

Г. Л. Волков, Т. Н. Платонова,
А. Н. Савчук, О. В. Горницкая,
Т. М. Чернышенко, Е. Н. Краснобрижая

СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О СИСТЕМЕ ГЕМОСТАЗА



НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ ИМ. А.В. ПАЛЛАДИНА
NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF UKRAINE
PALLADIN INSTITUTE OF BIOCHEMISTRY

Akusher-Lib.ru

G.L. VOLKOV, T.N. PLATONOVA,
A.N. SAVCHUK, O.V. GORNITSKAYA,
T.M. CHERNYSHENKO, E.N. KRASNOBRYZHAYA

MODERN CONCEPTIONS OF HEMOSTASIS SYSTEM

*“SCIENTIFIC BOOK”
PROJECT*

KIEV
NAUKOVA DUMKA
2005

Г.Л. ВОЛКОВ, Т.Н. ПЛАТОНОВА,
А.Н. САВЧУК, О.В. ГОРНИЦКАЯ,
Т.М. ЧЕРНЫШЕНКО, Е.Н. КРАСНОБРИЖАЯ

СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О СИСТЕМЕ ГЕМОСТАЗА

*ПРОЕКТ
“НАУКОВА КНИГА”*

КИЕВ
НАУКОВА ДУМКА
2005

В монографии представлены теоретические и практические аспекты биохимических механизмов и процессов, которые лежат в основе функционирования системы гемостаза. Приведены последние данные о функционировании основных звеньев системы гемостаза, их взаимодействии и взаиморегуляции, что является основой физиологического протекания биохимических процессов, направленных на поддержку жидкого состояния крови. Содержатся наиболее существенные сведения об основных белковых молекулах — факторах системы свертывания крови и фибринолиза, физиологических антикоагулянтах и ингибиторах фибринолитической системы; о процессах, лежащих в основе синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови. Рассмотрены сосудисто-тромбоцитарный гемостаз, структура и функции тромбоцитов, их активация, агрегация и участие в формировании тромба. Широко отображены патологические изменения, происходящие в системе гемостаза при разных заболеваниях. Освещены методические и методологические подходы для своевременной и качественной диагностики состояния системы гемостаза при различных патологиях.

Для научных работников, занимающихся исследованием системы свертывания крови, биологов и врачей.

У монографії наведено теоретичні та практичні аспекти біохімічних механізмів і процесів, що лежать в основі функціонування системи гемостазу. Подано останні дані стосовно функціонування ключових ланок системи гемостазу, їх взаємодії і взаєморегуляції як основи фізіологічного перебігу біохімічних процесів, спрямованих на підтримання рідкого стану крові. Вміщено найістотніші дані про основні білкові молекули — фактори системи зсідання крові та фібринолізу, фізіологічні антикоагулянти та інгібітори фібринолітичної системи; про процеси, що лежать в основі синдрому дисемінованого внутрішньосудинного зсідання крові. Розглянуто судинно-тромбоцитарний гемостаз, структуру і функції тромбоцитів, їх активацію, агрегацію та участь у формуванні тромбу. Широко відбито патологічні зміни, що відбуваються в системі гемостазу за різних захворювань. Висвітлено методичні й методологічні підходи для своєчасної та якісної діагностики стану системи гемостазу за різних патологій.

Для науковців, які займаються дослідженням системи зсідання крові, біологів та лікарів.

*Утверждено к печати ученым советом
Института биохимии им. А.В. Палладина НАН Украины*

***Видання здійснене за державним контрактом
на випуск наукової друкованої продукції***

Редакция медико-биологической, химической
и геологической литературы

Редактор *Н.А. Серебрякова*

© Г.Л. Волков, Т.Н. Платонова,
А.Н. Савчук, О.В. Горницкая,
Т.М. Чернышенко, Е.Н. Краснобрижая,
2005

ISBN 966-00-0447-8

*Посвящается выдающемуся ученому-биохимику,
основоположнику учения о системе гемостаза в Украине,
основателю отдела структуры и функции белка
Владимиру Александровичу БЕЛИЦЕРУ*

ПРЕДИСЛОВИЕ

Процесс научного поиска непременно, рано или поздно, приводит к этапу осмысления результатов экспериментов, т.е. согласно философскому учению, — к синтезу фрагментов знаний, собранных тяжелым трудом не одного поколения ученых. Фактически в такой период вступили и специалисты одной из известнейших школ изучения системы гемостаза, созданной еще в 1940-е годы выдающимся биохимиком академиком Владимиром Александровичем Белицером. Эта монография является первым шагом к консолидации и осмыслению всей суммы знаний, полученных как школой Белицера (отдел структуры и функции белка Института биохимии им. А.В. Палладина), так и другими школами, группами ученых, отдельными научными сотрудниками. Следует отметить, что большая часть других школ и ученых были рождены или “инфицированы” идеями В.А. Белицера, а также широко использовали (и/или используют) научные кадры, которые продолжает активно воспитывать школа Белицера.

Прогресс в области изучения процесса свертывания крови в последнее десятилетие способствует бурному развитию диагностики и профилактики геморрагических диатезов и тромбозов.

Научные сотрудники найдут в данной книге теоретические и практические аспекты биохимических механизмов и процессов, составляющих основу функционирования системы гемостаза. Особое внимание уделено последним данным о функционировании ключевых звеньев системы гемостаза — каскада коагуляционного и фибринолитического звеньев, характеристике большинства входящих в них белков, а также данным об их взаимодействии и взаиморегуляции как основе физиологического протекания биохимических процессов, направленных на поддержку жидкого состояния крови, об основных белковых молекулах — факторах системы свертывания крови и фибринолиза, фи-

зиологических антикоагулянтах и ингибиторах фибринолитической системы. Детально рассматривается сосудисто-тромбоцитарный гемостаз, описаны структура и функции тромбоцитов, их активация, агрегация и роль в формировании тромба.

От понимания механизмов функционирования системы гемостаза к использованию теоретического достояния в клинической практике не очень простой путь. Наша школа никогда не теряла практического интереса к использованию собственных результатов, не отмежевывалась даже от очень трудных для понимания клинических экспериментов. Поэтому для клиницистов в этой книге приведены сведения о процессах, составляющих основу синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови. Уделено внимание патологическим изменениям, которые происходят в системе гемостаза при разных заболеваниях, продемонстрированы методические и методологические подходы для проведения своевременной и качественной диагностики состояния системы гемостаза при различных патологиях (алгоритмы диагностики отдельных патологий, комплексы тестов для скрининг-анализа и более детального исследования специфических параметров системы гемостаза).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

α_2 -АП	— α_2 -антиплазмин
α_2 M	— α_2 -макроглобулин
CAM	— клеточная адгезивная молекула
FcR γ	— γ -цепь Fc-рецептора
GMP	— белок мембраны гранулы
GP	— гликопротеин
CAM	— внутриклеточная адгезивная молекула
IgCAM	— иммуноглобулинподобная клеточная адгезивная молекула
IGF	— инсулиноподобный фактор роста
ITAM	— тирозинсодержащий активированный мотив
LFA	— лейкоцитарный интегрин
Mac	— комплементсвязывающий интегрин
PDGE	— фактор роста тромбоцитов
PECAM	— адгезивная молекула эндотелиальных клеток
PF	— тромбоцитарный фактор
PGI	— простагландин
TAFI	— активируемый тромбином ингибитор фибринолиза
TGF α	— трансформирующий фактор роста
TxA $_2$	— тромбоксан A $_2$
u-APR	— урокиназный рецептор
VCAM	— адгезивная молекула клеток сосудов
VEGF	— фактор роста сосудистого эндотелия
VLA	— very late antigen
AB	— анцистроновое время
АДФ	— аденозиндифосфат
АПСАК	— ацилированный комплекс плазминогена со стрептокиназой
АПФ	— ангиотензинпревращающий фермент
АПС	— активированный протеин С
АТФ	— аденозинтрифосфат
АЧТВ	— активированное частичное тромбопластиновое время
ВМК	— высокомолекулярный кининоген
Глу-Пг	— Глу-форма плазминогена
ГМК	— гладкомышечные клетки
ГМФ	— гуанидинмонофосфат
ГТФ	— гуанидинтрифосфат
ДВС	— диссеминированное внутрисосудистое свертывание крови

ИБС	— ишемическая болезнь сердца
КС	— кесарево сечение
Лиз-Пг	— Лиз-форма плазминогена
ЛСУ	— лизинсвязывающий участок
МЕ	— международные единицы
НАДФ	— никотинамиддифосфат
ОИМ	— острый инфаркт миокарда
ПАИ-1	— ингибитор активатора плазминогена первого типа
ПАИ-2	— ингибитор активатора плазминогена второго типа
ПАИ-3	— ингибитор активатора плазминогена третьего типа
ПАР	— протеиназаактивированный рецептор
ПВ	— протромбиновое время
Пг	— плазминоген
ПК	— прекалликреин
Пм	— плазмин
ПРФ	— продукты расщепления фибрина/фибриногена
ПС	— протеин С
п-УК	— проурокиназа
РФВЭ	— релаксирующий фактор, вызывающий вазодилаторный эффект
РФМК	— растворимые фибрин-мономерные комплексы
СК	— стрептокиназа
ТАП	— тканевый активатор плазминогена
ТАТ	— тромбин/антитромбиновый комплекс
ТВ	— тромбиновое время
ТЛТ	— тромболитическая терапия
ТМ	— тромбомодулин
ТПФ	— тромбиноподобные ферменты
ТФ (TF)	— тканевый фактор
ТЭЛА	— тромбоземболия легочной артерии
у-Па	— активатор плазминогена урокиназного типа
Ф	— фибриноген
ФАТ (PAF)	— фактор активации тромбоцитов
ФНО (TNF- α)	— фактор некроза опухолей
ФНП	— функционально неактивные формы протромбина
ФР (NO)	— фактор релаксации
цАМФ	— циклический аденозинмонофосфат
ЭАКК	— ϵ -аминокапроновая кислота
ЭВ	— экамулиновое время
ЭТ	— эндотелины
ЭФГ	— эндотелиальный фактор гиперполяризации
ЭФР	— эндотелиальный фактор роста
ЭФР(EGF)	— эпидермальный фактор роста
βFGF	— фактор роста фибробластов

ГЛАВА 1 СОСУДИСТО-ТРОМБОЦИТАРНЫЙ ГЕМОСТАЗ

Гемостаз (ст. греч. *haima* — кровь + *stasis* — состояние) — эволюционно сложившаяся защитная реакция организма, выражающаяся в остановке кровотечения при повреждении сосуда. Система гемостаза — совокупность сосудистых, тромбоцитарных и гуморальных компонентов плазмы крови, обеспечивающих быструю остановку кровотечения при повреждении сосуда.

Первое описание гемостаза дал Ф.В. Цан в 1882 г., который наблюдал формирование тромба на раневой поверхности сосудов лягушки. Было установлено, что образование тромба обусловлено адгезией (прилипанием) тромбоцитов к травмированному участку сосуда. Фундаментальным вкладом в учение о гемостазе явились работы А.А. Шмидта — основоположника ферментативной теории процесса свертывания крови [1].

Ниже приведены некоторые исторические даты в учении о гемостазе:

1551 г.	Инквизиция сожгла М. Сервета за гипотезу о том, что кровь циркулирует в легких
1628 г.	У. Гарвей изложил учение о кровообращении
1661 г.	М. Мальпиги открыл капиллярное кровообращение
1673 г.	Э. ван Левенгук открыл в крови животных и человека эритроциты, У. Хьюсон — лейкоциты
1676 г.	R. Wiseman описал патологическую сущность тромбоза и его распространение по венам
1731 г.	J. Petit установил, что кровь при свертывании прилипает к сосудистой стенке
1761 г.	J.B. Morgagni описал спонтанное разжижение сгустков крови трупов
1797 г.	H. Chaptal предложил термин “фибрин”
1803 г.	B. Otto впервые описал наследственное заболевание — гемофилию
1832 г.	J. Muller описал “жидкий фибрин”, циркулирующий в крови
1834 г.	H.M. de Blainville воспроизвел ДВС-синдром введением растертой ткани мозга внутривенно

- 1845—1856 гг. Р. Вирхов описал предшественник фибрина “фибриноген”. “Триада Вирхова”. Ввел термины “тромбоз” и “эмболия”
- 1853 г. Открытие ацетилсалициловой кислоты
- 1861—1892 гг. А.А. Шмидт выдвинул теорию ферментативного свертывания крови
- 1870 г. Л.Ш. Малассе ввел в лабораторную практику камеру для подсчета форменных элементов крови
- 1875 г. О. Hammarsten установил, что хлорид кальция ускоряет свертывание крови
- 1877—1878 гг. Ж. Гайем открыл кровяные пластинки
- 1882 г. Дж. Биццоццеро охарактеризовал кровяные пластинки (бляшки)
- 1888 г. П. Эрлих описал апластическую анемию
- 1892 г. И.И. Мечников обосновал учение о фагоцитозе
- 1893 г. J. Dastre ввел термин “фибринолиз”
- 1901 г. M. Dekhuysen ввел термин “тромбоциты”
- 1905 г. P. Morawitz сделал обзор о химии свертывания крови. Предложил графическое изображение свертывания крови
- 1907 г. А.М.Е. Шоффар описал гемолитическую анемию
- 1908 г. F. Trendelenburg описал операцию при ТЭЛА
- 1908 г. P. Nolf выдвинул гипотезу о непрерывном образовании фибрина и постоянном фибринолизе
- 1910 г. W.W. Duke разработал метод определения продолжительности кровотечения при проколе пальца
- 1913 г. R.I. Lee и P.D. White разработали метод определения времени свертывания крови в пробирке
- 1916 г. J. MacLean выделил из печени собак гепарин
- 1926 г. E.A. von Willebrand описал болезнь Виллебранда
- А.А. Богданов организовал первый в мире Институт переливания крови (ныне Центральный институт гематологии и переливания крови, г. Москва)
- 1927 г. М.И. Аришкин разработал диагностический метод стерильной пункции
- 1929 г. У. Касл выяснил причину злокачественной анемии — дефицит витамина B_{12} (цианкобаламина)
- 1933 г. D.A. Scott и A.F. Charle разработали промышленную технологию получения гепарина из легких крупного рогатого скота. W.S. Tillet и R.J. Garner обнаружили фибринолитическую активность стрептокиназы
- 1935 г. X. Dam открыл витамин К
- 1938—1942 гг. И.А. Кассирский разработал цитологическую диагностику лимфоузлов, селезенки и печени
- 1941 г. D.X. Campbell и K. Link из сладкого клевера выделили дикумарин
- 1942—1943 гг. А.В. Палладин создал антигеморрагический препарат викасол (витамин K_3)
- Конец 1940-х — начало 1950-х годов
- 1950 г. Е.Л. Ходорова, В.А. Белицер предложили и обосновали гипотезу образования сгустка фибрина
- 1953 г. Д.Л. Клейн впервые получил препарат плазминогена
- 1957 г. Факторам свертывания крови присвоены римские цифры, а тромбоцитарным факторам — арабские
- 1962 г. G.V. Vorn предложил метод определения агрегации тромбоцитов
- 1962 г. М.С. Мачабели описала тромбгеморрагический синдром
- 1967—1969 гг. М.Б. Берник и Г.С. Кваан обнаружили, что эмбриональные клетки почек продуцируют урокиназу в культуре

- 1969—1975 гг. В.А. Белицер установил роль ионов кальция в стабилизации структуры фибриногена и его фрагментов
- 1970—1980 гг. Активное развитие технологий получения рекомбинантных белков для создания диагностических и терапевтических препаратов
- 1971 г. Дж. Вейн установил роль аспирина в регуляции свертывания крови (блокирует синтез простагландинов)
- 1975 г. Изучается низкомолекулярный гепарин. Т. Аструп описал процесс “клеточного фибринолиза”
- 1982—1990 гг. В.А. Белицер, Л.В. Медведь создали субдоменную структуру молекулы фибриногена. Установлена роль отдельных субдоменов в процессе самосборки фибрина
- 1997 г. С. Прусинер открыл прион — принципиально новый возбудитель инфекционных болезней (Нобелевская премия в области физиологии и медицины)

Система гемостаза играет важную роль в жизнедеятельности организма и представляет собой сложную биологическую систему, которая предупреждает или останавливает кровотечение, а также способствует поддержанию крови в жидком состоянии благодаря взаимодействию двух основных механизмов гемостаза: сосудисто-тромбоцитарного (образующего первичный тромб) и коагуляционного. В сосудисто-тромбоцитарном гемостазе ведущая роль в остановке кровотечения принадлежит сосудистой стенке и тромбоцитам, в коагуляционном — системе свертывания крови.

Гемостаз представляет собой комплекс реакций, вовлекающих тромбоциты как в процесс свертывания крови, так и в процессы восстановления ткани после повреждения. Эндотелий играет важную роль в процессе внутреннего свертывания за счет отрицательных зарядов, активирующих факторы свертывания. При повреждении сосуда из эндотелия могут выделяться тканевые факторы свертывания, которые принимают участие во внешнем пути свертывания (см. вклейку, рис. 1).

Повреждение сосуда влечет за собой ряд ответных реакций:

- 1) возникает сокращение поврежденного сосуда (сужение просвета), которое является следствием действия повреждения на гладкомышечные клетки и следствием выделения серотонина;
- 2) происходит накопление тромбоцитов;
- 3) запускается механизм свертывания крови (активация факторов свертывания вплоть до образования тромбина), включая образование тромба;
- 4) активируются процессы фибринолиза.

Сосудисто-тромбоцитарный гемостаз представлен эндотелием, гладкой мускулатурой сосудов и тромбоцитами (*тромбоциты — форменные элементы крови, представляющие собой кровяные пластинки; наименьшие из всех клеток крови. Образуются в костном мозге. Количество их в 1 мм³ крови колеблется от 150 000 до 400 000*). Суть первичного тромбоцитарного гемостаза заключается в трехэтапном образовании тромбов в сосудах низкого давления (микроциркуляции):

- а) местной вазоконстрикцией (местное действие серотонина, адреналина, тромбоксана А₂);
- б) адгезией (прилипанием) тромбоцитов к поврежденному (обнаженному) коллагену эндотелия сосудов;

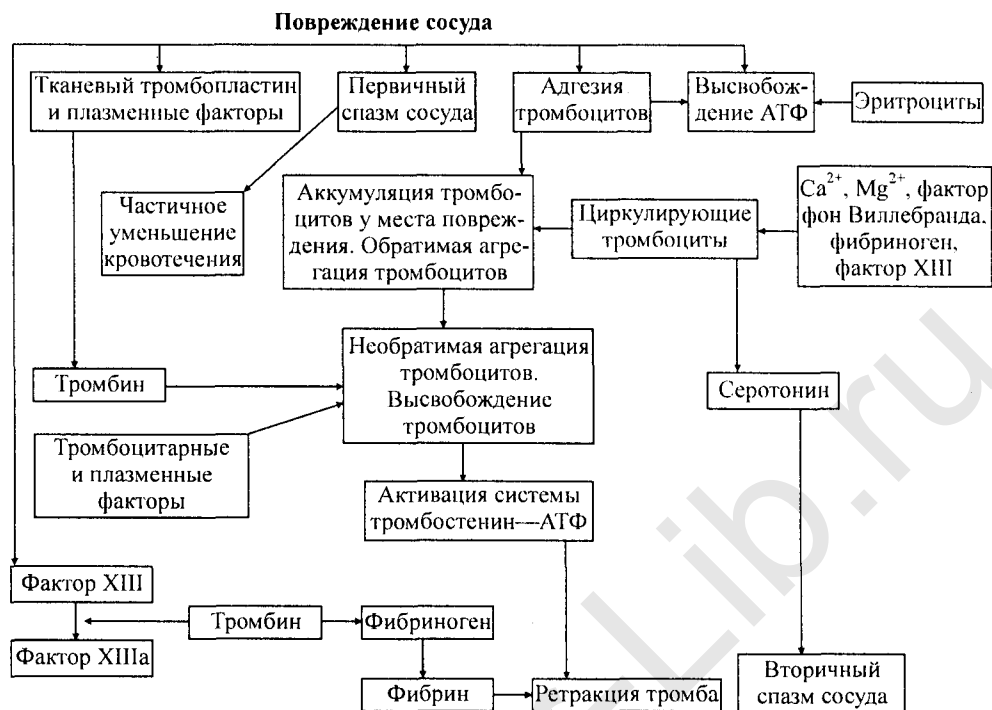


РИС. 1.1. Механизм сосудисто-тромбоцитарного гемостаза

в) формированием тромбоцитарных агрегатов с образованием белого тромба. В адгезии тромбоцитов принимают участие ионы кальция и синтезируемый в эндотелии сосудов белок — фактор фон Виллебранда [2].

Рассмотрим подробнее процесс накопления тромбоцитов в месте повреждения сосуда. Тромбоциты собираются у стенки поврежденного сосуда, так как нарушение целостности сосуда и прежде всего эндотелия, раскрывает ткани, находящиеся под эндотелием. Контакт тромбоцитов с подэндотелиальной тканью (субэндотелием) приводит к тому, что они приклеиваются к ней и активируются ею.

Активированные тромбоциты изменяют форму, значительно возрастает их способность прилипать друг к другу, на их поверхности появляется ряд веществ, влияющих на процесс свертывания крови.

Особую роль в активации тромбоцитов играет коллаген. Тромбоциты приклеиваются к коллагену, после чего начинается быстрое прилипание одного тромбоцита к другому. Вследствие этого образуется растущая компактная масса — тромбоцитарная гемостатическая пробка. Часть тромбоцитов пробки соединяется с сетью фибриновых волокон и, таким образом, участвует в образовании гемостатического тромба (рис. 1.1). Что же сдерживает рост тромбоцитарной пробки? Рост числа приклеивающихся друг к другу тромбоцитов и фибринового сгустка останавливается выделением специальных веществ из клеток, находящихся на границе с поврежденными клетками. Веществами, останавливающими агрегацию тромбоцитов, являются простациклин и плазменный антитромбин.

1.1. ЭНДОТЕЛИЙ

Термин *эндотелий* (от греч. *endon* — внутри + *thele* — сосок) предложен в 1865 г. W. His как дополнительный к термину “эпителий”. До 1930-х годов им обозначали выстилку сердца, кровеносных и лимфатических сосудов, серозных, синовиальных и мозговых оболочек, задней камеры глаза, респираторных путей. В настоящее время термин “эндотелий” (синоним — “сосудистый эндотелий”) применяется только для обозначения внутренней клеточной выстилки кровеносного и лимфатического русла. Эндотелий представлен однослойным пластом тесно прилегающих друг к другу плоских клеток (эндотелиоцитов), длиной 20—150 и шириной 10—20 мкм, обычно отграниченных от подлежащих тканей базальной мембраной; у эндотелия лимфатических сосудов базальная мембрана отсутствует. Это, как правило, одноядерные диплоидные клетки (доля двуядерных форм у млекопитающих колеблется от 0,2 до 5 %) толщиной 3—5 мкм в области ядра и 0,1—0,4 мкм — на периферии. Число взаимных контактов между эндотелиоцитами (степень связности) варьирует от 3 до 12. В организме взрослого человека содержится 10^{12} — 10^{13} эндотелиоцитов общей массой 1—2 кг с площадью выстилки сосудов около 700—1000 м². Цитоплазма клеток эндотелия некоторых капилляров может иметь поры, способствующие проницаемости веществ сквозь стенку капилляра (например, в сосудистых клубочках почки). Особенностью эндотелия расширенных капилляров (синусоидов) кровеносных органов, а также печени, коры надпочечников и некоторых других органов является высокая способность к фагоцитозу. Эти эндотелиальные клетки относятся к ретикуло-эндотелиальной системе [3].

В различных участках сосудистой системы эндотелиоциты находятся в неодинаковых условиях гемодинамики и метаболизма, вследствие чего они отличаются по ориентации относительно оси сосуда, форме, размерам, свойствам ядра и цитоплазмы и т.д. Это свойство эндотелия выделено Н.А. Шевченко и обозначено как полиморфизм или гетероморфизм [4].

Встречающееся в медицинской литературе использование термина *эндотелий* для обозначения других структур (“эндотелий роговицы”, “синовиальный эндотелий”) нельзя признать корректным. В научных источниках высказываются разные взгляды о месте эндотелия в системе тканей: его относят либо к эпителиям, либо рассматривают как одну из форм клеточной организации соединительной ткани. Наиболее обоснованной представляется точка зрения, высказанная Н.Г. Хлопиным, о том, что сосудистый эндотелий является тканью эпителиоморфного типа (специфическая разновидность однослойного плоского эпителия) [5]. Для эндотелия, как и для типичных эпителиев, характерны пограничное положение, отсутствие межклеточного вещества, наличие сходной по строению базальной мембраны (содержит коллаген IV типа и ламинин-альфа-4), полярность строения клеток, наличие системы межклеточных контактов, формирующих непрерывный клеточный пласт, общность механизмов роста в культуре и при репаративной регенерации.

1.1.1. Вещества, продуцируемые эндотелиоцитами

Основной причиной антикоагулянтной и сосудорасширяющей функции стенки сосудов является синтез эндотелием соответствующих биологически активных веществ. Вещества, вырабатываемые эндотелиоцитами, имеют очень короткий период полураспада. Это убеждает в том, что их паракринно-аутокринная роль (действие на соседние клетки и на эндотелий) — главная. Основным функциональным предназначением веществ, продуцируемых эндотелиоцитами, считают местный вазомоторный контроль. К таким веществам относят оксид азота, эндотелины, простагландины, фактор активации тромбоцитов и предсердные натрийуретические пептиды [6].

Оксид азота. Большое значение в поддержании нормального кровотока придается оксиду азота, который синтезируется эндотелием и является сигнальной молекулой в сердечно-сосудистой системе.

Оксид азота — основной стимулятор образования цГМФ. Увеличивая количество цГМФ, он уменьшает содержание кальция в тромбоцитах и гладких мышцах. цГМФ, активируя цГМФ-зависимую протеиназу, создает условия для открывания многочисленных калиевых и кальциевых каналов. Открывание их для калия приводит к расслаблению гладких мышц благодаря выходу из них калия и кальция при реполяризации (затухание биотока действия). Активирование каналов $K_{Ca^{2+}}$, плотность которых на мембранах очень велика, является основным механизмом действия NO. Поэтому его конечный эффект — антиагрегирующий, антикоагулянтный и сосудорасширяющий. NO предупреждает также рост и миграцию гладких мышц сосудов, тормозит выработку адгезивных молекул, препятствует развитию спазма в сосудах. Он выполняет функции нейромедиатора, транслятора нервных импульсов, участвует в механизмах памяти, обеспечивает бактерицидный эффект [7].

Основным стимулятором активности NO является напряжение сдвига. Образование NO увеличивается также под действием ацетилхолина, кининов, серотонина, катехоламинов и др. При интактном эндотелии многие вазодилататоры (гистамин, брадикинин, ацетилхолин и др.) оказывают сосудорасширяющий эффект через NO. Особенно сильно он расширяет мозговые сосуды.

Если функции эндотелия нарушены, ацетилхолин вызывает либо ослабленную, либо ошибочную реакцию. Поэтому реакция сосудов на ацетилхолин является показателем состояния эндотелия сосудов и используется в качестве теста его функционального состояния.

Полагают, что сосудорасширяющее действие оксида азота (NO) направлено против сосудосужающего эффекта эндотелинов (ЭТ) — аминокептидов, которые вырабатывает эндотелий в ответ на повреждение.

Эндотелины — группа полипептидов, состоящая из трех изомеров (эндотелин-1, эндотелин-2 и эндотелин-3), отличающихся некоторыми вариациями и последовательностью расположения аминокислот. Открытие эндотелинов в 1988 г. позволило объяснить ряд непонятных феноменов гемостаза в норме и при патологии.

Основной механизм действия эндотелинов заключается в высвобождении кальция, что вызывает:

- 1) стимуляцию всех фаз гемостаза, начиная с агрегации тромбоцитов и заканчивая образованием красного тромба;
- 2) сокращение и рост гладких мышц сосудов, приводящие к вазоконстрикции.

Синтез эндотелинов усиливают тромбин и тромбоциты. Эндотелины, в свою очередь, вызывают адгезию и агрегацию тромбоцитов.

Эффекты эндотелинов неоднозначны и определяются рядом причин. Наиболее активен изомер эндотелин-1. Он образуется не только в эндотелии, но и в гладких мышцах сосудов, нейронах, глие, мезенгиальных клетках почек, печени и других органах. Период полужизни — 10—20 мин, в плазме крови — 4—7 мин. Легкие удаляют до 90 % эндотелинов. Эндотелин-1 участвует в ряде патологических процессов (инфаркт миокарда, нарушение ритма сердца, легочная и системная гипертония, атеросклероз и др.) [8].

Эффекты эндотелинов определяются также свойствами рецепторов, с которыми эндотелины соединяются. Связываясь с эндотелин-А-рецепторами, они тормозят синтез NO в сосудах и вызывают их сужение; присоединившись к рецепторам В-1, — вызывают расширение сосудов (тормозится образование цАМФ и усиливается синтез NO).

Сосудосужающий потенциал ЭТ-1, который считается наиболее активной в биологическом отношении формой, в 10 раз выше, чем у ангиотензина II. Установлено, что повышенное содержание эндотелинов в крови коррелирует у больных с тяжестью повреждения, связанного с обширными травмами и операциями, кардиогенным шоком и сепсисом. Местное действие эндотелинов считают основным.

Простациклин. Важную роль в гемостазе и гемодинамике играет и другой мощный антикоагулянт — простациклин (простагландин PGI_2). Стимуляторами образования простациклина являются напряжение сдвига, кинины и ангиотензин I. Под действием циклооксигеназы отщепляется арахидоновая кислота, которая затем превращается в простагландины (PGI_2 и PGH_2) — нестойкие соединения. Из них под действием фермента простациклин-синтетазы образуется простациклин. Последний, действуя на мембрану гладких мышц, включает мессенджеры II типа — аденилатциклазу, увеличивающую в клетке содержание цАМФ, который снижает в них уровень Ca^{2+} .

Таким образом, простациклин действует как антиагрегант, антикоагулянтный фактор, причем механизм его действия такой же, как и оксида азота: удаление ионов кальция из гладких мышц, что препятствует спазму сосудов, агрегации тромбоцитов и свертыванию крови. Простациклин и оксид азота нормализуют липидный обмен, предупреждая развитие атеросклероза, тормозят ростовой процесс.

Эндотелиоциты синтезируют и простагландин E_2 , который способствует расширению сосудов и агрегации тромбоцитов. Фактор активации тромбоцитов (ФАТ), являющийся составной частью фосфолипидных мембран, рассматривается в качестве возможного медиатора гемодинамических и метаболических эффектов эндотоксинов. Назначение антагонистов, специфиче-

ских для рецепторов ФАТ, улучшает выживаемость лабораторных животных при сепсисе и геморрагическом шоке [9].

Тромбомодулин. Эндотелий сосудов синтезирует одноцепочный гликопротеид — тромбомодулин, выполняющий функцию рецептора тромбина. Тромбомодулин определяет скорость и направление процесса гемостаза. Тромбин, присоединившись к тромбомодулину, активирует протеин С, который проявляет регуляторные свойства, препятствуя свертыванию и активируя фибринолиз.

В норме эндотелий инактивирует процессы свертывания еще и по другим механизмам. Одним из них является синтез антитромбина III, который в комплексе с гепарином ингибирует тромбин и ряд других активированных факторов системы свертывания крови. Образуется гепарин в печени, легких базофилами, тучными клетками. Сам эндотелий синтезирует гепариноподобные глюкозаминогликаны, содержащие пентасахарид, и экспрессирует их на поверхность клеток. Создание на клетках участков связывания антитромбина III ускоряет нейтрализацию тромбина.

Таким образом, в нормальных физиологических условиях эндотелий сосудов препятствует агрегации тромбоцитов, свертыванию крови и спазмированию сосудов, синтезируя группу биологически активных веществ: оксид азота, простаглицлин, антитромбин III и др. Кроме того, эндотелий, образуя тромбомодулин, блокирует активные коагулянты, выделяющиеся печенью и находящиеся в плазме крови (тромбин). И, наконец, эндотелий адсорбирует антикоагулянты из плазмы крови, препятствуя адгезии и агрегации тромбоцитов на своей поверхности (гепарин, протеины С и S).

Ренин-ангиотензивная система. Эндотелий сосудов участвует в формировании активной агрегирующей и вазоконстрикторной системы — ангиотензивной [10]. Активной формой этой системы является ангиотензин II — октапептид, вызывающий генерализованную и очень сильную (в 50 раз сильнее адреналина) реакцию. Период полужизни ангиотензина II — 10—12 мин.

Предшественником ангиотензина II служит ангиотензиноген, образующийся в печени. Ренин, синтезируясь в юктагломерулярном аппарате почек, превращает ангиотензиноген в практически неактивный ангиотензин I. Последний переходит в биологически активный ангиотензин II под влиянием ангиотензинпревращающего фермента (АПФ), вырабатываемого, в основном, эндотелием сосудов. Особенно много АПФ синтезируется в легких, где имеется богатая сосудистая сеть.

Влияние ангиотензина II на органы осуществляется через специфические рецепторы двух типов. Спектр влияния ангиотензина достаточно широк. Так, ангиотензин II вызывает:

- повышение сосудистого тонуса (сокращение гладких мышц сосудов);
- увеличение объема циркулирующей крови, что происходит благодаря активизации выделения альдостерона (увеличивающего реабсорбцию натрия) и усилению секреции АДГ (задерживающего воду в организме);
- положительные тропные влияния на миокард, приводящие к увеличению минутного объема сердца;

повышение содержания ингибитора тканевого активатора плазминогена в кровотоке.

Следствием всех вышеупомянутых эффектов является повышение артериального давления под действием ангиотензина II.

Предсердные натрийуретические пептиды, или факторы, выделяются ЦНС и предсердиями в ответ на перерастяжение желудочков сердца и снижение секреции альдостерона. Роль этих веществ в ответе организма на повреждение остается невыясненной [3].

Кроме перечисленных выше биологически активных веществ, эндотелий вырабатывает еще большое число вазоактивных факторов, участвующих в гемостазе.

Важная роль отводится **фибронектину** — гликопротеину, состоящему из двух полипептидных цепей, соединенных дисульфидными связями. Вырабатывается он клетками сосудистой стенки, тромбоцитами. Фибронектин является рецептором для фибринстабилизирующего фактора. Способствует адгезии тромбоцитов, участвуя в образовании белого тромба, связывает гепарин. Присоединяясь к фибрину, фибронектин уплотняет тромб. Под его действием клетки гладких мышц, эпителиоцитов, фибробластов повышают свою чувствительность к факторам роста, что может вызвать утолщение мышечной стенки сосудов (сужение диаметра).

Фактор фон Виллебранда (VIII — vWF) синтезируется в эндотелии и мегакариоцитах; сульфатированный гликопротеин молекулярной массой 1000 кДа; стимулирует начало тромбообразования: способствует прикреплению рецепторов тромбоцитов к коллагену и фибронектину сосудов, а также друг к другу, т. е. усиливает адгезию и агрегацию тромбоцитов. Синтез фактора фон Виллебранда и выброс его в кровоток возрастают под влиянием вазопрессина, при повреждении эндотелия. Поскольку все стрессовые состояния увеличивают выделение вазопрессина, то при экстремальных состояниях тромбогенность сосудов возрастает, чему способствует повышение синтеза фактора фон Виллебранда [2].

Тромбоксан A_2 (TxA_2) — мощный активатор агрегации тромбоцитов — способствует быстрой агрегации тромбоцитов, увеличивает доступность их рецепторов для фибриногена, сужает кровеносные сосуды, вызывает спазм бронхов. TxA_2 вырабатывается гладкими мышцами сосудов, тромбоцитами. Одним из факторов, стимулирующих выделение тромбксана A_2 , является кальций, который в большом количестве высвобождается из тромбоцитов в начале их агрегации. Кальций активирует фосфолипазу A_2 , превращающую арахидоновую кислоту в простагландины PGI_2 , PGH_2 , а последний — в тромбоксан A_2 . Кроме того, кальций активирует сократительные белки тромбоцитов, что усиливает их агрегацию и реакцию высвобождения [3].

Тромбоспондин — гликопротеин, который вырабатывается эндотелием сосудов, однако находится и в тромбоцитах. Образует комплексы с коллагеном, гепарином, является сильным агрегирующим фактором, опосредуя адгезию тромбоцитов к субэндотелию.

1.1.2. Основные функции сосудистого эндотелия

Как известно, артериальная стенка состоит из трех основных слоев: интимы, меди (гладкой мускулатуры) и адвентиции (наружного слоя, содержащего кровеносные сосуды, которые питают саму стенку, — *vasa vasorum*, и нервные окончания). Основным компонентом интимы является эндотелий (или эндотелиальная выстилка) — единичный слой тонких клеток, обладающих крайне высокой метаболической и секреторной активностью. Эндотелий играет ключевую роль в контроле сосудистого тонуса, обеспечивая тонкую регуляцию просвета сосуда в зависимости от скорости кровотока и кровяного давления на сосудистую стенку, метаболических потребностей участка ткани, снабжаемого данным сосудом и т. д. (рис. 1.2). Впервые о самостоятельной роли эндотелия в регуляции сосудистого тонуса было заявлено в 1980 г. [11]. Авторы обнаружили способность изолированной артерии к самостоятельному изменению своего мышечного тонуса в ответ на ацетилхолин без участия центральных (нейрогуморальных) механизмов.

Главная заслуга в этом отводилась эндотелиальным клеткам, которые были охарактеризованы как “сердечно-сосудистый эндокринный орган, осуществляющий связь в критических ситуациях между кровью и тканями”.

За последние 20 лет было доказано, что эндотелий — это не пассивный барьер между органами и тканями, а активный орган, чья дисфункция является обязательным компонентом практически всех сердечно-сосудистых заболеваний, включая атеросклероз, гипертонию, ИБС, ХСН. Он также участвует в воспалительных реакциях, аутоиммунных процессах, диабете, тромбозе, сепсисе, росте злокачественных опухолей и др. (см. вклейку, рис. 2, а). Выстилая просвет сосудов изнутри, эндотелий удерживает элементы крови в сосудистом русле, препятствует их миграции в интерстициальное пространство.

Пограничное положение эндотелия между кровью и рабочими элементами органов обуславливает выполнение трех основных задач:

- обеспечение непрерывного обмена веществ;
- поддержание тромборезистентности люминальной поверхности эндотелиоцитов;
- участие в синтезе и метаболизме различных биологически активных веществ.

В эндотелии микроциркуляторного русла преобладает обменная, а в магистральных сосудах — метаболическая и синтетическая функции. Обменная

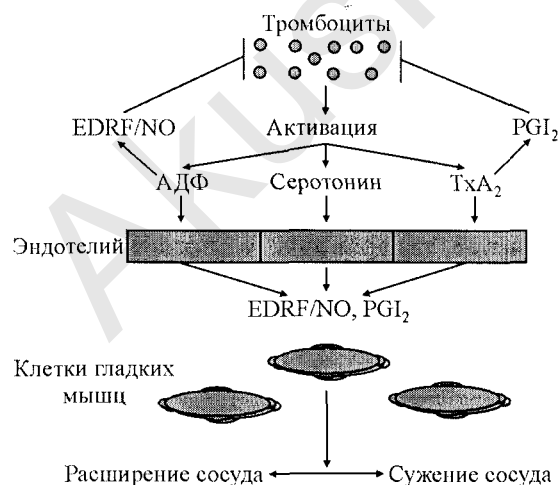


РИС. 1.2. Тромбоцитзависимая регуляция сосудистого тонуса [34]

функция реализуется через механизмы трансэндотелиального транспорта. Он осуществляется как интерцеллюлярно — через межклеточные контакты (размер транспортируемых частиц 10 нм) или межклеточные щели (размер переносимых частиц 100 нм), так и трансцеллюлярно — диффузией (газы, ионы, липиды, вода) посредством микропиноцитозных везикул и трансэндотелиальных каналов (размер частиц 100 нм), а также через фенестры и поры (размер частиц 90 нм) [12].

Синтетическая и метаболическая функции включают:

- синтез и метаболизм вазоактивных веществ (эндотелинов, простагландинов E_4 и F_4 , ангиотензина I-AI и, возможно, ангиотензина II-AII, простациклина, тромбосана, оксида азота);
- захват и инактивацию ацетилхолина, катехоламинов, брадикинина, серотонина, гистамина и гепарина;
- выработку стимуляторов (фактор роста сосудистого эндотелия VEGF, щелочной фактор роста фибробластов β FGF, фактор роста тромбоцитов PDGF, инсулиноподобный фактор роста IGF-1) и ингибиторов (трансформирующий фактор роста TGF_{β} , интерлейкин-1) клеточной пролиферации — основного цитологического механизма ангиогенеза;
- секрецию цитокинов, регулирующих кроветворение, пролиферацию и дифференцировку Т- и В-лимфоцитов;
- синтез компонентов базальной мембраны.

Препятствие процессу свертывания крови и участие в фибринолизе:

- тромборезистентная поверхность эндотелия (одинаковые заряды поверхности эндотелия и тромбоцитов препятствуют адгезии тромбоцитов к стенке сосуда);
- образование простациклина и NO-естественных дезагрегантов;
- образование тканевого активатора плазминогена;
- экспрессия на поверхности клеток эндотелия тромбомодулина — белка, способного связывать тромбин, и гепариноподобных гликозаминогликанов.

Иммунные функции:

- представление антигенов иммунокомпетентным клеткам;
- секреция интерлейкина-1 (стимулятора Т-лимфоцитов).

Ферментативная активность:

- экспрессия на поверхности эндотелиальных клеток ангиотензинпревращающего фермента (АПФ) (конверсия AI в AII).

Участие в регуляции роста гладкомышечных клеток (ГМК):

- секреция эндотелиального фактора роста (ЭФР);
- секреция гепариноподобных ингибиторов роста.

Защита гладкомышечных клеток от вазоконстрикторных влияний:

- важность сохранения целостности эндотелия для ряда сосудорасширяющих агентов, например ацетилхолина.

Эндотелий ежесекундно подвергается внешнему воздействию со стороны множества факторов, “атакующих” его поверхность из просвета сосуда и являющихся стимулами “гормонального” ответа эндотелиальной клетки (т. е. синтеза и выделения целого ряда вазоактивных соединений). В упрощен-

ном виде можно выделить три основных фактора, стимулирующих клетки эндотелия.

1. Изменение скорости кровотока — увеличение напряжения сдвига (например, при артериальной гипертензии кровь, протекающая по сосуду в условиях повышенного артериального давления, может повредить целостность эндотелиальной выстилки и привести к возникновению эндотелиальной дисфункции).

2. Циркулирующие и /или “внутристеночные” нейrogормоны (катехоламины, вазопрессин, ацетилхолин, брадикинин, аденозин, гистамин и др.).

3. Факторы тромбоцитарного происхождения, выделяющиеся из тромбоцитов при их активации (серотонин, АДФ, тромбин).

В норме в ответ на эти стимулы клетки эндотелия реагируют усилением синтеза веществ, вызывающих расслабление гладкомышечных клеток сосудистой стенки и, в первую очередь, эндотелиального фактора релаксации, ЭФР (который является не чем иным как оксидом азота — NO), простаглицлина, эндотелиального фактора гиперполяризации (ЭФГ) (см. вклейку, рис. 2, б). При повреждении сосуда активированные тромбоциты подвергаются ингибиторному действию простаглицлинов PGI_2 и NO, высвобожденным эндотелием (I). Образование тромба инициируется экспонированием в стенке сосуда коллагена и фактора фон Виллебранда (II), а также местным генерированием тромбина. Катящиеся тромбоциты прилипают и распластаются на коллагеновом матриксе, образуя монослой, который является основой для привлечения тромбоцитов, активированных тромбином, АДФ и тромбоксаном A_2 (III). Вследствие тесного контакта между тромбоцитами растет и стабилизируется тромбоцитарная пробка (IV). Наибольшее значение придается оксиду азота, который имеет критическое значение в поддержании должного сосудистого тонуса и, соответственно, необходимой величины локального кровотока через сосуд [13]. Важно отметить, что хотя NO и является наиболее мощным из известных на сегодня сосудорасширяющим агентом, его влияние не ограничивается дилатацией локального участка: NO способен подавлять пролиферативный ответ гладкомышечных клеток сосудистой стенки и оказывать целый ряд системных эффектов в просвете сосуда: блокировать агрегацию тромбоцитов, окисление липопротеинов низкой плотности, экспрессию адгезивных молекул, “прилипание” моноцитов и тромбоцитов к стенке сосуда, продуцирование эндотелина и др.

В определенных ситуациях (например, острая гипоксия или кровотечение) клетки эндотелия, напротив, становятся “причиной” сужения сосудов как за счет снижения содержания NO, так и вследствие усиленной выработки веществ с сосудосуживающим эффектом — эндотелина-1 (одного из наиболее мощных вазоконстрикторов эндогенного происхождения), сверхокисленных анионов, простаглицлинов типа тромбоксана A_2 и др.

Основная точка приложения как расслабляющих, так и сужающих факторов — располагающиеся под эндотелием гладкомышечные клетки, однако все они могут выделяться в просвет сосуда и действовать на близлежащие эндотелиальные клетки (так называемая паракринная активность) [14].

При длительном воздействии различных повреждающих факторов (гипоксия, интоксикация, воспаление, гемодинамическая перегрузка и др.)

происходит постепенное нарушение функционирования эндотелия — возникает его дисфункция. В современной фундаментальной кардиологии ключевая роль в инициации повреждения эндотелия отводится так называемому оксидативному стрессу — процессу, заключающемуся в накоплении внутри клеток свободных радикалов, крайне неблагоприятно влияющих на функцию и целостность клетки (помимо окислительного стресса самостоятельное влияние могут оказывать липопротеины низкой плотности, никотин). Процессы накопления свободных радикалов, в свою очередь, активируются при ишемии/гипоксии, под действием ряда известных факторов риска развития ИБС, а также являются основой для так называемого реперфузионного повреждения — повреждения эндотелия, происходящего при восстановлении кровотока через “инфарктсвязанную” артерию.

Эндотелиальная дисфункция — достаточно многогранный процесс, основными проявлениями которого являются следующие моменты:

1) *нарушение биодоступности NO* (считается, что именно это обстоятельство играет ключевую роль в наступлении дисфункции эндотелия под влиянием известных факторов риска ИБС—АГ, курения, дислипидемий, диабета):

- подавление экспрессии/инактивации эндотелиальной NO-синтазы (фермента, ответственного за синтез NO из L-аргинина) и снижение синтеза NO;

- снижение на поверхности эндотелиальных клеток плотности рецепторов (в частности, мускариновых), раздражение которых в норме приводит к образованию NO;

- повышение деградации NO — разрушение NO наступает прежде, чем вещество достигнет своего места действия (так действует, например, супероксидный анион — один из продуктов оксидативного стресса);

2) повышение активности АПФ на поверхности эндотелиальных клеток;

3) повышение выработки клетками эндотелия эндотелина-1 и других сосудосуживающих факторов;

4) при тяжелом поражении эндотелия нарушение его целостности, и появление в интима участках, лишенных эндотелиальной выстилки (деэндотелизация). Это приводит к тому, что нейрогормоны, минуя эндотелий, непосредственно взаимодействуют с гладкомышечными клетками и вызывают их сокращение.

В целом суть эндотелиальной дисфункции можно сформулировать следующим образом: вещества, которые в нормальных условиях вызывают расширение сосудов (через взаимодействие с соответствующими рецепторами на поверхности эндотелия и выделения последним NO), при дисфункции эндотелия теряют способность оказывать свое релаксирующее действие и даже могут вызывать спазм. Таким образом, происходит постепенное истощение и извращение компенсаторной “расширяющей” способности эндотелия, и преимущественным “ответом” эндотелиальных клеток на обычные стимулы становится сужение сосудов и пролиферация.

1.1.3. Физиология и биохимия эндотелия

Эндотелий сосудов синтезирует и секретирует мощный ингибитор агрегации тромбоцитов — простаглицлин, фиксирует на своей поверхности ряд естественных антикоагулянтов, вырабатывает активаторы фибринолиза. Остановка кровотечения обеспечивается взаимодействием эндотелия с клетками крови, в процессе чего эндотелиальные клетки вырабатывают факторы, направленные на образование тромба: фактор фон Виллебранда, коллаген (см. вклейку, рис. 3).

Взаимодействие эндотелия с клетками крови имеет ряд особенностей. Так, лейкоциты свободно циркулируют в кровотоке и не взаимодействуют с эндотелием кровеносных сосудов. Непосредственный контакт начинается только в случае повреждения тканей. Реакция лейкоцитов на повреждение эндотелия выражается в их качении к месту травмы, адгезии, инвазии. Эти процессы требуют экспрессии на эндотелии многих адгезивных рецепторов различных клеток и их лигандов, или контррецепторов лейкоцитов. Ниже приведены адгезивные рецепторы эндотелиальных клеток и их лейкоцитарные лиганды:

Адгезивные эндотелиальные рецепторы	Лейкоцитарные лиганды
Суперсемейство иммуноглобулинов (Ig)	Интегрины
ICAM-1	$\alpha_1\beta_2$ (CD11a/CD18) и $\alpha_M\beta_2$ (CD11b/CD18)
ICAM-2	$\alpha_1\beta_2$ (CD11a/CD18)
VCAM-1	Интегрин $\alpha_4\beta_1$ (VLA-4)
PECAM-1 (CD31)	Не обнаружен
Селектины	
Е-селектин	Антиген сиалил-Левис
P-селектин	Не обнаружен
Адрессин	L-селектин
GlyCAM-1	

Процесс качения выражается в медленном движении лейкоцитов через люминальный сосуд и миграции вдоль поверхности эндотелия (рис. 1.3). Различные агонисты, такие, как тромбин, гистамины, компоненты компонента, пероксид водорода и цитокины, вызывают быстрое, но кратковременное появление на поверхности эндотелия P-селектина, высвобождающегося из телец Вайбеля-Палада. Экспрессия этого белка, продолжающаяся несколько минут, вызвана экспрессией E-селектина, который необходим для агрегации лейкоцитов, и синтезируется в присутствии TNF- α , IL-1 и липополисахарида [15, 16].

P- и E-селектины являются адгезивными рецепторами лейкоцитов. Эти трансмембранные белки содержат (последовательно) N-концевые Ca²⁺-зависимый лектиновый, EGF-подобный, комплементсвязывающий домены и C-концевые трансмембранный и цитоплазматический домены. Каждый из этих доменов тесно коррелирует с экзон-интронной структурой каждого белка.



Рис. 1.3. Взаимодействие лейкоцитов с эндотелием [10]

В случае качения лейкоцитов на поверхности активированных нейтрофилов экспрессируются функционально активные β_2 -интегрины. Например, $\alpha_L\beta_2$, или CD11a/CD18, или лейкоцитарный антиген-1 связываются с адгезивными рецепторами эндотелиальных клеток ICAM-1 и ICAM-2. ICAM-1 медленно (более 24 ч) экспрессируется на поверхности сосудистого эндотелия с последующей активацией TNF- α , интерфероном- γ или IL-1. Экспрессия продолжается в присутствии цитокинов, которые повышают экспрессию мРНК ICAM-1 [17].

ICAM-1 и ICAM-2 относятся к семейству иммуноглобулинов. Структура молекулы этих белков представлена пятью непарными иммуноглобулиновыми доменами, соединенными конец к концу, и внеклеточным доменом с иммуноглобулинподобной структурой, которая функционирует как CAM. ICAM-2 имеет два иммуноглобулиновых домена с 35 % гомологии, соответствующей доменам ICAM-1. Оба белка посредством иммуноглобулинового домена связывают лейкоцитарный $\alpha_L\beta_2$. Интересно, что с этим доменом связывается также большая группа риновирусов человека. Третий иммуноглобулинподобный домен ICAM-1 является центром связывания интегрина $\alpha_M\beta_2$ (CD11b/CD18, или Mac-1).

ICAM-1 участвует в иммунных и воспалительных реакциях разного рода клеток (кроме эндотелия), включая лимфоциты, фибробласты и эпителиальные клетки, тогда как ICAM-2 экспрессируется только на эндотелии. *In vivo* экспрессия на эндотелии ICAM-1 происходит в случае гиперчувствительных кожных реакций и после введения интерлейкина-1 и интерферона- γ .

К семейству иммуноглобулинов относится также адгезивная молекула-1 (VCAM-1). Впервые этот белок обнаружен на эндотелии, доступном воспалительным цитокинам (IL-1, TNF) и LPS. С VCAM-1 связываются некоторые виды лейкоцитов, включая моноциты, Т- и В-лимфоциты, базофилы и эозинофилы. Лейкоцитарным лигандом для VCAM-1 является VLA-4 семейства интегринов β_1 . Значение VCAM-1 в воспалительном ответе подтверждается его повышенной экспрессией в посткапиллярном веноулярном эндотелии во время осложнений при пересадке сердца [18].

Контакт между лейкоцитами и эндотелием предполагает вовлечение нейтрофилов, адгезия которых к эндотелию связана с цитотоксичностью. Поверхностная активация НАДФ-оксидазы и генерация нейтрофилами пероксида водорода и супероксид-ионов связана с повреждением клеток сосуда.

Существует концепция, что лимфоциты перемещаются из кровотока в лимфатические ткани через специальные сосуды, или эндотелиальные венылы. Специфические рецепторы на лимфоцитах направляют их в эти венылы во всех лимфоидных тканях, включая лимфоузлы. Описано как минимум три типа эндотелиальных рецепторов для Т-лимфоцитов. Взаимодействие лимфоциты—эндотелий является первым шагом в миграции лимфоцитов к месту воспаления. Лимфоцитарный CD11a/CD18 опосредует связывание с ICAM-1. Второй этап адгезии включает связывание интегрина $\alpha_4\beta_1$ (VLA-4) на Т-лимфоцитах с VCAM-1 на эндотелии. Третьим рецептором является E-селектин. Разные пути адгезии возможны для неактивированных лимфоцитов [19]. Рецепторы, вовлеченные в связывание активированных лимфоцитов с эндотелием, более ограничены в действии: лимфоцитарный CD11a/CD18 связывается с ICAM-1 и ICAM-X. Кроме того, адгезия Т-лимфоцитов к VCAM-1, опосредованная β_1 -интегрином VLA-4, усиливается повышением экспрессии VCAM-1 на активированном цитокинами эндотелии.

Нормальную структуру и функцию эндотелиальных клеток микрососудов поддерживают тромбоциты. При уменьшении количества тромбоцитов, нарушении их функции резко возрастает проницаемость сосудистой стенки для эритроцитов. При малейшем повреждении стенки сосудов тромбоциты приклеиваются к поврежденному месту и способствуют образованию тромбоцитарных агрегатов. Подобно нейтрофилам, тромбоциты не могут взаимодействовать с неактивированным эндотелием. Однако при повреждении эндотелия тромбоциты присоединяются к субэндотелиальному внеклеточному матриксу. При сильном спазме ($> 600 \text{ с}^{-1}$) сосудов первым основным белком матрикса и базальной мембраны, который связывается с тромбоцитами, является фактор фон Виллебранда [20]. Белок содержит домены, необходимые для взаимодействия с коллагеном и глюкозаминогликанами внутри субэндотелия. Сразу после активации тромбоцитов агонистом или после связывания им гликопротеина GP Ib/IX фактор фон Виллебранда связывается с гликопротеином GP IIb/IIIa. Этого связывания недостаточно для компенсации отсутствия GP Ib/IX: адгезия тромбоцитов у пациентов с дефицитом последнего сильно нарушена.

In vivo адгезивными лигандами для тромбоцитов служат белки сосудистого эндотелия и матрикса. Эндотелиальные клетки продуцируют различные коллагены, некоторые из которых находятся в кровеносных сосудах. Минимальные требования для адгезии тромбоцитов заключаются в наличии спиральной структуры нативного коллагена. Адгезия усиливается ионами магния и марганца; связывание с коллагеном обеспечивается интегрином $\alpha_2\beta_1$. Начальная адгезия тромбоцитов к коллагену не требует их активации, что приводит к расплыванию тромбоцитов. Идентифицированы также неинтегриновые тромбоцитарные рецепторы коллагена — GP IV (CD36) и GP VI.

К мембранным и матриксным белкам, участвующим в адгезии тромбоцитов, относятся также витронектин и фибронектин [21, 22]. Тромбоциты

содержат как минимум два рецептора витронектина — $\alpha_V\beta_1$, $\alpha_{11b}\beta_3$ и два рецептора фибронектина — $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_{11b}\beta_3$. Оба рецептора фибронектина для связывания требуют наличия ионов кальция. В отличие от $\alpha_{11b}\beta_3$ $\alpha_5\beta_1$ связывается с фибронектином без предварительной активации тромбоцитов. Оба рецептора узнают RGD-последовательность в клеточном домене фибронектина. Существует еще один вид связывания фибронектина с тромбоцитами, который не зависит от наличия ионов кальция, RGD-последовательности и вовлекает в процесс связывания коллагенсвязывающий домен фибронектина. Тромбоциты взаимодействуют также с тромбоспондином, который продуцируется эндотелиальными клетками и мегакариоцитами, а также высвобождается из α -гранул во время секреции [23].

В физиологических условиях при отсутствии каких-либо повреждений эндотелий обладает высокой тромборезистентностью, или неспособностью активировать тромбоциты [24]. Тромборезистентность люминальной поверхности пласта обеспечивается сбалансированным продуцированием эндотелиоцитами как прокоагулянтов, так и антикоагулянтов и фибринолитиков (простациклин, активатор плазминогена, антитромбин III), посредством которых регулируется агрегатное состояние пристеночного слоя плазмы крови. Тромборезистентность эндотелия связана с такими его особенностями:

- 1) отрицательным зарядом на поверхности, обращенной в сторону просвета сосуда (внешние мембраны тромбоцитов имеют такой же заряд);
- 2) наличием в нем фермента (АДФаза), вызывающего расщепление АДФ — сильного стимулятора агрегации тромбоцитов;
- 3) способностью синтезировать вещества, угнетающие функциональную активность тромбоцитов (простациклин, NO и 13-гидрокси-9,11-октадекадиеновая кислота);
- 4) способностью связывать и инактивировать тромбин (посредством тромбомодулина);
- 5) наличием ингибиторов протеиназ системы свертывания крови (антитромбин III и α_2 -макрोगлобулин);
- 6) способностью синтезировать гликозаминогликаны, в результате активации которых ускоряют свое действие естественные антикоагулянты;
- 7) способностью синтезировать и высвобождать в кровоток тканевый активатор плазминогена.

Вместе с тем эндотелий обладает уникальной способностью менять свой антитромботический потенциал на тромбогенный. Такая трансформация стенок сосудов происходит при застое крови, гипоксии, повреждении стенок сосудов экзогенными (механические повреждения, лучевое воздействие, токсические вещества) и эндогенными (тромбин, циклические нуклеотиды, ряд цитокинов) факторами. После повреждения эндотелия слой субэндотелия, стоящий из базальной мембраны, коллагена, эластиновых волокон, фибронектина, фактора фон Виллебранда, становится стимулятором адгезии тромбоцитов и активации механизма свертывания крови (см. вклейку, рис. 4).

В норме сосудистый эндотелий не участвует в активации свертывания крови, а напротив, ингибирует этот процесс. На поверхности эндотелия синтезируется тромбомодулин — трансмембранный рецептор тромбина, кото-

рый вызывает в молекуле последнего конформационные изменения, приводящие к ингибированию его свертывающей активности и способности активировать фактор V системы свертывания крови. Более того, связывание тромбина с тромбомодулином вызывает ускорение активации протеина C. Процесс активации происходит на поверхности эндотелия, с которым протеин C связывается при участии своего кофактора протеина S. Активированный комплекс протеин C-протеин S обеспечивает на эндотелии функционирование мощного антикоагулянтного механизма [25].

Дополнительный механизм ингибирования процесса свертывания крови включает присутствующий на поверхности сосудистого эндотелия гепаран-сульфат — гликозаминогликан, который связывается с антитромбином III. Сосудистый эндотелий неравномерно покрыт связанным гепарином антитромбином, инактивирующим тромбин и факторы Ха и IXa системы свертывания крови, образующиеся при активации свертывания. Эндотелий синтезирует также простаглицлин (простагландин I₂) и EDRF (эндотелиальный фактор релаксации), которые являются мощными антитромбоцитарными антагонистами. Вследствие повреждения или заболевания (патологии) стенки сосуда эндотелий претерпевает множественные изменения [26, 27] (рис. 1.4). Наиболее значительным является экспрессия тканевого фактора (ТФ) — трансмембранного гликопротеина, являющегося кофактором для фактора VII/VIIa на люминальной поверхности эндотелия. В норме тканевый фактор *in vivo* и *in vitro* на эндотелиальных клетках не выявлен. Его экспрессия на эндотелии вызывается различными цитокинами, такими, как TNF и IL-1, и эндотоксином. TNF появляется для стимулирования высвобождения интерлейкина-1, который непосредственно индуцирует синтез тканевого фактора [28].

С тканевым фактором связывается фактор VII свертывания крови, и образовавшийся комплекс активирует фактор X свертывания крови. Факторы Ха и Va активируют протромбин либо на поверхности тромбоцитов, либо на эндотелии. Эндотелиальные клетки содержат фактор V, активируемый тромбином или эндогенным эндотелиальным ферментом [15]. Фактор Ха на тромбоцитах или на эндотелии связывается с фактором Va. Поскольку протекание этой реакции кинетически предпочтительнее на тромбоцитах, активация протромбина на эндотелии может служить вспомогательным механизмом свертывания крови. Комплекс Ха/Va активирует протромбин, что приводит к появлению тромбина и образованию сгустка [29, 30].

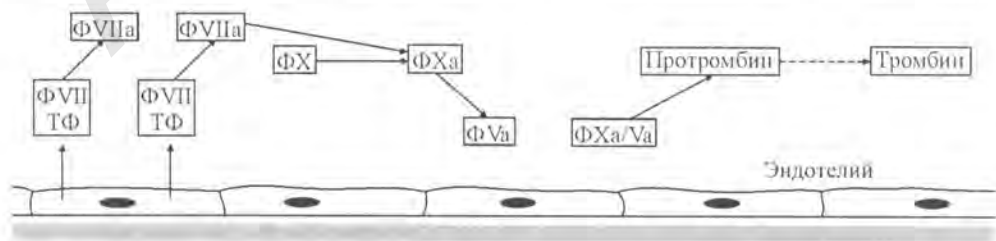


Рис. 1.4. Регуляция эндотелием процесса активации системы свертывания [35]

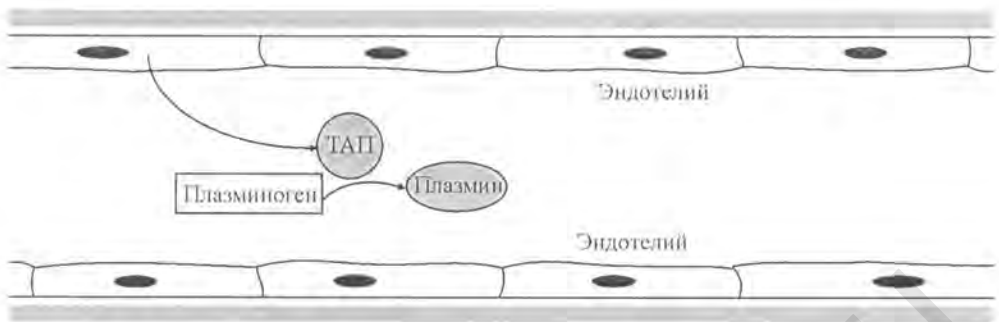


РИС. 1.5. Регуляция эндотелием процесса активации фибринолиза [35]

На эндотелиальных клетках находятся рецепторы факторов IX и IXa свертывания крови. Факторы IXa и VIIIa вместе с эндотелием ускоряют активацию фактора X и повышают сродство фактора IXa к его рецептору [31].

Эндотелиальные клетки продуцируют также фактор XIII свертывания крови, или фибринстабилизирующий фактор. Этот фермент “прошивает” α - и γ -цепи фибрина, создавая клеточную основу для стабилизации сгустка. В норме роль фактора XIII может заключаться в стабилизации белков матрикса (фибронектин или фибрин) на поверхности эндотелия [32].

Еще одной функцией эндотелия является активация и ингибирование фибринолиза (рис. 1.5). Клетки сосудистого эндотелия синтезируют и секретируют тканевый активатор плазминогена (ТАП) и его ингибитор первого типа (ПАИ-1) [33]. Что касается активатора плазминогена урокиназного типа (у-Па), то заингибированные при контакте преждевременно пересаженные клетки не способны его синтезировать, однако в условиях, приближенных к ангиогенезу, у-Па синтезируется. ТАП является основным активатором внутрисосудистого фибринолиза. Экспрессию этого белка эндотелием вызывают многие агонисты, включая тромбин, который также стимулирует синтез и экспрессию ПАИ-1. В физиологических условиях при отсутствии повреждения стенки сосуда величина напряжения сдвига, характерная для кровотока, является достаточной для поддержания фонового количества ТАП и предупреждения высвобождения ПАИ-1. Все вместе вызывает ингибирование активации плазминогена.

Синтез ПАИ-1 стимулируют также эндотоксин и интерлейкин-1, тем самым способствуя ингибированию фибринолиза. Обработка эндотелиальных клеток эндотоксином *in vitro* или *in vivo* приводит к повышению уровня ПАИ-1 на их поверхности. В случае инфекции или воспаления результатом является ингибирование растворения сгустка.

1.2. ТРОМБОЦИТЫ

Тромбоциты крови — самый интересный и важный пример образования отделенных от клеток цитоплазматических фрагментов, способных к самоорганизации. Тромбоциты играют центральную роль в свертывании крови, образовании тромбов — сгустков, закрывающих про-

свет разорвавшегося кровеносного сосуда и останавливающих кровотечение из этого сосуда. Биография тромбоцитов насчитывает не более 150 лет. В 1880-х годах их подробно описал итальянский врач Г. Биццоцери (раньше их даже называли бляшками Биццоцери). Под микроскопом тромбоциты выглядят как овальные или округлые гладкие тельца. Они способны к агрегации, т. е. слипанию, и благодаря адсорбции удерживают на своей поверхности факторы свертывания крови. Эти два свойства обуславливают активное участие тромбоцитов в процессе свертывания крови.

Таким образом, тромбоциты можно рассматривать как фрагменты цитоплазмы, естественно образующиеся из структур противоположного типа — гигантских клеток. Эти фрагменты могут длительное время сохраняться в крови в упакованном виде, но при необходимости способны однократно активироваться и самоорганизоваться, а затем, выполнив свою функцию, активировав свертывание, погибать.

Тромбоциты имеют три типа гранул: α -гранулы накапливают и секретируют протеины — фибриноген, фактор фон Виллебранда, 4-й тромбоцитарный фактор, тромбоглобулин и тромбоцитарный фактор роста; плотные гранулы накапливают более мелкие молекулы — АДФ, биогенные амины (серотонин, катехоламины и др.), ионы кальция; лизосомальные гранулы содержат кислые гидролазы. В мембране тромбоцитов локализовано множество рецепторов (5 типов гликопротеиновых, рецепторы к коллагену, тромбину, АДФ, катехоламинам, серотонину, тромбоксану A_2 , фактору активации тромбоцитов, Fc-фрагменту иммуноглобулинов, компонентам комплемента, инсулину, α -адренорецепторы, рецепторы к эндотелину), рецептороподобных протеинов, связывающих и удерживающих на поверхности тромбоцитов комплексы факторов свертывания и интегринов, участвующих в клеточной адгезии.

1.2.1. Морфология тромбоцитов

Тромбоциты — плоские безъядерные фрагменты клеток неправильной формы длиной 1—4 мкм и толщиной 0,5—0,75 мкм — образуются в костном мозге в результате фрагментации мегакариоцитов. В красном костном мозге стволовая клетка крови дифференцируется в гигантскую клетку — мегакариоцит. При действии гормона тромбопоэтина мегакариоцит отщепляет до 1000 фрагментов цитоплазмы — тромбоцитов, и после выхода в сосудистое русло примерно 2/3 этих кровяных пластинок циркулирует в кровотоке. Около 1/3 из них не принимает участия в процессах остановки кровотечения или внутрисосудистого тромбообразования и выводится из кровотока путем естественного фагоцитоза макрофагами селезенки и печени. Нормальное содержание тромбоцитов в 1 мм³ крови — 150—300 тыс., средняя продолжительность их жизни — $6,9 \pm 0,3$ сут. В 1 л нормальной крови насчитывается 180—320 млрд тромбоцитов [34].

Отсутствие у тромбоцитов клеточного ядра не дает возможности синтезировать ДНК и ограничивает их способность к синтезу белков *de novo*. В соответствии с вышесказанным тромбоциты не являются клетками в классическом смысле и обозначаются как “безъядерные клетки”. В неактивиро-

ванном состоянии тромбоциты имеют типичную дисковидную форму с площадью поверхности в среднем 8 мкм^2 . Активация тромбоцитов АДФ, тромбином или в результате адгезии приводит к изменению их формы: на поверхности активированного тромбоцита выпячиваются многочисленные псевдоподии. У тромбоцитов так же, как и у больших ядерных клеток, молекулярной основой образования псевдоподий является полимеризация актиновых микрофиламентов из растворимого актина. К микрофиламентам присоединяются миозин и другие молекулы. В результате псевдоподии, как и у больших клеток, становятся сократимыми, способными прикрепляться к различным поверхностям, например к коллагеновым волокнам [35—37].

На таких поверхностях тромбоцит расплывается и может даже перемещаться по ним на небольшие расстояния. Гранулы, собранные в центральной части цитоплазмы активированного тромбоцита, сливаются с наружной мембраной и секретируют свое содержимое в кровь или тканевую жидкость. При этом активные вещества, вышедшие из гранул, действуют на белки крови, стимулируя дальнейшее тромбообразование. Через несколько часов активированный тромбоцит, подобно клеточным фрагментам в культуре, погибает [38].

Ультраструктура тромбоцитов может быть разделена на четыре морфологические зоны: периферическая, структурная, зона органелл, мембранная система (см. вклейку, рис. 5) [37]. Каждая из зон выполняет специфические функции.

Периферическая зона представляет собой трехслойную цитоплазматическую мембрану, подобную мембранам других клеток, которая содержит различные гликопротеины, белки и мукополисахариды (гликокаликс). Как и в случае других клеток, цитоплазматическая мембрана состоит из поляризованного липидного бислоя, содержащего мембранные белки. Асимметричное распределение фосфолипидов — фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин снаружи, а сфингомиелин и фосфатидилинозитол внутри — является важным фактором для функций тромбоцитов. Организация фосфолипидов плазматической мембраны изменяется при активации тромбоцитов, во время которой экспрессируются белки-рецепторы агонистов (например, АДФ, тромбин) или адгезивные белки (например, фибриноген или фактор фон Виллебранда).

Структурная зона состоит из микротубул, представляющих собой тубулиновые волокна, окруженные сетью различных структурных белков. Компоненты структурной зоны служат, главным образом, для поддержания дисковидной формы неактивированных тромбоцитов и изменения их формы в случае активации. Структурные белки формируют цитоскелет, состоящий в основном из актина (15—20 % общей белковой массы) и актинсвязывающего белка. Актин находится в двух функциональных состояниях: G-актин (глобулярная форма) и F-актин (форма филаментов). В цитоплазме тромбоцитов различают гиаломер (гиалоплазму) и грануломер. Гиаломер представляет собой гомогенную или тонкогранулярную субстанцию, плотность которой варьирует в зависимости от функционального состояния тромбоцитов и их возраста. В гиаломере расположены микротрубочки и микрофиламенты (микроволокна), представляющие собой две морфологические формы тром-

бастенина — сократительного белка тромбоцитов (тромбоцитного актомиозина). Под грануломером понимают совокупность гранул, расположенных в цитоплазме тромбоцитов [39].

Зона органелл находится в цитоплазме и состоит из митохондрий, запасенного гликогена и трех форм гранул: плотных, α -гранул и лизосом:

Компоненты гранул тромбоцитов

Плотные гранулы	α -Гранулы	Лизосомы
	Ингибиторы протеиназ	
АТФ, АДФ, Ca^{2+} , серотонин, фосфат, гуаниннуклеотид	α_1 -Антитрипсин, α_2 -макроглобулин, ингибитор С1-эстеразы, α_2 -антиплазмин	α -Арабиноза, β -галактозидаза, β -глюкуронидаза, эластаза, N-ацетил-глюкозаминидаза, коллагеназа, катепсин
	Адгезивные белки	
	Фибриноген, фибронектин, тромбоспондин, фактор фон Виллебранда, витронектин, гликопротеин IIb/IIIa, P-селектин (PADGEM, GMP-140)	
	Факторы роста	
	Тромбоцитарный фактор роста, фактор роста β , эпидермальный фактор роста, эндотелиальный фактор роста	
	Цитокиноподобные белки	
	Интерлейкин I(?), CD40 лиганд (?), тромбоцитарный фактор 4, β -тромбомодулин	
	Факторы свертывания крови	
	плазминоген, ПАИ-1, фактор V, фактор XI, фибриноген, протеин S	

Гранулы являются характеристикой тромбоцитов и служат центрами хранения белков и других важных для функционирования тромбоцитов веществ.

Плотные гранулы получили свое название после характеристики их электронно-оптической плотности. Они содержат ряд низкомолекулярных компонентов (АДФ, АТФ, ионы кальция, серотонин), которые вызывают агрегацию тромбоцитов. α -Гранулы содержат белки, которые влияют на процессы адгезии, агрегации, хемотаксиса, пролиферации, воспаления, свертывания крови. Лизосомальные гранулы содержат гидролитические ферменты и сходны с лизосомами других клеток [35, 40].

Мембранная система состоит из многочисленных канальцевых структур, которые, с одной стороны, открываются на поверхность тромбоцитов, а с другой — в цитоплазму, и из плотной тубулярной системы. Тубулярная система происходит из шероховатого ретикулума мегакариоцитов и является одним из основных центров запасания свободных ионов кальция, который играет главную роль в регуляции метаболизма тромбоцитов и их активации. Как

только концентрация свободных ионов кальция превышает определенный порог, тромбоциты изменяют свою форму с образованием псевдоподиев [37].

Изменение формы тромбоцитов требует изменений в структурной зоне, богатой микротубулами в псевдоподиях. В то же время G-актин полимеризуется и образует филаменты F-актина, ассоциированные в дальнейшем с другими структурными белками мембраны. Это приводит к стабилизации мембраны в области псевдоподий. Во время активации тромбоцитов F-актин взаимодействует с миозином, образуя актомиозин. Подобно клеткам гладкой мускулатуры, актомиозин формирует сократительный аппарат, который гарантирует динамическое изменение формы активированных тромбоцитов. Такое изменение формы вызывает централизацию органелл, приводящую к увеличению поверхности тромбоцитов и таким образом поддерживающую тромбоцитарный гемостаз.

1.2.2. Адгезия тромбоцитов

Эндотелий помимо чисто барьерной функции активно препятствует адгезии и агрегации тромбоцитов за счет синтеза простагландина (простагландина PGI_2), эндотелиального релаксирующего фактора, а также активаторов пламиногена тканевого и урокиназного типов. Кроме того, на поверхности эндотелиальных клеток обнаружен гликопротеин тромбомодулин, обладающий способностью связывать и инактивировать тромбин [9, 26, 41].

На начальном этапе коагуляционного каскада происходит адгезия (прилипание) тромбоцитов к месту повреждения эндотелия. Процесс адгезии осуществляется благодаря наличию в мембране тромбоцита специфических рецепторов, моментально связывающихся с соответствующими лигандами в экстрацеллюлярном матриксе. При этом для процесса взаимодействия между лигандом и рецептором мембраны тромбоцита необходимо присутствие фактора фон Виллебранда, который также синтезируется клетками эндотелия сосудов.

Основными гликопротеидными комплексами мембраны тромбоцитов являются следующие:

<i>Гликопротеидный комплекс</i>	<i>Лиганды</i>	<i>Функция тромбоцитов</i>
GPIaIIa	Коллаген	Адгезия
GPIcIIa	Фибронектин	То же
GPIcIIa	Ламинин	“ ”
GPIbIX	Фактор фон Виллебранда	“ ”
	Витронектин	
	Фибронектин	
GPa _v IIIa	Фактор фон Виллебранда	“ ”
	Фибриноген	
	Тромбоспондин	
	Фибриноген	
	Фибронектин	
GPIbIIIa	Фактор фон Виллебранда	Агрегация
	Витронектин	
	Тромбоспондин	

Таким образом, в результате адгезии на поверхности разрыва эндотелия формируется монослой тромбоцитов. Связывание рецепторов мембраны тромбоцита с лигандами в субэндотелии является пусковым фактором для следующей стадии тромбообразования — агрегации тромбоцитов. При этом тромбоциты изменяют свою форму, становясь из дисковидных сферическими, на поверхности их мембраны появляются псевдоподии. Одновременно происходит высвобождение содержимого плотных гранул тромбоцитов, секретируются индукторы агрегации тромбоцитов — аденозиндифосфат (АДФ) и серотонин, тромбоцитарный фактор 4, тромбоцитарный фактор роста и др. Также повышается активность фосфолипаз A_2 и C , которые, расщепляя мембранные фосфолипиды, приводят к высвобождению арахидоновой кислоты. Далее арахидоновая кислота под влиянием циклооксигеназы и тромбоксансинтетазы превращается через промежуточную стадию эндопероксидов в тромбоксан A_2 . Тромбоксан A_2 , являясь мощным индуктором агрегации тромбоцитов, также вызывает выраженную вазо- и бронхоконстрикцию [42].

В результате высвобождения в кровоток многочисленных проагрегантов (АДФ, серотонин, тромбоксан A_2 , адреналин, тромбин и др.) осуществляется механизм положительной обратной связи, проявляющейся в усилении первоначальной агрегации тромбоцитов с одновременным вовлечением в процесс агрегации соседних неактивированных клеток.

Единовременное действие нескольких индукторов агрегации (в противном случае в кровеносном русле постоянно образовывались бы тромбоцитарные тромбы) является стимулом к началу общего финального этапа агрегационного процесса: на мембранах псевдоподий происходят конформационные изменения $IIb/IIIa$ -рецепторов, сопровождающиеся многократным увеличением их афинности к своим лигандам, прежде всего к фибриногену и фактору фон Виллебранда. Мультивалентные молекулы фибриногена и фактора фон Виллебранда способны взаимодействовать одновременно с большим количеством тромбоцитов, что приводит к образованию многочисленных межклеточных “мостиков”.

Таким образом, заключительной стадией процесса активации тромбоцитов является построение тромбоцитарного агрегата, представляющего собой множество активированных тромбоцитов, соединенных между собой с помощью молекул фибриногена и фиксированных к месту повреждения эндотелия посредством фактора фон Виллебранда [43—46].

Процессы прикрепления клеток друг к другу и к компонентам соединительнотканного матрикса принято объединять общим термином “клеточная адгезия”. Она обеспечивается специальными клеточными рецепторами, получившими название молекул клеточной адгезии и по своей структуре являющихся мембранными гликопротеинами. Расположены они на поверхности клеток и обладают способностью к избирательному взаимодействию с белками (лигандами или контррецепторами) на поверхности других клеток или адгезивными (“липкими”) белками соединительной ткани и плазмы крови. Молекулы клеточной адгезии тромбоцитов обеспечивают протекание начальных стадий процесса тромбообразования.

Адгезия тромбоцитов к поврежденному участку сосудистой стенки и их агрегация — первый ключевой элемент закупорки поврежденных сосудов.

Циркулирующие в крови тромбоциты не прилипают к интактному эндотелию и не слипаются друг с другом, если эндотелий не поврежден и не обнажены субэндотелиальные структуры. Адгезия тромбоцитов происходит при участии фактора фон Виллебранда, который во время адгезии тромбоцитов связывается с гликопротеиновыми рецепторами их поверхностной мембраны — GPIb-рецепторами (см. вклейку, рис. 6). Существуют два механизма адгезии тромбоцитов: 1) поверхность мембраны поврежденного эндотелия приобретает положительный заряд, поэтому к ней прилипают тромбоциты, наружная поверхность которых заряжена отрицательно; 2) повреждение сосуда приводит к образованию свободного фактора фон Виллебранда (в норме он связан с фактором VIII), который служит связующим звеном между субэндотелиальными структурами и белками поверхности тромбоцита [47].

Адгезия покоящихся тромбоцитов к поврежденной стенке сосуда является первым шагом первичного гемостаза и называется первичной. Прикрепление активированных тромбоцитов к субэндотелию получило название вторичной адгезии. Первичная адгезия приводит к изменению формы, распластыванию или качению, активации адгезированных тромбоцитов с последующей секрецией компонентов гранул и формированию агрегатов. Адгезия тромбоцитов наблюдается в условиях артериального тока и при высоком напряжении сдвига. Чтобы такое было возможно, изначальный контакт между циркулирующими тромбоцитами и стенкой сосуда должен происходить быстро и оставаться стабильным [34, 48].

Процесс адгезии регулируется гликопротеинами мембраны тромбоцитов. Тромбоциты имеют встроенные в мембрану рецепторы адгезии, которые “узнают” специфические структурные компоненты экстрацеллюлярного матрикса в области субэндотелия. Экстрацеллюлярный матрикс представляет собой сеть различных компонентов, таких, как коллаген, эластичные нити которого включены в гель протеогликанов, гликопротеинов и воды. Экстрацеллюлярный матрикс обеспечивает биомеханическую стабильность сосудов и состоит из различных структур. В следовых количествах в стенке сосудов присутствуют также коллагены IV, V, VI, VIII типов. С возрастом и развитием атеросклероза состав коллагена сосудистой стенки меняется: наблюдается присутствие больших количеств коллагена I типа. Основными из неколлагенадгезивных белков, включенными в экстрацеллюлярный матрикс, являются фибронектин и ламинин. В пролиферативной ткани присутствует тромбоспондин; эндотелий секретирует фактор фон Виллебранда. Небольшое количество этого белка адгезирует с коллагеновыми нитями во внешнем слое субэндотелия, а основная масса секретируется в кровь [49].

Первый контакт между циркулирующими в крови тромбоцитами и поврежденной стенкой сосуда устанавливается взаимодействием тромбоцитарного рецептора для фактора фон Виллебранда (гликопротеин Ib-V-IX) с коллагенимобилизованным фактором фон Виллебранда (контактная фаза) (см. вклейку, рис. 7, а). Их взаимодействие характеризуется высоким сродством, которое делает возможной адгезию тромбоцитов к стенке сосуда, особенно в области артериального тока. Важность взаимодействия меж-



РИС. 1.6. Участие арахидоновой кислоты в процессе агрегации тромбоцитов

ду фактором фон Виллебранда и его рецептором показана при анализе состояния системы гемостаза у пациентов с врожденным дефектом этого фактора (болезнь Виллебранда) или его рецептора (синдром Бернарда—Соле-ра) [50]. Для таких больных характерно увеличение длительности кровотечения.

Стабилизация адгезии тромбоцитов (фаза стабилизации) происходит при участии рецепторов коллагена, фибронектина и ламинина, принадлежащих к семейству интегринов (см. вклейку, рис. 7, б). Связывание тромбоцитарного рецептора коллагена с коллагеном приводит, в частности, к активации и изменению формы адгезированных тромбоцитов (активационная фаза) (см. вклейку, рис. 7, в). Во время изменения формы образующиеся псевдоподии приклеиваются к стенке поврежденного сосуда через белковые мостики — фактор фон Виллебранда, образуя однослойную выстилку, к которой из кровотока прилипают другие тромбоциты. Этот эффект носит название агрегации. Далее происходит запуск так называемого арахидонового каскада (рис. 1.6), приводящего к образованию тромбоксана A_2 , который высвобождает из запасящихся гранул клеток депонированные ионы кальция и АДФ. Последние выталкиваются на поверхность клетки, где они формируют с гликопротеином $IIb/IIIa$ -рецепторы к фибриногену, молекулы которого создают стяжки между клетками, удерживают их в конгломерате и укрупняют за счет выброса новых порций АДФ из вовлекаемых в процесс интактных кровяных пластинок [51, 52].

После выхода в экстрацеллюлярное пространство тромбоксан A_2 усиливает активационный процесс и связывание со специфическими тромбоксановыми рецепторами. Кроме того, тромбоксан A_2 обладает сосудосуживающей активностью и, таким образом, стимулирует образование тромба в месте сужения сосуда [53]. В дальнейшем компоненты гранул, высвобождающиеся во время адгезии (секреция), вовлекают в адгезию покоящиеся тромбоциты из кровотока, и тем самым усиливают этот процесс. Взаимодействие покоя-

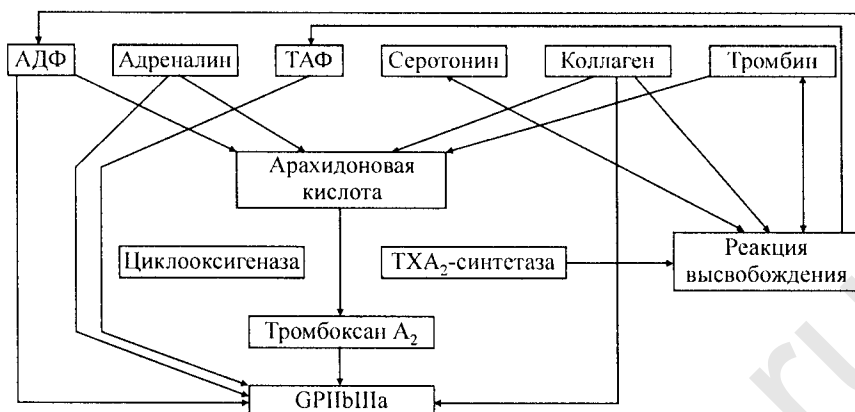


Рис. 1.7. Схема активации рецепторов тромбоцитов GPIIb/IIIa

щихся тромбоцитов с адгезированными происходит при участии активированных рецепторов GPIIb/IIIa (рис. 1.7). Заключительная стадия (стадия распластывания) адгезии считается завершенной, когда тромбоциты полностью прикреплены к субэндотелию (см. вклейку, рис. 7, з).

1.2.3. Роль фактора фон Виллебранда в адгезии тромбоцитов

Фактор фон Виллебранда представляет собой гликопротеин, состоящий из идентичных субъединиц, соединенных дисульфидными связями. Каждая субъединица содержит 2050 аминокислотных остатков и 22 углеводные цепи общей массой 278 кДа, из которых 10—19 % приходится на углеводы. Две субъединицы соединены с N-концами димеров, являющихся структурными блоками крупных полимеров. Межсубъединичные дисульфидные связи в N-концевой части димеров формируют мультимеры молекулярной массой 500—10 000 кДа. Мультимеры могут быть представлены как тонкие филаменты длиной 1300 нм с диаметром тромбоцита или как спиралевидные молекулы с поперечным сечением 200—300 нм [54—55].

Изменение гемодинамики может деспирализовать глобулу фактора фон Виллебранда, несмотря на ее временную связь с сосудистой или клеточной поверхностью. Однако фактор фон Виллебранда, связанный с коллагеном, не подвержен подобному изменению. Существует прямая зависимость между размером макромолекулы белка и его способностью вызывать формирование тромбоцитарных тромбов. Наблюдение пациентов с болезнью фон Виллебранда показало, что крупные мультимеры гемостатически более эффективны, чем мелкие. Вытянутые мультимеры функционально поливалентны, в каждой субъединице наблюдается высокая плотность упаковки доменов, что предполагает множественное взаимодействие с компонентами сосудистой стенки и тромбоцитов, приводящее к более эффективному проявлению адгезивных свойств. Например, крупные молекулы формируют

компактные (тесные) связи с GPIIb/IIIa и проводят сигналинг через поперечно-связанные рецепторы [56].

Специфические аспекты биосинтеза, запасаения и образования в плазме крови фактора фон Виллебранда нацелены на получение максимального тромбогенного ответа в месте повреждения, несмотря на неспособность ответа тромбоцитов, находящихся в кровотоке. Возможно, по этой причине фактор фон Виллебранда имеет два пути секреции: один из них непосредственно связан с синтезом, другой — с регуляцией накопления и высвобождения после стимуляции секрецией. Поскольку высвобожденный фактор фон Виллебранда подвержен уменьшению размеров молекулы, наличие источника нерасщепленных мультимеров из запасных клеточных центров позволяет максимальное проявление функций на участках, где требуются быстрая адгезия и агрегация. В клетках находится два вида органелл, где синтезируется белок: тельца Вайбеля-Палада в эндотелиальных клетках и α -гранулы в мегакариоцитах и тромбоцитах. В мегакариоцитах эффективным *in vivo* является регулируемый путь секреции фактора. Белок, находящийся в плазме крови, высвобождается эндотелиальными клетками, тогда как из α -гранул выброс фактора фон Виллебранда происходит только в случае активации. Фактор фон Виллебранда эндотелиальных клеток независимо от пути секреции направлен к субэндотелию. С помощью многочисленных исследований выяснено, что роль фактора фон Виллебранда, секретирующего непосредственно в стенке сосуда, в образовании первого слоя тромбоцитов на сосудистой стенке подобна таковой фактора плазмы крови. Оказывается, что наличие эндогенного эндотелиального фактора фон Виллебранда способствует адгезии тромбоцитов. Однако содержание субэндотелиального фактора фон Виллебранда в сетке сосудов не везде одинаково. Белок не может одновременно находиться во всех артериях и артериолах, непосредственно вовлеченных в гемостаз. Более того, травматическое повреждение из-за утолщения стенки сосуда обнажает глубокий слой экстрацеллюлярного матрикса, образованного другими, не эндотелиальными клетками, в котором внутренний фактор фон Виллебранда отсутствует. Роль плазменного фактора заключается в максимальной остановке посттравматического кровотечения путем быстрого взаимодействия специфической субъединицы доменов с несколькими компонентами экстрацеллюлярного матрикса [57].

Иммобилизация плазменного фактора фон Виллебранда на открытых субэндотелиальных структурах может служить преобладающим механизмом, вызывающим ответ тромбоцитов в области повреждения. Традиционное понимание этого процесса представляет собой связывание GPIIb/IIIa с A1-доменом фактора фон Виллебранда, иммобилизованным в основном на коллагене. Коллагенсвязывающая функция белка охватывает два типа A-доменов — A1 и A2, структура которых известна на атомном уровне. Все это является необходимым и достаточным для связывания с коллагеном типа I или III, тогда как домен A1 вовлечен в связывание с коллагеном VI типа [58]. Жидкостная динамика и механические силы способны модулировать эти взаимодействия, однако до сих пор не совсем понятно их участие в физиологических процессах иммобилизации фактора фон Виллебранда на субэндоте-

лии, компоненты которого (отличные от коллагена) также играют немаловажную роль. Например, антитело, ингибирующее связывание домена А3 с коллагеном *in vitro*, способно также ингибировать образование тромбоцитарного тромба и увеличивать продолжительность кровотечения *in vivo*. В то же время у пациентов с мутациями в молекуле фактора фон Виллебранда кровотечение отсутствовало или было довольно слабым. Имобилизация фактора фон Виллебранда на экстрацеллюлярной поверхности, опосредованная доменом А3, во многом зависит от природы повреждения. Это предполагает, что взаимодействие с коллагеном может регулировать связывание GPIb α с фактором фон Виллебранда. Недавно было показано, что процесс обратимой самосборки может быстро происходить между молекулами фактора, находящимися на поверхности и в кровотоке (рис. 1.8). В результате образуется слой мультимеров белка, располагающийся между открытой эндогенной поверхностью и клетками крови таким образом, что связывающийся с тромбоцитами А1-домен взаимодействует с поверхностью опосредованно и необратимо. Значение такого динамического обмена между связанным и свободным фактором фон Виллебранда с последующей адгезией тромбоцитов в условиях сильного динамического сдвига понятно не полностью, однако очевидно, что непосредственное взаимодействие между фактором фон Виллебранда и коллагеном не является абсолютным условием для проявления GPIb α -связывающей функции А1-доменом.

Участие фактора фон Виллебранда в формировании тромба выражается, с одной стороны, в опосредовании адгезии тромбоцитов к компонентам экстрацеллюлярного матрикса, а с другой — связано со стабилизацией прокоагулянтного фактора VIII и предупреждением его быстрого выхода из плазмы крови, что вызывает образование тромбина в пределах нормы. Основной функцией фактора фон Виллебранда является опосредование адгезивных взаимодействий тромбоцитов, поступивших из кровяного русла к месту повреждения сосуда, путем связывания со специфическими мембранными рецепторами. Дефицит фактора фон Виллебранда может вызвать кровотечение с характерными клиническими признаками: 1) нарушение адгезии тромбоцитов, связанное с кровотечением слизистой и наружной поверхностей, подобно таковому, вызванному беспорядком тромбоцитов, а пролонгированное время кровотечения используется для выявления заболевания; 2) недостаток фактора фон Виллебранда для стабилизации фактора VIII во вторичном дефиците последнего может вызвать спонтанное кровотечение в соединительных и мягких тканях подобно гемофилии А [59].

Молекулярная архитектура фактора фон Виллебранда полностью пригодна для инициирования адгезии тромбоцитов к реактивной поверхности в условиях сильного динамического сдвига. При низком напряжении сдвига другие адгезивные молекулы — коллаген, фибронектин и фибриноген/фибрин — могут образовывать связи, допускающие противоположные гемодинамические силы меньшей значимости, и таким образом в этих условиях фактор фон Виллебранда является менее уместным. Связывание GPIb α с А1-доменом является основным, если не существенным, адгезивным взаимодействием, вследствие которого тромбоциты прилипают к поверхности даже в случае повышенной вязкости крови [60, 61].

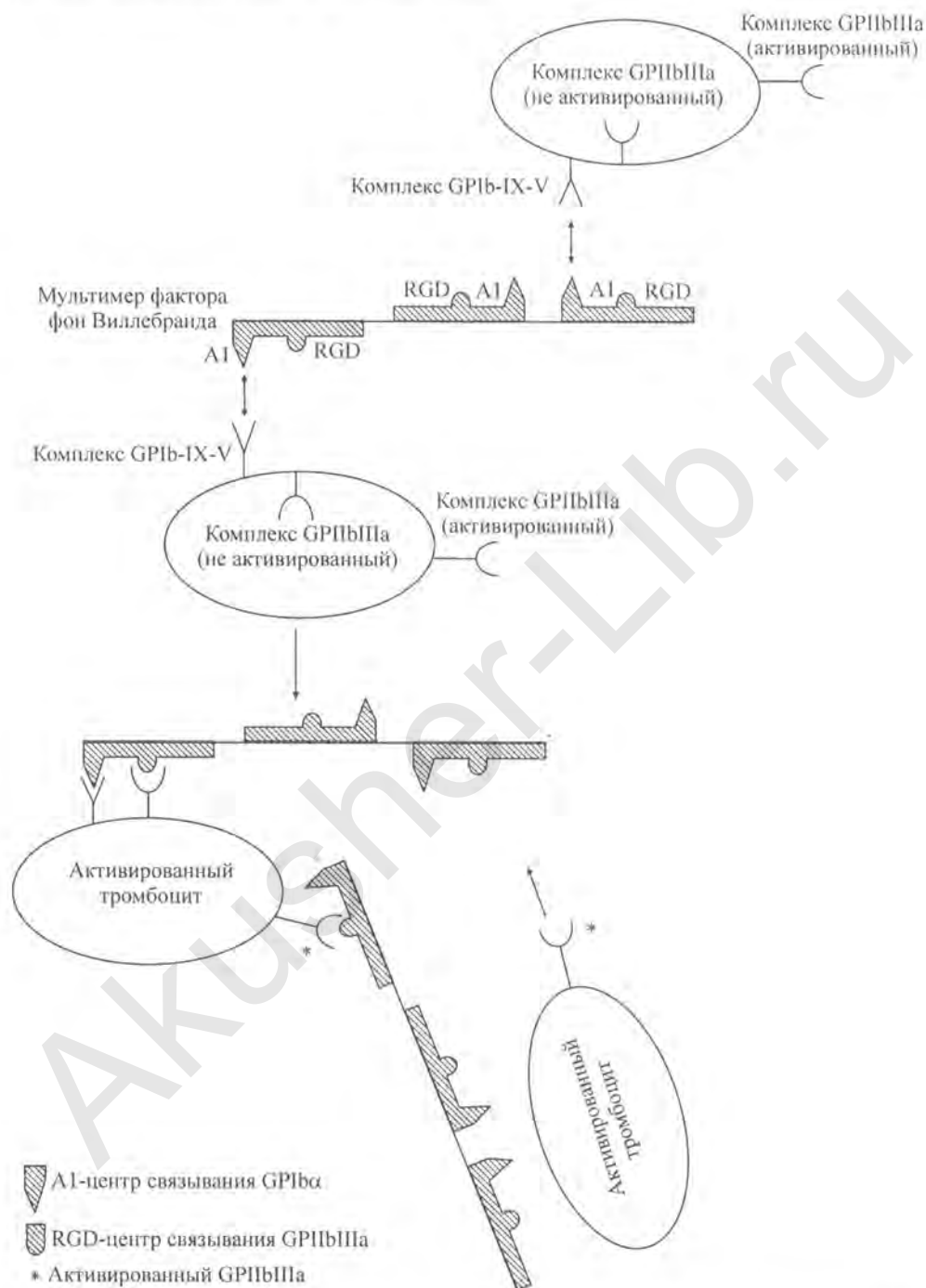


Рис. 1.8. Модель механизма связывания фактора фон Виллебранда с тромбоцитами [20]

Связь между GPIb α и фактором фон Виллебранда обычно не может опосредовать необратимую адгезию из-за высокой скорости диссоциации и короткого времени полужизни, однако поддерживает контакт тромбоцитов с поверхностью, а также способствует проявлению функции других рецепторов и лигандов, которые быстро и последовательно опосредуют стабильную адгезию. Основной в последующих событиях является роль коллагена и его рецепторов.

Тромбоцитарная мембрана содержит два рецептора фактора фон Виллебранда: гликопротеин (GP) GPIb α в комплексе GPIb-IX-V и интегрин $\alpha_{11b}\beta_3$ (GPIIb/IIIa). В результате изучения взаимодействия фактора фон Виллебранда с тромбоцитарной мембраной было показано, что процесс агглютинации тромбоцитов *in vitro* под действием ристоцетина требует наличия фактора фон Виллебранда в качестве кофактора и вызывает взаимодействие с GPIb α . Адгезия тромбоцитов зависит от фактора фон Виллебранда только в условиях высокого уровня напряжения стенки сосуда, что характерно для кровотока. Связыванию фактора фон Виллебранда с GPIb α способствует также ботроцетин — компонент яда змей рода *Bothrops*, который связывается непосредственно с A1-доменом фактора фон Виллебранда в дисульфидной петле Cys₅₀₉-Cys₆₉₅. В этом же участке расположены центры связывания с гепарином, сульфатидами и коллагеном. Второй коллагенсвязывающий центр локализован в домене A3. В то же время АДФ и тромбин способствуют связыванию фактора фон Виллебранда с $\alpha_{11b}\beta_3$, а не с GPIb α , как предполагалось изначально [62]. Биологическое значение взаимодействия с $\alpha_{11b}\beta_3$ сначала было недостаточно понятным, поскольку процесс ингибировался фибриногеном, молярная концентрация в плазме крови которого выше (~9 мкМ) по сравнению с концентрацией фактора фон Виллебранда (~1 мкМ). Фибриноген рассматривался как основной медиатор агонистиндуцируемой агрегации тромбоцитов, пока не выяснилось, что фактор фон Виллебранда, конкурентно связываясь с обоими рецепторами, играет определенную роль во взаимодействиях тромбоцит-тромбоцит, зависящих от динамики окружающей среды. Действительно, использование модельных систем с гемодинамическими условиями, подобными *in vivo*, помогло выяснить действительное биологическое значение различных взаимодействий лиганд-рецептор, которые опосредованы фактором фон Виллебранда.

Центр связывания фактора фон Виллебранда с GPIIb/IIIa локализован на RGDS-последовательности С-концевого участка домена C1. RGD-последовательность содержат фибриноген, фибронектин и витронектин, которые также связываются с GPIIb/IIIa. Кроме GPIIb/IIIa, некоторые интегрины, включая рецепторы фибронектина и витронектина, узнают RGD-последовательность на своих лигандах, но не связывают фактор фон Виллебранда [63, 64].

Сигналы, вызываемые механическим стимулированием связи фактор фон Виллебранда—GPIb α в условиях напряженного стресса, важны для начала активации тромбоцитов при сильном сдвиге. Стабильная адгезия устанавливается намного быстрее, когда свободный фактор фон Виллебранда связывается с коллагеном, на котором уже иммобилизован белок, определя-

ющий необходимую роль активационных сигналов, идущих от связанного коллагена и рецепторов других агонистов. На протяжении всего процесса плазменный фактор фон Виллебранда связывается с поверхностью адгезированных и активированных тромбоцитов с вовлечением обоих рецепторов — GPIb α и $\alpha_{IIb}\beta_3$, формирует субстрат, с которым связываются движущиеся тромбоциты, прикрепляясь посредством GPIb α к растущему тромбу [65].

Неактивированные тромбоциты связываются с фактором фон Виллебранда через комплекс GPIb/IX. Наследственный дефицит GPIb/IX вызывает кровотечение, подобное таковому при болезни фон Виллебранда. После активации тромбином или другими агонистами на тромбоцитах открывается второй центр связывания фактора фон Виллебранда GPIbIIIa.

С фактором фон Виллебранда специфически связываются входящие в состав субэндотелия фибриллярные коллагены, коллаген VI типа, гепарин, сульфатиды. Значение связывания с фибриллярными коллагенами несколько неопределенно, поскольку связывание фактора с экстрацеллюлярным матриксом не ингибируется при элиминировании фибриллярных коллагенов любой коллагеназой или созданием матрикса в присутствии ингибитора коллагена (α, α' -дипиридил). Более того, получены моноклональные антитела к фактору фон Виллебранда, которые ингибируют связывание с субэндотелием, но не с фибриллярными коллагенами.

В отличие от фибриллярных коллагенов коллаген VI типа в большом количестве находится в экстрацеллюлярном матриксе и устойчив к действию коллагеназы и дипиридила. Этот коллаген является подходящим лигандом для фактора фон Виллебранда, поскольку содержит домен, гомологичный А-домену белка, и расположенную в С-концевой части молекулы последовательность, подобную GPIb.

При высокой силе напряжения сдвига избирательное ингибирование GPIb α ограничивает процесс образования тромбов прежде, чем начинается адгезия к реактивной поверхности. Объяснение этому явлению заключается в том, что уровень сдвига повышается по мере увеличения тромба, что определяется массой агрегированных тромбоцитов. Следовательно, взаимодействие тромбоцит-тромбоцит, происходящее в стороне от реактивной поверхности, демонстрирует ограничивающий эффект гемодинамических сил на эффективность адгезивных связей, прежде чем появится любое наложение первого слоя тромбоцитов на основу тромба. Таким образом, GPIb α и фактор фон Виллебранда необходимы для поддержания нормальной агрегации тромбоцитов при высоком сдвиге гемодинамических условий, когда основная функция GPIbIIIa может быть незначительна [48, 66].

1.2.4. Агрегация тромбоцитов

Агрегацию тромбоцитов определяют как процесс взаимной адгезии между двумя тромбоцитами. После адгезии дисковидная форма тромбоцитов меняется на сферическую. При этом из гранул выбрасываются агонисты, активирующие тромбоциты (АДФ, серотонин, тромбоксан А₂, адреналин, тромбин и др.). В результате высвобождения этих веществ в крово-

ток осуществляется механизм положительной обратной связи, проявляющейся в усилении первоначальной агрегации тромбоцитов с одновременным вовлечением в процесс агрегации соседних неактивированных клеток. При повреждении эндотелия тромбоциты вступают в контакт с белками субэндотелия — коллагеном, фактором фон Виллебранда, тромбоспондином, фибронектином и др. [67].

В физиологических условиях тромбоциты не агрегируют между собой и не приклеиваются к сосудистой стенке в силу того, что последняя постоянно генерирует простагландин, который образуется из арахидоновой кислоты. Цитоплазматическая мембрана эндотелиальных клеток синтезирует тромбомодулин, который связывает тромбин, благодаря чему последний утрачивает способность к свертыванию, но сохраняет активирующее действие на систему двух важнейших антикоагулянтов — протеина С и Z. Эндотелиальные клетки продуцируют тканевый активатор плазминогена, фиксируют на своей поверхности антикоагулянтный комплекс антитромбин III + гепарин, секретируют фактор фон Виллебранда, фибронектин, который связывается с рецепторами форменных элементов крови и эндотелиальных клеток, а также с фибрином, что способствует упрочнению тромба [68].

Выделяют первичную и вторичную фазы агрегации. Первичная фаза — обратимая агрегация, когда под влиянием АДФ тромбоциты скучиваются и образуют рыхлую тромбоцитарную пробку, проницаемую для плазмы крови. Тромбоциты соединяются друг с другом фибриногеновыми мостиками. Вторичная фаза — необратимая агрегация. В данном случае образующийся к этому времени в плазме крови тромбин действует на рецепторы тромбоцитов и приводит к их разрушению и слиянию в плотную массу. Образовавшаяся тромбоцитарная пробка непроницаема для плазмы крови (см. вклейку, рис. 8). У пациентов с дефектами гранул тромбоцитов фаза вторичной агрегации сокращена или полностью отсутствует в связи с повышенной кровоточивостью. Для нормальной агрегации тромбоцитов необходимы три условия: повышенная вероятность контакта между двумя тромбоцитами, наличие ионов кальция и фибриногена. В случае нарушения одного из условий агрегация тромбоцитов не происходит. Нормальная плазма крови содержит достаточные для агрегации количества кальция и фибриногена, которые запасены в гранулах тромбоцитов. Во время агрегации оба компонента высвобождаются и включаются в растущую тромбоцитарную пробку [69, 70].

В случае повреждения сосуда агрегация тромбоцитов очень существенна для формирования тромбоцитарного тромба и для образования патологического тромба у места разрыва атеросклеротической бляшки. В начальный контакт тромбоцитов с поврежденной стенкой сосуда (адгезия) вовлечено множество адгезивных субстратов (фактор фон Виллебранда, коллаген) и тромбоцитарных рецепторов (GPIb-V-IX, GPIIb/IIIa или $\alpha_{11b}\beta_3$, $\alpha_2\beta_1$). Взаимодействие между связанным с матриксом фактором фон Виллебранда и GPIIb/IIIa в первую очередь служит для скопления тромбоцитов на площади повреждения и, частично, предпосылкой для удерживания интегринопосредованной клетки [71, 72].

Традиционная модель агрегации тромбоцитов, в которой интегрину GPIIb/IIIa отводится исключительная роль во взаимодействии тромбоцит-

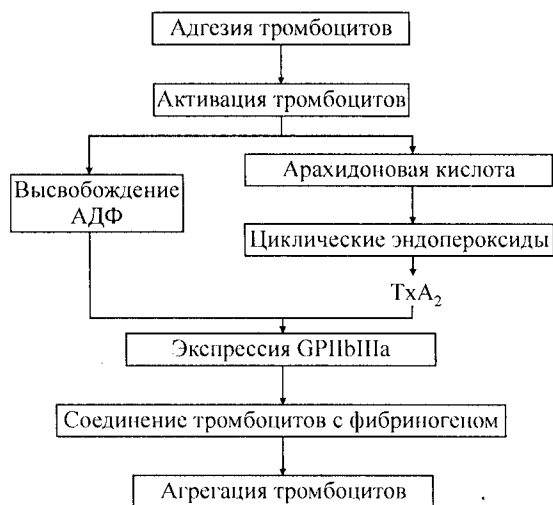


Рис. 1.9. Этапы от адгезии тромбоцитов до их агрегации

тромбоцит-тромбоцит, необратимая агрегация тромбоцитов требует вторичного адгезивного взаимодействия между фактором фон Виллебранда и GPIIb/IIIa [73].

Адгезивно-агрегационная функция тромбоцитов в значительной степени зависит от транспорта ионов кальция в эти клетки, а также от образования из мембранных фосфолипидов арахидоновой кислоты и циклических производных простагландинов. При этом в самих тромбоцитах образуется мощный стимулятор агрегации и ангиоспазма — тромбоксан А₂, а в эндотелиальных клетках — антиагрегант и вазодилататор — простациклин. При повреждении эндотелия начинает преобладать образование тромбоксана. Этот дисбаланс между тромбоксаном и простациклином резко усиливает агрегацию (рис. 1.9).

Основную роль в агрегации тромбоцитов играет гликопротеин IIb/IIIa. В состоянии покоя фибриноген плазмы крови не связывается с поверхностью тромбоцитов. Центры связывания фибриногена с рецепторами экспонируются только после активации тромбоцитов; процесс связывания сильно зависит от наличия ионов кальция и не наблюдается при отсутствии двухвалентных катионов. Небольшие агрегаты тромбоцитов формируются посредством фибриногеновых мостиков между двумя соседними тромбоцитами, а также при участии тромбоспондина. Последний вступает в действие во второй фазе агрегации, усиливая межклеточное взаимодействие и превращая обратимые микро- и макроагрегаты в необратимые структуры.

1.2.5. Активация тромбоцитов

Адгезия тромбоцитов приводит к их активации. Неактивированные тромбоциты, циркулирующие в крови человека, содержат в цитоплазме много неполимеризованного актина, а также гранул разного состава.

При действии химических веществ, связывающихся с рецепторами на наружной стороне их мембраны, например коллагена, тромбоциты активируются. Такая активация — начальный этап свертывания крови. На поверхности активированного тромбоцита выпячиваются многочисленные псевдоподии. У тромбоцитов так же, как и у больших ядерных клеток [2], молекулярной основой образования псевдоподий является полимеризация актиновых микрофиламентов из растворимого актина. К микрофиламентам присоединяются миозин и другие молекулы. В результате псевдоподии, как и у больших клеток, становятся сократимыми, способными прикрепляться к различным поверхностям, например к коллагеновым волокнам [34].

Активация тромбоцитов — сложный процесс, регулируемый: а) изменениями в метаболических и биохимических механизмах; б) изменениями формы тромбоцитов; в) активацией рецепторов поверхности тромбоцитов; г) изменениями в ориентации мембранных фосфолипидов.

Особенности покоящихся и активированных тромбоцитов приведены ниже:

<i>Показатель</i>	<i>Покоящиеся тромбоциты</i>	<i>Активированные тромбоциты</i>
Форма	Дисковидная	Сферическая с псевдоподиями (эхиносфероциты)
Актин	F-форма	G-форма
Фосфолипиды	Неактивные	Синтез тромбксана A_2 через расщепление арахидоновой кислоты
Фосфорилаза A_2	Неактивная	Активированная, высвобождает из фосфолипидной мембраны арахидоновую кислоту
Фосфорилаза C	Неактивная	Активированная, превращает ФИФ ₂ в ИФ ₃
Аденилатциклаза	Неактивная	Активированная
Цитоплазматический кальций	Низкое содержание	Высокое содержание
Гликопротеин П _в IIIa	Неактивный	Активированный, связывается с фибриногеном

Примечание. ФИФ — фосфоинозитол-4,5-бифосфонат; ИФ — 1, 4, 5-трифосфат.

Изменения в ориентации фосфолипидов вблизи плазматической мембраны создают для активированной поверхности возможность ассоциации на ней коагуляционных факторов и формирования каталитического протромбиназного комплекса. Это приводит к повышенной секреции тромбина и укреплению гемостатического сгустка посредством поперечной прошивки фибрина [74].

В дальнейшем тромбоциты активируются коллагеном и первыми порциями тромбина, образующимися в местах повреждения стенки сосуда. Продукты этих реакций активируют протеинкиназу C, а также повышают концентрацию кальция в цитозоле тромбоцитов. Помимо тромбина активацию тромбоцитов вызывают выделяющиеся из клеток (при их повреждении) фактор агрегации тромбоцитов, АДФ, а также выбрасывающиеся в кровотоки катехоламины, серотонин и др. Все эти агенты имеют специфические рецепторы.

пторы на тромбоцитарной плазматической мембране [75]. В результате возникает ряд последовательных, хотя и частично перекрывающихся событий.

1. Форма тромбоцитов изменяется, они образуют длинные псевдоподии.

2. На поверхностной мембране тромбоцита из рецепторов GPIIb и GPIIIa формируется объединенный рецептор GPIIb/IIIa, с которым связываются фибриноген и другие адгезивные белки, вследствие чего тромбоциты приклеиваются друг к другу.

3. Из фосфолипидов мембран высвобождается арахидоновая кислота, которая, окисляясь, образует ряд производных, в том числе простагландин PGH_2 — кофактор активации тромбоцитов, индуцируемой коллагеном, и тромбоксан A_2 , который тоже способен активировать тромбоциты.

4. Секретируется АДФ, который обладает способностью активировать тромбоциты и привлекать новые к формированию тромба.

5. На поверхности тромбоцитов мембраны реорганизуются и происходит экспозиция фосфолипидов, необходимых для последующего образования коагуляционных комплексов фермент-кофактор. Секреция тромбоцитарного фактора V из α -гранул тромбоцитов обеспечивает ключевой компонент для формирования одного из комплексов фермент-кофактор. В результате образуется дополнительное количество тромбина, что ведет к активации фибриногена и образованию фибриновых нитей, радиально отходящих от тромбоцитарного агрегата и способствующих формированию тромбоцитарного тромба, закрывающего сосуд.

6. Внутри тромбоцитов активируется механизм сокращения тромбоцитарного актомиозина. Тромбоцитарный сгусток сжимается, обеспечивая более эффективное прикрепление к месту повреждения сосуда.

1.2.6. Секреция

Во время адгезии и изменения формы тромбоциты начинают высвобождать компоненты гранул в окружающую среду. Этот процесс известен как секреция, высвобождение, дегрануляция. Секреция происходит двумя путями: с одной стороны, гранулы выбрасывают свои компоненты во внеклеточное пространство, где они попадают в открытую каналикулярную систему, с другой — через соединение мембраны гранул с плазматической мембраной секреция может происходить непосредственно в окружающую среду (экзоцитоз). Секреция гранул укрепляет активацию и вызывает вторичную (необратимую) агрегацию тромбоцитов.

Процесс секреции гранул является энергозависимым и требует наличия АТФ. Кроме того, секреция зависит от внутриклеточной концентрации кальция и происходит в следующем порядке: сначала высвобождаются компоненты плотных гранул, затем — α -гранул, и только после этого — лизосом. Компоненты гранул секретируются лишь при определенной концентрации кальция, причем для каждого типа гранул она разная. Секреция компонентов наблюдается до и во время вторичной агрегации и приводит к активации и привлечению свободных тромбоцитов подобно тому, как образование фибрина укрепляет тромбоцитарный тромб.

Плотные гранулы содержат в основном АДФ, АТФ, серотонин и кальций. Высвобождение АДФ играет основную роль в активации и привлечении покоящихся тромбоцитов в процессе агрегации. Наряду с этим АДФ высвобождается из поврежденной стенки сосуда, эндотелиальных клеток и эритроцитов, после чего связывается со специфическими мембранными рецепторами. Взаимодействие АДФ с пуриnergическим рецептором P_{2X_1} приводит к быстрому выбросу кальция и изменению формы тромбоцитов. Кроме того, АДФ, связываясь с рецептором P_{2Y_1} , активирует гликопротеин $GP_{IIb/IIIa}$. Рецептор посредством ингибиторных G-белков сопряжен с аденилатциклазой и таким образом тормозит повышение уровня цАМФ [76]. Значение АДФ для формирования тромба *in vivo* подтверждено клиническими исследованиями антитромботических компонентов класса тиенопиридинов (тиклопидин и клопидин), которые специфически ингибируют АДФ-стимулируемую активацию тромбоцитов.

Кроме адениннуклеотидов и серотонина плотные гранулы секретируют кальций высокой концентрации; это вызывает связывание фибриногена с $GP_{IIb/IIIa}$ и способствует функционированию других Ca^{2+} -зависимых механизмов. Кроме АДФ плотные гранулы высвобождают АТФ, который является конкурентным антагонистом АДФ и таким образом оказывает антикоагулянтное действие. Высвобожденный серотонин способствует замедлению кровотока возле тромбоцитарного тромба, оказывая сосудосужающее действие и тем самым способствуя формированию тромба.

Посредством высвобождения компонентов гранул тромбоциты участвуют не только в гемостазе, но и во многих других физиологических механизмах (рис. 1.10).

α -Гранулы содержат белки, некоторые из которых являются тромбоцитспецифичными (β -тромбомодулин), но встречаются также в плазме крови и других клетках. β -Тромбомодулин и тромбоцитарный фактор 4 (PF4) могут нейтрализовать антикоагулянтную активность гепарина, вызвать хемотаксис лейкоцитов и фибробластов. Тромбоцитарный фактор роста (PDGF) оказывает митогенный эффект на фибробласты возле тромбоцитарного тромба и участвует в пролиферативных процессах при повреждении стенки сосуда. α -Гранулы секретируют тромбоспондин, который участвует в адгезии и вторичной агрегации тромбоцитов. Более того, интерлейкины 1 и CD40-лиганд также секретируются активированными тромбоцитами. Эти факторы вызывают радикальные изменения адгезивных и хемотактных свойств клеток сосудистой стенки.

Гликопротеин α -гранул — P-селектин — во время секреции перемещается на поверхность мембраны. P-селектин является рецептором, необходимым для адгезии тромбоцитов к лейкоцитам. Этот белок вызывает воспалительные реакции в лейкоцитах. Кроме того, белки системы свертывания крови (фактор фон Виллебранда, фибриноген, фактор V) также встречаются в α -гранулах и выполняют прокоагулянтные или антифибринолитические (ПАИ-1) функции [40].

Активированные тромбоциты высвобождают множество гидролаз, находящихся в лизосомах. Секреция ферментов, гидролизующих тромбоциты,

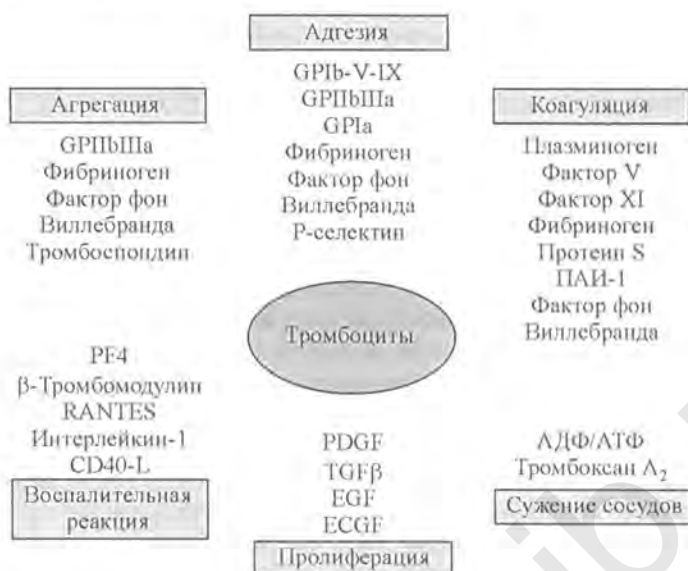


РИС. 1.10. Взаимодействия тромбоцитов [34]

вызывает нарушение субэндотелия и играет патофизиологическую роль в перестройке сосудистой стенки при атеросклерозе. Тромбоцитарные коллагеназы изменяют активационные свойства субэндотелиального коллагена посредством вызванных протеолизом изменений в молекуле белка. Действие эластазы приводит к расщеплению эластичных тканей сосуда и является характерным процессом атерогенеза. Гепариназа вызывает высвобождение гепаринподобных компонентов эндотелия и ингибирует рост клеток гладкой мускулатуры. Лизосомы тромбоцитов секретируют неактивную форму β-амилазного белка, который в довольно высокой концентрации обнаружен в церебральной артерии пациентов с болезнью Альцгеймера.

1.3. МЕМБРАННЫЕ РЕЦЕПТОРЫ И АКТИВАЦИЯ ТРОМБОЦИТОВ

Стенка сосуда содержит непрерывный слой эндотелия, который служит барьером между циркулирующими тромбоцитами и субэндотелиальным матриксом. В норме клетки эндотелия плотно прилегают друг к другу и слабо взаимодействуют с клетками, циркулирующими в крови. Барьерная функция эндотелия нарушается в случае его повреждения. При этом на поверхности поврежденного эндотелия экспонируются белки, включающиеся в процессы свертывания крови и воспаления. Образующийся тромбин вызывает высвобождение цитокинов, вазоактивных агентов и факторов роста. Под их действием фенотип эндотелиальных клеток меняется из тромборезистентного на прокоагулянтный и воспалительный, вследствие чего проферменты свертывания крови превращаются в активные протеиназы. При этом на поверхности субэндотелия экспонируются адгезивные белки,

необходимые для узнавания и связывания своих лигандов на моноцитах. Первый этап взаимодействия тромбоцитов с субэндотелием происходит посредством адгезивных рецепторов — GPIb-IX-V, которые опосредуют движение и прилипание тромбоцитов у места повреждения сосуда.

Далее рецепторы коллагена $\alpha_2\beta_1$ и GPVI принимают участие в адгезии и вызывают активацию тромбоцитов, вследствие чего из плотных гранул высвобождается АДФ, а из α -гранул — фибриноген, фактор V и P-селектин. Компоненты гранул стимулируют коагуляционный ответ в результате высвобождения фактора V и воспалительный ответ в результате экспонирования на поверхности тромбоцитов P-селектина. Тромбоциты генерируют также липидные медиаторы, одним из которых является тромбоксан A_2 . АДФ действует на тромбоциты посредством рецепторов P_{2Y1} и P_{2Y12} , тогда как тромбоксан A_2 активирует на поверхности тромбоцитов тромбоксан-простаноидный рецептор. Высвобожденные компоненты плотных гранул поддерживают дальнейшую активацию тромбоцитов и способствуют их привлечению к месту повреждения сосуда. Тромбоциты, взаимодействующие с этими посредниками, подвергаются реорганизации актинового цитоскелета, вследствие чего меняют форму. Появляются псевдоподии, которые формируют ячеистую сеть тромбоцитов в тромбоцитарной пробке. Кроме этого экспонируется тканевый фактор, инициирующий появление тромбина. Тромбин активирует тромбоциты посредством взаимодействия протеиназаактивированных рецепторов PAR-1 и PAR-4, а также превращает фибриноген в фибрин, который стабилизирует тромбоциты в тромбоцитарной пробке, что приводит к стабилизации гемостатической пробки [77].

Активацию тромбоцитов вызывают коллаген и ряд растворимых агонистов (АДФ, тромбин, тромбоксан A_2), взаимодействуя со специфическими мембранными рецепторами. Эти рецепторы связаны с G-белками, которые усиливают активацию (см. вклейку, рис. 10). Параллельно в комплексе со специфическими рецепторами антагонисты ингибируют процесс активации тромбоцитов:

Мембранные рецепторы и активация тромбоцитов

Рецепторы активации

Рецептор АДФ (P_{2Y1})
 Рецептор тромбина
 α -Адренорецептор (α_{2A} R)
 Рецептор фактора активации тромбоцитов (PAF R)
 Рецептор серотонина (5-HT_{2A})
 Рецептор тромбоксана (TxA_2 R)
 Рецептор вазопрессина (V_{1A} R)
 Рецептор коллагена (Coll R)

Рецепторы ингибирования активации

Рецептор аденозина (A_2A R)
 β -Адренорецептор (β_2 R)
 Рецептор простаглицина (PGI_2 R)
 Простагландин E_1 (PGE_1 R)

Взаимодействие тромбоцитов с коллагеном, фактором фон Виллебранда, АДФ, тромбоксаном A_2 и тромбином вызывает внутриклеточный сигналинг, инициирующий активацию рецептора фибриногена — интегрина GPIIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$), вследствие чего он связывается с фибриногеном. Образуются поперечно-сшитые агрегаты, накопление которых у места повреждения сосуда приводит к остановке кровотечения.

Таким образом, активация тромбоцитов является продуктом многих сигналов, поступающих от разных рецепторов, каждый из которых вносит вклад в формирование тромбоцитарного тромба.

1.3.1. Рецепторы адгезии тромбоцитов

Адгезия тромбоцитов необходима для роста, дифференциации, выживания и функционирования клеток. Нигде это не проявляется так наглядно, как в реакции на повреждение тканей, при котором мгновенно возникают репаративные процессы — гемостаз, воспаление и заживление раны. Протекание этих процессов зависит от координации адгезии клеток, миграции тромбоцитов, лейкоцитов и пр.

Клеточная адгезия опосредована структурно различными группами мембранных рецепторов, каждому из которых присущи конкретные свойства, необходимые для выполнения специфических функций при ответе на повреждение. Например, при токе крови через поврежденный сосуд лейкоциты медленно движутся к поверхности эндотелия вследствие взаимодействия лейкоцитарных гликопротеинов с селектинами. Тромбоциты также перемещаются как на поврежденную поверхность эндотелия, так и на поверхность сосуда. В последнем случае перемещение происходит путем взаимодействия комплекса GPIIb-V-IX с фактором фон Виллебранда на субэндотелии. Процесс передвижения может быть замедлен клетками крови: они доходят до нужного места и внезапно останавливаются посредством регулируемого взаимодействия между адгезивными рецепторами и любым рецептором эндотелиальных клеток или адгезивными белками матрикса. Интегрины также опосредуют ответы, необходимые для полной реакции на рану, включая перемещение лейкоцитов и агрегацию тромбоцитов.

Хотя адгезивные рецепторы вполне оправдывают свое название, любая трактовка их как клеточной связи не совсем верная. Большинство из них, если не все, участвует в контакте с вне- и внутриклеточным матриксом. При нарушении сосудистой системы тромбоциты становятся доступными для компонентов экстрацеллюлярного матрикса. Взаимодействие тромбоцитов с этими белками может быть прямым и опосредованным, но принципиально важное значение имеет коллаген.

1.3.2. Рецепторы коллагена

Комплекс GPIIb-V-IX. Начальное связывание тромбоцитов с коллагеном субэндотелия требует присутствия фактора фон Виллебранда, который в условиях кровотока в артериях и небольших артериолах одновременно связывается и с коллагеном, и с комплексом GPIIb-V-IX или с интегрином GPIIbIIIa в его активной конформации (см. вклейку, рис. 11). Фактор фон Виллебранд-зависимые взаимодействия происходят быстро и не могут поддерживать образование тромбоцитарного тромба. Эти взаимодействия заменимы более стабильным связыванием коллагена с тромбоцитарными рецепторами коллагена — интегинами $\alpha_2\beta_1$ и GPVI [78—81].

Связывание фактора фон Виллебранда с комплексом GPIb-V-IX повышает аффинность GPIIb/IIIa, вследствие чего интегрин способен связываться с фактором фон Виллебранда посредством повышения адгезии и, таким образом, способствовать формированию тромба связыванием с фибриногеном [82].

Интегрин $\alpha_2\beta_1$. Этот интегрин, известный также как тромбоцитарный GPIa/IIa или лимфоцитарный VLA-2, был первым обнаруженным тромбоцитарным рецептором коллагена, который связывается с коллагеном при наличии ионов магния. Долгое время $\alpha_2\beta_1$ считался основным тромбоцитарным рецептором, способствующим адгезии и активации, и играющим ключевую роль в гемостазе. Немалый вклад в выяснение роли $\alpha_2\beta_1$ внесло изучение системы гемостаза двух пациентов со сниженным уровнем рецептора, которые страдали посттравматическим кровотечением и чрезмерной меноррагией, и тромбоциты которых были неспособны реагировать на коллаген. Однако у одного из пациентов способность тромбоцитов к агрегации, вызываемой коллагеном, восстанавливалась при введении тромбоспондина-1, у второго — наблюдалась дефектная адгезия, из чего следовало, что нарушение процесса не связано с коллагеном.

Исследования по ингибированию $\alpha_2\beta_1$ антителами или токсинами яда змей привели к спорным результатам относительно роли интегрина. С одной стороны, было показано, что ингибирование $\alpha_2\beta_1$ значительно снижает или устраняет адгезию и агрегацию, с другой — обнаружено незначительное влияние антител и токсинов на адгезию к коллагену и коллагенстимулируемую агрегацию тромбоцитов. Подобные разногласия можно объяснить такими факторами, как условия эксперимента — присутствие или отсутствие плазмы крови, получение коллагена. Способ ингибирования $\alpha_2\beta_1$ также может влиять на результат. Например, существует множество анти- $\alpha_2\beta_1$ факторов, слабо ингибирующих активацию тромбоцитов GPVI-специфичными агонистами, такими, как конвульксин и CRP, предполагающих любой ингибиторный эффект интегрина на GPVI-зависимые сигналы или неспецифическое действие. Неспецифический ингибиторный эффект анти- $\alpha_2\beta_1$ особенно четко показан с помощью змеиного токсина родоцитина, мощного тромбоцитарного агониста. Некоторые исследователи показали, что блокирующие $\alpha_2\beta_1$ антитела ингибируют вызванную родоцитином активацию и агрегацию тромбоцитов, полагая, таким образом, что $\alpha_2\beta_1$ необходим для процесса активации [83]. Однако позже было продемонстрировано, что $\alpha_2\beta_1$ -дефицитные тромбоциты нормально реагируют на родоцитин, тем самым исключая роль интегрина.

Сегодня известно, что потребность в $\alpha_2\beta_1$ во многом определяется типом коллагена. В частности, $\alpha_2\beta_1$ необходим для адгезии и активации тромбоцитов коллагеном I типа в любых условиях, а также для осуществления этих же процессов с участием нативного фибриллярного коллагена. Это подтверждено группой исследователей [84], не обнаруживших влияния ингибирования $\alpha_2\beta_1$ на адгезию тромбоцитов человека к фибриллярному коллагену I типа в условиях низкого и высокого напряжения сдвига. В то же время абсолютная зависимость от функции $\alpha_2\beta_1$ показана для адгезии и формирования тромба на пепсинрастворимом коллагене I типа при таких же условиях.

Во избежание контакта с белками плазмы крови, который мог вызвать неспецифические взаимодействия, многие исследования взаимодействия тромбоцит-коллаген проводились на отмывтых тромбоцитах. Однако отсутствие плазмы крови ограничивает роль других адгезивных рецепторов коллагена, таких, как GPIb и GPIIb/IIIa. Последний связывается с коллагеном при участии фактора фон Виллебранда. Этот фактор в высокой концентрации содержится в плазме крови, а также высвобождается из α -гранул тромбоцитов во время их активации. Оба источника упомянутого белка играют существенную роль в распластывании и адгезии тромбоцитов при формировании тромба. Этим можно объяснить, почему $\alpha_2\beta_1$ имеет такое большое значение для адгезии отмывтых тромбоцитов к коллагену в динамических условиях, тогда как интегрин менее важен в цельной крови в присутствии циркулирующего фактора фон Виллебранда.

Иная картина наблюдается в статических условиях, при которых отмывтые тромбоциты прочно адгезируют к фибриллярному коллагену посредством $\alpha_2\beta_1$ -независимого механизма, хотя интегрин также вносит вклад в этот процесс, зависящий от степени отмывки и плотности коллагена. $\alpha_2\beta_1$ -Независимая адгезия подразумевает также взаимодействие GPIIb/IIIa с фактором фон Виллебранда, высвобожденным из α -гранул, однако это требует генерирования сильного внутриклеточного сигнала, опосредованного другими рецепторами, возможно GPVI.

Результаты изучения роли $\alpha_2\beta_1$ в активации тромбоцитов показали [85], что сродство интегрин к коллагену регулируется внутриклеточными сигналами. Некоторые агонисты — АДФ, тромбоксаны, GPVI-специфичные индукторы — повышают сродство $\alpha_2\beta_1$ к мономерному или растворимому коллагену. Нарушенную адгезию GPVI-дефицитных тромбоцитов к коллагену можно восстановить непосредственной активацией $\alpha_2\beta_1$ ионами магния или экзогенно введенных агонистов. То, что $\alpha_2\beta_1$ существует в более чем одном аффинном состоянии, не удивительно, поскольку индукторзависимая аффинная модуляция является основным свойством многих интегринов. Была предложена двухчастковая двустадийная модель активации тромбоцитов [84], предполагающая, что начальное взаимодействие коллагена с тромбоцитами через GPVI приводит к активации интегринов $\alpha_2\beta_1$ и GPIIb/IIIa и что это же взаимодействие опосредует прочную адгезию к коллагену и поэтому усиливает сигналинг через GPVI.

Исследования *in vitro* перфузии цельной крови показали, что $\alpha_2\beta_1$ -дефицитные тромбоциты прилипают и агрегируют к фибриллярному (Horm) коллагену в условиях сильного и слабого стресса так же, как и к контрольному (природному) коллагену. Напротив, адгезия $\alpha_2\beta_1$ -дефицитных тромбоцитов к мономерному коллагену, который слабо связывается с GPVI, в тех же условиях не происходит. Это подтверждает, что природа коллагена определяет значение интегрин. В отсутствие плазмы крови (и внеклеточного фактора фон Виллебранда) адгезия $\alpha_2\beta_1$ -дефицитных тромбоцитов к коллагену в динамических условиях сильно заингибирована, что является подтверждением рецепторной функции интегрин. Однако в статических условиях отмывтые $\alpha_2\beta_1$ -дефицитные тромбоциты прилипают к фибриллярному, но не

мономерному, коллагену при наличии ионов магния. Все вместе свидетельствует, что $\alpha_2\beta_1$ играет основную роль в адгезии тромбоцитов к коллагену в случае отмытых тромбоцитов в динамических условиях, тогда как в других физиологических условиях участие интегрин не обязательно из-за наличия внеклеточного фактора фон Виллебранда.

Интегрин $\alpha_2\beta_1$ не активирует тирозинкиназу, которая требуется для коллагенстимулируемой агрегации тромбоцитов, и стабилизирует взаимодействие с коллагеном, позволяющее ему взаимодействовать с другим рецептором коллагена, который активирует тирозинкиназависимый сигналинг [86].

Гликопротеин VI (GPVI). GPVI впервые был идентифицирован как тромбоцитарный гликопротеин молекулярной массой 60 или 65 кДа более 20 лет назад. Однако первые сведения о GPVI как о важном тромбоцитарном рецепторе коллагена появились благодаря результатам исследования пациентов с аутоиммунной тромбоцитопенией, вызванной антителами к 65 кДа белку, который присутствовал у доноров, но отсутствовал у больных. Тромбоциты, полученные от таких пациентов, не реагировали на коллаген, тогда как процесс их активации другими стимуляторами протекал нормально. F(ab)₂-фрагменты фракции Ig являются мощными активаторами нормальных тромбоцитов, тогда как моно-Fab-фрагменты ингибируют активацию тромбоцитов, вызванную коллагеном. При низком содержании GPVI наблюдается небольшое кровотечение, а агрегация тромбоцитов под действием коллагена несколько нарушена [87, 88].

Новая эра рецепторов коллагена последовала за открытием GPO-содержащего CRP-XL пептида (см. п. Тромбоциты и коллаген) и демонстрацией, что пептид, а также коллаген вызывают активацию через тирозин-киназный сигналинг, в который вовлечены киназа Syk и фосфолипаза C₂. Эта работа привела к открытию, что коллаген и CRPs вызывают фосфорилирование тирозина γ -цепи Fc-рецептора с тирозинсодержащим активационным мотивом (ITAM), представляющего собой мультипротеиназный комплекс, содержащий GPVI и Fc-рецепторы γ -цепи (FcR γ). Для ясности надо отметить, FcR γ является компонентом мультисубъединичного высокоаффинного рецептора иммуноглобулина IgE. GPVI как мощный рецептор коллагена был обнаружен у пациентов с низким содержанием этого белка, страдающих диатезным кровотечением. Он нековалентно связывается с FcR γ и анти-GPVI F(ab')₂-фрагментами и вызывает активацию тромбоцитов. Значение FcR γ и Syk в активации тромбоцитов коллагеном и CRP-XL показано при изучении нокаута и нокадауна тромбоцитов мыши, когда наблюдался недостаток одного из белков.

Уникальность коллагена как тромбоцитарного агониста заключается в том, что он представляет собой только стимулятор, активирующий тромбоциты в месте повреждения через ITAM-регулируемый путь. Токсин змеиного яда конвульксин, активирующий тромбоциты через GPVI, вызывает фосфорилирование тирозина γ -цепи FcR и Syk. Способность токсина активировать тромбоциты обнаружена 20 лет назад, однако механизм его действия, в отличие от коллагена, до сих пор окончательно не выяснен [89].

В 2000 г. впервые были представлены антимышиные GPVI моноклональные антитела (mAb), JAQ1 [90]. Антитела использовали против FcR γ -дефицитных тромбоцитов в предвкушении того, что рецептор гликопротеина может отсутствовать на поверхности тромбоцитов, как показано для других рецепторов, сопряженных с ITAM-содержащим белком. JAQ1 ингибируют агрегацию нормальных тромбоцитов мыши, вызванную коллагеном и CRP-XL, но быстро индуцируют агрегацию в случае поперечной прошивки вторичным антителом.

Группой исследователей было показано, что FcR γ -дефицитные тромбоциты являются устойчивыми к активации коллагеном I и V типов, при этом полагая, что комплекс GPVI/Fc γ — основной рецептор для коллагена любого типа [91]. Однако дефекты таких тромбоцитов не могут быть связаны с отсутствием GPVI, также как функции других рецепторов могут проявляться в отсутствие FcR γ (например, GPIb). Более прямое подтверждение особой роли GPVI для активации тромбоцитов коллагеном следует из опытов на мышах, которым вводили JAQ1 *in vivo*. Это приводило к временному дефициту GPVI, но не действовало на другие рецепторы, включая $\alpha_2\beta_1$, GPIIb/IIIa, GPIb и GPV. Показано, что снижение содержания GPVI происходит вследствие интернализации и протеолитической деградации рецептора. Подобно FcR γ -дефицитным тромбоцитам GPVI-истощенные тромбоциты устойчивы к активации CRP-XL и коллагеном.

Процессы фосфорилирования, вызванные CRP-пептидами, токсинами яда змей и поперечно прошитыми GPVI-антителами качественно сходны с таковыми, вызванными коллагеном, хотя интенсивность ответа сравнительно больше. Все GPVI-специфичные индукторы представляют собой природные мультимеры и способны вызывать формирование кластеров GPVI на поверхности тромбоцитов, посредством чего генерируется мощный внутриклеточный сигнал. В то же время GPVI-специфичный мотив — GPO — составляет около 10 % коллагена и пространственно не может быть предназначен для образования эквивалентного уровня кластеризации. Заслуживает внимания тот факт, что F(ab') $_2$ -фрагменты JAQ1, вызывающие только димеризацию рецептора, стимулируют слабый внутриклеточный сигнал, который достаточен для синергизма с G $_i$ -сигнальным путем, но неспособен вызывать изменение формы тромбоцитов, агрегацию или высвобождение компонентов гранул.

Комплементарная роль $\alpha_2\beta_1$ и GPVI. О вкладе $\alpha_2\beta_1$ и GPVI в адгезию тромбоцитов к коллагену и формирование тромба накоплено много данных. Тромбоциты мыши с недостатком GPVI вследствие внутривенной инъекции антимышиных моноклональных антител против GPVI или абляция гена FcR γ резистентны к активации коллагеном и коллагенподобным пептидом или адгезии к коллагену в статических и динамических условиях. Такие мыши также невосприимчивы к легочной тромбоэмболии, вызванной инфузией коллагена или адреналина, а время кровотечения умеренное. Тромбоциты, дефицитные по β_1 , хотя и медленно, способны к агрегации, вызываемой коллагеном. При низком (150 с $^{-1}$) и высоком (1000 с $^{-1}$) уровнях напряжения сдвига процесс прилипания к растворимому коллагену протекает нормаль-

но. Предполагается, что именно GPVI, а не $\alpha_2\beta_1$ важен для адгезии тромбоцитов к коллагену, и что начальное взаимодействие с коллагеном происходит преимущественно через GPVI, который вызывает клеточный сигналинг, что, в свою очередь, повышает аффинность $\alpha_2\beta_1$. Однако в отличие от тромбоцитов, дефицитных по β_1 , тромбоциты, дефицитные по α_1 , не могут адгезировать к растворимому коллагену в условиях низкого уровня напряжения сдвига, поэтому их взаимодействие с коллагеном аномально [92, 93].

Тромбоциты трансгенных мышей, у которых делеция GPVI произошла совсем недавно, не способны к агрегации под действием коллагена, однако время кровотечения у таких мышей находится в пределах нормы. Более того, изучение перфузии в условиях высокого напряжения сдвига показало, что тромбоциты с недостатком GPVI слипаются с нерастворимым коллагеном I типа, но не могут формировать тромб. То же самое характерно и для GPVI-дефицитных тромбоцитов человека, а также для нормальных тромбоцитов человека и анти-GPVI антитела, что свидетельствует о комплементарной роли $\alpha_2\beta_1$ и GPVI: $\alpha_2\beta_1$ способен связываться с коллагеном до активации тромбоцитов, а GPVI необходим для формирования тромба [94].

Роль GPIb и фактора фон Виллебранда во взаимодействии тромбоцит-коллаген в динамических условиях. Адгезия тромбоцитов к коллагену в напряженных условиях ($> 600 \text{ с}^{-1}$) требует присутствия иммобилизованного на коллагене фактора фон Виллебранда. Взаимодействие опосредовано N-концевым доменом GPIb α , содержащим центр связывания с фактором фон Виллебранда, существенно для начального захвата и связывания тромбоцитов фактором фон Виллебранда и сильно зависит от скорости комплексообразования между фактором фон Виллебранда и GPIb α . Замедленная скорость комплексообразования приводит к привлечению тромбоцитов к фактору фон Виллебранда, которое продолжается, пока опосредованная GPIbIIIa адгезия не станет прочной. В то же время стабильная адгезия быстро происходит на покрытой коллагеном поверхности через интегрины $\alpha_2\beta_1$ и IIbIIIa (см. вклейку, рис. 12).

GPIb вызывает активацию GPIbIIIa в тромбоцитах и СНО-клетках, хотя по сравнению с другими агонистами он значительно слабее. GPVI/FcR γ -дефицитные тромбоциты мыши, которые поддерживают нормальный уровень GPIb-IX-V, не способны к адгезии на иммобилизованном коллагене в условиях низкого и высокого уровня сдвига из-за отсутствия активации интегрин. То же самое характерно и для GPVI-дефицитных тромбоцитов человека. Сигнальные события, опосредованные GPIb-IX-V, или недостаточны для поддержания быстрой стабильной адгезии к коллагену, или при отсутствии GPVI/FcR γ они не возникают. Заслуживает внимания то, что GPIb-IX-V вызывает фосфорилирование тирозина FcR γ -цепи в тромбоцитах, как и у белков GPVI-сигнального каскада.

Удивительно, что в отсутствие функционального GPVI прилипания тромбоцитов мыши и их медленного перемещения по поверхности у мест повреждения не происходит так же, как не происходит и стабильной адгезии. Это показывает, что GPIb и GPVI должны действовать вместе с тром-

боцитами, захваченными субэндотелием при условии сильного напряжения сдвига. Объяснение вовлечения GPVI в процесс прилипания *in vivo* заключается в том, что слой фактора фон Виллебранда является иммуногенным и прерывистым, поэтому контакт белка с коллагеном неполный [95]. В этой модели непосредственное взаимодействие тромбоцит-коллаген (с участием GPVI) требуется для эффективного взаимодействия GPIb-фактор фон Виллебранда. Совместное действие комплексов GPIb-IX-V и GPVI/FcR γ может быть существенным независимо от коллагена. Показано, что адгезия GPVI-дефицитных тромбоцитов человека к иммобилизованному фактору фон Виллебранда в условиях сильного напряжения сдвига снижена. Комплекс GPVI/FcR γ может быть вовлечен в процесс активации тромбоцитов, приводящий к укреплению адгезии к фактору фон Виллебранда через активированный GPIIb/IIIa. Возможно также опосредование этого процесса активацией GPIb фактором фон Виллебранда или пассивной кластеризацией с предположением, что GPIb-IX-V и GPVI/FcR γ в некоторой степени соединены с мембраной.

Небольшие количества GPIb-IX-V обнаружены в большинстве липидов, что вносит свой вклад в стрессзависимую адгезию тромбоцитов и фосфорилирование тирозина в ответ на фактор фон Виллебранда. После того как GPVI/FcR γ проводит сигнал через липиды, GPIb-IX-V и GPVI/FcR γ объединяются в этих доменах, и кластеризация GPIb α обуславливает лиганднезависимый сигналинг через GPVI/FcR γ .

Кроме роли в прилипании тромбоцитов, фактор фон Виллебранда имеет немаловажное значение как субстрат для укрепления адгезии тромбоцитов к коллагену посредством GPIIb/IIIa. В плазме крови или в цельной крови GPIIb/IIIa и $\alpha_2\beta_1$ играют слишком важную роль в опосредовании стрессустойчивой адгезии. В случае $\alpha_2\beta_1$ и коллагена взаимодействие GPIIb/IIIa с фактором фон Виллебранда требует предварительной активации интегрина. *In vitro* на поверхности, покрытой коллагеном, эта активация зависит от функционального GPVI/FcR γ , что доказано отсутствием активации GPIIb/IIIa и адгезией GPVI/FcR γ -дефицитных тромбоцитов в статических и динамических условиях. Отсюда следует, что важная роль для взаимодействия фактора фон Виллебранда с GPIIb/IIIa в адгезии тромбоцитов к коллагену зависит от GPVI (см. вклейку, рис. 13).

Помимо двух основных рецепторов коллагена на тромбоцитах существуют некоторые вспомогательные рецепторы. Были клонированы белки 65 и 47 кДа и показано, что они находятся в тромбоцитах и связываются с коллагеном I и III типов. Также был охарактеризован новый коллаген III-связывающий белок. В лучшем случае роль этих рецепторов заключается больше в модуляции (положительной или отрицательной) сигналов от GPVI/FcR γ , чем в активации тромбоцитов коллагеном. В конце 1980-х годов был открыт CD36 (или GPIV) как специфический рецептор коллагена типа V. CD36 в роли функционального рецептора пробыл недолго, однако на примере мышиных и человеческих тромбоцитов было показано, что недостаток гликопротеина не влияет на нормальный ответ тромбоцитов на действие коллагена I и V типов [96, 97].

Одним из наиболее подходящих кандидатов в дополнительные рецепторы коллагена является GPV. Этот гликопротеин нековалентно связан с комплексом GPIb-IX на тромбоцитарной мембране, чем определяется его функция. Опыты на мышах, дефицитных по GPV, не выявили каких-либо заметных отклонений, но тромбоциты этих мышей обладали низкой способностью к коллагензависимой адгезии и агрегации. В дальнейшем было показано, что GPV специфически связывается с коллагеном, а растворимый GPV блокирует коллагенстимулируемую агрегацию тромбоцитов, подтверждая тем самым свою возможность функционировать как непосредственный рецептор коллагена. GPV-дефицитные тромбоциты более чувствительны к ингибированию коллагениндуцируемой агрегации анти-GPVI mAb — JAQ1. Предполагается, что GPV способствует взаимодействию коллаген-GPVI аналогично $\alpha_2\beta_1$. Определение функционального значения GPV *in vivo* затруднено его ролью в активации тромбоцитов тромбином. GPV-дефицитные мыши проявляли повышенную чувствительность к тромбину и, таким образом, тромбоциты этих животных дали переменные ответы на действие двух агонистов. Исследования *in vivo* моделей образования артериальных тромбов привели к неоднозначным толкованиям значения дефицита GPV, что можно объяснить разными условиями коллаген- и тромбинзависимого формирования тромба [98].

Клиническое значение $\alpha_2\beta_1$ и GPVI в гемостазе и тромбозе. Несмотря на сложность экстрацеллюлярного матрикса, взаимодействие тромбоцит-коллаген играет основную роль в инициации гемостаза и тромбоза *in vivo*. Дефицит $\alpha_2\beta_1$ и GPVI у некоторых пациентов, а также наличие других осложнений мешают оценить истинную роль этих гликопротеинов во взаимодействии тромбоцит-коллаген *in vivo*. Способом установления клинического значения интегринов является использование мышей с целенаправленным разрушением субъединиц интегринов и FcR γ , а также применение антител для блокады и снижения уровня GPVI. Следует отметить, что нарушение функционирования GPVI у мышей приводит только к умеренно продолжительному времени окончания кровотечения. Такая же реакция наблюдается и у $\alpha_2\beta_1$ -дефицитных мышей. Утрата функций любого из рецепторов не усиливает спонтанное кровотечение. Изучение гемостаза мышей с недостатком обоих рецепторов, отсутствие кровотечения у рецептордефицитных особей предполагает, что другие агонисты — тромбин, АДФ или тромбоксаны — могут заменить GPVI в опосредовании активации тромбоцитов и что другие адгезивные рецепторы — интегрины GPIIb/IIIa, $\alpha_5\beta_1$ и $\alpha_6\beta_1$ — опосредуют прочную адгезию и распластывание тромбоцитов в отсутствие двух рецепторов коллагена. Однако GPVI вместе с GPIb играют основную роль на первом этапе привлечения тромбоцитов к месту повреждения. Предполагается, что дефицит GPVI может оказывать эффект, подобный эффекту взаимодействия GPIb-фактор фон Виллебранда. Нарушение контакта этих белков приводит к четко выраженному кровотечению у нормальных и к умеренному — у GPVI/FcR γ -дефицитных особей. Единственное возможное объяснение такого различия заключается в том, что GPVI вовлечен только в образование первого слоя тромбоцитов, тогда как GPIb-фактор фон Виллебранда

участвуют еще и в захвате свободных тромбоцитов в растущий тромб. Кроме того, показано, что GPVI-независимые механизмы могут опосредовать прикрепление тромбоцитов и их активацию у центра повреждения сосуда во время нормального гемостаза.

Хотя рецепторы коллагена могут быть несущественны для остановки кровотечения, существуют доказательства их вклада в патологическое тромбообразование. В процессе атерогенеза немаловажную роль в возникновении тромбоза играет усиленный синтез коллагена клетками гладких мышц и фибробластами.

Обнаженный в разрыве бляшки матрикс обогащен коллагеном и поэтому занимает центральное место в формировании артериального тромба. Предполагается возможная роль $\alpha_2\beta_1$ в сердечно-сосудистой болезни, которая изучается анализом генетического полиморфизма. Уровень экспрессии $\alpha_2\beta_1$ на тромбоцитах изменяется, и это изменение связано с полиморфизмом в некодоновой области α_2 гена.

Относительно роли GPVI в артериальном тромбозе существуют неоспоримые данные: показано, что формирование тромба в поврежденной каротидной артерии мыши практически не происходит в отсутствие функционального GPVI. Это согласуется с данными ряда исследователей, которые обнаружили заметно сниженное прикрепление тромбоцитов и последующую неоинтимальную гиперплазию у места повреждения у FcR γ -дефицитных мышей с недостатком GPVI [99]. Полученные сведения делают GPVI потенциальной фармакологической мишенью для лечения ишемической болезни сердца. Такая стратегия открывает некоторые перспективы. Во-первых, GPVI экспрессирован исключительно на тромбоцитах и мегакариocyтах, что предотвращает риск побочных эффектов анти-GPVI агентов клеток другого типа. Во-вторых, дефицит GPVI не связан с риском кровотечения у людей и мышей, в связи с чем предполагается, что анти-GPVI терапия может быть более толерантной. Это влечет за собой создание новых инструментов, таких, как антагонисты рецепторов или истошающие антитела к GPVI. Последнее является уникальным способом снятия влияния коллагена на время жизни тромбоцитов. Это продемонстрировано на мышах, у которых инъекция анти-GPVI антител JAQ1 приводила к интернализации и деградации GPVI в циркулирующих тромбоцитах. Похожий механизм регуляции сниженного уровня GPVI существует и у людей. Некоторые GPVI-дефицитные пациенты, у которых были обнаружены антитела против явно отсутствующего рецептора, по-видимому, страдали от приобретенного дефицита GPVI, основанного на обусловленном антителами удалении рецептора из тромбоцитов. Опыты на мышах показали, что *in vivo* дефицит GPVI может быть вызван через более чем один центр и не требует предварительной активации рецептора. Предполагается, что анти-GPVI агенты, которые опосредованно активируют тромбоциты, могут замедлять регуляцию рецептора *in vivo*, приводя к длительной и мощной антитромботической защите [100, 101].

1.4. АДГЕЗИЯ ТРОМБОЦИТОВ И КОЛЛАГЕН

Повреждение стенки сосуда вызывает быструю активацию тромбоцитов и формирование тромбоцитарной розетки с последующим образованием фибринового сгустка. Эти события являются основными для снижения кровотечения из поврежденного места, но также могут блокировать травмированный сосуд, вызывая тем самым ишемию и инфаркт жизненно важных органов. Одна из основных клинических проблем — развитие артериального тромбоза, который возникает вследствие разрыва и эрозии атеросклеротической бляшки. Это приводит к адгезии тромбоцитов и образованию тромба в коронарной и церебральной артериях, вследствие чего развиваются инфаркт миокарда и инсульт.

Первый шаг в коагуляционном каскаде — взаимодействие тромбоцитов с экстрацеллюлярным матриксом в месте повреждения. Среди макромолекулярных компонентов матрикса в этом процессе основная роль принадлежит коллагену, который не только поддерживает адгезию тромбоцитов посредством прямого и непрямого путей, но и непосредственно активирует клетки, вызывающие агрегацию и коагулянтную активность. Адгезия и агрегация тромбоцитов на коллагене является интегрированным процессом с участием агонистов, которые действуют через интегрины, Ig-подобные и G-белоксопосредованные рецепторы, без которых не обходятся процессы склеивания, адгезии, секреции, агрегации тромбоцитов [102].

Взаимодействие тромбоцит-коллаген имеет большое значение при среднем и высоком уровнях стресса, которые обнаруживаются в артериях и поврежденных сосудах. При высоком напряжении сдвига в артериях и артериолах мгновенное взаимодействие между гликопротеином Ib-V-IX и фактором фон Виллебранда, иммобилизованным на коллагене, является решающим для начального прилипания свободных тромбоцитов. Взаимодействие фактора фон Виллебранда с GPIb-IX-V обратимо и недостаточно для прочной адгезии. Это подтверждается присоединением GPIb-IX-экспрессированных клеток или тромбоцитов к фактору фон Виллебранда в условиях сильного стресса. Быстрая стабилизация адгезии происходит за счет дополнительных контактов между тромбоцитами и экстрамолекулярным матриксом, которые осуществляются интегринными. Коллаген непосредственно или опосредованно связывается с двумя тромбоцитарными интегринными $\alpha_2\beta_1$ и $\alpha_{11b}\beta_3$ (через фактор фон Виллебранда). Любого из этих взаимодействий достаточно для стабилизации адгезии тромбоцитов на поверхности коллаген/фактор фон Виллебранда, однако для участия в этом процессе хотя бы один из интегринов должен находиться в активном состоянии в ответ на сигналы “изнутри—наружу”. Несмотря на наличие многих активных компонентов, способных опосредовать активацию интегринов, заслуживает внимания то, что коллаген является наиболее реакционноспособным компонентом экстрацеллюлярного матрикса, активирующим интегрин посредством Ig-рецептора — GPVI. Установлено, что прочная адгезия тромбоцитов к коллагену требует внутриклеточных сигналов от GPVI. Процесс усиливается высвобождением растворимых медиаторов, наиболее важными из которых являются АДФ и тромбоксан A_2 , и образованием тромбина (см. вклейку, рис. 14) [103, 104].

Уровень коллагена в сосудах составляет от 20 % в аорте до 40 % в малых артериях. Действие коллагена на тромбоциты впервые было обнаружено в 1963 г., когда показали, что солевой экстракт сухожилий, содержащий фибриллярный коллаген, способен вызывать агрегацию тромбоцитов. Дальнейшие исследования привели к открытию коллагена II типа, который составляет основу хрящевых тканей. Всего существует 20 различных типов генетически независимых коллагенов, 9 из которых (коллагены I, III—VI, VIII, XII, XIII и XIV типов) являются компонентами сосудистой стенки и представляют собой субстраты для адгезии тромбоцитов к субэндотелию. Было также показано, что агрегацию тромбоцитов вызывают коллагены I—III, V и XI типов. Фибриллярные коллагены I и III типов являются основными компонентами экстрацеллюлярного матрикса, а формирующий основу сгустка коллаген IV типа составляет основу базальной мембраны субэндотелия [105].

Кроме того, прошитый коллаген IV типа и микрофибриллярный коллаген VI типа, но не коллаген IX типа, также способны индуцировать агрегацию. Коллагены I—IV и VI типов, но не V типа, в статических условиях способны поддерживать адгезию отмытых тромбоцитов. В динамических условиях наблюдается адгезия тромбоцитов только к коллагенам I, II, IV и V типов.

Особенностью структуры коллагена является повторяющаяся последовательность Lys-Pro-Hyp, или GXY, где G — лизин, X и Y — пролин (P) и гидроксипролин (O). Последовательность GPO на 10 % состоит из коллагенов I и III типов. Повторяющийся мотив GXY формирует простую левозакрученную α -спираль, которая, соединяясь с двумя другими цепями, формирует правозакрученную тройную суперспираль, сложенную из трех полипептидов, каждый из которых содержит около 1000 аминокислотных остатков. Такая суперспираль — основная структурная единица коллагенов I и III типов. Прошивка мономеров коллагена формирует фибриллярный коллаген, который является преобладающей структурой, способствующей контакту тромбоцитов с экстрацеллюлярным матриксом. По сравнению с другими компонентами матрикса фибриллярный коллаген состоит из более чем одного типа молекул коллагена [106].

Для тромбоцитов коллаген является уникальным лигандом, поскольку только он способен поддерживать адгезию тромбоцитов и вызывать их агрегацию. В статических условиях тромбоциты адгезируют ко всем коллагенам, кроме коллагена VIII типа, в динамических — адгезия тромбоцитов к коллагену (типы I—IV) приводит к большому скоплению агрегатов. Фибриллярные коллагены типов I—III сильно тромбогенны и поддерживают адгезию, что не свойственно коллагену V типа.

Адгезия тромбоцитов к менее реактивным коллагенам (типы VI—VIII) характеризуется образованием меньшего количества агрегатов. Адгезия к коллагену VI типа ограничена зависимостью от скорости прилипания тромбоцитов (300 с^{-1}) и важна в крупных артериях и венах. Коллаген VI типа в сосудистой стенке связывает фактор фон Виллебранда, адгезия к которому происходит со скоростью 2000 с^{-1} . В связи с этим не исключено, что колла-

ген VI типа один может поддерживать фактор фон Виллебранд-зависимую адгезию к стенке сосуда на низком уровне. При высокой скорости прилипания в качестве лигандов для фактора фон Виллебранда выступают другие белки [107].

Коллагены VII и VIII типов незначительно поддерживают адгезию тромбоцитов: процесс замедлен при скорости более 300 с^{-1} . Коллаген VII типа формирует волокна, которые не являются компонентами сосудистой стенки, но закрепляют кератиноциты. Отсутствие коллагена этого типа наблюдается в случаях рессивного дистрофического эпидермолизиса, пузырьчатой болезни кожи.

Фибриллы коллагена распадаются на мономерные единицы под действием пептидаз, таких, как пепсин, мишенью которого являются неспиральные последовательности коллагена, тогда как для специфических коллагеназ требуются растворенные образцы коллагена. Образовавшиеся под действием пепсина мономеры вследствие прошивки могут формировать коллагены без неспирализованных участков, хотя важно знать степень прошивки, от которой зависит биологическая активность коллагена. Биологическая активность зависит также от типа коллагена. Например, мономерный коллаген в растворе избирательно взаимодействует с интегрином $\alpha_2\beta_1$ и требует поперечной прошивки или иммобилизации на достаточно плотной поверхности активированных посредством GPVI тромбоцитов. Это происходит, вероятно, благодаря низкому средству GPVI-связывающего мотива — GPO — к рецептору и относительно низкой встречаемости этого мотива в мономерном коллагене. Монослой тромбоцитов способен связываться с GPO в более чем одной молекуле мономерного пептида, вызывающего увеличение сгустка взаимодействием с коллагеном.

Представляет интерес создание синтетических коллагенов определенного состава и синтез рецепторизбирательных пептидов. Пептиды необходимы как компоненты спирали для поддержания сродства к рецепторам коллагена. Прорыв в этой области наступил, когда было обнаружено, что GPP или GPO повторяют пять или более спирализованных структур, характерных для коллагена. Синтез пептидов привел к неожиданному открытию, что пептиды с повторяющимся GPO-мотивом, прошитым N- и C-концевыми остатками цистеина или лизина, являются сильными тромбоцитарными агонистами, тогда как пептиды с прошитым GPP-мотивом неактивны. GPO-содержащий пептид был назван коллагенподобным (CRP) с CRP-XL для прошитой формы. Важно, что CRP-XL неспособен поддерживать адгезию при таких же напряженных условиях, при которых происходит адгезия тромбоцитов к коллагену, но способен активировать тромбоциты в присутствии $\alpha_2\beta_1$ -блокирующих антител. Поэтому CRP-XL был первым избирательным агонистом, идентифицированным как основной сигнальный тромбоцитарный рецептор коллагена и названным позднее GPVI. Подтверждение того, что активность CRP-XL возникла благодаря повторяющемуся GPO-мотиву и независимым N- и C-концевым поперечно прошитым группам, показано синтезом GPO-пептида и недостатком этих участков [108].

На сегодня обнаружено достаточно много пептидов — компонентов яда змей, которые опосредуют свое действие через GPVI и могут быть хорошими инструментами для изучения Ig-рецептора. К таким пептидам, например, относятся конвульксин (лектин С-типа), который активирует GPVI, алборагин, связывающийся со специфическим центром гликопротеина. Токсины змеиного яда являются мультимерными и вызывают активацию тромбоцитов кластеризацией рецептора. Некоторые из них связываются с другой поверхностью гликопротеина в дополнение к GPVI: албоагрегин А связывается с GPVI и GPIb, тем самым вызывая стремительную активацию тромбоцитов. При этом взаимодействие с GPIb для активации несущественно, так как албоагрегин А активирует тромбоциты Бернарда—Солера и клетки линий GPVI. Несмотря на это, совершенно нормально, что токсины яда змей опосредуют свое действие связыванием с более чем одним тромбоцитарным гликопротеином [109, 110].

В последние годы обнаружены антитела к GPVI, которые в случае поперечной прошивки вторичными антителами являются сильными тромбоцитарными агонистами, но отдельные из них могут быть рецепторными антагонистами для самих себя. Антитела служат мощными инструментами для определения последовательности внутри экстрацеллюлярного домена GPVI, связывающейся с коллагеном.

1.5. ТРОМБОЦИТЫ И АДЕНОЗИНДИФОСФАТ

Способность АДФ индуцировать агрегацию тромбоцитов установлена в 1961 г., когда обратили внимание на то, что небольшая молекула, вышедшая из красных кровяных клеток, вызывала адгезию тромбоцитов к стеклу и способствовала их агрегации. О ключевой роли АДФ в формировании гемостатической пробки и в патогенезе артериальных тромбозов свидетельствует следующее: 1) АДФ содержится в плотных гранулах тромбоцитов в высокой концентрации и высвобождается, когда тромбоциты активированы другими агентами, такими, как тромбин или коллаген; 2) ингибиторы АДФ-стимулируемой агрегации тромбоцитов являются эффективными антитромботическими препаратами; 3) у пациентов с дефектами рецепторов АДФ или с недостатком АДФ в гранулах тромбоцитов развивается диатезное кровотечение [111].

Формирование прочного тромбоцитарного тромба в месте повреждения требует инициации и продолжения активации тромбоцитов. Инициация обычно обеспечивается коллагеном, фактором фон Виллебранда и местной генерацией тромбина, вызванной образованием комплекса тканевый фактор-VIIa. Продолжение активации наблюдается, когда в растущий тромб вовлекаются новые тромбоциты, из гранул которых высвобождаются вторичные агонисты — тромбоксан A_2 , АДФ и продукт α -гранул — Gasb. АДФ активно высвобождается из плотных гранул тромбоцитов и гораздо медленнее — из поврежденных эритроцитов и эндотелиальных клеток. Добавление экзогенного АДФ к отмытым тромбоцитам приводит к изменению их формы, обратимой агрегации при физиологической концентрации кальция во внеш-

ней среде, и в конечном итоге к потере чувствительности. Взаимодействие тромбоцит-тромбоцит осуществляется при участии следовых количеств тромбоксана A_2 , который вызывает секрецию и усиление агрегации. Этот эффект достаточно сильный и может наблюдаться в случаях снижения концентрации кальция во внеклеточной среде до микромолярных количеств (как в богатой тромбоцитами цитратной плазме крови).

Большинство агонистов, включая АДФ, активирует тромбоциты посредством рецепторов клеточной поверхности, сопряженных с гетеротримерными ГТФ-связывающими, или G-белками [112, 113]. Тромбоциты содержат белки всех четырех классов G-белков: G_q , G_i , G_{12} , G_s . Из них первые три опосредуют действия агонистов, которые активируют тромбоциты; рецепторы агониста могут соединяться с одним, двумя или всеми тремя белками. Ряд процессов предотвращает неподходящую активацию тромбоцитов или ограничивает степень активации, включающую высвобожденные из эндотелия PGI_2 и NO , которые повышают уровень тромбоцитарного цАМФ и цГМФ, а также CD39, гидролизующего АДФ до неактивного АМФ. PGI_2 вызывает образование цАМФ, активируя аденилилциклазу посредством рецепторов на поверхности тромбоцитов, сопряженных с G_s (см. вклейку, рис. 10).

Воздействие АДФ приводит к изменению формы тромбоцитов, повышению активности фосфолипазы С и концентрации цитозольного кальция. АДФ подавляет образование цАМФ, действие которого является критическим для активации тромбоцитов. Активация и агрегация тромбоцитов, вызванные АДФ, играют основную роль в развитии и патогенезе артериальных тромбозов. Механизм активации тромбоцитов АДФ интересен с точки зрения фармакологии и медицины. Тромбоциты имеют АДФ-специфичные пуринорецепторы (см. вклейку, рис. 15). Некоторые из них (P_{2X1} ионотропный рецептор и P_{2Y1} рецептор, связанный с G-белками), которые стимулируют внутриклеточное запасание фосфоорилаза С/ Ca^{2+} и/или ингибируют аденилилциклазу, были охарактеризованы в несколько последних лет. Рецептор P_{2Y1} опосредует вызываемую АДФ мобилизацию кальция. Кроме того, описаны центры связывания адениннуклеотидов на гликопротеине $IIb/IIIa$. Рецептор P_{2X1} опосредует вызываемый АДФ приток кальция и изменение формы тромбоцитов. Этот путь активации не включает влияние тиенопиридинов в отличие от рецептора P_{2Y1} , имеющего в своем составе семь трансмембранных доменов и связанного с ингибиторными G-белками. Он опосредует высвобождение внутриклеточного кальция, ингибирование аденилатциклазы, активацию $GRIPb/IIIa$ и последующую агрегацию тромбоцитов. Все эти механизмы вызваны действием тиенопиридинов.

Изучение агонистов, являющихся пуриновыми производными, и антагонистов функционирования тромбоцитов привело к обнаружению множества рецепторов АДФ, которые способствуют ответу тромбоцитов на действие АДФ. Одним из них является ионный канал, или P_{2X1} , который активируется аналогом АДФ — α, β -MeATФ, способствующим притоку внеклеточного кальция. Другой аналог АТФ — ARL-66096 (в настоящее время доказано, что его антагонист — P_{2Y12}) блокирует как АДФ-стимулируемую агрегацию

тромбоцитов, так и ингибирование аденилилциклазы, однако в той же концентрации не может ингибировать активацию фосфолипазы С или изменение формы тромбоцитов. До того как были обнаружены рецепторы, разные исследователи выдвинули предположение о существовании на тромбоцитах двух G-белкоопосредованных рецепторов АДФ, один из которых ингибирует синтез цАМФ (посредством белков семейства G_i), а другой — активирует фосфолипазу С и вызывает изменение формы тромбоцитов (через G_q и G_{12}).

Для агрегации тромбоцитов требуется активация как G_i -, так и G_q -опосредованного пути. Интересно, что АДФ является агонистом, выполняющим эту задачу для обоих рецепторов, один из которых сопряжен с G_q , но не с G_i , а другой — с G_i , но не с G_q [114].

G_q -сопряженный рецептор АДФ — P_{2Y1} — ответственный за изменение формы тромбоцитов и мобилизацию кальция. Тромбоциты мыши, у которых отсутствует α -субъединица G_q -белка, обнаруживают связанные с АДФ дефекты, аналогичные таковым в тромбоцитах мыши без P_{2Y1} : они не могут ни агрегировать, ни изменять форму. Однако G_q -дефицитные тромбоциты сохраняют способность изменять форму в ответ на воздействие других агонистов, показывающих, что G_q опосредует АДФ-зависимые структурные изменения актиновых филаментов, вследствие чего тромбоциты изменяют форму, а другие G-белки (вероятно G_{12}) опосредуют эти изменения в цитоскелете в ответ на действие других агонистов [115].

G_i -сопряженный рецептор АДФ — P_{2Y12} необходим для активации рецептора фибриногена и формирования тромба. Он важен для необратимой агрегации тромбоцитов, вызываемой не только АДФ, но и тромбоксаном A_2 и PAR-1-специфичным пептидом. P_{2Y12} ингибирует аденилилциклазу, но не играет роли в изменении формы тромбоцитов и накоплении внутриклеточного кальция, происходящих под действием АДФ. Кроме того, G_i -сигналинг, опосредованный активацией P_{2Y12} , может приводить к агрегации тромбоцитов, когда G_q - или $G_{12/13}$ -пути одновременно активированы, или в наличии высокая концентрация АДФ (100 мкМ).

P_{2Y12} играет решающую роль в АДФ-опосредованной генерации тромбоксана A_2 , а также ускоряет индуцированное агонистом высвобождение компонентов плотных гранул и прокоагулянтную активность. От активации P_{2Y12} зависят высвобождение из α -гранул P-селектина и следующая за этим его экспрессия. Интересно, что все функции упомянутого рецептора могут быть сходны с таковыми эпинефринов, которые активируют G_i -белки связыванием с α_{2A} -тромбоцитарным рецептором [116].

P_{2Y12} играет главную роль в активации тромбоцитов, привлечении других тромбоцитов к месту повреждения с последующей их адгезией к фактору фон Виллебранда и коллагену, а также в повышении эффективности активации тромбоцитов вторичными агонистами, такими, как тромбин и тромбоксан A_2 (см. вклейку, рис. 16).

P_{2Y12} взаимодействует в основном с G_{12} - и в меньшей степени с другими G_i -белками, что приводит к ингибированию аденилилциклазы. Так, тромбоциты мыши с недостатком функционального P_{2Y12} не могут нормально агре-

гировать в ответ на действие АДФ. Они сохраняют связанный с P_{2Y1} ответ, включающий изменение формы и активацию фосфолипазы C , но теряют способность ингибировать образование цАМФ при участии аденилилциклазы. Эпинефрины посредством активации рецептора α_{2A} и последующим G_z -сигналингом оказывают такой же эффект. Однако сниженный уровень цАМФ имеет косвенное отношение к активации P_{2Y12} . G_i -сигналинг приводит к активации $PI3K$ -, Akt-, Rap1b- и K^+ -каналов. У мышей с недостатком $PI3\gamma$ наблюдаются нарушения в функционировании тромбоцитов только при использовании низких концентраций АДФ, но эти же мыши обеспечены защитой от тромбоэмболии [117]. Показано также, что Akt-, Rap1b- и K^+ -каналы являются важными функциональными эффекторами активации P_{2Y12} (см. вклейку, рис. 17).

1.6. ТРОМБОЦИТЫ И ТРОМБИН

Тромбин — сериновая протеиназа, активная форма протромбина, который является основным проферментом системы свертывания крови и активируется в тромбин в процессе реакций коагуляционного каскада. В активации тромбоцитов тромбин играет такую же существенную роль, как и в формировании фибринового сгустка. *In vitro* тромбин вызывает изменение формы тромбоцитов, склеивает их друг с другом и способствует высвобождению компонентов гранул. Однако о механизме активации было известно очень мало. Большим шагом вперед в изучении активации тромбоцитов тромбином явилось обнаружение в 1990 г. G-белоксопряженных рецепторов, которые активировались тромбином [118]. В результате многочисленных исследований установлено, что активация G-белков тромбином происходит при их непосредственном связывании на участках поверхности тромбоцитов, содержащих GPIIb/IIIa и GPV, однако расщепление последнего для активации тромбоцитов не требуется. В связи с этим выработаны краткие критерии соответствия белка как рецептора для тромбина: а) возможный рецептор должен располагаться на поверхности покоящихся тромбоцитов; б) данный белок должен быть субстратом для тромбина; в) наличие связи с внутриклеточным сигнальным каскадом; г) экспрессия возможного рецептора в клетке, которая иначе реагирует на тромбин; д) уменьшение ответа тромбоцитов на действие тромбина вследствие блокирования или разрушения возможного рецептора. Всем этим критериям полностью соответствуют протеиназактивированные рецепторы (ПАР).

Согласно последним данным, семейство ПАР включает четыре белка, три из которых (ПАР-1, ПАР-3 и ПАР-4) являются рецепторами тромбина, а четвертый — ПАР-2 активируется сериновой протеиназой, отличной от тромбина. Все четыре рецептора имеют сходное строение, включая N-концевой участок (см. вклейку, рис. 18). На примере ПАР-1 показано, что и остальные три рецептора функционируют аналогично [119]. В любом случае активация рецептора начинается после расщепления его N-концевого участка тромбином. При этом экспонируется новая N-концевая последовательность, которая служит связующим лигандом. Протеиназы, отличающиеся от тромбина,

также могут активировать ПАР-1, но в этих случаях ответ рецептора на тромбин — другой, поскольку N-концевой участок расщепляется в “неправильном” месте. Центр связывания лиганда находится в экстрацеллюлярных петлях рецептора. В случае других G-белков взаимодействие между лигандами ПАР и рецептором инициирует сигналинг вследствие конформационных изменений в рецепторе, которое переносится через плазматическую мембрану и способствует обмену ГТФ на ГДФ на G-белках. В случае ПАР особенности активации, установленные для ПАР-1, включают способность ответа на пептиды, составляющие последовательность лиганда. Исключением из правил является ПАР-3, для которого активационный пептид не обнаружен [120]. Относительно трех других ПАР известно, что ПАР-2 экспрессирован многочисленными тканями, включая и эндотелий, но не тромбоциты. ПАР-2 расщепляется и активируется трипсином и триптазой, но не тромбином. Кроме того, данный рецептор может активироваться комплексом тканевый фактор + VIIa и фактором Ха. ПАР-3 обнаружен в процессе исследований, которые показали, что тромбоциты мыши, лишённые ПАР-1, способны активироваться тромбином. ПАР-3 является основным регулятором ответа на тромбин тромбоцитов грызунов и человека. ПАР-3 тромбоцитов всего лишь способствует расщеплению тромбином ПАР-4. ПАР-4 находится в тромбоцитах мыши и человека и поддерживает способность тромбоцитов мыши, лишённых ПАР-3, активироваться тромбином. Для активации ПАР-4 необходима 10—100-кратная концентрация тромбина, поскольку в рецепторе отсутствует гирудинподобная последовательность, которая может взаимодействовать с анионсвязывающим экзосайтом и способствовать расщеплению рецептора тромбином [121]. Одновременное ингибирование ПАР-1 и ПАР-4 тромбоцитов человека антителами или антагонистами полностью уничтожает способность тромбоцитов активироваться тромбином.

Активация тромбоцитов тромбином, с одной стороны, происходит вследствие расщепления и активации ПАР-1 и ПАР-4 (см. вклейку, рис. 19), с другой — эти рецепторы активируют некоторые G-белки, вызывают повышение концентрации цитозольного кальция и ингибируют образование цАМФ. Этот процесс сопровождается высвобождением АДФ и тромбксана A_2 , которые связываются с их собственными рецепторами на поверхности тромбоцитов. Для расщепления ПАР-4 тромбоцитов человека требуется более высокая концентрация тромбина, чем для расщепления ПАР-1. Вероятно, ПАР-1 является преобладающим сигнальным рецептором при низкой концентрации тромбина, однако активация ПАР-4 может быть более устойчивой. Тромбоциты мыши — интересная противоположность тромбоцитам человека. Несмотря на то что в месте, где тромбоциты человека экспрессируют ПАР-1 и ПАР-4, тромбоциты мыши — экспрессируют ПАР-3 и ПАР-4, сигналинг обеспечивается непосредственно ПАР-4. Содействие ПАР-3 в этом случае только способствует расщеплению ПАР-4 при низкой концентрации тромбина [122].

Обсуждая активацию тромбоцитов тромбином, следует учитывать вклад и других рецепторов, в частности компонентов комплекса GPIIb-IX-V. GPIIb представляет собой гетеродимер, состоящий из α - и β -субъединиц,

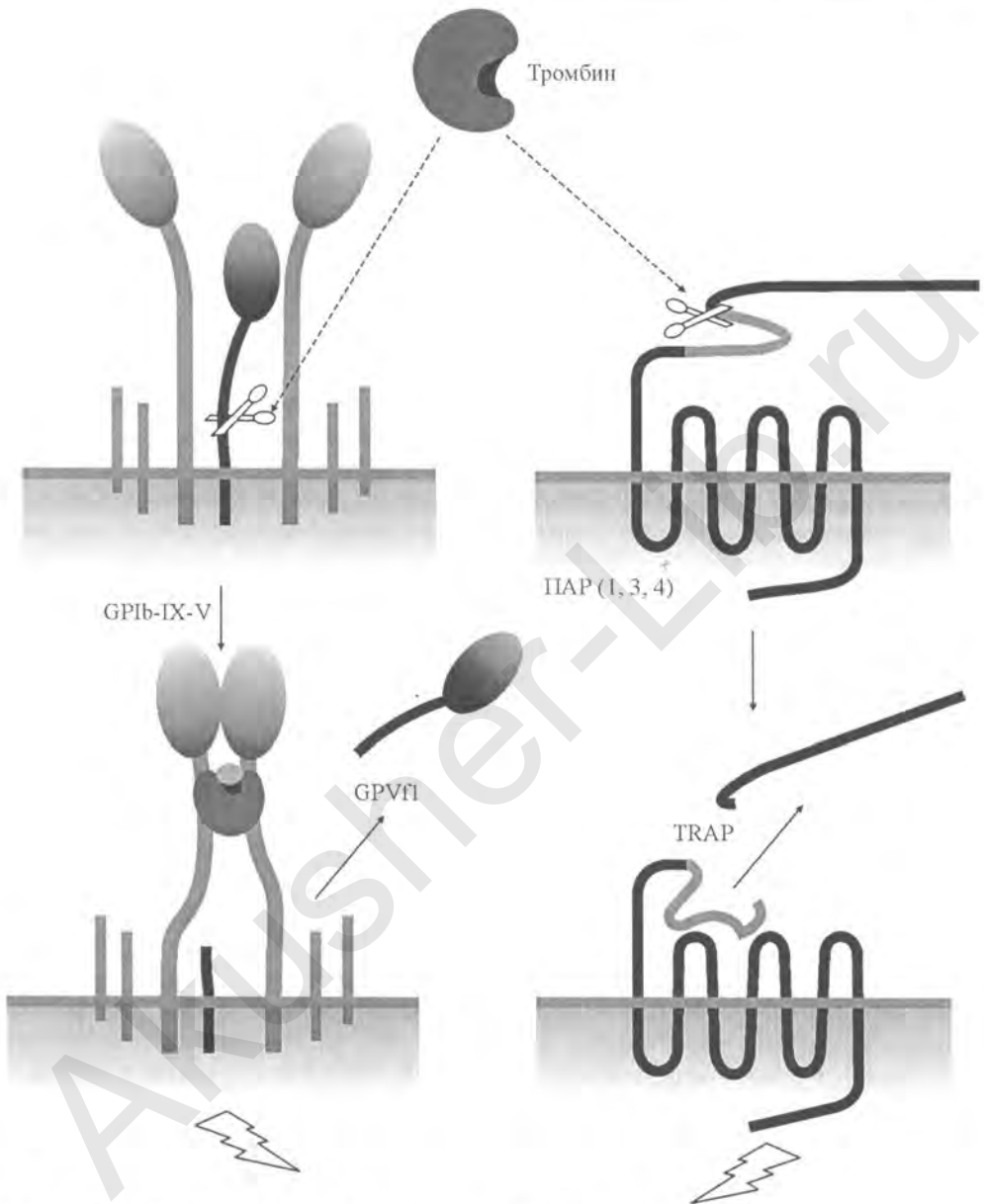


Рис. 1.11. Два пути активации тромбоцитов тромбином [121]

связанных друг с другом дисульфидными связями. Гетеродимер образует комплекс из GPIX и GPV, которые служат центром связывания фактора фон Виллебранда и якорем для цитоскелета тромбоцитов. Высокоаффинный центр связывания тромбина, расположенный в области 268—287 аминокислотных остатков GPIb α , взаимодействует с доменами помимо активного центра. Изоляция экстрацеллюлярного домена GPIb α или блокирова-

ние тромбинсвязывающего центра снижает ответ тромбоцитов на тромбин. Теоретически связывание тромбина с $GP_{Ib}\alpha$ может способствовать расщеплению ПАР на тромбоцитах человека. Сильное связывание тромбина с ПАР-3 способствует расщеплению ПАР-4 на тромбоцитах мышей (рис. 1.11). Несмотря на то что первичный ответ тромбоцитов человека на тромбин определяется ПАР-1 и ПАР-4, вполне возможно, что взаимодействия одного и более компонентов комплекса GP_{Ib} -IX-V могут способствовать расщеплению/активации ПАР-1 или по-другому регулировать активацию тромбоцитов тромбином [123].

1.7. ИНТЕГРИНЫ

Интегрины — семейство белков, находящихся на поверхности клетки, которые обеспечивают клеточную адгезию. Процесс адгезии для клеток чрезвычайно важен, поскольку отвечает за закрепление клеток после миграции и передачу сигналов для роста и дифференциации. Существуют два основных типа клеточной адгезии: клетка-внеклеточный матрикс (1) и клетка-клетка (2). Интегрины являются первичными посредниками адгезии первого типа, а также выступают в роли активных молекул в адгезии второго типа. Открытие интегринов явилось значительным шагом вперед в понимании процесса адгезии. Семейство этих рецепторов было обнаружено в середине 1980-х годов. В результате многочисленных исследований было показано, во-первых, что группа адгезивных белков цыплят, тромбоцитарный интегрин $GP_{IIb/IIIa}$, адгезивные белки лимфоцитов, антигены клеточной поверхности VLA, а также рецепторы фибронектина и витронектина обладают сходными структурой и активностью. Во-вторых, работе по изучению интегринов предшествовали годы детальных исследований белков внеклеточного матрикса, для которых интегрины являются рецепторами. В-третьих, стало очевидным, что интегрины важны для использования во многих областях биологии и медицины. Название *интегрины* эта группа белков получила в связи с их ролью в объединении (интеграции) внутриклеточного цитоскелета с внеклеточным матриксом. Обнаруживаются интегрины практически во всех клетках. Кроме адгезии и агрегации они участвуют как в дифференциации тканей, так и в росте раковых клеток и метастазировании. Интегрины вносят свой вклад в адгезию и миграцию лейкоцитов, а также контролируют адгезию лимфоцитов (хоминг) в лимфатических тканях [124, 125].

Для адгезии, распластывания и передвижения клеток интегрины должны связывать появляющиеся элементы цитоскелета с элементами внеклеточного матрикса. Это взаимодействие состоит из двух частей: связь интегрин-цитоскелет и связь интегрин-лиганд. Регуляция связывания интегрин-лиганд осуществляется контролем конформации интегрина, который может находиться в неактивном, с низкоаффинной конформацией, и активном, с высокоаффинной конформацией, состояниях. Для состояния гемостаза такая регуляция имеет большое функциональное значение. Например, в случае тромбастении Гланцмана гемостаз нарушен, поскольку ин-

тегрин GPIIb/IIIa неактивен. Неактивированные интегрины слабо опосредуют адгезию и распластывание клеток по сравнению с высокоаффинными интегринными. Нарушение силы взаимодействия интегрин-лиганд вследствие мутаций может оказывать влияние на подвижность клеток [126—128].

Возникает вопрос, влияет ли активация интегринов на связывание лигандов или на взаимодействие интегрин-цитоскелет. В пределах внутренних фокусных контактов взаимодействие интегрин-цитоскелет регулируется. Меньше известно о регуляции взаимодействия интегрин-цитоскелет в пределах внешних контактов, которые являются более слабыми и временными, но важны для инициации клеточной адгезии и подвижности. Вполне понятно, что молекулярная основа таких взаимодействий сильно отличается от таковой фокусного контакта, поскольку белковые комплексы малы.

Интегрины — мембранные гликопротеины, представляющие собой нековалентно связанные гетеродимеры, состоящие из двух типов субъединиц — α и β . У млекопитающих 18 α и 8 β нековалентно связанных субъединиц образуют 24 интегрин. Основная масса α - и β -субъединиц длиной порядка 1000 и 750 аминокислотных остатков соответственно является экстрацеллюлярной. Каждая субъединица представляет мембранный гликопротеин I типа с коротким цитоплазматическим “хвостом” (~20 и ~50 аминокислотных остатков соответственно для α - и β -субъединиц; исключением является β_4 , содержащая 1072 аминокислотных остатка “хвоста”, который связывает промежуточные филаменты). Половина α -субъединиц интегринов возле своих N-концевых участков содержит ~180 дополнительных аминокислот A-домена фактора фон Виллебранда (эти интегрины известны как α_A и α_I). Структура α_A предполагает нуклеотидсвязывающую α/β укладку — структуру, подвергающуюся частичным изменениям и обнаруженную в некоторых белках, включая конформационно активные G-белки. Девять α_A -содержащих интегринов “узнают” в лигандах глутаматсодержащий мотив последовательности быстрее, чем аспартатсодержащий, но обнаруживают такие же особенности двунаправленной активации и сигналинга, как и интегрины без α_A [129].

Интегрины классифицируются на основе β -цепи, которая вместе со специфической α -цепью образует функциональный рецептор. Как α -, так и β -цепи интегринов содержат крупные N-концевые экстрацеллюлярные домены, небольшой трансмембранный участок и C-концевой участок. β -Субъединица охватывает четыре цистеинбогатые последовательности, которые в разной форме сохраняются во всех восьми субъединицах. Цитоплазматический участок β -цепи удерживает интегрин в цитоскелете и регулирует его функции. α -Субъединица содержит три—четыре участка связывания с двухвалентными катионами.

Структура и взаимодействия интегринов схематически представлены на рис. 1.12. Центр связывания интегринов с лигандами сформирован последовательностью обеих субъединиц, а их цитоплазматические домены обеспечивают связь с цитоскелетом, в результате чего сами интегрины являются связующим звеном между цитоскелетом и внеклеточным матриксом.

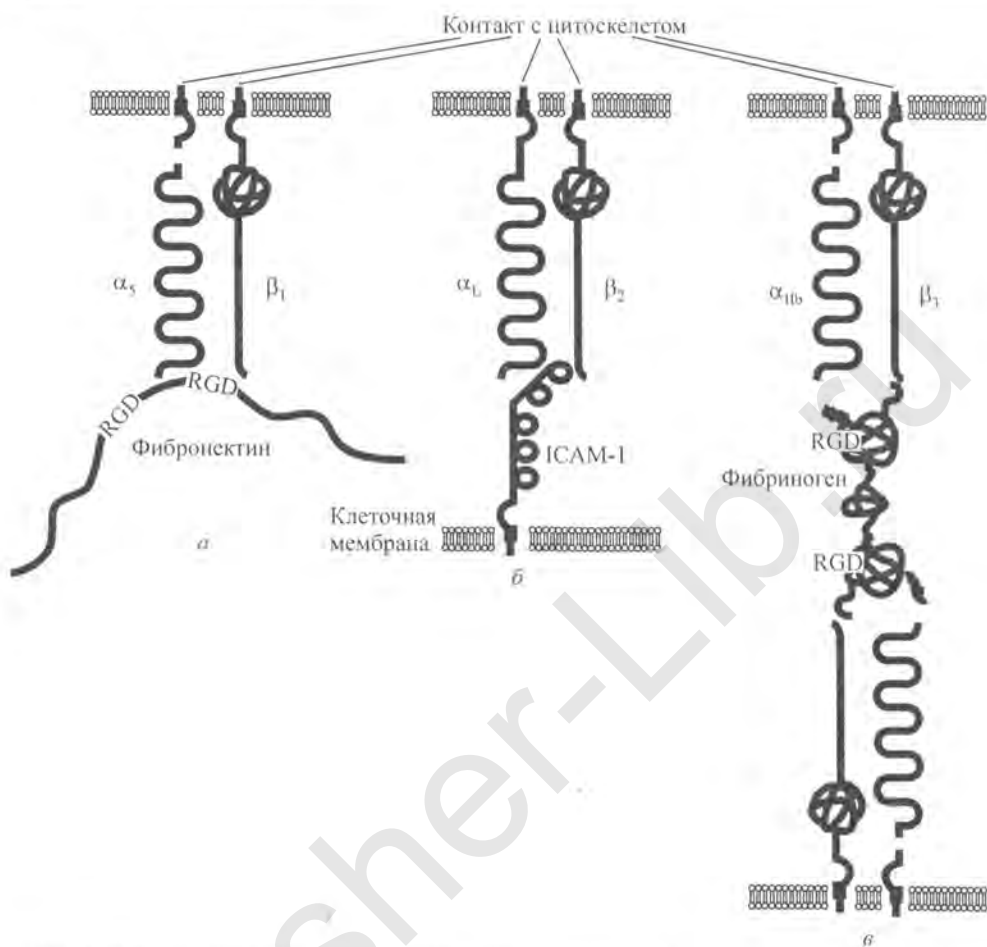


Рис. 1.12. Схема структуры и взаимодействий интегринов [124]

На сегодня известны последовательности 14 α - и 8 β -субъединиц (табл. 1.1). β -Субъединица служит для структурной классификации, тогда как α -субъединица определяет специфичность. В разных комбинациях они образуют как минимум 16 интегринов (рис. 1.13), однако весьма вероятно, что это не окончательное количество. В начале 1990-х годов стало ясно, что каждая β -субъединица способна соединяться со многими α -субъединицами, а одна α -субъединица может быть парой для более чем одной β -субъединицы.

В этом отношении наиболее “гибкой” является α_v -субъединица, образующая в результате таких контактов четыре интегринa. Подобное разнообразие интегринов обеспечивает клеткам скрытые возможности в узнавании адгезивных субстратов.

Некоторые интегрины имеют четко выраженную специфичность определенного типа клеток. Характерным примером является GPIIb/IIIa, кото-

Таблица 1.1. Семейство интегринов

Классификация и синонимы			Лигандная специфичность	Локализация	
β_1	VLA GPIIa	α_1	VLA1, CD4a	Ln, Fn, Coll	Любые клетки
		α_2	VLA2, GPIa, CD49b	Coll, Ln	То же
		α_3	VLA3, CD49c	Fn, Ln, Coll	" "
		α_4	VLA4, CD49d	Fn, VCAM-1	Лейкоциты
		α_5	VLA5, GPIc, CD49e	Fn	Любые клетки, нейроны
		α_6	VLA6, GPIc', CD49f	Ln	Любые клетки
		α_7	VLA7	Ln	Эпителий
		α_8	VLA8	?	То же
		α_9	α A	?	" "
		α_V	CD51	Vn, Fn	" "
β_2	LFA-1 MAC-1 P150/95 CD18	α_L	LFA-1, CD11a	ICAM-1, ICAM-2	Лейкоциты
		α_M	MAC-1, CD11b	C3bi, Fg, FX, ICAM-1	То же
		α_X	P150, 95, CD11c	C3bi, Fg	" "
β_3	GPIIIa VNR CD61	α_{IIb}	GPIIb, CD41	Fg, Fn, Vn, vWF, TSP	Тромбоциты
		α_V	VNR, Cd51	Fg, Fn, Vn, vWF	Любые клетки
β_4	CD104	α_6	CD49f	Ln	Эпителий
β_5		α_V	CD49f	Vn (Fn)	То же
β_6		α_V	CD51	Fn	Эпителий, клетки карциномы
β_7		α_4	CD49d	Fn, VCAM-1	Лейкоциты, эпителий
β_8		α_E			
		α_V	CD51	?	?

Примечание. Coll — коллаген; Fg — фибриноген; Fn — фибронектин; Ln — ламинин; Vn — витронектин; TSP — тромбоспондин; VLA — very late antigen; VNR — рецептор витронектина; vWF — фактор фон Виллебранда; FX — фактор X. Темным шрифтом отмечены случаи, касающиеся тромбоцитов.

рый экспрессирован только тромбоцитами и мегакариоцитами, LFA-1, Mac-1 и p150/95, находящиеся на мембране лейкоцитов. Интегрин $\alpha_6\beta_4$ специфичен для эпителиальных клеток и образованных ими опухолей [130].

Многие интегрины связываются с внеклеточным матриксом и вследствие этого опосредуют взаимодействие клетка-внеклеточный матрикс. К интегринам лигандам внеклеточного матрикса относятся гликопротеины, такие, как фибронектин, фибриноген, ламинин, коллаген, тромбоспондин, фактор фон Виллебранда, витронектин. Кроме внеклеточного матрикса эти белки в растворимой форме находятся в плазме крови. Некоторые интегрины связывают с клеточной мембраной белки, участвующие в адгезии клет-

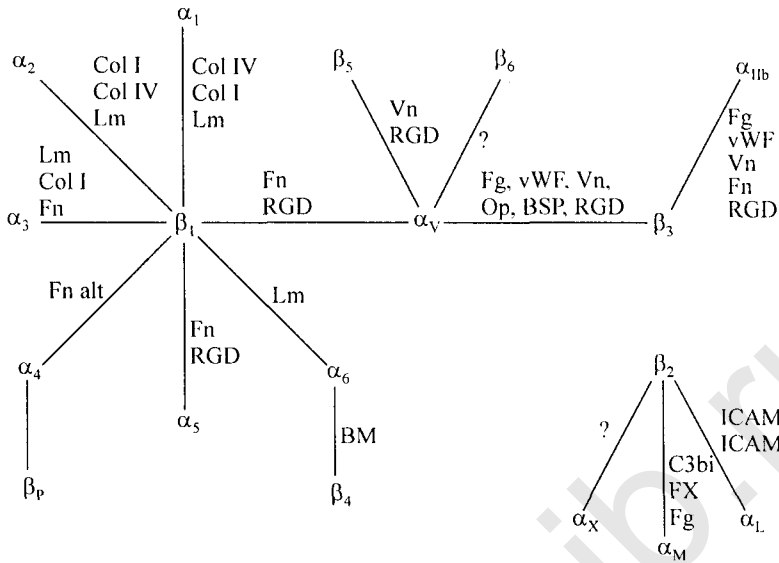


Рис. 1.13. Семейство интегринов — субъединицы и их комбинации, образующие известные интегрины

ка—клетка. Такие внутриклеточные адгезивные белки, как ICAM-1 и ICAM-2, называют “контррецепторами” (рецепторы, находящиеся в другой клетке) для лейкоцитарного интегрин LFA-1 (известен также как CD11a/CD18, или $\alpha_L\beta_2$). Для интегрин $\alpha_4\beta_1$ контррецептором является VCAM-1. Этот интегрин проявляет двойную специфичность, поскольку связывается еще и с фибронектином. ICAM-1, ICAM-2 и VCAM-1 принадлежат к иммуноглобулинам, многие из которых являются адгезивными белками [131, 132].

Тромбоцитарный интегрин GPIIb/IIIa способствует взаимодействию тромбоцитов друг с другом, используя растворимые поливалентные молекулы посредника. Основными лигандами для этого интегрин при агрегации тромбоцитов служат фибриноген и фактор фон Виллебранда, однако он может связываться также с фибронектином и витронектином, что важно для адгезии активированных тромбоцитов к субэндотелию.

Центром узнавания для многих интегринов, связывающихся с внеклеточным матриксом и адгезивными белками, является трипептид Arg-Gly-Asp, или RGD-последовательность. Впервые эта последовательность была обнаружена в фибронектине, а позднее выявлена и в других адгезивных белках внеклеточного матрикса и тромбоцитов. RGD — основная сигнальная последовательность, посредством которой происходит связывание лиганда с интегринными группами β_3 . Конформация RGD-сайта помогает определить, какой RGD-белок или RGD-пептид будет связан. Короткие синтетические пептиды, содержащие RGD-последовательность, демонстрируют меняющуюся специфичность различных интегринов изменением конформации пептида путем циклизации. Быстрая регуляция интегринов

может происходить путем аффинной модуляции. Это означает, что рецептор изменяет конформацию через внеклеточные эффекты и переходит в высокоаффинное состояние. Внутриклеточная сигнальная трансмиссия возникает вследствие опосредованной рецептором клеточной активации (например, тромбином), что приводит к активации интегринов через цитоплазматические участки рецептора. Связывание с лигандами (RGD-пептидами) или моноклональными антителами также способствует изменению конформации интегриновых рецепторов с последующей активацией сигнальных процессов. KQAGD-последовательность γ -цепи фибриногена может формировать подобную RGD структуру, так как пептиды, содержащие эти последовательности, по существу взаимозаменяемы с GPIIb/IIIa в связывании с тромбоцитами [133].

Последовательность, полностью отличающаяся от RGD и KQAGD, обнаружена в фибронектине как место связывания с ним интегрин $\alpha_4\beta_1$. Она находится в одном из произвольно соединенных сегментов фибронектина. Пептиды, воспроизводящие центры связывания с интегринами, могут составить новый класс терапевтических агентов.

Для связывания интегрин с лигандом первый должен проактивироваться. Так, GPIIb/IIIa находится на поверхности покоящихся тромбоцитов, но не вызывает агрегацию, даже если фибриноген доступен. Каким образом активация тромбоцитов вызывает активацию интегрин не вполне понятно, поскольку неактивированные тромбоциты способны контактировать с фибриногеном, ламинином и коллагеном. Лейкоцитарный интегрин LFA-1 также способен активироваться. Интересно, что связывание рецептора T-клеток вызывает активацию этого интегрин в лимфоцитах. Другие интегрины, такие, как рецепторы $\alpha_5\beta_1$ фибронектина и $\alpha_6\beta_1$ ламинина, активированные в различных клетках, контролируются также в процессе активации лейкоцитов.

Клетки способны регулировать и специфичность интегринов. Так, интегрин $\alpha_2\beta_1$ на тромбоцитах является рецептором коллагена, но в некоторых других клетках он связывается с ламинином и фибронектином [134].

Роль GPIIb/IIIa особенно четко видна на примере тромбастении Гланзмана, причина которой — врожденный дефицит этого рецептора. Тромбоциты в данном случае не способны агрегировать в случае активации, что свидетельствует о роли GPIIb/IIIa как основного посредника их агрегации. GPIIb/IIIa — привлекательный инструмент для терапевтического манипулирования агрегацией. Моноклональные антитела, инактивирующие GPIIb/IIIa, являются возможными ингибиторами агрегации тромбоцитов. RGD-пептиды, и особенно пептиды, содержащие подобную KQAGD-последовательность, могут быть альтернативой для анти-GPIIb/IIIa антител в терапевтическом подавлении активности GPIIb/IIIa. Циклизация определенных синтетических RGD-содержащих пептидов создает компоненты, имеющие сродство к GPIIb/IIIa в 5000 раз выше, чем линейные пептиды, у которых конкурентное сродство к другим RGD-зависимым интегринам снижено. Кроме того, такие пептиды могут быть эффективными специфическими ингибиторами агрегации.

Биологически активные RGD-пептиды существуют в природе. Яд определенных змей содержит небольшие молекулы белков с активной RGD-последовательностью, расположенной в хорошо защищенной дисульфидной петле, которые являются мощными ингибиторами агрегации тромбоцитов. Эти белки называют дезинтегринами из-за их способности ингибировать GPIIb/IIIa и другие интегрин. По сравнению с синтетическими пептидами дезинтегрин менее пригодны в качестве терапевтических средств из-за недостатка специфичности, характерной для пептидов, относящихся к ингибиторам GPIIb/IIIa [135].

Следует отметить, что интегрин — единственные из всех типов адгезивных молекул, которые играют значительную роль в функционировании лейкоцитов. В целом интегрин являются посредниками взаимодействия, сопровождающего превращение лейкоцитов из циркулирующих клеток в клейкие клетки, плотно присоединенные к тканям. Обычно это случается при повреждении тканей. Лейкоциты связываются с эндотелием поврежденной ткани в результате повышенной адгезивности, вызываемой повреждением. В лейкоцитах активируются интегрин группы β_2 , в эндотелии в больших количествах обнаруживается ICAM-1. Mac-1 ($\alpha_M\beta_2$) связывается с фибриногеном и другими белками, не обязательно присутствующими на эндотелии. Однако этот интегрин и p150/95 ($\alpha_X\beta_2$, CD11c/CD18), вероятно, также имеют на клеточной поверхности лиганды и являются немаловажными для адгезии нейтрофилов и моноцитов.

Роль интегрин группы β_2 для лейкоцитов видна на примере врожденного заболевания, известного как дефицит лейкоцитарной адгезии, или LAD. Заболевание вызвано недостатком функциональной β_2 -субъединицы, общей для LFA-1, Mac-1 и p150/95. Болезнь характеризуется нарушением лейкоцитарного кровоизлияния, приводящего к неспособности организма сопротивляться инфекциям [136].

Лейкоциты содержат также интегрин группы β_1 и рецепторы фибронектина, ламинина и коллагена. Название VLA (very late antigens) эта группа белков получила из-за повышенного содержания в лимфоцитах и способности к длительной стимуляции. Более того, стимулирование лимфоцитов через систему CD3 приводит к активации рецепторов фибронектина и ламинина (соответственно $\alpha_5\beta_1$ и $\alpha_6\beta_1$) в течение 1 мин от начала активации и предполагает участие этих интегрин в начальной фазе иммунного ответа. В макрофагах связывание рецептора фибронектина вызывает сверхрегуляцию комплементсвязывающего интегрин Mac-1, вызывая передачу сигнала клетке интегрин $\alpha_5\beta_1$. Лимфоцитспецифичный интегрин с уникальной β -субъединицей опосредует “наведение” лимфоцита. Этот интегрин — $\alpha_4\beta_7$ — узнает лиганд на эндотелии лимфоузла и позволяет лимфоцитам проникать в него.

На лейкоцитах находятся также α_V -интегрин. α_V -Субъединица соединена с β -субъединицами, в результате чего образуются интегрин с похожей, но индивидуальной специфичностью. Функции этих интегрин окончательно не изучены, однако известно, что интегрин $\alpha_V\beta_3$ и ему подобные

участвуют в связывании остеокластов с костью путем взаимодействия с RGD-содержащим белком остеопонтином [137].

Лейкоцитарные интегрины интересны с точки зрения терапии. Так, с одной стороны, восстановление функции интегринов группы β_2 однажды может стать средством для лечения LAD, а с другой — для результативного лечения иногда целесообразно не дать интегрину функционировать. Подобным примером может служить предотвращение миграции лейкоцитов к месту повреждения и воспаления после реперфузии тканей. Ингибирование функциональной активности производится введением моноклональных антител против β_2 [138].

Контррецептором для LFA-1 и ICAM-1 является рецептор риновирусов, вызывающих насморк. Растворимые фрагменты ICAM-1 ингибируют доступ вируса в клетки путем конкуренции за связывание вируса с поверхностью ICAM-1. Лейкоцитарные интегрины могут выступать в качестве “вводных” рецепторов как для вирусов, так и для бактерий. В случае ящура попадание вируса ингибируется RGD-содержащими пептидами [139, 140].

Белок ВИЧ также содержит RGD-последовательность и связывается с клетками в RGD-зависимом участке. Это важно, поскольку, попадая в клетку, этот белок активирует экспрессию вирусного генома и действует так же, как фактор роста для клеток саркомы Капоза. Если RGD-связывание имеет значение для проявления функций данного белка, ингибиторы могли бы быстро возникнуть и блокировать связывание остеокластов с костью посредством взаимодействия RGD-содержащих пептидов, что способно предотвратить разрушение кости при остеопорозе.

От интегринопосредованного взаимодействия зависит движение и размещение клеток, например при заживлении раны. Показано, что свежеполученные кератиноциты не экспрессируют рецепторы фибронектина и не прилипают к фибронектиновым бляшкам. Однако если полученные клетки некоторое время хранились или были взяты из поврежденной ткани, на их поверхности открываются рецепторы, а сами клетки контактируют с фибронектином. В результате исследований выяснилось, что кератиноциты, участвуя в заживлении раны, используют рецепторы фибронектина для контакта и миграции на временный фибронектинсодержащий матрикс поврежденной ткани. Это хорошо согласуется с данными о вкладе фибронектина и его рецепторов в миграцию клеток в течение эмбрионального развития [141]. Сведения о роли внеклеточного матрикса в заживлении ран включают использование фибронектина в заживлении язв и использование синтетических материалов, которые воспроизводят центры контакта клеток с фибронектином в качестве заживляющего клея.

Нормальные клетки запасают фибронектин, ламинин, коллаген и другие компоненты внеклеточного матрикса, создавая сеть нерастворимых белков. Они могут контактировать с этим матриксом посредством интегринов. Но не вполне понятным причинам наиболее опухолегенные клетки также запасаются в матриксе и выполняют, хотя и в меньшей степени, те же функции, что и нормальные клетки. Известно, что классический рецептор фибронектина — $\alpha_5\beta_1$ -интегрин — необходим для запасаения матрикса, и его эк-

спрессия в опухолевых клетках часто снижена. Более того, повышенная экспрессия этого интегрина преобразованием гена повышает запасание фибронектина опухолевыми клетками яичников китайского хомячка. Однако как минимум один фактор — рецептор сборки матрикса — также необходим для запасания фибронектина.

Следствием истощения запасов матрикса является то, что опухолевые клетки получают дополнительную степень свободы. Их подвижность не ограничена адгезией к собственному матриксу. Важность этого ограничения в нормальном поведении клеток обусловлена трансформацией гена $\alpha_5\beta_1$ -интегрин. Экспрессия интегрин таким геном значительно повышена, клетки, производящие экспрессию, не только образуют мощный фибронектиновый матрикс, но также становятся менее подвижными, чем обычные клетки. Они медленнее растут и в отличие от родительских клеток не формируют опухоли. Экспрессия рецепторов фибронектина и сборки фибронектинового матрикса может тесно ассоциироваться с экспрессией опухолевого фенотипа. Участие фибронектина в злокачественных процессах довольно многогранно. Опухолевым клеткам не хватает собственного внеклеточного матрикса, способного к быстрой пролиферации и миграции. Однако таким клеткам для миграции необходимо прикрепиться к любому матриксу. Это подтверждается фактом, что опухолевые клетки и другие двигательные клетки мигрируют предпочтительно на поверхностях, покрытых адгезивными белками внеклеточного матрикса. Более того, RGD-пептиды способны ингибировать перемещение опухолевых клеток сквозь ткани при наблюдении инвазии [142].

RGD-пептиды могут воздействовать на опухолевые клетки *in vivo*. Показано, что распространение введенных внутривенно опухолевых клеток в тканях мышцы ингибируется введением RGD-пептида. Потеря адгезии, возникшая в результате введения пептида, не позволяет клеткам закрепиться и набрать силу для роста и миграции. В то же время RGD-пептиды способны индуцировать рецепторы, передающие ингибиторный сигнал клетке. Способность пептидов к передаче сигнала заключается в индуцировании экспрессии протеиназ в фибробластах, а также в том, что в больших дозах они останавливают пролиферацию клеток. Пептиды могут быть рецепторами-агонистами по отношению к сигналингу и дополнительно — ингибиторами адгезии.

1.7.1. Интегриновый сигналинг

Связывание лиганда с интегрином часто регулируется клетками. Этот процесс известен как внутренний сигналинг, или активация интегринов. Как только интегрины связаны и кластеризованы своими лигандами, они передают информацию клеткам. Эти сигналы извне соединяются с сигналами, поступающими от рецепторов фактора роста и других мембранных рецепторов, и таким образом регулируют множество клеточных функций. Одним из хорошо изученных примеров интегринового сигналинга является GPIIb/IIIa, необходимый для агрегации и адгезии распластанных тромбоцитов во время гемостаза (рис. 1.14) [143]. GPIIb/IIIa состоит из двух-

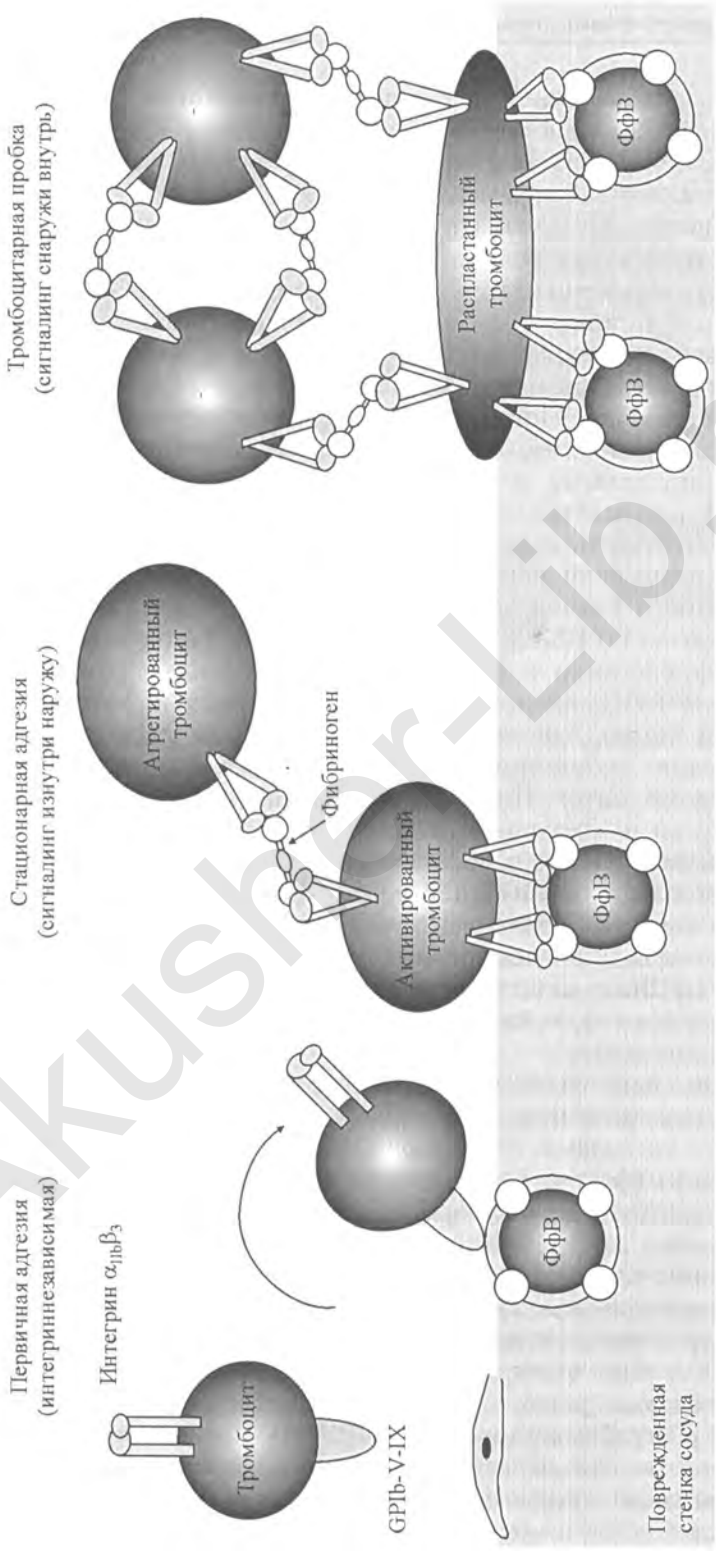


Рис. 1.14. Регуляторные сигнальные реакции гемостаза с участием интегрина GPIIbIIIa [159]. (ФфВ — фактор фон Виллебранда)

цепочечной α -субъединицы, нековалентно связанной с одноцепочечной β -субъединицей. Каждая субъединица связывается с тромбоцитарной мембраной только один раз. N-конец и больший остаток каждой субъединицы являются внеклеточными, а мембраносвязывающий домен соединен с коротким C-концевым цитоплазматическим хвостом, состоящим из 20 аминокислотных остатков в α -субъединице и 47 аминокислотных остатков в β -субъединице. На биохимических, генетических, молекулярных моделях показано, что связывание лиганда — основная функция поверхности глобулы интегрин. Поскольку связывание регулируется сигналами изнутри тромбоцитов и вызывает их ответ, должны существовать механизмы для передачи информации взад—вперед между цитоплазматическими “хвостами” и верхней частью глобулы. Этот процесс называют *интегриновым сигналингом*.

Между внутренним и внешним сигналингом существуют различия. Внутренний, или изнутри—наружу, сигналинг заключается в том, что реакции, вызванные связыванием одного или более агонистов с их рецепторами на плазматической мембране, приводит к превращению GPIIb/IIIa из низкоаффинного в высокоаффинный рецептор. Такое превращение определяет, может ли GPIIb/IIIa взаимодействовать с растворимым адгезивным лигандом (фибриноген и фактор фон Виллебранда), который содержит классическую RGD-последовательность узнавания интегрин. Такие поливалентные лиганды могут функционировать как мостики между рецепторами соседних тромбоцитов и тем самым способствовать продолжению агрегации тромбоцитов. Поскольку GPIIb/IIIa способен латерально располагаться внутри плазматической мембраны, внутренний сигналинг имеет две с трудом различимые особенности: а) аффинная модуляция, вносящая структурные изменения внутри гетеродимера, которые приводят к увеличению силы связывания лиганда; б) модуляция, приводящая к изменению аффинности функционального взаимодействия между лигандом и рецептором, что вызывает хелатирующий эффект [144]. Единственно правильным является путь через кластеризацию интегрин внутри плазматической мембраны (рис. 1.15).

Внешний, или извне—внутрь, сигналинг осуществляется реакциями, вызванными связыванием и кластеризацией интегринов, что должно быть согласовано с сигналами, поступающими от других рецепторов плазматической мембраны (фактор роста, цитокины, G-белоксопряженные рецепторы). Сигналы интегринов помогают регулировать множество событий, происходящих после связывания с лигандом: образование крупных агрегатов, распластывание тромбоцитов, секрецию гранул, ретракцию сгустка и, возможно, прокоагулянтную активность тромбоцитов.

Внутренний сигналинг тромбоцитов. Покоящиеся тромбоциты содержат около 80 000 копий поверхности GPIIb/IIIa, включая его дополнительные объединения в мембранах α -гранул и открытой каналикулярной системы. Связывание растворимых лигандов с GPIIb/IIIa происходит во время активации тромбоцитов, длится секунды, после чего несколько минут находится в равновесном состоянии. Вначале связывание интегрин—лиганд обратимо, далее оно становится необратимым. Очищенный GPIIb/IIIa связывает фиб-

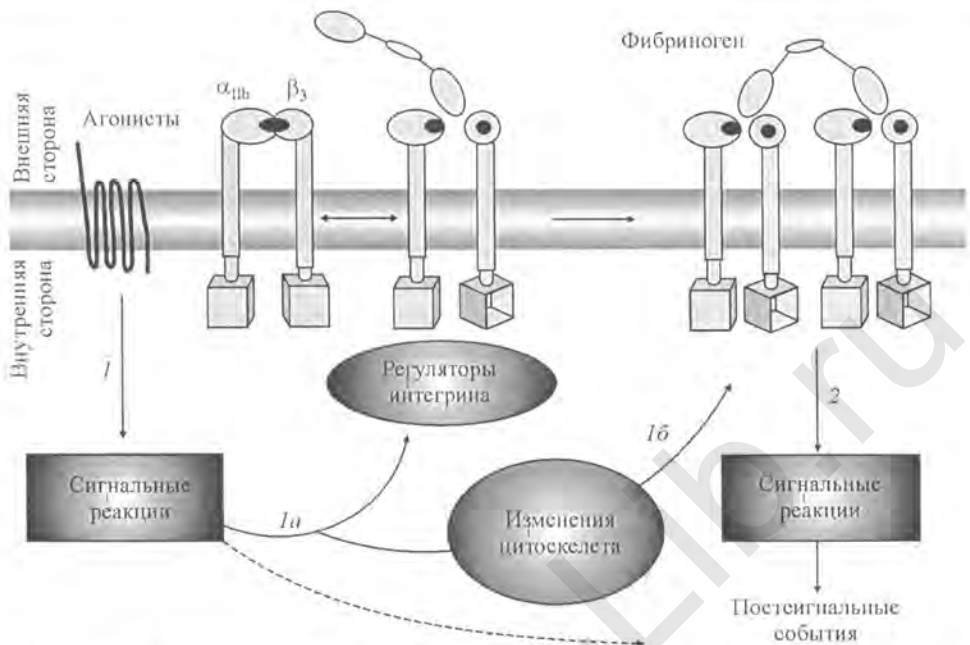


Рис. 1.15. Внутренние и внешние сигнальные реакции, опосредованные кластеризацией интегринина в плоскости плазматической мембраны [159]:

1 — изнутри наружу; 2 — снаружи внутрь

риноген в соотношении 1:1, но в тромбоцитах эта стехиометрия снижена. Хотя связывание лиганда с поверхностью GPIIb/IIIa существенно для первичной агрегации тромбоцитов, внутренние пулы интегринина становятся доступными после активации клеток и участия во вторичной агрегации, когда крупные агрегаты уже сформированы. Фактически пулы GPIIb/IIIa мембраны α -гранул могут образовывать комплексы с фибриногеном, находящимся внутри гранул. В том случае, если рецепторы поверхности покоящихся тромбоцитов становятся неспособными связывать лиганд, например после введения антител-ингибиторов, пул α -гранул способен поддерживать агрегацию тромбоцитов [145–147].

Тромбоциты наряду с другими клетками для регуляции связывания лиганда с интегрининами используют конформационный пусковой механизм и группирование рецепторов. Начальная, обратимая, фаза связывания имеет место вследствие аффинной модуляции, тогда как необратимая фаза возникает благодаря нескольким факторам: а) изменениями в рецепторе, вызванными лигандом (аналогично взаимодействию антиген-антитело) [148, 149]; б) кластеризации рецептора [150–152]; в) интернализации рецептора [153]. Кроме того, тромбоспондин и другие компоненты, высвобожденные из α -гранул, могут связываться с фибриногеном и/или GPIIb/IIIa и стабилизировать взаимодействие лиганд-рецептор. Начальный конформационный пусковой механизм совместим со скоростью и избирательным связыванием моновалентного лигандоподобного Fab-фрагмента с GPIIb/IIIa после актива-

ции тромбоцитов. Более того, флуоресцентный резонанс с использованием моноклонального антитела, связанного с внеклеточным доменом GPIIb/IIIa, показал, что активация тромбоцитов ассоциируется с изменением относительной ориентации субъединиц. Согласно электронным микрограммам очищенного GPIIb/IIIa, связывание фибриногена с поверхностью глобулы интегрин может быть вызвано взаимодействием моноклонального антитела непосредственно с мембранными “ножками” β -субъединицы. Это подтверждает, что длительное конформационное изменение, происходящее в интегрине, возможно, необходимо для аффинной модуляции. Логично предположить, что GPIIb/IIIa образует кластеры в мультимерах в ответ на изменение цитоскелета во время активации тромбоцитов. Субпопуляция GPIIb/IIIa всегда связана с мембранным скелетом в покоящихся тромбоцитах, и во время активации тромбоцитов интегрин перераспределен в F-актиновом цитоскелете. Однако большие цитоскелетные преобразования не являются необходимыми для начальной фазы связывания лиганда с GPIIb/IIIa, так как ингибиторы полимеризации актина практически не влияют на обратимое связывание с лигандом, но оказывают существенное действие на необратимое связывание [154].

Структурные изменения в GPIIb/IIIa, соответствующие переходу между низко- и высокоаффинным состояниями, неизвестны. Одна из моделей показывает, что реакции сигналинга, вызванные агонистами тромбоцитов, являются причиной модификации цитоплазматических “хвостов” интегрин, которые затем внедряются в экстрацеллюлярный домен для связывания лиганда.

Активация тромбоцитов может вызвать связывание с лигандом: а) возникновением конформационных изменений в β -субъединице открытием лигандсвязывающих центров; б) изменением ориентации субъединиц, которое демаскирует центры связывания в α -субъединице (рис. 1.16). Это означает, что рецептор может занимать чередующиеся области лиганда, поскольку молекула фибриногена поливалентна относительно GPIIb/IIIa. Например, C-конец γ -цепи фибриногена важен для начального связывания с GPIIb/IIIa, но один или оба RGD-центра в $A\alpha$ -цепи могут обеспечить вторичные точки соприкосновения, необходимые для прочного связывания. $A\alpha$ -центры также имеют значение, когда фибриноген иммобилизован на поверхности или превращен в фибрин [155, 156].

Во внутреннем сигналинге участвуют реакции, которые: а) инициируют и проводят информацию от агониста или антагониста рецепторов к множеству активаторов интегринов; б) непосредственно вызывают активацию или инактивацию дезинтегринов. Внутренний сигналинг, вызванный многими агонистами, такими, как тромбин, АДФ, эпинефрин и тромбоксан A_2 , связан с гетеротримерными ($\alpha\beta\gamma$) рецепторами, сопряженными с G-белками. Общей чертой многих агонистов, активирующих GPIIb/IIIa, является их способность вызывать гидролиз (поли)фосфоинозитида, образование диаглицерола и IP_3 посредством G_q -белка и фосфолипазы C_β или через тирозинкиназу и фосфолипазу C_γ . IP_3 стимулирует повышение содержания в цитоплазме свободного кальция, но для активации GPIIb/IIIa этого недостаточно.

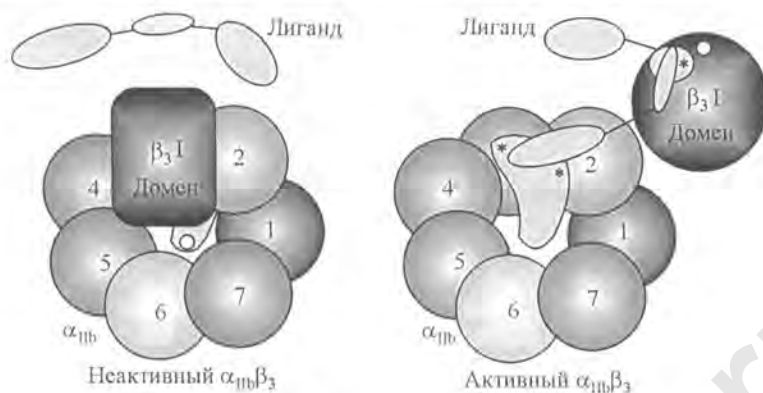


РИС. 1.16. Изменения в экстрацеллюлярном домене GPIIb/IIIa, необходимые для связывания с лигандом, происходящие при активации рецептора [159]

$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -канал может изменять чувствительность интегрин к агонистам. Активация РКС диаглицеролом приводит к активации GPIIb/IIIa, блокируемой ингибиторами РКС.

Пути ингибирования GPIIb/IIIa также важны, как и пути активации. Мощным ингибитором активации и агрегации тромбоцитов является простагландин I_2 . Он связывается со специфическим G_s -сопряженным рецептором, активирующим аденилилциклазу и цАМФ-зависимую протеинкиназу (РКА). Агрегацию тромбоцитов ингибируют также NO, который синтезируется и тромбоцитами, и эндотелием, и активирует гуанилилциклазу (РКГ). Значение ингибиторного пути NO *in vivo* показано на примере пациентов с дефектом биоспособности NO, повышаемой реактивностью тромбоцитов к агонистам [157].

Внешний сигналинг тромбоцитов. Сигналинг через GPIIb/IIIa определяет степень распластывания тромбоцитов на поверхности сосуда, содержащей фактор фон Виллебранда или фибриноген, и их резистентность к отрыву от матрикса. Похоже, внешние сигналы, возникшие во время агрегации и распластывания тромбоцитов, способствуют секреции гранул и вторичной агрегации. Следовательно, внешние сигналы определяют размер гемостатической пробки или патологического тромба (рис. 1.17). Ретракция сгустка фибрина также включает внешние сигналы, так как представляет собой взаимодействие фибрина и актинового цитоскелета с GPIIb/IIIa и взаимодействие актин-миозин. При определенных условиях даже развитие прокоагулянтной активности тромбоцитов благодаря "уходу" мембранных фосфолипидов зависит, в частности, от постагрегационных событий [158].

Внешний сигналинг возникает в определенных участках клеточного матрикса и местах контакта клетка-клетка. В тромбоцитах этот процесс вызван олигомеризацией GPIIb/IIIa как следствием связывания лиганда, поскольку подавать сигнал может только поливалентный лиганд. Распространяются сигналы взаимодействием между цитоплазмными "хвостами" интегринов, сигнальными молекулами и структурными белками цитоскелета, к ко-

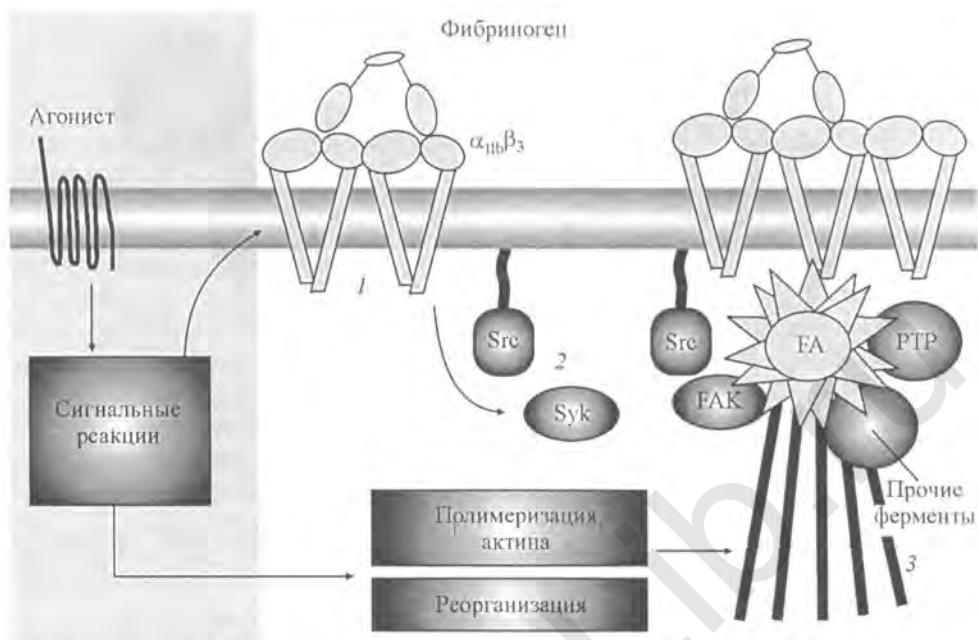


РИС. 1.17. Сигналинг в тромбоцитах снаружи внутрь при участии интегрина GPIIbIIIa: 1 — кластеризация интегрина вследствие вызванной агонистом аффинной модуляции и связывания лиганда; 2 — сигнальные реакции, вызванные связыванием и кластеризацией интегрина; 3 — активация и транслокация ферментов вследствие полимеризации актина [159]

торым относятся винкулин, талин и α -актинин. Начальные сигнальные реакции благоприятствуют продолжительной сборке комплекса, возникающей в результате белок-белковых взаимодействий, полимеризации актина и реорганизации цитоскелета. Распластывание тромбоцитов на фибриногене или факторе фон Виллебранда длится максимум несколько минут. За это время образуются кластеры винкулина, связанные с актиновыми нитями, и начинается адгезия тромбоцитов. Полное распастывание или агрегация ассоциированы с активацией тирозинкиназы и фосфорилированием тирозина вспомогательных субстратов, к которым относятся небольшие пептиды, SH-содержащий домен инозитол-5-фосфатазы. Не наблюдается никаких изменений, если распастывание и агрегация блокированы [159].

1.8. ИНГИБИТОРЫ И АКТИВАТОРЫ АГРЕГАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ, СОДЕРЖАЩИЕСЯ В ЯДЕ ЗМЕЙ

Эти компоненты яда змей разделены на несколько групп, которые включают ферментные активаторы прямого действия, неферментные активаторы и компоненты, требующие наличия плазменных кофакторов.

Активаторы агрегации тромбоцитов прямого действия. Одна из групп ферментов прямого действия на тромбоциты представлена сериновыми про-

теиназами (кроталоцитин, тромбоцитин, некоторые тромбиноподобные ферменты). Способность указанных веществ активировать агрегацию тромбоцитов определяется в основном сравнением с действием на тромбоциты АДФ и тромбина [160]. Так, кроталоцитин, полученный из яда лесной гремучей змеи *Crotalus horridus horridus*, одновременно индуцирует агрегацию тромбоцитов и секрецию из тромбоцитов АТФ. Тромбоцитин (содержится в яде южноамериканской ямкоголовой змеи *Bothrops atrox*) активирует агрегацию тромбоцитов и индуцирует реакцию их высвобождения. Механизм индуцирования этими ферментами агрегации тромбоцитов различен. Под действием тромбоцитина происходит высвобождение АДФ, который сам является индуктором агрегации, тогда как кроталоцитин индуцирует высвобождение АДФ, секрецию серотонина и в некоторой степени подобен действию малого количества тромбина. Два других тромбиноподобных фермента — керастоцитин (содержится в яде тунисской гадюки *Cerastes cerastes*) и керастобин (компонент яда египетской песчаной гадюки *Cerastes vipera*) — также вызывают агрегацию тромбоцитов. Однако керастобин может также предотвращать агрегацию тромбоцитов, вызванную керастоцитином, блокируя центры связывания рецепторов фибриногена и тромбина (соответственно интегрины GPIIb/IIIa и GPIb) [161, 162].

Отдельная группа ферментов яда змей, способных вызывать агрегацию тромбоцитов, представлена фосфолипазами A_2 . Действие фосфолипаз, полученных из яда различных змей, заключается в расщеплении липидов цитоплазматической мембраны, которое приводит к высвобождению арахидоновой кислоты. Некоторые фосфолипазы оказывают на агрегацию тромбоцитов двоякое действие: в низкой концентрации они могут быть активаторами, а в высокой концентрации или при длительной инкубации — ингибиторами (например, фосфолипаза, содержащаяся в яде южной медноголовой змеи *Agkistrodon contortrix contortrix*). Фосфолипазы яда кобры *Naja m. mossambica* и гадюки Рассела *Russeli vipera* оказывают бифазный эффект на отмытые тромбоциты кролика. Первая фаза — обратимая агрегация, вторая — ингибиторный эффект на агрегацию тромбоцитов, вызванную арахидоновой кислотой, АДФ и коллагеном, но не тромбином.

Неферментные компоненты прямого действия на агрегацию тромбоцитов. К этой группе относятся лектины яда кустарниковой змеи *Lachesis muta*, которые связываются с тромбоцитами и вызывают конформационные изменения в рецепторе фибриногена, позволяющие связывание фибриногена с рецептором и последующую агрегацию.

Другой тип неферментных активаторов образует конволюксин (яд южноамериканской гремучей змеи *Crotalus durissus terrificus*), принадлежащий к лектинам С-типа [163]. Он является мощным агентом, вызывающим агрегацию тромбоцитов. Механизм действия конволюксина на тромбоциты подобен таковому коллагена. Показано, что в активацию тромбоцитов, опосредованную конволюксином, включается фосфоинозитидспецифичная фосфолипаза С. В отличие от других лектинов С-типа, содержащихся в яде змей, конволюксин не связывается с гликопротеином Ib. Конволюксин индуцирует сигнальную трансдукцию в коллагенподобном участке и связывает

тся с гликозилированным компонентом лизатов 62 кДа тромбоцитарной мембраны. Показано, что этот компонент змеиного яда не использует коллагеновый рецептор — $\alpha_2\beta_1$ интегрин — для активации тромбоцитов, а изначально вызывает агрегацию тромбоцитов через гликопротеин 62 кДа.

Мощными активаторами агрегации являются:

∇ агрегосерпентин (компонент яда зеленой древесной змеи *Trimeresurus gramineus*) [164]; белок вызывает активацию тромбоцитов, снижая уровень цАМФ, или активацию эндогенной фосфолипазы A_2 , приводя в конечном счете к формированию активирующего тромбоцитарного фактора; механизм активации тромбоцитов не включает простагландины; для активности данного белка требуются ионы кальция;

∇ триваглерин (содержится в яде ямкоголовой гадюки Ваглера *Trimeresurus wagleri*; активация тромбоцитов в присутствии этого белка проходит по уникальному механизму, который не зависит от образования тромбосана A_2 и тромбоцитактивирующего фактора или от высвобождения АДФ [165];

∇ тримуцитин (содержится в яде китайского питона *Trimeresurus mucroquatus*); N-концевая последовательность этого белка (повторы Гли-Про-Х) подобна коллагену; действуя на тромбоциты кролика, тримуцитин вызывает высвобождение АДФ и образование тромбосана, но высвобождения АДФ не наблюдается [166];

∇ агретин (содержится в яде малайского шитомордника *Malayan pit viper*) связывается с тромбоцитами и может действовать как агонист интегрина Ia/IIa; агрегация тромбоцитов происходит вследствие активации эндогенной фосфолипазы C, приводящей к гидролизу фосфоинозитидов с последующей мобилизацией внутриклеточного кальция [167].

Ингибиторы агрегации тромбоцитов. Ингибиторы агрегации тромбоцитов разделены на четыре группы [168]:

∇ α -фибриногеназы, выявленные в яде змей Юго-Восточной Азии; ингибиторный эффект обусловлен расщеплением фибриногена, являющегося кофактором агрегации тромбоцитов;

∇ фосфолипазы A_2 , ингибиторный эффект которых наблюдается при продолжительной инкубации и высоких концентрациях; действие фосфолипазы A_2 вызывает появление расщепленных продуктов производных арахидиновой кислоты, которые обуславливают разрушение цитоскелета тромбоцитов; ингибиторный эффект вызван нарушением связывания фибриногена с его рецептором гликопротеином IIb/IIIa на фосфолипидной мембране тромбоцитов;

∇ 5'-нуклеотидазы, выявленные в яде представителей семейства *Viperidae* (гадюковые); действие этих ферментов вызывает разрушения АДФ — индуктора агрегации тромбоцитов, вследствие чего происходит ингибирование агрегации;

∇ антагонисты рецептора фибриногена; эта группа ингибиторов тромбоцитов представляет собой дезинтегрины, действующие как антагонисты тромбоцитарного рецептора фибриногена — гликопротеина IIb/IIIa.

Дезинтегрины — дисульфидбогатые полипептиды, которые связываются с интегринными рецепторами, принимающими участие в адгезии повер-

хности клеток [169—171]. Они являются специфическими ингибиторами интегринов групп β_1 и β_3 , к которым относится тромбоцитарный рецептор фибриногена — гликопротеин IIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$), рецептор витронектина ($\alpha_v\beta_3$) и рецептор фибронектина ($\alpha_5\beta_1$). Как ингибиторы агрегации тромбоцитов дезинтегрины связываются с интегринами на поверхности клеток разного типа, в том числе и злокачественных. Из яда змей семейства *Viperidae* выделено около 50 дезинтегринов и их изоформ. Дезинтегрины клонируют, экспрессируют, а также химически синтезируют [172, 173]. Белки этой группы ингибируют связывание фибриногена с тромбоцитами, действуя как антагонисты рецептора фибриногена. На поверхности тромбоцитов фибриноген связывается с интегрином IIb/IIIa, вызывая взаимодействие тромбоцит-тромбоцит, которое является заключительной стадией агрегации тромбоцитов, индуцированной АДФ, тромбином, коллагеном и арахидоновой кислотой. Дезинтегрины блокируют IIb/IIIa, препятствуя связыванию с ним фибриногена, и таким образом вызывают ингибирование агрегации тромбоцитов, несмотря на присутствие стимулирующих агентов.

Концентрация дезинтегринов, при которой происходит 50 %-е ингибирование агрегации тромбоцитов (IC_{50}), составляет 30—300 нМ. Исследованиями *in vitro* и *in vivo* получено доказательство наличия тонких различий в биологической активности разных интегринов, среди которых в зависимости от размера выделены три структурные подгруппы: а) короткие дезинтегрины (49—51 аминокислотный остаток) с 4 дисульфидными связями; б) средние (68—73) — с 6 дисульфидными связями; в) длинные (83) — с 7 дисульфидными связями. Ингибиторами агрегации тромбоцитов являются интегрини всех трех подгрупп.

Все дезинтегрины содержат С-концевую Arg-Gly-Asp (RGD)-последовательность, которая имеет большое значение для обеспечения их способности блокировать взаимодействие интегрини с лигандом. Один из дезинтегринов — барбуриин (компонент яда юго-восточной карликовой гремучей змеи *Sistrurus m. barbouri*) — содержит Lys-Gly-Asp (KGD)-последовательность, которая обеспечивает высокое сродство этого белка к рецептору фибриногена GPIIb/IIIa. Расположение дисульфидных связей и RGD/KGD-последовательности у всех интегринов различны. Однако для RGD-последовательности коротких дезинтегринов характерно уникальное расположение остатков цистеина: у этих белков нет свободных сульфгидрильных групп, поскольку все остатки цистеина вовлечены в дисульфидные связи.

С помощью ядерного магнитного резонанса установлена трехмерная структура аллолабрина (яд *Trimeresurus albolabris*), кистрина (яд *Calloselasma rhodostoma*), флавовиридина (яд *Trimeresurus flavoviridis*) и эхистатина (яд *Echis carinatus*). Для этих белков характерно наличие нерегулярных изгибов и петель, которые формируют жесткую структуру, стабилизируемую водородными и дисульфидными связями. RGD-последовательность всех четырех дезинтегринов расположена на конце гибкой шпильки, стабилизированной двумя дисульфидными связями. Последовательность обладает высокой мобильностью, что позволяет быстрое узнавание и связывание с интегрини.

Представляет интерес мутантный эхистатин, у которого последовательность ARGDD превращена в CRGDC. Вследствие мутации появляются дополнительная дисульфидная связь и конформационные изменения молекулы белка, стерически оставляющие RGD в бетаизгибе II' типа. Мутантный белок ингибирует связывание интегрина с GPIIb/IIIa в два раза эффективнее нативного эхистатина. Интересно, что дисульфидсвязанный димерный дезинтегрин — контортростатин — оказывает на сигнальную трансдукцию тромбоцитов совсем иной эффект, чем мономерный дезинтегрин — мульти-скваматин, полученный из яда эфы многочешуйчатой (*Echis multisquamatus*) [174]. Контортростатин опосредует сигналинг, вызванный фибриногеновой прошивкой интегрина IIb/IIIa, однако оба дезинтегрин ингибируют агрегацию тромбоцитов. Контортростатин блокирует интегрин группы β_1 и β_3 и ингибирует агрегацию тромбоцитов связыванием рецептора фибриногена (GPIIb/IIIa). На модельных системах (собаки) *ex vivo* было показано, что у животных, которым не был введен дезинтегрин, наблюдалась неконтролируемая реокклюзия, тогда как у животных, которым контортростатин вводили внутривенно, параметры гемостаза не изменялись.

Для дезинтегринов всех трех подгрупп центр связывания расположен внутри GPIIb/IIIa (аминокислотные остатки 217—302) и в пределах 15—20 Å от RGD-связывающего центра между гетеродимерными субъединицами интегрин, однако возможно наличие и дополнительных контактных центров.

Результаты клинических исследований предполагают использование блокады IIb/IIIa в качестве эффективной терапии при тромботических осложнениях. Таким образом, дезинтегрины могут служить структурными прототипами агентов для развития антитромботической терапии, а основанные на структуре дезинтегринов антитромботические агенты — использоваться для увеличения реперфузии у пациентов, проходящих курс антитромботической терапии при ОИМ [175].

2.1. КОМПОНЕНТЫ СИСТЕМЫ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ**2.1.1. Витамин К-зависимые белки**

Факторы системы свертывания крови — II, VII, IX, X, протеин С и протеин S принадлежат к семейству витамин К-зависимых белков, характерной особенностью структуры которых является наличие в N-концевой части молекулы так называемого Gla-домена, содержащего от 37 до 46 аминокислотных остатков, гомологичных соответствующим доменам этой группы белков и включающих от 9 до 12 остатков γ -карбоксихлутаминовой кислоты (рис. 2.1).

Gla-домен играет важную роль в образовании комплекса фермент-кофактор-профермент на отрицательно заряженной фосфолипидной мембране. При образовании таких сложных многокомпонентных комплексов ионы кальция выполняют регуляторную роль и служат мостиками между белковыми компонентами системы свертывания крови и клеточными мембранами. Ионы кальция взаимодействуют с двумя свободными карбоксильными группами γ -карбоксихлутаминовой аминокислоты полипептидной цепи фактора и полярными головками фосфатидилсерина. За счет кальциевых мостиков происходит не только предварительная ориентация факторов свертывания крови на фосфолипидной мембране, но и конформационная перестройка белковых компонентов образующихся активационных комплексов. Таким образом, Gla-домен определяет металло- и мембраносвязывающие свойства витамин К-зависимых белков — уникальные для данного класса белков.

Витамин К-зависимые белки синтезируются в форме предшественников, содержащих на N-конце молекулы дополнительные последовательности (лидерные пресегменты и пропептиды). Лидерная последовательность, содержащая гидрофобные аминокислотные остатки, служит сигналом, требующимся для проникновения всего белка сквозь липопротеидную мембрану в эндоплазматическую сеть, а пропептид — для распознавания белковой цепи витамин К-зависимой γ -глутамилкарбоксилазой [1—3].



Рис. 2.1. Структурные домены белков, участвующих в гемостазе, и родственных им белков [34]

Витамин К, или антигеморрагический витамин, является производным 2-метил-1,4-нафтохинона, который функционирует в мембранах эндоплазматического ретикулума печени в качестве кофактора специфической карбоксилазы при посттрансляционном γ -карбоксилировании глутамильных остатков полипептидных цепей предшественников витамин К-зависимых белков (рис. 2.2).



РИС. 2.2. Процесс карбоксилирования остатка γ -глутаминовой кислоты С1а-домена витамин К-зависимых белков

При недостатке витамина К или при введении его антагонистов нарушается посттрансляционное γ -карбоксилирование предшественников протромбина, факторов VII, IX, X, протеинов С, S и Z. При этом часть белков этой группы, не подвергаясь γ -карбоксилированию, выделяется в кровь, что приводит к появлению в кровяном русле аномальных форм витамин К-зависимых белков, которые функционально неактивны, так как не связывают должным образом ионы Ca^{2+} и не участвуют в процессе свертывания крови. Декарбоксилированные формы этих белков получили наименование PIVKA II, PIVKA VII и т. д. (PIVKA — протеин, образующийся в отсутствие витамина К).

Уровень снижения функциональной активности отдельных витамин К-зависимых факторов при введении антагонистов витамина К обусловлен разной скоростью распада данных белков в организме и соответствует интенсивности их синтеза в печени. Так, после приема антикоагулянтов непрямого действия активность фактора VII у людей снижается наиболее резко — на 19 %/ч, факторов IX и X — на 2, протромбина — на 1 %/ч.

Первичная недостаточность витамина К у человека встречается редко — он довольно широко распространен в растительных и животных продуктах. Более того, он продуцируется бактериями, находящимися в кишечнике человека. Однако длительное лечение антибиотиками, которые подавляют кишечную флору, может быть причиной гиповитаминоза [2, 4—6].

Фактор VII — витамин К-зависимый гликопротеин молекулярной массой 50 кДа, циркулирующий в крови в виде профермента в концентрации 10 нМ. Активированная форма фактора — VIIa (КФ 3.4.21.21) образует эквивалентный комплекс с тканевым фактором и участвует во внешнем пути системы свертывания крови. Синтезируется клетками печени.

Профермент фактора VII сам по себе может иметь минимальную протеиназную активность и способен к самоактивации [7, 8]. У здоровых людей в циркулирующей крови содержится 0,5—1,0 % фактора VII в активной форме. Повышенный уровень этого фермента рассматривают как индикатор риска возникновения ишемической болезни сердца (табл. 2.1).

Фактор VII состоит из одной полипептидной цепи, имеющей в своем составе 406 аминокислотных остатков. 40 аминокислотных остатков N-концевого участка молекулы фактора VII образуют Gla-домен, содержащий ос-

Таблица 2.1. Факторы свертывания крови и ингибиторы [2, 18, 34]

Компонент	Молекулярная масса, кДа	Концентрация в плазме крови		Время полужизни, ч	$A_{280\text{ нм}}^{1\%}$	Хромосомная локализация
		н/М	мг/л			
Фактор I (фибриноген)	340	7600	2600	90—120	15,1	4q23-q32
Фактор II (протромбин)	72	1400	100	60	13,8	11q11-q12
Фактор V (проакселерин)	330	20—30	6,6—10	12—20	9,6	1q21-q25
Фактор VII (проконвертин)	50	10	0,5—1,0	5—6	13,9	13q34
Фактор VIII (антигемофильный A)	330	0,7	0,1—0,2	7—12	8,8	Xq28
Фактор IX (фактор Кристмаса)	57	90	3—5	20—30	13,2	Xq27.1-q27.2
Фактор X (фактор Стюарта—Прауэра)	56	170	10—12	20—40	13,9	13q34-qter
Фактор XI	160	30	4,8—6,0	65	13,4	4q32-q35
Фактор XII (фактор Хагемана)	80	375	30—40	60		5q33-qter
Фактор XIII (фибринстабилизирующий)	340—320	70—90	20—30	100—150	13,8	1q31.2-q31.3-B 6p24-p25-A
Прекаликреин (фактор Флетчера)	85	300—580	25—40	256	Не опр.	4p35
Высокомолекулярный кининоген (фактор Фишжеральда—Фложе)	110—120	636—1000	Не опр.	170	Не опр.	3q26-qter
Антитромбин III	58	3400	200	60—90	6,2	1q23-q25 1q22-25
Тромбомодулин	75	*	*	Не опр.	8,8	20p12-cen
Протеин C	62	60	3,7—5,0	6—12	14,5	2q13-q14
Протеин S	69—78	145—300	10—21	20—30	9,5	3p11.1-q11.2

*Тромбомодулин присутствует в количестве 100 000 копий на эндотелиальную клетку, концентрация свободного тромбомодулина в крупных сосудах составляет приблизительно 0,1—0,2 нМ, при взаимодействии с тромбином его локальная концентрация увеличивается до 10 нМ; Не опр. — не определяли.

татки γ -карбоксиглутаминовой аминокислоты, которые определяют метал-лосвязывающие свойства этого белка и служат для присоединения к фосфо-липидной поверхности.

Фактор VII превращается в активную форму VIIa под действием тром-бина, факторов IXa, Xa, VIIa, XIIa, каликреина и плазмина путем расщепле-ния пептидной связи Arg₁₅₂—Ile₁₅₃. Фактор VIIa состоит из двух полипептид-ных цепей молекулярной массой 30 и 20 кДа, соединенных дисульфидной связью Cys₁₃₅—Cys₂₆₂ (рис. 2.3).

Врожденное нарушение функционирования фактора VII представляет собой редкое аутосомное заболевание с частотой в общей популяции 1:500 000, генетически гетерогенное. Описано около 24 мутаций в разных участках гена, которые вызывают потерю способности связываться с тканевым фактором и снижение функциональной активности [9].

При лечении антикоагулянтами непрямого действия активность фактора VII снижается быстрее, чем активность протромбина, что является результатом более короткого периода полужизни этого белка (около 6 ч).

При повреждении стенок сосудов или активации эндотелия субэндотелиальный тканевый фактор экспонируется/экспрессируется в кровоток. Фактор VIIa связывается с тканевым фактором, образуя эквимольный комплекс, субстратом которого является фактор X [10, 11]. Как интегральный белок тканевый фактор функционирует не самостоятельно, а в комплексе с фосфолипидной матрицей, которая в процессе повреждения внешней кле-

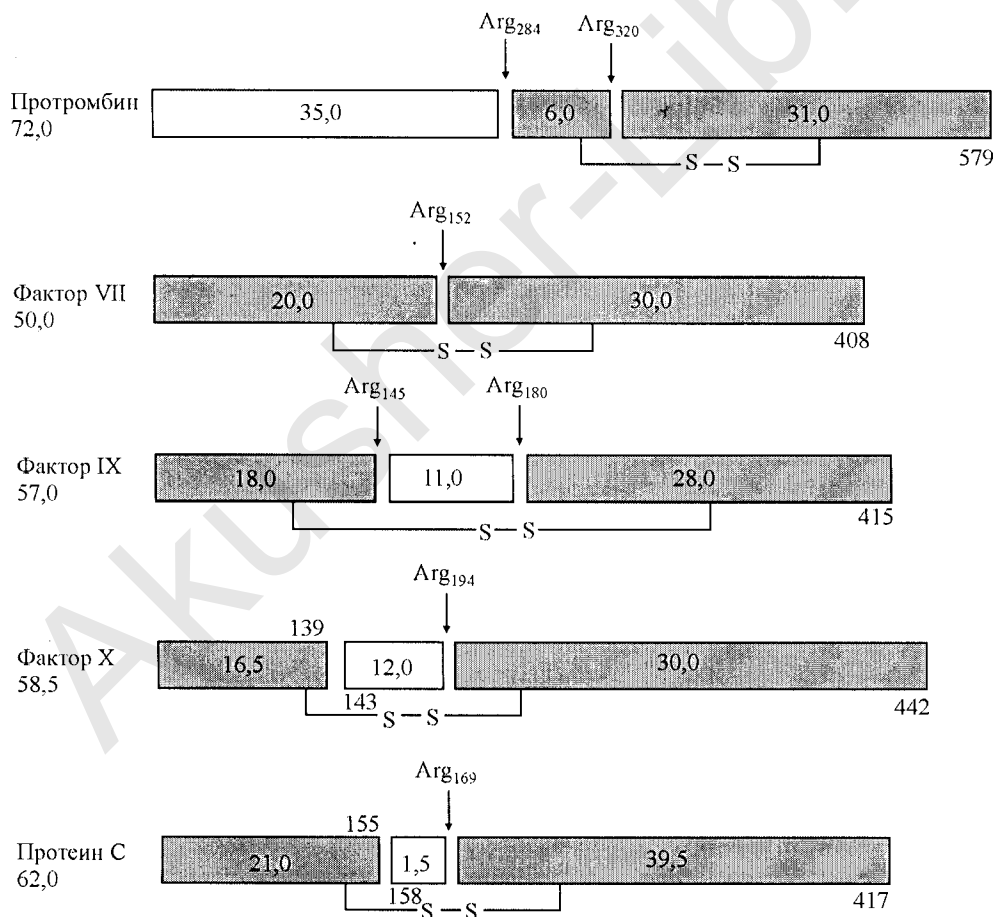


РИС. 2.3. Схема активации витамин К-зависимых факторов системы свертывания крови. Стрелками обозначены участки специфического расщепления полипептидных цепей проферментов в процессе их активации [18]

точной мембраны теряет нормальное асимметрическое распределение своих липидов. В результате происходит перемещение молекул фосфатидилсерина и фосфатидилэтаноламина из внутреннего листка бислоя мембраны на внешний. Активность тканевого фактора в норме не проявляется в клетках, находящихся в непосредственном контакте с циркулирующей кровью.

Тканевый фактор — трансмембранный гликопротеин молекулярной массой 37 кДа, который содержится в мембранах эндотелиальных и гладкомышечных клеток, моноцитов, макрофагов. Белок состоит из 263 аминокислотных остатков, образующих три домена. Первые 219 аминокислотных остатков (растворимый тканевый фактор) образуют экстрацеллюлярный участок, состоящий из двух доменов (N-концевой модуль с 1-го по 103-й и C-концевой модуль со 104-го по 210-й аминокислотные остатки), сложенные в β -сендвич. Они могут быть отнесены к фибронектиновым модулям типа III. Аминокислотные остатки Arg₁₃₅ и Phe₁₄₀ важны для присоединения фактора VIIa. Гидрофобный трансмембранный домен образован аминокислотными остатками 220—242, к нему примыкает небольшой цитоплазматический участок (аминокислотные остатки 243—263), содержащий гликозилированный фрагмент. По структурной гомологии и распределению остатков цистеина этот C-концевой участок молекулы тканевого фактора отнесен ко второму классу семейства цитокиновых рецепторов [12, 13].

Фактор IX (фактор Кристмаса) — витамин K-зависимый гликопротеин молекулярной массой 57 кДа, циркулирующий в плазме крови в виде профермента в концентрации 90 нМ. Активированная форма фактора IX — фактора IXa (КФ 3.4.21.22) в комплексе с фактором VIIIa, фосфолипидами и ионами кальция участвует в свертывании крови, активируя фактор X.

Фактор IX состоит из 415 аминокислотных остатков, образующих ряд доменов. N-концевая часть молекулы (1—46 аминокислотные остатки) формирует Gla-домен, главной функцией которого является опосредованное ионами Ca²⁺ связывание с фосфолипидами клеточных мембран. Аминокислотные остатки с 3-го по 11-й важны для присоединения фактора IXa к эндотелиальным клеткам [14].

Далее следуют два домена, гомологичные молекуле эпидермального фактора роста (EGF-подобный домен). Они содержат 43—50 аминокислотных остатков и три дисульфидные связи. EGF-подобные домены являются посредниками взаимодействия с EGF и EGF-подобными рецепторами на поверхности клеток. EGF-подобные домены в витамин K-зависимых белках играют важную роль в формировании белковых комплексов и содержат центры связывания Ca²⁺. Так, первый из этих доменов фактора VII содержит один высокоаффинный центр связывания Ca²⁺, необходимый для поддержания конформации и обеспечивающий взаимодействие с факторами VIIIa и X.

Аминокислотные остатки 181—415 образуют каталитический домен типичной сериновой протеиназы, в активный центр которой входят His₂₂₁, Asp₂₆₉ и Ser₃₆₅.

Физиологическая активация фактора IX может происходить под действием двух протеолитических ферментов при наличии Ca²⁺. Первый из них — фактор VIIa в комплексе с тканевым фактором и фосфолипидами, второй — фактор Xa [15, 16]. В результате активации в двух местах (Arg₁₄₅—Ala₁₄₆ и

Arg₁₈₀—Val₁₈₁) полипептидная цепь расщепляется, что сопровождается образованием двухцепочечной молекулы фактора IXa (молекулярная масса 45 кДа) и активационного пептида молекулярной массой 11 кДа (аминокислотные остатки 145—180). Молекулярные массы соединенных дисульфидной связью полипептидных цепей фактора IXa соответствуют 28 и 18 кДа.

После отщепления активационного пептида Val₁₈₁ образует ионную пару с Asp₂₆₉, что сопровождается конформационной перестройкой и формированием активного центра, в результате чего Ser₃₆₅ приобретает возможность взаимодействовать с фактором X.

Расщепление фактором Xa только одной пептидной связи Arg₁₄₅—Ala₁₄₆ приводит к образованию формы фактора IX, не обладающей коагуляционной активностью. Активационный пептид остается присоединенным к тяжелой цепи. Если же активационный пептид остается присоединенным к легкой цепи (после расщепления ядом гадюки пептидной связи Arg₁₈₀—Val₁₈₁), то образовавшийся фактор IXa_α проявляет около 20 % функциональной активности.

Поражение паренхимы печени, длительный курс лечения антагонистами витамина K, нарушение всасывания жирорастворимого витамина K могут приводить к снижению концентрации функционально активного фактора IX.

Недостаточность фактора IX может быть обусловлена генетически (гемофилия В). Клинически и генетически гемофилия В сходна с гемофилией А. Заболевание связано с рецессивными сцепленными с полом мутациями гена фактора IX. Мутации обнаружены во всех доменах молекулы фактора IX и промоторе, в донорных и акцепторных концах стыковки (сплайсинга) экзонов и даже в интронах с образованием новых скрытых мест сплайсинга [17]. Различают варианты гемофилии В с наличием и отсутствием антигена фактора IX. Распространенность гемофилии В в 5 раз ниже, чем гемофилии А.

Фактор X (фактор Стюарта—Прауэра) — витамин K-зависимый гликопротеин молекулярной массой 56 кДа, циркулирующий в плазме крови человека как профермент концентрацией 170 нМ. Активированная форма фактора X — фактор Xa (КФ 3.4.21.6) в комплексе с фактором Va и фосфолипидной мембраной активирует протромбин.

В отличие от других проферментов системы свертывания крови фактор X состоит из двух полипептидных цепей (тяжелая цепь — 42, легкая — 17 кДа), соединенных дисульфидной связью [18, 19]. Легкая цепь профермента состоит из 139 аминокислотных остатков и включает Gla-домен и два EGF-подобных домена аналогично фактору VII. Gla-домен состоит из 11 остатков γ-карбоксиглутаминовой кислоты. Тяжелая цепь содержит каталитический домен сериновой протеиназы и N-концевой активационный пептид, состоящий из 52 аминокислотных остатков. Все углеводы молекулы связаны с тяжелой цепью. Синтезируется клетками печени.

Активация фактора X может происходить с участием разных компонентов: комплекса фактора VIIa, тканевого фактора и Ca²⁺ (теназа внешнего пути свертывания крови), комплекса факторов IXa, VIIIa, фосфолипидов и Ca²⁺ (теназа внутреннего пути свертывания крови). Активация фактора X за-

ключается в ограниченном протеолизе пептидной связи Arg_{194} — Ile_{195} с отщеплением фрагмента 12 кДа тяжелой цепи, в результате чего образуется активный фактор Xa_α . При автокаталитическом отщеплении С-концевого участка тяжелой цепи (3 кДа) образуется фактор Xa_β . Эта модификация не влияет на коагуляционную активность фермента. Аминокислотные остатки His_{236} , Asp_{282} и Ser_{379} образуют триаду активного центра сериновой протеиназы — фактора Xa [20, 21].

Врожденный дефицит фактора X, проявляющийся кровоточивостью под названием *коагуляционный дефект Стюарта—Прауэра*, может иметь гомозиготную и гетерозиготную формы с частотой соответственно 1:1 000 000 и 2:1000. Мутации способны приводить к нарушениям как во внешнем, так и во внутреннем путях активации фактора X.

Приобретенная недостаточность может быть результатом дефицита витамина K, использования антикоагулянтов непрямого действия.

Фактор II (протромбин) — витамин K-зависимый гликопротеин молекулярной массой 72 кДа, циркулирующий в плазме крови в виде профермента в концентрации 1400 нМ. Уровень протромбина существенно изменяется при заболеваниях печени, K-гиповитаминозах во время инфекционных процессов и других патологических состояниях. Это профермент сериновой мультифункциональной протеиназы тромбина (КФ 3.4.21.5).

Асимметричная молекула протромбина состоит из одной полипептидной цепи, включающей несколько структурных и функциональных доменов. Первые 40 аминокислотных остатков составляют Gla -домен, содержащий 10 остатков γ -карбоксиглутаминовой кислоты. После Gla -домена расположены два гомологичных участка, которые состоят из 83 аминокислотных остатков и имеют три внутренние дисульфидные связи. Эти участки образуют структуры, названные кринглами. Кроме протромбина идентифицирован еще ряд белков, в состав которых входят подобные структуры: фактор XII, плазминоген, тканевый фактор плазминогена, урокиназный активатор плазминогена, фактор роста гепатоцитов. Главная функция кринглов, очевидно, состоит в регулировании взаимодействия с субстратами, кофакторами и рецепторами [22, 23]. С-концевой участок протромбина представляет собой каталитический домен сериновой протеиназы.

Рентгеноструктурный анализ молекулы протромбина показал, что в отсутствие ионов кальция Gla -домен не имеет упорядоченной структуры, а при их наличии происходит стабилизация молекулы путем образования двух внутренних карбоксилатных поверхностей, которые координируют семь ионов кальция [24]. Третичная структура кринглового домена от присутствия ионов кальция не зависит.

Физиологическим активатором протромбина в организме является фактор Xa . Активация протромбина фактором Xa приобретает большую скорость при наличии фосфолипидных мицелл и фактора Va, в присутствии которого происходит связывание Xa с тромбоцитами. Фактор Va и фосфолипидные мембраны принимают участие в образовании протромбиназного комплекса и выполняют функции кофакторов, повышающих скорость активации протромбина фактором Xa [25, 26]. Показано, что протромбин может

связываться только с активированным фактором Va, и в этом взаимодействии определенную роль играет фрагмент 2 протромбина. В процессе активации протромбина протромбиназным комплексом благодаря взаимодействию белковых компонентов с фосфолипидной мембраной при наличии Ca^{2+} повышается субстратная специфичность фактора Xa, что определяет скорость образования тромбина через стадии мезотромбина II и претромбина-2 [27, 28].

Фактор Xa одновременно или последовательно расщепляет две расположенные на поверхности пептидные связи: $\text{Arg}_{284}\text{—Thr}_{285}$ и $\text{Arg}_{320}\text{—Ile}_{321}$ [1, 18]. Лизис первой из них приводит к высвобождению фрагмента F1+2. Последующее расщепление второй пептидной связи приводит к образованию двухцепочечной молекулы тромбина (см. рис. 2.3). Расщепление только одной пептидной связи $\text{Arg}_{320}\text{—Ile}_{321}$ обуславливает возникновение мезотромбина — промежуточного продукта образования тромбина, который способен расщеплять синтетические пептидные субстраты, но ограниченно взаимодействует с тромбоцитами и фибриногеном [29]. Этот тромбин расщепляет в протромбине пептидную связь $\text{Arg}_{156}\text{—Ser}_{157}$, вследствие чего возникают протромбиновый фрагмент 1 (F1) и претромбин 1. Расщепление протромбина под действием тромбина существует, очевидно, для ограничения образования последнего по принципу обратной связи (см. рис. 2.3). Дальнейший распад тромбина путем автокатализа ведет к возникновению трехцепочечной молекулы β -тромбина, что сопровождается потерей пептида молекулярной массой порядка 5,0—5,8 кДа, содержащего углевод.

Протеин С — витамин К-зависимый гликопротеин молекулярной массой 62 кДа, циркулирующий в крови в виде профермента в концентрации 60 нМ.

Активированный протеин С (КФ 3.4.21.69) — один из ключевых компонентов физиологического механизма антикоагуляции. Его активация является важнейшим защитным механизмом в ответ на тромбогенный стимул. Активированный протеин С путем ограниченного протеолиза инактивирует факторы VIIa и Va и тем самым ингибирует генерацию фактора Xa и тромбина. Эти реакции усиливаются в присутствии ионов кальция, фосфолипидов и протеина S.

Активированный протеин С не только ингибирует свертывание крови, но также связывает ингибитор активатора плазминогена ПАИ-1, стимулируя фибринолиз.

В крови циркулируют как одно-, так и двухцепочечная формы протеина С в соотношении $\alpha:\beta = 1:3$. Обе формы могут быть активированы.

Молекула протеина С состоит из двух полипептидных цепей: тяжелой (41 кДа) и легкой (21 кДа). Цепи соединены дисульфидной связью (см. рис. 2.3). Легкая цепь протеина С содержит Gla-домен, определяющий высокое сродство молекулы к отрицательно заряженной фосфолипидной мембране. Gla-домен протеина С включает 37 аминокислотных остатков и содержит 9 остатков γ -карбоксиглутаминовой кислоты. Через небольшой гидрофобный участок Gla-домен соединен с двумя EGF-подобными доменами (46—136 аминокислотные остатки). Они образуют высокоаффинные

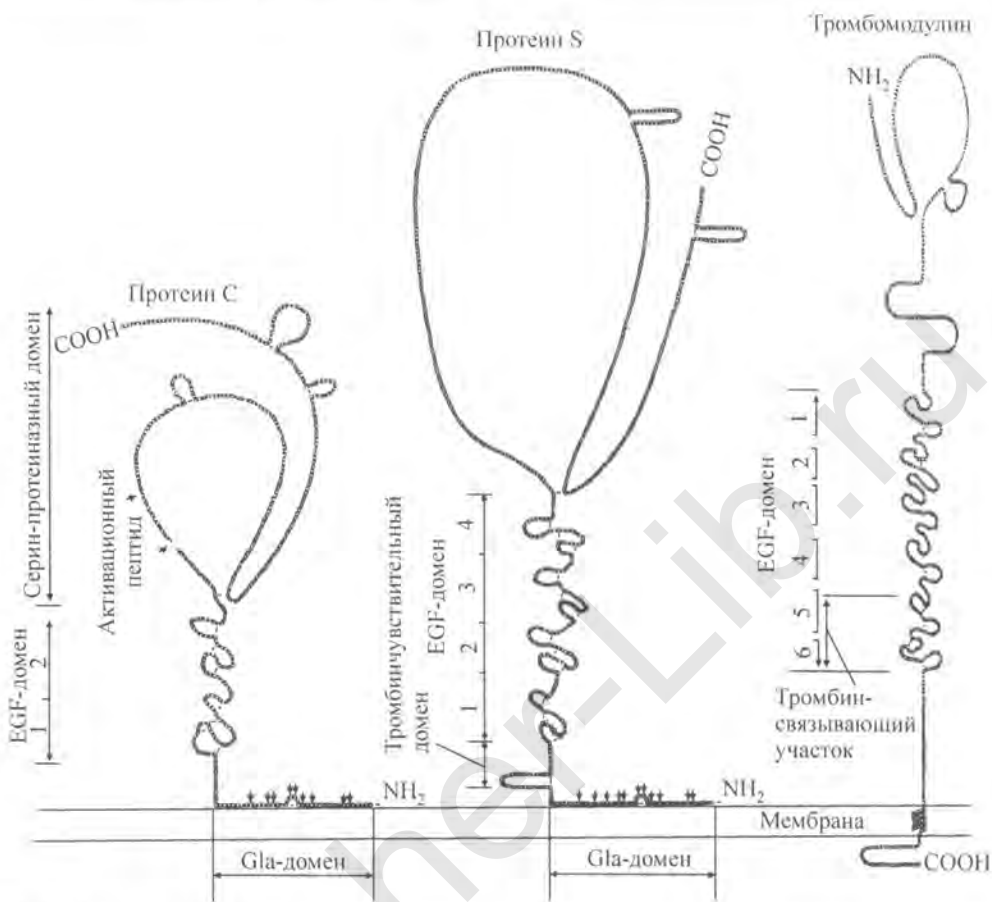


Рис. 2.4. Схематическое представление структур протеина С, протеина S и тромбомодулина [34]

центры связывания Ca^{2+} , которые необходимы для формирования третичной структуры молекулы, ее активации и взаимодействия с молекулой протеина S. С-концевой участок молекулы содержит каталитический домен, гомологичный другим сериновым протеиназам. Активный центр протеина С включает His_{211} , Asp_{257} , Ser_{360} (рис. 2.4).

Активируется протеин С на фосфолипидной мембране комплексом тромбин-тромбомодулин [2, 30, 31]. При активации протеина С тромбином от N-конца тяжелой цепи отщепляется активационный пептид, состоящий из 12 аминокислотных остатков. При этом расщепляется пептидная связь $\text{Arg}_{169}\text{-Leu}_{170}$. Активация протеина С может происходить под действием фактора Ха и яда змей (гадюки Рассела, змей семейства щитомордника) [18].

В процессе активации тромбином мощной антикоагулянтной системы протеина С — тромбомодулин выполняет роль кофактора. Этот гликопротеин по свойствам подобен липопротеинам низкой плотности и представляет собой рецептор тромбина на клеточной поверхности эндотелия.

Молекулярная масса тромбомодулина — 75 кДа. Молекула состоит из 554–559 аминокислотных остатков, образующих несколько доменов. N-концевой участок включает 18 гидрофобных аминокислотных остатков лидерной последовательности (см. рис. 2.4). Следующие аминокислотные остатки формируют лектиноподобный домен, который содержит потенциальный участок связывания тромбина. Затем следует 6 EGF-подобных доменов и участок, состоящий из 34 аминокислотных остатков, который богат остатками серина и треонина — предположительное место O-гликозилирования. Последующие 23 аминокислотные остатка формируют трансмембранный домен. Аминокислотные остатки 33–38 образуют так называемый цитоплазматический хвост тромбомодулина, содержащий несколько потенциальных участков фосфорилирования [18, 36]. В целом молекула состоит из 554–575 аминокислотных остатков. Наряду с полной формой молекулы присутствуют и растворимые фрагменты тромбомодулина. Появление в плазме крови растворимого фрагмента тромбомодулина иногда рассматривается как повреждение эндотелия, в модельной системе он ускоряет тромбинзависимую активацию прокарбоксилазы (КФ 3.4.17.2). Это позволяет предположить, что тромбомодулин способствует торможению фибринолиза. Повышение уровня растворимого тромбомодулина и E-селектина считают отражением процессов активации эндотелия, что может рассматриваться как показатель для прогнозирования риска развития тромботических осложнений. В то же время другие исследователи рассматривают этот показатель как предвестник опасности геморрагий у пациентов, прошедших курс лечения антикоагулянтами непрямого действия [2, 37].

Нейтрализация активированного протеина С осуществляется несколькими ингибиторами, которые содержатся в плазме крови: ингибитор протеина С, α_1 -антитрипсин, α_2 -макроглобулин, α_2 -антиплазмин (α_1 -антитрипсин является ингибитором тромбина, факторов IXa, XIa, XIIa, плазмина; С₁-инактиватор описан как ингибитор плазмина, калликреина и факторов XIIa, XIa) [32, 33].

Врожденная недостаточность протеина С является одной из причин тромбоэмболии. По концентрации антигена и активности протеина С классифицируют два типа нарушения системы протеина С. Для первого типа характерно уменьшение в плазме крови уровня антигена и активности протеина С, для второго — нормальный уровень антигена, но сниженная активность протеина С. Бóльшая часть выявленных больных были гетерозиготными.

Помимо врожденной недостаточности самого профермента причиной тромбофилии является также резистентность к активированному протеину С фактора V α (РАПС), которая вызвана точечной мутацией гена, кодирующего этот фактор. Мутация приводит к замене остатка Arg₅₀₆ фактора V α глутамином, что препятствует нормальной деградации фактора V α , стабилизирует протромбиназный комплекс и увеличивает скорость образования тромбина. РАПС обнаружена у 40 % пациентов, страдающих тромбозами [34, 35].

Среди причин приобретенной недостаточности протеина С (поражение печени, острая лейкемия, послеоперационный период, выработка антифос-

фолипидных антител, развитие ДВС-синдрома) прежде всего необходимо отметить применение антикоагулянтов непрямого действия. Причина возникающей при этом тромбофилии заключается в том, что из-за короткого периода полужизни протеина С (6–7 ч) его концентрация снижается раньше, чем других витамин К-зависимых факторов свертывания крови [2].

Протеин S — витамин К-зависимый неферментативный гликопротеин, участвующий в регуляции процесса свертывания крови в качестве кофактора при деградации активированным протеином С факторов Va и VIIIa. Все функциональные свойства протеина S проявляются только при взаимодействии с отрицательно заряженной фосфолипидной мембраной.

Протеин S синтезируется гепатоцитами, эндотелиальными клетками и мегакариоцитами, его содержание в крови — 300 нМ (в свободной форме около 30 % и обратимо связанного с регуляторным компонентом пути комплемента — С4В-связывающим белком — 70 %). Антикоагулянтные свойства протеина S проявляет только свободная фракция этого белка. В небольших количествах протеин S присутствует также в тромбоцитах.

Молекула протеина S состоит из одной полипептидной цепи, содержащей 635 аминокислотных остатков, образующих сложную структуру целого ряда доменов. Gla-домен образован 37 аминокислотными остатками N-концевой части молекулы и содержит 11 остатков γ -карбоксиглутаминовой кислоты (см. рис. 2.4). Далее между Gla-доменом и четырьмя EGF-подобными доменами расположен тромбинчувствительный домен, в котором тромбин расщепляет две полипептидные связи — Arg₄₉—Ser₅₀ и Arg₇₀—Ser₇₁. В присутствии ионов кальция эти пептидные связи резистентны к действию тромбина. Протеин S может расщепляться эластазой в тромбинчувствительном домене, что сопровождается снижением его кофакторной активности [39, 40].

C-концевой участок молекулы протеина S не имеет аналогов среди других витамин К-зависимых факторов свертывания крови, но гомологичен участкам андрогенсвязывающих белков. Именно эта часть молекулы протеина S обеспечивает соединение белка с С4В-связывающим белком комплемента. Установлено также, что место связывания протеина S с фактором Va находится в C-концевой части молекулы (Arg₆₂₁—Ser₆₃₅) [15, 18].

Анализ особенностей структуры Gla-домена протеина S показал его большое сходство со структурой аналогичного домена протромбина, что дает основание предполагать взаимодействие протеина S с отрицательно заряженной фосфолипидной мембраной. Подтверждением этому служат данные о том, что протеолитически отщепленный Gla-домен протеина S способен связываться с фосфолипидными везикулами.

Молекулярная основа врожденной недостаточности протеина S чрезвычайно гетерогенна, с большим спектром мутаций. Частота аутомной доминантной недостаточности протеина С составляет 1:20 000. Различают три типа недостаточности: I — нормальное содержание общего антигена со сниженным содержанием свободной формы и кофакторной активностью; II — сниженное содержание антигена всех форм протеина S и кофакторной активности; III — нормальный уровень антигена всех фракций протеина S и сниженная кофакторная активность.

Синтез протеина S подавляется антагонистами витамина K. В некоторых случаях наблюдается снижение уровня протеина S при беременности, однако опасность возникновения тромбозов при этом не выявлено [2, 41—43].

2.1.2. Белки контактной фазы

Плазменный прекалликреин (фактор Флетчера) представляет собой профермент сериновой протеиназы калликреина (КФ 3.4.21.34). Молекулярная масса его 85 кДа, полипептидная цепь содержит 619 аминокислотных остатков. 371 аминокислотный остаток N-концевой части прекалликреина формирует четыре повторяющихся так называемых яблоковидных домена (A1—A4). Каждый A-домен состоит из 90—91 аминокислотного остатка, гомологичных таковым в факторе XI. 248 аминокислотных остатков C-концевой части молекулы формируют каталитический домен C. Каталитическая триада домена C состоит из His_{415} , Ser_{559} , Asp_{464} [44].

Концентрация его в плазме крови составляет 300—580 нМ. 75 % прекалликреина циркулирует в крови в виде нековалентного эквимолярного комплекса с высокомолекулярным кининогеном (ВМК). Участки связывания компонентов комплекса расположены в доменах прекалликреина A1—A4 [45].

Активация прекалликреина происходит при контакте крови с чужеродной поверхностью, на которой сорбируется не только комплекс прекалликреина с высокомолекулярным кининогеном, но и факторы свертывания крови XI и XII.

Это ведет к контактной активации фактора XII и превращению его в фактор XIIa, который расщепляет полипептидную связь Arg_{371} — Ile_{372} прекалликреина с образованием двух полипептидных цепей, соединенных дисульфидной связью, молекулярными массами 52 и 33 кДа (Cys_{364} — Cys_{484}). Для активации прекалликреина не требуется присутствия ионов кальция. Установлен реципрокный механизм активации фактора XII и прекалликреина XIIa [44, 46]. Сорбированный фактор XII претерпевает изменение конформации, что способствует его более эффективной активации калликреином. Реципрокная активация — положительная обратная связь, служит для быстрой взаимной активации белков контактной системы свертывания. При активации фактора XII возможен и процесс автокатализа, однако эффективность его в 2000 раз ниже. Важную роль реципрокной активации в процессе активации белков контактной фазы отчетливо подтверждает замедление свертывания крови при контакте с чужеродной поверхностью у лиц с дефицитом прекалликреина и ВМК.

Автокатализ калликреина приводит к образованию β -калликреина, что сопровождается расщеплением тяжелой цепи на два фрагмента (33 и 20 кДа). Такая форма калликреина медленнее расщепляет высокомолекулярный кининоген и лишена способности активировать нейтрофилы и индуцировать секрецию ими эластазы.

Главными белковыми субстратами калликреина является высокомолекулярный кининоген, фактор XII и проурокиназа.

В настоящее время представления о физиологической роли контактной системы плазмы крови существенно изменились. Установлено, что контактная система инициирует активацию не только системы свертывания, но и других протеолитических систем плазмы крови: калликреин-кининовой, фибринолитической (стимулирует активацию плазминогена и проурокиназы), системы комплемента и ренин-ангиотензиновой системы. Калликреин, образовавшийся в результате активации прекалликреина, обладает широким спектром биорегулирующих функций. Гидролизуя две пептидные связи в молекуле ВМК, он освобождает брадикинин, который, в свою очередь, контролирует множество физиологических и патогенетических процессов, включая регуляцию функций эндотелиальных клеток [46].

Врожденная недостаточность прекалликреина (болезнь Флетчера) представляет собой редкое аутосомно-рецессивно передающееся расстройство. В плазме крови гомозигот содержится менее 1 % активности прекалликреина, а гетерозигот от 20 до 60 %. Недостаточность прекалликреина не сопровождается геморагиями.

Высокомолекулярный кининоген (ВМК) (фактор Фицджеральда—Фложе) является предшественником вазоактивных пептидов — кининов. ВМК связанный с поверхностью эндотелиальных клеток, служит рецептором для прекалликреина и фактора XI. Взаимодействуя с гидрофильной и анионной поверхностями, он проявляет прокоагулянтную активность и принимает участие в формировании комплекса белков контактной фазы, в процессах активации плазменных протеолитических систем как неэнзиматический кофактор.

Кининогены синтезируются в основном гепатоцитами и перед секретированием в кровотоки подвергаются посттрансляционному гликозилированию. В крови ВМК обнаруживается в концентрации 670 нМ.

Молекула высокомолекулярного кининогена состоит из одной полипептидной цепи молекулярной массой 120 кДа и содержит 626 аминокислотных остатков. Дисульфидная связь (Cys₁₀—Cys₅₉₆) соединяет оба конца полипептидной цепи ВМК. Особенности доменной структуры ВМК определяют роль этого мультифункционального белка в регуляции функций ряда белков плазмы крови и ряда клеток. ВМК участвует в активации контактной фазы плазменного протеолиза; контролирует адгезию и активацию тромбоцитов, полиморфно-ядерных лейкоцитов, эндотелиоцитов; подавляет активность цистеиновых протеиназ, препятствуя деградации плазменных белков при повреждении тканей; участвует в регуляции артериального давления; модулирует воспалительные и антитромботические реакции; создает важную регуляторную систему во взаимодействии плазменных белков с клетками крови и клетками сосудистой стенки.

Электронно-микроскопические исследования показали, что молекула ВМК состоит из шести доменов [47]. Первый N-концевой домен D1 имеет низкоаффинный центр связывания ионов кальция. Домен D2 обладает уникальной способностью ингибировать активируемую кальцием нейтральную клеточную протеиназу кальпаин (КФ 3.4.22.17). Домены D2 и D3 содержат высококонсервативный пептид Gln-Val-Val-Ala-Gly, который является функциональным ингибитором цистеиновых протеиназ, таких как папаин, катепсины В и Н. Домен D4 включает в себя нанопептид брадикинин

(Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg), играющий важную роль в регуляции баланса воды и электролитов, сокращении гладких мышц, вазодилатации и проницаемости капилляров (рис. 2.5). Домен D5 содержит участки связывания с отрицательно заряженными поверхностями, домен D6 — участки связывания с прекалликреином и фактором XI. Комплементарные им участки на молекулах прекалликреина и фактора XI представлены β -складчатыми структурами, содержащими 31 аминокислотный остаток [45]. Именно эти два последних домена обеспечивают способность ВМК участвовать в процессе свертывания крови. Четыре первых домена входят в состав низкомолекулярного кининогена, который отличается от ВМК своим последним доменом D5.

ВМК расщепляется несколькими протеиназами: калликреином, фактором XIa, плазмином, нейтрофильной эластазой. Калликреин расщепляет полипептидные связи $\text{Lys}_{362}\text{—Arg}_{363}$ $\text{Arg}_{371}\text{—Ser}_{372}$, в результате чего высвобождается брадикинин. Лишенный кинина ВМК состоит из тяжелой (молекулярная масса 65 кДа) и легкой (молекулярная масса 45 кДа) полипептидных цепей, соединенных между собой одной дисульфидной связью.

Фактор XIa расщепляет в ВМК три полипептидные связи: $\text{Arg}_{409}\text{—Arg}_{410}$, $\text{Lys}_{502}\text{—Thr}_{503}$, $\text{Lys}_{325}\text{—Lys}_{326}$, вследствие чего повреждается сайт связывания с чужеродными поверхностями. Возможно, таким образом регулируется система контактной активации свертывания крови.

ВМК обратимо связывается с тромбоцитами, нейтрофилами, эндотелиальными клетками участками, расположенными в тяжелой цепи D3 и легкой цепи D5. Этот процесс влияет на функцию клеток. Так, ВМК, связанный с мембраной эндотелиальных клеток, блокирует взаимодействие тромбина, индуцирует образование простаглицина. При контакте ВМК с эндотелиоцитами увеличивается скорость высвобождения брадикинина, который, в свою очередь, стимулирует образование NO и простаглицина, оказывающих антитромботическое действие, и вазодилатацию.

Взаимодействие ВМК с тромбоцитами через тромбоспондин снижает активность тромбоцитарного кальпаина, связывания тромбина и тем самым подавляет агрегацию тромбоцитов, стимулируемую тромбином. При соединении с полиморфноядерными лейкоцитами ВМК действует как антиадгезивная молекула, что объясняется вытеснением фибриногена, связанного с интегринами α , $\beta 2$ и Mac-1. Кроме того, ВМК необходим при стимуляции активности полиморфноядерных лейкоцитов калликреином. ВМК способствует увеличению продукции свободных радикалов кислорода, дегрануляции полиморфно-ядерных лейкоцитов и высвобождению гранулоцитарной эластазы и лактоферрина [2, 45, 48]. По влиянию на фактор XII прекалликреин ВМК относят к антитромботическим молекулам.

Фактор XII (фактор Хагемана) — гликопротеин молекулярной массой 80 кДа, циркулирующий в крови в концентрации 375 нМ в виде профермента активной протеиназы фактора XIIa (КФ 3.4.21.38). Синтезируется гепатоцитами.

Полипептидная цепь фактора XII состоит из 596 аминокислотных остатков. 16,8 % массы молекулы составляют углеводы. Молекула фактора XII

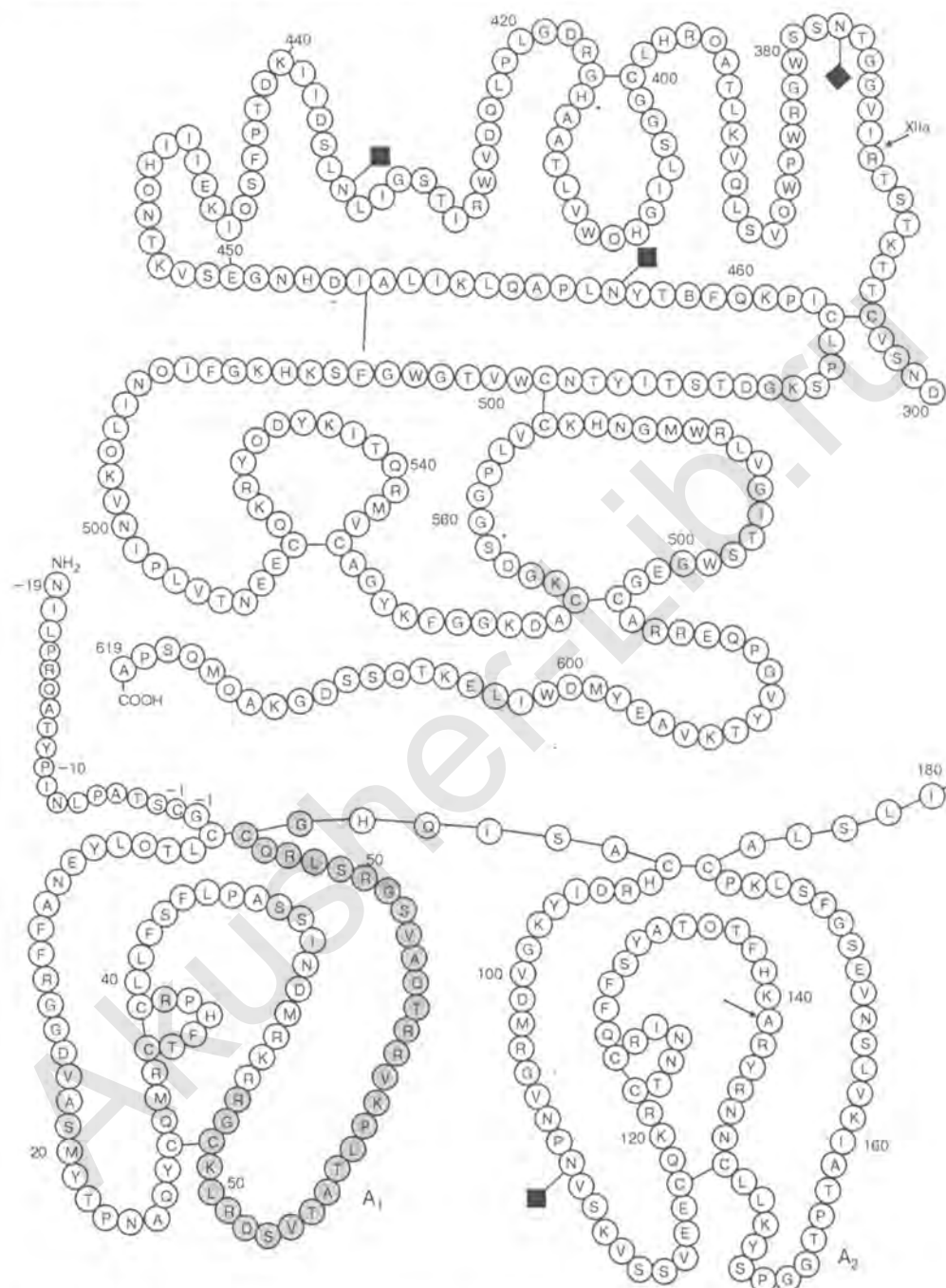
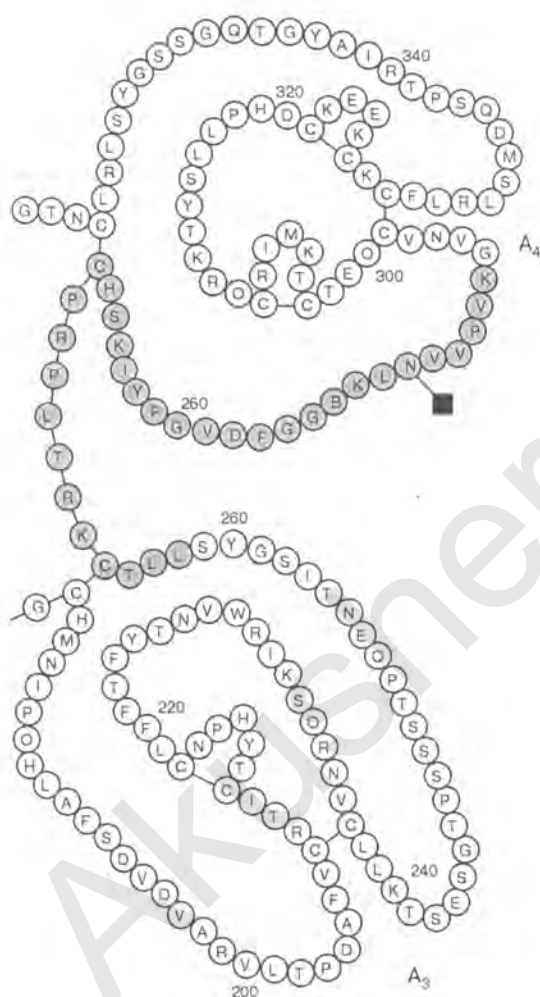


РИС. 2.5. Первичная и доменная структуры прекалликреина плазмы крови человека. Четыре A_2 , A_3 и A_4 . Стрелкой указана связь, расщепляемая активной формой фактора XII (XIIa) (при каталитической триада, характерная для сериновых протеиназ (His₄₁₅, Asp₄₆₄ и Ser₅₃₉)-отмеченные звездочками, связаны с углеводными цепями, затемненные участки в доменах



ре “яблоковидных” домена обозначены как A_1 , активации прекалликреина, звездочками отмечены остатки аспарагинов (108, 289, 377, 434 и 475), A_1 и A_4 — места связывания ВМК [146]

включает пять дискретных доменов, которые расположены следующим образом: на N-конце находится фибронектиновый домен II типа, затем первый домен, подобный эпидермальному фактору роста (EGF-домен), фибронектиновый домен I типа, второй EGF-подобный домен, крингловый домен. В C-концевой части молекулы расположен каталитический домен сериновой протеиназы (рис. 2.1) [2, 18, 49].

Для активации фактора XII присутствие ионов кальция не обязательно. При активации фактора XII происходит расщепление пептидной связи Arg_{353} — Ser_{354} , в результате чего возникает двухцепочечная форма фермента α XIIa, которая состоит из тяжелой (52 кДа) и легкой (28 кДа) полипептидных цепей, соединенных дисульфидной связью. Легкая цепь содержит каталитический домен. Тяжелая цепь, в состав которой входит N-концевая часть молекулы фактора XII, имеет участок связывания с инородной поверхностью и с фибронектиновым доменом II типа. β -Форма фактора XIIa, потерявшего в результате протеолитического расщепления значительную часть тяжелой цепи, имеет меньшее сродство к отрицательно заряженной поверхности и теряет способность активировать фактор XI, связанный с отрицательно заряженной поверхностью.

Врожденная недостаточность фактора XII у человека передается аутосомно-рецессивным способом. У гомозигот фактор практически не определяется (менее

1 %), а у гетерозигот выявляется от 20 до 60 % активности этого фактора. Приобретенная недостаточность фактора XII наблюдается при воспалительных процессах инфекционной природы. Выдвинута гипотеза, согласно которой снижение активности фактора XII является следствием подавления его синтеза под действием интерлейкина-6.

Субстраты фактора XIIa в плазме крови — прекаликреин, факторы XI, VII, плазминоген [49, 50]. Фактор XII синтезируется гепатоцитами.

Фактор XI — гликопротеин, циркулирующий в крови в концентрации 30 нМ. Активированная форма фактора XIa (КФ 3.4.21.27) участвует не в инициации, а в поддержании процесса свертывания крови. Профермент циркулирует в крови в комплексе с высокомолекулярным кининогеном.

По химической природе фактор XI представляет собой гомодимер, состоящий из двух полипептидных цепей молекулярной массой 160 кДа, состоящих из 608 аминокислотных остатков. Углеводы составляют около 5 % массы молекулы. Цепи соединены одной дисульфидной связью и содержат 35 остатков полуцистина, которые вовлечены в образование дисульфидных связей. Выявлено пять участков потенциального гликозилирования (рис. 2.1).

В N-концевой части молекулы фактора XI расположены четыре повторяющихся так называемых яблоковидных домена (A1—A4) и каталитический домен (C). Каждый A домен состоит из 90—91 аминокислотного остатка, гомологичных таковым в прекаликреине. Домен C содержит 238 аминокислотных остатков. Каталитическая триада домена C состоит из His₄₁₃, Ser₅₅₇, Asp₅₅₁ [2, 18, 51].

Активация фактора XI происходит при участии тромбина и комплекса, состоящего из фактора XIIa, калликреина и высокомолекулярного кининогена [46, 51]. В процессе активации фактора XI происходит расщепление пептидной связи Arg₃₆₉—Ser₃₇₀ в каждой полипептидной цепи гомодимера с образованием активного фермента. Фактор XIa состоит из двух идентичных субъединиц, состоящих из тяжелой (молекулярная масса 50 кДа) и легкой (молекулярная масса 30 кДа) полипептидных цепей. Субъединицы соединены одной дисульфидной связью, а тяжелая и легкая цепи — тремя. В отличие от других факторов системы свертывания крови фактор XIa содержит два активных центра. Подобно другим факторам систем свертывания крови и фибринолиза тяжелая цепь фактора выполняет регуляторную роль в проявлении ферментативной активности, определяет субстратную специфичность и влияет на каталитическую эффективность фактора XIa при взаимодействии с субстратом, фактором IX и кофактором — ВМК.

Функция фактора XIa заключается в активации фактора IX путем ограниченного протеолиза. Врожденная недостаточность фактора XI (гемофилия C) — редкое заболевание (до 7 % случаев больных гемофилией). В отличие от гемофилии A и B наследование носит аутосомно-рецессивный характер. Клиническое проявление значительно слабее по сравнению с другими формами гемофилии. Заболевание обычно проявляется в виде посттравматических и постоперационных кровотечений [52]. У гетерозигот риск постоперационных кровотечений обнаруживается редко [2, 18].

2.1.3. Белковые кофакторы

Фактор V — гликопротеин молекулярной массой 330 кДа, циркулирующий в крови в концентрации 20 нМ (в крови находится до 75 % фактора V, в тромбоцитах — 18—25 %). Молекула имеет асимметричную палочкообразную форму (соотношение осей 25:1) и состоит из одной полипептидной цепи из доменов A1-A2-B-A3-C1-C2 (рис. 2.6). 14 остатков цистеина образуют внутримолекулярные дисульфидные связи, а четыре — содержат свободные сульфгидрильные группы. Обнаружено две формы фактора V, которые различаются по степени гликозилирования С-концевого домена C2, что определяет их сродство к фосфолипидам мембраны тромбоцитов [1, 2, 18].

Активация фактора V происходит при расщеплении тромбином трех пептидных связей: Arg₇₀₉—Ser₇₁₀, Arg₁₀₁₈—Thr₁₀₁₉, Arg₁₅₄₅—Ser₁₅₄₆, что сопровождается образованием гетеродимера, состоящего из двух цепей (тяжелой — 105 кДа и легкой — 74 кДа) [53, 54]. Обе субъединицы нековалентно связаны ионами кальция. Тяжелая цепь содержит N-концевой участок прокофактора и образует два А-домена (аминокислотные остатки 1—303 и 317—656). С-концевой участок молекулы фактора V образует один А-домен (аминокислотные остатки 1546—1877) и два С-домена (аминокислотные остатки 1878—2036 и 2037—2196). Наиболее крупный гликозилированный домен В (аминокислотные остатки 710—1545) для проявления кофакторной активности фактора Va не требуется и отделяется при активации. Из яда гадюки Рассела выделен фермент-активатор фактора V, который, в отличие от тромбина, расщепляет связи Arg₁₅₄₅—Ser₁₅₄₆ и Arg₁₀₁₈—Ser₁₀₂₀, что приводит к образованию тяжелой цепи молекулярной массой 230 кДа, содержащей домены A1, A2 и B. Это свидетельствует о том, что для проявления гемокоагулирующего действия фактора Va отделение домена В не обязательно. Фактор V может также активироваться фактором Ха, но при этом расщепляются связи Arg₇₀₉—Ser₇₁₀ и Arg₁₀₁₈—Ser₁₀₁₉.

В молекуле сульфированы остатки тирозина 665, 696, 698, 1494, 1510, 1515, 1565. Установлено, что сульфирование фактора V важно для процесса активации прокофактора тромбином и взаимодействие фактора Va с компонентами протромбиназного комплекса.

Фактор Va неспособен активировать протромбин, но в процессе свертывания крови он выполняет существенную кофакторную роль при активации протромбина под действием фактора Ха.

Фактор VIII (антигемофильный фактор А) — гликопротеин молекулярной массой 330 кДа, циркулирующий в крови человека в концентрации 0,7 нМ в виде нековалентного комплекса с фактором фон Виллебранда. Период полужизни фактора VIII, находящегося в комплексе, составляет 7—12 ч. Фактор фон Виллебранда выполняет роль белкового носителя, предохраняющего фактор VIII *in vivo* от протеолитической деградаци.

Молекулы фактора VIII представляют собой варьированные по длине тяжелые цепи, образующие A1-A2-B-домена, нековалентно связанные с легкими полипептидными цепями, состоящими из A3-C1-C2-доменов. Предполагается, что в объединении этих полипептидных цепей участвуют двухва-

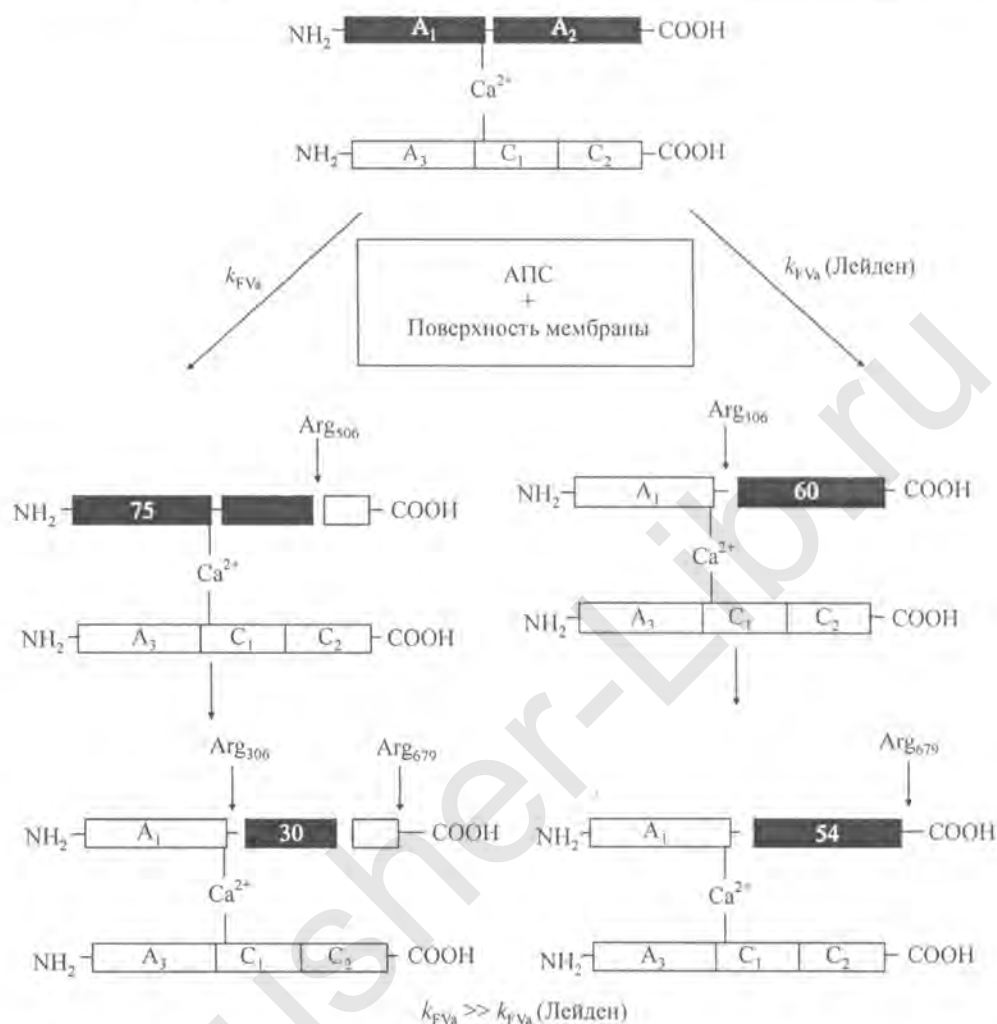


Рис. 2.6. Схема инактивации фактора Va и Va (Лейден) активированным протеином С. Расщепление по Arg₅₀₆ — необходимое условие для экспонирования участков расщепления Arg₃₀₆ и Arg₆₇₉. При отсутствии расщепления по Arg₅₀₆ фактора Va (Лейден) скорость инактивации значительно снижается [18]

лентные ионы, в частности Ca²⁺. В состав фактора входит 19 цистеиновых остатков, 16 из которых образуют дисульфидные связи.

Фактор VIII претерпевает посттрансляционные модификации, в результате которых остатки тирозина 346, 718, 719, 723, 1664 сульфированы. Установлено, что остатки тирозина 346 и 1664 играют важную роль в процессе активации протромбина, а 718, 719, 723 — важны для оптимизации взаимодействия фактора VIIIa с компонентами теназы внутреннего пути активации системы свертывания крови. Остаток тирозина 1680 выполняет определенную функцию при взаимодействии фактора VIII с фактором фон Виллебранда. Эти данные подтверждают, что сульфирование аминокислотных остат-

ков фактора VIII дифференциально влияет на кофакторную и функциональную активность фактора VIIIa.

Активация фактора VIII под действием тромбина осуществляется в две стадии: на первой происходит расщепление пептидных связей Arg₇₄₀ и Arg₁₆₈₉, что сопровождается пятикратным увеличением кофакторной активности, на второй — полная активация фактора VIII обеспечивается расщеплением пептидной связи Arg₃₇₂. Расщепление пептидной связи Arg₁₆₈₉ на первой стадии активации приводит к высвобождению из комплекса фактора фон Виллебранда. Фактор VIIIa состоит из фрагментов молекулярной массой 50 (A1-домен), 40 (A2-домен) и 74 кДа (A3C1C2-домен). Эти три субъединицы нековалентно связаны двухвалентными ионами металлов.

Вместе с фосфолипидами и ионами кальция фактор VIII выполняет кофакторную функцию при активации фактора X под действием фактора IXa. Он присутствует в плазме крови в форме нековалентного комплекса с фактором фон Виллебранда, его коагуляционная функция состоит в ускорении преобразования фактора X в активную форму под действием фактора IXa. При снижении содержания или отсутствии факторов VIII и IX наблюдаются гемофилический синдром, классические гемофилии A и гемофилии B, которые характеризуются геморрагическим состоянием [1, 2, 18, 55—57].

Фактор фон Виллебранда принадлежит к семейству адгезивных белков и представляет собой гетерогенную популяцию гликопротеиновых мультимеров, регулирующих прилипание тромбоцитов к поврежденным тканям сосудов. Наряду с этим фактор фон Виллебранда действует как белок-носитель, защищающий фактор VIII от протеолиза *in vivo*. Он присутствует в плазме крови, тромбоцитах и субэндотелии.

Концентрация фактора фон Виллебранда в крови составляет 7 мкг/мл. Фактор фон Виллебранда синтезируется в виде предшественника молекулярной массой 275 кДа, который состоит из сигнального пептида, пропептида и структурной субъединицы. Предшественник димеризуется в эндоплазматическом ретикулуме за счет образования дисульфидных связей в С-концевой части структурной субъединицы. Там же происходит N-гликозилирование. Затем посредством образования второго набора межцепочечных дисульфидных мостиков происходит мультимеризация. Наиболее крупные мультимеры хранятся в специфических для большинства эндотелиальных клеток удлинённых органеллах, называемых тельцами Вейбеля-Паладе. В местах повреждения сосуда или воспаления такие физиологические агенты, как тромбин, фибрин или гистамин, могут вызвать выделение этих крупных биологически активных мультимеров фактора фон Виллебранда из телец Вейбеля-Паладе в кровь или субэндотелий. Гомоцистеин нарушает процессинг и секрецию путем подавления транспорта из эндоплазматического ретикулума [58].

Первый домен N-концевого участка зрелой молекулы фактора фон Виллебранда, состоящий из 272 аминокислотных остатков, стабилизирует фактор VIII, связываясь с его легкой цепью. Каждая субъединица мультимерного фактора фон Виллебранда может присоединить гетеродимерную молекулу фактора VIII, однако *in vivo* большинство мест связывания остается свободным, поскольку молярная концентрация последнего значительно меньше. Насыщение составляет 1—8 %.

2.1.4. Фибриноген и другие белки

Фактор I системы свертывания крови — фибриноген — мультидоменный гликопротеин с молекулярной массой 340 кДа, которая определена методами диффузии, седиментации и светорассеяния. По своим свойствам фибриноген классифицируется как эглобулин, в связи с тем что он растворим только в слабых солевых растворах, выпадает в осадок при снижении ионной силы раствора и высаливается при ее повышении.

В системе свертывания крови фибриноген занимает особое место, поскольку является единственным белком, который под действием тромбина превращается в фибрин с последующим образованием волокон фибрина, создающих основу сгустка, предотвращающего кровопотерю. Таким образом, весь каскад системы свертывания крови направлен на активацию протромбина в тромбин и превращение фибриногена в фибрин.

Фибриногену присущи важные функции в физиологических и патологических процессах: репаративных, воспалительных, метастазировании. Его концентрация экспоненциально коррелирует с вязкостью крови, определяет процесс агрегации тромбоцитов, эритроцитов и влияет на адгезию лейкоцитов. Фибриноген ускоряет активацию фактора XIII системы свертывания крови и взаимодействует с рядом белков: фибронектином, тромбоспондином, коллагеном (тип IV), фактором фон Виллебранда, α_2 -антиплазмином.

В крови человека содержание фибриногена составляет 2,0—3,0 г/л. При патологических состояниях концентрация фибриногена находится в пределах 1,0—10 г/л. Биологический период полужизни фибриногена человека составляет 3—5 сут.

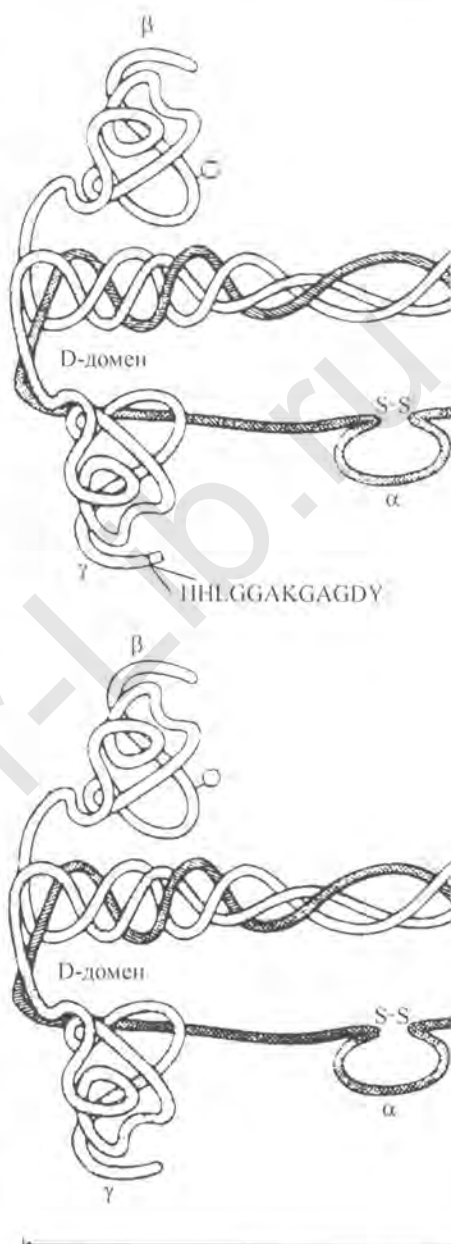
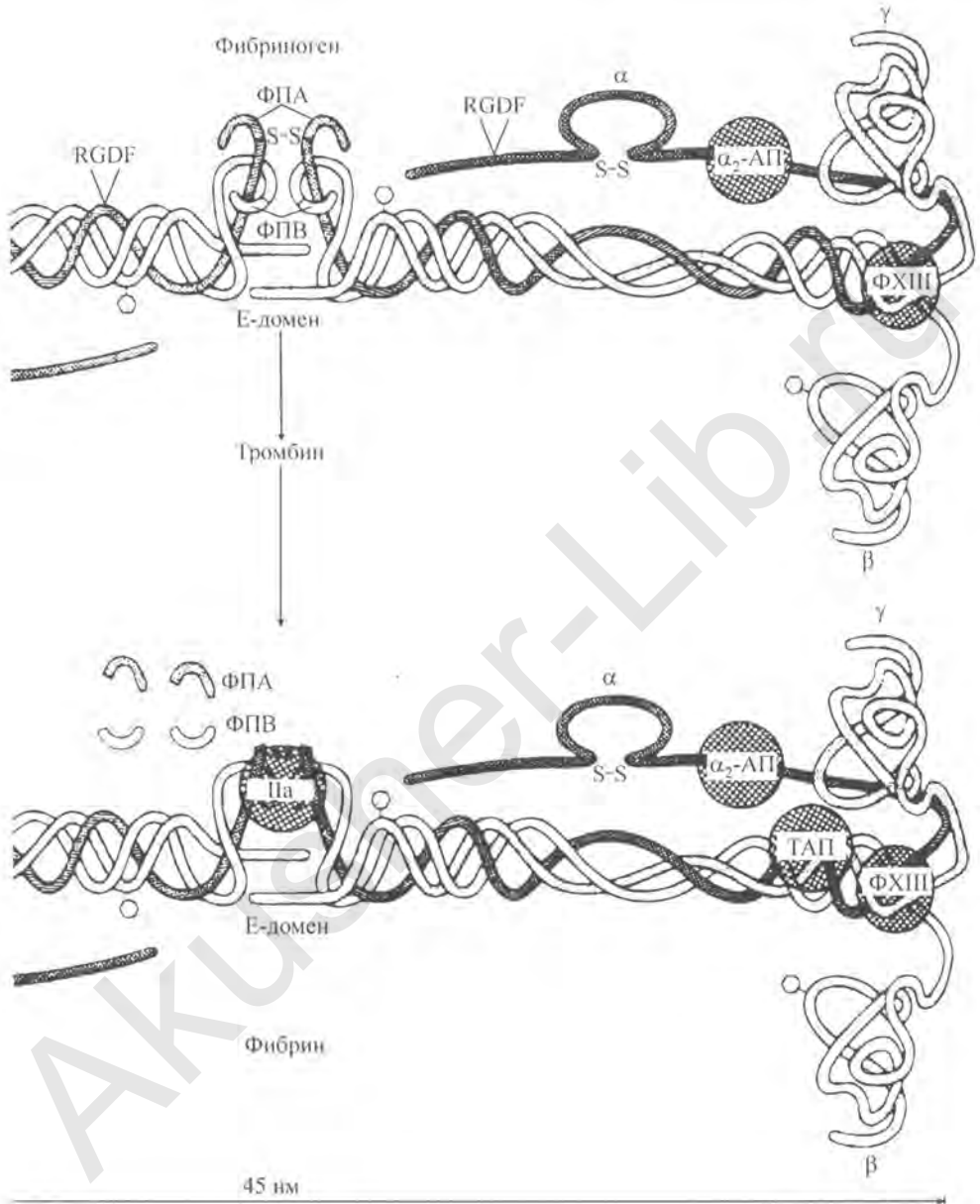


Рис. 2.7. Структура фибриногена и его



превращение в фибрин

Молекула фибриногена состоит из двух одинаковых субъединиц, каждая субъединица — из трех полипептидных цепей: $A\alpha$ (67 кДа), $B\beta$ (54 кДа), γ (48 кДа). Таким образом, молекулу фибриногена можно представить формулой $(A\alpha B\beta \gamma)_2$ (рис. 2.7).

Исследование аминокислотной последовательности трех цепей фибриногена прямым секвенированием полипептидных цепей показало, что $A\alpha$, $B\beta$ - и γ -цепи фибриногена человека содержат 610, 461 и 411 аминокислотных остатков. Последовательность аминокислот в цепях фибриногена была также определена по расшифрованной структуре кДНК, кодирующей отдельные цепи. Результаты обоих исследований совпадают. Сравнение аминокислотной последовательности трех полипептидных цепей фибриногена показало высокую степень гомологии, что позволило предположить их образование от общего предшественника путем дупликации генов. Степень гомологии между $B\beta$ - и γ -цепями фибриногена человека составляет 30 %, в то время как $A\alpha$ -цепь гомологична γ - или $B\beta$ -цепи на 10 %, имея более высокие степени гомологии на отдельных участках [59—61].

Углеводная часть молекулы фибриногена составляет около 3,5 % общей ее массы. Известно, что в каждой субъединице фибриногена человека гликозилированы Asn_{364} $B\beta$ -цепи и Asn_{52} γ -цепи. Показано, что углеводы являются олигосахаридами с концевыми сиаловыми кислотами.

Субъединицы фибриногена соединяются дисульфидными связями между симметричными аминокислотными остатками $A\alpha$ Cys_{28} , γ Cys_8 и γ Cys_9 в N-концевых участках $A\alpha$ -, γ -цепей и $2(A\alpha$ Cys_{36} — $B\beta$ $Cys_{65})$. Дисульфидные связи соединяют N-концевые участки γ -цепей в антипараллельной ориентации. Показано, что дисульфидные связи между субъединицами имеют высокую стабильность и не принимают участия в реакциях дисульфидного обмена [62, 63]. Все цистеиновые остатки в молекуле фибриногена принимают участие в создании 29 дисульфидных связей. В каждой субъединице шесть дисульфидных связей образуют два дисульфидных кольца K1 и K2, расположенных на расстоянии 111 аминокислотных остатков в $A\alpha$ - и $B\beta$ -цепях и 112 аминокислотных остатков — в γ -цепи. Участки полипептидных цепей между дисульфидными кольцами имеют суперспиральную структуру, что способствует поддержанию жесткой конформации, являющейся уникальной особенностью молекулы фибриногена [62, 64]. Между дисульфидными кольцами расположен лабильный участок ($A\alpha$ 96—119; $B\beta$ 127—150 и γ 70—93), который не имеет вторичной структуры и содержит связи, доступные ферментативному расщеплению.

Физико-химические свойства и пространственная организация молекулы фибриногена обусловлены его структурными особенностями. Изоэлектрическая точка белка находится в зоне рН 5,5. Тепловая денатурация фибриногена при нейтральном рН происходит при температуре 50—53 °С. Смещение рН среды в кислую или щелочную зону снижает температуру денатурации [65].

Для определения пространственного строения молекулы фибриногена использован целый ряд современных физико-химических методов: гидродинамические исследования, спектрофотометрия, сканирующая микрокалориметрия, круговой дихроизм, компьютерное моделирование вторичной структуры. Эти подходы дали возможность получить информацию о размере и форме молекулы в растворе при условиях, близких к физиологическим. Исследование растворов фибриногена методом малоуглового рассеяния

нейтронов показало, что молекулы фибриногена имеют бананообразную форму с аксиальным соотношением $p = a/b = 3,1$ ($a = 140 \text{ \AA}$; $b = 45 \text{ \AA}$), объем гидратированной молекулы ($3,7 \cdot 10^5 \text{ \AA}^3$). Эти данные совпадают с гидродинамическими параметрами фибриногена. Значительная вязкость растворов фибриногена может быть связана с высокой гидратацией молекулы или с сильной асимметрией молекулы, что подтверждено методом электронной микроскопии с использованием метода замораживания—скальвания [66, 67].

Для выяснения доменной организации молекулы фибриногена оказалось плодотворным использование методов электронной микроскопии, ограниченного протеолиза и сканирующей микрокалориметрии. Эти приемы позволили целенаправленно выделять фрагменты фибриногена, сохраняющие нативную конформацию, для изучения их пространственной структурной организации. Использование такого подхода дало возможность установить, что С-концевой D-домен состоит из пяти субдоменов, а центральный E-домен — из двух идентичных субдоменов (рис. 2.8). Показано также, что С-концевые фрагменты $\text{A}\alpha$ -цепей 240—610, которые предварительно рассматривались как неупорядоченные полипептидные цепи, имеют упорядоченную доменную область — αC -домен (368—585) и неупорядоченную — участок цепи 238—338 — коннектор; αC -домены в молекуле фибриногена взаимодействуют между собой и нековалентно соединяются с E-доменом [68—73].

Установлено, что фибриноген имеет три центра связывания Ca^{2+} высокой аффинности ($K_D \cdot 10^{-6}$) и несколько центров слабого связывания Ca^{2+} ($K_D \cdot 10^{-3}$) [74, 75].

Одной из основных функций фибриногена является его способность под действием тромбина превращаться в мономерный фибрин, который затем спонтанно полимеризуется и создает волокнистую сеть фибрина, служащую основой сгустка, предупреждающего кровопотерю.

Самосборка фибрина — строго упорядоченный процесс, отдельные этапы которого регламентированы каталитической активностью тромбина, обеспечивающего экспонирование центров полимеризации и образование определенных форм фибрина (фибрин дез-АА, протофибриллы, фибрин дез-ААВВ). Функциональные свойства каждой формы фибрина обусловлены последовательным включением новых доменов молекулы фибрина в построение фибринового сгустка (см. рис. 2.8).

Процесс самосборки фибрина разделяют на несколько этапов. На первом фибриноген превращается в фибрин-мономер, на втором — его молекулы спонтанно полимеризуются с образованием двунитчатых структур — протофибрилл, на третьем — протофибриллы путем латеральной ассоциации соединяются в фибриллы, которые и составляют трехмерную сетку [76—78].

Превращение фибриногена в мономерный фибрин происходит в результате ограниченного протеолитического действия тромбина, который отщепляет от NH_2 -концевых участков $\text{A}\alpha$ - и $\text{B}\beta$ -цепей фибриногена соответственно фибринопептиды А (16 аминокислотных остатков) и В (14 аминокис-

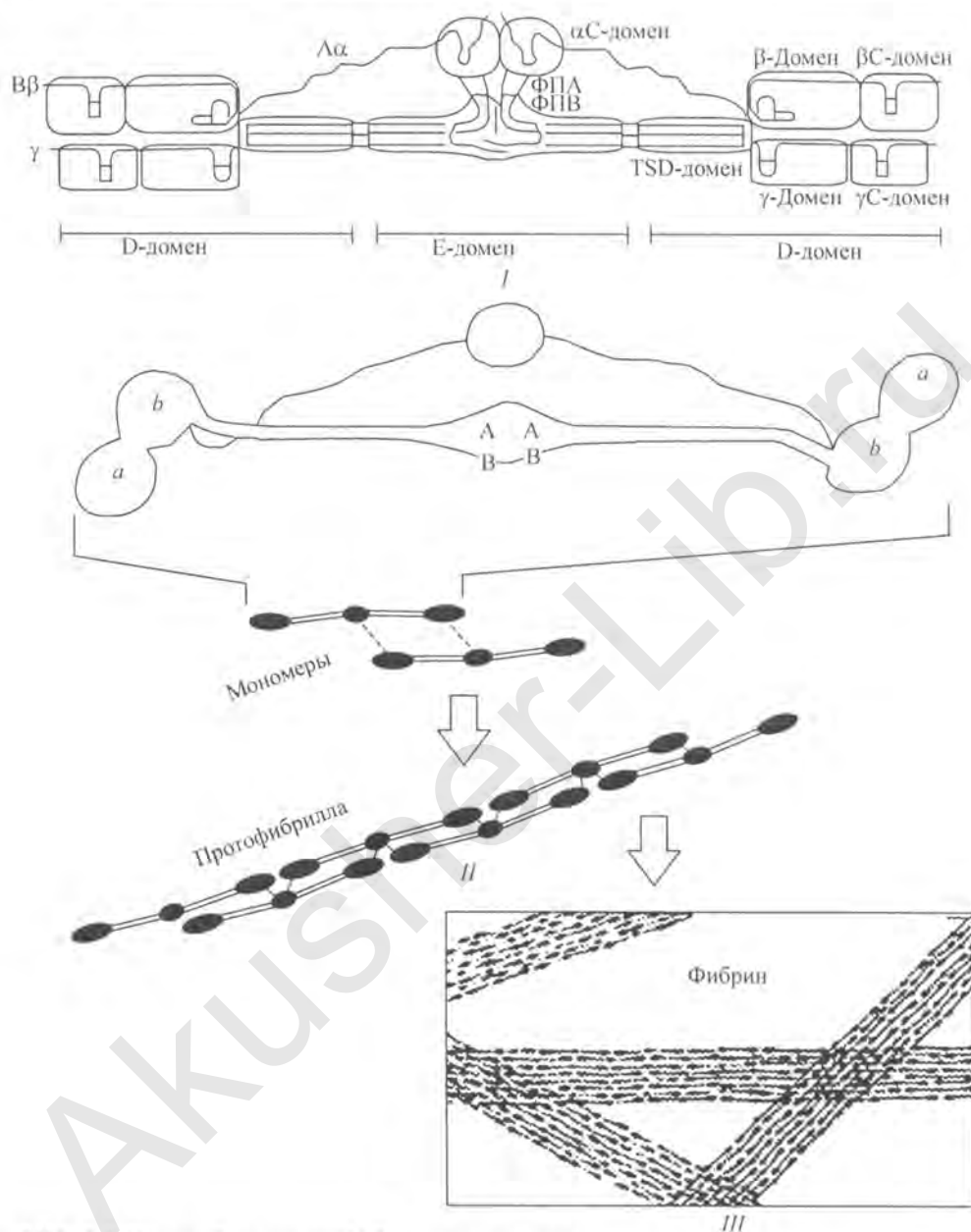


Рис. 2.8. Схема образования фибринового сгустка:

I — доменная организация молекулы фибриногена; II — расположение центров полимеризации a и b ; III — образование протофибрилл и волокон фибрина

лотных остатков). При этом в центральном домене E экспонируются специфические центры полимеризации E_A и E_B [79—81].

Основным механизмом полимеризации фибрина является нековалентное межмолекулярное взаимодействие специфических центров полимериза-

ции доменов E (E_A , E_B) и комплементарных им центров D-доменов (D_a , D_b) молекулы фибрина. Центры D_a и D_b не требуют предварительной активации и присутствуют в молекуле фибриногена. Наличие в молекуле мономерного фибрина специфических центров полимеризации обеспечивает самосборку фибрина [83—89].

Отщепление фибринопептидов A имеет кооперативный механизм: скорость отщепления первого фибринопептида A в 16 раз превышает скорость отщепления второго фибринопептида A [90, 91]. Обнаружено, что тромбин имеет большое сродство к $A\alpha$ -цепи, а методом ядерного магнитного резонанса уточнены аминокислотные остатки в N-концевом участке $A\alpha$ -цепи. (Asn_7 — Val_{15}), с которыми тромбин связывается локусом активного центра. Этот участок имеет шпилькоподобную структуру, благодаря чему аминокислоты $A\alpha$ -цепи Phe_8 , Leu_9 , Val_{15} образуют гидрофобный кластер, попадающий в соответствующий гидрофобный участок активного центра тромбина и связывающийся с аполярным сайтом тромбина. При этом происходит сближение Arg_{16} $A\alpha$ -цепи фибриногена и каталитической триады активного центра фермента, необходимого для гидролиза связи Arg_{16} — Gly_{17} [92].

Отщепление тромбином A пептидов, имеющих отрицательный заряд, не приводит к конформации фибрина дез-АА, но локально изменяет заряд E-домена и открывает N-концевые Gly - His - Arg - Pro -участки α -цепей. После этого начинается построение протофибрилл, структура которых состоит из параллельно расположенных молекул мономерного фибрина, перекрывающих друг друга наполовину. Образование протофибрилл происходит за счет нековалентного взаимодействия молекул мономерного фибрина по специфическим центрам полимеризации E_A — D_a .

Построение двунитчатой протофибриллы приводит к ускорению отщепления фибринопептидов B. Кинетические параметры отщепления фибринопептида A выше, чем фибринопептида B. Протофибриллы латерально ассоциируют в фибриллы, разветвляющиеся и образующие трехмерную сеть полимерного фибрина — сгусток (см. рис. 2.8).

Исследование локализации, структуры и функции центров полимеризации проведено с использованием коротких синтетических пептидов Gly - Pro - Arg и Gly - His - Arg , последовательность которых совпадает с последовательностью N-концевых участков α - и β -цепей фибрин-мономера. Показано, что пептид Gly - Pro - Arg является эффективным ингибитором полимеризации и связывается с D-фрагментом [79, 84]. Выявлено, что замещение одной аминокислоты в этом пептиде приводит к потере антиполимеризационных свойств фрагмента. В фибриногене Детройт подобное замещение $Arg \rightarrow Ser$ приводит к нарушению процесса полимеризации. Это свидетельствует о высокой степени консерватизма последовательности аминокислот на участке $A\alpha$ -цепи, примыкающему к фибринопептиду A.

Пептиды Gly - His - Arg не блокируют полимеризацию фибрина, но участок полипептидной цепи β 15—42 является эффективным ингибитором полимеризации. А.З. Буджинский предположил, что участок полипептидной цепи β 30—43 образует петлю в микродомене β 15—55, которая сближается с

участком β 15—17 и изменяет конформацию, вызванную отщеплением фибринопептида В. По мнению авторов, такая конформационная перестройка и взаимодействие с N-концевой последовательностью $A\alpha$ -цепи формирует второй центр полимеризации в молекуле фибрина [82—89, 93]. Позднее было показано, что моноклональное антитело к N-концевому участку α -цепи не связывается с эпитопом, находящимся в комплексе DD:E, в то время как моноклональное антитело к N-концевому участку β -цепи связывается с ним. Выявлено также, что для целостности комплекса важны N-концевые аминокислоты α -цепи и последовательность цепи β 40—55. Авторы рассматривают комплекс DD:E как модель фибринового сгустка и делают вывод, что β 40—54 поддерживает структуру комплекса, а β 15—19, возможно, функционирует как центр латеральной ассоциации. Таким образом, можно предположить, что В-центр полимеризации играет вспомогательную роль в процессе полимеризации — ускоряет латеральную ассоциацию и укрепляет полимеры фибрина. Показано, что процесс полимеризации фибриногена-325, у которого отсутствует участок 1—43 В β -цепи, замедлен в 180 раз по сравнению со скоростью полимеризации нормально-го фибриногена.

Проведение кристаллизации фрагментов фибриногена/фибрина и использование рекомбинантных модулей фибриногена позволило детально изучить функционирование центров полимеризации и их локализацию в доменах. Исследованием трехмерной кристаллической структуры С-концевого γ -модуля фибриногена установлено, что в формировании центра полимеризации D_a задействован участок γ -цепей 337—379, который связывает пептид Gly-Pro-Arg [94—96].

Если отщепление фибринопептидов А и образование связей E_A-D_a является пусковым механизмом процесса полимеризации фибрина, то роль взаимодействия центров E_B-D_b окончательно не выяснена. Отщепление фибринопептидов В — необязательное условие для инициации латеральной ассоциации протофибрилл. Показано, что под действием тромбиноподобных ферментов, которые отщепляют только фибринопептид А, образуются толстые фибриллы. Известно, что отщепление В-пептида приводит к стабилизации D-блоков, усиливает латеральные контакты протофибрилл, что сопровождается укреплением структуры протофибрилл, повышением разветвления волокон и увеличением эластичности геля. Информация о локализации и роли взаимодействия центров E_B-D_b в процессе самосборки фибрина может дать дополнительную информацию о механизме образования фибринового сгустка [97, 98].

Важное функциональное значение последовательности отщепления пептидов при свертывании фибриногена под действием тромбина может быть решающим для оптимизации самосборки фибрина, когда формируются толстые высокоупорядоченные фибриллы. Высказано предположение о том, что более позднее образование связи E_B-D_b является контрольным механизмом, предотвращающим внутрисосудистое свертывание крови.

Высокая степень гомологии С-концевых участков В β - и γ -цепей фибриногена позволила предположить, что D_b -центр полимеризации расположен

в С-концевой зоне В β -цепи исследованием влияния пептида Gly-His-Arg-Pro, меченного флуоресцентным зондом, на антиполимеризационные свойства фрагмента D, в котором отсутствует участок γ -цепи. Эта гипотеза подтверждена [79, 84].

Важная роль в процессе самосборки фибрина С-концевых участков α C-цепей [68—73] впервые отмечена В.А. Белицером, который показал, что α C-домены в молекуле фибриногена связаны между собой и с центральным E-доменом и отвечают за глобулярное состояние и высокую степень гидратации молекулы фибриногена [99]. После отщепления фибринопептидов A α C-домены диссоциируют и принимают участие в латеральной ассоциации протофибрилл, ускоряя этот процесс и образуя первичные контакты между молекулами фибрина и протофибриллами. О наличии в α C-доменах центров межмолекулярной связи, принимающих участие в латеральной ассоциации протофибрилл, свидетельствуют также данные, полученные при изучении процесса полимеризации аномального фибриногена, в котором нарушена структура α C-доменов.

Начальная скорость реакции полимеризации, как было определено, пропорциональна квадрату концентрации фибриногена. Достигнув определенной длины, протофибриллы начинают латерально ассоциировать. Протофибриллы и фибриллы спирализированы с шагом спирали 1930 нм. Рост протофибрилл в длину зависит от условий полимеризации и концентрации тромбина. Толщина фибрилл также зависит от условий полимеризации и определяется балансом между силой ассоциации поверхностных протофибрилл к фибрилле и силой растяжения протофибриллы.

Образования межфибриллярных контактов и трехмерной сетки сгустка отвечает фазовому переходу раствор—гель [77, 78, 92, 97, 99].

После желатинизации структура сгустка ковалентно фиксируется (стабилизируется) фактором XIIIa, который прошивает полимерный фибрин по α - и γ -цепям. При этом образуются изопептидные связи между ϵ -аминогруппами остатков лизина 406 и γ -карбоксильными группами специфических глутаминовых остатков 398. Вследствие этой реакции увеличиваются механическая прочность сгустка, структурная целостность фибриновых волокон и резистентность их к лизису плазмином. По данным электронной микроскопии, при ковалентной прошивке структурная организация фибрина не изменяется, так как фермент катализирует образование связей между участками соседних молекул, которые уже закреплены в структуре фибрина системой нековалентных связей и имеют определенное положение в пространстве. Этот процесс зависит от ионов Ca^{2+} . Прошивка по γ -цепям — быстрый процесс, происходящий при низкой концентрации фермента на стадии образования протофибрилл. Прошивка по α -цепям осуществляется медленнее и требует более высокой концентрации фактора XIIIa системы свертывания крови. Остатки глутамин, принимающие участие в образовании α -полимеров, локализованы в положении 328—366, а реактивные лизины — в положении 508, 556 или 562.

Исследование влияния ионов Ca^{2+} на полимеризацию фибрина показало их существенную роль в процессе самосборки фибрина. При физио-

логической концентрации ионов кальция обеспечивается структурная целостность молекулы фибриногена и стабилизация центров полимеризации на всех этапах процесса. Латеральная ассоциация протофибрилл в фибриллы с уменьшением концентрации ионов Ca^{2+} замедляется.

Ферментативное расщепление фибриногена/фибрина. Ферментативная деградация фибриногена (как и фибрина) *in vivo* — естественный процесс, который происходит постоянно (катаболизм), поэтому плазма крови всегда содержит не только интактный, но и частично расщепленный фибриноген.

Характер протеолитического расщепления молекулы фибриногена определяется ее пространственной организацией. Показано, что независимо от типа протеиназы фибриноген расщепляется на фрагменты, соответствующие его доменам, а расщепление пептидных связей происходит прежде всего в неупорядоченных междоменных участках α -суперспирали.

Расщепление плазмином первых 10 пептидных связей в фибриногене происходит со скоростью, на порядок большей по сравнению с дальнейшим расщеплением молекулы. Сначала от фибриногена последовательно отщепляются длинные (до 2/3 длины $\text{A}\alpha$ цепей) С-концевые участки (αC -домен), что сопровождается образованием X-фрагментов молекулярной массой 295 и 260 кДа (рис. 2.9).

Проанализировав структуру X-фрагментов, Л. Медведь и соавт. предложили схему расщепления фибриногена на первых этапах действия плазмина [69, 72], согласно которой от обеих $\text{A}\alpha$ -цепей отщепляются фрагменты 42 и 12 кДа; затем более длинная $\text{A}\alpha$ -цепь сокращается еще на 30 кДа и отщепляются короткие N-концевые участки B β -цепей (53 аминокислотных остатков). Расщепление NH_2 -концевого участка B β -цепи происходит в два этапа. На первом отщепляется пептид, состоящий из 42 аминокислотных остатков, на втором — из 11 аминокислотных остатков. В составе первого фрагмента находится сегмент из 14 аминокислот — фибринопептид В [100, 101]. Поздние X-фрагменты теряют способность свертываться под действием тромбина.

Асимметрическое расщепление X-фрагмента в области между двумя дисульфидными кольцами приводит к возникновению D-фрагмента (молекулярная масса 95 кДа) и Y-фрагмента (молекулярная масса 150 кДа). В дальнейшем Y-фрагмент расщепляется на E-фрагмент молекулярной массой 60—50 кДа и D-фрагмент, аналогичный первому.

Таким образом, вследствие ограниченного протеолиза фибриногена возникают два идентичных D-фрагмента и один E-фрагмент. Впервые упомянутые фрагменты были получены из плазминового гидролизата фибриногена, а позднее идентифицированы промежуточные продукты расщепления — X- и Y-фрагменты.

Следует отметить, что терминами “D-фрагмент” и “E-фрагмент” обозначают несколько их видов. Описаны три вида плазминовых E-фрагментов (E_1 , E_2 , E_3) и два основных вида D-фрагментов. Так, при плазминолизе фибриногена в присутствии ионов кальция сначала появляется D_1 -фрагмент (молекулярная масса 93—100 кДа). Иначе его обозначают D_{cate} или D_n . Если

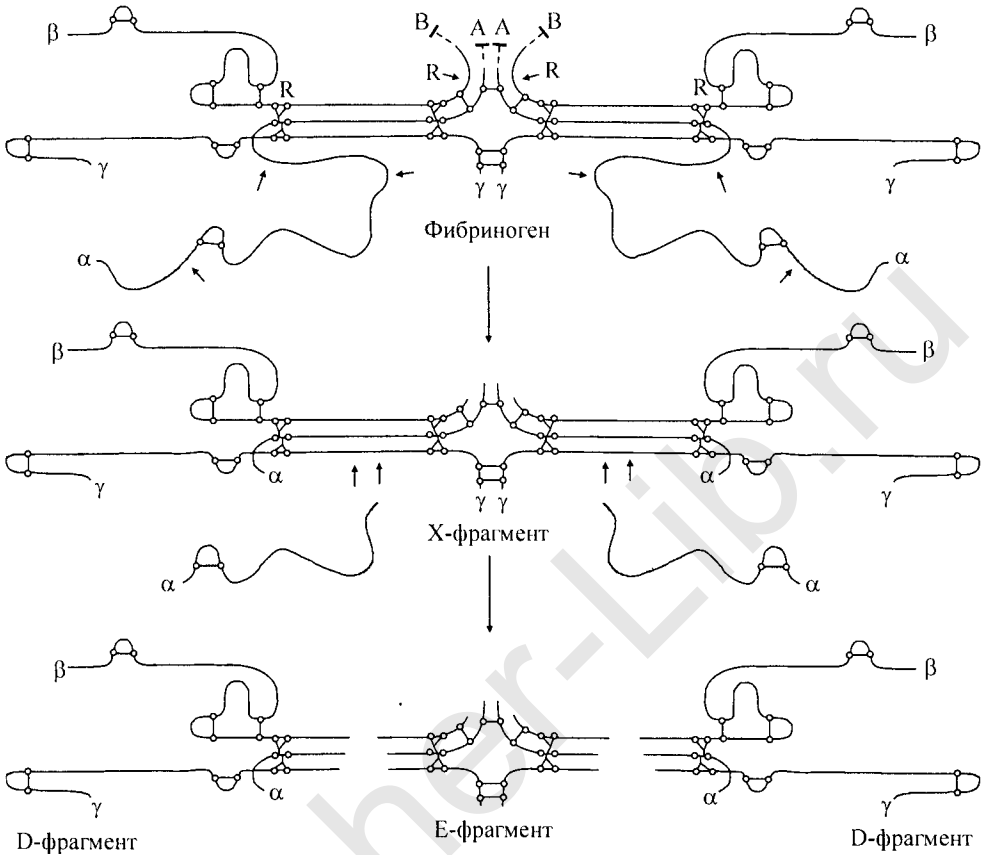


РИС. 2.9. Схема расщепления фибриногена плазмином

же плазминолиз фибриногена проходит в присутствии EGTA, то молекулярная масса фрагмента уменьшается в 2 раза и D_1 -фрагмент теряет C-концевой участок γ -цепи, в котором локализованы Ca^{2+} -связывающий участок, центр полимеризации и участок связывания ТАП, вследствие чего возникает так называемый D_{EGTA} -фрагмент.

При лизисе, который происходит в физиологических условиях, фибриноген превращается преимущественно в высокомолекулярные продукты, сохраняющие свойства, характерные для нативных белков. Поздние коровьи формы этих продуктов отличаются высокой резистентностью к протеолитическим ферментам. В гидролизате соотношение высокомолекулярных фрагментов и пептидного материала составляет 2:1. Изменение условий гидролиза — pH, температуры, количества фермента — влияет на скорость процесса, но почти не отражается на количестве и качестве фрагментов и пептидов. Очевидно, особенности строения молекулы фибриногена определяет последовательность реакций фрагментации.

Расщепление стабилизированного фибринового сгустка происходит по аналогичному механизму [102]. Наличие в фибрине участков, которые легко

расщепляются с образованием растворимых фрагментов, имеет глубокий биологический смысл: это обеспечивает высокую скорость растворения кровяного сгустка после активации фибринолитической системы. На начальном этапе лизиса фибрина, стабилизированного фактором XIIIa, отщепляются α -полимеры, на втором — расщепляются полипептидные цепи в суперспирализованной области, что приводит к образованию целого ряда продуктов, молекулярная масса которых варьирует от высокомолекулярных структур до DD:E-комплекса и фрагментов DD и E.

Эти данные свидетельствуют о том, что поперечно прошитый фибрин разрушается в виде крупных надмолекулярных блоков, обнаруженных в плазме крови больных с синдромом диссеминированного внутрисосудистого свертывания [102, 103].

Основным конечным ковалентным продуктом ферментативного расщепления стабилизированного фибрина является DD:E-комплекс, в котором за счет специфических центров полимеризации нековалентно соединены DD- и E-фрагменты. DD:E-комплекс состоит из фрагментов трех молекул фибрина, расположенных в протофибрилле рядом. Именно DD:E-комплексы, являющиеся структурной единицей протофибриллы, составляют основу промежуточных высокомолекулярных комплексов DY/YD, DXD/YY и YXD/DXY.

Ковалентная прошивка DD-фрагмента придает двум доменам новые качества и сохраняет пространственное расположение центров полимеризации, отвечающее конформации в полимерном фибрине. D-димер состоит из идентичных D-доменов, двух молекул фибрина, расположенных рядом в протофибрилле, или фибринового волокна. Этот фрагмент достаточно стабилен к расщеплению плазмином.

В комплексе E-фрагмент имеет высокое сродство к D-димеру. DD:E-комплекс разрушается после отщепления плазмином обоих N-концевых участков β -цепей в E₁-фрагменте.

Последовательность расщепления DD:E-комплекса можно показать таким образом: DD:E₁ → DD:E₂ → DD + E₃. Преобразование E₁ в E₂ не сопровождается диссоциацией DD:E-комплекса. Превращаясь в E₃, E₂-фрагмент теряет пептид (молекулярная масса 5 кДа), и комплекс распадается на фрагменты DD и E₃ (A α 24—78, B β 54—120, γ 1—53)₂. Накопление в гидролизате фрагмента E₃ всегда сопровождается появлением свободного DD-фрагмента и уменьшением DD:E комплекса и фрагментов E₁ и E₂. Это было показано методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия и β -меркаптоэтанола.

Изучение свойств продуктов деградации и комплексов фибриногена/фибрина позволяет понять общие принципы структурной организации и механизмов функционирования сложных белков и надмолекулярных структур. Так, установлено, что фибриноген входит в состав белковых комплексов, которые функционируют при различных процессах в организме. В первичной структуре фибриногена локализован участок связывания с клетками крови — тромбоцитами (A α 92—94 и A α 572—574), лейкоцитами (γ 190—202), (γ 1—51, B β 1—118). Полимерный фибрин принимает участие в активации

фибринолитической системы, т. е. служит основой, на которой плазминоген подвергается действию тканевого активатора плазминогена (ТАП). Установлен участок связывания плазминогена и ТАП на фибрине ($A\alpha$ 148—160, γ 312—324). Такая многофункциональность фибриногена обусловлена структурой и свойствами молекулы [104—112].

Изучением свойств продуктов ферментативного расщепления фибриногена/фибрина установлено, что они принимают участие во многих биологических процессах и влияют практически на все звенья системы гемостаза: увеличивают проницаемость стенок сосудов, влияют на процесс агрегации тромбоцитов, на функции клеток крови и тканей различных органов, на синтез фибриногена. При некоторых патологических состояниях содержание продуктов расщепления фибриногена/фибрина в плазме крови значительно возрастает, они являются маркерами синдрома диссеминированного внутрисосудистого микросвертывания крови.

Фактор XIII — профермент единственного тиолового фермента системы свертывания крови трансглутаминазы (КФ 2.3.2.13). В гемокоагуляционном каскаде фактор XIII активируется последним в результате ограниченного протеолиза тромбином. Физиологическая функция фактора XIIIа системы свертывания крови заключается в образовании специфической изопептидной связи между остатками γ -карбоксихлутамила и ϵ -аминогруппой лизина при межмолекулярной прошивке мономеров фибрина, что укрепляет и стабилизирует фибриновый сгусток. Кроме того, при прошивке фибринового сгустка трансглутаминазой происходит ковалентное связывание α_2 -антиплазмина с $A\alpha$ -цепью полимерного фибрина, что имеет существенное значение в регуляции фибринолитического процесса. Ковалентное связывание фибронектина, коллагена, других белков плазмы крови и межклеточного матрикса с $A\alpha$ -цепью фибрина необходимо для закоривания фибринового сгустка в ткани и для процесса заживления ран. Таким образом, реакции, катализируемые трансглутаминазой, регулируют как поддержание нормального гемостаза в плазме крови, так и репаративные процессы в местах повреждения сосудов и тканей [113—116].

Согласно исследованиям [18, 115] фактор XIII содержится в крови в концентрации 70 нМ и синтезируется клетками печени и мегакариоцитами. В плазме крови фактор XIII связан с фибриногеном и включается в фибриновый сгусток.

Фактор XIII — гетеродимер, его молекулярная масса — 320 кДа. Он состоит из двух каталитических **a**- и двух регуляторных **b**-субъединиц (**a₂b₂**) молекулярной массой соответственно 82 и 76,5 кДа. Тромбоцитарная и плацентарная формы состоят из **a₂**-субъединиц [117—120].

Электронно-микроскопические исследования показали, что субъединица **a** фактора XIII имеет компактную асимметричную форму глобулы (6×9 нм), субъединица **b** — нитевидная структура длиной 30 нм и диаметром 2 нм [117].

Полипептидные цепи субъединицы **a** плазменного, тромбоцитарного и плацентарного фактора XIII гомологичны и состоят из 730 аминокислотных остатков, не гликолизированы, и 9 остатков цистеина не образуют дисуль-

фидные связи. Установлено, что субъединица **a** состоит из пяти доменов: трех термолабильных и двух термостабильных. Термолабильные домены обеспечивают прочное взаимодействие субъединиц **a** между собой. Первые 37 аминокислотных остатков образуют домен активационного пептида. Затем до Lys₅₁₃ расположен фибринсвязывающий домен.

Активный центр представлен последовательностью Gly₃₁₂-Gly₃₁₃-Cys₃₁₄-Trp₃₁₅ в каталитических субдоменах, сформированных участком полипептидной цепи 185—515. Полная каталитическая активность транскламиназы зависит от аминокислотных остатков His₃₄₂, His₃₇₃, Asp₃₉₆ и Val₄₁₄; замена Val на Phe дестабилизирует молекулу. Ca²⁺-связывающий участок предположительно находится в последовательности Glu₄₆₈-Asp₄₇₉ и удален от каталитического центра [121, 122].

Субъединица **b** состоит из 641 аминокислотного остатка, содержит 8,5 % углеводов. Ее структура на 98 % состоит из 10 повторяющихся последовательностей, которые, как полагают, служат белоксвязывающими модулями. В COOH-концевом участке **b**-субъединицы в 587—599 положении обнаружен RDG-пептид — лиганд клеточных рецепторов. В полипептидной цепи субъединицы **b** обнаружено три потенциальных места гликозилирования и 16-17 дисульфидных связей. Главная функция субъединицы **b** состоит в образовании комплекса с субъединицами **a** и регуляция их действия.

Фактор XIII активируется тромбином в присутствии фибрина и Ca²⁺. Тромбин расщепляет пептидную связь Arg₃₇-Gly₃₈ и отщепляет от N-концевого участка полипептидной цепи субъединицы **a** 37-членный пептид. В присутствии фибрина и Ca²⁺ тетрамер (**a**₂***b**₂) диссоциирует на активный димер (**a**₂*), связанный с фибрином, и две субъединицы **b**, что сопровождается конформационной перестройкой субъединицы **a** и экспонированием активного центра. Фактор XIII может активироваться не только тромбином, но и трипсином, папаином.

В процессе активации фактора XIII важную роль играет фибриноген, который усиливает ограниченный протеолиз фактора XIII тромбином и в 10 раз снижает необходимую для диссоциации цепей **b** концентрацию Ca²⁺, приводя ее к физиологическому уровню.

В настоящее время установлено более 200 случаев развития тяжелых геморрагических диатезов, обусловленных наследственным дефицитом фактора XIII. Врожденный дефицит субъединиц **a** и **b** — редкое аутомное заболевание (1:2 000 000) [122, 123]. Наряду с врожденной недостаточностью фактора XIII известны случаи выработки к нему иммунных IgG-ингибиторов, которые угнетают активность как плазменного, так и тромбоцитарного факторов [18].

Ингибитор пути тканевого фактора (TFPI) связан с эндотелиальными клетками (50—80 %), после введения гепарина переходит в кровотоки, где циркулирует в комплексе с липопротеинами низкой плотности — до 60 %, высокой плотности — до 44 %, очень низкой плотности — 9 % и только 6 % остаются в свободном состоянии. Молекулярная масса TFPI — 36 кДа и 40 кДа в том случае, если TFPI связан дисульфидными связями с аполипротеином АII.

Молекула TFPI состоит из 276 аминокислотных остатков. N-концевой участок ее содержит кластер отрицательно заряженных аминокислот, три домена типа ингибитора протеиназ Кунитца (K1, K2, K3) и кластер положительно заряженных аминокислот на C-концевом участке. В каждом домене типа ингибитора Кунитца имеются три консервативных дисульфидных связи. В молекуле обнаружено три потенциальных места для N-гликозилирования.

TFPI синтезируется эндотелиальными клетками кровеносных сосудов, астроцитами и олигодендроцитами мозга, мегакариоцитами. Установлено, что в больших количествах TFPI продуцируется эндотелием легких, сердца и в меньшем количестве — эндотелием синусоидов печени. В почках, поджелудочной железе и скелетных мышцах экспрессируется небольшое количество этого белка [124—126].

Антитромбин III — одноцепочечный гликопротеин молекулярной массой 58,2 кДа, циркулирует в крови в концентрации 2300 нМ. Биосинтез его происходит в печени [127—130].

Антитромбин III является одним из основных физиологических ингибиторов тромбина и некоторых других активированных факторов свертывания крови (IXa, Xa, XIa, XIIa, калликреина). Антитромбин III осуществляет постепенное прогрессирующее влияние на тромбин или на фактор Xa путем образования эквимолярных комплексов, которые удаляются из кровотока через рецепторопосредованный путь. Реакция ингибирования ферментов антитромбином III в значительной степени зависит от присутствия анионных глюкозаминогликанов, таких как гепарин и гепарансульфат. Гепарин увеличивает ингибирующую активность антитромбина в 2000 раз и ускоряет его взаимодействие с тромбином.

Молекула антитромбина III состоит из 432 аминокислотных остатков. Рентгеноструктурным анализом установлено, что антитромбин III подобно другим серпинам сформирован элементами вторичной структуры: девять спиральных участков и три β -структуры, на долю которых приходится около 70 % молекулы. Установлено, что α -антитромбин III N-гликозилирован в четырех положениях (Asn₉₆, Asn₁₃₅, Asn₁₅₅, Asn₁₉₂), в то время как β -антитромбин III лишен олигосахаридной группировки у Asn₁₃₅. В плазме крови циркулирует 10 % β -антитромбина III. На долю углеводного компонента приходится около 15 % общей массы.

Гепаринсвязывающий домен расположен в N-концевой части молекулы, включает аминокислотные остатки с 41 по 49 и со 107 по 156, состоит из основных аминокислот. N-концевой участок молекулы, расположенный на поверхности молекулы, вносит решающий вклад в формирование гепаринсвязывающего участка. Ключевую роль в связывании гепарина играют аминокислотные остатки антитромбина III Lys₁₁, Arg₁₃, Arg₂₄, Arg₄₇, Lys₁₂₅, Arg₁₂₉, Arg₁₄₅.

Дефицит антитромбиновой активности чаще всего сопровождается развитием тромбозов глубоких вен. Врожденный дефицит антитромбина III встречается относительно редко. В настоящее время многие мутации, вызывающие дефицит антитромбина III, уже охарактеризованы. Приобретенные

формы дефицита антитромбина III распространены довольно широко и связаны с нарушением синтеза белка при заболевании печени, ускоренным катаболизмом вследствие взаимодействия с тромбином, эластазой и гепарином. Усиленное образование тромбина при ряде патологических состояний сопровождается потреблением антитромбина III.

α_2 -Макроглобулин (α_2 -М) — гликопротеин плазмы крови, ингибиторный потенциал которого составляет 25—30 % всего антитромбинового потенциала плазмы крови. Известны две функции α_2 -М. Первая связана с быстрым и своевременным выводом из кровотока комплексов ингибиторов (антитромбина III, α_2 -антиплазмина, С1-эстеразы) с соответствующими ферментами, вторая — при низкой концентрации вышеуказанных ингибиторов α_2 -М выполняет функцию ингибирования активированных протеиназ крови. α_2 -М принимает участие в иммунных реакциях, влияя на ответ иммунокомпетентных клеток на разные стимулы, а также контролирует способность макрофагов и нейтрофилов мигрировать в области воспаления. Макроглобулин определяет интенсивность синтеза и высвобождение некоторых растворимых медиаторов, регулируя интенсивность взаимодействия сенсibilизированных лимфоцитов со специфическим антигеном. Его значение возрастает при унаследованном или приобретенном дефиците основных ингибиторов протеиназ [33].

2.2. СИСТЕМА СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ И ЕЕ РЕГУЛЯЦИЯ

2.2.1. Ферментативный каскад системы свертывания крови

Система свертывания крови является одной из основных составных частей гемостаза. Плазменный (коагуляционный) гемостаз — это многоэтапный ферментативный процесс, в котором участвуют белки плазмы крови и тканей, надмолекулярные структуры и ионы кальция. Коагуляционный гемостаз, хотя и называется вторичным, осуществляется не строго последовательно вслед за сосудисто-тромбоцитарным (первичным) гемостазом, а функционирует при взаимодействии с этим звеном.

Необходимым компонентом процесса свертывания крови *in vivo* являются тромбоциты. Агрегированные активированные тромбоциты обеспечивают эквивалентную прокоагулянтам отрицательно заряженную фосфолипидную поверхность, на которой локализуются реакции, катализируемые многокомпонентными комплексами. Кроме того, тромбоциты представляют собой депо белков, участвующих в процессе свертывания крови и его регуляции, и определяют особенности механизма функционирования гемостаза (локализация ответа, усиление прокоагулянтной активности и предупреждение кровотечения при повреждении сосуда). Участие тромбоцитов в процессе свертывания крови подтверждается тем, что при введении фармакологических количеств мощного антагониста тромбоцитов, такого как простагландин E_1 , значительно удлиняется время свертывания крови и подавляется образование тромбина [131, 132].

Конечной целью коагуляционного гемостаза является превращение фибриногена в фибрин и последующее формирование фибринового сгустка, который повышает плотность первичного тромба и закрепляет его на сосудистой стенке в месте повреждения.

С биохимической точки зрения механизм свертывания крови и образования сгустка представляет каскад последовательных ферментативных реакций, которые осуществляются группой специфических белков — факторов системы свертывания. Каждый активированный фактор активирует следующий путем ограниченного протеолиза, превращая профермент в фермент. Все плазменные факторы свертывания крови в неактивном состоянии обозначаются римскими цифрами, а их активные формы маркируются прибавлением к номеру фактора буквы “а”. Многие прокоагулянты были открыты при исследовании системы свертывания крови больных с наследственными коагулопатиями, поэтому ряд факторов назван по фамилиям впервые выявленных носителей дефекта (факторы Хагемана, Кристмаса, Стюарта, фон Виллебранда) [1, 2, 15, 18].

Большая часть реакций каскада системы свертывания крови протекает не в свободном растворе, где они слишком рассеяны, а на поверхности фосфолипидных мембран, активированных тромбоцитов, лейкоцитов, эндотелиальных клеток в присутствии ионов кальция и белковых кофакторов, которые изменяют конформацию профермента и отвечают за определенное сродство белковых компонентов друг к другу и к отрицательно заряженной фосфолипидной мембране [133, 134].

Эффективность ферментативного действия комплексов, которые собираются при участии ионов кальция на поверхности фосфолипидных мембран и состоят из витамин К-зависимой сериновой протеиназы и не обладающего ферментативной активностью кофакторного белка, превышает каталитическую эффективность отдельных ферментов в $2,5 \cdot 10^5 - 2 \cdot 10^9$ раз [18].

Каждая последующая стадия проходит с большей скоростью, чем предыдущая, и первичный сигнал значительно усиливается за счет повышения на каждом этапе свертывания крови количества следующего компонента, принимающего участие в этом процессе. Небольшое количество активированного фактора на начальных этапах процесса активации системы свертывания вызывает лавинообразное усиление на последующих стадиях и как результат — быструю реакцию организма на травму [135, 136].

Кроме того, широко распространен механизм положительной обратной связи, оказывающий содействие ускорению реакций начальных этапов свертывания крови. Например, фактор Ха и тромбин, активируя факторы V и VIII, значительно ускоряют процесс образования тромбина. Более того, тромбин является клеточным агонистом, который способен стимулировать тромбоциты и эндотелиальные клетки, что приводит к экспонированию отрицательно заряженных фосфолипидов на поверхности клеточных мембран [15, 136].

Таким образом, биологическое значение этого сложного многоступенчатого ферментативного процесса состоит в том, что от момента запуска до

конечного этапа происходит возрастание скорости протекания каждого последующего этапа и интенсивное наращивание содержимого компонентов каждого следующего этапа активации.

Процесс функционирования каскада реакций свертывания крови условно делят на три фазы [1, 135].

Первая фаза — образование протромбиназного комплекса. Весь каскад активации факторов как внутреннего, так и внешнего пути системы свертывания крови направлен на преобразование фактора X в активированный фактор Xа и на формирование протромбиназного комплекса, который превращает протромбин в тромбин.

Вторая фаза — тромбинообразование. Протромбиназный комплекс (факторы коагуляции Xа, Va, ионы кальция) на фосфолипидной мембране переводит неактивный фактор II (протромбин) в активный фактор IIа (тромбин). Активация протромбина является важным звеном каскада реакций коагуляционного гемостаза, которые ведут к образованию мультифункционального фермента — тромбина, играющего ключевую роль в регуляции системы гемостаза.

Третья фаза свертывания крови — фибринообразование. Образовавшийся тромбин отщепляет от молекулы фибриногена фибринопептиды, превращает его в фибрин-мономер, что сопровождается экспонированием специфических центров полимеризации. Молекулы фибрин-мономера, взаимодействуя по специфическим центрам полимеризации, образуют двунитчатые структуры — протофибриллы, которые латерально ассоциируют в фибриллы и образуют фибриновую сеть. Кроме того, тромбин активирует фактор XIII в фактор XIIIа. Последний в присутствии ионов кальция ковалентно прошивает фибриновый полимер, превращая его в стабильную форму, которая и составляет основу кровяного сгустка.

В зависимости от пути формирования протромбиназы различают внутренний и внешний пути ее образования. Связь с фосфолипидными мембранами и дальнейшая взаимосвязь между факторами свертывания крови при активации происходит за счет белок-белковых взаимодействий, включающих взаимодействие IXа-VIIIа (теназа внутреннего пути) или взаимодействие фактора VII с апопротеином тканевого фактора, в результате чего образуется активный комплекс тканевый фактор-VIIа, который называют теназа внешнего пути свертывания крови (рис. 2.10).

Основным критерием для разделения внешнего и внутреннего путей свертывания крови служит источник клеточных мембран, на поверхности которых протекают ферментативные реакции. Для активации факторов внутреннего пути свертывания крови источником отрицательно заряженных мембран являются активированные тромбоциты, а для факторов внешнего пути — мембраны эндотелиальных клеток и других тканей, с которыми кровь вступает в контакт при ранении.

Внутренний механизм свертывания крови реализуется с участием ряда факторов системы свертывания крови (XII, XI, IX, VIII, X), калликреин-кининовой системы и тромбоцитов. Детальное изучение *in vitro* белок-белковых взаимодействий при формировании ансамбля компонентов контактной системы на анионной поверхности (каолин, сульфамиды, декстрансульфа-

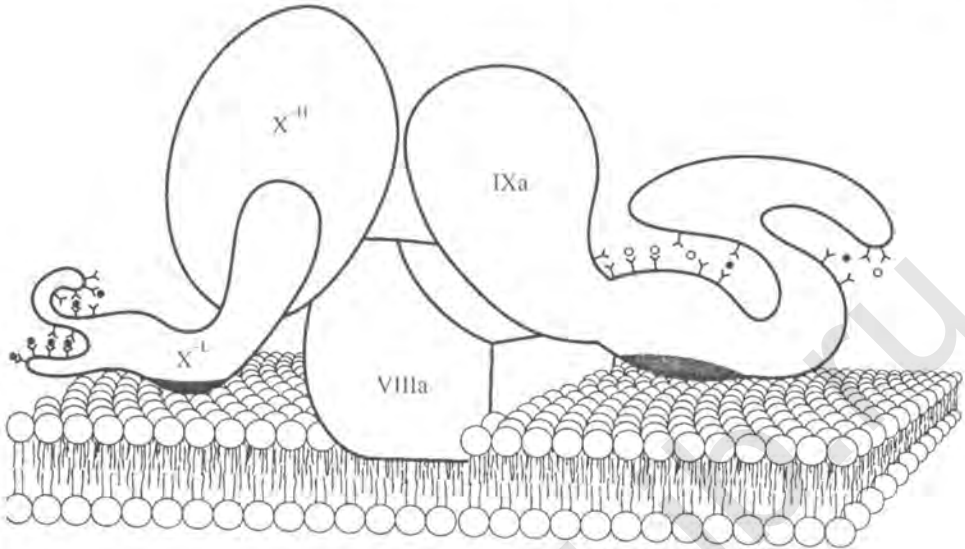


Рис. 2.10. Гипотетическая модель теназного комплекса [34]

ты, фосфолипиды) привело к постулированию механизма активации этой системы с генерированием фактора XIIa и калликреина (рис. 2.11).

Активированные тромбоциты или инородная отрицательно заряженная поверхность является высокоаффинной для белков контактной фазы. Взаимная ориентация молекул в процессе образования комплекса приводит к изменению конформации каждого белка и активации компонентов [44, 46, 137—140]. При этом прекалликреин превращается в калликреин, неактивный фактор XII — в активный фактор XIIa, который в результате ограниченного протеолиза стимулирует образование калликреина. Калликреин, в свою очередь, усиливает активацию фактора XII, в результате чего образуются активные формы фактора XII — фактор α XIIa и фактор β XIIa [15, 18].

Субстратами фактора XIIa в плазме крови является прекалликреин, факторы XI, VII, плазминоген. Фактор XIIa в присутствии высокомолекулярного кининогена активирует фактор XI, превращая его в сериновую протеиназу — фактор IXa. Фактор IXa вместе с фактором VIIIa, фосфолипидами и ионами кальция образуют теназу внутреннего пути, которая активирует фактор X, действующий в комплексе с кофакторами как протромбиназа, превращая протромбин в тромбин [49, 141—143].

В настоящее время существенно расширились и изменились представления о природе и роли контактной активации плазменного протеолиза. Постулированный ранее механизм контактной активации фактора XII традиционно рассматривался как триггер процессов внутреннего пути гемостаза. Более детальное изучение процесса активации отдельных компонентов контактной фазы дало возможность установить, что активация белковых компонентов внутреннего пути системы свертывания крови может происходить независимо от активации фактора XII, поскольку

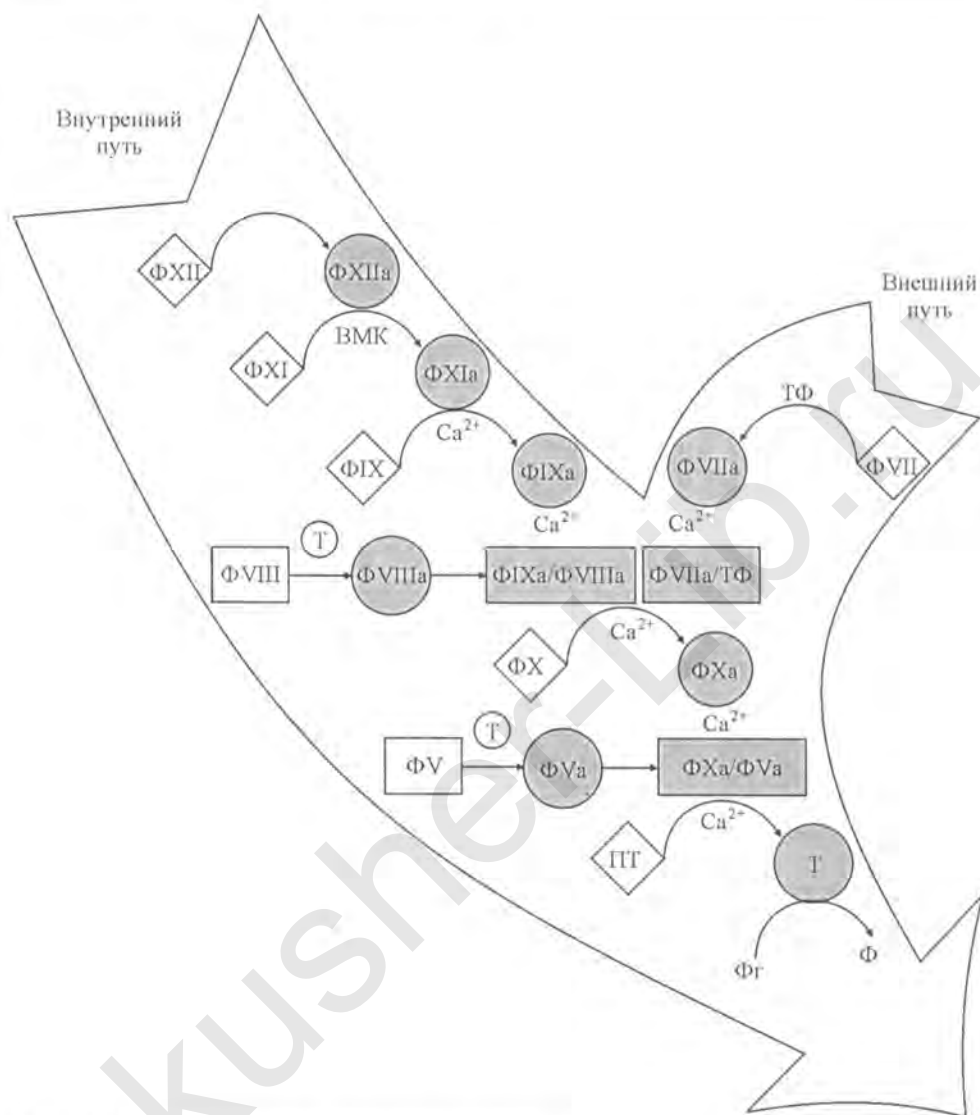


РИС. 2.11. Каскад системы свертывания крови [34]

прекалликреин, связанный с D6-доменом высокомолекулярного кининогена и фактором XI на мембране тромбоцитов, нейтрофилов и эндотелиальных клеток, может инициировать процесс активации [144–148].

Кроме того, отсутствие прямых доказательств такой активации *in vivo* и тот факт, что дефицит этих компонентов не вызывает кровоточивости, выраженной гемофилии, стимулировал поиск иного механизма их активации, а также уточнения физиологической роли этой системы в гемостазе.

Ранее она рассматривалась, в основном, как начальный этап внутреннего пути гемокоагулирующего каскада, однако в настоящее время установлено, что контактная активация протеолитических систем плазмы крови необ-

ходима для инициирования, усиления и распространения защитных реакций организма, которые обеспечиваются этими и другими системами, с ними взаимодействующими. Ферменты контактной системы активируют плазминоген, первый компонент (С1) и фактор В комплемента, фактор VII системы свертывания крови и проренин, а также стимулируют активацию нейтрофилов и влияют на функцию эндотелиоцитов непосредственно либо через высвобождение брадикинина. Особенно следует подчеркнуть влияние брадикинина на процесс высвобождения цитокинов, таких как интерлейкин-1, фактор некроза опухолей и других вторично генерируемых медиаторов: NO, простагландинов и лейкотриенов [149].

Внешний путь свертывания крови ранее рассматривался как резервный, мобилизуемый организмом при чрезвычайных обстоятельствах, обуславливающий быстрое свертывание крови. Однако, согласно современным представлениям, внешний путь свертывания крови, индуцируемый тканевым фактором, является основным механизмом тромбогенеза в сосудистом русле [1, 18, 44, 145—148].

Тканевый фактор — трансмембранный гликопротеин, содержащийся в мембранах эндотелиальных и гладкомышечных клеток, моноцитов, макрофагов, функционирует не самостоятельно, а в комплексе с фосфолипидной матрицей, которая в процессе повреждения внешней клеточной мембраны теряет нормальное асимметрическое распределение липидов, что сопровождается переходом молекул фосфатидилсерина и фосфатидилэтаноламина с внутреннего листка бислоя мембраны на внешний.

Свертывание крови иницируется тканевым фактором, который экспрессируется на клеточных поверхностях при повреждении ткани и образует эквимольный комплекс с фактором VIIa (рис. 2.12). Фактор VIIa, присутствующий в кровотоке в небольшом количестве (0,5—1,0 % фактора VII), имеет конформацию, которая не позволяет ему контактировать с плазменными факторами свертывания крови и активировать их. Конформация фактора VIIa меняется только после связывания с тканевым фактором и он приобретает способность активировать факторы IX и X [150—154]. Фактор VIIa отличается от других факторов системы свертывания крови тем, что становится чувствительным к инактивации антитромбином III только в комплексе с кофактором, что, очевидно, обеспечивает механизм циркуляции свободного фактора VIIa в крови [7, 8].

Исследование на модельных системах процесса стимуляции тканевым фактором свертывания крови в условиях, близких к таковым *in vivo*, позволило установить, что этот процесс можно разделить на фазы: инициация свертывания крови и распространение образования тромбина (см. вклейку, рис. 20).

В первой фазе инициации свертывания крови комплекс тканевый фактор-фактор VIIa, называемый теназа внешнего пути, в присутствии ионов кальция влияет на фактор X, превращая его в активную форму. Образующийся при этом в ограниченном количестве фактор Xa генерирует пикомольные концентрации тромбина.

Первая фаза характеризуется низкой скоростью образования тромбина, частичной активацией тромбоцитов и активацией прокофакторов V и VIII в

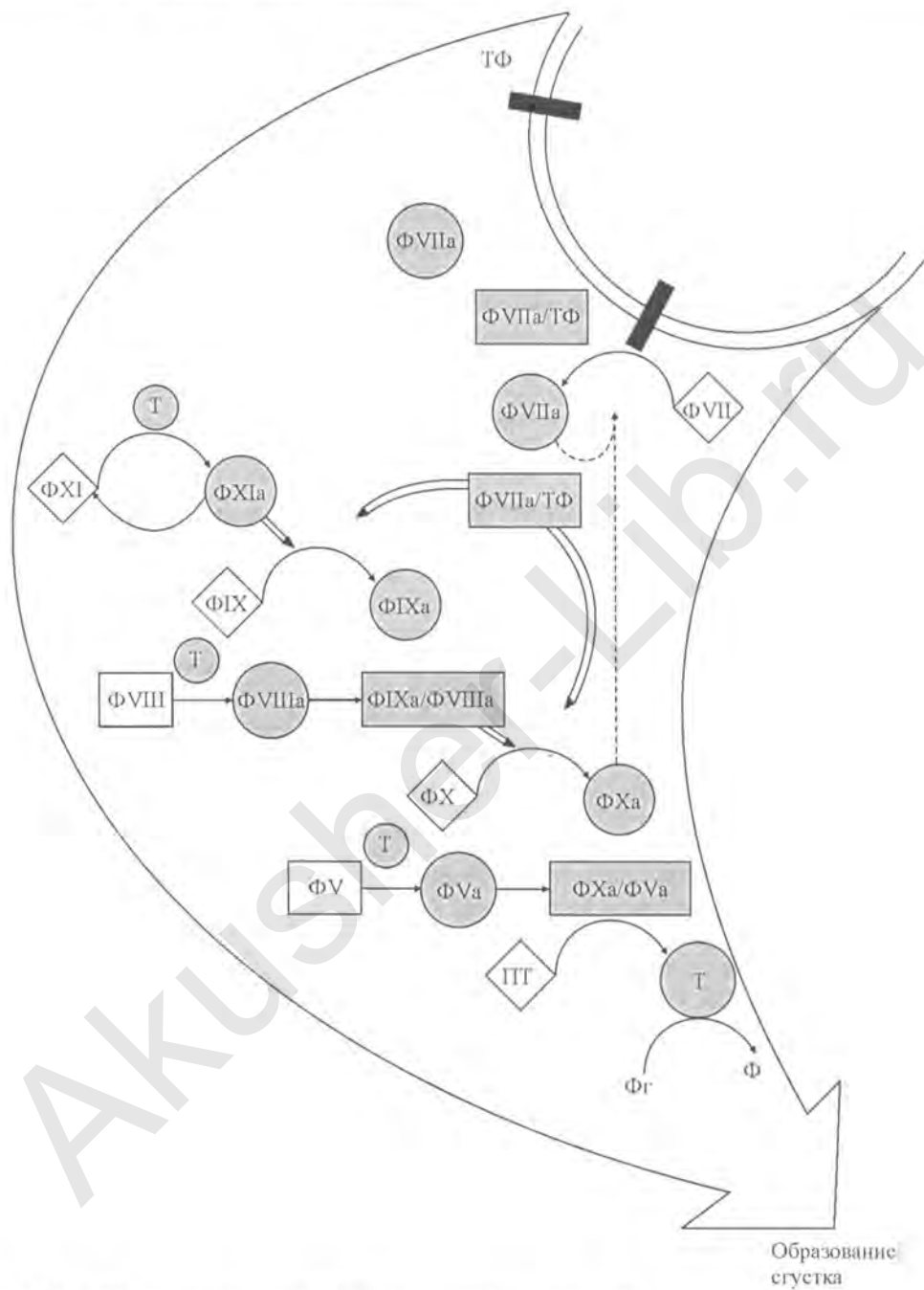


РИС. 2.12. Физиологические пути свертывания крови [34]

активные кофакторы Va и VIIIa. В течение этой фазы происходит образование также пикомолярных количеств факторов VIIa, IXa, Xa и XIa.

Преобразование фактора IX в активную форму также катализируется фактором Xa. Такой путь называется альтернативным, усиливающим механизм активации системы свертывания крови, который ведет к появлению небольшого количества тромбина, необходимого для активации клеточного гемостаза, но недостаточного для процесса фибринообразования.

Кроме активации сериновых протеиназ системы свертывания крови, усиливающий механизм включает образование активной формы фактора VIII, выполняющего кофакторную функцию в тройном энзиматическом комплексе: фосфолипидная поверхность-фактор VIIIa-фактор IXa [18]. На поверхности мембран тромбоцитов, эндотелия и других клеток фактор IXa образует комплекс с фактором VIIIa, который эффективно активирует фактор X со скоростью, в 50—100 раз большей скорости активации этого фермента комплексом тканевый фактор-фактор VIIa, и тем самым обеспечивает образование тромбина в концентрации, достаточной для остановки кровотечения [158—160].

Продолжительность фазы инициации, которая соответствует времени свертывания крови, зависит, в первую очередь, от концентрации тканевого фактора и ингибитора пути тканевого фактора [161].

Затем при нормальных концентрациях всех прокоагулянтных белков наступает фаза распространения образования тромбина. При свертывании цельной крови образование сгустка происходит в начале этой фазы. Отличительными чертами фазы распространения является высокая скорость процесса превращения протромбина в тромбин, завершение активации тромбоцитов и образование прочного сгустка. Эта фаза регулируется прежде всего АТ III и системой протеина C, а также белками семейства серпинов [32, 33, 127, 129, 151, 157].

Образование тромбина в процессе фазы распространения резко снижается в отсутствие факторов VIII и IX (гемофилия соответственно А и В) и при снижении содержания тромбоцитов до 5 % нормы [2].

Таким образом, активация фактора X может происходить при участии разных компонентов: теназы внешнего пути свертывания крови (комплекса тканевого фактора, фактора VIIa и Ca^{2+}), теназы внутреннего пути свертывания крови (комплекса факторов IXa, VIIIa, фосфолипидов и Ca^{2+}). Внутренний и внешний путь активации системы свертывания крови объединяются на этапе образования протромбиназного комплекса (фактор Xa-Va-фосфолипидная поверхность), который превращает профермент протромбин в активный фермент тромбин [15, 18, 155, 162]. Распределение процессов свертывания крови на внутренний и внешний пути условно, поскольку существуют механизмы взаиморегуляции. Так, при незначительном повреждении сосудистой стенки тканевый фактор в комплексе с фактором VIIa активирует фактор IX.

Превращение протромбина в тромбин — быстротекущий процесс, который осуществляется *in vivo* специфическим активатором протромбина — фактором Xa (рис. 2.13). Активация протромбина фактором Xa приобретает

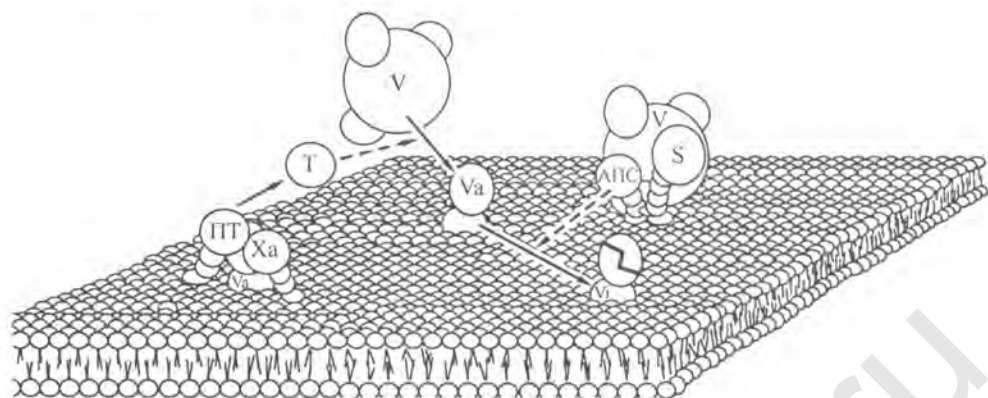


Рис. 2.13. Схема активации протромбина протромбиназным комплексом, активация фактора V системы свертывания крови тромбином и инактивация фактора Va активированным протеином С на фосфолипидной мембране

большую скорость при наличии отрицательно заряженных фосфолипидных мембран и фактора Va, которые принимают участие в образовании протромбиназного комплекса и выполняют функции кофакторов, ускоряя процесс активации протромбина фактором Ха. Установлено, что протромбин может связываться только с активированным фактором Va. В этом процессе определенную роль играет фрагмент 2 протромбина. Фосфолипидная мембрана также играет существенную роль в процессе формирования протромбиназного комплекса и повышения субстратной специфичности фактора Ха к промежуточным продуктам процесса активации протромбина: мезотромбина, мезотромбина II и претромбина 2 [26, 164—168].

Фактор Ха одновременно или последовательно расщепляет две поверхностно расположенные пептидные связи: $\text{Arg}_{271}\text{—Thr}_{272}$ и $\text{Arg}_{320}\text{—Ile}_{321}$ протромбина. Лизис первой пептидной связи приводит к высвобождению фрагмента F_{1+2} , содержащего Gla-домен и две крингловые структуры. Вследствие гидролиза второй пептидной связи образуется двухцепочечная молекула тромбина (цепи связаны дисульфидной связью). Таким образом, во время процесса активации протромбина от его молекулы фактором Ха отщепляется 42 % молекулы протромбина, которые остаются связанными за счет Gla-домена с фосфолипидной поверхностью, а молекула тромбина, имеющая меньшее сродство к ней, переходит в кровоток [168].

Расщепление только одной пептидной связи $\text{Arg}_{320}\text{—Ile}_{321}$ приводит к появлению мезотромбина — промежуточного продукта образования тромбина, который способен гидролизовать синтетические пептидные субстраты, но ограничено взаимодействует с тромбоцитами и фибриногеном.

Протромбин может расщепляться тромбином ($\text{Arg}_{156}\text{—Ser}_{157}$) до промежуточного продукта претромбина, молекулы которого не содержат Gla-домен и первый крингл. Претромбин, не имея Gla-домена, теряет способность связываться с фосфолипидной мембраной и является физиологически неактивным. Дальнейшее расщепление тромбина путем автокатализа сопровождается потерей пептида 5,0—5,8 кДа, содержащего углеводный компонент.

Трехцепочечная форма молекулы тромбина (γ -тромбин) теряет свертывающую способность. Таким образом, расщепление протромбина под действием тромбина вызывает снижение потенциала системы свертывания крови и является регуляторным процессом по принципу обратной связи.

Генерация тромбина может осуществляться при воспалительных процессах на поверхности активированных моноцитов механизмом, не зависящим от фактора VII системы свертывания крови и тканевого фактора. Активация моноцитов приводит к экспонированию на их поверхности адгезивных белков, в том числе интегринов $\alpha\text{M}\beta_2$, называемых также Mac-1 или CD11b/CD18, принадлежащих к семейству β_2 -интегринов, которые наряду с другими белками связывают фактор X системы свертывания крови. Катепсин G, высвобождающийся из активированных лейкоцитов, вызывает ограниченный протеолиз фактора X, превращая его в активную форму Xa, способную активировать протромбин в тромбин.

2.2.2. Структура и регуляторные функции тромбина

Тромбин — мультифункциональная сериновая протеиназа (КФ 3.4.21.5) состоит из двух цепей А и В, которые соединены двумя дисульфидными связями. А-цепь состоит из 49 аминокислотных остатков. В-цепь содержит 259 аминокислотных остатков и стабилизирована тремя дисульфидными связями. Углеводный остаток В-цепи составляет 4—5 % массы фермента и состоит из 3,5 % нейтральных сахаров, 2,6 % глюкозамина и 1,5 % сиаловой кислоты. В-цепь содержит сериновый и гистидиновый радикалы активного центра. Установлено, что после восстановления межцепочечного дисульфидного мостика А- и В-цепи тромбина образуют нековалентный комплекс. А-цепь содержит Ca^{2+} -связывающий участок, который стабилизирует нативную конформацию молекулы тромбина, играет определенную роль во взаимодействии с липидами, однако не влияет на специфичность действия фермента [160, 170].

Тромбин является одним из главных биорегуляторов системы свертывания крови, проявляющих специфические протеолитические и гормоноподобные функции. Он участвует во многих физиологических и патологических процессах, таких как свертывание крови и противосвертывающие механизмы, тромбообразование и фибринолиз, регуляция сосудистого тонуса и процессов развития организма, а также в процессах воспаления, репарации тканей, атерогенеза, канцерогенеза. Тромбин стимулирует клетки, принимающие участие в этих процессах, в том числе моноциты, Т-лимфоциты, фибробласты, тучные и нервные клетки. На поверхности фибробластов тромбин имеет митогенный эффект; на макрофагах — хемотаксис; на эндотелиальных клетках — пролиферацию [171—178].

Прокоагулянтные свойства тромбина проявляются в реакциях, направленных на активацию и высвобождение факторов, участвующих в процессе свертывания крови; он индуцирует адгезию тромбоцитов и лейкоцитов к стенке сосуда и взаимодействует с тромбиновыми рецепторами на тромбо-

цитах, вызывая агрегацию тромбоцитов; стимулирует секрецию эндотелием адгезивных белков и тем самым ускоряет превращение протромбина в тромбин.

Антикоагулянтные свойства тромбина проявляются в активации нейрогуморальной противосвертывающей системы; активации эндотелийзависимой системы протеина С, которая блокирует образование тромбина; стимулировании секреции эндотелием простагландинов и ингибитора активатора плазминогена.

Регуляторные функции тромбина разнонаправлены. Так, активация тромбином факторов свертывания крови V, VIII и XI приводит к усилению активации системы свертывания крови. В то же время фермент приобретает парадоксальную противосвертывающую активность при связывании с тромбомодулином эндотелия, в результате чего изменяется его субстратная специфичность. Он теряет способность свертывать фибриноген и активировать тромбоциты, но активирует протеин С. Активированный протеин С инактивирует факторы свертывания крови Va и VIIIa и тем самым блокирует образование тромбина.

Действие тромбина на процесс фибринолиза также разнонаправлено. Так, связанный с тромбомодулином тромбин может активировать ингибитор фибринолиза — TAFI и тем самым блокировать фибринолиз. TAFIa-карбоксипептидаза отщепляет от молекулы фибрина С-концевые остатки лизина и аргинина. Это приводит к снижению сродства плазминогена к фибрину, вследствие чего снижается скорость образования плазмина. В то же время активированный тромбином протеин С связывает ингибитор активатора плазминогена (ПАИ-1), который продуцируется эндотелиальными клетками, и таким образом тромбин стимулирует фибринолиз [178, 179].

Действие тромбина на сосудистый тонус проявляется в его способности при разных условиях высвобождать из эндотелия либо оксид азота NO и простаглицлин (PGI₂), тем самым стимулируя вазодилатацию, либо эндотелин-1, а из тромбоцитов — тромбоксан A₂, стимулируя вазоконстрикцию.

Итак, действие тромбина распространяется на все три звена гемостаза: тромбоцитарный аппарат, сосудистую стенку и плазменные факторы свертывания крови. Поэтому активация протромбина является важным регуляторным процессом, который обеспечивает поддержание гемостаза и обуславливает большую заинтересованность в исследовании процессов активации профермента, а также в создании ингибиторов тромбина.

Полифункциональность тромбина и его роль как про-, так и антикоагулянта обусловлена особенностями его структуры, аллостерической регуляцией его активности и наличием, кроме классического активного центра сериновых протеиназ, нескольких субцентров, которые называют экзосайтами, или субцентрами, дополнительного центра распознавания субстратов и рецепторов [172—178].

Эти субцентры отвечают за высокоспецифическое связывание тромбина с субстратами, рецепторами и высокую избирательность в расщеплении связей. Важной особенностью тромбина является то, что его активность зависит от конформационной подвижности молекулы и ее изменений при взаимодействии с различными лигандами.

Методами рентгеноструктурного анализа, направленного мутагенеза и химической модификации показана роль анионсвязывающего субцентра 1 в соединении тромбина с фибриногеном, тромбомодулином, кофактором II гепарина, рецептором, активируемым протеиназой (ПАР) и высокоспецифическим экзогенным ингибитором тромбина — гирудином. Анионсвязывающий субцентр-2 отвечает за узнавание гепарина.

Экзосайт-1, взаимодействуя с комплементарными участками специфических субстратов, ингибиторов и рецепторов, отвечает за высокую протеолитическую специфичность тромбина и его регуляторные свойства. Так, при исследовании влияния пептида, имитирующего аминокислотную последовательность N-концевого участка $\text{A}\alpha$ -цепи фибриногена, было показано, что он неконкурентно ингибирует свертывающую активность тромбина, связываясь не с его активным центром, а с экзосайтом-1 [82, 181, 182].

Тромбин является Na^+ -зависимым аллостерическим ферментом. Идентифицированы два участка связывания Na^+ . Ионы натрия вызывают конформационную перестройку молекулы фермента, которая приводит к образованию так называемой быстрой формы тромбина, обладающей большей специфичностью и способной расщеплять фибриноген с более высокой скоростью. Медленная форма тромбина специфичнее активирует протеин С. При физиологических условиях (145 мМ NaCl) существуют две формы тромбина. Точечная замена Tpr_{60} на Asp в молекуле тромбина вызывает снижение связывания ионов натрия, что приводит к сдвигу в сторону формирования медленной формы фермента и к повышению антикоагулянтной активности тромбина [182, 183].

Образовавшийся тромбин более селективен, чем трипсин: он расщепляет в фибриногене только четыре из 376 пептидных связей, чувствительных к действию трипсина, и превращает его в фибрин. Конечная фаза системы свертывания крови характеризуется трансформацией фибриногена в волокна фибрина, активацией тромбином фактора XIII, который ковалентно прошивает фибрин, образующий основной каркас сгустка крови.

2.2.3. Регуляция системы свертывания крови

Для остановки кровотечения тромбин продуцируется в избытке и создает угрозу тромбозов. Однако в процессе образования гемостатического тромба распространение тромбообразования от места повреждения стенки сосуда по сосудистому руслу не происходит, так как этому препятствует антикоагулянтный потенциал и активация фибринолитической системы крови. Антитромботический потенциал плазмы крови на порядок превышает потенциал системы свертывания крови.

Ингибиторы системы свертывания крови обеспечивают нормальное функционирование гемостаза. Регулирование тонкого баланса между прокоагулянтными механизмами и механизмами действия антикоагулянтов имеет важное значение для выживания. Нарушение регуляции этой сложной системы приводит к тяжелым осложнениям, развитию тромбозов и геморрагий [18].

Естественные механизмы регуляции функционирования тромбина заключаются в торможении процесса образования тромбина и в инактивации тромбина плазменными ингибиторами протеиназ в жидкой фазе и на поверхности эндотелия сосудов. Эти процессы сопровождаются образованием комплекса тромбин-тромбомодулин на клетках эндотелия, активацией протеина С и блокированием образования тромбина системой С, прерывающей каскад свертывания крови на ранних его этапах; высвобождением антикоагулянта гепарина из тучных клеток, депонирующих и секретирующих его, а также высвобождением гепариноподобных гликозаминогликанов из эндотелия; секретированием тканевого активатора плазминогена и антиагрегационных простагландинов клетками эндотелия. Все эти механизмы в той или иной мере вовлекаются в общую противосвертывающую систему организма, активирующуюся при появлении в кровотоке тромбина и возникновении угрозы тромбообразования [34].

Систему ингибиторов протеолитических ферментов, регулирующих процессы свертывания крови, фибринолиза и иммуногенеза можно рассматривать как компонент универсальной системы организма, которая предотвращает избыточный протеолиз в крови. Известны два способа инактивации ферментов системы свертывания крови: блокирование и расщепление. Оба способа завершаются тем, что продукты этой реакции распознаются клеточными рецепторами и удаляются соответствующими клетками из кровотока.

Свертывание крови происходит под жестким контролем, определяющим скорость и объем протекания ферментативных процессов. Решающую роль на начальных этапах активации системы свертывания крови играет количество тканевого фактора, который высвобождается при повреждении сосуда. Центром свертывания крови является место ранения, так как тканевый фактор локализован в мембранах поврежденных клеток. Продукты активации относятся от места активации в концентрациях, недостаточных для формирования сгустка. В связи с этим при повреждении стенки сосуда сгусток образуется только в месте ранения.

Начальный этап свертывания крови — фазу инициации — блокирует ингибитор пути тканевого фактора (TFPI), являющийся ингибитором протеиназ, которые принимают участие в инициации свертывания крови. В крови присутствует как свободная форма ингибитора, так и связанная липопротеинами неактивная форма [124—126].

Установлено, что TFPI ингибирует фактор Ха, связываясь непосредственно с активным центром фермента (рис. 2.14). Ингибирование комплекса фактор VIIa-тканевый активатор проходит в две стадии. На первой стадии процесса ингибирования образуется комплекс TFPI-фактор Ха, на второй — этот комплекс связывается с комплексом фактор VIIa-тканевый активатор. В процессе формирования такого сложного комплекса существенную роль играет Gla-домен фактора Ха. По альтернативной модели TFPI связывается с ранее сформированным тройным комплексом фактор VIIa-тканевый активатор-фактор Ха, образуя четырехкомпонентный комплекс.

Роль трех доменов типа ингибитора Кунитца молекулы TFPI изучена сайт направленным мутагенезом. Установлено, что домен K2 обеспечивает связывание и ингибирование фактора Ха, а домен K1 — образование комп-

лекса с фактором VIIa, который необходим для формирования четырехкомпонентного комплекса. Отщепление домена К3 и С-концевого пептида молекулы TFPI, отвечающего за связывание гепарина, снижает сродство комплекса ингибитор-фактор Ха с отрицательно заряженной фосфолипидной мембраной [184—186].

В модельных экспериментах, выполненных в присутствии нескольких ингибиторов свертывания крови, обнаружен синергизм действия TFPI, антитромбина III и системы протеина С на процесс активации тромбина, т. е. одновременное действие двух ингибиторов вызывает более выраженный эффект. Гепарин, в том числе и низкомолекулярный, усиливает синергизм действия антикоагулянтов [152].

Как показано в модельных экспериментах, на этапе инициации образования тромбина система протеин С — антитромбин III оказывает незначительное ингибирующее действие на протяженность фазы инициации, но каждая из этих регуляторных систем имеет выраженное влияние на фазу распространения образования тромбина, когда происходит непосредственное ингибирование образовавшегося тромбина (рис. 2.15) [157].

Прямая инактивация тромбина осуществляется семейством так называемых серпинов (ингибиторов сериновых протеиназ), включающих антитромбин III, α_1 — ингибитор протеиназ (α_1 -антитрипсин), кофактор II гепарина и α_2 — макроглобулин. Семейство серпинов происходит от общего предшественника. Ингибиторы эволюционировали параллельно с сериновыми протеиназами, которые прошли путь от трипсиноподобных протеиназ широкого спектра действия до высокоспецифичных регуляторных протеиназ, способных быстро и точно реагировать на нарушения гемостаза [129, 187].

Основным ингибитором тромбина является антитромбин III, который отвечает за 75 % антитромбинового потенциала плазмы крови. Он блокирует тромбин и другие сериновые протеиназы плазмы крови (факторы свертывания крови Ха, IXa, XIIa и плазмин), подавляя не только действие тромбина, но и препятствуя его образованию.

В отсутствие гепарина в плазме крови антитромбин III медленно инактивирует тромбин. Это обусловлено тем, что между тромбином и ингибитором вначале происходит слабая ассоциация ($K_d = 1,4 \cdot 10^{-3}$). Постепенное

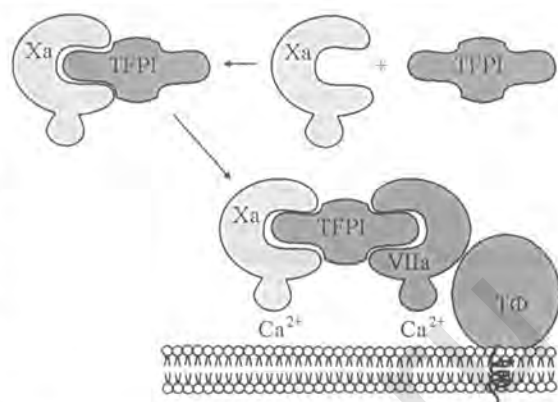


РИС. 2.14. Механизм регуляции активации фактора VIIa свертывания крови ингибитором пути тканевого фактора. В модели связывание TFPI с фактором Ха свертывания крови приводит к конформационным изменениям молекулы ингибитора, которые облегчают ингибирование фактора VIIa, находящегося в комплексе с тканевым фактором [34]

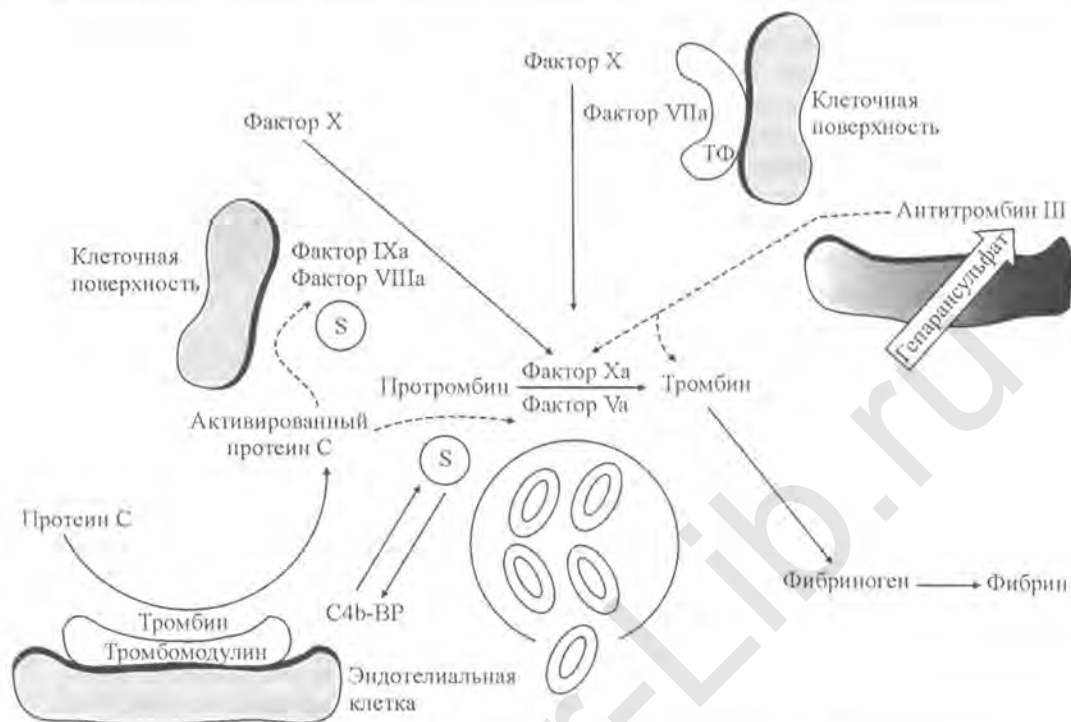


Рис. 2.15. Механизм регуляции активации фактора X и протромбина физиологическими ингибиторами [34]

действие антитромбина III предоставляет возможность свободному тромбину выполнять свою специфическую биологическую функцию.

В процессе ингибирования антитромбин III оказывает постепенное прогрессирующее действие на тромбин или фактор Xa путем образования эквимолярного стехиометрического комплекса в результате взаимодействия аргинина, реактивного участка ингибитора с серином активного центра фермента. Комплекс фермент-ингибитор стабилизируется при образовании сложной эфирной связи между карбоксильной группой Arg₃₉₃ молекулы антитромбина III и гидроксилом боковой группы серина в активном центре протеиназы, вследствие чего фермент теряет свои энзиматические свойства. Это подтверждается *in vitro* тем, что предыдущая обработка тромбина диизопропилфторфосфатом препятствует комплексообразованию с антитромбином III [188].

После расщепления связи Arg₃₉₃—Ser₃₉₄ в молекуле антитромбина III происходит конформационная перестройка (так называемая релаксация молекулы). Подобные структурные перестройки претерпевают в комплексе с тромбином α₁-антитрипсин, кофактор II гепарина, превращаясь в такую форму, которую узнают рецепторы гепатоцитов, осуществляющих клиренс комплекса ингибитор-фермент, но не нативных ингибиторов [189].

Образование комплекса фермент-ингибитор происходит относительно медленно, но прогрессивно ускоряется гепарином, катализирующим инак-

тивацию протеиназ, вследствие чего скорость реакции повышается более чем в 2000—5000 раз.

Гепарин — кислый полисахарид из числа глюкозаминогликанов, его молекулярная масса варьирует от 5 до 20 кДа. Молекула гепарина, благодаря наличию сульфогрупп, при физиологических значениях рН является полианионом.

Повышение скорости ингибирования тромбина антитромбином III в присутствии каталитических количеств гепарина обусловлено связыванием этого полианиона с остатками лизина Lys₁₁₄, Lys₁₂₅, Lys₂₈₇, Arg₁₃₂, Lys₁₃₃, Arg₁₃₆, а также аминокислотными остатками Arg₄₇, Pro₄₁, Thr₁₉, которые формируют гепаринсвязывающий домен N-концевого участка антитромбина III. Молекулярной основой высокого сродства гепарина и антитромбина III служит уникальный пентасахарид с 3-0-сульфатированным гликозаминном в третьем остатке (H₃), который вызывает конформационную перестройку молекулы ингибитора. Установлено, что аминокислотные остатки Lys₁₁₄, Lys₁₂₅, Lys₂₈₇, Arg₄₇ обуславливают связывание с H₃. Такой пентасахарид достаточно эффективно усиливает ингибирование фактора Ха антитромбином III. Однако изолированный пентасахарид малоэффективен в катализе ингибирования тромбина, поскольку для образования тройного комплекса тромбин-антитромбин III-гепарин требуется фрагмент гепарина, состоящий из 18 моносахаридов.

Кинетические исследования образования тройного комплекса антитромбин III-тромбин-гепарин, проведенные *in vitro*, показали, что сродство связывания гепарина с ингибитором выше, чем с тромбином, поэтому сначала образуется бимолекулярный комплекс антитромбин III-гепарин. Образование этого комплекса сопровождается конформационными перестройками молекулы антитромбина III и изменением в положении реактивного аргинина ингибитора.

Связывание этих компонентов тройного комплекса индуцирует последующее присоединение третьего компонента. Вместе с тем не следует исключать связывание тромбина с гепарином, особенно в условиях *in vivo*, и модуляцию центра узнавания высокомолекулярных соединений и конформационных изменений фермента, облегчающих ингибирование антитромбином III. Существование в структуре антитромбина III реактивного участка, ответственного за связывание фермента, и домена, связывающего гепарин, подтверждено анализом нарушений в регуляции системы свертывания крови, вызванных врожденными дефектами молекулы антитромбина III.

В процессе ингибирования комплекс антитромбин III-тромбин закрепляется, а гепарин отщепляется. Таким образом, гепарин является катализатором образования комплекса АТIII-тромбин [7, 129, 190—194].

К важным регуляторным механизмам свертывания крови принадлежит сложная многофункциональная система протеина С, которую рассматривают как один из самых ранних и быстрых механизмов, включающихся в процесс регуляции гемостаза при угрозе тромбообразования (табл. 2.2). Активация системы свертывания крови приводит к быстрому потреблению основного компонента этой системы — протеина С, что в настоящее время рассматривается как один из главных показателей развития тромбофилии [30—32].

Таблица 2.2. Характеристика компонентов антикоагулянтной системы протеина С

Белок, молекулярная масса	Содержание, нМ	Домены	Функции
Протеин С, 62 кДа	60	Gla, 2 EGFs, AP, SP	Ингибитор свертывания крови (расщепление факторов V/Va, VIII/ VIIIa). Участвует в воспалительных и апоптозных процессах. АПС расщепляет ПАР-1
Тромбомодулин *, 75 кДа		Лектинподобный, гидрофобный, 6 EGFs, S/T, трансмембранный, цитоплазматический	Трансмембранный белок эндотелиальных клеток, кофактор тромбина в процессе активации тромбином протеина С и TAFI
Рецептор EPCR, 50 кДа	Не опр.	MHC/CD1	Мембранный белок; связывает Gla-домен протеина С; стимулирует его активацию комплексом тромбин-тромбомодулин и расщепление ПАР-1 активированным протеином С
Фактор V, 330 кДа	20	A1, A2, B, A3, C1, C2	Предшественник прокоагулянта фактора Va, кофактор протромбиназного комплекса
Фактор VIII, 330 кДа	0,7	A1, A2, B, A3, C1, C2	Предшественник прокоагулянта фактора VIIIa, кофактор теназного комплекса
Протеин S, 75 кДа	300	Gla, TSR, 4 EGFs, SHBG (2LamG домены)	Кофактор протеина С, связывает C4BP с апоптозными клетками, стимулирует фагоцитоз
C4BP, 570 кДа	Не опр.	8 CCP _s , 3 CCP _s	α -Цепи — кофакторы фактора I — фермента, регулирующего систему комплемента; β -цель связывает протеин S
Ингибитор протеина С, 60 кДа	Не опр.	Домен серпинового типа	Ингибитор активированного протеина С и других протеиназ; стимулируется гепарином
α_1 -Антитрипсин, 60 кДа	Не опр.	Домен серпинового типа	Ингибитор активированного протеина С и других протеиназ

* Тромбомодулин присутствует в количестве 100 000 копий на эндотелиальную клетку. Концентрация свободного тромбомодулина в крупных сосудах ~ 0,1—0,2 нМ; при взаимодействии с тромбином его локальная концентрация увеличивается до 10 нМ; в микрососудах его концентрация достигает 500 нМ. Таким образом, в соответствии с распределением тромбомодулина активность протеина С разветвляется преимущественно в микроциркуляторном русле [30]. Не опр. — не определено.

Активированный протеин С является одним из основных белков анти-тромботического регуляторного механизма, он функционирует как анти-коагулянт, принципиально отличающийся от действия специфических ингибиторов факторов свертывания крови и от действия системы фибринолиза.

В отличие от ингибиторов тромбина семейства серпинов, которые непосредственно ингибируют сериновые протеиназы ферментативного каскада системы свертывания крови, протеин С снижает прокоагуляционный потенциал плазмы крови путем ограниченного протеолиза неферментативных кофакторов Va и VIIIa, участвующих в активации ключевых проферментов системы свертывания крови.

Еще одной функцией активированного протеина С является его способность стимулировать фибринолиз [195, 196]. Механизм профибринолитической активности протеина С описан подробно в гл. 3.

Активация протеина С осуществляется комплексом тромбин-тромбомодулин на фосфолипидной мембране клеток. Тромбомодулин является высокоаффинным рецептором тромбина и выполняет роль кофактора в процессе активации протеина С. Он экспрессируется в эндотелиальных клетках сосудов, тромбоцитов, моноцитов, макрофагов. Связывание тромбина с тромбомодулином блокирует прокоагулянтную активность тромбина. Таким образом, тромбомодулин действует как своего рода “переключатель” субстратной специфичности тромбина [2, 30, 31].

Тромбомодулин входит в состав эквимольного комплекса с тромбином за счет взаимодействия пятого и шестого EGF-подобных доменов с В-цепью тромбина. Три последних EGF-домена формулируют минимальный фрагмент тромбомодулина, который способен функционировать в качестве кофактора активации протеина С. В процессе образования комплекса тромбин-тромбомодулин важен участок, содержащий остатки серина и треонина, в котором ковалентно присоединена цепь хондроитинсульфата с высокоаффинным фрагментом. Установлено также, что аминокислотный остаток Asp₃₄₉ играет критическую роль в кальцийзависимом связывании тромбомодулина и Gla-домена протеина С. В присутствии ионов кальция тромбомодулин увеличивает эффективность действия тромбина в процессе активации протеина С в 1000 раз и более.

Образование комплекса, способного активировать протеин С на поверхности клетки, сопровождается конформационной перестройкой активного центра тромбина, в результате чего тромбин теряет свои свертывающие свойства и приобретает способность активировать протеин С [38, 39]. В настоящее время установлено, что в процессе активации протеина С существенную роль играет EPCR — специфический клеточный эндотелиальный рецептор протеина С, который способствует концентрированию протеина С на поверхности стенок сосудов, что ускоряет его активацию комплексом тромбин-тромбомодулин.

Одной из основных функций активированного протеина С является регуляция процесса свертывания крови путем инактивации неэнзиматических кофакторов Va и VIIIa. Это приводит к торможению активации протромбина и фактора X и тем самым препятствует образованию фибрина, появление которого создает угрозу развития тромбозов.

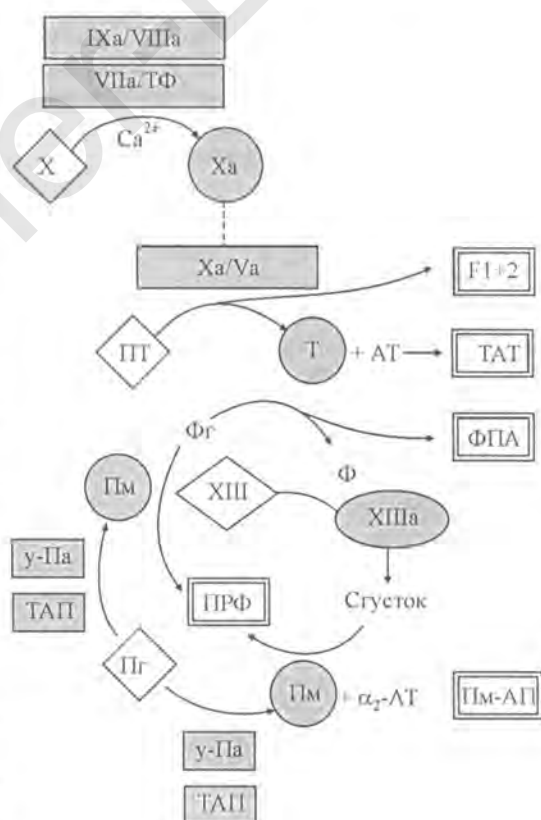
Для эффективного функционирования активированного протеина С на фосфолипидной мембране необходимо присутствие кофактора — протеина S, способствующего взаимодействию протеина С с фосфолипидными мембранами тромбоцитов и эндотелиальных клеток [34, 197]. 30—40 % протеина

S в свободной форме циркулирует в плазме крови и может быть нековалентно ассоциирован с C4b-связывающим белком, который является регулятором классического пути активации системы комплемента [42]. Только свободная форма протеина S функционирует как активный компонент системы протеина C. Протеины C и S взаимодействуют Gla-доменами с фосфолипидными мембранами в присутствии ионов кальция. Кофакторная функция протеина S в процессе инактивации факторов Va и VIIIa заключается в усилении связывания протеина C с фосфолипидной мембраной и смещении его активного центра относительно мембраны, что способствует эффективности действия протеина C.

Протеин S проявляет антикоагулянтные свойства независимо от протеина C, что обусловлено его конкуренцией с протромбином за связывание с фактором Va. Показано также, что протеин S связывает и ингибирует фактор Xa, образовавшийся по внутреннему пути свертывания крови. Фосфолипиды не оказывают влияния на это взаимодействие, а ионы кальция усиливают ингибиторный эффект. Механизм ингибирования состоит в обратном, специфическом и высокоафинном взаимодействии протеина S с фактором VIIIa. Этот эффект был обнаружен в присутствии клеток эндотелия. Наличие тромбоцитов усиливает ингибирующее действие протеина S [34, 198, 199].

Ингибирующее действие активированной системы протеина C реализуется путем ограниченного расщепления факторов Va и VIIIa системы свертывания крови. Активация протеина C сопровождается расщеплением молекулы профермента и конформационной перестройкой, которая приводит к повышению сродства C-концевого участка каталитического домена активированного протеина C к активированным факторам Va и VIIIa. Во взаимодействии с активированным протеином C принимают участие аминокислотные остатки Arg₁₈₆₅—Phe₁₈₇₄ легких цепей фактора Va и His₂₀₀₉—Val₂₀₁₈ молекулы фактора VIIIa. Неактивированные кофакторы V и VIII резистентны к действию активированного протеина C (см. рис. 2.6).

Инактивация фактора VIIIa протеином C сопровождается



расщеплением пептидной связи Arg₃₃₆—Met₃₃₇ в А1-домене и Arg₅₆₂—Gly₅₆₃ в А2-домене.

В молекуле фактора Va расщепление идет по остаткам Arg₃₀₆, Arg₅₀₆, Arg₆₇₉. Расщепление первой пептидной связи нарушает не только связь между А1- и А2-доменами, но и структуру участка (аминокислотные остатки 311—325), отвечающего за взаимодействие кофактора Va с фактором Ха.

Ингибиторами активированного протеина С являются специфический ингибитор протеина С и α_1 -антитрипсин. Они нейтрализуют активированный протеин С относительно медленно, однако эффективность специфического ингибитора протеина С возрастает в присутствии гепарина.

Нарушение регуляторной функции системы протеина С может быть связано как с врожденной недостаточностью самого профермента, так и с резистентностью фактора Va к активированному протеину С (РАПС), вызванной точечной мутацией гена, кодирующего этот фактор.

Мутация в молекуле фактора V, которая сопровождается заменой остатка Arg₅₀₆ глутамином, приводит к нарушению нормальной деградации фактора Va, стабилизирует протромбиназный комплекс и тем самым увеличивает скорость образования тромбина. РАПС выявлена у 40 % пациентов, страдающих тромбозами [34, 35, 200—204].

Различают наследственную и приобретенную формы резистентности. В основе приобретенной формы лежат нарушения взаимодействия фактора Va, протеина С с протеином S на фосфолипидной мембране. Эта форма РАПС сказывается при беременности и антифосфолипидном синдроме.

Снижение содержания функционально активного протеина С в настоящее время рассматривается как один из маркеров ДВС-синдрома, развивающегося при болезнях почек, печени, сердца, воспалительных процессах, онкологических и других заболеваниях [34].

В норме происходит постоянная незначительная активация системы свертывания крови, которая контролируется ингибиторами свертывания крови и фибринолитической системой. Обнаружено, что количество фибрина и продуктов его деградации находится в динамическом равновесии [205—208]. Это свидетельствует о сбалансированности систем свертывания крови и фибринолиза. При дефиците ингибиторов свертывания крови воз-

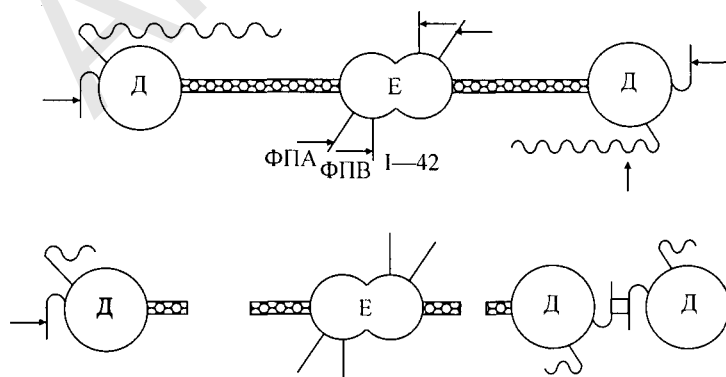


РИС. 2.16. Маркеры активации системы свертывания крови и фибринолиза при ДВС-синдроме [34]

никает угроза развития тромбофилии, причина которой может быть связана с недостаточным подавлением активации системы свертывания крови.

Нарушение взаимодействия между звеньями системы гемостаза может привести как к тромбозу и эмболии, так и к кровотечению. Многие заболевания сопровождаются диссеминированным внутрисосудистым свертыванием крови (ДВС-синдром), которое относится к приобретенным нарушениям системы гемостаза и рассматривается как неспецифическая общепатологическая реакция организма на действие повреждающих агентов. При диагностике ДВС-синдрома необходимо определить параметры, характеризующие степень активации системы свертывания крови: РФМК, ТАТ, D-димер, фрагменты протромбина 1 + 2, активность ингибиторов системы свертывания крови (АТIII, протеина С). Для характеристики состояния системы фибринолиза определяется содержание/активность тканевого активатора плазминогена и ингибитора тканевого активатора плазминогена первого типа (рис. 2.16).

ГЛАВА 3 СИСТЕМА ФИБРИНОЛИЗА ПЛАЗМЫ КРОВИ

Система фибринолиза — одна из важнейших протеолитических систем в организме млекопитающих, которая обеспечивает поддержание крови в жидком состоянии препятствуя внутрисосудистому тромбообразованию [1—3]. Кроме того, фибринолитическая система обеспечивает лизис внеклеточных отложений фибрина: в почечных канальцах, матке, слезном канале, желчных протоках, канальцах грудных желез [2]. Необходимо также отметить, что протеиназы фибринолитической системы крови играют важную роль в процессах миграции клеток, росте сосудов (ангиогенезе), ремоделировании тканей, инвазии опухолей, иммунологических процессах, аллергических реакциях, овуляции, имплантации эмбрионов, эмбриогенезе [4—6].

Впервые термин “фибринолиз” предложил A. Dastre в 1893 г., для описания физиологического процесса лизиса фибрина [2]. Интенсивные исследования процесса фибринолиза начаты в 50-х годах XX ст. На данное время исследованы главные компоненты фибринолитической системы (табл. 3.1). Ключевым проферментом системы фибринолиза является плазминоген — одноцепочечный гликопротеин плазмы крови с молекулярной массой 92 кДа, который после активации эндогенными или экзогенными активаторами превращается в активный фермент — плазмин (КФ 3.4.21.7). Функционирование фибринолитической системы обусловлено сбалансированным взаимодействием активаторов и ингибиторов плазминогена (см. вклейку, рис. 21) [7]. Известно три типа физиологических активаторов плазминогена: урокиназа (КФ 3.4.21.73), которая обеспечивает протеолиз на поверхности клеток путем активации плазминогена или факторов роста с последующей деградацией компонентов клеточного матрикса, фактор XIIa (вносит незначительный вклад в потенциал фибринолитической системы) и тканевый активатор плазминогена (КФ 3.4.21.68), которому присуща определяющая

Таблица 3.1. Компоненты системы фибринолиза

Компонент	Молекулярная масса, кДа	Содержание в плазме	Период полужизни	Функция
Плазминоген	92	0,2 мг/мл	50 ч	Профермент
α_2 -Антиплазмин	69	0,07 мг/мл	50 ч	Ингибитор плазмينا
α_2 -Макроглобулин	725	2,5 мг/мл	Не опр.	Поливалентный ингибитор
Тканевый активатор плазминогена (ТАП)	70	5—10 нг/мл	2—3 мин	Активатор плазминогена
Урокиназа	55, 31	1 нг/мл	3—5 мин	Активатор плазминогена
Прекалликреин	88	0,04 мг/мл	25 ч	Профермент
Фактор XII	80	0,03 мг/мл	60 ч	Профермент
Ингибитор активаторов плазминогена типа 1 (ПАИ-1)	50	60 нг/мл	5—15 мин	Ингибитор
Ингибитор активаторов плазминогена типа 2 (ПАИ-2)	70	<5 нг/мл	Не опр.	Ингибитор системы комплемента и контактной активации
Активируемый тромбином ингибитор фибринолиза (ТАФИ)	49	13 мкг/мл	8 мин	Ингибитор связывания плазминоген-ТАП с фибрином

Примечание. Не опр. — не определено.

роль в деградации фибрина и тромбов в русле крови [1—3]. К экзогенным активаторам плазминогена относится стрептокиназа (белок бактериального происхождения) и рекомбинантные препараты тканевого активатора плазминогена и урокиназы, которые вводятся в организм с лечебной целью [1, 8—10].

Плазминоген активируется сосудистыми и тканевыми активаторами на поверхности фибринового сгустка, где находятся все компоненты необходимые для этого процесса. Связанный на поверхности фибрина плазмин в значительной степени защищен от ингибирующего действия α_2 -антиплазмينا (физиологический ингибитор плазмينا), благодаря этому механизму обеспечивается лизис фибринового сгустка в присутствии ингибитора. После ферментативного лизиса фибрина до фрагментов плазмин высвобождается в кровеносное русло, где быстро и необратимо ингибируется α_2 -антиплазмином. Эта модель межмолекулярных взаимодействий белковых компонентов системы фибринолиза в общем виде была сформулирована в 1978 году В. Wiman и D. Collen [11].

Регулирование процесса фибринолиза происходит на уровне ингибиторов активаторов плазминогена I, II и III типа (соответственно ПАИ-1, ПАИ-2 и ПАИ-3) или α_2 -антиплазмином, которые являются ингибиторами сериновых протеиназ и относятся к семейству серпинов [3]. Также одним из основных регуляторов активности протеолитических ферментов крови и тканей считается α_2 -макроглобулин. Он образует комплексы с сериновыми

протеиназами, снижая их активность, тем не менее, он не относится к семейству серпинов [2]. Существует также группа модуляторов фибринолитической системы, к которой относят витронектин (ВН), тромбоспондин, тетранектин и др., способные ингибировать или стимулировать процесс фибринолиза. Например, витронектин взаимодействует с функционально активным ПАИ-1, что повышает стабильность последнего [3, 12].

3.1. ПЛАЗМИНОГЕН / ПЛАЗМИН — КЛЮЧЕВОЙ КОМПОНЕНТ СИСТЕМЫ ФИБРИНОЛИЗА

Пламиноген человека — одноцепочечный гликопротеин молекулярной массой 92 кДа. Активная форма пламиногена — плазмин, сериновая протеиназа семейства химотрипсина [13]. Пламиноген найден во всех биологических жидкостях организма, некоторых тканях и компонентах крови [1—4]. Пламиноген циркулирует в крови в мономерной форме, в комплексе с α_2 -антиплазмином или фибриногеном [14].

Анализ аминокислотной последовательности тяжелой и легкой цепей пламина [15—17] и пламиногена [18—24] дал возможность определить полную аминокислотную последовательность пламиногена. Молекула нативной формы пламиногена человека состоит из 791 аминокислотного остатка и содержит 24 дисульфидные связи. На N-конце расположен остаток глутаминовой аминокислоты (такую форму обозначают как Glu-пламиноген), на C-конце — остаток аспарагиновой аминокислоты [13]. Молекула пламиногена содержит 2 % углеводов (сиаловая кислота, N-ацетилглюкозамин, нейтральные сахара), которые локализованы в участке, соответствующем тяжелой цепи пламиногена. Олигосахариды присоединены к Asp₂₈₈ и Thr₃₄₅ (рис. 3.1).

Структура тяжелой цепи Пг характеризуется наличием пяти участков гомологичной последовательности, названных “кринглами”, впервые идентифицированных в бычьем протромбине [25]. Крингловые структуры представляют особый интерес, поскольку они присутствуют практически во всех ферментах, связанных с системой свертывания крови и фибринолиза (рис. 3.2), что указывает на их роль в тонкой регуляции этих процессов.

Крингл — трехмерная петлеподобная структура, содержащая ~ 80 остатков аминокислот и три высококонсервативные дисульфидные связи. Их структуре присуща β -складчатая организация и кластер ароматических аминокислотных остатков. Основная функция крингловых структур — связывание с разными лигандами; например, кринглы пламиногена принимают участие в связывании с фибрином, α_2 -антиплазмином, тромбоспондином и клеточными рецепторами. Для характеристики связывающих участков кринглов были использованы низкомолекулярные лиганды с положительно заряженными группами. Показано, что ω -аминокарбоновые кислоты, такие как 6-аминогексановая (6-АГК), обладают антифибринолитической активностью и моделируют связывающую способность больших молекул, в частности фибрина. Фрагментация пламиногена эластазой и другими протеиназами дала возможность идентифицировать отдельные кринглы пламиногена, которые имеют связывающие участки для этих аминокислот [26]. Такие низко-

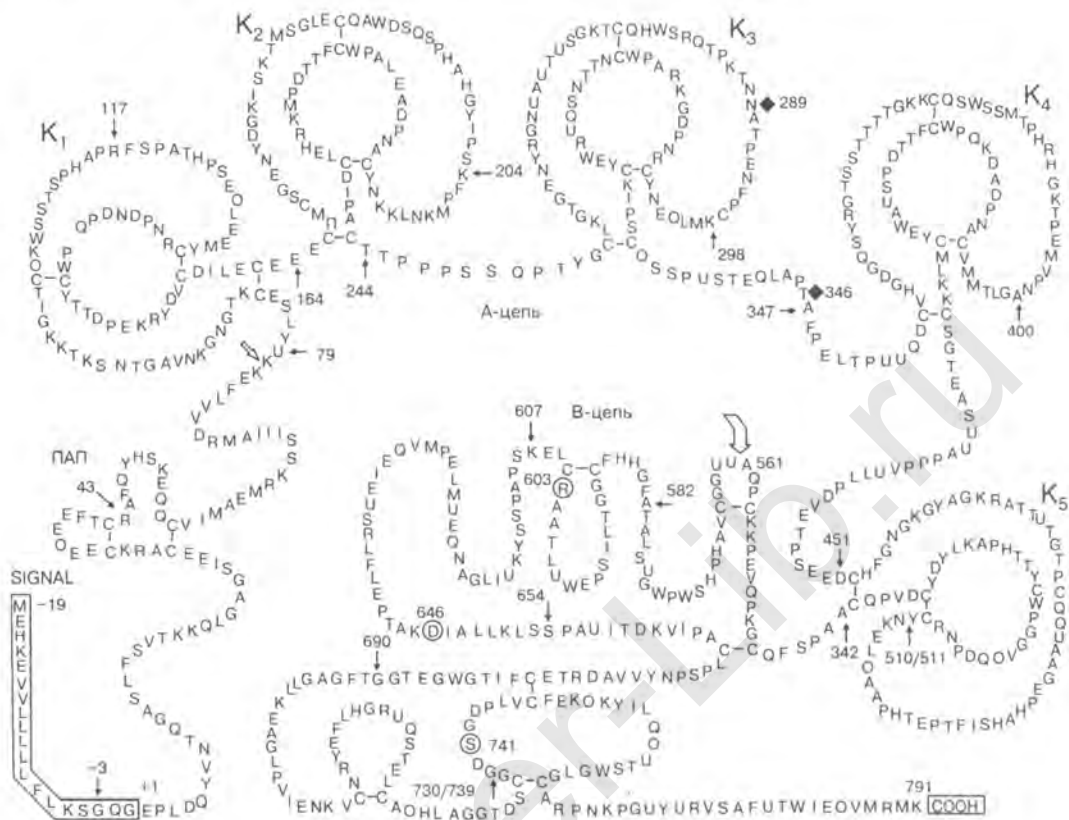
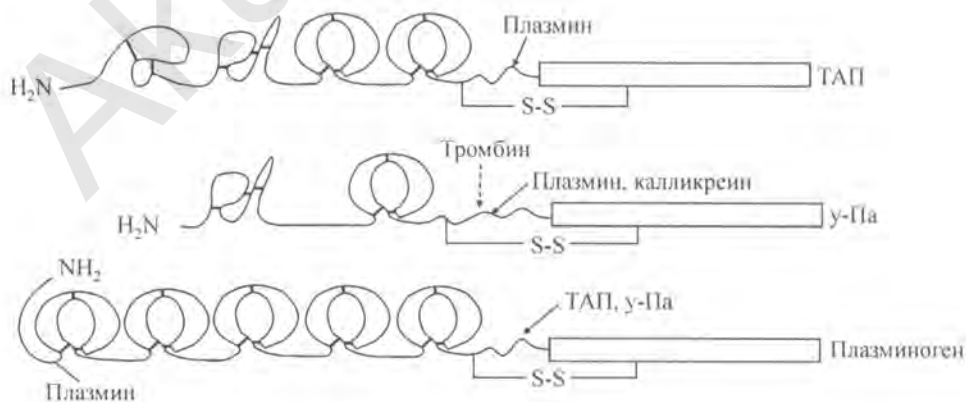


Рис. 3.1. Схема структуры молекулы плазминогена человека [13];

А-цепь, В-цепь соответственно тяжелая и легкая цепь Пг; K_1, K_2, K_3, K_4, K_5 — кринговые структуры Пг; ♦ — места присоединения гликозильных остатков; согнутая белая стрелка указывает на активационную связь $\text{Acl}_{561}-\text{Val}_{562}$; в кружочек обведенные $\text{His}_{603}, \text{Asp}_{646}$ и Ser_{741} активного центра плазмина; ПАП — преактивационный пептид



молекулярные лиганды, как *L*-лизин, 6-АГК, бензамидин, *L*-аргинин связываются с интактным пламиногеном и/или с его изолированными фрагментами по одному участку на один крингл; они называются лизинсвязывающими участками (ЛСУ) [27—31]. Структура ЛСУ охарактеризована в кристаллографических и ЯМР-исследованиях как гидрофобная пустота, в формировании которой принимает участие кластер ароматических аминокислот с удвоенным зарядом анионного центра в одном конце этой пустоты. Связывающие участки, имеющие высокую степень сродства к С-концевому остатку лизина, дополнительно образуют катионный центр в противоположном конце этой пустоты.

Согласно имеющимся данным, пламиноген превращается в плазмин путем расщепления пептидной связи Arg₅₆₁—Val₅₆₂ определенными активаторами. Эта связь расположена в дисульфидной петле, образованной мостиком Cys₅₅₇—Cys₅₆₅. Существует предположение, что эта связь важна для специфического взаимодействия с активаторами, так как благодаря дисульфидным связям расщепление Arg₅₆₁ — Val₅₆₂ не приводит к распаду молекулы пламиногена, а она из одноцепочечной превращается в двухцепочечную и состоит из двух полипептидных цепей: тяжелой — А-цепи, расположенной в N-конце молекулы, и легкой В-цепи, которая находится в С-концевом участке. Молекула плазима относится к эндопептидазе — двухцепочечной трипсиноподобной сериновой протеиназе с активным сайтом, состоящим из His₆₀₃, Asp₆₄₆, Ser₇₄₁ [3, 13]. Сериновый протеиназный домен плазима (последовательность Val₅₆₂—Asn₇₉₁) — активная сериновая протеиназа с широким спектром субстратной специфичности, которая гидролизует пептидные связи с С-концевыми остатками аргинина и лизина [32]. Поскольку во всех сериновых протеиназах трипсинового ряда вторичная структура гомологична, В-цепь плазима тоже состоит из двух β-складчатых структур с небольшим участком α-спирали [33].

Синтезируется пламиноген преимущественно клетками печени, хотя его синтез был выявлен также в почках, эозинофилах, клетках микроглии мозга и в семенниках [2, 13, 34]. В норме концентрация пламиногена в крови колеблется в пределах 1,2—2,0 мкм, тем не менее уровень пламиногена в крови изменяется при разных физиологических процессах [4]. Содержание

◀ РИС. 3.2. Схема структуры основных компонентов системы фибринолиза [1]

ТАП состоит из пальцевида домена фибриноектина, домена фактора роста эпидермиса, двух крингл- и каталитического доменов. Связывание ТАП с фибрином обеспечивается доменом фибриноектина и крингл-2, а связывание с ПАИ-1 — крингл-2 и остатками 296—304 N-концевой области каталитического домена. Одноцепочечная урокиназа состоит из домена фактора роста эпидермиса, крингл- и каталитического доменов. Плазмин и калликреин расщепляют одноцепочечную урокиназу по Lys₁₅₈ с образованием двухцепочечной формы фермента, активирующей как свободный, так и связанный с фибрином пламиноген. Тромбин расщепляет одноцепочечную урокиназу по Arg₁₅₆ с образованием формы, которая не активирует свободный пламиноген, но может медленно активироваться пламином в результате расщепления по Lys₁₅₈. Пламиноген состоит из пяти крингл-доменов (содержащих участки связывания с фибрином, α₂-антипламином и рецепторами на клетках) и каталитического домена.

плазминогена наиболее низкое у плода, новорожденных, больных циррозом печени и значительно возрастает на последних месяцах беременности, при инфекционных заболеваниях, травмах и злокачественных опухолях [2].

3.2. ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ АКТИВАТОРЫ ПЛАЗМИНОГЕНА

К основным физиологическим (эндогенным) активаторам плазминогена, выявленным в различных тканях и биологических жидкостях [35], относятся активаторы плазминогена тканевого и урокиназного типов. В отличие от плазмина, которому присуща широкая субстратная специфичность, активные центры ТАП и урокиназы высокоспецифично гидролизуют пептидную связь плазминогена ($\text{Arg}_{561}-\text{Val}_{562}$), что и приводит к его активации.

Существует также фактор XIIa (фактор Хагемана)—зависимый путь активации плазминогена, связанный с активацией каллекреин-кининовой системы и системы комплемента. Однако, как считают, этот путь активации не играет значительной роли в процессе фибринолиза [35]. Роль активаторов плазминогена — урокиназы и ТАП в деградации фибрина и тромбов *in vivo*, исследована в экспериментах с использованием трансгенных мышей, в которых отсутствовал один из этих активаторов или оба одновременно [36]. Инактивация у мышей гена тканевого активатора плазминогена вызывает нарушения лизиса сгустков. Инактивация гена урокиназы приводит к локальным отложениям фибрина, дефицит плазминогена или одновременный дефицит тканевого активатора плазминогена и урокиназы вызывает обширные спонтанные отложения фибрина.

3.2.1. Тканевый активатор плазминогена

Тканевый активатор плазминогена (ТАП) — единственная протеиназа системы гемостаза, которая постоянно секретируется эндотелиальными клетками в активной форме [1]. Синтезируется ТАП эндотелиальными клетками стенок главным образом малых вен, хотя ее синтез происходит и в малых артериях, больших венах, а также в лимфатических сосудах. Концентрация в плазме ТАП в свободной и комплексной форме с ПАИ-1 составляет 5 нг/мл, а концентрация свободного ТАП — менее чем 1 нг/мл [1—4, 37]. Нативная молекула ТАП — одноцепочечный гликопротеин молекулярной массой 70 кДа, который состоит из 527 аминокислотных остатков и содержит 17 дисульфидных мостиков, 35 остатков цистеина и 3 N-гликозилированных сайта (Asn_{117} , Asn_{184} , Asn_{448} ; рис. 3.3) [14]. Степень гликозилирования ТАП влияет на скорость образования двухцепочечной формы активатора под действием плазмина [38]. Двухцепочечная форма образуется вследствие ограниченного гидролиза пептидной связи $\text{Arg}_{275}-\text{Pe}_{276}$ плазмином, калликреином или фактором Ха. Состоит она из тяжелой цепи молекулярной массой 31 кДа, которая начинается с N-концевой части молекулы, и легкой цепи молекулярной массой 28 кДа, содержащей C-концевую группу. Соединены эти цепи дисульфидной связью между Cys_{264} и Cys_{395} .

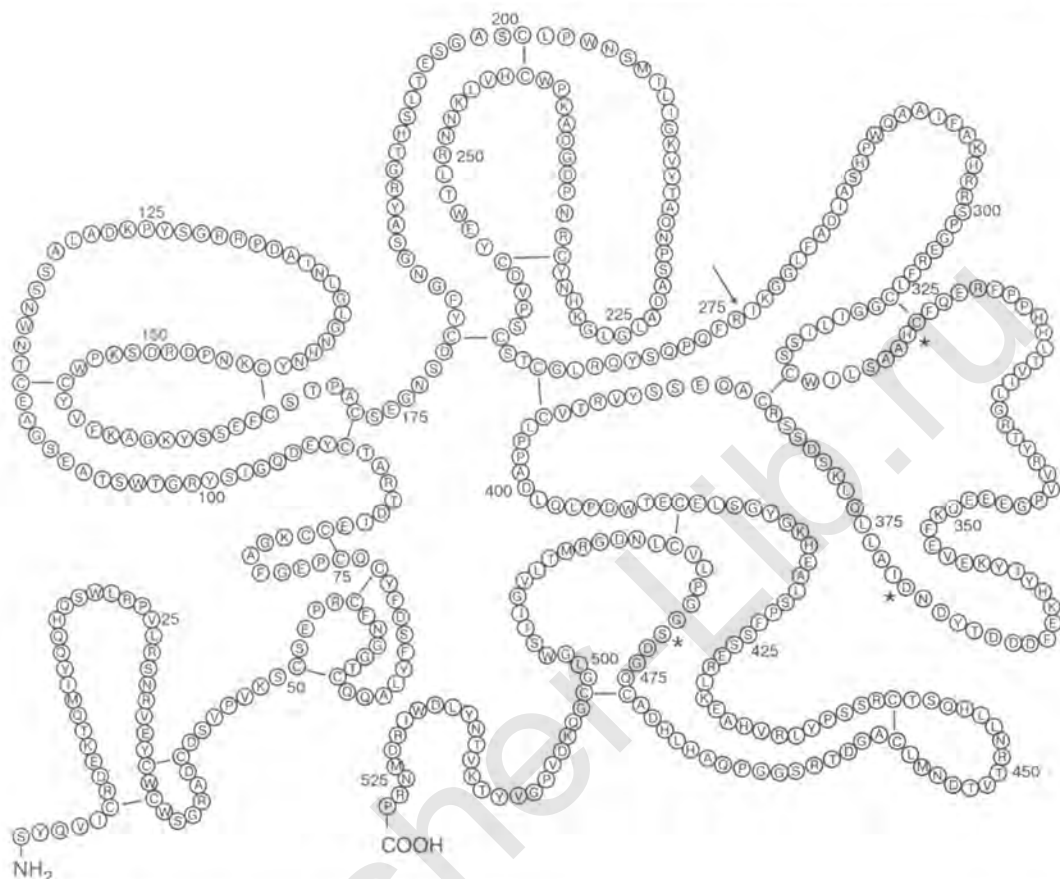


Рис. 3.3. Схема структуры молекулы тканевого активатора плазминогена человека [14]. Стрелкой обозначен сайт Arg₂₇₅—Phe₂₇₆ гидролиз которого приводит к образованию двухцепочечной формы, звездочкой — аминокислотные остатки активного центра

Молекула ТАП включает 5 структурных доменов (рис. 3.2). Тяжелая цепь состоит из двух крингловых доменов, содержащих 88 (87 — 175) и 86 (176 — 262) аминокислотных остатков, высокоомологичных к кринглам плазминогена; из “фигер”-домена (аминокислотные остатки 4—50), гомологичного к выявленной в фибронектине структуре; из домена, содержащего аминокислотные остатки 50—87 и похожего на эпидермальный фактор роста — принимает участие во взаимодействии с клетками печени. В легкой цепи расположен домен сериновой протеиназы (аминокислотные остатки 276 — 527) с активными сайтами His₃₂₂, Asp₃₇₁, Ser₄₇₈. Аминокислотная последовательность, окружающая каталитический сайт, высокоомологична соответствующим сайтам других сериновых протеиназ. Все сериновые протеиназы содержат высококонсервативные остатки цистеина. Свидетельством высокой специфичности активного центра ТАП является наличие лишь одного субстрата — пептидная связь плазминогена Arg₅₆₁—Val₅₆₂. При физиологических условиях ТАП акти-

вирует Пг преимущественно в присутствии макромолекул (фибрина, компонентов экстрацеллюлярного матрикса) [14, 39, 40] или клеточных рецепторов [3, 4]. При активации плазминогена происходит его перестройка в двухцепочечную активную форму—плазмин вследствие специфического расщепления пептидной связи Arg₅₆₁—Val₅₆₂. При этом две цепи остаются связанными между собой двумя дисульфидными мостиками. Дисульфидная связь Cys₅₇₇—Cys₅₆₅ уникальна для плазмينا, благодаря которой пептидная связь, расщепляемая во время активации, находится в узкой петле, что делает ее чувствительной к действию тканевого активатора плазминогена.

В большинстве случаев одноцепочечные формы сериновых протеиназ — неактивные проферменты. ТАП является исключением из этого правила и имеет сформированный активный центр (His₃₂₂, Asp₃₇₆, Ser₄₇₈), благодаря чему проявляет каталитическую активность и способность связываться с ингибиторами, например с ПАИ [1, 3]. Методом рентгеноструктурного анализа протеиназного домена одноцепочечной формы ТАП установлен молекулярный механизм этого феномена. Он состоит в образовании солевого мостика между карбоксильной группой Asp₄₇₇ и аминогруппой Lys₄₂₉, что даже при отсутствии N-концевого Ile₂₇₆ двухцепочечной формы индуцирует конформационные изменения, достаточные для появления активного центра [41]. Свободные одно- и двухцепочечная формы ТАП имеют одинаковые плазминогенактивирующие свойства, но на поверхности фибрина одноцепочечная форма сразу превращается в двухцепочечную, которая активирует плазминоген на поверхности фибрина почти в 30 раз быстрее. Активность ТАП увеличивается не вследствие протеолитического расщепления его полипептидной цепи, а вследствие взаимодействия с белковым эффектором. Тем не менее это преобразование не играет значительной роли в регуляции фибринолиза. При отсутствии фибрина активация плазминогена тканевым активатором происходит весьма медленно. В присутствии фибрина, к которому и плазминоген, и ТАП имеют высокое сродство, K_M реакции активации уменьшается с 65 до 0,16 мкМ, тогда как каталитическая константа почти не изменяется в обоих случаях и приблизительно равна 0,1 с⁻¹. На частично деградированном фибрине активация Глу-плазминогена тканевым активатором возрастает, K_M уменьшается до 0,06 мкМ. Ускорение активации авторы объясняют экспозицией новых потенциальных участков связывания для ТАП и плазминогена на фибрине [42]. Предложен механизм активации плазминогена тканевым активатором, согласно которому ТАП, плазминоген и фибрин формируют тройной циклический комплекс, вследствие чего получается плазмин, связанный с фибрином, где ТАП и плазмин защищены от инактивирующего действия соответственно ПАИ-1 и α_2 -антиплазмина [14, 43]. Результаты экспериментов В. Ньювенхаузена дают основания считать, что на фибрине ТАП-связывающим участком является последовательность γ 312—324, а последовательность A α 148—60 — плазминогенсвязывающий участок фибрина [44]. Эффекторные функции фибрина в процессе фибринолиза изменяются, поскольку фибрин модифицируется плазмином. Предполагают, что связывание ТАП с нативным фибрином происходит за счет “фингер”-домена, а после частичной деградации фибрина плазмином резко увеличивается количество связанного

активатора за счет взаимодействия второго крингла ТАП с С-концевыми остатками лизина, образующимися на фибрине [26].

Во взаимодействии ТАП с его главным физиологическим ингибитором (ПАИ-1) важную роль играет не только активный центр, но и крингл-2 и область, представленная аминокислотными остатками 296—304. Поскольку участки взаимодействия ТАП с фибрином и ПАИ-1 перекрываются только частично, то комплекс ТАП-ПАИ сохраняет свойство связываться с фибрином и может быть конкурентным ингибитором ТАП в активации лизиса тромбов [1].

Расщепление фибрина плазмином ускоряет фибринолиз за счет увеличения связывания и локальной концентрации как ТАП, так и плазминогена, для которого увеличивается число потенциальных участков связывания на фибрин-мономере с одного до трех [3].

Тканевый активатор плазминогена и плазмин могут образовывать тройные комплексы с рядом клеточных рецепторов, например с анексином II (клетки эндотелия) и с рецепторами, расположенными на моноцитах [14].

Секреция ТАП в русло крови обеспечивается двумя механизмами: быстрым высвобождением из клеточного пула, где накапливается тканевый активатор плазминогена, или длительным путем — синтезом *de novo*. Венозные закупорки, физические упражнения, некоторые вещества, такие как катехоламины, брадикинины или дезамино-8-д-Arg-вазопресин (DDAVP), вызывают быстрое повышение (меньше минуты) уровня ТАП в крови [5]. Этот ответ происходит по пути быстрого механизма.

Группа других веществ-стимуляторов, таких как тромбин, гистамин, бутират, фибробластный фактор роста, активированный протеином С, бутанол, алкогольпроизводные и ретиноиды стимулируют синтез ТАП [5]. Тем не менее только несколько соединений были идентифицированы как стимуляторы синтеза ТАП без синтеза ПАИ-1, а именно: гистамин, бутират. Сосудоактивирующие вещества — гистамин и тромбин — связываются со специфическими рецепторами и активируют фосфолипазу С, которая гидролизует фосфатидилинозит-4,5-дифосфат с образованием двух вторичных мессенджеров: инозит-1,4,5-трифосфата и диацилглицерола. Диацилглицерол активирует мембранно-связанную протеинкиназу, которая, в свою очередь, активирует синтез тканевого активатора плазминогена. Процессы аноксии/реоксигенации эндотелиальных клеток приводят к генерированию в клетках оксидантного эффекта и снижению синтеза и секреции ТАП и ПАИ-1, вследствие чего ослабляется фибринолитическая активность эндотелиальных клеток. Возможно, этот механизм связан с патофизиологией ишемии.

Инактивация и вывод из русла крови тканевого активатора плазминогена осуществляется путем формирования неактивного комплекса со специфическими ингибиторами сериновых протеиназ, преимущественно с ингибитором активаторов плазминогена первого типа (ПАИ-1) или α_2 -антиплазмином [1, 3]. Известно, что содержание ПАИ-1 в крови довольно высокое, а время полужизни ТАП в кровотоке составляет 5 мин и большая часть секретируемого ТАП ингибируется ПАИ-1 раньше, чем происходит взаимодействие с фибрином. Тем не менее комплекс ТАП-ПАИ-1 не сразу выводится из организма. Циркулируя в русле крови определенное время, он способен свя-

зываются с фибрином, мешая взаимодействию функционально активного ТАП с сайтами связывания на фибрине, на основании чего некоторые авторы предполагают, что комплекс ТАП-ПАИ-1 имеет определенные свойства, которые еще необходимо исследовать [1].

3.2.2. Активатор плазминогена урокиназного типа

Урокиназа, или активатор плазминогена урокиназного типа (у-Па), впервые выявлена в моче и описана как потенциальный фибринолитический агент. Физиологической функцией урокиназы, вероятно, является превращение плазминогена в плазмин в мочевыводящих путях и растворение в них сгустков крови, если они образуются. Ж. Фермилен и М. Ферстрате считают, что при активации плазминогена урокиназой активность фибринолиза повышается не только в мочевыводящих путях, но и в слезном канале, семенном канатике, желчевыводящих путях, в канальцах молочных желез. у-Па — высокоспецифическая протеиназа прямого действия, которая синтезируется и секретируется многими типами клеток на разных стадиях их жизненного цикла [45]. Синтезируется и циркулирует как одноцепочеч-

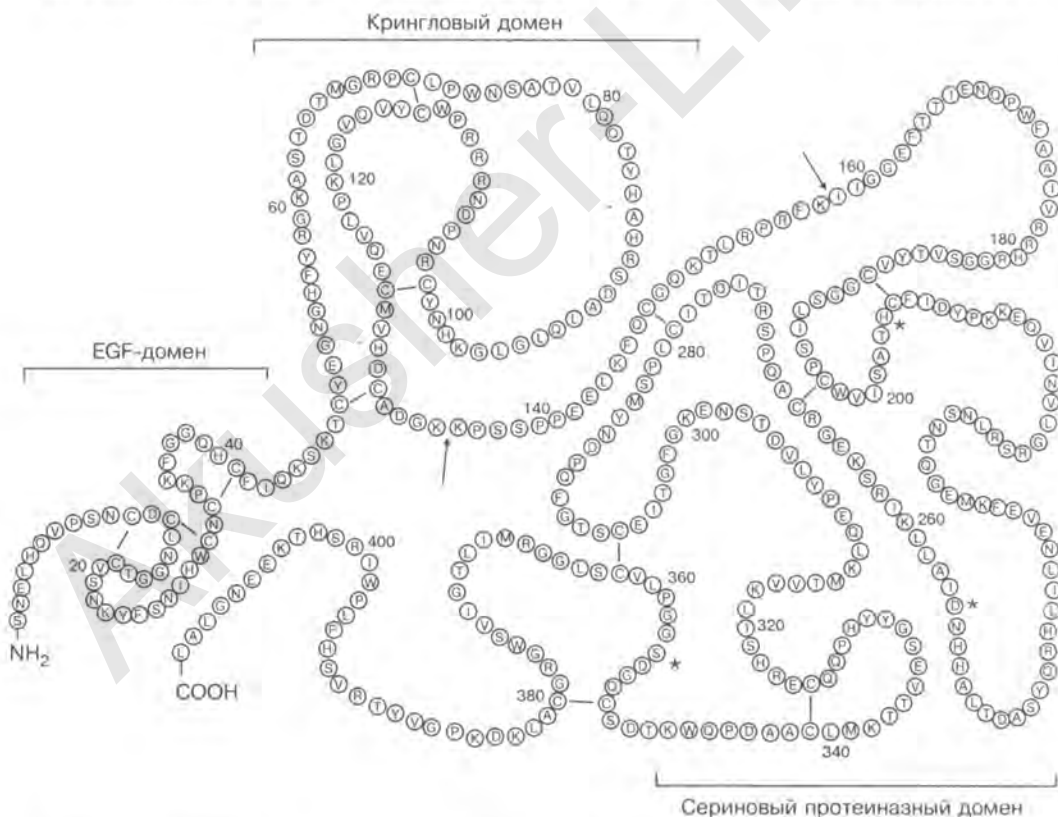


Рис. 3.4. Схема структуры молекулы одноцепочечной урокиназы. Стрелками указаны места расщепления протеолитическими ферментами [14]

ный профермент одноцепочечная урокиназа, или проурокиназа, с молекулярной массой 54 кДа и состоит из 411 аминокислотных остатков [46—49]. Вследствие ограниченного протеолиза плазмином или калликреином пептидной связи $\text{Lis}_{158}-\text{Phe}_{159}$ молекула урокиназы превращается в активную двухцепочечную форму, две цепи которой соединены одной дисульфидной связью. Каталитический центр урокиназы расположен в протеиназном домене (аминокислотные остатки 159—411) и сформирован His_{204} , Asp_{255} и Ser_{356} (рис. 3.4). N-концевая цепь в своем составе содержит участок, гомологичный эпидермальному фактору роста человека, за ним расположен крингловый домен, который гомологичен кринглам плазминогена и ТАП, хотя и не содержит лизинсвязывающие участки и соответственно не взаимодействует с фибрином [50]. Тромбин расщепляет $\text{Arg}_{156}-\text{Phe}_{157}$ -пептидную связь в одноцепочечной урокиназе с образованием неактивной формы ($M_r = 33$ кДа), которая может превращаться в активную форму ($M_r = 32$ кДа) после расщепления $\text{Lis}_{158}-\text{Phe}_{159}$ -пептидной связи плазмином [51]. Высокомолекулярная двухцепочечная и низкомолекулярная активная формы урокиназы имеют похожие ферментативные свойства [52]. Одноцепочечная форма урокиназы проявляет весьма низкую активность по отношению к низкомолекулярным хромогенным субстратам, в то же время при переходе в двухцепочечную форму она проявляет полную амидазную активность. Одноцепочечная урокиназа не взаимодействует с естественными основными ингибиторами ПАИ-1 и ПАИ-2 [53]. В плазме из-за отсутствия фибрина одноцепочечная урокиназа стабильна и не активирует плазминоген, в присутствии фибрина именно эта форма, а не двухцепочечная урокиназа индуцирует фибринзависимый лизис сгустка [54]. Фибринспецифичность одноцепочечной урокиназы не зависит от перехода в двухцепочечную форму или Глу-Пг к Лиз-форме плазминогена, а обусловлена повышением связывания плазминогена с частично деградированным фибрином [54]. Активация плазминогена двухцепочечной урокиназой не зависит от наличия фибрина и происходит в растворе [52]. Скорость активации Глу-плазминогена (но не Лиз-плазминогена) двухцепочечной урокиназой повышается в 10—20 раз в присутствии фибрина или ω -аминокарбоновых аминокислот за счет конформационных перестроек в нативном плазминогене [52].

На мембранах клеток имеются специфические рецепторы к урокиназе (у-Па). Поскольку рецепторы урокиназы экспрессированы в целом ряде клеток, бесспорно важна роль урокиназы в миграции клеток, перестройке тканей, клеточной адгезии и хемотаксисе [45, 55, 56]. Рецептор является богатым цистеином гликопротеином, не имеющим трансмембранного и внутриклеточного доменов. Взаимодействие с мембраной обеспечивается ковалентной связью С-конца рецептора с гликозилфосфатидилинозитолом. Связывание урокиназы с у-Па обеспечивается N-концевым EGF-доменом и характеризуется высокими сродством ($K_d \sim 10^{-9} - 10^{-10}$ М) и специфичностью, так как другие EGF-содержащие компоненты системы гемостаза с этим рецептором не взаимодействуют. Связанная с у-Па урокиназа активирует сигналпроводящую систему клеток, плазминоген и матриксные протеиназы, что обеспечивает активацию клеток и деградацию внеклеточного матрикса, необходимую для их роста, деления и миграции.

Период полужизни урокиназы в плазме крови составляет около 3 мин, выводится у-Па печенью. Протеолитическая активность урокиназы на поверхности клетки регулируется специфическими ингибиторами активаторов пламиногена — ПАИ-1, ПАИ-2, протеазным нексином-1 (ПН-1) и ингибитором протеина С. Они образуют необратимый ковалентный комплекс с ферментом. ПАИ-1 является одним из основных ингибиторов урокиназы. Помимо этого он принимает участие в процессах эндоцитоза и внутриклеточной деградации инактивированной урокиназы. Установлено, что формирование комплекса урокиназы с ПАИ-1 включает две стадии. Первая — стадия комплексообразования — обратима, вторая — сопровождается расщеплением ингибитора — он остается связанным эфирной связью с серином активного центра фермента. Связанный с у-Па комплекс урокиназы с ингибитором удаляется с поверхности клетки путем интернализации через клатринокаймленные ямки при участии рецепторов, принадлежащих к семейству рецепторов липопротеинов низкой плотности. Показано также, что интернализация и деградация одноцепочечной и двухцепочечной форм урокиназы, связанных с рецептором α_2 -макроглобулина, возможны и без участия ПАИ-1, однако инактивация урокиназы ПАИ-1 существенно повышает скорость ее эндоцитоза [57].

Одноцепочечная урокиназа в отличие от двухцепочечной не активирует пламиноген системно, хотя стимулирует разрушение фибриновых сгустков [58]. Механизм избирательности объясняют связыванием одноцепочечной урокиназы с пламиногеном, иммобилизованным на фибрине в Лиз-конформации [58, 59]. Урокиназа и ТАП в случае одновременного участия в разрушении фибринового сгустка проявляют синергичный эффект [60]. ТАП активирует Глу-пламиноген на нативном фибрине, а одноцепочечная урокиназа преимущественно активирует пламиноген, который связан с частично расщепленным фибрином с участием С-концевого остатка лизина.

3.2.3. Роль белков контактной активации в регуляции системы фибринолиза

К белкам контактной фазы свертывания крови относятся факторы XII и XI, прекалликреин (ПК) и высокомолекулярный кининоген (ВМК) (см. гл. 2). В настоящее время существенно пересматриваются механизмы активации и роль контактной системы в регуляции гемостаза. Если ранее эта система рассматривалась в основном как начальный этап внутреннего пути гемокоагулирующего каскада, то сейчас уже стало ясно, что она принимает участие в инициации фибринолиза. Активация контактной системы плазмы крови играет существенную роль в регуляции фибринолиза, поскольку приводит к активации пламиногена и проурокиназы, а также вызывает секрецию ТАП из клеток эндотелия (брадикинин, образующийся при расщеплении ВМК, является сильным стимулятором высвобождения ТАП *in vivo*) [61].

Остановимся подробнее на роли активной формы фактора XII в регуляции системы фибринолиза. Фактор XII (фактор Хагемана) — гликопротеин, который после его активации, осуществляемой на отрицательно заряженных поверхностях, может инициировать внутренний путь свертывания крови,

фибринолиз и калликреин-кининовую систему. Он активирует фибринолитическую систему двумя путями: первый путь аналогичен действию стрептокиназы (фактор XIIa является непрямым активатором плазминогена), второй — участвует в превращении прекалликреина в калликреин. Калликреин кроме реципрокной активации фактора XII может расщеплять пептидную связь в плазминогене ($\text{Arg}_{560}-\text{Val}_{561}$) с образованием активного фермента плазмина. Калликреин (в большей степени, чем факторы XIIa и XIa) непосредственно активирует плазминоген, хотя менее эффективно, чем урокиназа. Тем не менее плазменный калликреин уже охарактеризован как кинетически эффективный активатор проурокиназы *in vitro* [62]. Активация проурокиназы может осуществляться на поверхности тромбоцитов и эндотелиальных клеток [63, 64].

Наиболее эффективно проурокиназа активируется при связывании калликреина через ВМК с рецептором у-Па [65]. Показано, что калликреин является кинетически благоприятным активатором проурокиназы, и активация фибринолиза может протекать без участия фактора XII [66].

Кроме того, высокая степень гомологии в структуре фактора XII, плазминогена и тканевых активаторов плазминогена свидетельствует, что контактная система относится в основном к системе фибринолиза [67]. Поэтому пациенты, у которых имеется дефицит факторов контактной фазы свертывания крови (фактор XII, прекалликреин, высокомолекулярный кининоген), могут страдать от тромбозов вследствие недостаточной активации фибринолиза.

В организме активация фибринолиза, как и активация свертывания крови, может осуществляться как по внешнему, так и по внутреннему пути. Внутренняя активация может быть обусловлена теми же факторами, что и свертывание крови, т. е. комплексами XIIa с калликреином и высокомолекулярным кининогеном. У больных с дефицитом фактора XII активация фибринолиза при физических упражнениях или сдавливании вен ниже, чем у здоровых людей [68]. Внешний путь осуществляется при участии активаторов из клеток тканей, эндотелиальных, а также клеток крови.

Очень часто при ДВС-синдроме и массивных тромбозах повышение уровня продуктов деградации фибрина сочетается с замедлением XIIa-зависимого фибринолиза со снижением содержания в крови плазминогена и его активаторов. По мнению Э.С. Баркагана [69], в этом нет никакого противоречия, так как фибринолиз с образованием продуктов деградации идет в тромбах и микросгустках фибрина, где фиксируется плазминоген и его активаторы. Следствием этого является интенсивная убыль указанных соединений из циркулирующей крови, в результате чего их концентрация в плазме снижается.

Заслуживает внимания также работа Дж. Гриффина и соавт., в которой высказывается предположение, что главный механизм стимуляции внутреннего фибринолитического пути заключается в нейтрализации ПАИ-1 фактором XIa [70].

3.3. ИНГИБИТОРЫ АКТИВАТОРОВ ПЛАЗМИНОГЕНА

Сложная многокомпонентная система фибринолиза, функционирующая в организме, контролируется не только активаторами, рассмотренными выше, но и различными ингибиторами плазмы крови и тканей.

Ингибитор активаторов плазминогена типа 1 (ПАИ-1) — одноцепочечный гликопротеин молекулярной массой 52 кДа, состоящий из 379 аминокислотных остатков (см. вклейку, рис. 22). ПАИ-1 относится к типу ингибиторов сериновых протеиназ (серпинов) и является главным ингибитором активаторов плазминогена в плазме крови [1, 3, 71]. Другие ингибиторы, такие как ПАИ-2, который синтезируется плацентой, и ПАИ-3 — ингибитор урокиназы и активированного протеина С, не выявлены в плазме в нормальном физиологическом состоянии [3, 72].

Особенностью серпинов является наличие “привлекающего” участка, являющего субстратом для фермента, на который действует ингибитор. В ПАИ-1 активный пептидный сайт Arg₃₄₆—Met₃₄₇ расположен на расстоянии 33 аминокислотных остатка от карбоксильного конца молекулы. Интактный N-конец молекулы ПАИ-1 важен для проявления его ингибирующей активности [1, 3, 73].

В плазме активность ПАИ-1 колеблется в широком диапазоне — от 0,5 до 47 МЕ/мл (в среднем 0,5—15 МЕ/мл). Концентрация свободного ПАИ-1 и в комплексной форме колеблется от 6 до 85 нг/мл (в среднем 24 нг/мл) [4].

ПАИ-1 ингибирует одно- и двухцепочечный ТАП и двухцепочечный активатор плазминогена урокиназного типа. До 40 % ТАП находится в комплексной форме с ПАИ-1 (молярное соотношение 1:1), образуя стойкий неактивный стехиометрический комплекс 1:1. Участком связывания ПАИ-1 с ТАП является семичленный пептид, расположенный вблизи активного центра фермента. Трехмерная структура серпинов и ее изменение при переходе из латентного в активное состояние и при взаимодействии с ТАП исследована W. Bode и R. Huber [74]. На модельных системах показано, что аминокислотная последовательность ПАИ-1 350—355 содержит три отрицательно заряженные сайта взаимодействия с положительно заряженным регионом в ТАП (296—304) и в у-Па (179—184). Взаимодействие ПАИ-1 с ТАП происходит в две стадии. На первой с высокой скоростью образуется обратимый комплекс, в котором происходит расщепление связи Arg₃₄₆—Met₃₄₇ каталитического центра с высвобождением C-концевого пептида ингибитора и образованием ковалентного комплекса ТАП-ПАИ-1, $k_{\text{кат}} \sim 10^7 \text{M}^{-1} \text{c}^{-1}$ [75].

В физиологических условиях в плазме ПАИ-1 представлен тремя молекулярными формами:

- неактивной комплексной формой молекулярной массой более чем 700 кДа, состоящей из ТАП, ПАИ-1 и витронектина;
- активной формой ПАИ-1 представленной комплексом ПАИ-1 — витронектин молекулярной массой 450 кДа;
- свободной формой ПАИ-1 молекулярной массой 52 кДа, тем не менее эта форма функционально неактивна [76—78].

Известны три обратимые конформации ПАИ-1: латентная (неактивная), ингибиторная и субстратная. Существование двух различных конформаций ПАИ-1 (ингибиторной и субстратной) — раньше неизвестный феномен, который присущ серпинам. Субстратные ПАИ-1 не формируют стабильный комплекс с ферментами-мишенями в отличие от ингибиторных форм, но образуют пептидную связь [4, 79].

Синтезируется ПАИ-1 эндотелиальными клетками сосудов и мегакариоцитами, при фрагментации которых ингибитор накапливается в α -гранулах тромбоцитов в комплексе с витронектином, и составляет 90 % общего количества. Это имеет важное значение в процессе тромбообразования для поддержания стабильности фибринового сгустка. При активации тромбоцитов во время тромбообразования ПАИ-1 секретируется α -гранулами, что приводит к высокой локальной концентрации ингибитора и стабилизации фибриновой матрицы тромба [1]. Предполагают, что при активации тромбоцитов отрицательно заряженные фосфолипиды экспонируются на поверхности тромбоцитарной мембраны с последующей активацией латентной формы ПАИ-1 в α -гранулах.

Период полужизни ПАИ-1 в русле крови — от 5 до 15 мин, а концентрация наибольшая утром и снижается во второй половине дня [3]. ПАИ-связывающие белки, такие, как витронектин и протеин С, — важные регуляторы активности ПАИ-1, которые также принимают участие в процессе его инактивации [3, 4]. Активированный протеин С — белок плазмы крови, образующий стабильные комплексы с ПАИ-1, после чего комплекс выводится из русла крови или образование этих комплексов приводит к деградации ПАИ-1. В этом процессе важная роль принадлежит эндотелиальным клеткам [80, 81].

Найдена корреляция между уровнем ПАИ-1 в плазме и массовым индексом тела, уровнями триглицеридов, инсулина и кровяным систолическим давлением [1, 4]. В литературе высказываются гипотезы, согласно которым высокий уровень ПАИ-1 в русле крови может вызвать повреждения стенок сосудов. Однако роль общего или локального повышения уровня ПАИ-1 в развитии атеротромбозных явлений до некоторой степени противоречива. Тем не менее существует предположение, что низкий уровень или отсутствие ПАИ-1 приводит к кровоизлияниям или задержке свертывания крови [5].

Ингибитор активаторов плазминогена типа 2 (ПАИ-2) — одноцепочечный белок, который существует во внеклеточной (гликозилированной) и во внутриклеточной (негликозилированной) формах. Молекулярная масса гликозилированной формы составляет около 60 кДа, а негликозилированной — 47 кДа. ПАИ-2 содержит 415 аминокислотных остатков. Концентрация ПАИ-2 в плазме крови незначительна, только во время беременности она возрастает до 100—300 нг/мл. Он продуцируется в плаценте клетками трофобластического эпителия, а также макрофагами, полиморфноядерными лейкоцитами и некоторыми другими клетками, в том числе и опухолевыми.

ПАИ-2 ингибирует у-Па и ТАП, образуя эквимольные комплексы с константами скорости второго порядка соответственно $9 \cdot 10^5$ и $2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$, что менее эффективно, чем ингибирование ПАИ-1. С активным центром ферментов он взаимодействует как псевдосубстрат с пептидной связью $\text{Arg}_{330}-\text{Tre}_{331}$, находящийся в реактивной петле.

Недостаточность ПАИ-2 пока не описана. Увеличение концентрации ингибитора, которая максимально выражена в триместре беременности, не коррелирует с частотой тромбозов. Хотя ПАИ-2 нередко описывается как ингибитор у-Па, в действительности, возможно, он является антагонистом какой-то другой протеиназы. В клетках он замедляет процесс апоптоза, ин-

дуцированный фактором некроза опухолей, и защищает от цитопатических эффектов вирусной инфекции, выступая как внутриклеточный переносчик сигналов, индуцируя синтез интерферона. Несмотря на то что ПАИ-2 считают регулятором активации плазминогена, его протеиназные мишени и биологическая функция окончательно еще не определены [3].

Ингибитор активаторов плазминогена типа 3 (ПАИ-3). Этот гликопротеин молекулярной массой 57 кДа, как упоминалось выше, известен как ингибитор активированного протеина С. Его концентрация в плазме составляет 2—5 мкг/мл, он также выявлен в моче. Около 30 % содержится в α -гранулах тромбоцитов: 2,9 нг/10 клеток ингибитора выделяется после стимуляции АДФ, коллагеном, адреналином, тромбином или пептидом, который активирует тромбиновый рецептор. Секретированный ПАИ-3 оказывался на поверхности активированных тромбоцитов и микровезикул [82].

Согласно данным секвенирования кДНК, ПАИ-3 состоит из 387 аминокислотных остатков, среди которых находятся 5 потенциальных участков для гликозилирования.

ПАИ-3 ингибирует активированный протеин С, двухцепочечный ТАП, у-Па, тромбин, фактор Ха, фактор XIa, но точная функция его неизвестна. Предполагается, что он главный ингибитор протеина С в плазме крови. Константа скорости второго порядка ПАИ-3 относительно у-Па — между $1 \cdot 10^3$ и $8 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$, по отношению к ТАП — менее $1 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ [3]. Ингибирование осуществляется путем внедрения реактивной петли ингибитора в активный центр протеиназы.

3.4. ИНГИБИТОРЫ ПЛАЗМИНА

3.4.1. α_2 -Антиплазмин

α_2 -Антиплазмин (α_2 -АП) принадлежит к семейству серпинов и является основным белком, выполняющим функцию ингибитора плазмина. Он способен нейтрализовать около 2/3 всего плазмина, образуемого при полной активации содержащегося в крови плазминогена. α_2 -Антиплазмин оказывает действие на плазмин тремя путями: препятствует связыванию плазмина на фибрине; ингибирует протеолитическую активность фермента; ковалентно присоединяется к фибрину [1, 3].

α_2 -Антиплазмин синтезируется в печени и секретируется как одноцепочечный гликопротеин молекулярной массой 67 кДа, состоит из 464 аминокислотных остатков. В его молекулу входит 39 % гексоз, 3,7 гексозамина и 4,1 % сиаловых кислот [11, 83, 84]. Концентрация α_2 -антиплазмина в плазме — 1 мкМ (50 — 70 мг/л). Помимо плазмина может быстро образовывать комплексы с трипсином и химотрипсином и медленно — с урокиназой, калликреином, фактором Ха, тромбином и тканевым активатором плазминогена. В крови α_2 -антиплазмин присутствует в виде двух форм: Met- α_2 -АП и Asn- α_2 -АП. В плазме выявлено около 30 — 40 % Asn- α_2 -АП, который образуется в результате отщепления 12-членного пептида от N-конца Met- α_2 -АП. Обе формы α_2 -антиплазмина ингибируют плазмин с одинаковой скоростью,

но Met- α_2 -АП обладает меньшим сродством к фибрину, чем Asn- α_2 -АП [85]. В плазме крови здоровых людей присутствует также около 30 % деградированной формы α_2 -антиплазмينا, у которой отсутствует С-концевой пептид для связывания пламиногена [86].

α_2 -Антиплазмин ингибирует свободный плазмин с очень высокой скоростью ($t_{1/2} \sim 0,1-0,5$ с). Реакция протекает в две стадии, в итоге образуется стабильный комплекс, лишенный всякой ферментативной активности и не диссоциирующий в присутствии восстанавливающих и денатурирующих средств. На первой стадии быстро образуется обратимый комплекс α_2 -АП-плазмин ($K_d \sim 2 \cdot 10^{-10}$ М), в котором затем происходит медленное расщепление по реактивному центру Arg₃₆₄—Met₃₆₅. С-концевой фрагмент α_2 -антиплазмينا остается нековалентно связанным с кринглом 1, а N-концевая часть образует ковалентную связь с Ser активного центра плазмينا. Взаимодействие α_2 -антиплазмينا с субстратсвязывающим участком обеспечивает селективность действия плазмينا. В присутствии быстродействующего ингибитора плазмин может проявлять свою активность только в месте образования до тех пор, пока остается связанным с фибрином. Плазмин, образованный на поверхности фибрина (кровяного сгустка) и связанный с ним своими лизинсвязывающими участками, инактивируется в 50 раз медленнее, что и обеспечивает фибринолиз. Если же связь плазмينا с фибрином нарушается и он поступает в кровь, то при этом происходит моментальная его инактивация. Известно также, что плазмин теряет реактивность к ингибитору при образовании комплексов со стрептокиназой.

Кроме ингибирования плазмينا в кровотоке α_2 -антиплазмину принадлежит важная роль в стабилизации фибрина. При полимеризации в фибрин включаются как пламиноген, так и α_2 -антиплазмин в примерно равном количестве. Причем α_2 -антиплазмин связывается, а затем и сшивается фактором XIIIa с той областью фибрина, которая в первую очередь расщепляется под действием плазмينا [87].

Плазмин расщепляет пептидные связи фибриногена или фибрина с образованием продуктов деградации, обозначаемых как X-, Y-, D- и E-фрагменты. Наиболее чувствительной к протеолизу является С-концевая часть α -цепи, которая может расщепляться по остаткам 584, 425 и 207. Затем происходит отщепление N-концевого 42-членного пептида β -цепи. Расщепление по этим связям может протекать асимметрично в каждой из половин молекулы фибриногена с образованием набора X-фрагментов, имеющих молекулярную массу от 330 до 240 кДа. X-фрагменты содержат как центральный, так и периферические участки взаимодействия фибрин-мономеров и могут образовывать полимерную структуру. Солюбилизация фибрина происходит после расщепления ряда пептидных связей во всех трех субъединицах фибрина, приводящих к высвобождению одного из D-фрагментов, который содержит периферический участок полимеризации [88].

Сшитый с фибрином α_2 -антиплазмин ограничивает действие плазмينا, образующего из связанного при полимеризации пламиногена, расщеплением С-концевой области α -цепи фибрина. Это расщепление еще не приво-

дит к распаду полимера, но открывает в его структуре новые участки связывания ТАП и плазминогена с высоким сродством. Расщепление фибрина до растворимых фрагментов происходит после активации плазминогена, связывающегося с уже частично деградированным фибрином [89]. Наличие двух стадий в лизисе фибрина является одним из механизмов, обеспечивающих смещение во времени процессов образования и лизиса фибрина.

α_2 -Антиплазмин нестабилен в растворе, при лиофилизации, повторном замораживании и оттаивании.

3.4.2. α_2 -Макроглобулин

Другим функционально важным ингибитором плазмина является α_2 -макроглобулин (α_2 -М). α_2 -Макроглобулин принимает участие в регуляции активности протеолитических ферментов широкого спектра действия путем специфического комплексообразования [90]. Этот белок как уникальный ингибитор сериновых протеиназ был открыт независимо друг от друга двумя группами исследователей — В.И. Навербак и соавт. [91] и К.Н. Веремеенко, В.А. Белицером [92] с использованием разных методических подходов.

α_2 -Макроглобулин — гликопротеин молекулярной массой 720 кДа. Его молекула состоит из четырех идентичных субъединиц молекулярной массой 185 кДа каждая. Субъединицы соединяются в пары ковалентными связями (дисульфидными мостиками), а димеры стабилизированы нековалентными связями [93]. В плазме он содержится в концентрации 2 — 4 мг/мл. Первичная структура белка полностью расшифрована в 1984 г. Выявлено, что она имеет много общего с таковой белков системы комплемента C3, C4 [94]. Каждая субъединица содержит 1451 аминокислотный остаток с С-концевым аланином и N-терминальным серином. Молекула α_2 -макроглобулина содержит 8—10 % углеводов: маннозу, ацетилглюкозамин, галактозу. Глюкозаминные основные группы присоединены к восьми остаткам аспарагина.

Изучение пространственной организации α_2 -макроглобулина показало, что белок содержит 8,6 % α -спиралей и 35 % β -структур. Моделью третичной структуры выбрана конформация β -бочонка преальбумина.

В структуре α_2 -макроглобулина имеется последовательность Arg₆₈₁-Val-Gly-Phe-Tyr-Glu₆₈₆, пептидные связи которой могут расщепляться разными типами протеиназ. Расщепление приводит к конформационным изменениям α_2 -макроглобулина, в результате чего гидролизуется тиоэфирная связь между Cys₉₄₉ и Gln₉₅₂, а карбонильный радикал образует ковалентную связь с протеиназой, но в отличие от серпинов не по активному центру. Поэтому комплекс протеиназа- α_2 -М способен расщеплять низкомолекулярные субстраты, а связывание с белками становится не возможным из-за стерических препятствий, создаваемых макромолекулой ингибитора [1]. Поэтому α_2 -макроглобулин предпочтительнее называть не ингибитором, а рестриктором — ограничителем ферментативной функции протеиназ.

α_2 -Макроглобулин в отличие от α_2 -антиплазмина реагирует с плазмином относительно медленно, но его емкость велика (в 2 раза выше, чем α_2 -антиплазмина), поэтому при больших количествах плазмина и исчерпании запаса

α_2 -антиплазмина инактивацию выполняет α_2 -макроглобулин. Комплекс плазмин- α_2 -макроглобулин обладает высокой способностью расщеплять фибрин, а его фибринолитическая активность обнаруживается лишь после длительной инкубации комплексов с фибриногеном. Комплекс трипсин- α_2 -макроглобулин лишен и фибрино-, и фибринолитической активности. α_2 -Макроглобулин относится к основным ингибиторам калликреинов плазмы, полностью снимает их биологическое действие, а активность в отношении искусственных пептидных субстратов (ТАМЭ-эстеразную активность) — лишь наполовину.

В последние годы показано, что наряду с регуляцией активности всех четырех классов протеиназ α_2 -макроглобулин играет важную роль в иммунологических реакциях, клеточном росте, дифференциации, метаболизме соединительной ткани, модуляции активности различных цитокинов, регуляции синтеза оксида азота макрофагами и др. [95—97].

Предполагается, что кроме регуляции активности протеиназ одна из функций α_2 -макроглобулина — удаление активированных ферментов из кровотока. Установлено, что α_2 -макроглобулин может связываться с внутренней поверхностью эндотелия, способен связываться с мембранами клеток ретикулоэндотелиальной системы (лимфоцитами, полиморфноядерными лейкоцитами, макрофагами) и ингибировать протеиназозависимые реакции иммунных процессов [1, 2, 92].

3.5. АКТИВИРУЕМЫЙ ТРОМБИНОМ ИНГИБИТОР ФИБРИНОЛИЗА (ТАФИ)

Активируемый тромбином ингибитор фибринолиза (ТАФИ) — одноцепочечный гликопротеин молекулярной массой 58 кДа, который синтезируется в печени и секретируется в кровь. Необходимо отметить, что обнаружена тромбоцитарная форма ТАФИ молекулярной массой 50 кДа синтез которой, как предполагают, обеспечивается мегакариоцитами. Дегликозилирование как тромбоцитарной, так и плазменной форм ТАФИ приводит к образованию подобных молекул молекулярной массой 47 кДа [98]. ТАФИ гомологичен обнаруженному ранее в плазме карбоксипептидазе U и прокариоксипептадезе B [99, 100].

ТАФИ не относится к числу белков “острой фазы”, но в некоторых исследованиях показано, что у здоровых людей его уровень варьирует в широких пределах (от 4 до 6 раз). В среднем концентрация ТАФИ в плазме составляет 4 — 15 мкг/мл [101]. Тромбоцитарная форма ТАФИ содержится в α -гранулах тромбоцитов и его концентрация достигает 48 ± 5 нг/ 10^9 тромбоцитов. Эта форма ТАФИ секретируется при активации тромбоцитов и имеет идентичные энзиматические характеристики с плазменным ТАФИ (активация тромбином, тромбин/тромбомодулином). Как полагают, тромбоцитарный ТАФИ необходим для защиты сгустков от фибринолизиса [98].

Механизм антифибринолитического действия ТАФИ заключается в отщеплении С-концевых остатков, которые экспонируются на начальных этапах расщепления фибрина и формируют новые участки связывания ТАП и плазминогена, обеспечивающие ускорение лизиса [102]. Его активация про-

исходит в результате расщепления тромбином и другими трипсиноподобными протеиназами по Arg₉₂ с высвобождением N-концевого пептида и образованием активного фермента 35 кДа [103]. Свободный тромбин активирует TAFI с низкой скоростью: k_{cat} реакции составляет 0,002 с⁻¹, а $K_M \sim 2$ мкМ, что на порядок выше концентрации TAFI в плазме. Связывание тромбина с тромбомодулином (ТМ) повышает k_{cat} до 1,2 с⁻¹ и снижает K'_M до 1 мкМ, что увеличивает каталитическую эффективность реакции в 1250 раз [104]. Другим физиологическим активатором TAFI может быть плазмин. K'_M реакции составляет 0,055 мкМ, а $k_{\text{cat}} = 0,0004$ с⁻¹. Скорость реакции значительно повышается в присутствии гликозаминогликанов, и при терапевтических концентрациях гепарина в крови каталитическая эффективность активации TAFI плазмином может составлять $\sim 10\%$ таковой для комплекса тромбин/тромбомодулин [105].

Физиологический ингибитор TAFIa не идентифицирован. В растворе TAFIa спонтанно инактивируется. Скорость инактивации значительно возрастает при повышении температуры ($t_{1/2}$, составляет ~ 3 ч при 22 °С и ~ 8 мин — при 37 °С), снижается в присутствии субстратов и конкурентных ингибиторов (аналогов Lys). Это свидетельствует о том, что основным механизмом его инактивации являются конформационные изменения [106].

Открытие TAFI и выяснение механизма его антифибринолитического действия позволили объяснить, почему сгустки крови у больных гемофилией лизируются быстрее, чем у здоровых лиц. Свободный тромбин активирует TAFI с низкой скоростью, поэтому антифибринолитический эффект этого ингибитора зависит от количества тромбина, образующегося при активации свертывания крови [104, 107].

Значительно сложнее охарактеризовать эффекты системы протеина С, так как ее компоненты могут оказывать противоположное по знаку влияние на активацию TAFI. С одной стороны, активация протеина С и расщепление фактора Va снижают количество образующегося тромбина, что должно приводить к снижению степени активации TAFI, а лейденская мутация фактора V — к ее повышению. Это согласуется с данными о предрасположенности к тромбозам больных с дефектами этих компонентов [108]. С другой стороны, связывание тромбина с ТМ повышает скорость активации как протеина С, так и TAFI. Поскольку по кинетическим параметрам протеин С и TAFI являются примерно равноценными субстратами, а их концентрации в плазме на порядок ниже, чем для комплекса тромбин-тромбомодулин, степень активации этих проферментов зависит от концентрации всех компонентов реакции. L.O. Mosnier и соавт. [109], исследуя влияние ТМ на активацию TAFI и стимулированный тканевым активатором плазменогена лизис сгустков нормальной плазмы, показали, что при увеличении концентрации ТМ от 0,05 до 5 нМ наблюдаются повышение степени активации TAFI и снижение скорости лизиса, а при более высокой концентрации ТМ — снижение степени активации TAFI и соответственно увеличение скорости лизиса. Таким образом, значительное увеличение скорости активации TAFI при образовании комплекса тромбина с ТМ свидетельствует о том, что этот комплекс может оказывать не только антикоагулянтное (как считалось в те-

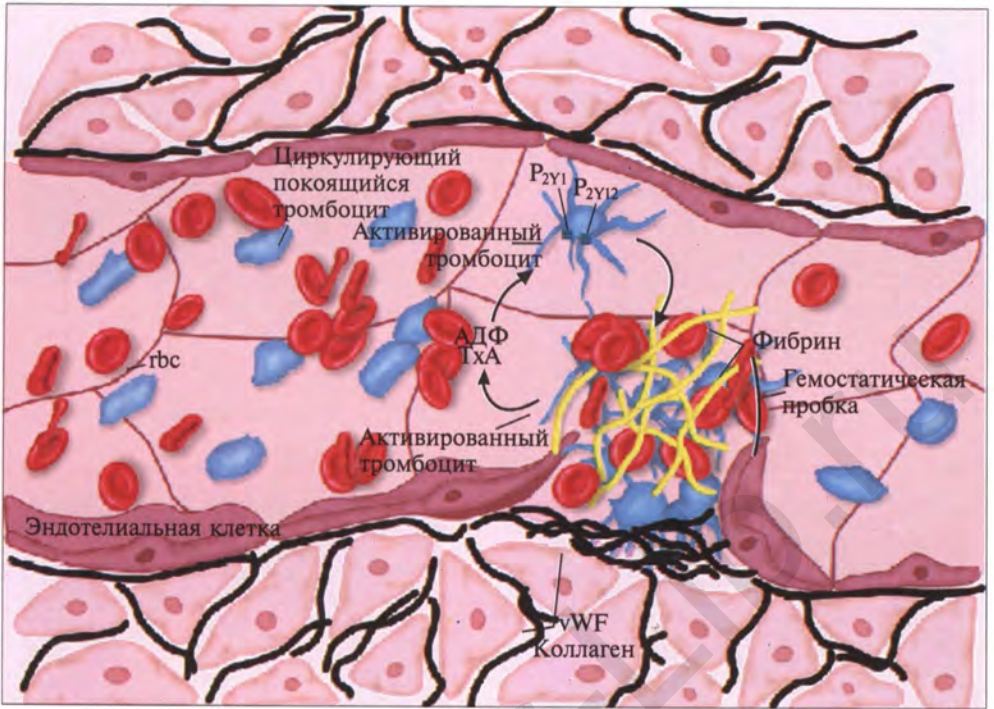
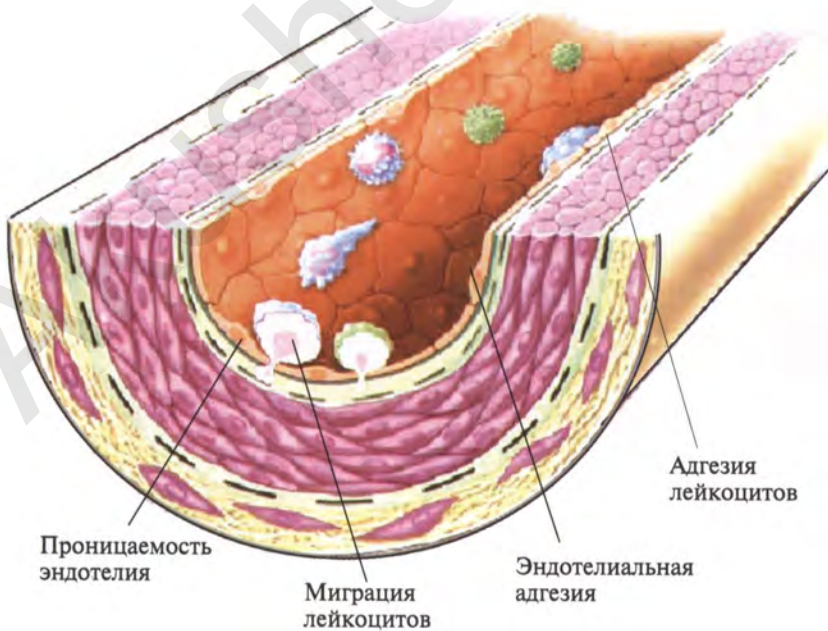
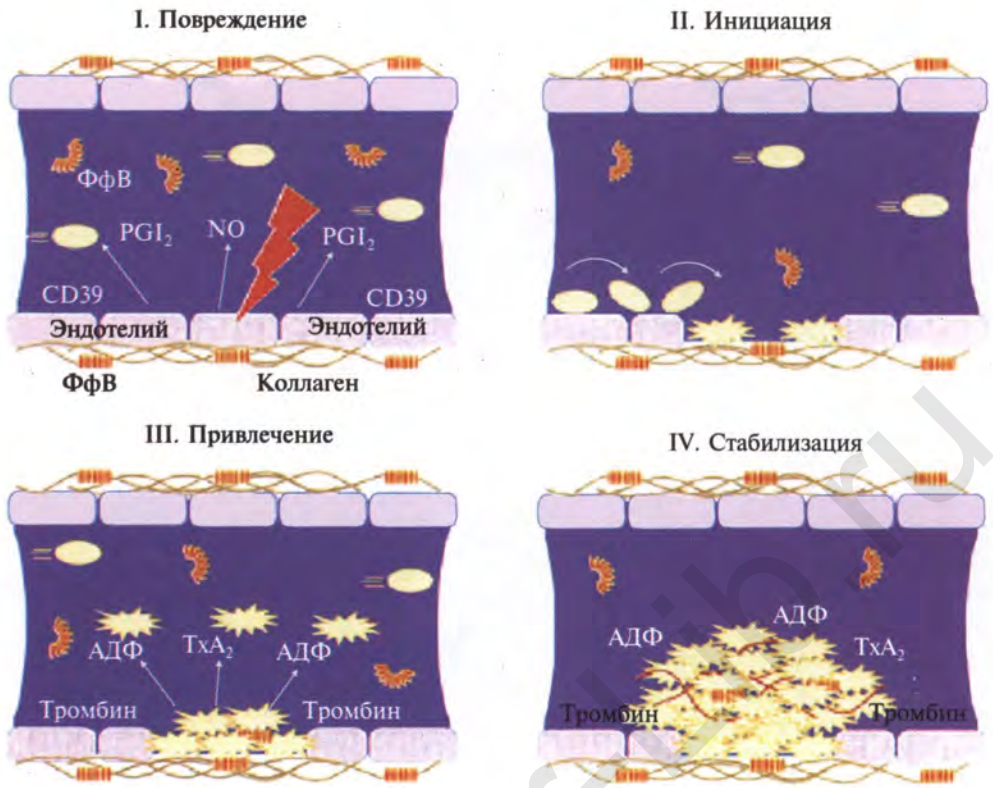


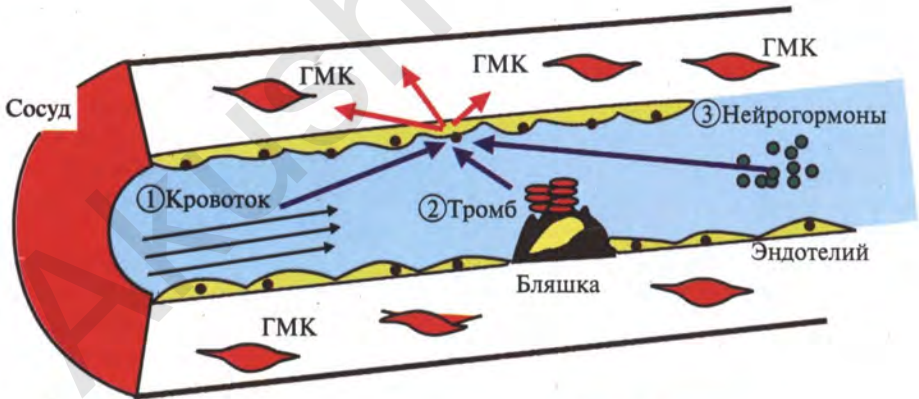
РИС. 1. Гемостаз [117]





б

РИС. 2. Дисфункция эндотелия при атеросклерозе (R. Ross, 2005) (а) и стадии (I-IV) образования тромбоцитарного тромба (б)



В просвете сосуда

- ① — ускорение кровотока (напряжение сдвига)
- ② — тромбоцитарные факторы
- ③ — гормоны и нейромедиаторы

В стенке артерии

- NO/ЭФР
- фактор гиперполяризации
- простациклин
- ЭФК/ЭТ
- фактор роста

РИС. 3. Функционирование эндотелия в норме (Ф.Т. Агеев, 2000)

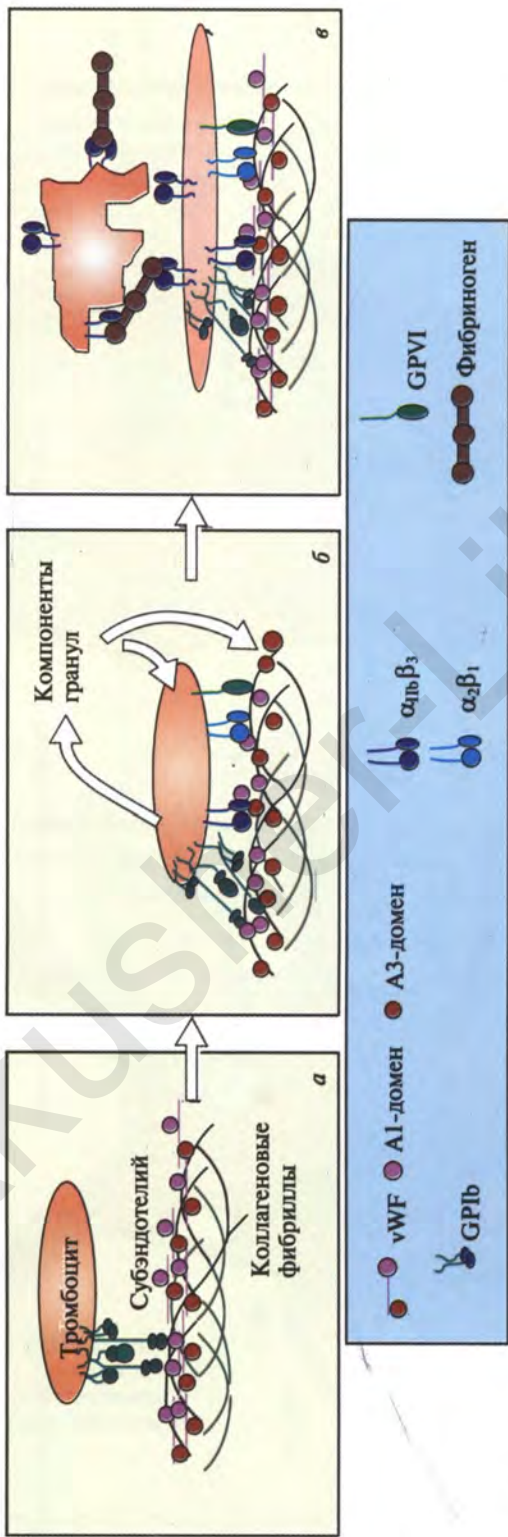
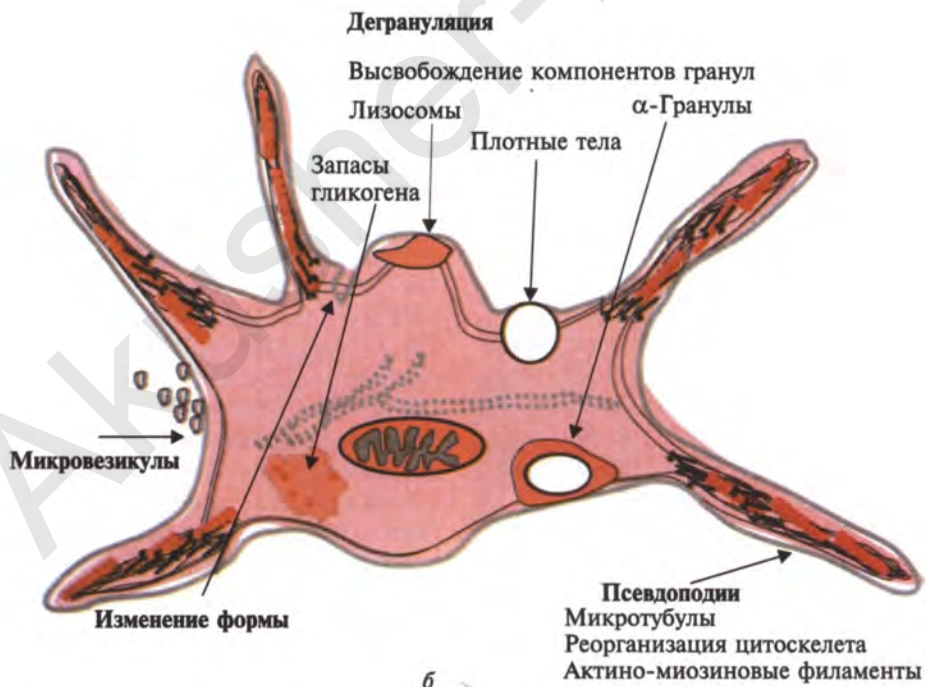


РИС. 4. Активация тромбоцитов при взаимодействии с субэндотелием:

а — начальный контакт тромбоцитарного GPIb и A1-домена фактора фон Виллебранда, связанного посредством A3-домена с коллагеном; *б* — адгезия активированного тромбоцита к коллагену, опосредованная интегринами и другими адгезивными молекулами; *в* — активированный тромбоцит распластывается на субэндотелии, образуя основу для связывания других тромбоцитов. Агрегация при участии активированных рецепторов $\alpha_{1\text{b}}\beta_3$ и фибриногена



a



b

РИС. 5. Ультраструктуры покоящегося (a) и активированного (б) тромбоцитов [34]

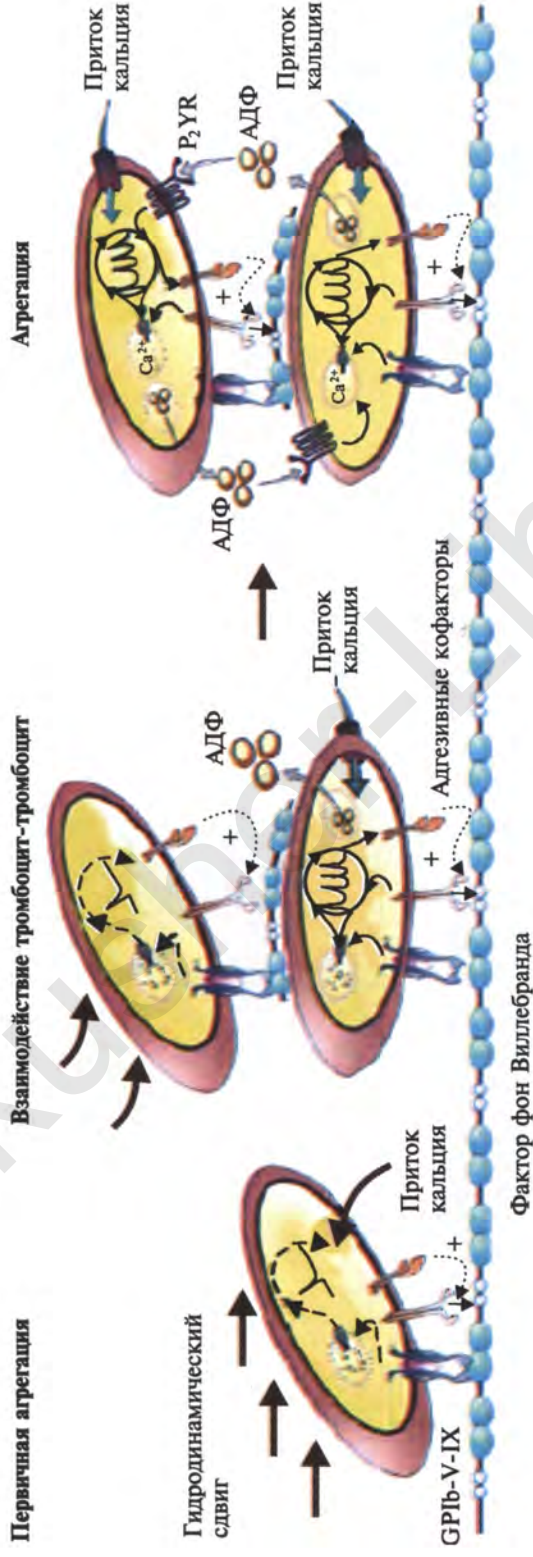


Рис. 6. Участие фактора фон Виллебранда в процессе адгезии тромбоцитов [81]

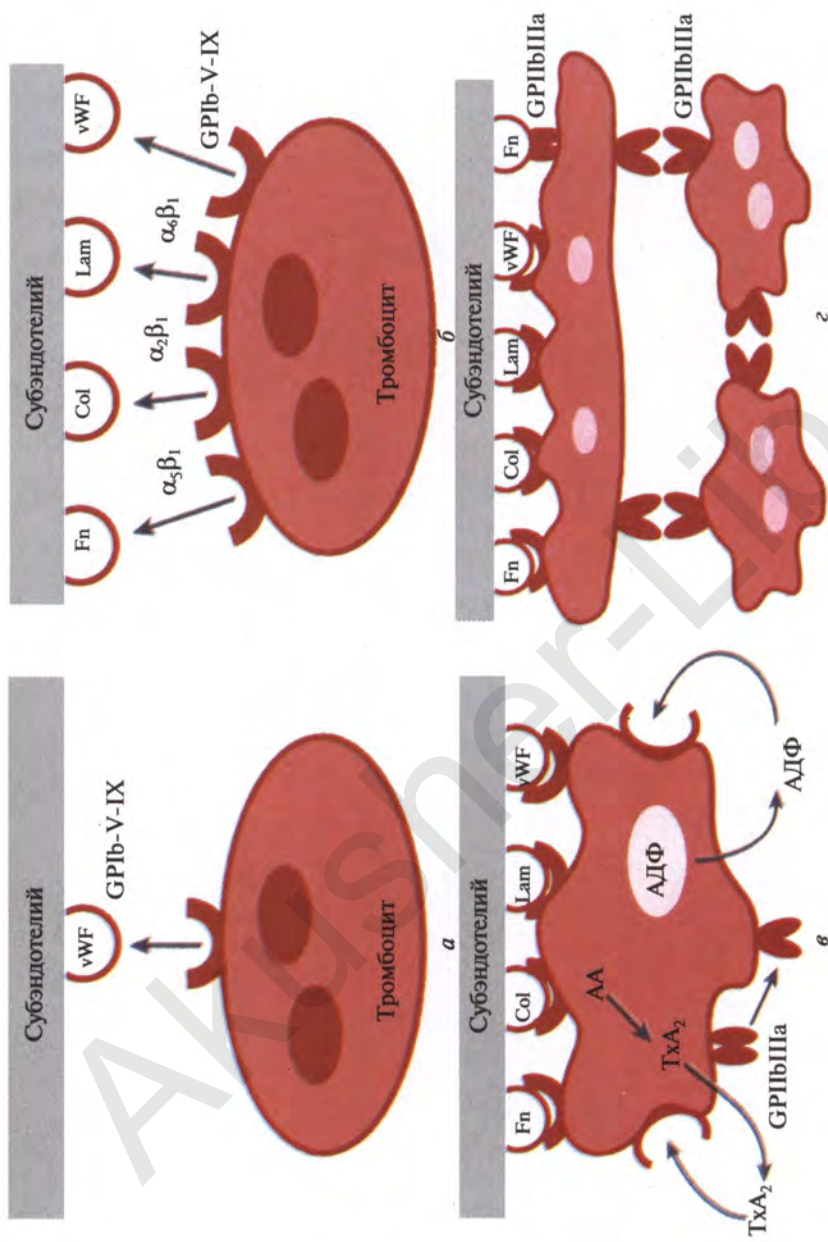


РИС. 7. Адгезия тромбоцитов: *а* — контактная фаза; *б* — фаза стабилизации; *в* — фаза активации; *г* — стадия распластывания и агрегации [34]

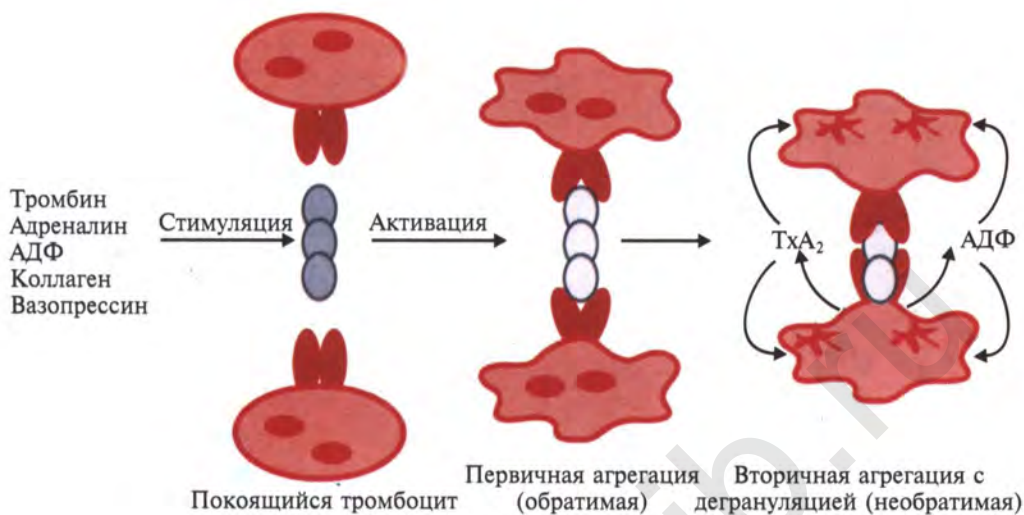


РИС. 8. Фазы агрегации тромбоцитов [34]

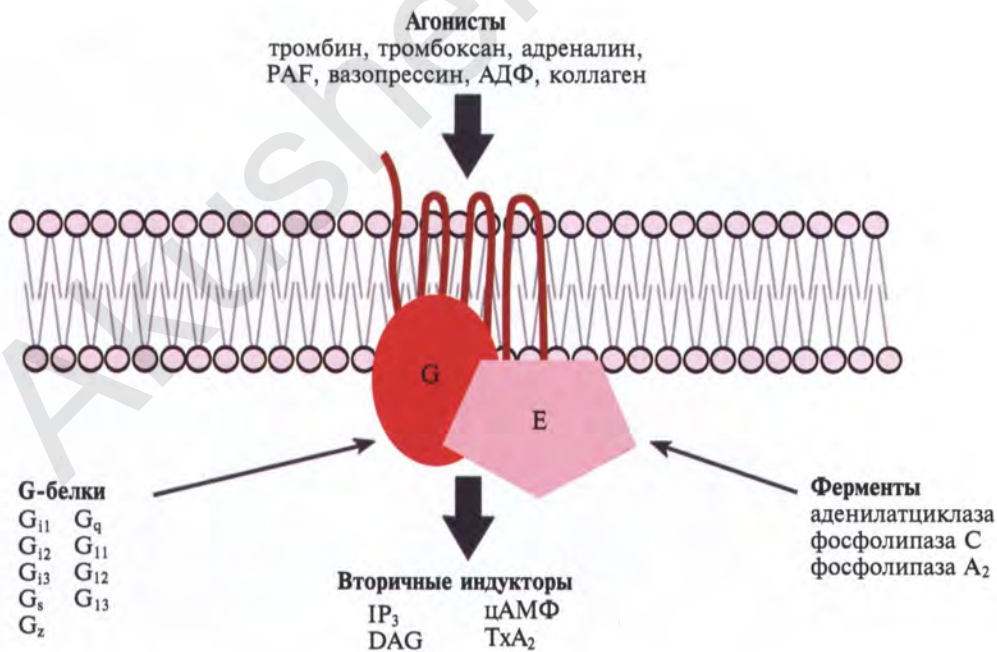
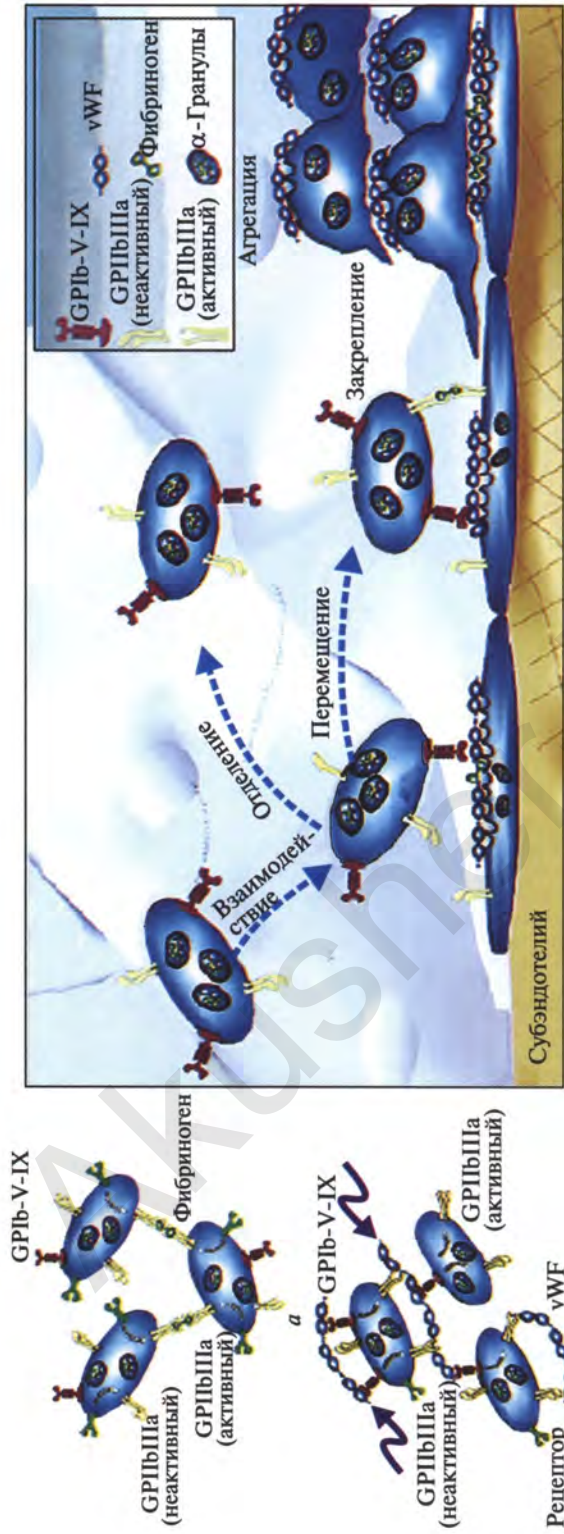


РИС. 10. G-белки и активация тромбоцитов [34]



6

Рис. 9. Традиционная модель агрегации тромбоцитов:

a — активация интегрина GPIIb/IIIa, его последующее связывание с фибриногеном и образование стабильных тромбоцитарных агрегатов; *б* — активация тромбоцитов вследствие связывания фактора фон Виллебранда с комплексом GPIIb/IIIa; *в* — механизм образования тромбоцитарного тромба

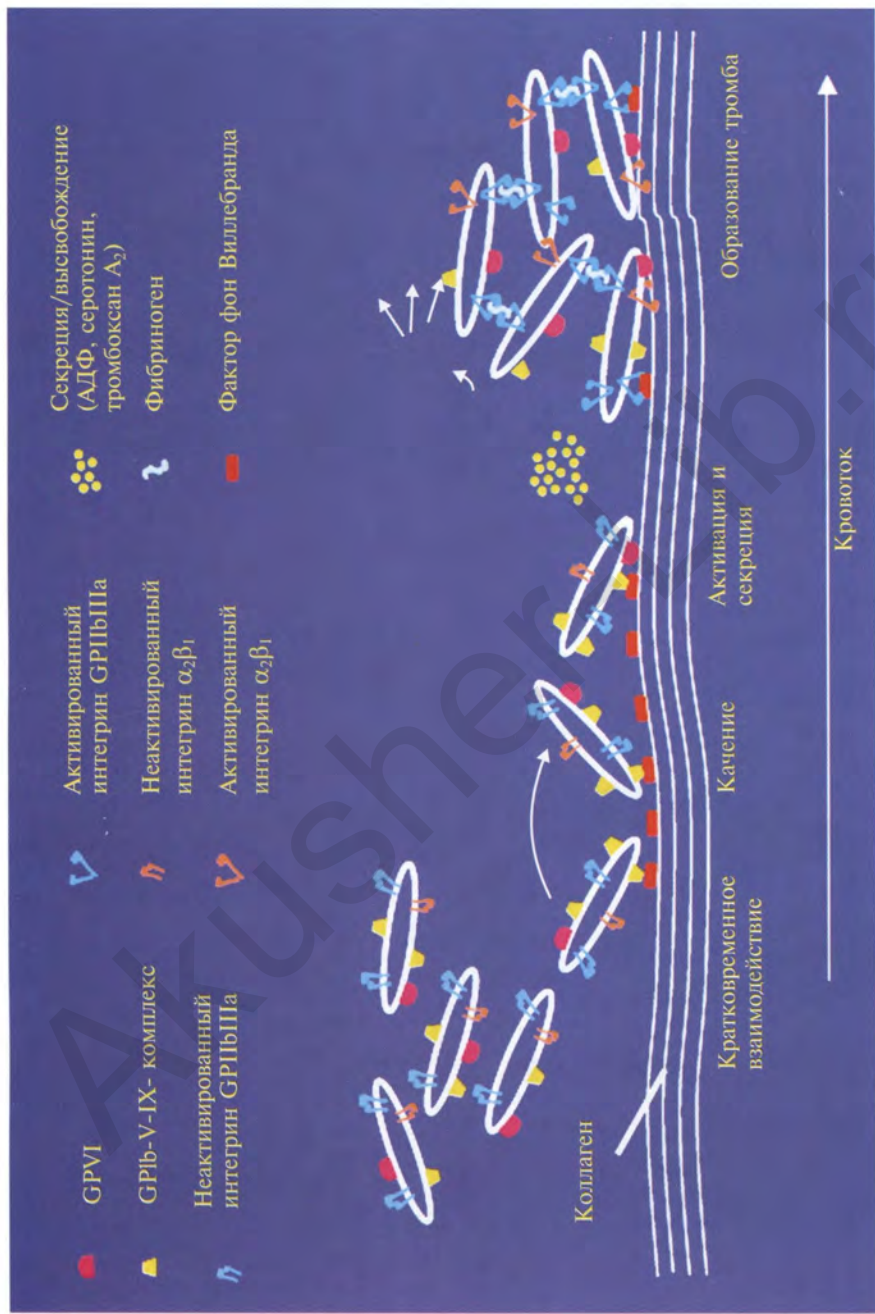


РИС. 11. Образование тромбоцитарного тромба на коллагене, экспонированном в месте повреждения тканей

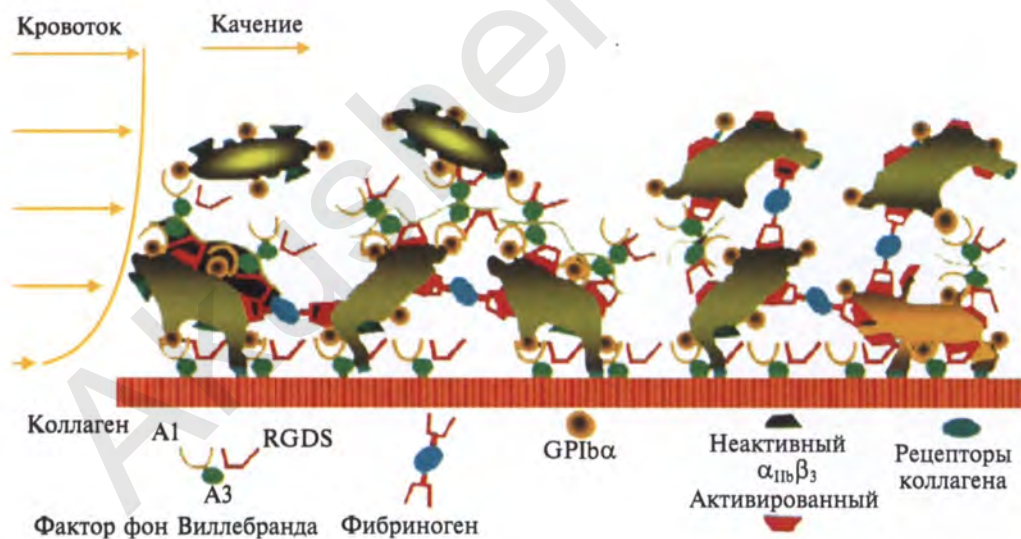
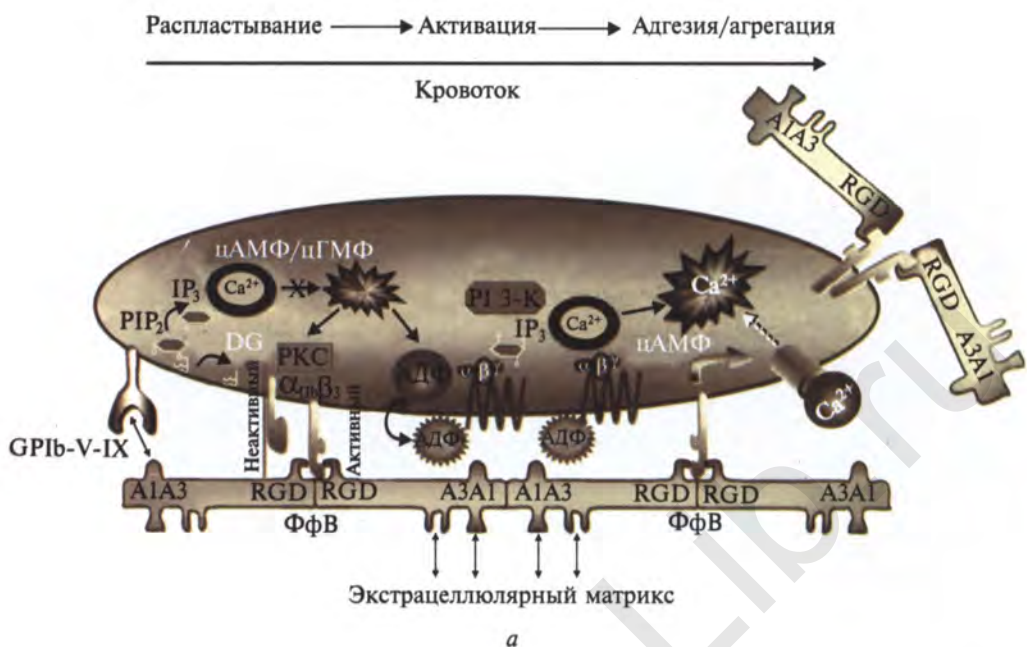


РИС. 12. Роль интегринов и фактора фон Виллебранда во взаимодействии тромбоцитов с коллагеном:

a — механизм активации тромбоцитов иммобилизованным фактором фон Виллебранда в динамических условиях; *b* — механизм адгезии и активации тромбоцитов в кровотоке

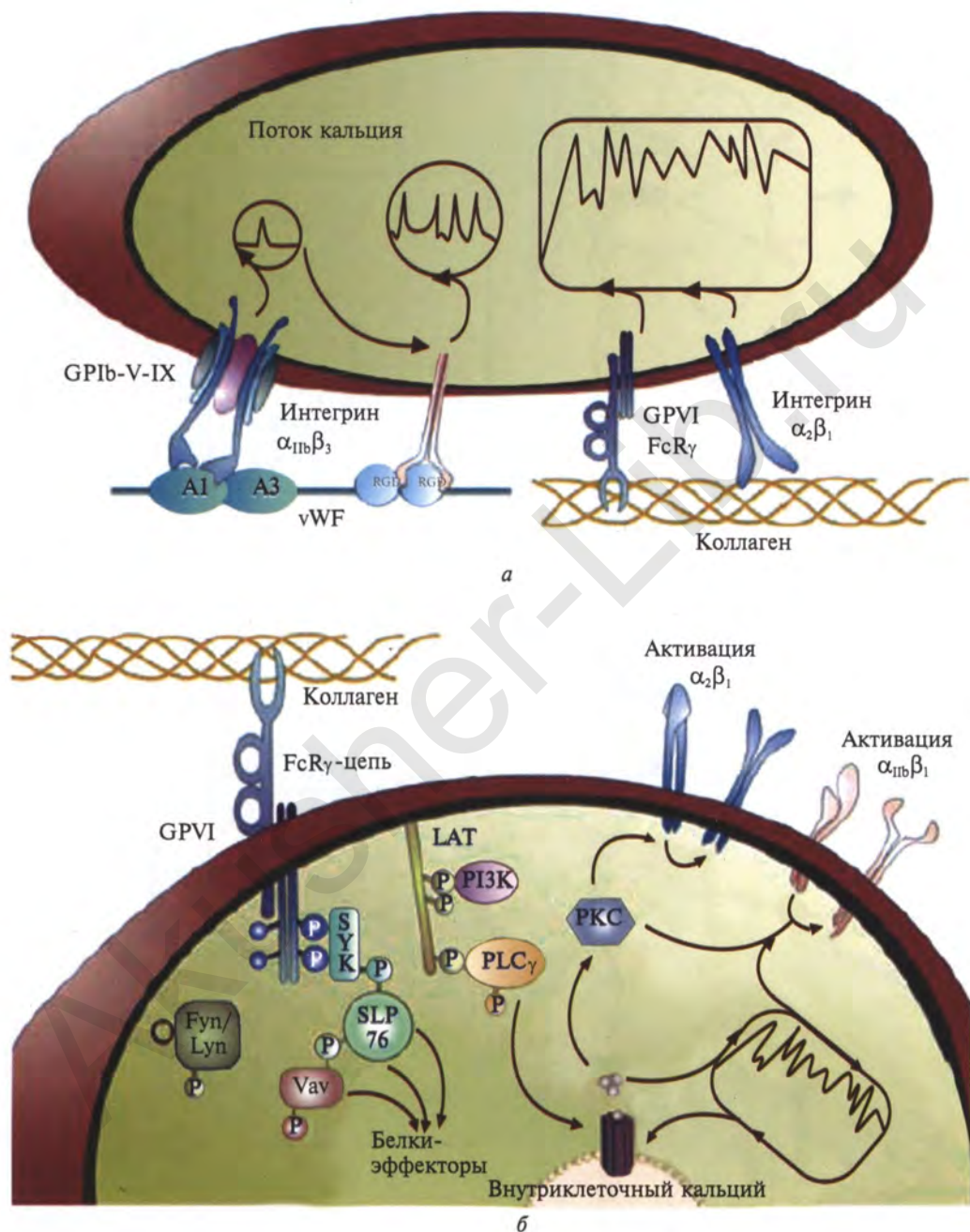


РИС. 13. Роль коллагена в активации тромбоцитов:

а — начальное взаимодействие тромбоцитов с субэндотелием в условиях высокого динамического напряжения; *б* — сигналинг, вызванный взаимодействием коллагена с GPVI [81]

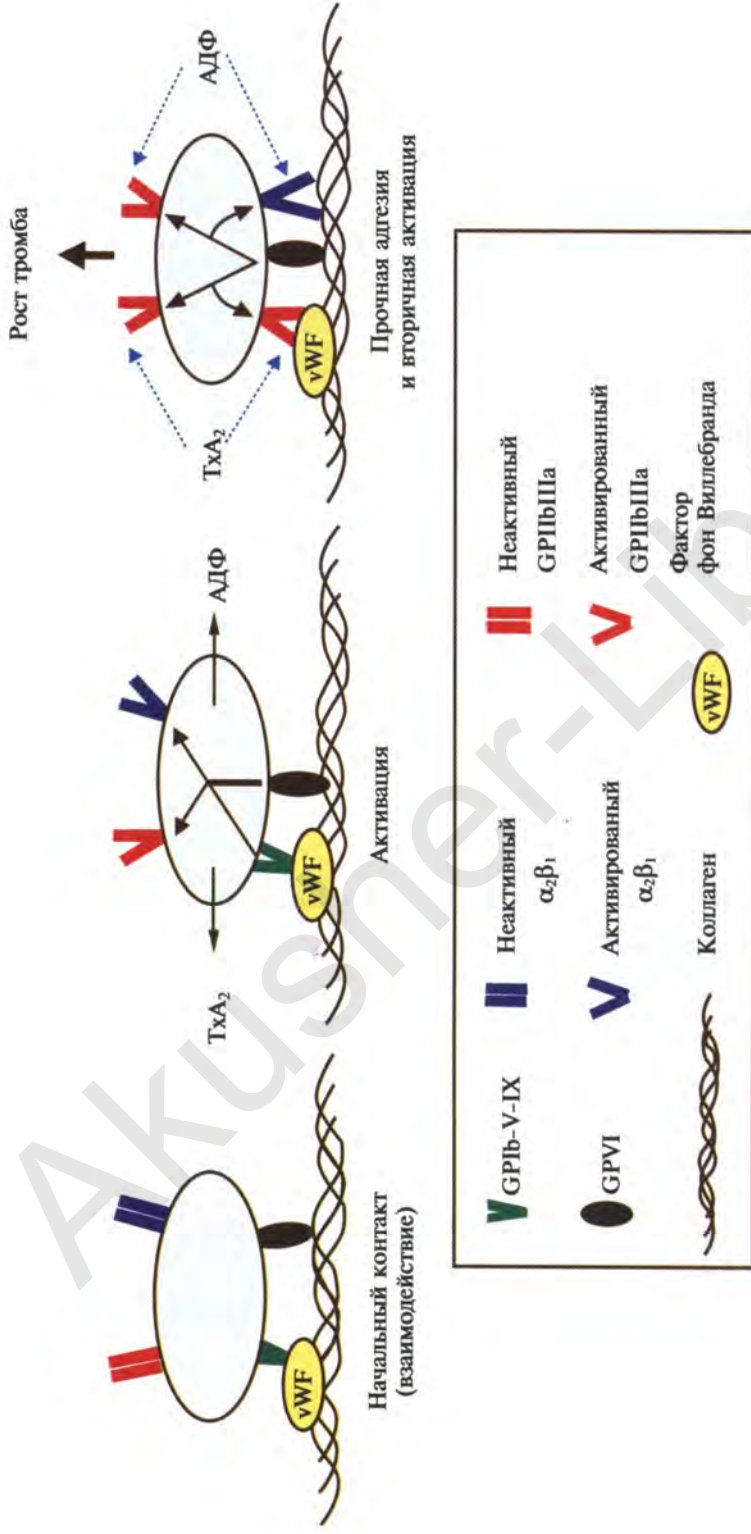


Рис. 14. Адгезия тромбоцитов к коллагену

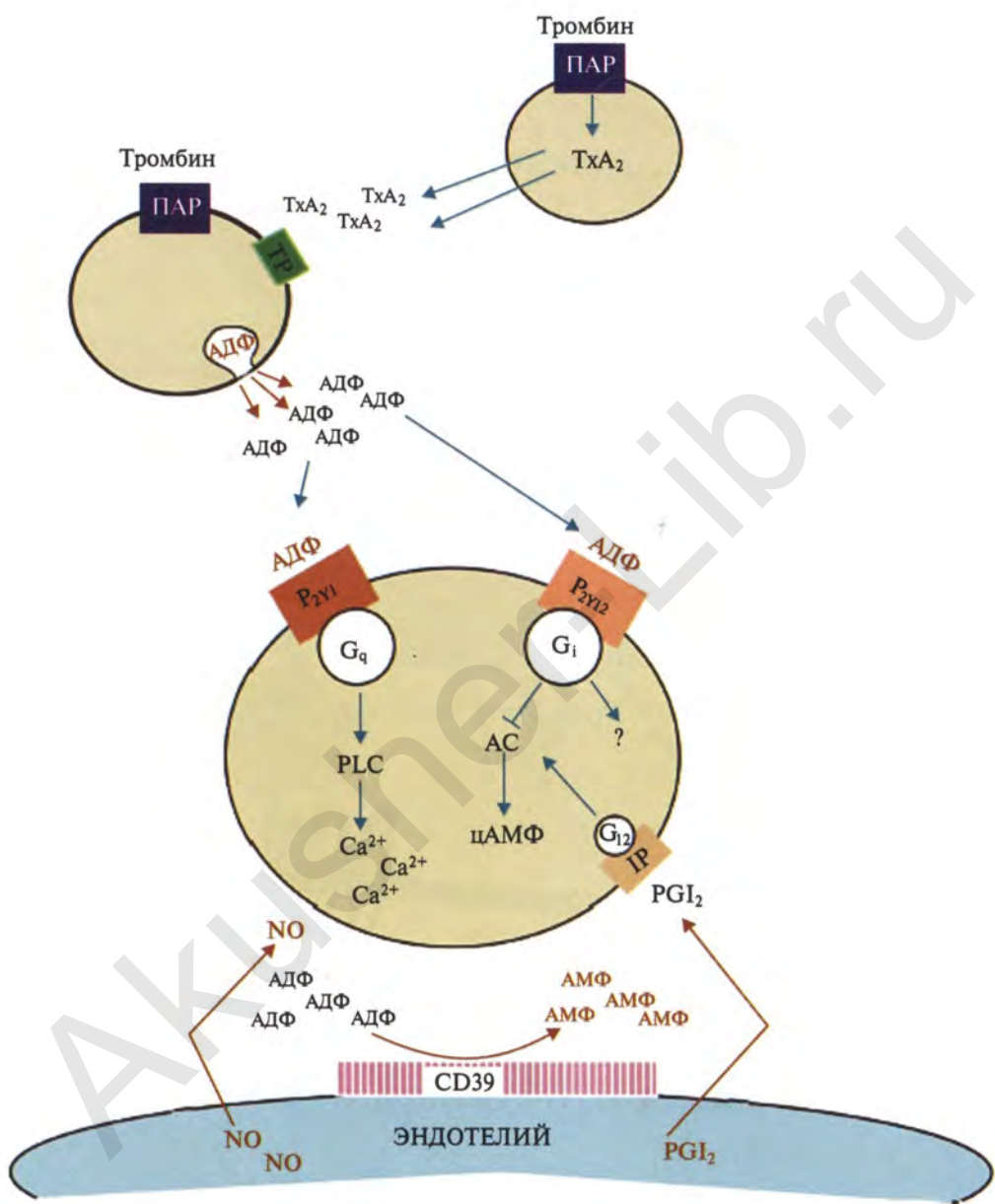


РИС. 15. АДФ и активация тромбоцитов [112]



РИС. 16. Роль рецептора АДФ P_{2Y12} в формировании тромба

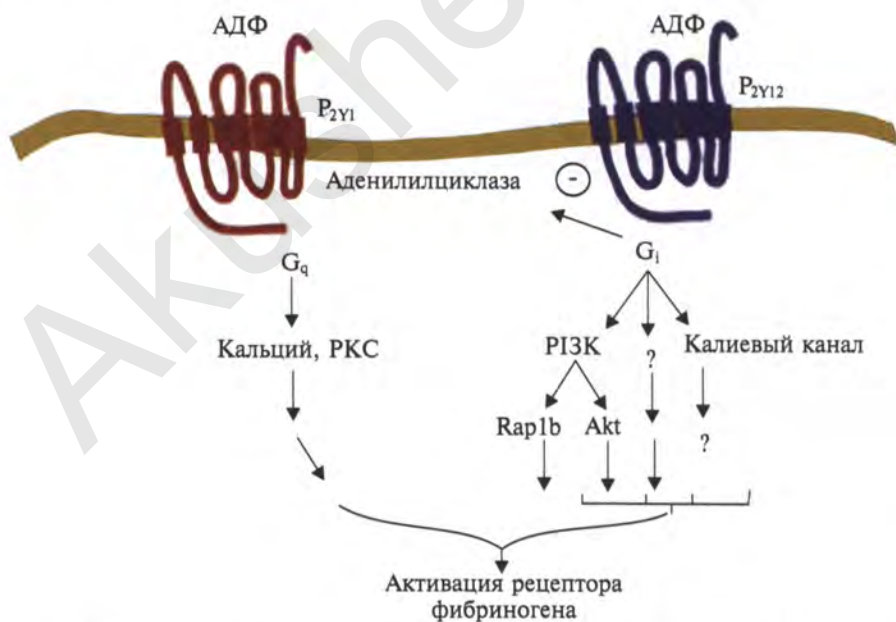


РИС. 17. Внутриклеточный сигналинг, опосредованный рецепторами АДФ [117]

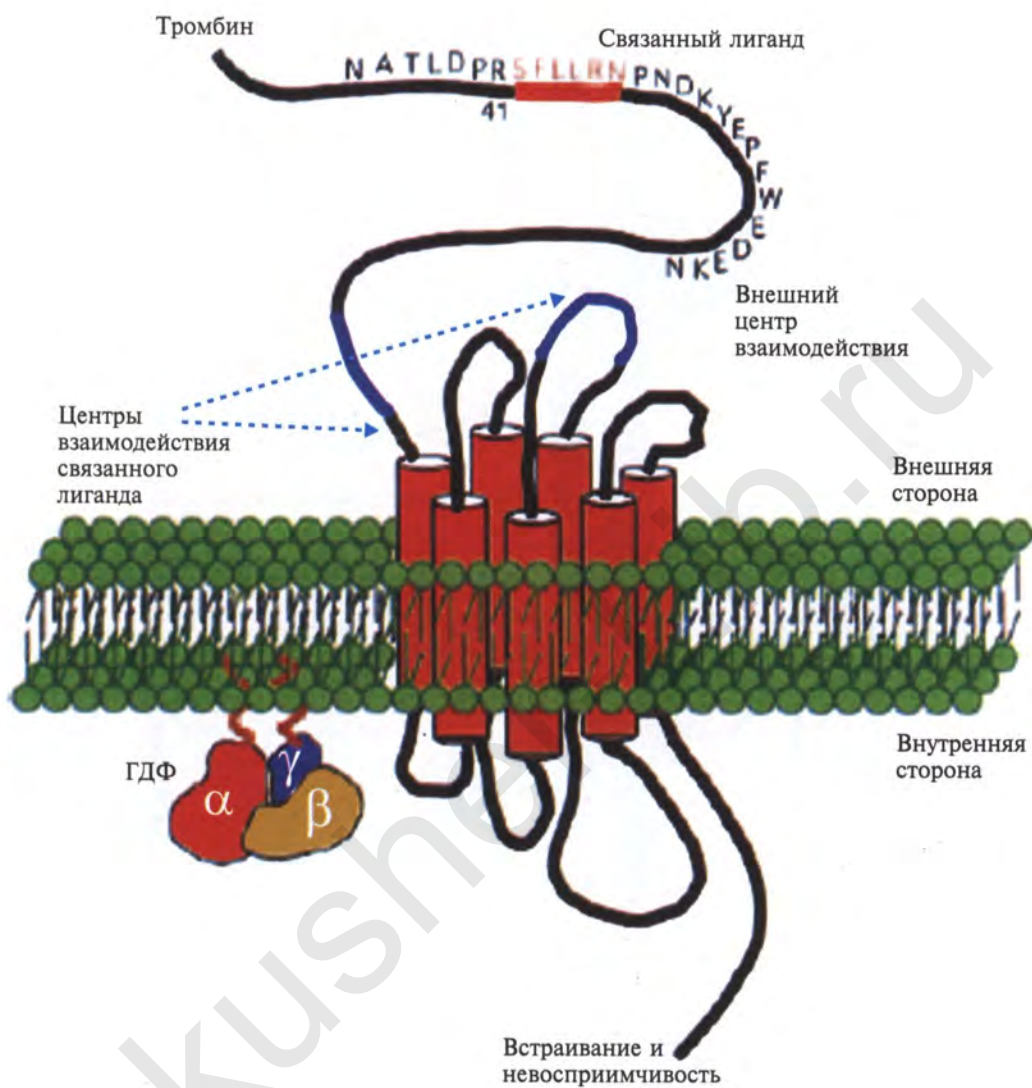


Рис. 18. Структура и особенности ПАР-1 [119]

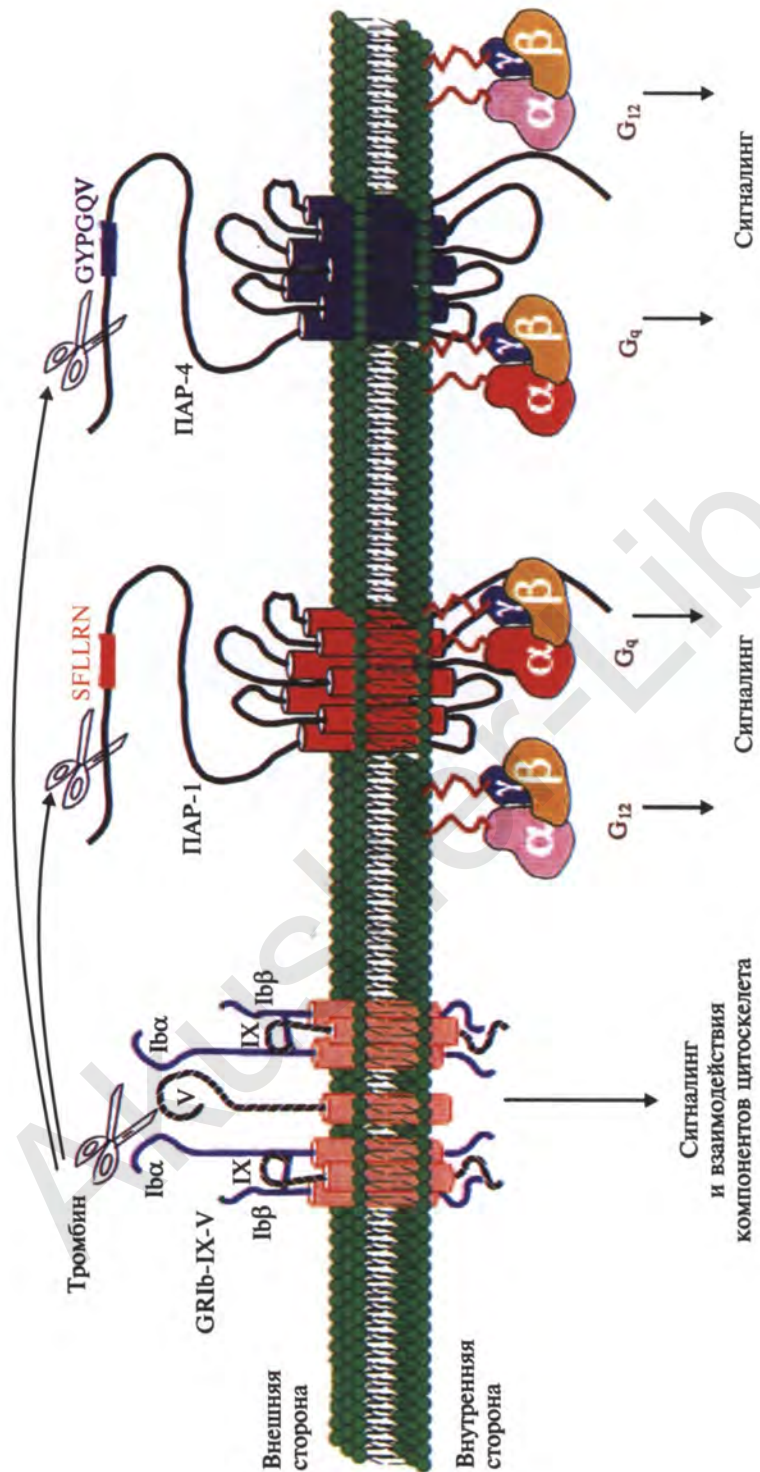


РИС. 19. Участие рецепторов семейства PAR в процессе активации тромбоцитов тромбином [119]

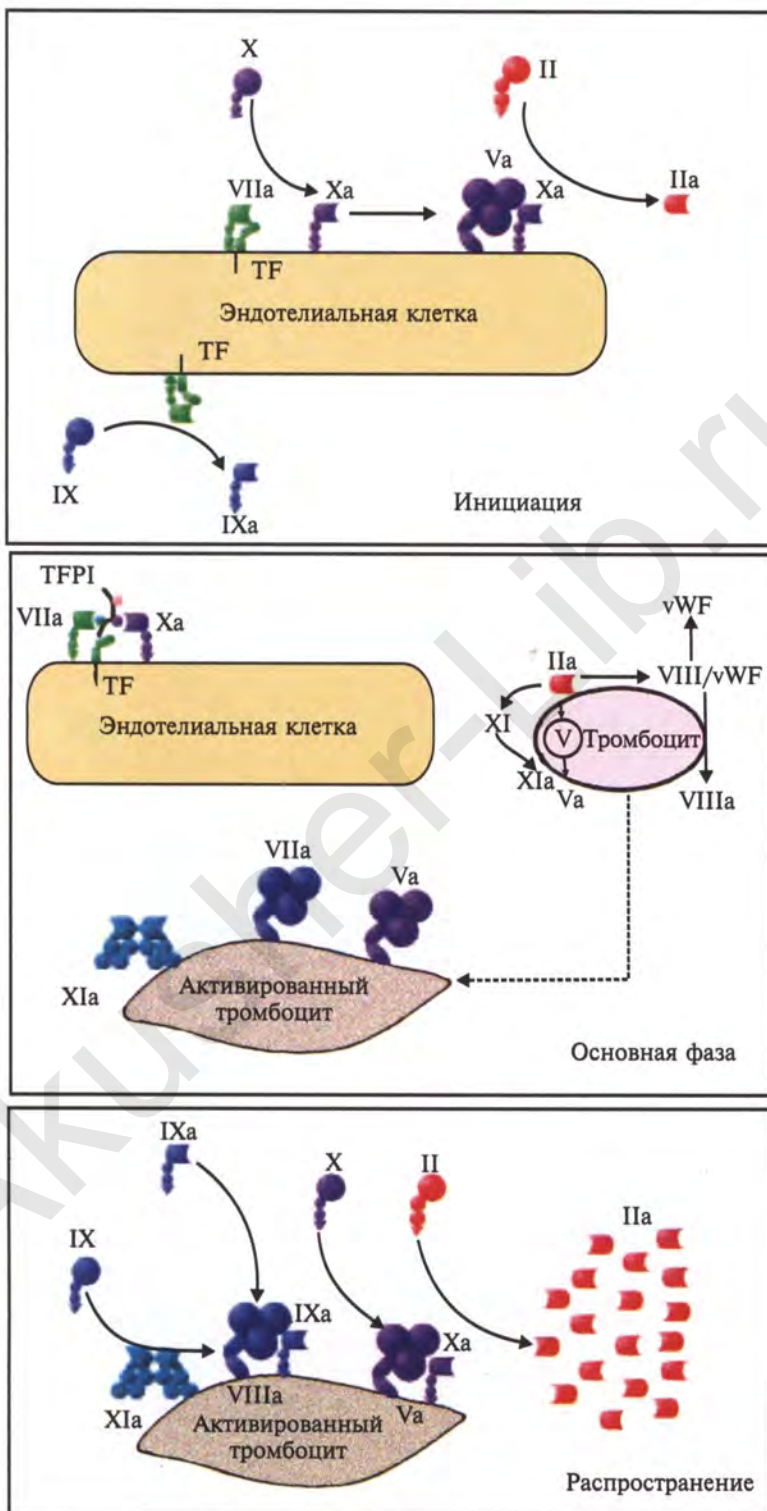


Рис. 20. Модель процесса коагуляции с участием эндотелиальных клеток и тромбоцитов (фазы инициации, стабилизации и распространения)

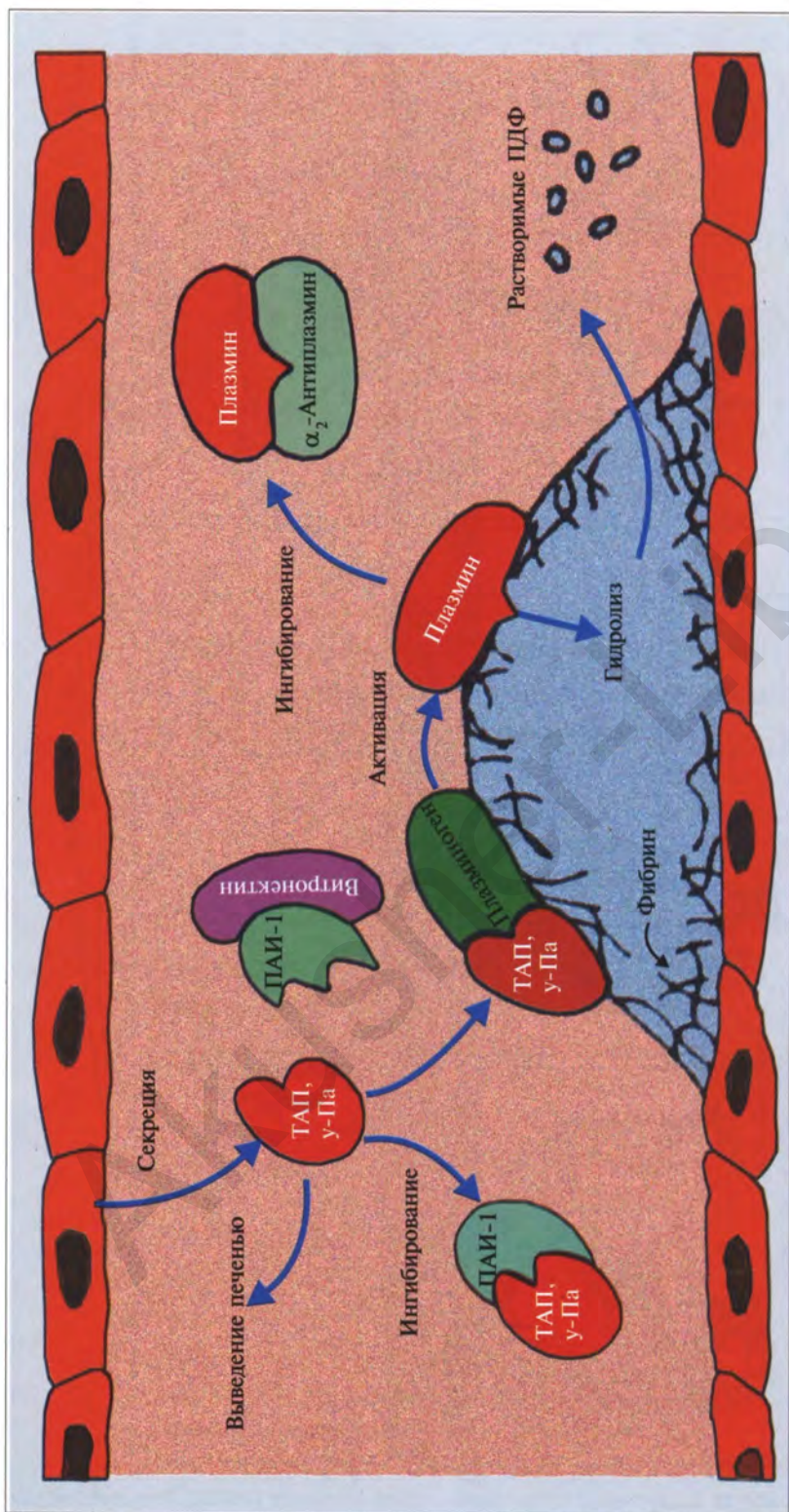


РИС. 21. Схема процесса фибринолиза в сосудах [7]

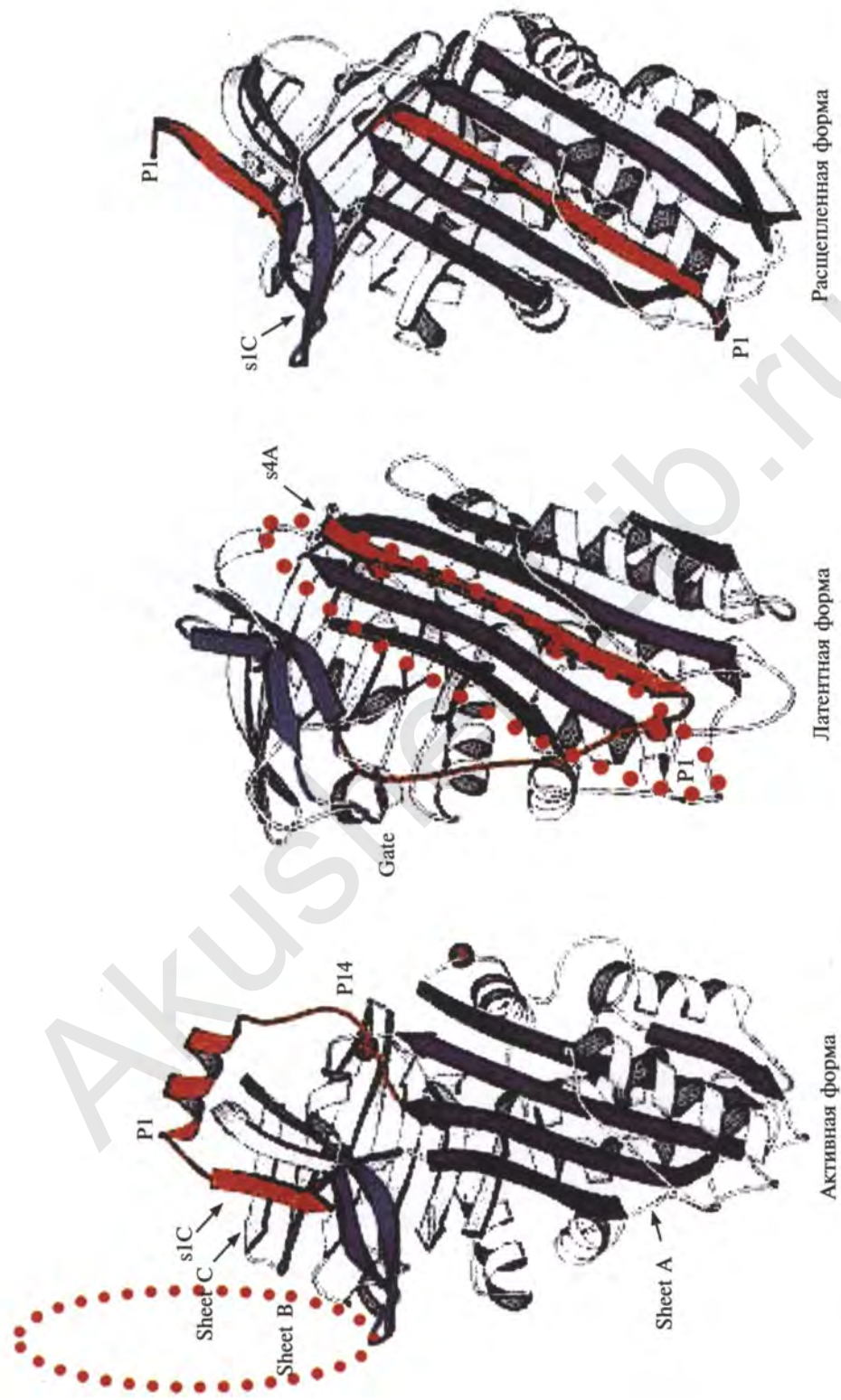


Рис. 22. Молекулярные формы ингибитора активатора плазминогена типа 1

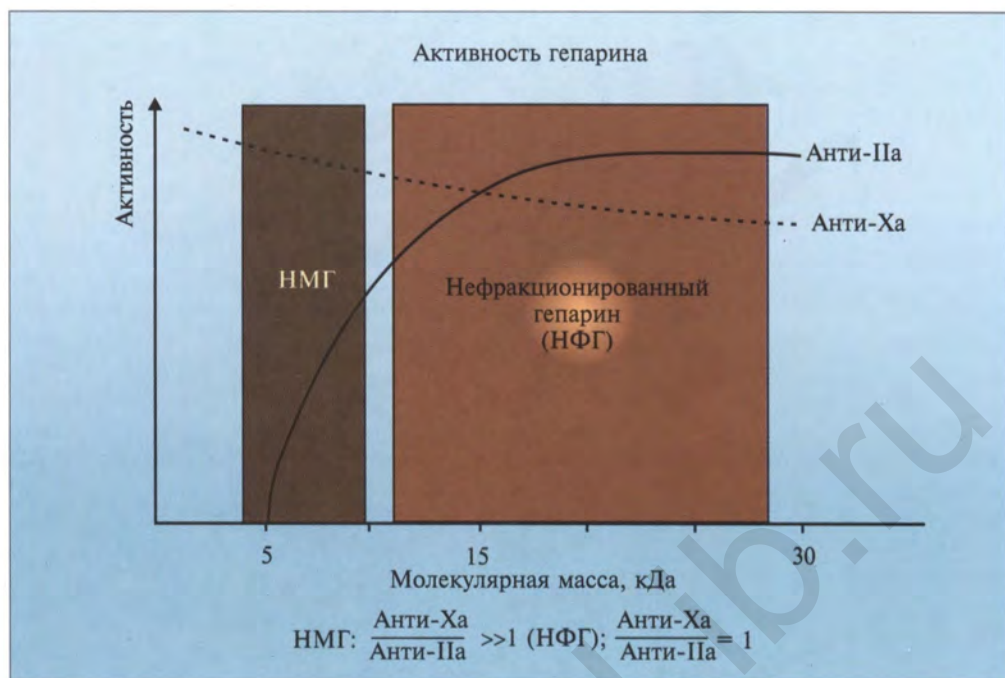


РИС. 23. Антитромботическое действие гепарина:

НМГ — низкомолекулярный гепарин (ингибирует фактор Ха, оказывает антитромботическое действие); НФГ — нефракционированный гепарин (ингибирует тромбин, оказывает антикоагулянтное действие); с уменьшением молекулярной массы гепарина антикоагуляционный эффект снижается

чение почти 20 лет после открытия ТМ), но и антифибринолитическое (т. е. прокоагулянтное) действие. Результирующая этих двух процессов зависит от многих параметров, определяющих формирование тромба *in vivo*.

Следует отметить, что в экспериментах *in vitro* 50%-й эффект ингибирования фибринолиза наблюдается уже при концентрации TAFIa, равной 1 нМ, а максимальный — при 10 нМ. Хотя свободный тромбин активирует TAFI с низкой скоростью, но при свертывании плазмы, содержащей нормальные уровни факторов системы гемостаза, тромбин образуется в количестве, которое и в отсутствие ТМ может обеспечить активацию TAFI в степени, достаточной для ингибирования фибринолиза [106].

Значимость TAFI в стабилизации тромбов подтверждают данные, полученные в экспериментах по тромболитизу. Введение кроликам специфического ингибитора — карбоксипептидазы В ($K_i = 0,4$ нМ) в 2 — 4 раза повышало тромболитическую эффективность ТАП [110, 111]. В то же время следует отметить, что *in vitro* по мере увеличения концентрации ТАП антифибринолитический эффект TAFIa снижается. Уменьшение влияния TAFIa может быть обусловлено системной активацией фибринолиза при концентрации ТАП, значительно превышающей физиологическую (> 250 нг/мл), что приводит к потреблению α_2 -антиплазмина, образованию продуктов деградации фибриногена и Lys-плазминогена, который обладает более высоким сродством к фибрину и активируется с большей скоростью, чем Glu-плазминоген. Подтверждением этого может служить то, что при использовании активатора плазминогена летучих мышей-вампилов, обладающего значительно более высокой фибриноспецифичностью, чем ТАП, антифибринолитический эффект TAFIa наблюдался при всех исследованных концентрациях активатора [112].

Следует отметить, что TAFIa может отщеплять С-концевые Arg или Lys не только в фибрине, но и в других белках и пептидах. Предполагается, что он может участвовать также в регуляции активности кининов и анафилотоксинов [113]. Клинические исследования (пато)физиологической роли TAFI пока немногочисленны. Van Tilburg и соавт. [114] показали, что повышенный уровень TAFI является фактором риска развития тромбоза глубоких вен. У женщин уровень TAFIa повышается с возрастом и при приеме оральных контрацептивов, что может быть одной из причин увеличения риска тромбообразования [101]. Значительное снижение содержания активируемой формы TAFI обнаружено у пациентов с хроническими заболеваниями печени [115] и больных с острой промиелоцитопенической лейкемией, у которых отмечаются аномальная активация фибринолиза и высокая частота летальных геморрагий [1, 116].

3.6. РОЛЬ ПРОТЕИНА С В РЕГУЛЯЦИИ СИСТЕМЫ ФИБРИНОЛИЗА

Активированный протеин С (АПС) является природным антикоагулянтом в русле крови (см. гл. 2). Известно также, что АПС принимает участие в регуляции системы фибринолиза. Механизмы профибринолитической функции активированного протеина С до конца не выяснены. В различных модельных системах *in vitro* и *in vivo* показано, что основной механизм ре-

гуляции системы фибринолиза заключается во взаимодействии АПС с ингибитором тканевого активатора пламиногена (ПАИ-1) в составе его комплекса с ТАП, что, в свою очередь, приводит к высвобождению ТАП из комплекса и увеличению фибринолитического потенциала крови [117, 118]. Известно, что k_2 взаимодействия АПС с ПАИ-1 составляет $0,6 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$, а витронектин является кофактором этого процесса и увеличивает эффективность взаимодействия в 300 раз, при этом k_2 реакции составляет $1,8 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$. Таким образом, ПАИ-1 является наиболее эффективным ингибитором АПС в плазме [119].

Группой исследователей выдвинуто также предположение, что основной путь АПС в регуляции системы фибринолиза является ТАФИ-опосредованным, а именно, АПС регулирует фибринолиз, препятствуя образованию тромбина, который в комплексе с тромбомодулином активирует ТАФИ. Как упоминалось выше, функция ТАФИа состоит в ингибировании образования тройного циклического комплекса с участием фибрина, пламиногена и ТАП, что, в свою очередь, препятствует образованию пламина на фибриновом ступке [120]. В этом процессе принимает участие кофактор протеина С — протеин S, который может ингибировать активацию ТАФИ двумя путями: как кофактор протеина С и по протеин С-независимому пути — ингибируя инициацию образования тромбина и таким образом снижая степень активации ТАФИ [121].

Следует отметить, что тромбин способен непосредственно влиять на компоненты системы фибринолиза, так он вызывает синтез и секрецию ТАП эндотелиальными клетками в русло крови, которое также сопровождается секрецией ПАИ-1 [3, 5].

3.7. СРЕПТОКИНАЗА — АКТИВАТОР ПЛАЗМИНОГЕНА ЭКЗОГЕННОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Стрептокиназа (СК) — белок бактериального происхождения, который продуцируется разными видами (С, G, А серологические группы) β -гемолитических стрептококков. Вероятно, что она принимает участие в инвазии стрептококками организма хозяина [122]. Стрептокиназа способна активировать пламиноген как в растворе, так и связанный с поверхностью бактерии, причем пламин в комплексе с рецептором не чувствителен к ингибирующему действию α_2 -антипламина [123]. Такое функциональное взаимодействие активатора и рецептора обеспечивает поддержание нерегулированной протеолитической активности и эффективное проникновение бактерии сквозь тканевые барьеры организма хозяина.

Широкое применение стрептокиназы в тромболитической терапии во время лечения инфаркта миокарда, легочной эмболии, глубоких тромбозов сосудов и других нарушений кровообращения, связанных с тромбообразованием, обусловило значительный интерес к изучению ее структуры и механизма действия [8].

Структура молекулы стрептокиназы. Стрептокиназа — белок молекулярной массой 47 кДа, состоящий из 414 аминокислотных остатков [124, 125]. В N-концевом участке найдено около 250 аминокислотных остатков, гомоло-

гичных последовательностям некоторых сериновых протеиназ, включая трипсин быка и протеиназы некоторых бактерий [126]. Анализ последовательности СК дает возможность предположить, что она имеет трехмерный участок, который напоминает активный центр сериновых протеиназ, но His₅₇ “активного” участка замещен на глицин. Однако другие остатки аминокислот — Asp₁₀₂ и Ser₁₉₅ — находятся в ожидаемых позициях. Не считая наличия гомологии, весомых доказательств происхождения стрептокиназы из ферментов не найдено. Сиквенирование гена стрептокиназы с *Streptococcus equisimilis* и его дальнейшее успешное клонирование дало возможность провести масштабные исследования стрептокиназы [127].

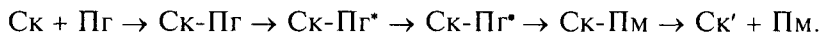
Стрептокиназа содержит 69 карбоксильных, 61 основных и 170 (около 40 %) гидрофобных остатков. С-концевая аминокислота — лизин, а N-концевая изолейцин. В состав СК входят 0,2 % гексоз и 0,1 % гексозамина [128]. Около 60 % аспарагиновых и глутаминовых остатков находятся в амидной форме [129]. В составе стрептокиназы не найдено цистеина и цистина. Белок стойкий к действию высоких температур и влияния мочевины. СК стабильна в пределах pH от 7 до 10 [130]. Изoeлектрическая точка стрептокиназы от 4,7 до 6,5 [131]. Спектрофотометрическими и калориметрическими методами исследована вторичная структура СК. По результатам опытов стрептокиназа является $\alpha + \beta$ -протеином, в составе которого около 17 % α -спиралей, 28 β -складчатых структур, 21 β -изгибов и 34 % неупорядоченной структуры [132].

Молекула стрептокиназы представляет собой мультидоменный протеин с чрезвычайно высоким уровнем гидратации и гибкости, которая мешает проведению рентгеноструктурного исследования или изучению структуры ее молекулы с использованием ЯМР [133]. Методом сканирующей микрокалориметрии установлено, что стрептокиназа содержит четыре независимых домена с разной стабильностью [134, 135]. Два N-концевых домена термолabile и, возможно, способны взаимодействовать с двумя другими. Четвертый домен — С-концевой — термостабильный и может взаимодействовать с третьим доменом, который в случае расщепления пептидной связи в четвертом дестабилизируется [136].

Активация плазминогена стрептокиназой. Стрептокиназа не проявляет амидолитической или эстеразной активности, поэтому ее относят к косвенным активаторам плазминогена. Индукция каталитической активности плазминогена стрептокиназой происходит поэтапно. На первом этапе стрептокиназа связывается с молекулой плазминогена, что вызывает определенные конформационные изменения в протеиназном домене плазминогена с дальнейшей экспозицией каталитического центра в плазминогеновой составной комплекса плазминоген-стрептокиназа. Предыдущие изменения приводят к расщеплению пептидной связи Arg₅₆₁—Val₅₆₂ в плазминогене, который находится в комплексе или свободном плазминогене [137].

Представленная ниже схема отображает этапы взаимодействия стрептокиназы с плазминогеном, вследствие сначала образуется, стехиометрический комплекс (СК-Пг), а после конформационных перестроек в плазминогеновой части комплекса — СК-Пг*. Этот этап зависит от наличия некоторых анионов или фибрин(оген)а или его фрагментов, которые подавляют

или стимулируют активность комплекса с экспонированным активным центром. Дальнейшие перестройки приводят к таким изменениям в комплексе СК-Пг*, что он становится нечувствительным к упомянутым факторам. В дальнейшем происходит разрыв пептидной связи $\text{Arg}_{561}-\text{Val}_{562}$, сопровождающийся образованием комплекса СК-Пм, стрептокиназа которого с течением времени частично деградирует [138]:



Известно, что плазмин не способен к активации плазминогена, комплексы же СК-Пг*, СК-Пг* и СК-Пм функционируют как активаторы плазминогена. Плазминогеновая компонента активаторного комплекса имеет свойства сериновых протеиназ, что противоречит классическому пониманию активации плазминогена как обязательного расщепления $\text{Arg}_{561}-\text{Val}_{562}$ -пептидной связи [139]. Плазминоген с экспонированным активным центром ингибируется серпинами, что является прямым доказательством принадлежности его к сериновым протеиназам [140]. Вместе с тем белковые ингибиторы протеиназ плазмы крови, такие как α_2 -антиплазмин, α_1 -антитрипсин, α_2 -макроглобулин и антитромбин III неспособны к его полному ингибированию [141]. В отличие от свободного плазмина активаторный комплекс Пг-СК не расщепляет белковые субстраты — фибрин, фибриноген, казеин. При низких значениях pH комплекс Пг-СК распадается, СК денатурирует, но плазминоген остается активным и может ингибироваться α_2 -антиплазмином, что указывает на наличие в молекуле плазминогена экспонированного активного центра [142, 143]. Липопротеин-(а), конкурируя с плазминогеном, способен к ингибированию индукции каталитической активности плазминогена стрептокиназой [144].

Стрептокиназа связывается с плазминогеном очень быстро — $5,4 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ [94]. Она способна образовывать комплексы не только с Глу-плазминогеном (Глу-Пг), но и Лиз-плазминогеном (Лиз-Пг) [145], миниплазминогеном [146], микроплазминогеном [147] или В-цепью (протеиназным доменом ПД) плазмина [148]. СК индуцирует каталитическую активность микроплазминогена медленнее, чем Глу-Пг или Лиз-Пг. Способность СК к индукции каталитической активности Лиз-Пг выше почти вчетверо, чем относительно Глу-Пг.

Видовая специфичность стрептокиназы. Стрептокиназа разного происхождения имеет четко выраженную видовую специфичность активации плазминогена. Так, стрептокиназа, продуцированная *Streptococcus uberis*, активирует лишь плазминоген вола [149], стрептокиназы некоторых стрептококков группы E активируют плазминоген свиньи [150], вместе с тем они инертны относительно плазминогена человека, что может быть свидетельством дивергентного характера эволюции активатора [149]. Неодинаковая способность к активации плазминогена стрептокиназами разного происхождения объясняется, очевидно, структурными отличиями протеиназного домена плазминогена у разных млекопитающих [151]. Конформация Пг в целом существенно не влияет на способность плазминогена млекопитающих активироваться стрептокиназой [152].

Для широко используемой в клинике стрептокиназы *Streptococcus equisimilis* тоже характерна высокая видовая специфичность — она хорошо активирует пламиноген человека и некоторых других видов млекопитающих, а пламиноген некоторых видов млекопитающих активирует слабо или совсем не активирует [151]. По способности активироваться этой стрептокиназой пламиноген млекопитающих можно распределить на три группы: 1 — активируются каталитическими количествами СК (пламиноген человека, макаки, кошки); 2 — активируются эквимольными и большими количествами СК (пламиноген собаки, кроля, лошади); 3 — не активируются стрептокиназой вообще (пламиноген вола, свиньи, мыши, крысы) [151].

Механизм действия стрептокиназы состоит в образовании эквимольного комплекса с пламиногеном. После этого в результате внутренних превращений в молекуле пламиногена открывается активный центр, и комплекс стрептокиназа-пламиноген приобретает способность активировать пламиноген в пламин, который и фрагментирует фибрин тромба до ПДФ. Пламин фрагментирует не только фибрин, но и фибриноген, циркулирующий в крови, чем и объясняется снижение его уровня на фоне тромбозиса.

3.8. ТРОМБОЛИТИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ

3.8.1. История тромболитической терапии

Тромболитические препараты впервые были применены в клинической практике благодаря стараниям В. Тиллета и С. Шерри еще в 1949 г., а в 1958 г. С. Шерри вместе с А. Флетчером и Н. Алкерсиг доложили об успешном применении стрептокиназы для лечения больных инфарктом миокарда (ИМ). Тромболитические препараты, которые на сегодня являются главными в лечении ИМ, позволили в ведущих клиниках мира снизить смертность от этого заболевания до 7 и даже до 5 %. Однако необходимость тромболитиков при этой патологии получила общее признание лишь после 1989 г. Несомненные заслуги отечественных ученых в области практического применения тромболитической терапии (ТЛТ) хорошо известны в мире. В 1961 г. отечественный фибринолизин, созданный Г.В. Андреенком под руководством Б.А. Кудряшова, был впервые применен в клинике А.Л. Мясникова Е.И. Чазовым. Отметим, что Е.И. Чазову принадлежит мировой приоритет внутрикоронарного введения тромболитика больному ИМ в 1976 г. [153].

Решающую роль в развитии ТЛТ сыграли широкое использование коронароангиографии при ОИМ, а также морфологические работы, убедительно показавшие, что причиной развивающегося ИМ является внутрикоронарный тромбоз, возникающий, как правило, на месте имеющейся атеросклеротической бляшки с поврежденной поверхностью. Эти работы способствовали организации двух крупных многоцентровых исследований, ставших классическими, так как именно с их помощью была доказана эффективность ТЛТ для снижения смертности при ИМ. Первое из них — GISSI-1 (Gruppo Italiano per lo Studio della Streptochinasi ne nell'Infarto miocardico) — выполнено в Италии и опубликовано в 1986 г.; второе — ISIS-2 (Second In-

ternational Study of Infarct Survival) — было международным, и его результаты стали доступными в 1988 г. С начала 1990-х годов ТЛТ вошла в перечень обязательных мероприятий при ОИМ [8, 153].

3.8.2. Механизм действия тромболитических препаратов и оценка эффективности тромболитической терапии

В отличие от антитромбоцитарных препаратов, прямых и непрямых антикоагулянтов, действие которых направлено на предотвращение тромбообразования, механизм действия тромболитических средств заключается в растворении фибринового тромба. Этот тромб, например, может образоваться в пораженной атеросклерозом артерии, а также явиться результатом эмболии. Различают тромбозы артериальные и венозные, а тромбоз эмболии — системные, легочные и парадоксальные. Локализация и происхождение тромба, как впрочем и общее состояние больного, имеют важное значение при решении вопроса о целесообразности тромболитической терапии в каждом конкретном случае, учитывая высокую стоимость тромболитических препаратов и связанный с их применением риск развития серьезных геморрагических осложнений. Тромболитическая терапия показана в остром периоде ИМ, при массивной или субмассивной ТЭЛА, тромбозе крупных артерий (бедренных, подколенных, подключичных и др.), а также, возможно, в первые часы после возникновения инсульта тромбоз эмболического происхождения. Не рекомендуется применение тромболитических препаратов для лечения тромбоза глубоких вен нижних конечностей, так как частичный лизис венозного тромба может повысить риск развития ТЭЛА.

Венозные тромбы, как правило, легче лизируются, чем артериальные, поэтому, например при лечении ТЭЛА, требуются гораздо меньшие дозы тромболитических препаратов, чем при лечении острого ИМ. И это не удивительно, учитывая, что в первом случае причиной заболевания служит венозный по происхождению тромб, а во втором — фибриновый тромб образуется в месте пораженной атеросклерозом коронарной артерии.

Тромболитическая терапия направлена на то, чтобы по возможности быстро растворить фибриновый тромб и восстановить антероградный кровоток в соответствующем органе или его части. Для этого необходимо повысить фибринолитическую активность крови больного, что теоретически можно достичь двумя путями:

- 1) введением активированного *in vitro* плазминогена, и увеличением тем самым его содержания в крови;
- 2) введением активаторов плазминогена, которые усиливают образование плазмина из эндогенного плазминогена.

Фибринолизин (или плазмин) — это выделенный из плазмы человека и неспецифически активированный *in vitro* трипсином плазминоген (профибринолизин). Клинические исследования показали, что экзогенный плазмин (препарат фибринолизин) действует медленно и недостаточно эффективен в растворении артериальных тромбов. Кроме того, он часто вызывает пирогенную и аллергическую реакцию, а также серьезные кровотечения. Тем не менее фибринолизин продолжает производиться в Украине, и разрешен к

клиническому применению в России, но едва ли его следует использовать при тромботических осложнениях.

За исключением фибринолизина, применяемые в настоящее время тромболитические препараты по механизму действия являются активаторами эндогенного плазминогена.

Современные тромболитические средства можно условно разделить на **три основные группы**:

1) *препараты первого поколения*, которые приблизительно в одинаковой мере активируют и связанный с фибрином, и циркулирующий в крови плазминоген и имеют короткий период полужизни (стрепто- и урокиназа);

2) *препараты второго поколения*, обладающие относительной специфичностью к связанному с фибрином плазминогену и более продолжительным периодом полужизни (рекомбинантная проурокиназа, АПСАК — анизоилированный плазминоген-стрептокиназный активаторный комплекс, рекомбинантный тканевый активатор плазминогена — ТАП, рекомбинантная стафилокиназа);

3) *препараты третьего поколения*, обладающие более высокой тромболитической активностью благодаря изменениям в их молекулах, которые были внесены методом генной инженерии (негликозилированный рекомбинантный ТАП, химерные молекулы, содержащие различные участки ТАП и урокиназы, и др.).

Стрептокиназа (стрептаза) — непрямой активатор плазминогена. Период полужизни стрептокиназы 15—25 мин. Получают ее из культуры β-гемолитического стрептококка группы С (по классификации Лансфильда), она обладает антигенными свойствами. В крови человека всегда обнаруживаются антитела против стрептокиназы, что связано с большой распространенностью стрептококковых инфекций в общей популяции. Титры антистрептокиназных антител быстро нарастают в течение нескольких дней после ее введения и через несколько суток достигают пика, который может в 1000 раз превышать исходные титры антител против стрептокиназы. У части больных титры антистрептокиназных антител возвращаются к исходному уровню (до ее введения) через 6 мес, однако во многих случаях титры этих антител остаются повышенными у больных, получавших стрептокиназу 2—4 года назад, обуславливая резистентность к повторному введению препарата, а также аллергические реакции.

Учитывая динамику антистрептокиназных антител, обычно не рекомендуют повторное введение стрептокиназы после проведенного лечения, а также сразу после перенесенной стрептококковой инфекции. В то же время М. Buchalter и соавт. показано, что в течение 72 ч после лечения стрептокиназой повторное ее введение (при необходимости) может быть эффективным и безопасным для большинства больных.

Для профилактики аллергических реакций (включая анафилактический шок) некоторые авторы рекомендуют перед введением стрептокиназы внутривенно вводить кортикостероиды (до 180—240 мг преднизолона) и/или антигистаминные препараты.

Как показывают исследования, эффективность стрептокиназы может значительно варьировать, что, по-видимому, связано с различиями в титрах антистрептокиназных антител у некоторых больных. Поэтому не удивитель-

но, что данные литературы относительно оптимальной дозы стрептокиназы у больных острым инфарктом миокарда разноречивы. По наблюдениям J. Col эффективность 500 000 и 1 500 000 ЕД стрептокиназы примерно одинаковая. В то же время показано, что 3 000 000 ЕД стрептокиназы значительно превосходит по эффективности дозу препарата 1 500 000 ЕД, которая в настоящее время считается общепринятой.

Данные J. Col и соавт. о достаточно высокой эффективности более низких, чем обычно рекомендуемые, доз стрептокиназы представляют интерес, особенно в связи с довольно высокой стоимостью этого самого дешевого из тромболитических препаратов. Однако, поскольку нельзя исключить того, что под наблюдением авторов оказались больные с низкими исходными титрами антистрептокиназных антител, вопрос о наименьшей эффективной дозе стрептокиназы при остром ИМ остается открытым до проведения крупных сравнительных исследований.

В настоящее время при лечении острого ИМ стрептокиназа обычно назначается в дозе 1 500 000 ЕД, которая разводится в 100 мл изотонического раствора хлорида натрия или 5%-го раствора глюкозы и вводится в течение 60 мин. При более быстром введении 1 500 000 ЕД препарата (за 30 мин) эффективность тромболитической терапии, оцениваемая по частоте проходимости инфарктсвязанной коронарной артерии, увеличивается, но при этом значительно возрастает риск развития гипотонии.

Стрептокиназа выпускается во многих странах мира под различными коммерческими названиями: “стрептаза”, “кабикиназа”, “авелизин”, “целиаза” и др.

Урокиназа (аббокиназа). Существуют две молекулярные формы активатора плазминогена урокиназного типа: низкомолекулярная (молекулярная масса 33 кДа) и высокомолекулярная (54 кДа). Обычный препарат урокиназы представляет собой низкомолекулярную форму двухцепочечного активатора плазминогена урокиназного типа, которая является результатом расщепления ее высокомолекулярной формы, вероятно за счет аутокаталитического механизма в процессе очистки. Период полужизни урокиназы 15–20 мин. Основной путь элиминации урокиназы — ее разрушение и быстрое выведение печенью. В отличие от стрептокиназы урокиназа не вызывает образования специфических антител. Аллергические реакции при лечении урокиназой встречаются гораздо реже, чем при введении стрептокиназы.

Урокиназа выпускается под различными коммерческими названиями: “аббокиназа”, “урокидан” и др.

Проурокиназа (саруплаза), или одноцепочечный активатор плазминогена урокиназного типа, обладает высокой специфичностью в отношении связанного с фибрином плазминогена (по сравнению со стрепто- и урокиназой), а также более продолжительным периодом полужизни.

Проурокиназу можно выделить из мочи и культуры клеток почек эмбриона человека, однако для клинического применения препарат обычно получают ДНК-рекомбинантным методом. В настоящее время выпускают две различные формы рекомбинантной проурокиназы. Негликозилированная ее форма известна под названием “саруплаза” (saruplase), с успехом исполь-

зуется в странах Западной Европы для лечения острого ИМ. Эффективность и безопасность саруплазы недавно продемонстрирована в крупном открытом исследовании PASS (Practical Applicability of Saruplase Study), включавшем 1698 больных, которым саруплазу вводили в первые 6 ч после начала заболевания. Отмечены низкая внутрибольничная смертность (5,4 %), низкая частота повторного ИМ (3,8 %), геморрагического инсульта (0,5 %) и серьезных кровотечений, требующих переливания крови (1,2 %).

В США проводятся клинические испытания гликозилированной формы рекомбинантной проурокиназы (А-74187) с более быстрым началом действия, чем у негликозилированной. По предварительным данным, 90-минутная проходимость инфарктсвязанной коронарной артерии при лечении этим препаратом составляет в среднем 73 %, что выше соответствующего из показателя для стрепто- и урокиназы.

При лечении острого ИМ рекомбинантные формы проурокиназы назначают в дозе 40—80 мг в течение 60—120 мин.

Ацетилированный плазминоген-стрептокиназный комплекс — АПСАК (анистреплаза) представляет собой неактивный эквимольярный комплекс стрептокиназы и плазминогена человека, в котором к активному центру молекулы плазминогена ковалентно присоединена ацетильная группа. Ацетилирование не влияет на способность АПСАК связываться с фибриновым тромбом, так как фибринсвязывающий центр плазминогена функционально отличается от его активного центра. АПСАК не взаимодействует с плазминогеном до тех пор, пока в результате спонтанного деацетилирования в крови не будет восстановлена его ферментативная активность. Период полужизни АПСАК составляет 70—120 мин, что значительно больше, чем стрепто- или урокиназы, благодаря чему АПСАК можно назначать в виде однократного болюса. В большинстве сравнительных исследований частота 90-минутной проходимости инфарктсвязанной коронарной артерии при лечении АПСАК была выше, чем при применении стрептокиназы.

Рекомендуемая доза АПСАК для лечения острого ИМ составляет 30 мг (или 30 ЕД), которые вводят в виде внутривенного болюса в течение 2—5 мин.

В литературе АПСАК часто называют также “анистреплаза” (anistreplase), одно из патентованных названий АПСАК — “эминаза” (eminase).

Тканевый активатор плазминогена (альтеплаза). Уникальным свойством ТАП является его очень высокая избирательность в отношении связанного с фибрином плазминогена, что обеспечивает его преимущественную активацию на поверхности фибринового тромба. Правда, эта избирательность в значительной мере утрачивается, когда ТАП используется в терапевтических дозах.

ТАП не обладает антигенными свойствами и не оказывает существенного влияния на гемодинамику; пирогенные и аллергические реакции в ответ на введение ТАП встречаются редко.

В последние годы для клинического применения ТАП получают ДНК-рекомбинантным методом. В литературе так полученный препарат однопечечного ТАП получил название “альтеплаза” (alteplase), а двухпечечного ТАП — “дуптеплаза” (duteplase).

Альтеплаза выпускается под патентованными названиями “активаза” (activase) и “актилизе” (actilyse).

Экспериментальные исследования свидетельствуют о более высокой тромболитической активности ТАП по сравнению со стрепто- и урокиназой. В остром периоде ИМ комбинантный ТАП быстрее и чаще вызывает лизис окклюзирующего тромба в инфарктсвязанной коронарной артерии. ТАП более эффективно снижает раннюю смертность у больных ИМ, чем стрептокиназа, однако чаще вызывает внутричерепные кровоизлияния.

В клинической практике используется главным образом одноцепочечный рекомбинантный ТАП, или альтеплаза, период полужизни которого составляет 4—8 мин.

Для лечения острого ИМ альтеплазу обычно назначают в общей дозе 100—150 мг в течение 3 ч, причем первые 6—10 мг препарата вводят в виде болюса в течение 2 мин. В связи с тем что альтеплаза в общей дозе 150 мг часто вызывала геморрагические осложнения, а 3-часовая инфузия слишком поздно приводила к реканализации инфарктсвязанной коронарной артерии, в последние годы предложены две новые схемы введения рекомбинантного ТАП.

К. Neuhaus и соавт. предложили схему “ускоренного” введения рекомбинантного ТАП: 100 мг в течение 90 мин, причем первые 15 мг препарата вводят в виде болюса, затем начинают инфузию (50 мг за 30 мин и 35 мг за остальные 60 мин).

Схема ускоренного введения альтеплазы успешно апробирована в одном из самых крупных из исследований по изучению эффективной тромболитической терапии при остром ИМ GUSTO-I (Global Utilization of Streptokinase and Tissue Plasminogen Activator for Occluded Coronary Arteries, 1993). В этом исследовании показано, что при ускоренном введении рекомбинантного ТАП 30-суточная смертность на 15 % ниже, чем при лечении стрептокиназой. На 90-й минуте после начала тромболитической терапии инфарктсвязанная коронарная артерия была проходимой у 81 % больных, получивших ТАП, и лишь у 57 % больных, получавших стрептокиназу, причем полная проходимость наблюдалась соответственно в 54 и 31 % случаев. Учитывая, что при обычной схеме введения альтеплазы частота 90-минутной проводимости инфарктсвязанной коронарной артерии составляет в среднем 70 %, результаты исследования GUSTO-I можно рассматривать как доказательство большей эффективности ускоренной схемы введения препарата.

Другая схема введения альтеплазы в остром периоде ИМ предложена J. Riguis и соавт.: препарат вводился в виде двух болюсов по 50 мг с интервалом между болюсами в 30 мин. При двухболюсной схеме назначения рекомбинантного ТАП 90-минутная проходимость инфарктсвязанной коронарной артерии отмечалась у 78 из 84 (93 %) больных, причем полная проходимость — в 88 % случаев.

Таким образом, новые схемы применения рекомбинантного ТАП при остром ИМ оказались значительно более эффективными, чем рекомендовавшаяся ранее схема 3-часового введения препарата.

Сравнительная характеристика основных применяемых в настоящее время тромболитических препаратов представлена в табл. 3.2.

Таблица 3.2. Сравнительная характеристика основных тромболитических препаратов [154]

Показатель	Стрептокиназа	Урокиназа	АПСАК (анистреплаза)	ТАП (альтеплаза)
Молекулярная масса, кДа	47	33—54	131	70
$t_{1/2}$, мин	15—25	15—20	70—120	4—8
Связывание с плазминогеном	Непрямое	Прямое	Непрямое	Прямое
Избирательная активность в отношении фибрина	Минимальная	Умеренная	Минимальная	Умеренная
Антигенные свойства	Да	Нет	Да	Нет
Риск развития гипотонии	Да	Да	Да	Да
Кровотечение как главный побочный эффект	Да	Да	Да	Да

Недостатки существующих тромболитических препаратов (короткий период полужизни, недостаточная фибринолитическая активность, нередкое развитие реокклюзии и т. д.) привели к разработке новых препаратов на основе ДНК-рекомбинантного метода. Так была создана модифицированная (негликозилированная) форма рекомбинантного ТАП — препарат ретеплаза (reteplase) с более длительным периодом полужизни, чем альтеплаза.

Ретеплаза вводится в виде двух болюсов по 10 000 000 ЕД с интервалом 30 мин. В сравнительном исследовании обнаружена более высокая эффективность ретеплазы у больных острым ИМ по сравнению со стандартной схемой применения альтеплазы (100 мг за 3 ч). Завершено контролируемое исследование по сравнению эффективности и безопасности ретеплазы и ускоренной схемы введения альтеплазы (100 мг за 90 мин). Смертность на 35-е сутки острого ИМ при лечении ретеплазой была недостоверно ниже, чем при лечении альтеплазой (4,1 и 8,4 %). Частота 90-минутной проходимости инфарктсвязанной коронарной артерии в группе больных, которых лечили ретеплазой, составила 83 %, что значительно больше, чем в группе больных, получавших альтеплазу. Не было различий между ретеплазой и альтеплазой в частоте серьезных кровотечений или геморрагических инсультов. Таким образом, по предварительным данным, ретеплаза является самым эффективным тромболитическим средством из применяемых в настоящее время для лечения острого ИМ.

Стафилокиназа представляет собой одноцепочечный белок без дисульфидных связей, состоящий из 136 аминокислотных остатков. Она секретируется некоторыми штаммами золотистого стафилококка, однако для клинического применения в настоящее время стафилокиназу получают ДНК-рекомбинантным методом. От стрептокиназы стафилокиназа отличается большей фибринолитической активностью и меньшей аллергенностью.

Недавно продемонстрирована высокая эффективность стафилокиназы в отношении восстановления проходимости инфарктсвязанной коронарной артерии в остром периоде ИМ, а также при недавно возникшей тромботиче-

ской окклюзии периферической артерии. Общепринятых схем введения стафилокиназы для лечения острого ИМ не существует. При сравнении эффективности и безопасности стафилокиназы и рекомбинантного ТАП (альтеплазы) S. Vanderschueren и соавт. использовали две схемы внутривенного введения стафилокиназы: 1) 1 мг в виде болюса, затем 9 мг в виде инфузии за 30 мин; 2) 2 мг в виде болюса, затем 18 мг в виде инфузии за 30 мин. Внутривенная смертность оказалась достоверно ниже в группе больных острым ИМ, получавших стафилокиназу, чем в группе больных, получавших рекомбинантный ТАП (ни одного случая смерти среди 48 больных против 5 случаев среди 52 больных; $p < 0,05$). Частота кровотечений, реинфарктов или повторных эпизодов ишемии миокарда была недостоверно ниже среди больных, которых лечили стафилокиназой. Эти данные указывают на то, что рекомбинантная стафилокиназа, по-видимому, превосходит по эффективности рекомбинантный ТАП, а значит, и стрептокиназу, и урокиназу.

Основными показаниями к применению тромболитических препаратов являются:

- 1) острый ИМ (обычно в первые 4—6 ч после развития ангинозного приступа;
- 2) массивная или субмассивная ТЭЛА (в течение 5—14 сут);
- 3) периферические артериальные тромбозы;
- 4) тромбоз центральной вены сетчатки;
- 5) тромбозы других вен (печеночных, почечных и других, кроме вен нижних конечностей);
- 6) тромбозы дополнительных сосудистых шунтов (аорто-коронарных, артериовенозных шунтов для проведения гемодиализа и др.);
- 7) тромбоз протеза трехстворчатого клапана сердца.

Среди побочных эффектов тромболитических препаратов наибольшее значение имеют геморрагические осложнения и особенно внутричерепные кровоизлияния, которые встречаются в 0,1—1,0 % случаев. Частота внутричерепных кровоизлияний у больных острым ИМ при лечении альтеплазой выше, чем при лечении стрептокиназой, и приблизительно такая же, как при применении АПСАК.

В то же время аллергические реакции (в частности, анафилактический шок) чаще развиваются при лечении стрептокиназой или АПСАК, чем урокиназой или рекомбинантным ТАП.

По данным исследования GUSTO-I, стойкая гипотония чаще встречается при лечении стрептокиназой, чем альтеплазой.

Реокклюзия (ретромбоз) инфарктсвязанной коронарной артерии после успешной тромболитической терапии острого ИМ наблюдается приблизительно в 15—20 % случаев, хотя далеко не всегда она сопровождается развитием повторного ИМ (или рецидива). Тем не менее, как показывают данные контролируемых исследований, которые проводились до начала широкого использования тромболитических препаратов при лечении острого ИМ, частота раннего повторного ИМ после лечения стрептокиназой в 1,5—2,0 раза больше, чем среди больных, не получавших тромболитической терапии.

Данные литературы о частоте реокклюзий при лечении ОИМ различными тромболитическими препаратами противоречивы. Это объясняется тем,

что по этическим соображениям невозможно у многих больных проводить повторные ангиографические исследования. Лишь в 5 исследованиях оценивалась частота реокклюзии инфарктсвязанной коронарной артерии, которая была проходимой на 90-й минуте после начала тромболитической терапии. Повторная коронароангиография проводилась в разные сроки острого ИМ (от 24 ч до выписки больного из стационара). По сводным данным, частота реокклюзии наибольшая после лечения рекомбинантным ТАП (от 11 до 20 %, в среднем 13%) и наименьшая после применения АПСАК (2,4 %). После лечения стрептокиназой она составляла в среднем 9 %, урокиназой — 10 %. Низкую частоту реокклюзии инфарктсвязанной коронарной артерии после применения АПСАК объясняют как длительным периодом полужизни, так и отсутствием избирательности к связанному с фибрином плазминогеном, что приводит к снижению содержания фибриногена в крови.

В исследовании GUSTO-I не обнаружено различий в частоте реокклюзии после лечения стрептокиназой и рекомбинантным ТАП (по 5,9 %).

Важнейшие абсолютные и относительные противопоказания к тромболитической терапии приведены ниже.

АБСОЛЮТНЫЕ ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ

- Острое внутреннее кровотечение.
- Недавнее (до 10 сут) серьезное кровотечение из желудочно-кишечного тракта или мочеполовых путей.
- Недавняя (в течение 10 сут) обширная операция, травма с возможным повреждением внутренних органов (например, после сердечно-легочной реанимации) или биопсия внутренних органов.
- Недавняя (в течение 2 мес) травма или операция на головном или спинном мозге.
- Неконтролируемая артериальная гипертензия (АД выше 200/120 мм рт. ст.).
- Геморрагический диатез, включая тромбоцитопению (число тромбоцитов меньше 100 000 в 1 мм³).
- Геморрагический инсульт в анамнезе, остаточные явления после перенесенного инсульта. Подозрение на расслаивающую аневризму аорты или острый панкреатит.
- Аллергическая реакция на тромболитический препарат (при необходимости повторного введения стрептокиназы или АПСАК).

ОТНОСИТЕЛЬНЫЕ ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ

- Тяжелая артериальная гипертензия (АД 180/110 мм рт. ст. или выше).
- Заболевания, сочетающиеся с повышенным риском развития кровотечения, включая тяжелые заболевания печени или почек.
- Сосудистое заболевание головного мозга.
- Травма головного мозга, операция на головном или спинном мозге, кровотечение из желудочно-кишечного тракта или мочеполовых путей в анамнезе.
- Тромбоз глубоких вен нижних конечностей.
- Наличие тромба в полостях сердца.
- Острый перикардит или инфекционный эндокардит.
- Диабетическая геморрагическая ретинопатия.
- Обширные ожоги.
- Беременность.
- Переломы костей.
- Предшествующая терапия стрептокиназой или АПСАК (особенно в первые 4—9 мес), если предполагается повторное введение этих препаратов (другие тромболитические препараты не противопоказаны).

Существуют ингибиторы фибринолиза, которые являются специфическими антагонистами тромболитических препаратов. К ним относятся аминокaproновая кислота (ϵ -аминокaproновая кислота ЭАКК), аминoметилбензойная кислота (ПАМБК), транексамовая кислота и апротинин.

Однако ингибиторы фибринолиза следует использовать для лечения геморрагических осложнений тромболитической терапии с большой осторожностью, учитывая повышенный риск развития повторного тромбоза, особенно у больных острым ИМ. Применение ингибиторов фибринолиза оправдано лишь при кровотечениях, угрожающих жизни больного.

ЭАКК (патентованное название “амикар”) быстро тормозит фибринолиз. Препарат обычно вводится внутривенно капельно (100 мл 5%-го раствора в течение 30 мин, затем по 1 г/ч до остановки кровотечения).

ПАМБК (патентованные названия ПАМБА (РАМВА), “гумбикс”, “стриптосолют”) обладает малой токсичностью и по антифибринолитической активности примерно в 3 раза превосходит ЭАКК. ПАМБК вводят внутривенно капельно по 1—3 г 3—4 раза в сутки.

Транексамовая кислота (патентованные названия “циклокапрон”, “френолиз”, “экзацил” и др.) в 10 раз активнее, чем ЭАКК. Применяется внутривенно капельно по 1,0—1,5 г 3 раза в сутки.

Апротинин (трасилол, контрикал) является природным ингибитором протеолитических ферментов. Из-за высокой стоимости он редко используется в качестве ингибитора фибринолиза. Назначается по 300 000 МЕ внутривенно капельно.

Контролируемые исследования по изучению эффективности и безопасности ингибиторов фибринолиза при лечении кровотечений у больных острым ИМ, получавших тромболитическую терапию, не проводились. Однако результаты двух многоцентровых исследований, посвященных лечению субарахноидального кровоизлияния, вызванного разрывом аневризмы мозговой артерии, свидетельствуют, что антифибринолитические препараты, снижая смертность от повторного кровотечения, одновременно повышают риск развития ишемического тромботического инсульта.

Ингибиторы фибринолиза иногда сочетают с инфузиями свежемороженой плазмы. При необходимости переливания крови предпочтительнее использовать свежую кровь.

Таким образом, тромболитические препараты являются высокоэффективными средствами для лечения сердечно-сосудистых заболеваний, обусловленных полной или частичной окклюзией крупного сосуда фибриновым тромбом, однако необходимы строгий учет противопоказаний к назначению этих препаратов и тщательное наблюдение за участками возможного кровотечения, особенно в местах повреждения сосуда, например, при его пункции или катетеризации [154].

ГЛАВА 4 НАРУШЕНИЯ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА

4.1. ПАТОЛОГИЧЕСКОЕ ТРОМБООБРАЗОВАНИЕ (ТРОМБОЗЫ)

У здоровых людей гемостатический процесс является нормальной реакцией организма, возникающей обычно в ответ на механическое повреждение сосудов и направленной на остановку локального кровотечения. Однако очень многие патологические состояния как приобретенного, так и наследственного характера могут сопровождаться спонтанным образованием тромбов, что может послужить причиной тяжелых нарушений функций и систем организма и даже привести к внезапной смерти. Нам не представляется целесообразным перечислять все нозологические формы, в генезе которых патологическое свертывание крови играет существенную роль, однако стоит упомянуть такие заболевания, как атеросклероз и его осложнения, инфаркт миокарда, нарушения мозгового кровообращения, сахарный диабет, злокачественные новообразования, патология беременности, в частности преэклампсия, септицемия и септический шок, врожденные тромбофилические нарушения; часто тромбоз возникает и после хирургических вмешательств. Данный перечень заболеваний может быть расширен во много раз, однако вне зависимости от этиологических причин тромбообразование в организме происходит по единым законам с включением в процесс определенных клеточных элементов, энзимов и субстратов.

В целостном организме при отсутствии каких-либо патологических воздействий жидкое состояние крови является следствием равновесия факторов, обуславливающих процессы свертывания и препятствующих их развитию. Существуют три основные причины, способные привести к нарушению подобного баланса с последующим тромбообразованием. Это повреждение сосудистой стенки, повышенная склонность крови к свертыванию (тромбофилия) и гемодинамические нарушения [1]. Данные патогенетические составные присутствуют во всех случаях

тромбозов вне зависимости от этиологии процесса, однако величина их удельного вклада в каждом конкретном случае может быть различной.

Сосудистая стенка принимает непосредственное участие в регуляции коагулологического потенциала крови. Эндотелий является естественным барьером между кровью и другими тканями. Белки, локализованные на люминальной поверхности эндотелиоцитов, участвуют в реализации функционального взаимодействия между сосудистой стенкой и кровью, что выражается прежде всего в обеспечении тромборезистентных свойств внутренней поверхности сосудов и участии в поддержании сосудистого тонуса через специфические рецепторы [2, 3].

Эндотелиальные клетки способны синтезировать и/или экспрессировать на своей поверхности различные биологически активные вещества, модулирующие тромбообразование. К ним относятся фактор фон Виллебранда, эндотелиальный фактор релаксации (NO), простаглицин (PGI₂), тромбомодулин, эндотелин, активатор плазминогена тканевого типа (ТАП), ингибитор активатора плазминогена тканевого типа (ПАИ-1), тканевый фактор (тромбопластин), ингибитор пути тканевого фактора и некоторые другие. Кроме того, мембраны эндотелиоцитов несут на себе рецепторы, которые при определенных условиях опосредуют их связывание с молекулярными лигандами и клетками, свободно циркулирующими в кровотоке [4—7].

При отсутствии каких-либо повреждений выстилающие сосуд эндотелиальные клетки обладают тромборезистентными свойствами, что способствует поддержанию жидкого состояния крови. Причины тромборезистентности неповрежденной сосудистой стенки до сих пор остаются во многом неясными, однако можно выделить ряд физиологических обстоятельств, способных обеспечить условия, препятствующие развитию коагуляционных процессов в здоровом организме. Известно, что васкулярные клетки могут синтезировать и секретировать ряд компонентов, обладающих антитромботическими свойствами (ТАП, PGI₂, эндотелин, NO и др.), однако нет достаточных доказательств того, что этот эффект может быть проявлен интактным эндотелием без предварительной его стимуляции [5—9]. Однако, не исключено, что обусловленные кровотоком физиологические величины сдвигового напряжения достаточны для стимуляции образования и высвобождения эндотелиальными клетками факторов, обеспечивающих сосудистой стенке тромборезистентные свойства. К ним прежде всего относятся простаглицин (PGI₂) и эндотелиальный фактор расслабления, представляющий собой оксид азота NO. Известно, что PGI₂ в эндотелиальных клетках может метаболизироваться не только из эндогенных нестабильных пероксидов, но и из экзогенных тромбоцитарных PGG₂ и PGH₂. Кроме того, PGI₂ способен образовываться в цельной крови в отсутствие эндотелиальных клеток.

Простаглицин является вазодилататором большинства сосудов, в том числе и коронарных артерий, за счет прямого влияния на гладкомышечные клетки и одним из самых сильных антиагрегационных агентов из описанных в литературе [5—7, 10, 11].

Оксид азота участвует в регуляции сосудистого тонуса, нейротрансмиссии, иммунном ответе организма и ряде других реакций. Известно, что NO

обладает мощным антиагрегационным эффектом. Физиологические значения сил кровотока представляют собой достаточный стимул для образования такого количества NO, которое способно обеспечить антиадгезивные свойства сосудистой стенки.

NO, так же, как и простаглицлин, не накапливается и не депонируется в организме, но при соответствующей стимуляции синтезируется и высвобождается из клеток. При этом быстрый, но кратковременный подъем уровня этих биологически активных веществ возникает в ответ на действие различных агонистов, вызывающих увеличение содержания внутриклеточного ионизированного кальция [2—5].

Имеется и третья антиагрегационная субстанция, синтезирующаяся эндотелиальными клетками. Это эндотелин, представляющий собой пептид и обладающий выраженным вазоконстрикторным эффектом. Известно, что продукция эндотелина повышается при низких значениях сдвигового напряжения, например в венах, что может служить препятствием инициации тромбообразования в регионах, характеризующихся низкой скоростью сдвига. Кроме того, эндотелин способен стимулировать высвобождение PG12 и NO [3—7, 12].

Тканевый активатор плазминогена играет важную роль не только в обеспечении фибринолитических реакций, но также принимает участие и в других физиологических процессах, в том числе овуляции, клеточной миграции, дифференциации эпителия, прогрессии опухолей и пр. В физиологических условиях при отсутствии повреждения сосудистой стенки величины сдвигового напряжения, характерные для артериального русла, являются достаточными для поддержания высвобождения фоновых количеств ТАП из эндотелиоцитов в кровотоки и предупреждения высвобождения из эндотелиальных клеток ингибитора активаторов плазминогена (ПАИ-1). Следует отметить, что помимо участия в предупреждении депозиции фибрина, ТАП вмешивается и в клеточный гемостаз, потенцируя дезагрегационный эффект NO и PG12 [13, 14].

Тромборезистентности сосудистой стенки способствует еще один продукт липидного обмена — 13-гидроксиоктадекадиеновая кислота (13-HODE). 13-HODE депонируется в везикулах эндотелиальных клеток и не высвобождается из них в окружающее пространство. При стимуляции эндотелиоцитов тромбином, эндотоксином, интерлейкином-1 и некоторыми другими цитокинами синтез 13-HODE быстро снижается. Напротив, повышение внутриклеточного уровня цАМФ сопровождается активацией образования 13-HODE. Показано, что количество 13-HODE в интактных эндотелиальных клетках отрицательно коррелирует со степенью тромбогенности плазматической мембраны эндотелиоцитов. При изучении механизма антиадгезивного действия 13-HODE выявлено, что этот метаболит регулирует экспрессию адгезивных рецепторов, прежде всего витронектиновых, на поверхности эндотелиальных клеток. Известно, что 13-HODE и витронектиновые рецепторы, являющиеся двухцепочечными гликопротеинами и относящиеся к классу интегринов, имеют общую локализацию в клетках и располагаются в везикулах, находящихся непосредственно под плазматической мембраной. В интактных эндотелиоцитах 13-HODE взаимодействует с липофиль-

ными центрами витронектиновых рецепторов, понижая тем самым экспрессию последних на плазматической мембране [1—3].

Еще одной причиной тромборезистентности сосудистой стенки является способность эндотелиальных клеток синтезировать и экспрессировать на своей поверхности белок тромбомодулин. При высоком уровне цАМФ в эндотелиоцитах (а это возможно при отсутствии каких-либо стимулирующих факторов за исключением физиологического сдвигового напряжения) на люминальной поверхности интимы повышается экспрессия тромбомодулина, выполняющего роль рецептора для активированного тромбина. Тромбин, связанный с тромбомодулином, претерпевает такие конформационные изменения, которые делают невозможным его участие в процессе фибринообразования, но зато обеспечивает высокую активность тромбина в реакции расщепления профермента протеина С, способствуя тем самым выявлению противосвертывающего эффекта последнего [4, 15, 16].

Еще одним фактором, предотвращающим тромбообразование, является гепарин, синтезирующийся в тучных клетках, однако его реальная роль в обеспечении тромборезистентности сосудистой стенки пока недостаточно ясна [1, 17, 18].

Вне всякого сомнения указанные причины тромборезистентности сосудистой стенки далеко не в полной мере отражают генез этого феномена. Не исключено, что в обеспечении тромборезистентности внутренней поверхности интактной сосудистой стенки участвуют и другие факторы, например входящие в ее состав глюкозаминогликаны и связанный с ними антитромбин III, кофактор гепарина II, ингибитор пути тканевого фактора, ингибитор сериновых протеиназ нексин и т. п. Следует также отметить, что для полного проявления антитромбогенности интимы необходимо сочетанное действие всех или большинства из указанных физиологических слагаемых [1—3].

Нарушение целостности сосудистой стенки и/или изменение функциональных свойств эндотелиальных клеток могут способствовать развитию протромботических реакций и индуцировать прогрессирование ряда заболеваний, например атеросклероза. Причины, приводящие к травме сосудов, весьма разнообразны. Это экзогенные факторы: механические повреждения, лучевое воздействие, гипер- и гипотермия, токсические вещества, лекарственные препараты и т. п. Среди лекарственных средств наибольшее значение имеют гормональные контрацептивы, гипертонические растворы с низким рН, адреналин, глюкокортикоиды. К эндогенным факторам относятся биологически активные вещества (тромбин, циклические нуклеотиды, ряд цитокинов и т. п.), способные при определенных условиях проявлять мембраноагрессивные свойства. Такой механизм поражения сосудистой стенки характерен для многих заболеваний, сопровождающихся склонностью к тромбообразованию [4, 6, 8].

При индукции повреждения эндотелиоцитов естественными метаболитами или эндотоксином, что наблюдается при многих заболеваниях, ответная реакция сосудистой стенки в зависимости от вида повреждающего фактора может иметь острый или хронический характер. В случае развития острых изменений ответ эндотелиальных клеток бывает быстрым, но кратковременным, что типично прежде всего для проявлений, опосредованных тромби-

ном. Сериновая протеиназа тромбин, с одной стороны, является фактором, способным модулировать метаболические процессы в интактных клетках сосудистого эндотелия, с другой — генерация этой протеиназы представляет собой ответную реакцию на повреждение эндотелиоцитов: на поверхностно поврежденной сосудистой стенке присутствует тромбин с прокоагулянтной активностью. Тромбин, выявляющийся на сосудистой поверхности, может быть генерирован локально с участием экспрессированного тканевого фактора или образован в плазме, например на начальных этапах развития ДВС-синдрома после обширных хирургических вмешательств, а затем связываться с поврежденным участком сосудистой стенки, в частности с субэндотелиальной мембраной или депонированным фибрином.

Эффекты, оказываемые тромбином на процессы жизнедеятельности эндотелиальных клеток, многообразны [19—27], причем большинство из них реализуется через взаимодействие лиганда со специфическими поверхностными рецепторами. В этих ситуациях выявляются повышение синтеза и секреции PGI₂, NO, фактора агрегации тромбоцитов (ФАТ), секреции фактора фон Виллебранда, экспрессии р-селектина на поверхности наружной эндотелиальной мембраны, приводящей к потенцированию адгезии нейтрофилов, увеличению проницаемости эндотелиоцитов, а также увеличению экспрессии тканевого фактора и секреции ТАП и ПАИ-1.

Эндотелиальные клетки при развитии острых нарушений участвуют также в инактивации тромбина путем вовлечения в процесс сорбированных с их поверхностью антитромбина III (АТ III) и тромбомодулина. Механизм действия тромбомодулина связан с активацией протеина С. Активированный протеин С обладает противосвертывающими свойствами, обусловленными его ингибирующим влиянием на фактор V и фактор VIII, а также ПАИ-1 [1, 3].

Таким образом, умеренные по интенсивности изолированные воздействия тромбина на здоровые эндотелиальные клетки приводят к развитию реакций, в большинстве своем направленных на поддержание жидкого состояния крови. Известно, что при действии на эндотелиоциты тромбин прежде всего вызывает быстрое повышение синтеза и секреции мощных антиагрегантов PGI₂ и NO, способных лимитировать развитие процесса внутрисосудистой коагуляции. В этой ситуации PGI₂ и NO действуют как синергисты, однако продолжительность их эффекта невелика, что связано с очень коротким периодом полужизни данных субстанций. Кроме того, в первый момент после воздействия слабыми стимулами на эндотелиальные клетки повышается высвобождение только эндотелиального фактора релаксации (NO), тогда как для либерации PGI₂ требуются более сильные стимулы. По всей видимости это связано с разными путями передачи сигнала, обеспечивающего синтез обоих медиаторов. Не исключено, что такая последовательность высвобождения NO и PGI₂ обусловлена биологической целесообразностью, так как при слабых воздействиях на эндотелий для предупреждения возможного развития протромботических реакций достаточно вмешательства в процесс одного лишь NO. Это объясняется тем, что начальный этап тромбообразования протекает при активной адгезии клеточных элементов к поверхности сосудистой стенки и, следовательно, в этой ситуации наиболее предпочтитель-

льным является синтез NO, обладающий не только антиагрегационным, но и выраженным антиадгезивным действием. После образования монослоя депозированных тромбоцитов дальнейшая их аккумуляция происходит в основном по законам межтромбоцитарного взаимодействия, т. е. агрегации. Отсюда понятна небольшая временная задержка синтеза PGI₂, который является самым сильным природным антиагрегационным веществом, способным к тому же потенцировать как антиагрегационный, так и дезагрегационный эффекты NO, но в физиологических концентрациях не обладает модулирующим влиянием на адгезию [1—6].

При действии тромбина на эндотелиоциты они способны отвечать быстрым, но кратковременным повышением синтеза и высвобождения фактора агрегации тромбоцитов (ФАТ). Острое воздействие ФАТ на клеточный гемостаз *in vivo* приводит к повышению уровня синтеза PGI₂, препятствуя таким образом тромбообразованию в рассматриваемой ситуации. ФАТ является физиологически активным фосфолипидом, проявляющим свое действие при многих заболеваниях (бронхиальная астма, шок, ишемия миокарда и мозга, воспаление и др.). Ряд клеток, включая макрофаги, полиморфноядерные лейкоциты, тромбоциты, а также клетки сосудистого эндотелия, способны синтезировать, высвободить и утилизировать ФАТ. Вызывать продукцию и высвобождение ФАТ эндотелиальными клетками могут цитокины, в частности интерлейкин 1. Фактор агрегации тромбоцитов принимает деятельное участие в реализации реакций, приводящих к образованию тромбов. Он способен влиять на тромбоциты с последующим развитием их адгезии и агрегации, повышать чувствительность тромбоцитов к активирующему действию базофилов, нейтрофилов и макрофагов, а также к продуктам реакции высвобождения самих тромбоцитов. ФАТ может также индуцировать образование свободных радикалов, что способно повысить степень функциональных поражений эндотелиоцитов. Помимо воздействия на клеточное звено гемокоагуляции, ФАТ может изменять и реологические параметры, так как он обладает выраженным гипотензивным эффектом и вазодилаторным действием.

Тромбин способен также модулировать синтез и секрецию эндотелиальными клетками веществ, участвующих в процессе фибринолиза. При этом воздействие тромбина на эндотелиоциты способствует увеличению секреции как ТАП, так и ПАИ-1 [28—33].

Таким образом, с одной стороны, эффекты сосудистой стенки при действии на нее тромбина направлены на осуществление локального гемостаза, а с другой — на ликвидацию причин активации свертывающей системы крови и ограничение тромбообразования.

Спонтанное тромбообразование является достаточно частым осложнением заболеваний, развитие которых связано с воспалительными изменениями, а также с состояниями, сопровождающимися повышением функциональной активности лейкоцитов, каким является и атеросклероз. Основными причинами, провоцирующими в этой ситуации тромбоз, является наличие в крови эндотоксина и высвобождение из ряда клеток цитокинов. При активации эндотелиоцитов эндотоксином или цитокинами чаще развиваются хронические изменения функциональных свойств данных клеток.

Общая направленность реакций эндотелиоцитов в ответ на воздействие цитокинов или эндотоксина носит прокоагулянтный характер. При этом происходят уменьшение синтеза PGI_2 и NO , усиление синтеза ФАТ, повышение агонистиндуцированной секреции фактора фон Виллебранда, повышение экспрессии тканевого фактора и молекул, участвующих в адгезии лейкоцитов, увеличение секреции ПАИ-1 и снижение секреции ТАП, а также снижение экспрессии тромбомодулина [1, 4, 15, 16].

Снижение экспрессии тромбомодулина на поверхности эндотелиоцитов имеет две основные причины. Во-первых, при ряде заболеваний (васкулиты, тромботическая тромбоцитопеническая пурпура, ДВС-синдром и др.) эндотелиальные клетки под действием повреждающих факторов, в частности интерлейкина-1, фактора некроза опухолей, эндотоксина, гипоксии и т.п., теряют со своей поверхности тромбомодулин, обеспечивая тем самым повышение уровня этого гликопротеина в плазме крови. Во-вторых, эти факторы также способствуют снижению синтеза тромбомодулина эндотелиальными клетками [15].

Одной из основных причин приобретения прокоагулянтных свойств интимой сосудов является способность эндотелиоцитов синтезировать и экспрессировать на своей поверхности тканевый фактор (тромбопластин) — основной инициатор процесса свертывания крови. Заболеваниями и патологическими состояниями, чаще других приводящими к экспрессии тканевого фактора эндотелиоцитами, являются гипоксия, вирусные инфекции, аутоиммунные васкулиты, однако эта реакция абсолютно необходима при инициации тромбообразования вне зависимости от его причин. Количество экспрессированного на клеточной поверхности тромбопластина — лимитирующее условие тромбообразования; при достижении определенного уровня тканевый фактор обеспечивает тромбогенность поврежденной сосудистой стенки, а степень отложения фибрина на эндотелиоцитах прямо зависит от величины экспрессии на них тканевого фактора [6, 34].

Повышение адгезии лейкоцитов к сосудистой стенке также является одним из ответов на действие провоцирующих факторов, вызывающих стойкую и длительную активацию эндотелиальных клеток, и способствует выявлению тромбогенных свойств интимы [6]. Такие стимулы, как цитокины или эндотоксин, обеспечивают увеличение экспрессии адгезивных молекул, опосредующих связывание эндотелиоцитов с клетками крови. Механизм повышения коагуляционного потенциала сосудистой стенки под влиянием лейкоцитов не совсем ясен, однако не исключено, что в его основе лежит потенцирование ими продукции фактора агрегации тромбоцитов в клетках сосудистой стенки, высвобождение цитокинов из активированных лимфоцитов и/или прямая активация эндотелиоцитов адгезированными лимфоцитами и как следствие этих процессов — повышение экспрессии тканевого фактора клетками эндотелия. Кроме того, лейкоциты содержат ряд активаторов различных звеньев плазменного гемостаза [1].

Одним из наиболее важных факторов, ограничивающих тромбообразование, инициированное повышением уровня тромбопластина, является ингибитор пути тканевого фактора. Эта мультивалентная биологическая субстанция синтезируется главным образом эндотелиальными клетками и мо-

жет присутствовать в организме как свободно циркулирующее вещество или быть связанной с поверхностью эндотелиоцитов. Кроме того, физиологически значимые количества ингибитора пути тканевого фактора (приблизительно 5—10 % величины плазменного пула) содержатся в тромбоцитах. Следует отметить, что объединенные плазменный и тромбоцитарный пулы этого естественного антикоагулянта составляют менее половины общего его количества, присутствующего в сосудистом русле, так как основная часть ингибитора пути тканевого фактора связана с эндотелием. В ответ на действие цитокинов, приводящее к увеличению экспрессии тканевого фактора, повышается уровень циркулирующего ингибитора пути тканевого фактора, однако величина его пула, связанного с сосудистой поверхностью, не претерпевает значительных изменений. Ингибитор пути тканевого фактора способен предупреждать прокоагулянтный эффект как фактора Ха, так и комплекса тканевый фактор/фактор VIIa. Механизм его действия заключается в способности связываться с фактором Ха, образовавшееся при этом физиологически активное вещество является потенциальным ингибитором комплекса, состоящего из тканевого фактора (тромбопластина) и фактора XIIIa [35].

Чрезвычайно важные результаты нарушения целостности сосудистой стенки — активация тромбоцитов и индукция процессов их адгезии, реакции высвобождения и агрегации. При этом адгезия предшествует развитию реакции высвобождения и агрегации тромбоцитов и является первой ступенью формирования тромба.

Важная роль в патогенезе тромбоза и гемодинамических факторов. Причинами нарушения кровообращения могут быть морфологические и/или функциональные поражения сердца и сосудов, а также изменения реологических свойств протекающей по ним крови. Эти изменения носят общий или локальный характер.

Гемодинамические характеристики, присущие тем или иным участкам сосудистого ложа, являются одной из наиболее важных причин, обуславливающих структурные особенности стенок отдельных сосудов. Эти же факторы в значительной степени определяют и гистологию эндотелиального слоя. Эндотелиоциты хорошо приспособлены к условиям, при которых на них постоянно воздействуют механические силы, что имеет свое отражение в морфологическом строении этих клеток. В местах, характеризующихся равномерным кровотоком, эндотелиальные клетки вытянуты по направлению движения крови, а в участках сосудистого русла с турбулентным течением они имеют полигональную форму. Физиология эндотелиальных клеток также во многом зависит от реологических условий. Так, хотя продолжительность жизни эндотелиоцитов достаточно велика, их смена в участках со сложными гемодинамическими условиями происходит быстрее, чем в регионах с устойчивым кровотоком. Кроме того, силы, обусловленные механическим воздействием движущейся крови на стенку сосуда, составляют абсолютно обязательное условие, необходимое для проявления интактным эндотелием тромборезистентных свойств [1].

Тромбоз является динамическим процессом и во многом зависит от состояния кровотока [36, 37]. При частичной окклюзии кровеносного сосуда

значения скорости сдвига (соответственно, и напряжения сдвига) могут возрастать в несколько раз. Это происходит потому, что скорость сдвига обратно пропорциональна третьей степени диаметра сосуда. Так, уменьшение диаметра сосуда в два раза приводит к восьмикратному повышению скорости сдвига. Таким образом, медленное сужение просвета сосуда, например при развитии атеросклеротических поражений, в любой момент способно осложниться его окклюзией, так как повышение сдвигового напряжения может индуцировать отложение тромбоцитов с последующим развитием процессов свертывания крови. При травмировании сосуда или развитии атеросклеротических изменений, нарушающих конфигурацию его просвета, нормальный скоростной профиль кровотока разрушается, образуя участки как с высокими, так и с низкими значениями сдвигового напряжения. Депозиция тромбоцитов происходит в тех местах, где значения этого показателя наиболее высокие, в то время как фибринообразование наиболее интенсивное в зонах с наименьшим сдвиговым напряжением. В естественных условиях тромбообразование является результатом процессов, происходящих в объеме и на поверхности контакта отдельных коагуляционных составляющих в условиях движения крови. Обычно тромбообразование наблюдается в месте повреждения сосуда и зависит от локального присутствия реактивного материала (клеток и проферментов) и динамики удаления из очага свертывания крови образовавшихся активных продуктов (активированных клеток и энзимов). При этом кровоток может выполнять следующие функции [1]:

1) движение крови способствует росту тромба, обеспечивая приток форменных элементов, входящих в структуру сгустка, а также плазменных факторов, причастных к свертыванию;

2) движение крови может индуцировать процессы адгезии и агрегации тромбоцитов, поскольку напряжение сдвига, действующее на форменные элементы, при определенных условиях способно вызывать их деструкцию или приводить к увеличению синтеза и/или секреции веществ, инициирующих процессы свертывания и непосредственно в них участвующих;

3) движение крови может препятствовать росту тромба, удаляя активированные белки и клетки из зоны коагуляции;

4) движение крови может замедлять формирование фибриновой сети, разрушая длинные нити фибрина.

Оценивая возможные аспекты воздействия кровообращения на тромбообразование с учетом неоднозначности гемодинамических параметров в различных отделах кровеносного русла, можно с уверенностью заключить, что состояние динамики локального кровотока влияет не только на количество депонирующихся элементов крови, но также на структуру и состав образующихся тромбов. Так, именно разные реологические условия приводят к тому, что артериальные и венозные тромбы различаются между собой по количеству фибриновых нитей, а также по соотношению между участвующими в процессе тромбоцитами и эритроцитами.

Кровоток обеспечивает транспорт клеточных элементов и белков к месту повреждения сосудистой стенки. Важно, что распределение этих компонентов в потоке не является равномерным. Так, концентрация эритроцитов в центральной зоне сосуда выше, чем на периферии, в то время как число

тромбоцитов убывает в направлении от стенки сосуда к центру его просвета. Известно, что при отсутствии каких-либо повреждений число тромбоцитов в пристеночной зоне приблизительно в 5—10 раз выше, чем в центре потока. При повреждении сосудистой стенки или при локальной активации эндотелиоцитов белки и форменные элементы поступают к травмированному участку. При этом основным механизмом обеспечения данного процесса служит диффузия. Коэффициент диффузии различных протеинов неодинаков, но в среднем составляет 10^{-6} — 10^{-7} см²/с. Размеры клеток крови намного больше, чем белковых молекул и, следовательно, коэффициент диффузии для них ниже. Однако было показано, что для тромбоцитов он хотя и имеет меньшие значения по сравнению с молекулярными факторами, участвующими в коагуляции, все же на 2—3 порядка больше теоретически рассчитанного. По всей видимости это является следствием изменения скорости сдвига под влиянием межклеточных столкновений и развивающейся в результате деформации клеток, что и усиливает транспорт тромбоцитов через кровь [1].

Функциональная роль тромбоцитов в реализации гемостатического процесса подразумевает их необратимую фиксацию в месте сосудистой травмы, причем это взаимодействие тромбоцитов с сосудистой стенкой происходит вопреки тенденции кровотока “сдвигать” адгезированные тромбоциты с места их депозиции. Следует отметить, что сила, противопоставленная стабильной адгезии клеток, увеличивается с повышением скорости сдвига. Последняя же величина, как уже отмечалось, обратно пропорциональна диаметру сосуда. С одной стороны, из этого следует, что чем больше масса пристеночного тромба, тем более существенные силы препятствуют его дальнейшему росту, с другой — механизмы, участвующие в формировании адгезивных процессов и сохранении уже образовавшихся масс депозированных тромбоцитов, должны быть достаточными и различными в участках сосудистого русла с разными гемодинамическими условиями (артерии, вены, капилляры) [38—41].

Помимо доставки необходимого материала к месту тромбообразования кровотоком при определенных условиях способен активировать клетки, участвующие в гемостазе. Так, функция эндотелиальных клеток в значительной степени зависит от гемодинамических параметров. Возможны два разных пути влияния реологических условий на жизнедеятельность эндотелиоцитов. Во-первых, кровотоком способен изменять локальное химическое и/или клеточное окружение поверхности эндотелиальных клеток в пограничном с ней слое крови путем перемещения этих реактивных компонентов. Во-вторых, силы, действующие непосредственно на эндотелиоциты, могут физически вызывать конформационное повреждение целой клетки или ее части. Данные процессы не являются взаимоисключающими, и в реальных условиях целостного организма существуют совместно, оказывая друг на друга существенное влияние. Модуляция жизнедеятельности эндотелиоцитов силами сдвига при определенных условиях может лежать в основе очень серьезных патологических состояний. Как уже отмечалось, атеросклеротические бляшки часто развиваются в местах, наиболее подверженных механическому воздействию протекающей крови, например у бифуркаций сосудов. Таким образом, не исключено, что достаточно высокие значения сдвигового

напряжения могут потенцировать патологический процесс на ранних стадиях развития атеросклероза [1, 3—7].

Изучение возможной роли гемодинамических сил в контроле реактивности тромбоцитов подразумевает учет не только прямого эффекта, но и их не прямое влияние, опосредованное зависимым от скорости сдвига высвобождением из сосудистого эндотелия субстанций, способных модулировать проагрегационный ответ тромбоцитов. Следует отметить, что в условиях *in vivo* антиагрегационные эффекты сдвигового напряжения, вероятно, преобладают над его прямым проагрегационным действием.

Гемодинамические условия модулируют тромбообразование, влияя не только на функциональную активность эндотелиальных клеток и тромбоцитов, но и повышая эффективность реакций плазменного звена гемостаза. Обнаружено, что комплекс тканевый фактор/фактор VIIa/фосфолипид с увеличением скорости сдвига повышал свою способность активировать фактор X [1].

Изложенные данные дают возможность заключить, что сосудистая стенка играет чрезвычайно важную роль в обеспечении гемостатических реакций. В здоровом организме вне зависимости от причин, вызвавших нарушение целостности или изменение функциональной активности стенки сосуда, происходит инициация процессов, направленных, с одной стороны, на предупреждение или уменьшение выраженности геморрагических проявлений, с другой — на ограничение процессов тромбообразования. Однако наличие патологических состояний, сопровождающихся дисбалансом протромбогенных и антитромбогенных сосудистых факторов, может способствовать развитию неконтролируемой коагуляции крови.

Гемодинамические условия также являются важной составляющей, обеспечивающей поддержание равновесия между про- и противотромботическими реакциями. Изменение нормальных параметров кровотока может послужить причиной развития тромбообразования как в артериальном, так и в венозном русле, особенно при сопутствующем поражении целостности сосудистой стенки или тромбофилических проявлениях. Кроме того, выраженное нарушение физиологических условий кровотока само способно приводить к повышению коагулологического потенциала крови, повреждать тромборезистентные свойства эндотелиоцитов и активировать клеточный гемостаз.

4.2. ЭМБОЛИИ

Термин “эмболия” первым предложил Р. Вирхов более 100 лет назад для обозначения процесса закупорки сосудов частицами и телами, приносимыми с током крови.

Эмболы — частицы, закупоривающие сосуды, представляют собой самый разнообразный субстрат — кусочки тромба, жир, воздух, ворсинки хорiona, металлические осколки пуль, снарядов и т. д. Пути распространения эмболов в большинстве случаев строго соответствуют направлению тока крови и лимфы, и лишь теоретически можно представить возникновение ретроградной эмболии. Такая возможность существует в нижней полости вене

при резком венозном застое и недостаточности трехстворчатого клапана. Эмболия малого и большого кругов кровообращения поддается строгому разграничению. Лишь при врожденных пороках сердца (открытый артериальный проток или дефект межпредсердной перегородки) может возникать парадоксальная эмболия. При малых размерах и хорошей эластичности эмболы (капли жира, раковые клетки) способны проходить капиллярную сеть легких и таким образом попадать из малого круга кровообращения в большой [42].

Нельзя рассматривать эмболию как простой механический процесс переноса каких-либо частиц кровью или лимфой. Помимо сугубо механических факторов (скорости движения крови, размера эмбола), необходимо учитывать и ангиоархитектонику области движения эмбола, состояние и реактивность сосудистой стенки. Атеросклеротические, воспалительные, гиперпластические изменения сосудов не только способствуют появлению источников эмболии, но и в значительной степени обуславливают закупорку сосудов. При этом, с одной стороны, играет роль морфологический фактор, способствующий сужению просвета сосуда, появлению шероховатых поверхностей и распадающихся бляшек, с другой — фактор функциональный, проявляющийся обычно спазмом сосудов.

Доказано, что эмболия обычно сопровождается спазмом сосудов, который наиболее важен при резком растягивании артерии эмболом. Спазм возникает лишь при быстром растягивании сосуда, тогда как при медленном движении эмбола он может и не появляться. По происхождению эмболы бывают эндо- и экзогенными.

4.2.1. Эмболии эндогенного происхождения

Наиболее частым видом эндогенной эмболии является эмболия оторвавшимися частями тромба, источником которых является либо внутрисердечный тромб, либо тромб, образовавшийся в венах в связи с тромбофлебитом; реже встречается подобная эмболия после операции.

Так, тромбоэмболия легочных артерий (ТЭЛА) — это окклюзия сосудистого русла легких тромбами, первично образовавшимися в венах большого круга кровообращения либо в правых полостях сердца и принесенными в него током крови [43, 44]. Источником ТЭЛА чаще всего являются тромбы из бассейна нижней полой вены (более 90 %), в том числе из нижних конечностей — 63 %, тазовых сплетений — 20 % [45—47]. В 5—20 % случаев источником тромбов является правое предсердие или правый желудочек [48—49]. Особую опасность представляют аксиальные тромбы, соединенные с венозной стенкой лишь дистальным концом [50].

Согласно классификации, предложенной В.А. Жмуром в 1978 г. [51], выделяют четыре формы ТЭЛА.

1. *Молниеносная* — в клинической картине преобладают асфиксия, болевой синдром, резкое падение артериального давления. Пациент теряет сознание, отмечается диффузный цианоз, преимущественно верхней половины туловища, остановка дыхания и сердечной деятельности. Данная форма развивается, как правило, при условии 70—100 % окклюзии ствола или главных

ветвей легочной артерии. Смерть наступает в течение 10—15 мин. Патанатомические изменения в легочной ткани не обнаруживаются.

2. **Быстрая** — развивается при окклюзии 50—70 % сосудистого русла и сопровождается тахипноэ, синусовой тахикардией, артериальной гипотензией, ангиноподобными болями, нарушениями церебральной перфузии, кашлем, повышением температуры тела. Смерть наступает через 30—60 мин. В легких обнаруживаются продукты застойных явлений.

3. **Замедленная** — в клинике те же признаки, смерть наступает через несколько часов и в легких обнаруживается начало геморрагического инфаркта.

4. **Стертая** — в клинике преобладает пневмоническая, сердечная недостаточность, в легких — инфаркт-пневмония. Смерть, как правило, наступает в отдаленный период.

Эмболия околоплодными водами (ЭОВ), или амниотическая эмболия, — критическое состояние, связанное с попаданием околоплодной жидкости и ее элементов в кровоток матери с дальнейшим развитием синдрома шока смешанного генеза вплоть до остановки сердечной деятельности, острой дыхательной недостаточности и острого синдрома ДВС. ЭОВ может возникнуть при физиологических и патологических родах через естественные родовые пути, при кесаревом сечении или выкидыше [44].

Жировая эмболия возникает при массивной кровопотере, сочетании акушерско-гинекологической патологии с переломами или оперативным вмешательством на костях (чаще голень, бедро, таз), обширных ушибах подкожной клетчатки у больных с избыточной массой тела, при ожогах и некоторых отравлениях, производстве гистеросальпингографии жирорастворимыми рентгеноконтрастными веществами [52, 53]. Причиной жировой эмболии может стать даже незначительная травма опорно-двигательного аппарата при выраженном остеопорозе [44]. Случаи жировой эмболии описаны также при остеомиелите, остром панкреатите, тяжелом течении сахарного диабета, жировой дистрофии печени, судорожном синдроме различного генеза, тяжелых интоксикациях, наркозе эфиром или фторотаном, закрытом массаже сердца, лечении масляными растворами лекарственных веществ или в случае неправильного введения жировых эмульсий, используемых для парентерального питания [44].

В развитии жировой эмболии доминирующей считается коллоидно-химическая теория, заключающаяся в том, что под влиянием травмы и сопутствующей артериальной гипотензии, гипоксии, гиперкатехолемии, активации тромбоцитов и факторов свертывания крови нарушается дисперсность жиров плазмы крови, в результате чего мелкодисперсная эмульсия жиров превращается в крупнодисперсную. Нейтральный жир трансформируется в свободные жирные кислоты, которые затем в процессе реэтерификации образуют глобулы нейтрального жира, закупоривающие просвет капилляров и вызывающие клинику жировой эмболии.

Механическая теория (капельки жидкого жира из костного мозга попадают в кровеносное русло) и ферментативная теория (активация липазы нарушает дисперсность собственных жиров плазмы крови) имеют право на существование, но большинство авторов относятся к ним критически [51].

Клеточная (тканевая) эмболия отмечается при травмах с тяжелыми повреждениями органов и тканей, нарушении правил катетеризации подключичных и яремных вен, чрезкожной биопсии внутренних органов, распаде злокачественных новообразований. Эмболами в этих случаях являются клетки и кусочки вышеперечисленных органов и тканей [44]. Данный вид эмболии отличается быстрым нарастанием клинических и биохимических признаков — синдрома ДВС с геморрагическими осложнениями, стойкой артериальной гипотензией и тяжелой дыхательной недостаточностью с последующим развитием коматозного состояния.

4.2.2. Эмболии экзогенного происхождения

Воздушная эмболия — это, как правило, патологический процесс, обусловленный травмой или ятрогенными ошибками. Воздух попадает в кровоток при ранении яремных или подключичных вен, открытой травме синусов твердой мозговой оболочки, повреждении легкого при наложении пневмоперитонеума, хирургических вмешательствах на легких, применении искусственного кровообращения, катетеризации полостей сердца, проведением гемодиализа. Воздушная эмболия может развиваться при зиянии вен матки после родов [44].

Септическая эмболия бывает осложнением гнойного воспалительного процесса практически любой локализации или бактериального эндокардита правых отделов сердца. Попадание агглютинированных микроорганизмов или фрагментов септических тромбов, подвергшихся септическому расплавлению, в сосуды малого круга кровообращения приводит к образованию гнойных метастатических очагов в различных участках легочной паренхимы [44].

4.3. ТРОМБОФИЛИИ

За последнее десятилетие клиническая практика обогатилась возможностями выяснения причин ряда ранее неизвестных патогенетических форм тромбоза. Так, по данным исследований F. Demarmels, V. Lammler [54], у 30 % пациентов выявляются претромботические молекулярные дефекты, которые могут быть первичными и вторичными. Первичные (генетически обусловленные) и вторичные (приобретенные, симптоматические) тромбофилии имеют довольно сходную клиническую картину. В то же время их диагностика крайне необходима в связи с тем, что каждая требует совершенно разных подходов к профилактике и лечению.

К тромбофилиям относят состояния кровеносной системы характеризующиеся повышенной склонностью к развитию тромбозов кровеносных сосудов и ишемией органов, в основе которых лежат нарушения в различных звеньях системы гемостаза и гемореологии. Тромбофилия, как правило, имеет скрытое течение, без видимых клинических проявлений. При возникновении определенных ситуаций происходит индукция внутрисосудистой системы гемостаза, что клинически проявляется тромбозами, а лабораторно определяются нарушения различных звеньев системы гемостаза.

Классификацию основных видов тромбофилий предложил З.С. Баркаган [55].

1. Гемореологические формы

- 1.1. Полиглобулии, полицитемии, синдромы повышенной вязкости крови.
- 1.2. Гемоглобинопатии, протекающие со снижением деформируемости эритроцитов.
- 1.3. Формы, связанные с гипервискозностью плазмы (парапротеинемии, гиперфибриногенемии).

2. Формы, обусловленные нарушениями сосудисто-тромбоцитарного гемостаза

- 2.1. Тромбоцитемии и гипертромбоцитозы (первичные, симптоматические, в том числе неопластические).
- 2.2. Формы с повышенной спонтанной агрегацией и адгезивностью тромбоцитов и/или с повышенной чувствительностью к агонистам агрегации (коллагену, АДФ, адреналину, арахидоновой кислоте), в том числе “синдром липких тромбоцитов”.
- 2.3. Формы, связанные с гиперпродукцией и повышенной мультимерностью фактора фон Виллебранда, а также со снижением антиагрегатного потенциала плазмы — тромбоцитарная тромбоцитопеническая пурпура (болезнь Мошковиц), микроангиопатическая гемолитическая анемия и др.

3. Формы, связанные с дефицитом и/или аномалиями первичных физиологических антикоагулянтов

- 3.1. Антитромбина III.
- 3.2. Протеина С.
- 3.3. Протеина S.
- 3.4. Тромбомодулина.
- 3.5. Ингибитора внешнего пути активации свертывания крови (TFPI).
- 3.6. Избыток ингибитора протеина С.
- 3.7. Дефицит кофактора II гепарина.
- 3.8. Избыток богатого гистидином гликопротеина — ингибитора комплекса плазменный антитромбин-гепарин.

4. Формы, связанные с дефицитом или аномалиями плазменных факторов свертывания крови и фибринолиза

- 4.1. Аномалии фактора V (Лейден), резистентность к активированному протеину С.
- 4.2. Тромбогенные дисфибриногенемии.
- 4.3. Дефицит и/или аномалии плазминогена.
- 4.4. Дефицит и нарушение высвобождения тканевого активатора плазминогена.
- 4.5. Высокий уровень ингибиторов активаторов плазминогена (ПАИ-1, ПАИ-2).
- 4.6. Редкие формы (дефицит фактора XII, плазменного прекалликреина, высокомолекулярного кининогена).

5. Формы, связанные с повышением уровня и недостаточной инактивацией факторов свертывания

- 5.1. Повышение уровня и активации комплекса тканевый фактор + фактор VII + фактор Ха + Ca²⁺, включая симптоматические формы при гестозах, гиперлипидемиях, атеросклерозе, висцеральных видах рака.

- 5.2. Повышение уровня фактора VIII.
- 5.3. Гиперфибриногенемия.
6. *Аутоиммунные и инфекционно-иммунные тромбофилии*
 - 6.1. Антифосфолипидный синдром.
 - 6.1.1. Первичный антифосфолипидный синдром.
 - 6.1.2. Вторичный антифосфолипидный синдром при системных иммунных заболеваниях и опухолях: формы с антителами к аннексину V, протромбину, протеину C и др.
 - 6.2. При болезни и синдроме Бехчета.
 - 6.3. При иммунных тромбоваскулитах.
 - 6.4. При инфекционно-иммунных заболеваниях.
 - 6.4.1. Тромбогеморрагические лихорадки.
 - 6.4.2. Гемолитикоуремический синдром.
 - 6.4.3. При бактериальном эндокардите, сепсисе.
7. *Паранеопластические формы*
 - 7.1. Синдром Труссо и др.
8. *Метаболические формы с комплексом нарушений в разных звеньях системы гемостаза*
 - 8.1. Диабет, диабетическая ангиопатия.
 - 8.2. Гиперлипидемии: врожденные, симптоматические.
 - 8.3. Гипергомоцистеинемия (гомоцистеинурия): генетически обусловленная (ранняя) и приобретенная симптоматическая (поздняя).
 - 8.4. Гиперурикемия (наследственная, вторичная).
9. *Ятрогенные (в том числе медикаментозные) формы*
 - 9.1. При катетеризации сосудов, стентировании и шунтировании сосудов, протезировании клапанов сердца, имплантации кавальных фильтров, тромбэктомии.
 - 9.2. Медикаментозные формы.
 - 9.2.1. При приеме эстрогенных контрацептивов.
 - 9.2.2. Формы, обусловленные гемостатической терапией — концентратами факторов протромбинового комплекса, десмопрессина и др.
 - 9.2.3. Формы, вызванные приемом антикоагулянтов: гепарин-индуцированная тромботическая тромбоцитопения; кумариновые тромботические некрозы кожи.
 - 9.2.4. Тромбозы при лечении ингибиторами фибринолиза.
 - 9.3. При трансплантации костного мозга (печеночная веноокклюзионная болезнь).
 - 9.4. Тромбозы при гемотерапии онкологических заболеваний.
 - 9.5. Тромбозы смешанного генеза.

Дифференциация этих форм патологии принципиально важна, поскольку они требуют применения разных методов лечения и профилактики, несмотря на сходную клиническую картину. Термин “тромбофилия” нельзя заменять термином “гиперкоагуляционное состояние” или “гиперкоагуляционный синдром”, так как многие виды тромбофилий характеризуются не повышением свертываемости крови, а ее снижением, либо нарушениями не в гемокоагуляции, а в других звеньях системы гемостаза [55].

В клинической практике возможны сочетания различных форм тромбофилии, при этом последствия зависят от синергизма эффектов их воздействия на систему гемостаза.

Самыми опасными клиническими последствиями тромбофилии являются ТЭО, причина которых заключается в тромбофилических состояниях, развивающихся при:

- 1) тромбозе поверхностных вен нижних конечностей;
- 2) тромбозе глубоких вен нижних конечностей;
- 3) тромбозе вен таза;
- 4) ТЭЛА.

Выявление лиц с наследственными дефектами гемостаза — невероятно сложная задача. Понятно, что тромбоз может быть индуцирован даже незначительными по силе воздействия факторами, активирующими систему гемостаза. Беременность, роды, оперативное вмешательство способны провоцировать манифестацию наследственных дефектов гемостаза, предрасполагающих к тромбозу.

Несомненным успехом теоретической медицины явилось изучение генетически обусловленных дефектов гемостаза как причины рецидивирующих тромбозов и тромбоземболии. К ним относят наследственный дефицит АТ III, ПС и ПС, гипергомоцистеинемию, синдром липких тромбоцитов (SPS), дефицит гепарин-кофактора II, дефицит фактора XII (Хагемана), дис- и гипоплазминогенемии, дисфибриногенемии, дефицит тканевого активатора плазминогена, а также так называемую лейденовскую мутацию фактора V.

Из форм тромбофилии, связанных с дефицитом и/или аномалиями первичных физиологических антикоагулянтов, наиболее распространенными являются дефицит АТ III, ПС и/или ПС.

Дефицит и/или врожденная патология антитромбина III. Антитромбин III (АТ III) является гликопротеином и синтезируется в печени. Биологическая роль АТ III заключается в том, что он является главным физиологическим антикоагулянтом (70—75 % антитромбинового действия плазмы). Инактивация осуществляется путем образования комплекса тромбин-антитромбин и протекает медленно, что позволяет свободному тромбину вначале выполнить свою биологическую роль — образовать фибрин, а затем ингибироваться. Гепарин увеличивает скорость инактивации в 1000—5000 раз. АТ III принимает также участие в нейтрализации факторов IX, X, XI, XII.

Причинами дефицита АТ III могут быть отсутствие синтеза или поступления антикоагулянта в кровь, а также извращенный синтез или образование аномальных (не функционирующих или аномально функционирующих) форм данного белка. Частота наследственного дефицита АТ III в популяции составляет 1 на 2000—5000, однако в действительности может встречаться значительно чаще [56]. Известно около 45 мутантных аллелей, главным из которых является точечная мутация его гена с заменой глутамина аргинином. Тип наследования — аутосомно-доминантный. Подавляющее большинство пациенток с дефицитом АТ III являются гетерозиготными. При гомозиготном типе наследования дефицита уровень АТ III составляет 2—3 % нормы, что сопровождается тяжелой тромбофилией и гибе-

люю носителей еще в период новорожденности или в раннем детском возрасте. Дефицит АТ III ниже 40 % проявляется рецидивирующими венозными тромбозами в возрасте 20—30 лет. У пациентов с ТЭО дефицит АТ III выявляется в 3—8 % случаев. В целом риск развития тромбофилии у этих лиц составляет приблизительно 50 %, что значительно выше, чем при дефиците протеинов С и S.

В литературе описаны случаи ТЭО при дефиците и/или врожденной патологии АТ III [57—59].

З.С. Баркаган выделяет следующие формы дефицита АТ III:

- 1) крайне тяжелую — уровень АТ III ниже 5 %;
- 2) тяжелую — с уровнем АТ III менее 40 %;
- 3) пограничную — с содержанием в плазме АТ III в пределах 41—65 %;
- 4) потенциальную — с уровнем АТ III в пределах 66—80 %.

Наследственный дефицит АТ III имеет характерные клинические и лабораторные признаки. Клиническими признаками наследственного дефицита АТ III являются:

- 1) проявление заболевания в двух формах — истинно дефицитной и дисфункциональной;
- 2) аутосомно-доминантное наследование;
- 3) возникновение тромбов у гетерозигот;
- 4) развитие ТЭО при уровне АТ III ниже 75 %;
- 5) манифестация венозных тромбозов чаще в возрасте 13—30 лет;
- 6) чаще тромбоз глубоких вен нижних конечностей и реже — тромбоз мезентериальных сосудов;
- 7) характерна легочная эмболия.

Лабораторные признаки наследственного дефицита АТ III:

- 1) низкий уровень биологической активности АТ III;
- 2) низкий уровень показателей иммунитета при истинном дефиците АТ III;
- 3) нормальные показатели иммунитета при дисфункциональной форме дефицита АТ III;
- 4) основные тесты коагуляции не изменены;
- 5) нормальные тесты на фибринолиз;
- 6) нормальное время кровотечения;
- 7) агрегация тромбоцитов в норме;
- 8) отсутствие адекватного удлинения АЧТВ при гепаринотерапии.

Возможны также случаи генетически обусловленных вариантов сочетания дефектов АТ III с нарушением его взаимодействия с гепарином, факторами Ха и Па либо как с гепарином, так и с активированными факторами. Важным для клиницистов является то, что при одних формах этой патологии активность АТ III в процессе лечения антикоагулянтами непрямого действия возрастает, при других — напротив, остается стабильно сниженной [60, 61].

Достаточно распространенными в настоящее время являются приобретенные формы недостаточности АТ III. Причины их развития следующие:

- 1) нарушение синтеза белка при тяжелом поражении печени;
- 2) длительный прием эстроген-гестагенных препаратов;

- 3) гиперпотребление факторов свертывания при синдроме ДВС, операционной травме, гемодиализе;
- 4) нефротический синдром (протеинурия и потеря АТ III);
- 5) сепсис, вызванный грамположительными микроорганизмами (разрушение лейкоцитов сопровождается высвобождением большого количества эластазы, препятствующей образованию комплекса тромбин-антитромбин);
- 6) шок различной этиологии (периферический стаз, гипоксия, ацидоз, повреждение эндотелия кровеносных сосудов и активация свертывания крови);
- 7) гипергепаринизация (значительное усиление утилизации антитромбина).

Протеин С (ПС) является гликопротеином с физиологическими антикоагулянтными свойствами. Синтез его происходит в печени и зависит от наличия витамина К. ПС считается одним из главных проферментов противосвертывающей системы, активность которого проявляется преимущественно в микроциркуляторном русле. Активация ПС происходит на поверхности эндотелиальных клеток комплексом тромбин-тромбомодулин. После активации он обретает способность расщеплять и инактивировать находящиеся на мембране факторы Va и VIIa, а также ингибировать активатор плазминогена. Свои функции ПС способен осуществлять только после взаимодействия с ПС.

В европейских странах частота резистентности к активированному ПС составляет в популяции 3—5 %, а среди особей репродуктивного возраста с рецидивирующими тромбозами — 15—60 % [62]. Врожденный дефицит ПС наследуется аутосомно-доминантно, а по некоторым данным — аутосомно-рецессивно, и его клинические проявления во многом схожи с клиникой дефицита АТ III. В то же время отмечено, что наследственный дефицит ПС чаще является причиной тромбозов (10 %) и тромбоэмболии, чем дефицит АТ III (3—8 %).

В настоящее время идентифицировано 160 различных мутаций ПС, однако в основном выделяют два типа дефицита ПС [63]:

- 1) тип встречается наиболее часто, характеризуется снижением антигенного уровня и функциональной активности ПС; этот тип является результатом дефицита или замены участка гена ПС, а также точечной мутации;
- 2) тип встречается гораздо реже и характеризуется нормальным антигенным уровнем ПС, однако со сниженной его функциональной активностью; подобно дефициту АТ III тромбозы, особенно в легких, возникают у гетерозиготных пациентов.

В литературе описано большое количество случаев дефицита ПС или случаев с нормальной концентрацией ПС у пациентов, но с врожденной или приобретенной резистентностью к активированному ПС, которые явились причиной ТЭО [64, 65]. Эпидемиологическими исследованиями установлено, что дефицит ПС крайне редко встречается у жителей Юго-Восточной Азии, а в России эта патология регистрируется у 20 % больных с венозными тромбозами [62].

Клиническими проявлениями врожденного дефицита ПС являются:

1) молниеносная злокачественная пурпура новорожденных (purpura fulminans);

2) рецидивирующие венозные тромбозы и тромбоземболии;

3) трофические язвы голени;

4) тромбозы мелких сосудов кожи с некрозом ее отдельных участков.

Возможно развитие приобретенных форм дефицита ПС. Причинами, которые могут вызывать приобретенный дефицит ПС, являются:

1) тромбоз глубоких вен;

2) легочная эмболия;

3) применение непрямых антикоагулянтов (раннее проявление лекарственной тромбофилии — некрозы кожи вследствие тромбирования микроциркуляторного русла);

4) заболевания печени;

5) синдром ДВС;

6) послеоперационный период;

7) инфекции во время беременности и в послеродовом периоде;

8) злокачественные новообразования, острая лейкемия;

9) острый респираторный дистресс-синдром;

10) гемолитико-уремический синдром;

11) тромботическая тромбоцитопеническая пурпура;

12) *L*-аспарагиназа;

13) АФС.

В литературе имеется большое количество публикаций о роли ПС в возникновении ТЭО [59, 64]. ПС является гликопротеином, неэнзиматическим кофактором APC в активации факторов Va и VIIIa, а также обладает APC-независимой антикоагулянтной активностью. Кроме того, ПС функционирует как ростовой фактор.

В норме в течение беременности концентрации ПС изменяются — его уровни снижаются во второй половине беременности и снова повышаются только после родов. Этот факт необходимо учитывать при обследовании пациенток с подозрениями на тромбофилию, так как не исключена возможность получения ложноположительных результатов [66, 67]. Наследование происходит по аутосомно-доминантному типу, при этом гетерозиготы являются группой риска по возникновению ТЭО. В популяции дефицит ПС встречается с частотой 1:20 000, а среди лиц, страдающих тромбофилией, — в 2—5 % случаев. Описаны 32 мутации генов, приводящие к недостаточности ПС. Около 40 % семей с тромбофилией, вызванной дефицитом ПС, имеют также мутацию Лейден. Описаны случаи сочетания дефицита ПС с недостаточностью АТ III, гепаринового кофактора II и ПС. Почти у 50 % пациентов с дефицитом ПС тромбозы возникают в возрасте около 25 лет, при этом только у 44 % из них имеются предрасполагающие к тромбозам факторы. В крови ПС циркулирует в двух формах [51]:

1) свободный ПС—активен как кофактор APC и составляет 30—40 % общего количества ПС;

2) комплекс ПС с C₄-связывающим протеином — не имеет кофакторной активности к APC и составляет 60—70 % общего количества ПС.

Выделяют два типа наследственного дефицита ПС:

- 1) тип I (качественная форма) — снижен уровень свободного PS;
- 2) тип II (количественная форма) — снижен уровень свободного PS и комплекса PS с C₄-связывающим протеином.

В семейных исследованиях гетерозиготы — носители дефектного PS-гена имели 6—10-кратное повышение частоты ТЭО, однако данные об истинной распространенности этой патологии и ее роли в развитии ТЭО в акушерстве требуют дальнейших исследований.

Причинами приобретенных форм дефицита PS могут быть:

- 1) тяжелые заболевания или повреждения печени;
- 2) прием антагонистов витамина K;
- 3) инфекционные заболевания.

Фактор V — это гликопротеин плазмы крови. Он ускоряет превращение протромбина в тромбин под действием протеиназы фактора Ха при наличии фосфолипидов и Ca²⁺. Синтезируется в печени, содержится также в α-гранулах тромбоцитов.

Дефект гена, кодирующего фактор V, впервые был открыт в 1993 г. В. Dahlback в г. Лейден и получил название “лейденской мутации фактора V”, или резистентности к активированному PS. Наследуется по аутосомно-доминантному типу. Дефект заключается в точечной мутации в гене коагуляционного фактора V — вместо аминокислоты аргинина в 506-м положении встраивается глутамин. Не так давно были обнаружены новые формы мутации гена, кодирующего фактор V: замена аргинина треонином в положении 306 (форма Кембридж) или аргинина глицином в позиции 306 (форма Hong—Kong). В случае мутации фактора V активированный PS не способен инактивировать факторы V и VIII, что приводит к повышению уровня протромбина и тромбофилическому состоянию.

Частота генной мутации плазменного фактора V (мутация Лейден) в популяции колеблется от 1 до 14 % в разных регионах мира. Среди жителей Европы она встречается у 3—12 % населения [69]. Очень часто встречается у женщин кавказской национальности, но не отмечена у населения Японии, Китая, афро-американского населения США, а также у африканских негров и индусов.

Носители фактора V (Лейден) составляют около 30—40 % среди пациентов с первичными эпизодами глубоких венозных тромбозов, 50 % — среди больных, страдающих семейной тромбофилией. Генная мутация плазменного фактора V (Лейден) в настоящее время является наиболее частым преморбидным фоном, на котором возникают рецидивирующие тромбозы (60—70 % случаев рецидивирующих тромбозов возникает на фоне лейденской мутации). В возрасте до 50 лет 40 % лиц, страдающих данной мутацией гена, пережили эпизоды тромбозов. ТЭО, связанные с лейденской мутацией, встречаются в 4—6 раз чаще других генетических дефектов, однако они имеют более благоприятное течение [69].

Резистентность фактора Va к активированному PS имеет по меньшей мере два объяснения [63]:

- 1) нарушение деградации фактора Va под действием активированного PS, в то время как прокоагулянтный эффект мутировавшего фактора Va сохраняется;

2) нарушение в процессе деградации фактора VIIIa, поскольку нормальный кливаж фактора V в области Arg₅₀₆ необходим для осуществления синергичной активированному ПС-кофакторной активности фактора V наряду с ПС в деградации фактора VIIIa.

Лейденовская мутация оказывает воздействие и на систему фибринолиза. В настоящее время известны профибринолитические свойства активированного ПС. Для укорочения времени лизиса сгустка, содержащего фактор V (Лейден), от 140 до 50 мин требуется в 10 раз больше активированного ПС, чем для лизиса сгустка, содержащего нормальный фактор V. Тем не менее в отсутствие тромбинактивируемого ингибитора фибринолиза (ТАФИ) активированный ПС не влияет ни на лизис сгустка, содержащего фактор V (Лейден), ни на лизис сгустка, содержащего нормальный фактор V. Таким образом, нарушение профибринолитического ответа на активированный ПС у пациенток с генной мутацией плазменного фактора V (Лейден) является ТАФИ-зависимым.

Сочетание нескольких генетических дефектов, предрасполагающих к тромбофилии, или одновременное наличие АФС, инфекции, СКВ, экстрагенитальной патологии многократно увеличивают риск ТЭО.

Мутация протромбина G20210A впервые обнаружена в 1996 г. путем ПЦР-диагностики у 18 % больных с венозными тромбозами в семейном анамнезе. Суть мутации заключается в изменении гена протромбина G20210A в 3'-нетранслируемом участке. Риск развития тромбозов при этой патологии возрастает в 3 раза. Наследование осуществляется по аутосомно-доминантному типу. Частота мутации у населения Южной и Северной Европы различна и представляет соответственно 3,0 и 1,7 %. Частота патологии у представителей кавказской национальности достигает 2 % [63].

Функциональное исследование системы гемостаза у 87 % больных с рассматриваемой патологией дает возможность выявить повышенный (> 115 %) или нормальный уровень протромбина.

Мутация протромбина G20210A может быть причиной тромбоза глубоких вен нижних конечностей и цереброваскулярных тромбоокклюзионных заболеваний. Прием оральных контрацептивов, беременность и другие факторы, провоцирующие возникновение тромбофилии, на фоне наличия у женщины мутации протромбина G20210A в десятки и сотни раз повышает риск ТЭО. Поэтому этот дефект следует исключать у женщин с наличием в анамнезе необъяснимых венозных и артериальных тромбозов.

Гомоцистеин — аминокислота, образующаяся из метионина. Метаболизм гомоцистеина включает реметилирование в метионин и транссульфатирование в цистеин. В реметилировании участвуют три фермента: метионинсинтетаза, 5,10-метилентетрагидрофолатредуктаза и бетаин-метионинметилтрансфераза. При транссульфировании гомоцистеин трансформируется в цистатионин посредством цистатионинсинтетазы. В плазме гомоцистеин находится как в свободной форме, так и в связанном с белком виде. Нормальная концентрация гомоцистеина в плазме крови составляет 5,7—14 мкмоль/л [61].

Гипергомоцистеинемия (наследственные формы) относится к наиболее часто встречающимся метаболическим формам с комплексом нарушений в

разных звеньях системы гемостаза. Это аутосомно-рецессивная патология, проявляющаяся дефектом энзима метилентетрагидрофолатредуктазы. При этой патологии повышенное содержание в плазме гомоцистеина становится причиной поражения сосудистой стенки (артериальной и венозной), в том числе магистральных вен, и как следствие этого — развития тромботических инсультов, инфаркта миокарда, облитерации периферических сосудов.

Приобретенные формы болезни связаны с нарушением синтеза витаминов В₆ и В₁₂, фолиевой кислоты, снижением активности ряда ферментов, в частности метилентетрагидрофолатредуктазы. Повышение уровня гомоцистеина отмечается в крови курильщиков, при заболеваниях почек (70 % гомоцистеина метаболизируется почками) и печени, а также при системных заболеваниях — гипотиреозе, сахарном диабете, энтероколитах, злокачественных новообразованиях молочной железы, яичников и поджелудочной железы.

Гипергомоцистеинемией считаются уровни гомоцистеина выше нормальных показателей. В зависимости от уровня гомоцистеина различают следующие степени тяжести заболевания:

- 1) легкая — уровень гомоцистеина 15—30 мкмоль/л;
- 2) средняя — 31—100 мкмоль/л;
- 3) тяжелая (выраженная) — более 100 мкмоль/л.

Гипергомоцистеинемия чаще диагностируется у женщин, чем у мужчин, и концентрация этой аминокислоты увеличивается с возрастом, что, по-видимому, связано с инволютивными изменениями гемостаза. Вероятность возникновения тромбоза глубоких вен у людей с этой патологией в 2—3 раза превосходит таковую у лиц, не страдающих этой болезнью.

Синдром липких тромбоцитов (SPS) — это дисфункция тромбоцитов, сопровождающаяся артериальными и венозными тромбозами и наследуемая аутосомно-доминантным путем. Открыт в 1982 г. E.F. Mammen и впервые описан в 1985 г. Синдром SPS занимает третье место среди причин тромбозов. Этиология SPS-синдрома до конца не изучена. Предполагается, что ведущая роль в патологическом процессе принадлежит дефекту поверхностных тромбоцитарных рецепторов. Нормальный уровень тромбоцитарного фактора 4- и b-тромбоглобулина свидетельствует, что в активированном состоянии тромбоциты находятся не постоянно. Они активируются под действием АДФ или при высвобождении адреналина (часто тромбозы возникают после стрессовых ситуаций). Синдром сопровождается исключительно высоким риском развития инфаркта миокарда и цереброваскулярных тромбозов.

Выделяют три типа SPS:

- тип I — повышение агрегации под действием АДФ и адреналина;
- тип II — повышение агрегации только под действием адреналина;
- тип III — повышение агрегации только под действием АДФ.

Клинические проявления SPS:

- 1) приступы стенокардии;
- 2) острый инфаркт миокарда;
- 3) транзиторные церебральные ишемические атаки;
- 4) инсульты;

- 5) тромбозы сетчатки;
- 6) периферические артериальные и венозные тромбозы.

Описаны случаи комбинации SPS с другими генетическими тромбофилиями [63].

Гепарин-кофактор II (НС II) — это тромбинингибирующий гликопротеин. НС II ингибирует амидолитическую и протеолитическую активность тромбина путем формирования ковалентного (1:1) молярного комплекса с тромбином. Ингибиторная активность НС II может усиливаться гепарином, включая гепарин с низкой АТ III-активностью (НМГ). НС II незначительно ингибирует факторы Ха, XIa, IXa, плазмин и химотрипсин. Кроме того, НС II ингибирует тромбининдуцированную реакцию тромбоцитов в реакциях высвобождения тромбоцитов [63].

Дефицит НС II наследуется по аутосомно-доминантному типу, впервые был описан в 1985 г. Тромбофилия развивается при уровне НС II менее 60 %. Как причина необъяснимых тромбозов дефицит НС II является достаточно редкой патологией. Приобретенная форма дефицита НС II развивается при синдроме ДВС, однако, в отличие от АТ III, уровень НС II при остром тромбозе или при нефротическом синдроме не снижается [63].

Новые наследственные дефекты тромбоцитов, предрасполагающие к тромбозу, описаны в последние годы. К ним относятся Wein—Pensing-дефект, впервые описанный в 1991 г. и характеризующийся дефицитом липоксигеназного метаболического пути и компенсаторным увеличением ТхА₂, простагландинов Е₂ и D₂. Синдром сопровождается исключительно высоким риском развития инфаркта миокарда и цереброваскулярных тромбозов.

Лекарственная приобретенная тромбофилия чаще всего является продуктом ятрогенной природы. Поэтому при назначении лекарственных средств следует учитывать, что некоторые из них активируют и истощают различные звенья гемостаза, другие — снижают антитромботический потенциал эндотелия и крови, третьи — реализуют свой эффект через клеточные мембраны и т. д. [62]. Эта форма приобретенной тромбофилии развивается чаще всего при оральной контрацепции и приеме препаратов, используемых для ЗГТ. Это можно объяснить действием на свертывающую систему крови эстрогенов. Под их влиянием подавляется выработка АТ III, ПС и PS, активируется свертывающий потенциал (возрастает содержание VI, VII, VIII, IX и X факторов, фибриногена), повышается способность тромбоцитов к агрегации и адгезии, снижается фибринолитическая активность [59, 60, 70].

Степень тромбофилии значительно возрастает при применении гормональных препаратов и наличии других факторов риска, в частности, возраст старше 40 лет, ожирение, оперативное вмешательство, курение, варикозное расширение вен нижних конечностей, перенесенные в прошлом тромбозы и эмболии. Критические тромбофилии развиваются у пациенток, принимающих гормоны и страдающих врожденными нарушениями свертываемости крови — наследственным дефицитом АТ III, белков С и S, APC-резистентностью и др. [63].

На свертываемость крови, агрегацию тромбоцитов, фибринолиз, стенку сосудов влияет ряд сердечно-сосудистых, нейротропных и других препара-

тов. Не следует злоупотреблять внутривенными введениями, так как внутрисосудистое введение концентрированных гиперосмотических растворов может привести к повреждению стенки сосудов вследствие травмирования иглой или катетером либо в результате химического повреждения интимы сосудов [62]. Внутривенное введение различных концентрированных растворов, особенно при частых введениях больших количеств различных препаратов, могут быть причиной возникновения тромбофлебита. Для предупреждения тромбозов при назначении лекарственных препаратов следует учитывать как состояние организма больного, так и свойства вводимого препарата (учет его возможного тромбогенного действия).

Гепарининдуцированная тромбоцитопения (ГИТ) является классическим примером тромбофилий, обусловленных приемом медикаментов. Механизмы возникновения тромбоза, обусловленного ГИТ, считаются на сегодня наиболее изученными.

Различают два типа ГИТ:

1) первый, наиболее частый, имеет раннее начало, сопровождается легкой тромбоцитопенией, возможно, связанной со способностью некоторых фракций гепарина усиливать активность тромбоцитов;

2) второй обуславливает спорадические, изолированные случаи тяжелой тромбоцитопении с поздним началом, иммуноспровоцированные и часто ассоциирующиеся с катастрофическим тромбозом.

Роль иммуноглобулинов в патогенезе этого синдрома была показана еще в 1973 г.: обнаружено, что сыворотка и очищенный IgG от двух больных с ГИТ вызывали агрегацию нормальных тромбоцитов при наличии терапевтических концентраций гепарина. Важнейшую роль в патогенезе активации тромбоцитов у больных с ГИТ играют тромбоцитарные рецепторы, в частности Fc γ RII (CD32). Этот рецептор находится на тромбоцитах, нейтрофилах и моноцитах, имеет низкий аффинитет к Fc-части мономерного IgG, но высокий — к IgG в составе иммунных комплексов и к IgG, связанному с антигенами на поверхности тромбоцитов.

Большая занятость Fc γ RII-рецепторов приводит к сигнальной трансдукции, генерации TxA $_2$ и высвобождению тромбоцитарных гранул. Важно отметить, что активированные тромбоциты, в свою очередь, увеличивают количество Fc γ RII-рецепторов. Так, было обнаружено, что в острой фазе ГИТ происходит увеличение экспрессии тромбоцитарных Fc γ RII-рецепторов.

Как показали последние исследования, в качестве антигенных детерминант выступают комплексы гепарина и тромбоцитарного фактора 4 (PF4). После введения гепарина тромбоциты высвобождают PF4. В результате в крови и на поверхности тромбоцитов появляются комплексы гепарин-PF4, к которым, в свою очередь, вырабатываются антитела. После связывания со слабоактивированными тромбоцитами через лежащие на поверхности комплексы гепарин-PF4 эти антитела взаимодействуют затем с рецепторами Fc γ RII. В результате возникает сильная активация тромбоцитов с дальнейшим высвобождением PF4. Образуется замкнутый порочный круг, приводящий в итоге к развитию тромбоза. Помимо указанного механизма возможна и активация комплемента. Связывать PF4 способны также протеоглики и гликозаминоглики эндотелиальной поверхности сосудов. Гепарининдуцированные

антитела связываются с комплексами FР4-гликозаминогликаны и индуцируют экспрессию тканевого фактора, что приводит к развитию тромбоза. Таким образом, тромбоз возникает в основном там, где высвобождается PР4.

Механизм возникновения тромбоза при наличии аутоантител к фактору фон Виллебранда во многом подобен такому при ГИТ: связывание аутоантител с тромбоцитами через фактор фон Виллебранда приводит к активации FcyRII-рецепторов и т.д.[51].

Антифосфолипидный синдром (АФС) — приобретенное мультисистемное расстройство коагуляции, вызванное антифосфолипидными антителами (АФЛА) и проявляющееся венозными и/или артериальными тромбозами, иммунной тромбоцитопенией и/или неврологическими расстройствами.

Впервые АФС описан в 1986 г. английскими учеными G. Hughes и соавт. [71]. Истинная распространенность АФС в популяции до сих пор неизвестна. Частота обнаружения аутоантител в сыворотках здоровых людей варьирует от 0 до 14 %, в среднем составляя 2—4 % (в высоком титре менее 0,2 %), и возрастает у больных с воспалительными, аутоиммунными и инфекционными заболеваниями, злокачественными новообразованиями на фоне приема широко распространенных лекарственных препаратов (оральные контрацептивы, психотропные средства и др.).

По данным американских авторов, АФС встречается в популяции у 5 % населения [72]. Настораживает и тот факт, что соотношение больных мужчин и женщин при первичном АФС составляет 4:1, а при вторичном — достигает 7:1.

Серологическими маркерами АФС являются АФЛА, которые циркулируют в крови, относятся к иммуноглобулинам (Ig) классов G, M и обнаруживаются в тестах на волчаночный антикоагулянт или в кардиолипидиновых тестах. Эти антитела сами по себе или образуя комплексы с другими белками плазмы, обладающими выраженной антигенной активностью, повреждают фосфолипидсодержащие мембраны клеток эндотелия сосудов, тромбоцитов, клеток мозга, легких и др. АФЛА — гетерогенная группа антител, различающихся по своей иммунохимической специфичности, связанной с существованием нескольких классов мембранных фосфолипидов. Аутоиммунные АФЛА подразделяются на первичные (при отсутствии системной красной волчанки (СКВ) и других заболеваний) и вторичные (при наличии СКВ и/или других заболеваний соединительной ткани).

В настоящее время известны основные составляющие патогенеза тромбозов при АФС. Они связаны с повреждением функции эндотелия и в представлении А.Д. Макацария и соавт. [63] выглядят следующим образом.

1. *Подавление синтеза простаглицлина.* АФЛА подавляют синтез эндотелиальными клетками наиболее мощного естественного ингибитора агрегации тромбоцитов и вазодилатора — простаглицлина, что, в свою очередь, ведет к гиперагрегации. Волчаночные антитела снижают продукцию простаглицлина через воздействие на фосфолипидные субстраты, из которых с участием фосфолипазы А₂ высвобождается арахидоновая кислота, чем можно объяснить тромбозы в маточно-плацентарных артериях. В то же время обна-

ружено, что волчаночные антитела способны ингибировать фосфолипазу A_2 в интактных эндотелиальных клетках.

2. *Снижение активности АТ III — важнейшего естественного антикоагулянта.* Синтезируясь в печени, АТ III экспонируется на эндотелии, где происходит его гликозаминогликанзависимая активация.

3. *Индукция синтеза тканевого фактора (ТФ).* Поскольку образование антител к эндотелиальным клеткам, характерное для АФС, вызывает их повреждение, соответственно индуцируются синтез ТФ и повреждение мембран с экспозицией анионных фосфолипидов.

4. *Продукция больших количеств фактора фон Виллебранда и фибронектина.* Активированные эндотелиоциты экспонируют в больших количествах фактор фон Виллебранда и фибронектин, что также увеличивает свертывающий потенциал крови.

5. *Повреждения в системе ПС.* АФЛА ингибируют систему протеина С несколькими путями:

- угнетают формирование тромбина, активатора ПС (тромбиновый парадокс);
- ингибируют активацию ПС через влияние на тромбомодулин (анти-ТМ-антитела);
- антитела влияют на уровни ПС и/или PS (приобретенный ПС/PS-дефицит);
- угнетают активированный ПС (приобретенная АПС-резистентность);
- через ингибирование сборки протеинов комплекса ПС на анионных поверхностях фосфолипидных матриц;
- через прямое ингибирование активности активированного ПС;
- через угнетение кофакторов Va и VIIIa.

6. *Разрушение “аннексинового щита”.* Аннексин V (антикоагулянтный плацентарный протеин-1, сосудистый антикоагулянт альфа) обладает мощными антикоагулянтными способностями *in vitro*, основанными на высокой аффинности к анионным фосфолипидам и его способности “изолировать” коагуляционные факторы от фосфолипидных поверхностей. Унифицированная гипотеза АФЛА-опосредованных тромбозов подразумевает разрушение “аннексинового щита”. Тромбофилия является следствием уменьшения содержания аннексина V на апикальной поверхности плацентарных трофобластов и сосудистых эндотелиальных клеток, когда эти клетки вступают в контакт с текущей кровью. Мощный антикоагулянтный протеин играет тромборегуляторную роль на участке контакта сосуда и крови и защищает анионные фосфолипиды (которые в противном случае служат эффективными кофакторами для образования комплекса коагуляционных факторов) от соучастия в коагуляционных реакциях.

Аннексин V, покрывающий фосфолипидную поверхность в виде ковра и защищающий фосфолипиды от возможности любых коагуляционных реакций, вытесняется АФЛА, высокая аффинность которых является следствием формирования бивалентных комплексов с b2GPI на поверхности фосфолипидной мембраны. Антитела, связывающиеся с этой тромбогенной поверхностью на месте случайных выступов, влияют на формирование щита и об-

нажают на окружающей поверхности повышенное количество фосфолипидов, готовых начать коагуляционные реакции. АФЛА-опосредованное усиление связывания протромбина с тробластом при наличии аннексина V вероятно происходит подобным образом.

4.4. ДВС-СИНДРОМ

Различные нарушения функционирования гемостаза могут вызывать системную активацию свертывания. Она может быть незначительной, но в более тяжелой форме выражается в клинической картине синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови (ДВС-синдром).

Одно из первых описаний этой патологии принадлежит выдающемуся представителю восточной медицины Зайнуддину-Абу-Ибрахиму Джурджани (Гургони), которое он приводит в своеобразной медицинской энциклопедии “Захиран Хоразшохи”, написанной в 1110 г. Не соглашаясь с существовавшими до него взглядами, автор объясняет механизм отравления змеиными ядами не тем, что “природа этих ядов холодная или горячая”, а тем, что “люди умирают от свертывания крови в сердце и сосудах, после чего из всех отверстий начинает течь жидкая кровь... Яд, убивающий в более продолжительные сроки, вызывает в месте укуса онемение и частичное свертывание крови”.

Абсолютная правильность этой концепции получила подтверждение только в XX ст., когда было детально изучено гемокоагулирующее действие ядов многих змей и в эксперименте, и в клинике доказано закономерное развитие при их укусах острого ДВС-синдрома. Большой вклад в изучение аспектов диссеминированного внутрисосудистого свертывания ученых М.С. Мачабели, З.С. Баркагана, Б.И. Кузика, В.П. Скипетрова, Б.А. Кудряшова, В.П. Балуды, Д.М. Зубаирова, З.Ф. Федоровой, Л.П. Папаяна, А.И. Воробьева, В.Г. Лычева, В.В. Крашутского, М. Ферстрате, Ж. Фермила, М.И. Титовой, а также других отечественных и зарубежных ученых. На сегодня это состояние широко распространенного и беспорядочного свертывания крови поражает человечество равносильно травмам или инфекциям.

ДВС-синдром — это один из наиболее распространенных и представляющих большую опасность для пациентов вид патологии гемостаза. Принципиально он характеризуется рассеянным свертыванием крови с тромбообразованием. Результатами этих двух процессов являются:

- 1) массивное потребление факторов свертывания крови;
- 2) чрезмерная активация фибринолиза, следствием чего является частое возникновение кровотечений различной локализации.

Синонимы: синдром РВС (рассеянного внутрисосудистого свертывания), ВСФ (внутрисосудистое свертывание и фибринолиз), гиперкоагуляционный синдром, коагулопатия потребления, ТГС (тромбогеморрагический синдром). Чаще в практике пользуются терминами “ДВС-синдром” и “ТГС”.

ДВС-синдром развивается при многих заболеваниях и практически при всех терминальных состояниях в результате появления в кровотоке тканевого тромбопластина. ДВС-синдром неспецифичен и универсален, поэтому в

настоящее время его рассматривают как общебиологический процесс, предназначенный природой как для остановки кровотечения при нарушении целостности сосуда, так и для отграничения пораженных тканей от всего организма. ДВС-синдром довольно полиморфен. В широких пределах могут варьировать как тяжесть и распространенность синдрома, так и скорость его развития.

ДВС представляет собой продолжительное клиничко-патологическое осложнение, касающееся повышающейся потери локализации или сбалансированного контроля внутрисосудистой активации свертывания. ДВС имеет определенные фазы, которые характеризуются повышенным риском смертности. Кроме того, для ДВС характерна обширная и стремительная активация свертывания, которая приводит к возможному отложению фибрина в микрососудах, что, в свою очередь, мешает доступу крови к различным органам. Продолжительная активация системы свертывания, ослабленный синтез, повышенная деградация факторов свертывания крови часто ведет к снижению уровня прокоагулянтных белков, ингибиторов протеиназ и тромбоцитов. В результате возникает серьезное кровотечение, в частности, у пациентов с риском большой потери крови (операция, травма). Таким образом, возникает ситуация одновременного тромбообразования и кровотечения. Осложняя течение многих заболеваний, ДВС-синдром становится ведущим патогенетическим механизмом, приводящим к глубоким нарушениям жизнедеятельности организма и нередко к летальному исходу.

Сам по себе ДВС не является заболеванием, но всегда вторичен относительно причин, вызывающих нарушения. ДВС — приобретенное заболевание, причины которого могут быть самые разные:

- 1) ДВС может быть вызван повышенным и аномально поддерживаемым образованием тромбина;
- 2) ДВС — обязательный результат сепсиса; впервые успешное лечение сепсиса проводилось с применением активированного ПС, чтобы затормозить образование тромбина;
- 3) ДВС — пример множественного взаимодействия между воспалительным и свертывающим путями;
- 4) ДВС определяет переход от локализованных, адаптивных и компенсаторных процессов свертывания к общеорганизменным ответам.

ДВС классифицируется как гемостатическое осложнение болезней и это, отчасти, снижает основное патологическое значение данного процесса, которое определяется двумя ключевыми позициями. Во-первых, наличие ДВС определяет риск смертности после начала болезни. Во-вторых, устранение основной причины не обязательно облегчает процесс во всех случаях.

К сожалению, до настоящего времени нет общепринятой классификации ДВС-синдрома. Я.А. Жизневский, И.Н. Бокарев, Г.И. Назаренко и А.А. Кишкун [73—75] предлагают классифицировать ДВС-синдром в зависимости от скорости его развития: острый, если он развивается в течение нескольких часов (до суток), подострый — в течение нескольких суток (до 3 недель), хронический — протекает месяцы и годы.

М.С. Мачабели [76] предлагает классифицировать ДВС-синдром по этиологическим принципам I—III.

I. Тромбогеморрагические синдромы с преобладанием активации по линии внешней системы гемостаза, вызванные появлением тканевого тромбопластина в кровотоке:

- 1) введение извне тканевого тромбопластина;
- 2) введение извне тромбина;
- 3) хирургическая травма (операции на сердце, легких, предстательной железе, поджелудочной железе, матке);
- 4) генерализованный тромбоз;
- 5) акушерская патология;
- 6) ожоги;
- 7) кровопотеря;
- 8) геморрагический и травматический шок;
- 9) метастатический рак (рак поджелудочной железы, рак предстательной железы);
- 10) отравление ядами некоторых видов змей;
- 11) внезапная смерть;
- 12) мезентеральный тромбоз с геморрагическими проявлениями;
- 13) геморрагические инфаркты;
- 14) тромбоз легочной артерии с кровохарканьем;
- 15) гипоксия.

II. Тромбогеморрагические синдромы с преобладанием активации по линии внутренней системы гемостаза, вызванные появлением клеточно-тромбоцитарного, эритроцитарного и лейкоцитарного тромбопластина в кровотоке:

- 1) хронические лейкозы;
- 2) эритремия;
- 3) тромбоцитемии, сопровождающие другие заболевания, а также состояния после спленэктомии;
- 4) гемолитическая анемия;
- 5) переливание несовместимой крови;
- 6) пароксизмальная ночная гемоглобинурия;
- 7) гемолитический шок;
- 8) гемолитическая уремия;
- 9) отравление ядами некоторых видов змей.

III. Тромбогеморрагические синдромы с преобладанием активации по линии системы гемостаза, связанные с острым и хроническим васкулитом.

A. Патологические состояния, при которых создаются условия для поступления в кровоток бактерий:

- 1) феномен Санарелли;
- 2) феномен Швартцмана;
- 3) септический аборт;
- 4) дифтерия;
- 5) дизентерия;
- 6) тонзиллит;
- 7) менингококковый сепсис;
- 8) гастроэнтериты;
- 9) кумариновый некроз.

Б. Аллергические реакции:

- 1) феномен Артюса;
- 2) болезнь Мошкович — тромботическая тромбоцитопеническая пурпура;
- 3) болезнь Шенлейна — Геноха;
- 4) анафилактические состояния;
- 5) заболевания, приводящие к геморрагическому нефриту с цилиндрурией.

По клиническому течению ДВС-синдром предлагается классифицировать более подробно: молниеносный, острый, подострый, рецидивирующий, хронический и латентный [36, 74, 77—79]. Острота, а следовательно, и выраженность клинических проявлений ДВС-синдрома определяется скоростью поступления в кровь тромбопластина и других активаторов системы гемостаза. Информация по данному вопросу представлена в табл. 4.1, 4.2 (по данным [80]).

Таблица 4.1. Классификация гемостазиологических форм и стадий ДВС-синдрома [80]

Форма ДВС-синдрома	Продолжительность развития и течения ДВС-синдрома	Фаза ДВС-синдрома
Молниеносная	Несколько десятков минут	Фазы гиперкоагуляции и переходная протекают скоротечно и как правило не обнаруживаются. Быстро наступает фаза глубокой гипокоагуляции (коагулопатия потребления) — резко выраженная блокада свертывания крови на фоне интенсивной активации фибринолиза. Фаза восстановления — при адекватном и интенсивном лечении, а при неудовлетворительной терапии — развитие осложнений и неблагоприятный исход
Острая	Несколько часов (до нескольких суток)	Фаза гиперкоагуляции — резко или значительно выраженная активация свертывающей системы крови. Переходная фаза характеризуется разнонаправленными значениями показателей свертывающей и фибринолитической систем крови. Фаза гипокоагуляции (коагулопатия потребления свертывающих и противосвертывающих факторов крови) — резко выраженная блокада свертывания крови. Фаза восстановления — при адекватном и интенсивном лечении, а при неудовлетворительной терапии — развитие осложнений и неблагоприятный исход
Подострая	Несколько недель	Фазы отчетливо не дифференцируются. Выявляется активация свертывающей системы крови (но менее выраженная, чем при острой форме). Фибринолитическая активность крови тормозится. Переходная фаза характеризуется разнонаправленными значениями показателей свертывающей и фибринолитической систем крови. Часто не обнаруживается. Фаза гипокоагуляции также выражена менее отчетливо, чем при острой форме ДВС-синдрома. Фаза восстановления — при адекватном и интенсивном лечении, а при неудовлетворительной терапии — фаза углубления осложнений и неблагоприятного исхода. При неблагоприятном течении заболевания индуктора и неудовлетворительном лечении ДВС-синдрома возможен переход подострого ДВС-синдрома в острый

Форма ДВС-синдрома	Продолжительность развития и течения ДВС-синдрома	Фаза ДВС-синдрома
Хроническая	Месяцы и годы	Фазы не дифференцируются. Наблюдается умеренно выраженная активация свертывания крови на фоне незначительного снижения или несущественного повышения активности фибринолиза. При неблагоприятном течении заболевания-индуктора и неудовлетворительном лечении ДВС-синдрома возможен переход хронического ДВС-синдрома в подострый или в острый
Рецидивирующая	Годы	Фазы не дифференцируются. Обнаруживается тенденция к умеренно выраженной гипер- или гипокоагуляции с волнообразным течением. При неблагоприятном течении заболевания-индуктора и неудовлетворительном лечении ДВС-синдрома возможен переход рецидивирующей формы ДВС-синдрома в подострый
Латентная	Годы	Фазы не дифференцируются. Выявляется незначительно выраженная гиперкоагуляция на фоне симптомокомплекса основного заболевания-индуктора. При неблагоприятном течении заболевания-индуктора и неудовлетворительном лечении ДВС-синдрома возможен переход рецидивирующей формы ДВС-синдрома в подострый

Таблица 4.2. Классификация гемостазиологических форм и клинических проявлений ДВС-синдрома [80]

Форма ДВС-синдрома	Продолжительность развития и течения ДВС-синдрома	Клинические проявления ДВС-синдрома
Молниеносная	Несколько десятков минут	Тяжелый геморрагический синдром (профузное маточное кровотечение, возможно присоединение желудочно-кишечного кровотечения). Резко выражен анемический синдром, обусловленный обильным кровотечением. В дальнейшем развиваются глубокие микроциркуляторные расстройства (острая почечная, легочная и печеночная недостаточность, изъязвляются слизистые оболочки, возможен некроз тканей), ведущие в наиболее тяжелых случаях к шоку и коллапсу
Острая	Несколько часов (до нескольких суток)	Геморрагический синдром, однако менее выраженный, чем при молниеносной форме ДВС-синдрома. Часто появляются желудочно-кишечные кровотечения, иногда достаточно массивные. Микроциркуляторные нарушения зачастую выходят на первое место в клинической картине ДВС-синдрома острой формы: к концу первых суток развивается полиорганная недостаточность — легочная, почечная, печеночная. В наиболее тяжелых случаях могут развиваться некроз тканей, шок и коллапс. Характерен выраженный анемический синдром, обус-

Окончание табл. 4.2

Форма ДВС-синдрома	Продолжительность развития и течения ДВС-синдрома	Клинические проявления ДВС-синдрома
Подострая	Несколько недель	ловленный кровотечением и внутрисосудистым гемолизом эритроцитов вследствие фрагментации измененных клеток нитями фибрина Проявления аналогичны таковым при остром ДВС-синдроме, однако протекают с менее выраженной клиникой и негативными последствиями для организма. Преобладают нарушения микроциркуляции и функции внутренних органов (легких, почек, печени, желудочно-кишечного тракта, головного мозга)
Хроническая	Месяцы и годы	Вначале ДВС-синдром протекает бессимптомно. С нарастанием тяжести заболевания-индуктора постепенно появляются и усиливаются различные признаки хронического ДВС-синдрома — геморрагический синдром (необильные носовые, десневые, желудочно-кишечные, маточные кровотечения), тромботические явления и микроциркуляторные нарушения, которые резко ухудшают течение основного заболевания. Нарушается репарация тканей: в органах и тканях развиваются склеротические изменения, а в дальнейшем — функциональная недостаточность
Рецидивирующая	Годы	В период обострения заболевания-индуктора наблюдается геморрагический синдром (необильные носовые и десневые кровотечения, геморрагический гастрит, синяки на коже), который исчезает в период ремиссии. Микроциркуляторные нарушения выражены незначительно и не сопровождаются глубокими расстройствами функции органов. Нарушается репарация тканей: постепенно происходят склеротические изменения во внутренних органах, что является одной из причин развития нефросклероза, цирроза печени, кардиосклероза
Латентная	Годы	Клинически практически не проявляется. Наблюдается только симптомокомплекс основного заболевания-индуктора и обнаруживается лишь при лабораторном обследовании пациентов

Молниеносная форма ДВС-синдрома развивается в течение нескольких десятков минут и характеризуется тяжелым геморрагическим синдромом (профузное маточное кровотечение, иногда в сочетании с желудочно-кишечным кровотечением). Резко выражена анемия. В наиболее тяжелых случаях — шок и коллапс. Эта форма ДВС-синдрома наблюдается преимущественно при акушерской патологии [69, 81].

ДВС-синдром острого течения характерен для сепсиса, обширных ожогов и отморожений, тяжелых сочетанных травм, краш-синдрома, синдрома массивных гемотрансфузий. При острых формах ДВС-синдрома также возможно кровотечение. Однако его появление и выраженность не столь зна-

чимы, как при молниеносном течении ДВС-синдрома. Острая форма ДВС вначале проявляется носовыми и десневыми кровотечениями, из мест внутримышечных инъекций, позже появляются желудочно-кишечные кровотечения, нередко массивные [74, 82—84]. Микроциркуляторные нарушения играют значительную роль в клинике острых форм ДВС. Развивается картина шока, полиорганной недостаточности [76, 85—87]. Часто именно эти явления выходят на первое место в картине ДВС-синдрома при его остром течении. В таких случаях уже к концу первых суток появляется почечная и легочная недостаточность. При острых формах ДВС резко выражена анемия. Появление тромбов и гематом способствует развитию инфекционных осложнений [80, 88].

Подострая форма ДВС-синдрома развивается при патологических процессах, которые сопровождаются острым ДВС-синдромом, однако их тяжесть менее выражена. При этом ДВС-синдром протекает с менее отчетливой клиникой и негативными последствиями для организма. Преобладают нарушения микроциркуляции и функции внутренних органов (легких, почек, печени, желудочно-кишечного тракта, головного мозга).

Хроническая форма ДВС-синдрома наблюдается при хронических заболеваниях легких, почек, атеросклерозе, сахарном диабете, артериальной гипертензии и других патологических состояниях. Хронический ДВС-синдром вначале протекает практически бессимптомно. Его можно обнаружить лишь с помощью современных методов лабораторных исследований системы гемостаза. Сопровождающая хроническое заболевание, ДВС-синдром нарастает с повышением тяжести основного заболевания [73, 85]. Согласно П.А. Воробьеву [84], микроциркуляторные нарушения при хроническом течении ДВС-синдрома играют значительную роль в прогрессировании основного заболевания. С нарушением микроциркуляции он связывает возникновение таких частых осложнений, как рефрактерность к обычной терапии (например, рефрактерная гипертензия). Коррекция микроциркуляторных нарушений в этих случаях приводит, по мнению автора, к исчезновению резистентности организма к лекарственным препаратам.

Рецидивирующая форма ДВС сопутствует тяжелым рецидивирующим заболеваниям, главным образом, иммунокомплексным васкулитам и инфекциям [74, 84]. Она характеризуется периодическим нарастанием и затуханием геморрагических проявлений ДВС, что соответствует обострению и затуханию самого заболевания. Рецидивирующей форме ДВС-синдрома свойственна относительная “мягкость” клинических проявлений: необильное кровотечение из носа и десен, геморрагический гастрит, синяки на коже в период рецидива основного заболевания и практически полное исчезновение геморрагии в период ремиссии. Микроциркуляторные нарушения носят, как правило, невыраженный характер и не сопровождаются тяжелыми функциональными расстройствами.

Существует сравнительно большая группа больных с ДВС-синдромом, у которых клинические проявления этого патологического состояния отсутствуют. Это так называемые латентные (скрыто протекающие) формы ДВС-синдрома. Их диагностика возможна только на основании совокупности результатов специальных лабораторных тестов [77, 86].

В отечественной литературе обычно придерживаются следующей классификации стадий ДВС-синдрома. Первая — стадия гиперкоагуляции и агрегации тромбоцитов. Чем тяжелее ДВС-синдром, тем короче стадия гиперкоагуляции. При массивном поступлении в сосудистое русло тромбопластина продолжительность этой стадии исчисляется минутами [75]. Вторая стадия является переходной к гипокоагуляции с нарастающей тромбоцитопенией, разнонаправленными сдвигами в коагуляционных тестах. В третьей — стадии глубокой гипокоагуляции происходит снижение способности крови свертываться вплоть до полной несвертываемости. Четвертая — восстановительная стадия, а при неблагоприятном течении патологического процесса — стадия глубоких осложнений и летального исхода. По мнению З.С. Баркагана [59, 82], эта классификация слишком схематична и ограничена, она приложима лишь к острому ДВС-синдрому, так как градации его тяжести могут варьировать от латентных (скрытых и медленно текущих) до крайне тяжелых — молниеносных форм.

М.С. Мачабели выделяет четыре стадии тяжести ДВС-синдрома [89]:

I стадия — гиперкоагуляция — связана с появлением большого количества активного тромбопластина;

II стадия — коагулопатия потребления — связана с уменьшением уровня прокоагулянтов из-за включения их в микротромбы; одновременно активизируется процесс фибринолиза;

III стадия — резкое снижение уровня в крови всех прокоагулянтов — вплоть до развития афибриногемии на фоне выраженного фибринолиза, характеризуется особенно тяжелыми гемorragиями; если больной остается жив, то тромбогеморрагический синдром переходит в следующую стадию;

IV стадия — восстановительная — происходит постепенная нормализация состояния системы свертывания крови, нередко выявляются осложнения перенесенного ДВС-синдрома: острая печеночная недостаточность, острая почечная недостаточность, острая дыхательная недостаточность, нарушение мозгового кровообращения.

З.Д. Федорова и соавт. [81] предлагают классификацию течения ДВС-синдрома, представленную ниже.

I стадия — гиперкоагуляция. Продолжительность ее различна; наблюдают уменьшение времени свертывания крови, фибринолитической и антикоагуляционной активности, сокращение времени свертывания в тромбин-тесте. Клинически на этой стадии наблюдают гиперемии кожных покровов, чередующуюся с цианозом, мраморность рисунка, особенно на верхних и нижних конечностях, иногда озноб, беспокойство больной, тахикардию.

II стадия — гипокоагуляция. По данным коагулограммы отмечается потребление факторов свертывания, появляются продукты деградации фибриногена и фибрина (ПДФ), уменьшается число тромбоцитов, увеличивается тромбиновое время свертывания, несколько сокращается время лизиса сгустка фибрина, снижается активность антитромбина III. Клинически отмечают усиление кровотечения из родовых путей, раневых поверхностей, появляются кровоизлияния на коже, носовые кровотечения, петехиальные высыпания на боковых поверхностях грудной клетки, бедрах, верхнем веке. Кровь,

изливающаяся из матки, содержит рыхлые сгустки, которые быстро лизируются.

III стадия — гипокоагуляция с генерализованной активацией фибринолиза. Коагулограмма: уменьшение числа и ослабление функциональных свойств тромбоцитов, снижение концентрации и активности прокоагулянтов, циркуляция в крови больших количеств продуктов деградации фибриногена и фибрина, резкое повышение фибринолитической активности, дальнейшее увеличение количества свободного гепарина. Клиника: выделяется жидкая несвертывающаяся кровь, иногда образуются единичные мелкие сгустки, которые быстро лизируются. Наблюдается генерализованная кровоточивость мест инъекций, венесекций, операционного поля, гематурия, появляются геморрагические выпоты в грудной и брюшной полостях, перикарде.

IV стадия — полное несвертывание крови. Терминальная стадия. Гипокоагуляция крайней степени в сочетании с высокой фибринолитической и антикоагуляционной активностью. Клиническая картина такая же, как и в III стадии, — генерализованная кровоточивость.

Надо сказать, что в эту классическую схему развития ДВС-синдрома жизнь вносит свои коррективы; наблюдается множество клинических и лабораторных вариантов синдрома, протекающего индивидуально у каждого больного.

Клиническая картина ДВС-синдрома варьирует от малосимптомных и даже бессимптомных форм при латентном течении процесса до клинически манифестных, проявляющихся яркой полиорганной патологией. Полиморфизм клинических симптомов ДВС-синдрома обусловлен ишемическими (тромботическими) и геморрагическими нарушениями в первую очередь органов, имеющих хорошо выраженную микроциркуляторную сеть (легкие, почки, надпочечники, желудочно-кишечный тракт, мозг, печень). Блокада микроциркуляторной сети вследствие диссеминированного тромбообразования приводит к дисфункции органов.

Чаще всего органами-мишенями при ДВС-синдроме являются легкие и почки [74, 79, 83, 90]. Поражение легких при ДВС-синдроме характеризуется картиной острой легочной недостаточности с нарастающей одышкой и цианозом, развитием инфарктов, ателектазов и прогрессирующим отеком легких (острый респираторный дистресс-синдром). Поражение почек проявляется развитием острой почечной недостаточности. При этом клинически отмечается снижение диуреза (вплоть до анурии), протеинурия, гематурия, нарастание содержания в сыворотке крови мочевины и креатинина. Сочетанное поражение легких и почек при ДВС-синдроме протекает особенно тяжело и является неблагоприятным прогностическим признаком.

Ишемические расстройства при ДВС-синдроме могут быть и в других органах [59, 75, 87]. В частности, может развиваться недостаточность печени, которая выражается избыточным поступлением в кровь ферментов и билирубина вследствие очаговых некрозов. Нарушения микроциркуляции в слизистой оболочке желудка и кишечника сопровождаются развитием острых эрозий, язв, мезентериальных тромбозов, ведущих к инфарктам кишечника. Тромбоз сосудов головного мозга приводит к нарушению мозговой деятель-

ности, которое проявляется психомоторным возбуждением, помрачением сознания вплоть до комы, судорогами, парезами, параличами вследствие ишемического инсульта. При кровоизлияниях в мозг в ликворе обычно присутствует кровь, спинномозговая жидкость вытекает под повышенным давлением, что свидетельствует об отеке мозга. Следует подчеркнуть, что типичным для ДВС-синдрома является сочетанное поражение двух и более органов. Острый ДВС-синдром характеризуется острой недостаточностью внутренних органов, подострый или хронический — соответственно подострой или хронической их недостаточностью [80]. По мнению З.С. Баркагана [87], такую клиническую картину врачи наблюдают повседневно у различных тяжелобольных, однако трактуют эти результаты не как проявление ДВС-синдрома, а как патологические процессы, возникшие в виде осложнений основного заболевания, например поражение легких (пневмонии), почек (острая или подострая почечная недостаточность), желудочно-кишечного тракта (острые эрозии и язвы, многократные и обильные желудочно-кишечные кровотечения), мозга (психомоторное возбуждение, интоксикационный делирий, парезы, кома, отек мозга). При этом начинающие врачи не связывают наблюдающиеся разнообразные клинические проявления ДВС “единым патогенетическим механизмом, каковым является ДВС-синдром, что неизбежно ведет к неполноте и фрагментации лечебных воздействий” [87].

Традиционно ДВС рассматривается как результат активации внешнего и внутреннего путей свертывания. В последние 15 лет стало ясным, что образование тромбина при ДВС опосредовано исключительно внешним (тканевый фактор/фактор VIIa) путем. Тканевый фактор появляется на активированных и неактивированных моноклеарных клетках, эндотелии и способен связывать фактор VIIa, который затем активирует каскад свертывания. Результаты некоторых исследований позволили предположить, что тканевый фактор является основным “пусковым механизмом” активации свертывания при сепсисе. Во-первых, анализ молекулярных маркеров активации различных факторов свертывания в моделях сепсиса или токсинемии показал, что образование тромбина зависит от связки тканевый фактор/фактор VIIa, тогда как не наблюдается активации другого пути свертывания. Во-вторых, ингибирование внешнего пути свертывания в экспериментальных моделях сепсиса подтвердило прекращение образования тромбина и отложений фибрина, тогда как блокада внутреннего пути не давала никакого эффекта. И последнее, эксперименты *in vivo* и наблюдение пациентов с сепсисом свидетельствуют, что эндотоксин и провоспалительные цитокины вызывают появление тканевого фактора на циркулирующих моноцитах. Несмотря на то что внешний путь свертывания важен для активации свертывания при ДВС, контактная система также активирована, но для образования тромбина это неважно. Эта система может иметь значение для регуляции и дисрегуляции гемодинамической и фибринолитической активации [94—96].

Регуляция образования тромбина происходит на трех уровнях системы свертывания: регуляция тромбина и фактора Ха антитромбином, кофакторов V и факторов VIII активированным протеином C, комплекса тканевый фактор/фактор VIIa ингибитором пути тканевого фактора (TFPI). При ДВС каждый из трех путей антикоагулянтных механизмов нарушен.

Антитромбин неспособен адекватно регулировать активность тромбина при ДВС по нескольким причинам. Во-первых, антитромбин постоянно расходуется длительным образованием тромбина и других протеиназ, которые “неравнодушны” к формированию комплекса с антитромбином. Во-вторых, антитромбин разрушается эластазой, высвобождающейся из активированных нейтрофилов. В-третьих, ослабленный синтез антитромбина из-за дисфункции печени при сепсисе приводит к внесосудистой “утечке” этого протеиназного ингибитора, что также вносит значительный вклад в низкий уровень антитромбина в плазме крови. Лабораторные наблюдения показали такой же низкий уровень антитромбина, как и у 30 % пациентов с сепсисом. Низкий уровень антитромбина связан с высокой смертностью при сепсисе. Восстановление уровня антитромбина в экспериментальных животных показало соответствующее блокирование системной активации свертывания, уменьшенные сроки снижения повреждения органов и как следствие — снижение показателя общей смертности.

Существует несколько причин неадекватного поведения системы протеина С при сепсисе. Во-первых, повышенное его потребление, сниженный синтез клетками печени и нестабильное состояние сосудов может привести к низкому уровню протеина С. Во-вторых, активация ряда цитокинов, в частности высокий уровень фактора α некроза опухолей (TNF- α), приводит к заметному снижению регуляции тромбомодулина на эндотелии, мешая таким образом нормальной активации протеина С. Замедленная регуляция тромбомодулина при ДВС показана при биопсии кожи пациентов с менингококковой септиемией. В-третьих, антикоагулянтная способность протеина С уменьшается при низком содержании в плазме крови свободного протеина S. В плазме крови 60 % протеина S находится в комплексе с регуляторным белком комплемента — C4b-связывающим белком. Повышенное содержание этого белка вследствие реакции острой фазы сепсиса может привести к относительному дефициту протеина S. Хотя показано, что β -цепь C4b-связывающего белка, ключевая для связывания протеина S, не очень сильно затрагивается в течение острой фазы, инфузия C4b-связывающего белка вместе с сублетальной дозой *Escherichia coli* бабуину приводит к летальному исходу и поражению органов из-за ДВС. Более того, важная роль протеина С в патогенезе ДВС подчеркивается исследованиями, показавшими, что введение активированного протеина С животным обуславливает уменьшение ДВС и увеличение выживаемости [94—96].

ДВС связан с небольшим снижением содержания, а в некоторых случаях даже с повышением концентрации TFPI. Введение высоких доз рекомбинантного TFPI приводило к полному ингибированию экспериментальной бактериемии или эндотоксининдуцированной активации свертывания. Основанная на этих наблюдениях гипотеза предполагает, что содержания TFPI относительно мало при развитии ДВС.

Экспериментальные модели показывают, что во время максимальной активации регуляция фибринолиза сильно замедлена. Экспериментальная бактериемия и эндотоксемия вызывают появление фибринолитической активности, вероятнее всего, благодаря высвобождению активаторов плазминогена из клеток эндотелия. Эта реакция почти всегда немедленно следует

за угнетением фибринолиза в результате постоянного повышения уровня ПАИ-1. Ведущая роль ПАИ-1 в угнетении фибринолиза при ДВС показана отсутствием тромбов в почках мышей, у которых ПАИ ингибировался введением эндотоксина. Функциональная мутация в гене ПАИ-1 не только влияла на уровень ингибитора в плазме крови, но и была связана с клиническим исходом менингококковой септицемии. У пациентов с такой мутацией, концентрация ПАИ-1 в плазме крови очень высокая, а также значительно увеличивается риск общей смертности [95].

Хорошо известно, что признаком ДВС-синдрома являются геморрагические проявления (локальные или распространенные), возникающие преимущественно на стадии гипокоагуляции, в то время как на стадии гиперкоагуляции зачастую наблюдается быстрое тромбирование игл, катетеров, частое свертывание крови в пробирках, несмотря на смешивание ее с цитратом или гепарином. В.В. Крашутский [142] различает локальные и распространенные геморрагии, обусловленные развившимся ДВС-синдромом. Локальные кровотечения преимущественно наблюдаются в тканях и органах, подвергшихся травме и хирургическим вмешательствам, в участках острых язв желудочно-кишечного тракта, реже — при инфаркте легких и почек. Распространенные геморрагии, обусловленные общими нарушениями в системе гемостаза, проявляются наличием гематом, петехиальных кровоизлияний в кожу, подкожную клетчатку, мозг, мозговые оболочки, легкие, плевру, брюшину, сердце, перикард, склеры глаз, а также кровотечениями — носовыми, желудочно-кишечными, почечными, маточными [36, 74, 79, 83, 92].

Геморрагии при ДВС-синдроме обусловлены избыточным потреблением факторов свертывания, тромбоцитов, нарушением их функций, интенсивным образованием продуктов деградации фибрина и фибриногена, токсическим влиянием на сосудистую стенку продуктов протеолиза, повышением сосудистой проницаемости вследствие гипоксии, ацидоза и активации кининовой системы (увеличение продукции брадикинина). Закономерным следствием кровоточивости является развитие постгеморрагической анемии. Тяжесть ее почти всегда усугубляется гемолизом эритроцитов. Причиной последнего при ДВС-синдроме является механическое повреждение измененных эритроцитов нитями фибрина при прохождении клеток через капилляры [59, 87, 88, 92]. При этом может наблюдаться характерная клиничко-лабораторная картина гемолиза эритроцитов: желтушность склер, повышение в сыворотке крови уровня непрямого билирубина, гемоглобинурия.

В 76 % случаев синдром ДВС проявляется микроциркуляторными нарушениями, ведущими к дисфункции различных внутренних органов, и только в 24 % — геморрагической манифестацией, совпадающей по времени с коагулопатией потребления (терминальная стадия) [80].

Многообразие клинических проявлений ДВС-синдрома обусловлено, с одной стороны, степенью нарушения микроциркуляции в различных органах, с другой — интенсивностью и распространенностью геморрагического процесса. При этом симптомы ДВС-синдрома наслаиваются на симптомы основного заболевания. Возникает сложная комбинация клинических проявлений патологических процессов, что в конечном итоге затрудняет свое-

временную диагностику нарушений системы гемостаза и назначение адекватной терапии.

По мнению В.П. Балуды [93], существует несколько основных причин смерти при остром течении ДВС-синдрома:

1) гибель организма может наступить мгновенно при закупорке магистральных сосудов жизненно важных органов;

2) если организм не погибает в первые минуты от закупорки сосудов кровяными сгустками, то летальный исход может быть определен развитием тяжелого геморрагического синдрома в виде локальных кровотечений в месте повреждения сосудов (операции, травмы) или генерализованных кровотечений, кровоизлияний во внутренние органы;

3) в более поздний период летальный исход возможен в связи с тяжелым нарушением функции отдельных органов (почки, печень, легкие, селезенка, миокард, головной мозг, гипофиз, надпочечники, желудочно-кишечный тракт).

Ниже приведен перечень заболеваний и состояний, часто осложняющихся ДВС-синдромом [42, 59, 82, 87].

1. Злокачественные (солидные) новообразования различных локализаций.

2. Карциноид, нейробластома.

3. Рабдомиосаркома.

4. Острый промиелоцитарный лейкоз.

5. Эритремия.

6. Хронический эгакариоцитарный лейкоз.

7. Внутрисосудистый гемолиз.

8. Серповидноклеточная анемия (криз).

9. Гистиоцитоз.

10. Септический аборт.

11. Отслойка плаценты.

12. Эмболия околоплодными водами.

13. Внутриутробная смерть плода.

14. Внематочная беременность.

15. Тяжелая эклампсия.

16. Кесарево сечение.

17. Конфликт матери и плода по системам АВ0 и Rh.

18. Аневризмы.

19. Коарктация аорты.

20. Ангиоматоз Казабаха—Меррит (множественные и гигантские ангиомы).

21. Аортит Такаясу.

22. Хирургическая ангиопластика.

23. Врожденные “синие” пороки сердца.

24. Иммунокомплексные заболевания (васкулиты).

25. Тромбоэмболии легочной артерии.

26. Гемолитико-уремический синдром.

27. Инфаркт миокарда.

28. Сепсис.

29. Шок (травматический, геморрагический, ожоговый, анафилактический, септический).
30. Массивные поражения тканей (crush-синдром, травматические хирургические операции).
31. Синдром гомологичной крови.
32. Переливание несовместимой крови.
33. Эксикоз.
34. Жировая эмболия.
35. Гемоперфузия (на угольных фильтрах).
36. Отравления и интоксикации (змеиным ядом, лекарственными средствами).
37. Ацидоз, гипоксия.
38. Острый панкреатит.
39. Гиперлипидемия.
40. Амилоидоз.
41. Острые и хронические заболевания печени.
42. Вирусные инфекции (герпес, краснуха, оспа, цитомегаловирус).
43. Геморрагическая лихорадка.
44. Малярия.
45. Глистная инвазия.

Как видно из приведенного списка, круг заболеваний и состояний, при которых может наблюдаться ДВС-синдром, достаточно велик. Перечисленные заболевания, ассоциированные с ДВС, по происхождению можно условно разделить на несколько клинических состояний:

1) сепсис или прочие инфекции; 2) травма; 3) разрушение органов; 4) злокачественные образования; 5) акушерские осложнения; 6) сосудистые нарушения; 7) повреждение печени; 8) токсичные или иммунологические реакции.

Бактериальная инфекция, в частности септическая, более всего связана с ДВС. Однако системные инфекции, вызванные другими микроорганизмами, такими как вирусы и паразиты, также приводят к развитию ДВС. Факторами, вовлеченными в развитие ДВС у инфекционных больных, могут быть специфические компоненты клеточных мембран микроорганизмов (липополисахарид, эндотоксин) или бактериальные экзотоксины (например, стафилококковый α -токсин). Эти компоненты способны вызвать генерализованную воспалительную реакцию, характеризующуюся повышенным уровнем цитокинов, которые в основном вырабатываются активированными моноядерными клетками и эндотелием. Также цитокины частично ответственны за расстройство функционирования системы свертывания крови при ДВС.

Сильные травмы — другой клинический показатель, связанный с ДВС. Совокупность механизмов, включающая высвобождение тканевого материала (жиры, фосфолипиды) в кровообращение, гемолиз, угрозу нормального функционирования эндотелия, вносит свой вклад в развитие активации свертывания. Дополнительно замечено, что у пациентов с травмами цитокины также играют основную роль в появлении ДВС. Популяции цитокинов фактически практически идентичны у травмированных пациентов и у больных сепсисом.

Гематологические раковые заболевания и плотные опухоли также осложняются ДВС. Механизм нарушения функционирования системы свертывания в этой ситуации малопонятен. Клетки злокачественных опухолей производят прокоагулянтные молекулы, включая тканевый фактор и раковый прокоагулянт — цистеиновую протеиназу, активирующую фактор X свертывания крови. Прокоагулянт обнаружен в экстрактах неопластов и плазме крови пациентов со злокачественными образованиями. Определенная форма ДВС часто наблюдается при острой промиелоцитарной лейкемии, которая характеризуется четко выраженным гиперфибринолитическим состоянием дополнительно к активации системы свертывания. Хотя по клиническим признакам в этой ситуации преобладает кровотечение, ДВС обнаружен у некоторых пациентов при аутопсии.

Острый ДВС развивается при гинекологических осложнениях — разрыве плаценты и амниотической жидкостной эмболии. Показано, что амниотическая жидкость способна активировать процесс свертывания *in vitro*, и уровень плацентарного разделения коррелирует с длительностью ДВС. Предполагается, что утечка тромбопластинподобного материала является ответом на ДВС. Хотя система свертывания крови может быть активирована у пациентов с преэклампсией и HELLP-синдромом (гемолиз, повышенный уровень ферментов печени и низкий уровень тромбоцитов), ДВС наблюдается у небольшого процента больных (обычно при разрыве плаценты и некоторых других осложнениях).

Сосудистые осложнения — большая аневризма аорты или гигантская гемангиома (синдром Казабаха—Меррита) — приводят к локальному активированию свертывания крови. Активированные факторы свертывания в конце концов выбрасываются в кровоток и вызывают ДВС, но более характерным является потребление факторов и тромбоцитов в результате локального потребления.

Микроангиопатическая гемолитическая анемия представляет ряд нарушений, которые включают тромбоцитопению, гемолитический уремический синдром, анемию, вызванную химиотерапией, злокачественную гипертензию и HELLP-синдром. Хотя некоторые характеристики микроангиопатической анемии и возникающая тромботическая окклюзия мелких и средних сосудов, приводящая к поражению органов, может скрыть клиническую картину ДВС, указанные нарушения фактически представляют отдельную группу заболеваний.

Клиническая проблема ДВС с высокой тромбоцитопенией и низким уровнем факторов свертывания у больных с сильными и продолжительными кровотечениями остается неразрешимой. Однако сильные кровотечения наблюдаются у меньшего количества пациентов с ДВС. Наиболее общим является поражение органов. Существует несколько направлений, указывающих, что ДВС играет значительную патогенетическую роль в нарушении деятельности органов. Во-первых, это результаты вскрытия умерших больных ДВС. Аутопсия показала наличие кровоизлияний в различных местах, геморрагический некроз тканей, микротромбы в малых и средних сосудах (артерии и вены). Демонстрация ишемии и некроза была неизменной благодаря замедленному кровотоку и отложению фибрина в малых и средних сосудах

различных органов. Важно, что наличие этих внутрисосудистых тромбов четко просматривается и специфически указывает на клиническую дисфункцию органа. Во-вторых, эксперименты на животных показали наличие отложений фибрина в различных органах в случае ДВС. Экспериментальная бактеремия и эндотоксемия вызывают внутри- и внесосудистые накопления фибрина в почках, легких, печени, мозге и других органах. При устранении гемостатического дефекта различными способами в этих моделях наблюдается уменьшение повреждения и, правда не во всех случаях, снижение показателя общей смертности.

Процессы, приводящие к нарушению системы гемостаза и развитию ДВС-синдрома, начинаются с появления в кровотоке тканевого фактора; усиления образования тромбина из-за нарушений функционирования физиологических антикоагулянтных механизмов, накопления фибрина в микрососудистой системе, вызванное недостаточной деградацией фибрина в результате ингибирования фибринолитической системы.

Ниже приведен механизм развития ДВС-синдрома, который условно можно разделить на три фазы:

I фаза. Образование активного тромбoplastина — самая продолжительная фаза гемостаза. В ней принимают участие факторы плазменные (XII, XI, IX, VIII, X, IV, V) и факторы тромбоцитарные (3, 1).

II фаза. Переход протромбина в тромбин происходит при действии активного тромбoplastина и участии ионов кальция (фактор IV).

III фаза. Образование фибрин-полимера — тромбин при участии ионов кальция (фактор IV) и фактора тромбоцитов (4) переводит фибриноген в фибрин-мономер, который при действии фактора VIII плазмы и тромбоцитарного фактора 2 превращается в нерастворимые нити фибрина-полимера.

Многие ученые отмечают, что лечение ДВС-синдрома обязательно должно быть направлено на [1, 24, 42, 44, 50, 61]:

- 1) устранение основной причины синдрома;
- 2) нормализацию центральной и периферической гемодинамики;
- 3) восстановление гемокоагуляционных свойств;
- 4) ограничение процесса внутрисосудистого свертывания крови;
- 5) нормализацию фибринолитической активности.

Инфузионная терапия, проводимая при ДВС-синдроме, обязательно должна включать:

- гемотрансфузию — используют только теплую донорскую кровь или свежесконсервированную кровь со сроком хранения не более 3 сут;
- сухую нативную, замороженную плазму, альбумин, низкомолекулярные декстраны;
- антиагреганты (трентал, теоникол, курантил, дипиридамол) в стадии гиперкоагуляции;
- протеолитические ферменты (контрикал, трасилол, гордокс) в стадии гипокоагуляции.

Степень гемодилуции должна контролироваться показателями гематокрита, ОЦК и ОП, ЦВД, коагулограммой и почасовым диурезом.

Комплекс методов диагностики ДВС-синдрома включает в себя [61], лабораторную диагностику и клинические маркеры.

Лабораторная диагностика

1. Определение клеточных маркеров (подсчет количества тромбоцитов в крови; определение спонтанной агрегации тромбоцитов; оценка фрагментации эритроцитов).

2. Показания общих коагуляционных тестов (АЧТВ, протромбиновый и тромбиновый тесты, содержание в плазме фибриногена).

3. Выявление признаков тромбинемии и активации фибринолиза — увеличение содержания РФ и других маркеров.

4. Дополнительные методы (определение плазменного антитромбина, определение плазминогена).

Клинические маркеры

1. Наличие этиологических факторов.

2. Наличие полиорганной недостаточности и/или блокады микроциркуляции в нескольких органах.

3. Наличие гемorragий разной локализации (не всегда).

ГЛАВА 5 АНАЛИЗ СОСТОЯНИЯ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА

Нормальное функционирование гемостаза обеспечивается динамическим равновесием между прокоагулянтным, антикоагулянтным и фибринолитическим звеньями. Нарушение баланса между отдельными звеньями вызывает внутрисосудистое свертывание крови, которое может быть обусловлено тромбофилией (артериальные, венозные и смешанные тромбозы), тромбоэмболией, ДВС-синдромом. Кровотечения наблюдаются при тромбоцитопении, дисфункции тромбоцитов, болезни фон Виллебранда, гемофилии (А, В, С), клинической манифестации ДВС-синдрома [1–3].

Для правильного выбора терапии при повышенном тромбообразовании необходимо учитывать, что механизмы артериального и венозного тромбоза различны [4]. При артериальном тромбозе ведущим является поражение и дисфункция сосудистой стенки, что сопровождается потерей эндотелием резистентности, нарушением кровотока и сдвиговым напряжением в результате стеноза и вазоконстрикции. Последняя провоцируется тромбоксаном A_2 и эндотелином-1, выделяющимися при активации тромбоцитов. Активация тромбоцитов сопровождается изменением их формы, а количество активных форм и число тромбоцитов, вовлеченных в агрегаты, может быть прогностическим показателем предтромботической готовности.

Среди наследственных механизмов артериальных тромбозов особое значение имеют гипергомоцистеинемия и повышенная активность тромбоцитов при наличии полиморфизма генов рецепторного аппарата. К приобретенным факторам риска развития артериального тромбоза относится гиперагрегация тромбоцитов.

Тромбообразование в венозном русле связано с замедлением и нарушением кровотока и системной гиперкоагуляцией, которая чаще всего связана с дефицитом естественных антикоагулянтов — антитромбина III и протеина С,

а также с резистентностью фактора Va к действию активированного протеина C, что связано с мутацией гена фактора V.

Системная гиперкоагуляция, развивающаяся на фоне оперативных вмешательств, сердечно-сосудистых заболеваний, злокачественных новообразований, в акушерской практике, приводит к тромбозам и тромбоэмболиям.

Нарушения системы гемостаза, сопровождающие многие заболевания осложняют протекание болезни и могут приводить к смерти. В связи с этим выявление доклинических признаков нарушения системы гемостаза и динамический контроль при проведении антитромботической терапии необходимы для правильной постановки диагноза и профилактики тромботических осложнений.

В клинической практике исследование системы гемостаза преследует следующие цели:

- выявление нарушений в системе гемостаза до проявления клинических признаков;
- определение степени нарушений в том или ином звене системы гемостаза путем определения содержания соответствующих маркеров;
- создание алгоритма диагностики нарушений системы гемостаза путем подбора наиболее информативных тестов для данной патологии;
- проведение контроля эффективности лечения антикоагулянтами прямого и непрямого действия или тромболитической терапии.

5.1. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СОСУДИСТО-ТРОМБОЦИТАРНОГО (ПЕРВИЧНОГО) ГЕМОСТАЗА

Сосудисто-тромбоцитарный, или первичный, гемостаз нарушается при изменениях сосудистой стенки (дистрофические, иммуноаллергические, неопластические, травматические капилляропатии), тромбоцитопении, тромбоцитопатии, сочетании капилляропатий и тромбоцитопений.

Сосудистый компонент системы гемостаза. Для характеристики сосудистого компонента гемостаза проводят пробу жгута или щипка. Принцип метода манжетной пробы, характеризующий резистентность микрососудов, основан на создании венозного стаза путем дозированного сжатия плеча манжетой от аппарата для измерения АД при давлении 80 мм рт. ст. в течение 5 мин. Затем подсчитывают появившиеся петехии. Если их количество превышает норму, то это свидетельствует о снижении резистентности (повышенной ломкости) микрососудов.

Для проведения пробы щипка клиницист собирает под ключицей кожу больного в складку и делает щипок. У здоровых людей в течение 24 ч никаких изменений на коже не происходит [5, 6].

Тромбоцитарный компонент системы гемостаза. К показателям, характеризующим тромбоцитарный компонент системы гемостаза, относятся: длительность кровотечения, количество тромбоцитов, агрегация тромбоцитов с индукторами агрегации тромбоцитов, активность фактора фон Виллебранда.

Длительность кровотечения из микрососудов кожи определяется после дозированного прокола или проведения поперечных насечек кожи на ладонной поверхности верхней части предплечья в условиях венозного стаза (40 мм рт. ст.). Тесты проводятся методом Дьюке и методом Айви [5, 6, 8, 9]. При резко выраженной тромбоцитопении, тяжелых формах качественной неполноценности тромбоцитов (тромбастения Гланцмана и др.) и, особенно, при болезни фон Виллебранда, время кровотечения удлиняется. При гемофилии это время изменяется не так значительно, поскольку остановка кровотечений в зоне микроциркуляции обеспечивается в основном тромбоцитами, а не плазменными факторами. Однако при лечении антикоагулянтами и развитии ДВС-синдрома время кровотечения удлиняется.

Количество тромбоцитов чаще всего определяют с помощью камеры Горяева и фазово-контрастного микроскопа. Нормальные пределы колебания их количества в крови человека $(170...350) \cdot 10^9/\text{л}$. Важной характеристикой состояния сосудисто-тромбоцитарного гемостаза является не только количество тромбоцитов, но также их форма. При наследственных тромбоцитопатиях наблюдаются формы с микроцидозом (синдром Вискотта—Олдрича) и преобладание гигантских кровяных пластинок (аномалии Бернара—Сулье и Мей-Хегглина).

Способность тромбоцитов к агрегации может быть оценена *in vitro* в богатой тромбоцитами плазме в присутствии индукторов агрегации (АДФ, адреналин, коллаген, тромбин, ристомидин, арахидоновая кислота и ряд других агентов) путем измерения интенсивности светопропускания через суспензию тромбоцитов в перемешиваемой плазме крови. Регистрация процесса агрегации тромбоцитов осуществляется с помощью специальных приборов — агрегометров, где графически регистрируются изменения формы тромбоцитов и образование агрегатов, влияющих на проходимость светового потока. По мере агрегации тромбоцитов среда, в которой они были суспендированы, становится более прозрачной, и интенсивность проходящего светового потока увеличивается. При воздействии малых доз агонистов агрегации, например при низких концентрациях АДФ (10^{-7} М) на агрегатограмме регистрируется двойная волна агрегации: первая — под воздействием введенного в плазму извне стимулятора, вторая — за счет реакции высвобождения собственных агонистов, содержащихся в гранулах тромбоцитов. Вводимые извне большие дозы агонистов (АДФ 10^{-5} М) приводят к слиянию первой и второй волн агрегации. При нарушении реакции высвобождения собственных агонистов начальная агрегация, вызванная введением агониста, сменяется дезагрегацией.

Таким образом, при анализе агрегатограмм обращают внимание на общий характер кривых агрегации (одноволновая, двухволновая, полная, неполная, обратимая, необратимая). Проанализировав полученные кривые, можно определить интенсивность и скорость агрегации. Важно отметить, что появление двухволновой агрегации при стимуляции АДФ и адреналином в концентрациях, вызывающих в норме обратимую агрегацию, указывает на повышение чувствительности тромбоцитов к этим индукторам, а развитие одноволновой, неполной (а часто и обратимой) агрегации при стимуляции этими агонистами в концентрации 10 мкМ и больше — на нарушение реакции высвобождения тромбоцитов.

Анализ кривых агрегации тромбоцитов используется не только для изучения тонких механизмов физических свойств мембраны этих форменных элементов крови, но и для выявления способности различных химических соединений влиять на этот процесс с целью поиска новых лекарственных веществ, регулирующих свойства тромбоцитов.

Анализ процесса агрегации тромбоцитов с различными индукторами агрегации играет важнейшую роль в дифференциальной диагностике тромбоцитопатий.

В зависимости от функционально-морфологических характеристик тромбоцитов тромбоцитопатии делят на следующие группы:

- наследственные дезагрегационные тромбоцитопатии без нарушения реакции высвобождения (тромбастиения Гланцманна, эссенциальная атромбия, аномалия Мей-Хегглина);
- парциальные дезагрегационные тромбоцитопатии — заболевания с врожденным дефектом агрегации с тем или иным агрегантом или снижением интенсивности реакции высвобождения;
- нарушение реакции высвобождения; для этой группы заболеваний характерно отсутствие второй волны агрегации при стимуляции малыми дозами АДФ и адреналином; коллагенагрегация не выявляется;
- болезни, сопровождающиеся недостаточными накоплением и хранением медиаторов агрегации (серотонин, адреналин, АДФ и др.); при лабораторных исследованиях для этой группы характерны снижение всех видов агрегации и отсутствие второй ее волны.

При хирургических вмешательствах нарушения в системе сосудисто-тромбоцитарного гемостаза в большинстве случаев обусловлены не нарушением агрегационных и других функциональных свойств тромбоцитов, а наличием тромбоцитопении разной степени.

Для определения активности и содержания в плазме крови фактора фон Виллебранда используется ряд методов, с помощью которых можно выявить большинство форм болезни фон Виллебранда. Значительное повышение активности фактора фон Виллебранда в плазме крови наблюдается при острых тромбозах, некоторых тромбофилиях, ДВС-синдроме, поражениях сосудистой стенки и свидетельствует о его выходе из эндотелия в кровь.

5.2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПЛАЗМЕННОГО (КОАГУЛЯЦИОННОГО) ГЕМОСТАЗА

Тесты, используемые в клинической практике для характеристики состояния плазменного гемостаза, условно можно разделить на две группы [10, 11]: скрининговые и уточняющие.

Скрининговые тесты предназначены для характеристики основных компонентов коагуляционного гемостаза и выявления нарушений равновесия между отдельными звеньями системы гемостаза. К этой группе относятся прежде всего функциональные (хронометрические) тесты — время свертывания крови по Ли-Уайту, протромбиновое время, активированное частичное тромбопластиновое время, тромбиновое время, общая характеристика фибринолитической активности крови (лизис эуглобулиновой фракции);

агрегация тромбоцитов и определение содержания фибриногена в плазме крови, а также определение маркеров ДВС-синдрома — растворимых фибрин-мономерных комплексов (РФМК), продуктов расщепления фибриногена/фибрина (ПРФ).

Уточняющие тесты оценивают содержание определенных компонентов системы свертывания крови и фибринолиза: ингибиторов системы свертывания крови — антитромбина III, протеина С; факторов системы свертывания крови — II, X, XIII; компонентов системы фибринолиза — плазминогена, α_2 -антиплазмина, тканевого активатора плазминогена, ингибитора тканевого активатора плазминогена и др.

Все тесты по исследованию системы гемостаза имеют свои естественные ограничения, поскольку они только моделируют *in vitro* процессы свертывания и фибринолиза, которые происходят в живом организме. Кроме того, при выполнении скрининговых тестов активируется и взаимодействует ряд факторов разнонаправленного действия, поэтому определить содержание или активность отдельных компонентов невозможно. Для определения содержания тех или иных компонентов системы гемостаза используют иммуноферментные методы, которые дают информацию о содержании отдельных компонентов, но не об их функциональной активности. Для характеристики состояния системы гемостаза не менее важны и функциональные методы ее исследования, поскольку они отражают фактический потенциал этой системы. В связи с этим при анализе нельзя ограничиваться отдельными тестами, необходим комплексный анализ всех звеньев системы гемостаза.

5.2.1. Скрининговые тесты

Общий коагуляционный тест — время свертывания крови по Ли-Уайту. Время свертывания крови удлиняется при дефиците факторов, участвующих во внутреннем механизме образования протромбиназы (факторов XII, XI, IX, VIII), а также при гипофибриногемии. Однако тест малочувствителен и непригоден для выявления гемофилии и контроля за достаточностью заместительной терапии и предоперационной подготовки больных. *Нормальные значения:* 8—12 мин [5].

Время рекальцификации стабилизированной крови. Общественной пробой на свертывание стабилизированной крови (плазмы) является реакция рекальцификации, которая заключается в определении времени свертывания тромбоцитарной плазмы при добавлении к ней раствора хлорида кальция оптимальной концентрации.

В последнее время рекомендуется определять время рекальцификации плазмы в условиях стандартной контактной активации свертывания коаляном. *Нормальные значения:* 60—120 с.

Укорочение времени рекальцификации указывает на гиперкоагуляцию, удлинение — на гипокоагуляцию. Удлинение этого времени может быть связано с врожденной недостаточностью плазменных факторов свертывания (за исключением факторов VII и XII), наличием в крови ингибиторов свертывания крови или выраженным дефицитом фактора III тромбоцитов при ДВС-синдроме (стадии “коагулопатии потребления”).

Протромбиновое время (ПВ). Этот функциональный тест моделирует *in vitro* внешний путь свертывания крови и является вариантом определения времени рекальцификации плазмы с добавлением экзогенного тканевого тромбопластина. *Нормальные значения:* 15—20 с.

Результаты теста ПВ могут быть выражены в виде протромбинового индекса (ПИ).

Препараты тромбопластина различаются по исходной активности и по чувствительности к факторам свертывания крови. Необходимо подчеркнуть, что чувствительность тромбопластина и его “активность” — разные и независимые величины. Использование различных препаратов тромбопластина затрудняет стандартизацию контроля эффективности лечения антикоагулянтами непрямого действия. В связи с этим для их характеристики введен международный индекс чувствительности препаратов тромбопластина (МИЧ или ISI). Использование величины МИЧ вносит существенную поправку в показания протромбинового теста. Тромбопластины с низкой чувствительностью (МИЧ $\geq 2,0$) использовать не рекомендуется.

Удлинение ПВ может быть связано с нарушением образования витамин К-зависимых факторов, участвующих во внешнем пути — VII, X, II, а также при терапии антикоагулянтами непрямого действия. Укорочение ПВ связано со снижением содержания антикоагулянтов в крови, а также патологической активацией прокоагулянтного звена системы гемостаза.

В настоящее время при лечении антикоагулянтами непрямого действия показателем их эффективности и безопасности является международное нормализованное отношение (МНО или INR — International Normalized Ratio). Результаты в единицах МНО определяют по формуле $\text{МНО} = (\text{ПВ}_{\text{большого}} / \text{ПВ}_{\text{референтной плазмы}})^{\text{МИЧ}}$. В норме МНО варьирует в пределах 0,7—1,1. Оптимальное МНО при назначении антикоагулянтов непрямого действия составляет 1,7—3,0. Чем выше МНО, тем значительнее полученная гипокоагуляция и тем чаще возможно возникновение геморрагических осложнений [5, 8, 9].

Активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ). Этот тест является одним из самых информативных и распространенных скрининговых тестов, который отражает изменение активности факторов внутреннего пути свертывания крови и нарушение равновесия между прокоагулянтным и антикоагулянтным звеньями системы гемостаза. При выполнении теста определяется время рекальцификации бестромбоцитарной плазмы в условиях стандартизованной контактной (коалином) и фосфолипидной (эритрофосфатидом) активации свертывания крови. Эритрофосфатид или кефалин используют в качестве заменителя тромбоцитарного тромбопластина. *Нормальные значения* 35—55 с.

Удлинение времени свертывания в тесте АЧТВ наблюдается при дефиците или аномалиях высокомолекулярного кининогена, прекалликреина, факторов свертывания крови XII, XI, VIII, V, X, I, а также в присутствии гепарина, продуктов деградации фибриногена/фибрина, люпус-антикоагулянтов. В случае удлинения АЧТВ при нормальном содержании фибриногена проводят коррекционно-ингибиторные пробы. Если добавление плазмы крови доноров (1/2 объема донорской плазмы + 1/2 объема исследуемой

плазмы) приводит к нормализации времени свертывания в тесте, то это указывает на дефицит факторов. Если же время свертывания при добавлении плазмы доноров не нормализуется, это свидетельствует о накоплении ингибиторов. Укорочение АЧТВ наблюдается в случаях активации системы свертывания крови и снижения содержания антикоагулянтов.

Определение АЧТВ является распространенным методом контроля при лечении гепарином. Укорочение АЧТВ указывает на гиперкоагуляцию и рассматривается как фактор риска тромбозов [5, 6, 8, 9].

Тромбиновое время, рептилазное время. Метод основан на способности тромбина или тромбиноподобных ферментов змеиного яда индуцировать превращение фибриногена в фибрин без участия других факторов свертывания крови. Обе пробы позволяют оценить конечный этап свертывания крови — превращение фибриногена в фибрин с последующей его полимеризацией.

Тромбиновое время характеризует процесс превращения фибриногена в фибрин под действием экзогенного тромбина. Удлинение тромбинового времени наблюдается при врожденной аномалии фибриногена, гипофибриногенемии, наличии ингибиторов тромбина.

Рептилаза и другие тромбиноподобные ферменты (атроксин, арвин, анцистрон) отличаются от тромбина тем, что отщепляют от молекулы фибриногена только фибринопептиды А (тромбин отщепляет фибринопептиды А и В), не активируют фактор XIII и не инактивируются комплексом гепарин-антитромбин III. Рептилазное время удлиняется при наличии продуктов деградации фибрина [5, 6, 8—11].

Важно отметить, что гепарин не влияет на рептилазное время, поэтому гипергепаринемия легко распознать по удлинению тромбинового времени в сочетании с нормальным рептилазным временем. *Нормальные значения:* 12—18 с.

5.2.2. Оценка результатов общих коагуляционных тестов

1. Удлинение протромбинового времени при нормальных значениях АЧТВ и тромбинового времени свойственно только при дефиците фактора VII.

2. Нарушение показаний АЧТВ при нормальных ПВ и ТВ наблюдается только при дефиците или ингибировании факторов VIII, IX, XI и XII, а также прекалликреина и высокомолекулярного кининогена. Из этих форм нарушений наиболее часты и сопровождаются выраженной кровоточивостью дефицит факторов VIII и IX, что характерно для гемофилии А и В.

3. Замедление свертывания только в тромбиновом тесте имеет место при дисфибриногенемии, накоплении патологических ингибиторов тромбина и при гепаринотерапии.

4. Замедление свертывания как в АЧТВ, так и в протромбиновом тесте при нормальном ТВ и уровне фибриногена в плазме более 1 г/л наблюдается при дефиците факторов X, V и II, а также при воздействии антикоагулянтов непрямого действия.

5. Нарушение показателей всех трех базисных тестов наблюдается при гепаринотерапии, глубокой гипофибриногемии, воздействии на систему свертывания крови продуктов фибринолиза, лечении активаторами фибринолиза.

Определение содержания фибриногена. Принцип гравиметрического метода Рутберг основан на образовании сгустка фибрина под действием тромбина и последующем взвешивании тщательно отжатого сгустка фибрина.

Паракоагуляционные тесты, позволяющие выявить растворимые фибрин-мономерные комплексы (РФМК). С практической точки зрения зачастую важно определить не только концентрацию свертываемого тромбином фибриногена, но и концентрацию ряда его высокомолекулярных производных (растворимого фибрина, растворимых комплексов фибрин-мономера с продуктами расщепления фибриногена/фибрина, которые не трансформируются в фибрин при добавлении тромбина.

Существуют разные методы определения содержания РФМК. За рубежом наиболее часто применяют иммунохимические методы, в основе которых лежит использование антител к фибринопептидам. Ряд методов основан на способности растворимого фибрина стимулировать превращение плазминогена в плазмин под действием тканевого активатора плазминогена.

Для выявления ДВС-синдрома широкое распространение в клинической практике получили паракоагуляционные тесты, позволяющие обнаружить в плазме крови растворимые фибрин-мономерные комплексы. К ним относятся этаноловый, β -нафтоловый, протаминсульфатный тесты [5]. Однако при сравнении их чувствительности показано, что в зависимости от содержания фибриногена этаноловый и β -нафтоловый тесты могут давать завышенный или заниженный результат. Это связано с соосаждением фибриногена и других белков с РФМК. Протаминсульфатный тест более чувствительный, но точность его зависит от качества используемого протаминсульфата. Так, было показано, что препараты фирмы "Sigma", "Serva", "Fluka" и протаминсульфат Хабаровского химико-фармацевтического завода более эффективно осаждают РФ. Низкомолекулярный протаминсульфат фирмы "Sprofa" не осаждают ни фибриноген, ни растворимый фибрин [16, 17].

В последние годы достаточно широко используется фенантролиновый тест, принцип которого основан на оценке времени появления в исследуемой бедной тромбоцитами цитратной плазме, содержащей РФМК, хлопьев фибрина после добавления ортофенантролина [5, 7].

Положительная проба указывает на присутствие в плазме комплексов фибрин-мономера с продуктами расщепления фибриногена/фибрина и фибриногеном, что рассматривается как важный лабораторный критерий диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови.

5.2.3. Уточняющие тесты

Определение содержания ПРФ (D-димера). Количественное определение D-димера имеет большое диагностическое значение, позволяет характеризовать как степень внутрисосудистого свертывания крови, так и процесс фибринолиза, а также контролировать эффективность анти-

тромботической терапии. Тест основан на способности частиц латекса, покрытых антителами к D-димеру, агглютинировать при смешивании с плазмой крови, содержащей D-димер.

Разработаны также тесты, основанные на анализе времени полимеризации препарата “мономерный фибрин” в присутствии исследуемой плазмы. ПРФ являются вторичными антикоагулянтами: они тормозят образование фибринового сгустка. Степень удлинения времени формирования сгустка в тесте прямо пропорциональна концентрации ПРФ [5, 6, 10, 12].

Определение содержания ингибитора системы свертывания крови — анти-тромбина III. К основным первичным физиологическим антикоагулянтам относится антитромбин III (АТIII), являющийся ингибитором тромбина, а также XIIa, XIa, IXa, Xa, VIIa факторов системы свертывания крови. Для определения содержания антитромбина III чаще всего используют метод, в котором определяют способность исследуемой плазмы инактивировать экзогенный тромбин. По уровню снижения активности экзогенного тромбина в процентах от нормы оценивают антитромбиновую активность плазмы крови [5, 6, 10, 18].

Методика определения уровня пламиногена в плазме крови. Принцип метода состоит в превращении пламиногена в плазмин в присутствии стрептокиназы. При добавлении стрептокиназы к образцу исследуемой плазмы крови образуется пламиноген-стрептокиназный комплекс, активирующий пламиноген в плазмин. Последний расщепляет хромогенный субстрат S_{2251} , скорость гидролиза которого зависит от концентрации пламиногена в образце плазмы крови. Скорость расщепления субстрата регистрируют с помощью спектрофотометра при 405 нм. Уровень содержания пламиногена в плазме крови определяют по активности образовавшегося плазмينا. В норме уровень пламиногена составляет 75—115 % [5, 21, 22].

Методика определения уровня α_2 -антиплазмينا в плазме крови. Метод основан на определении способности α_2 -антиплазмينا исследуемой плазмы крови инактивировать добавляемый в плазму экзогенный плазмин. Содержание остаточного плазмина определяется по степени гидролиза хромогенного субстрата. В норме уровень α_2 -антиплазмينا составляет 80—110 % [5, 12].

Методика определения общей фибринолитической активности плазмы крови. По этому методу измеряется время спонтанного лизиса фибринового сгустка, который получен при добавлении раствора хлорида кальция к эуглобулиновой фракции, бедной на тромбоциты плазмы крови. Время лизиса характеризует общую фибринолитическую активность плазмы крови. За счет освобождения от ингибиторов эуглобулиновая фракция является очень удобным объектом исследования и позволяет оценить потенциал системы фибринолиза, осуществляющей сосудистый фибринолиз. В норме время лизиса составляет 150—180 мин. Сокращение времени лизиса свидетельствует о повышении потенциала фибринолитической системы, удлинение — о снижении потенциала системы фибринолиза [5, 8, 12].

Подготовка образцов плазмы крови. Для проведения качественного анализа состояния системы гемостаза важны адекватная подготовка больного к взятию у него крови, сама методика кровопускания и стабилизация крови [1, 5, 8]. Кровь пациента для анализа берут натошак из локтевой вены иглой

Таблица 5.1. Соотношение объемов раствора цитрата натрия и крови в зависимости от значения гематокритного показателя

Гематокритный показатель, %	Объем стабилизатора, мл	Объем крови, мл
20—21	1,4	8,6
22—27	1,3	8,7
28—33	1,2	8,8
34—39	1,1	8,9
40—45	1,0	9,0
46—51	0,9	9,1
52—57	0,8	9,2
58—60	0,7	9,3
> 65	0,5	9,5

с широким просветом без шприца (самотеком). Использование шприца недопустимо из-за активации тромбоцитов и факторов свертывания крови турбулентным движением крови и ее смешением с воздухом (вспенивание). Допустимо лишь кратковременное наложение жгута.

Кровь смешивают с 3,8%-м раствором цитрата натрия в соотношении 9 : 1 (табл. 5.1). Принятое соотношение крови с раствором стабилизатора правильно лишь при нормальном гематокритном показателе, в связи с тем что раствор цитрата остается в плазме и не проникает в клетки крови. Поэтому при высоком гематокритном показателе (свыше 70 %) в плазме крови создается избыточная концентрация цитрата, приводящая к “ложной гипокоагуляции”. Напротив, при его снижении до 35 % обнаруживается “ложная гиперкоагуляция”, и кровь при ее смешении с цитратом в соотношении 9 : 1 может свернуться в пробирке еще до начала исследования. Пересчет объема стабилизатора в соответствии с гематокритным показателем позволяет избежать этой ошибки. После заполнения пробирки кровью до требуемого объема смесь тщательно перемешивают, не допуская встряхивания [1, 5].

При приготовлении стабилизатора следует учитывать, что трехзамещенный 5,5-водный цитрат натрия готовится концентрацией 3,8 % (0,11 М), а 2-водный — концентрацией 3,2 %. Хранение раствора цитрата натрия допускается в течение недели при 6 °С.

Во время приготовления плазмы крови важно соблюдать режим центрифугирования. Так, для получения богатой тромбоцитами плазмы стабилизированную кровь центрифугируют при 140—160 г в течение 5—7 мин, а для получения бедной тромбоцитами — при 1200—1400 г в течение 15 мин. Центрифугирование проводят при комнатной температуре в пластмассовых пробирках.

5.3. КОМПЛЕКСНАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА НАРУШЕНИЙ СИСТЕМЫ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ И ФИБРИНОЛИЗА

В настоящее время в клинической практике нет единого подхода к диагностике состояния системы гемостаза. Лаборатории перегружены множеством обязательных тестов, большинство из которых относится к скрининговым — суммарным тестам, дающим информацию только о факте нарушения равновесия между отдельными звеньями системы гемостаза. Более точную информацию об изменениях, происходящих в системе гемостаза при той или иной патологии, указанные тесты дать не могут. В связи с этим, при анализе системы гемостаза особое внимание следует уделять стандартизации, унификации и повышению точности наиболее важных в практическом отношении методик, разработке высокочувствительных тестов, а также интерпретации полученных данных [1].

Оперативности и точности лабораторной диагностики способствует разработка алгоритмов, включающих наиболее чувствительные и информативные тесты, которые предоставляют конкретную информацию о степени нарушения в системе гемостаза при данной патологии.

Для своевременной диагностики и выявления доклинических признаков нарушений системы гемостаза необходимо проводить развернутое комплексное исследование, которое дает информацию о процессе агрегации тромбоцитов, степени активации системы свертывания крови и фибринолиза, накопления вторичных ингибиторов. Динамический контроль изменений коагулограммы важен также при проведении антикоагулянтной и тромболитической терапии.

Учитывая состояние проблемы, нами проведен анализ информативности используемых в клинической практике коагулологических тестов, характеризующих состояние системы свертывания крови и фибринолиза. На основании полученных результатов разработан комплекс высокочувствительных, несложных в исполнении информативных диагностических лабораторных тестов, которые позволяют определять не только содержание компонентов, но и их функциональную активность, что отражает фактический потенциал отдельных звеньев плазменного гемостаза. Комплекс диагностических тестов, разработанный для выявления нарушений функционирования системы свертывания крови и фибринолиза приведен ниже:

Тесты	Характеристика параметров системы гемостаза
Определение агрегации тромбоцитов	Характеристика степени нарушения активации тромбоцитов
Активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ)	Характеристика активности факторов внутреннего пути свертывания крови
Протромбиновое время (ПВ)	Характеристика активности факторов внешнего пути свертывания крови
Тромбиновое время (ТВ)	Характеристика конечного этапа свертывания крови (превращение фибриногена в фибрин). Выявление гипофибриногенемии и ингибиторов, блокирующих действие тромбина

Анцистроновое время (АВ) (аналог рептилазного времени)	Характеристика конечного этапа свертывания крови, не чувствителен к действию гепарина. Одновременное сокращение времени свертывания плазмы крови в тестах ТВ и АВ является показателем развития тромбофилии
Определение содержания фибриногена	Выявление гипо- и гиперфибриногенемии
Растворимые фибрин-мономерные комплексы (РФМК)	Маркер тромбинемии
Экамулиновое время (ЭВ)	Выявление функционально неактивных форм протромбина — маркера тромбинемии. Контроль эффективности лечения антикоагулянтами непрямого действия
Определение активности фактора X	Определение уровня активности
Фактор XIII	Определение уровня активности
Продукты расщепления фибриногена/фибрина	Маркер ДВС-синдрома
Антитромбин III	Характеристика антикоагулянтного потенциала плазмы крови
Протеин С	Характеристика антикоагулянтного потенциала плазмы крови
Общая фибринолитическая активность плазмы крови	Фибринолитическая активность плазмы крови
Определение активности плазминогена	Характеристика активности плазминогена
Определение активности α_2 -антиплазмина	Характеристика активности ингибитора плазмина
Определение активности ТАП	Активность тканевого активатора плазминогена
Определение активности ПАИ-1	Активность ингибитора активатора плазминогена

Кроме общепринятых методов лабораторной диагностики в комплекс включены методы, разработанные на основе использования активаторов проферментов системы свертывания крови, выделенных из яда змей, которые являются удобным инструментом для применения в диагностических тестах. Используемый комплекс диагностических тестов дает возможность контролировать накопление маркеров тромбофилии и эффективность антикоагулянтной терапии [10, 11].

При разработке комплекса диагностических тестов особое внимание уделяли методам, предназначенным для выявления маркеров тромбинемии: определение содержания фибриногена, РФМК, продуктов расщепления фибриногена/фибрина, функционально неактивных форм протромбина, определение активности протеина С и антитромбина III. Для характеристики системы фибринолиза разработаны тесты, позволяющие определять активность ТАП и ПАИ-1.

Тесты апробированы на плазме крови больных при заболеваниях сердечно-сосудистой системы (стенокардия, инфаркт, инсульт), язвенной болез-

ни, гломерулонефрите, осложнениях при беременности, хирургических вмешательствах, ожогах и других патологических состояниях [24—39].

Использование тромбиноподобного фермента анцистрона-Н для определения содержания фибриногена в плазме крови. Содержание фибриногена в плазме крови — один из важных показателей, характеризующих состояние системы гемостаза. Биосинтез данного белка усиливается в ответ на травму, в послеоперационный период, при инфекционных болезнях, сердечно-сосудистых заболеваниях, воспалительных и других процессах (гиперфибриногенемия). В связи с этим он получил название “белок острой фазы”. Гипофибриногенемия может быть вызвана потреблением фибриногена при ДВС-синдроме, дилуционной коагулопатии, введении фибринолитических препаратов [2, 40, 41].

Эпидемиологическими исследованиями обнаружен высокий уровень корреляции между содержанием фибриногена в плазме крови и развитием двух основных тромботических осложнений: инсульта и инфаркта миокарда. Главным механизмом при данных осложнениях является процесс образования тромба, ключевую роль в котором играет фибриноген, поскольку фаза фибринообразования — одна из решающих в развитии тромбоза. Понимание связи между тромбозом и содержанием фибриногена в плазме крови дает возможность своевременного проведения лечения для предупреждения возникновения тромботических осложнений.

Таким образом, определение количества фибриногена в плазме крови имеет важное диагностическое значение и может быть прогностическим фактором при многих патологических состояниях, связанных с нарушением системы гемостаза и сопровождающихся развитием тромботических осложнений.

Содержание фибриногена в плазме крови определяют с помощью тромбина и тромбиноподобных ферментов. Известно несколько методов, которые чаще всего используются в клинической практике: метод Клаусса и гравиметрический метод Рутберг.

Широко используемый в зарубежной клинической практике, метод Клаусса позволяет быстро определять содержание фибриногена, однако он предусматривает ежедневный контроль реактивов и построение калибровочной кривой по референтной плазме крови, что значительно усложняет проводимый анализ.

Метод определения содержания фибриногена по Рутберг наименее стандартизован. Неконтролируемые детали этого метода дают недостоверные и расходящиеся результаты определений: неполное удаление влаги приводит к завышенным результатам, задержка процедуры взвешивания на 1—2 мин в ходе выполнения измерений — к ошибке на 2—4 %. Вариации результатов определения содержания фибриногена гравиметрическим методом в разных лабораториях могут достигать от 50 до 100 % [1].

Мы проводили определение содержания фибриногена по методу Белицера и Варецкой. Принцип метода состоит в том, что под действием экзогенного тромбина в исследуемой плазме крови достигается полное превращение фибриногена в фибрин. Образовавшийся сгусток отжимали на стеклянной палочке и растворяли в уксусной кислоте. Содержание фибриногена определяли спектрофотометрически [12, 15].

Однако при гепаринотерапии, а также при накоплении вторичных ингибиторов свертывания крови определение истинного содержания фибриногена с помощью тромбина затруднено и приводит к заниженным результатам. В связи с этим мы заменили тромбин тромбиноподобным ферментом — анцистроном-Н, выделенным из яда щитомордника обыкновенного (*Agkistrodon halys halys*). В отличие от тромбина анцистрон-Н не ингибируется анти-тромбином III и гепарином, не активирует фактор XIII, не вызывает ретракцию сгустков [10, 15, 42, 43].

Определение содержания фибриногена в плазме крови выполняли следующим образом: в стеклянную пробирку вносили 1,8 мл 0,1 М фосфатного буфера рН 7,0; 0,2 мл плазмы крови; 0,1 мл анцистрона-Н, содержащего 0,3 единицы активности. После 30 мин инкубации при 37 °С образовавшиеся сгустки отжимали на стеклянной палочке и растворяли в 5 мл 1,5%-го раствора уксусной кислоты. Концентрацию раствора фибрина определяли спектрофотометрически.

Расчеты проводили по формуле

$$\Phi = (E_{280} - E_{320}) \cdot 255/15,06,$$

где Φ — концентрация фибриногена в плазме крови, г/л; 255 — коэффициент для перерасчета содержания фибриногена в объеме образца на его концентрацию в плазме; 15,06 — коэффициент экстинкции поглощения 1 %-го раствора фибрина в кислой среде при длине волны 280 нм.

Исследования, проведенные с использованием модельных систем, показали, что тромбиноподобный фермент анцистрон-Н позволяет определять содержание фибриногена в плазме крови даже в присутствии 40 ед/мл гепарина [10, 15].

Как отмечалось выше, накопление в плазме крови ингибиторов тромбина приводит к заниженным результатам (рис. 5.1). Использование тромбиноподобных ферментов позволяет избежать подобных ошибок [43].

Так, при определении с помощью тромбина содержания фибриногена в плазме крови группы людей, страдающих гипертонической болезнью (преклонного и старческого возраста, $n = 171$), выявлено снижение уровня фибриногена у 19 больных.

Однако параллельное определение содержания фибриногена с помощью анцистрона-Н показало, что его уровень соответствует норме (табл. 5.2). Для объяснения этого феномена проведена ингибиторно-коррекционная проба с помощью теста АЧТВ. Увеличение времени свертывания в тесте АЧТВ подтвердило наличие в исследуемой плазме крови ингибиторов свертывания, снижающих активность тромбина, что, в свою очередь, влияет на результаты определения содержания фибриногена.

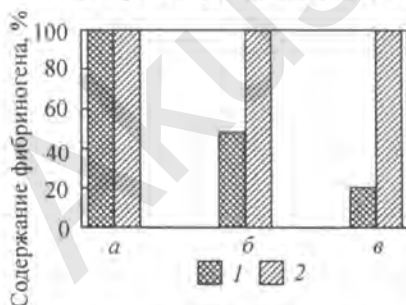


РИС. 5.1. Сравнительная оценка эффективности действия тромбина (1) и анцистрона (2) при определении содержания фибриногена в плазме крови:

а — норма; б — повышенный уровень ингибиторов; в — гепаринотерапия

Таблица 5.2. Содержание фибриногена в плазме крови пациентов с гипертензией

Обследуемый	Содержания фибриногена, г/л		Содержание антитромбина III, %	АЧТВ*, с
	тромбин	анцистрон-Н		
М-н	1,35	3,55	82	73
М-к	1,69	2,45	95	100
Я-о	1,27	2,10	70	150
Е-о	1,26	2,62	86	300
Б-о	1,78	2,28	105	90
В-а	1,27	2,54	80	140
Б-к	1,18	2,37	70	73
А-в	1,52	2,41	97	90

* В норме время свертывания плазмы крови доноров в тесте АЧТВ составляет 55 с, содержание фибриногена — $2,4 \pm 0,3$ г/л, антитромбина III — 100 ± 14 %.

Вторичные ингибиторы могут накапливаться в плазме крови и замедлять скорость свертывания крови при воспалительных процессах, стрессе, осложнениях при беременности, онкологических, сердечно-сосудистых заболеваниях, системной красной волчанке.

Анцистроновое время (АВ). Второй тест, в котором используется тромбиноподобный фермент анцистрон-Н, является аналогом рептилазного времени (рис. 5.2). В отличие от тромбинового времени (ТВ) тест чувствителен к накоплению продуктов деградации фибриногена (ПРФ) — ингибиторов свертывания фибрина. Сравнение ТВ и АВ позволяет характеризовать завершающий этап процесса свертывания крови и дифференцировать причины удлинения времени свертывания в тесте ТВ [10, 29]. Алгоритм использования теста АВ представлен ниже.

Оценка состояния системы гемостаза при помощи анцистрона-Н

Норма	АВ 30 с — содержание фибриногена в пределах нормы; ПДФ и/или ингибиторы свертывания в плазме не выявлены
Гиперфибриногенемия	АВ удлинено в 1,5—2 раза; при разбавлении плазмы крови буфером вдвое АВ восстанавливается
Гипофибриногенемия	АВ удлинено; при разбавлении плазмы крови буфером вдвое АВ не восстанавливается; количественное определение содержания фибриногена подтверждает гипофибриногенемию
Наличие ПРФ	АВ удлинено; содержание фибриногена в пределах нормы; ТВ приближено к норме
Наличие ингибиторов свертывания	Нормальные параметры АВ наряду с удлинением ТВ указывает на наличие гепарина

Сравнение эффективности тестов “анцистроновое время” и подобного ему “атроксин/тромбиновое время” (фирма “Sigma”, США) подтвердили чувствительность и точность теста “анцистроновое время”.

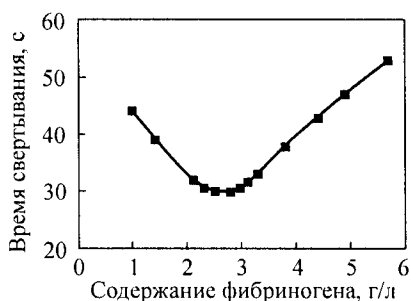


РИС. 5.2. Влияние фибриногена на время свертывания плазмы крови в тесте анцистроновое время

лекса, с последующей полимеризацией его и образованием геля.

Учитывая низкую специфичность выполняемых в клинической практике тестов, в наших исследованиях был использован метод выявления РФМК, разработанный В.А. Белицером и Т.В. Варецкой, основанный на реакции паракоагуляции в присутствии фосфатных буферов. Фосфатные буферы позволяют оптимизировать условия теста, при которых фибриноген и ПРФ соосажаются в незначительных количествах [12]. Тест выполняется следующим образом: в центрифужные пробирки вносят: 0,25 мл исследуемой плазмы; 0,25 мл 0,1 М дигидрофосфатного буфера ($\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{NaOH}$) pH 7,5, содержащего 0,065 М NaCl; 0,2 % 6-АГК и 0,1 %-й раствор цитрат натрия. Смесь тщательно перемешивают, добавляют 0,4 мл 1 М фосфатного буфера pH 7,5, перемешивают и оставляют на 30 мин при температуре 22 °С. Результаты оценивают полуколичественно по форме и количеству появляющегося осадка: мелкие частички — 0,035 мг/мл (1 условная единица — у.е.); хлопьевидная муть — 0,07 мг/мл (2 у.е.); хлопья, нити — 0,105 мг/мл (3 у.е.); гелеобразный осадок — 0,14 мг/мл (4 у.е.). Количество РФМК определяют по калибровочному графику, полученному на модельной системе, составленной из плазмы крови доноров и определенных количеств мономерного фибрина [10, 15, 23].

Определение содержания ПРФ. ПРФ являются вторичными антикоагулянтами, тормозящими образование фибринового сгустка. Тест основан на определении степени замедления времени полимеризации препарата мономерного фибрина в присутствии исследуемой плазмы крови, содержащей ПРФ. Степень удлинения времени формирования сгустка в тесте прямо пропорциональна концентрации ПРФ [10, 15].

Определение общего уровня протромбина и его функционально неактивных форм с помощью ферментного препарата экамулина. Для установления содержания протромбина в плазме крови и выявления его функционально неактивных форм использовали активатор протромбина — экамулин, выделенный нами из яда эфы многочешуйчатой (*Echis multisquamatus*). По свойствам этот фермент подобен экаину, выделенному из яда эфы песчаной (*Echis carinatus*), который широко используется в зарубежной клинической практике [44, 45].

В отличие от тромбoplastина экамулин способен активировать непосредственно протромбин, не активируя весь каскад системы свертывания

Одновременное сокращение времени свертывания плазмы крови в тестах ТВ и АВ является показателем развития тромбофилии.

Содержание растворимых фибрин-мономерных комплексов (РФМК). Принцип паракоагуляционных тестов, используемых в клинической практике для выявления растворимых фибрин-мономерных комплексов в плазме крови, основан на том, что после внесения в плазму крови соответствующих реагентов происходит высвобождение фибрин-мономера из комп-

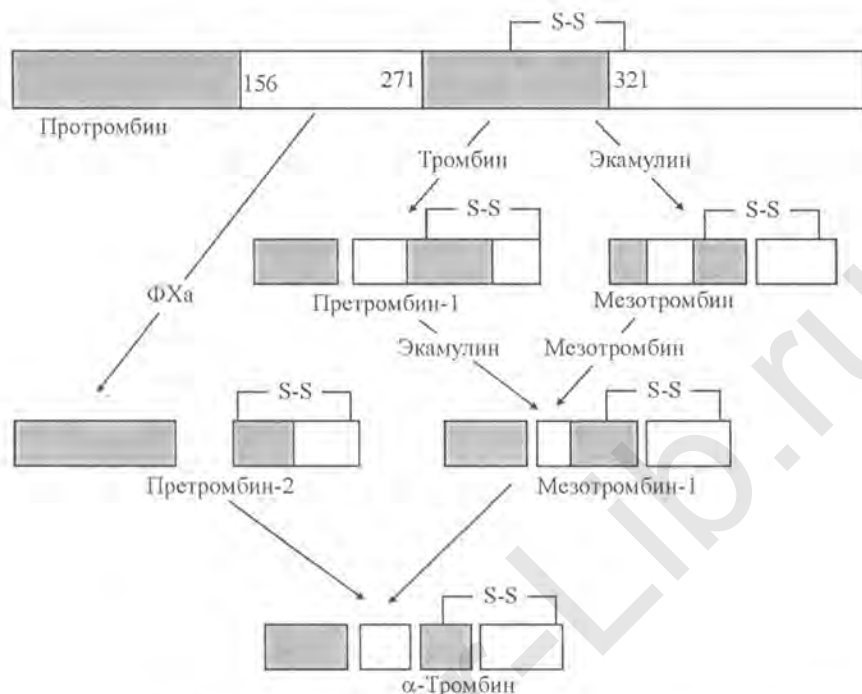


РИС. 5.3. Схема активации протромбина фактором Ха системы свертывания крови и экамулином

крови. Для активации протромбина экамулином не требуется наличие ионов кальция, фосфолипидов или других кофакторов.

Следует отметить еще одно свойство этого фермента — экамулин способен активировать не только протромбин, но и его функционально неактивные формы, например претромбин, который появляется в кровотоке под действием тромбина и служит маркером внутрисосудистого свертывания крови.

Физиологическая активация протромбина происходит под действием протромбиназного комплекса (факторы Ха и Va) на фосфолипидной мембране при наличии ионов кальция. Протромбин превращается в тромбин под действием фактора Ха путем расщепления двух пептидных связей молекулы протромбина (рис. 5.3). Это может сопровождаться накоплением в плазме крови N-концевого участка молекулы протромбина, содержащего оба крингла так называемого фрагмента F_{1+2} . Появление этого продукта активации протромбина рассматривается как косвенный показатель генерации тромбина [2, 46]. В зарубежной клинической практике для выявления маркеров тромбинемии широко используются иммуноферментные методы, с помощью которых определяют содержание низкомолекулярных фрагментов протромбина F_{1+2} .

Появившийся в результате активации системы свертывания крови тромбин может расщеплять молекулу протромбина с образованием промежуточ-

ных производных. Одна из основных форм производных — протромбин, образующийся при отщеплении тромбином Gla-домена и первого крингла молекулы протромбина, который при этом теряет способность связываться с фосфолипидной мембраной и является физиологически неактивным. Выявление таких функционально неактивных молекул важно для диагностики тромбофилии.

Результаты теста экамулиновое время могут быть представлены в виде *экамулинового индекса* — соотношения времени свертывания плазмы крови доноров и исследуемой плазмы крови. При накоплении в плазме крови функционально неактивных форм протромбина экамулиновый индекс выше протромбинового. Значение экамулинового индекса соответствует общему уровню протромбина в плазме крови: сумме функционально активных и неактивных форм. Содержание функционально неактивных форм протромбина можно определить по разнице между протромбиновым и экамулиновым индексами. Если ЭИ выше ПИ на 10—20 %, то плазма крови больного содержит 1,2 мкг/мл функционально неактивных форм протромбина; если разница соответствует 20—40 % — 2,4 мкг/мл; 40—60 % — 3,6 мкг/мл. Эти величины получены при исследовании влияния препаратов протромбина на время свертывания плазмы крови доноров в тесте экамулиновое время [47].

Сравнение результатов протромбинового и экамулинового тестов позволяет выявить функционально неактивные формы протромбина и определить их содержание. Уровень накопления таких форм характеризует степень активации системы свертывания крови. Этот показатель может быть информативен при оценке эффективности проводимой антитромботической терапии.

Информативность теста проверена в ходе анализа 102 образцов плазмы крови больных, оперированных по поводу абдоминальных кровотечений при язве желудка. Группы больных были составлены по степени тяжести протекания послеоперационного периода: I группа — стабильное состояние, II — тяжелое, III — летальный исход. Представленные данные иллюстрируют корреляцию между снижением уровня протеина С и накоплением функционально неактивных форм протромбина, что подтверждает активацию процесса свертывания крови (табл. 5.3).

Таблица 5.3. Показатели гемостаза в группах больных, оперированных по поводу абдоминальных кровотечений при язве желудка ($S \pm SD$)

Показатель	Группа		
	I, n = 68	II, n = 19	III, n = 15
Протромбиновый индекс, % ($p_{1-2} < 0,05$; $p_{1-3} < 0,05$)	88,33 ± 11,95	75,37 ± 20,80	63,95 ± 20,98
Антитромбин III—гепарин, % ($p_{2-3} < 0,05$)	87,75 ± 19,28	98,68 ± 41,56	74,33 ± 15,05
Функционально неактивные формы протромбина, мкг/мл ($p_{1-3} < 0,05$; $p_{2-3} < 0,05$)	0,78 ± 1,29	1,08 ± 1,23	1,54 ± 1,4

Определение содержания физиологических ингибиторов системы свертывания крови. К основным ингибиторам свертывания крови относятся анти-тромбин III и протеин С. Антитромбин III является ингибитором тромбина, а также XIIa, XIa, IXa, Xa, VIIa факторов системы свертывания крови. В наших исследованиях для определения содержания антитромбина III использовали метод [5, 10].

Активированный протеин С выборочно расщепляет факторы свертывания Va и VIIa. Определение содержания функционально активного протеина С имеет важное значение для оценки антикоагуляционного потенциала крови. Активация системы свертывания крови приводит к снижению содержания протеина С.

Для определения активности протеина С ранее использовали неспецифические активаторы — тромбин, трипсин и активатор фактора X, выделенный из яда гадюки Рассела. Однако для ускорения этого процесса требовалось наличие кофакторов, например тромбомодулина. В связи с этим определение уровня протеина С было технически сложным. В 1986 г. показано, что яд *Agkistrodon contortrix contortrix* способен активировать протеин С. Впоследствии из яда этой змеи был выделен активатор протеина С, известный как Protac. Аналогичные по действию ферменты-активаторы обнаружены также в яде змей рода *Agkistrodon* (*A. contortrix contortrix*, *A. c. piscivorus*, *A. c. pictigaster*, *A. c. mokeson*, *A. bilineatus*, *A. piscivorus leucostoma*) [45].

Активаторы протеина С, содержащиеся в яде змей, исключают использование комплекса тромбин-тромбомодулин. Преимущество нефизиологических активаторов протеина С, выделенных из яда змей, состоит в их специфичности, высокой скорости активации протеина С, отсутствии в плазме крови их ингибиторов, а также в их резистентности к высокой ионной силе, что дает возможность использовать их для определения уровня протеина С *in vitro*. В отличие от иммунологических тестов, применение которых позволяет найти только содержание протеина С, тесты с использованием активатора протеина С характеризуют функциональную активность этого белка.

Для определения активности протеина С из яда щитомордника обыкновенного (*Agkistrodon halys halys*) нами был выделен фермент — активатор протеина С. Сравнение его действия с действием фирменного препарата Protac (American Diagnostica, США) показало идентичность влияния обоих препаратов [10, 48].

Принцип метода определения активности протеина С в плазме крови заключается в его способности инактивировать факторы Va и VIIa, что приводит к удлинению времени свертывания плазмы крови в тесте АЧТВ в присутствии активатора протеина С. При дефиците протеина С время свертывания плазмы крови сокращается [3, 10, 19, 20].

Активация системы свертывания крови сопровождается снижением содержания протеина С и к накоплению маркеров тромбинемии — РФМК, функционально неактивных форм протромбина. В табл. 5.4 представлены данные, характеризующие состояние системы гемостаза беременных при гестозе.

Таблица 5.4. Содержание протеина С и маркеров тромбинемии: растворимого фибрина, функционально неактивных форм протромбина у беременных при гестозах

Преэклампсия	РФМК, г/л	Функционально неактивные формы протромбина, мкг/мл	Протеин С, %
1-я степень	0,035 ± 0,001	1,8 ± 0,1	93,7 ± 3,4
2-я степень	0,075 ± 0,004	3,6 ± 0,4	58,8 ± 3,4
3-я степень	0,14 ± 0,008	3,2 ± 0,2	39,2 ± 4,3
Доноры	0	0	100 ± 1,3

Представленные данные характеризуют степень активации системы свертывания крови: накопление маркеров тромбинемии (РФМК и функционально неактивных форм протромбина) и потребление одного из основных ингибиторов этой системы — протеина С, что характеризует нарушение баланса между прокоагулянтным звеном и ингибиторами.

Характеристика параметров фибринолитической системы

Методы определения активности тканевого активатора плазминогена в углубулиновой фракции плазмы крови и ингибитора активатора плазминогена первого типа в плазме крови.

В процессе фибринолиза непосредственное участие принимает специфический фермент крови — плазмин, который образуется из своего неактивного предшественника — плазминогена. Активацию плазминогена в физиологических условиях осуществляют ТАП и активатор урокиназного типа. Действие ферментов фибринолиза находится под контролем их ингибиторов, основными из которых являются α_2 -антиплазмин — специфический ингибитор плазмина и ингибитор активатора плазминогена первого типа (ПАИ-1).

Для характеристики системы фибринолиза чаще всего выполняется тест, устанавливающий общую фибринолитическую активность. Для более детальной характеристики фибринолитического потенциала рекомендуется определение содержания/активности компонентов системы фибринолиза.

В наших исследованиях мы находили содержание плазминогена и α_2 -антиплазмина с помощью хромогенных субстратов [21].

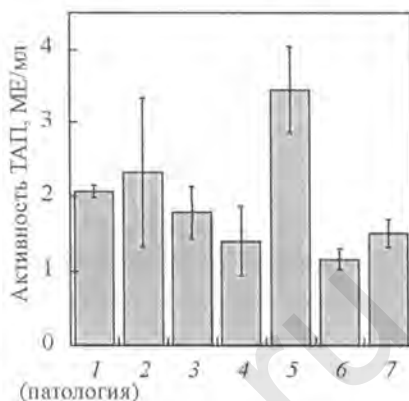
Для установления активности ТАП в плазме крови мы адаптировали метод определения этого показателя в крови больных с различными патологиями, связанными с нарушениями системы гемостаза [22, 23, 37].

Принцип метода заключается в способности тканевого активатора плазминогена в присутствии стимулятора превращать плазминоген в плазмин. Плазмин расщепляет хромогенный субстрат с высвобождением в раствор паранитроанилида, изменение его оптической плотности измеряли при 405 нм. В норме активность ТАП составляет 2,05 МЕ/мл, снижение его активности свидетельствует о возможной угрозе тромботического осложнения, повышение — о предрасположенности к геморрагиям [23].

Из рис. 5.4 видно, что изменение активности ТАП носит разнонаправленный характер. Активность ТАП является важным информативным пока-

Рис. 5.4. Активность тканевого активатора плазминогена ТАП в плазме крови доноров и при патологиях:

1 — доноры; 2 — ревматоидный артрит; 3 — стабильная стенокардия; 4 — нестабильная стенокардия; 5 — беременные; 6 — острый инфаркт миокарда; 7 — септические осложнения при ожогах



зателем состояния системы фибринолиза и характеризует фибринолитический потенциал исследуемой плазмы [49—52]. Для данного метода норма активности ТАП составляет в среднем 2,05 МЕ/мл плазмы крови. Иммунохимические методы определения содержания ТАП дают информацию о количестве ТАП, но не характеризуют его активность, в то время как для оценки эффективности проводимой терапии в некоторых случаях важна именно информация о его активности [23, 53].

Активность ПАИ-1 в плазме крови также является важным показателем состояния системы фибринолиза и может объяснить причину снижения общего фибринолитического потенциала при повышенной активности ТАП.

Например, определение активности ПАИ-1 и ТАП в плазме крови женщин после абдоминального родоразрешения фибринолитический потенциал крови снижен, несмотря на высокую активность ТАП (9,26 МЕ/мл), что можно объяснить повышением активности его ингибитора — ПАИ-1.

5.4. КОМПЛЕКСНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТЕПЕНИ НАРУШЕНИЯ РАВНОВЕСИЯ МЕЖДУ КОМПОНЕНТАМИ СИСТЕМЫ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ И ФИБРИНОЛИЗА ПРИ ТЕРМИЧЕСКОЙ ТРАВМЕ

Термическая травма — один из сильнейших экстремальных факторов, который действует кратковременно, но вызывает изменения функционального состояния системы гемостаза, сопровождающиеся развитием гиперкоагуляции, значительным повышением содержания фибриногена (в 2—3 раза по сравнению с нормой) и подавлением фибринолиза. Активация системы свертывания крови ухудшает общее состояние организма и в случае тяжелых ожогов повышает показатель смертности.

Значительное нарастание признаков тромбинемии проявляется у ожоговых больных на стадии септикотоксемии. В связи с этим необходим постоянный контроль системы гемостаза таких пациентов на всех этапах лечения.

Для разработки алгоритма ранней диагностики развития тромботических осложнений изучено состояние системы гемостаза 54 человек, получивших глубокие ожоги. По тяжести поражения выделено три группы больных: 1-я группа ($n = 15$) — крайне тяжелые (площадь ожога 40—70 %), 2-я ($n = 17$) — больные с тяжелыми ожогами (площадь ожога больше 20 %), 3-я ($n = 22$) —

Таблица 5.7. Параметры системы гемостаза ожоговых больных ($M \pm m$)

Показатель для групп доноров ($n = 8$)		Группа ожоговых больных	1-е сутки
Ф, г/л	$2,36 \pm 0,03$	1	$5,37 \pm 0,35$
		2	$5,11 \pm 0,87$
		3	$3,45 \pm 0,95$
ТВ, с	$12 \pm 0,07$	1	$17,4 \pm 5,15$
		2	$12,5 \pm 0,63$
		3	$10,08 \pm 0,44$
АВ, с	$30 \pm 0,5$	1	$34,35 \pm 2,84$
		2	$30,3 \pm 1,7$
		3	$31,8 \pm 1,59$
АТIII, %	$99,75 \pm 2,13$	1	$87,8 \pm 9,32$
		2	$57,2 \pm 12,78$
		3	$64 \pm 11,26$
ПС, %	$100,12 \pm 1,33$	1	$72,7 \pm 6,7$
		2	$58,6 \pm 12,8$
		3	$71,25 \pm 14,44$
РФМК, г/л	0	1	$0,064 \pm 0,037$
		2	$0,053 \pm 0,014$
		3	$0,054 \pm 0,0147$

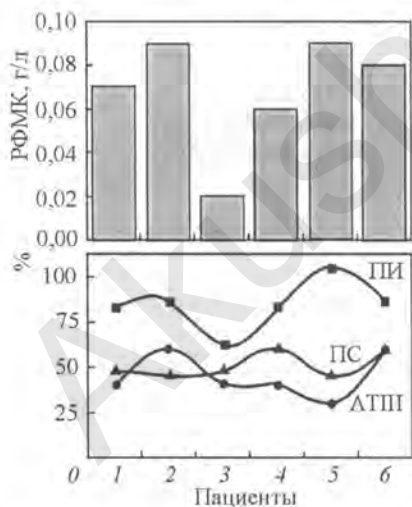


Рис. 5.5. Показатели системы свертывания крови у больных с тяжелыми ожогами ($n = 6$)

РФМК — растворимые фибрин-мономерные комплексы; ПИ — протромбиновый индекс; АТIII — антитромбин III; ПС — протеин С

больные со средней тяжестью поражения (площадь ожога до 20 %).

При комплексном анализе состояния системы гемостаза определяли ряд параметров системы свертывания крови и фибринолиза (табл. 5.7). О глубоких воспалительных процессах в организме больных в 1-е сутки после ожога свидетельствует значительное повышение содержания фибриногена в плазме крови, что может быть фактором риска развития процесса тромбообразования.

Сокращение времени свертывания плазмы крови в тестах анцистроновое и тромбиновое время при высоком содержании фибриногена и накоплении маркера тромбинемии — РФМК ($0,03 - 0,09$ г/л) в сочетании с потреблением основных ингибиторов — АТIII и протеина С — свидетельствует о гиперкоагуляции и развитии тромботических осложнений.

Определение активности ТАП и ПАИ-1 показало, что потенциал системы фибринолиза в плазме крови больных при глубоких ожогах значительно снижен. Так, активность ТАП составляла $1,34 \pm 0,27$ МЕ/мл (при норме $2,05 \pm 0,03$ МЕ/мл), а активность ПАИ-1 превысила норму приблизительно в 10 раз. Коэффициент корреляции между этими параметрами $-0,82$ ($p < 0,05$), что свидетельствует об их тесной взаимосвязи.

Анализ данных, представленных на рис. 5.5, подтверждает нарушение баланса между активаторами и ингибиторами системы свертывания крови. Выявлено значительное накопление маркера тромбинемии — РФМК.

5.5. ПРОВЕДЕНИЕ КОНТРОЛЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПИИ АНТИКОАГУЛЯНТАМИ НЕПРЯМОГО ДЕЙСТВИЯ

Развитие хирургических и терапевтических методов лечения приводит к увеличению количества больных, которым необходимо постоянно или в течение ограниченного времени принимать препараты, снижающие свертываемость крови, в первую очередь антикоагулянты непрямого действия (АНД). Многочисленные эпидемиологические и клинические исследования показали, что АНД существенно снижают возможность развития тромбоэмболических осложнений. В некоторых случаях они являются единственным средством оказания терапевтической неотложной помощи больным с предрасположенностью к развитию тромбозов. Действие препаратов АНД на систему свертывания крови наблюдается только через 12—24 ч после начала применения, в то время как противосвертывающее действие гепарина — практически сразу после введения, что обусловлено различиями в механизме антикоагулянтного действия этих препаратов.

Использование АНД (кумарин, варфарин, фенилин) приводит к необратимому подавлению действия γ -глутамилкарбоксилазы и сопровождается нарушением посттрансляционного γ -карбоксилирования предшественников протромбина, факторов VII, IX, X, протеинов C, S и Z. Декарбоксилированные формы этих белков получили наименование PIVKA II, PIVKA VII и т. д. (PIVKA — белки, образующиеся в отсутствие витамина K). Они не участвуют в процессе свертывания крови, поскольку не связывают ионы кальция и теряют аффинность к фосфолипидной мембране, что приводит к снижению свертывающего потенциала плазмы крови [3, 54, 55].

Передозировка препаратов кумаринов может привести к кровотечению. В связи с этим проведение современной антикоагулянтной терапии невозможно без надлежащего лабораторного контроля состояния системы гемостаза [57—59]. Анализ данных рандомизированных исследований показал, что при правильно подобранной терапии антагонистами витамина K выигрыш в профилактике тромбозов значительно перекрывает риск кровотечений (рис. 5.6).

Методы контроля состояния системы свертывания крови при проведении современной антикоагулянтной терапии в клинической практике достаточно разнообразны и специфичны. Общепринятым тестом контроля

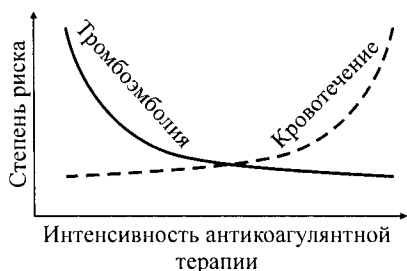


РИС. 5.6. Зависимость степени риска развития осложнений от интенсивности проведения терапии антагонистами витамина К [58]

системы свертывания крови, значительный вклад вносят активированные факторы X, II и VII.

Использование АНД сопровождается накоплением белков PIVKA, которые не активируются тромбопластином. Их накопление в кровотоке приводит к замедлению свертывания в тесте протромбиновое время, что позволяет контролировать эффективность проводимой антитромботической терапии.

В настоящее время при лечении антикоагулянтами непрямого действия показателем их эффективности и безопасности является Международное нормализованное отношение (МНО или INR — International Normalized Ratio), которое выражается отношением ПВ больного к ПВ пула плазмы доноров. Введение МНО обеспечивает оптимизацию терапии оральными антикоагулянтами. Использование единой системы контроля позволяет обобщать опыт, накопленный в разных клиниках.

Однако при выполнении теста необходимо учитывать качество реагентов. Использование различных препаратов тромбопластина затрудняет стандартизацию контроля эффективности лечения АНД. В связи с этим для характеристики препаратов тромбопластина введен международный индекс чувствительности препаратов тромбопластина (МИЧ или ISI). Тромбопластины с низкой чувствительностью (МИЧ $\geq 2,0$) использовать не рекомендуется. Следует подчеркнуть, что чувствительность тромбопластина и его активность — различные и независимые величины. Оптимальная величина МНО при лечении антикоагулянтами непрямого действия соответствует 2,0—3,5 [56].

Однако выполнение только одного теста не дает полной информации об эффективности действия терапевтических препаратов, так как в крови больных могут накапливаться ингибиторы, которые искажают результаты тестов. В связи с этим нами использован тест экамулиновое время для контроля эффективности лечения АНД, так как экамулин способен активировать не только протромбин, но и его декарбоксилированные формы, которые не участвуют в процессе свертывания крови, поскольку не связывают ионы кальция и теряют аффинность к фосфолипидной мембране.

Нами проведен анализ состояния системы свертывания крови больных с диагнозом нестабильная стенокардия ($n = 43$). Группе больных ($n = 7$) было

эффективности терапии АНД, является протромбиновое время — функциональный тест, характеризующий внешний путь системы свертывания крови. Принцип его состоит в определении времени свертывания цитратной плазмы крови (в некоторых случаях — цельной капиллярной крови) в присутствии экзогенного тромбопластина и ионов Ca^{2+} . При выполнении теста протромбиновое время реализуется ряд последовательных и взаимосвязанных реакций. Результаты зависят от содержания и активности факторов внешнего пути системы свертывания крови.

назначено лечение антикоагулянтами непрямого действия. Исследованием выявлено увеличение содержания фибриногена до 3,5 г/л (норма $2,5 \pm 0,23$ г/л) и высокий уровень содержания в плазме крови РФМК (у некоторых обследованных лиц — до 0,12 г/л), что свидетельствует об активации системы свертывания крови и представляет угрозу развития процесса тромбообразования. Активированное частично тромбопластиновое время удлинено. Ингибиторно-коррекционные пробы в тесте АЧТВ показали, что удлинение времени свертывания плазмы крови связано с накоплением вторичных ингибиторов, а не со снижением функциональной активности факторов свертывания. Однако эти ингибиторы не влияют на завершающий этап системы свертывания крови — тромбиновое время практически соответствует норме.

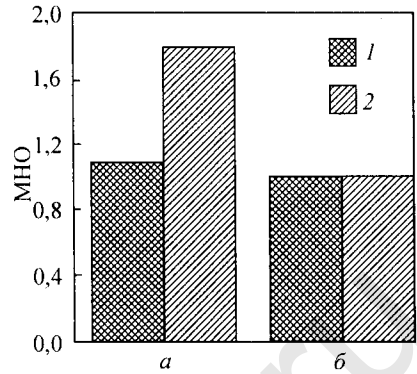


Рис. 5.7. Влияние антикоагулянтов непрямого действия на время свертывания в тестах протромбиновое (а) и экамулиновое (б) время:

1 — до лечения; 2 — во время лечения

Эффективность действия препаратов антагонистов витамина К проверяли по накоплению функционально неактивных форм протромбина, сравнивая результаты тестов протромбиновое и экамулиновое время. Значительное увеличение времени свертывания плазмы крови в тесте протромбиновое время свидетельствует о накоплении функционально неактивных форм протромбина, в то время как общий его уровень активности по данным теста экамулиновое время не меняется. Повышение уровня функционально неактивных форм факторов свертывания уменьшает потенциал системы свертывания и снижает угрозу развития процесса тромбообразования (рис. 5.7). Об эффективности проводимой терапии свидетельствует снижение содержания РФМК в плазме крови больных.

При лечении АНД необходимо контролировать уровень активности протеина С, поскольку он также относится к витамин К-зависимым белкам и его функциональная активность снижается при лечении антагонистами витамина К. Неконтролируемое уменьшение активности протеина С может снизить эффективность лечения и привести к развитию тромбозов.

Таким образом, результаты исследований состояния системы свертывания крови при проведении антикоагулянтной терапии АНД позволяют заключить, что необходимо учитывать не только уровень функционально активных витамин К-зависимых факторов системы свертывания крови в тесте протромбиновое время и общий уровень протромбина в тесте экамулиновое время, но и контролировать уровень активности протеина С и степень активации системы свертывания крови по накоплению РФМК.

5.6. АНАЛИЗ СОСТОЯНИЯ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА И ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ТРОМБОТИЧЕСКИХ ОСЛОЖНЕНИЙ ПРИ ОСТРОМ ИНФАРКТЕ МИОКАРДА В ХОДЕ ЛЕЧЕНИЯ СТРЕПТОКИНАЗОЙ

По данным многочисленных исследований, изменения в системе гемостаза при остром инфаркте миокарда (ОИМ) сопровождаются значительной активацией системы свертывания крови, о чем свидетельствует увеличение содержания маркеров тромбинемии (фибринопептидов, растворимого фибрина, фрагментов протромбина F_{1+2}), снижается содержание ингибиторов системы свертывания и появляется тромбин-антитромбиновый комплекс (ТАТ). Содержание как связанного, так и свободного тканевого активатора плазминогена, увеличивается, но уровень его активности остается низким [60—62].

Экспериментальные и клинические исследования показали, что при проведении тромболитической терапии (ТЛТ) с применением стрептокиназы наряду с восстановлением кровотока в венечной артерии в некоторых случаях происходит активация тромбоцитов и каскада коагуляции, что по данным разных исследований в 10—30 % случаев приводит к повторному тромбообразованию [63]. В связи с этим информация о состоянии системы свертывания крови и фибринолиза при ТЛТ необходима для предупреждения развития геморрагий или ретромбозов, а также контроля эффективности антикоагулянтной терапии.

Мы проанализировали состояние системы гемостаза у группы больных в возрасте до 70 лет с диагнозом крупноочаговый трансмуральный ОИМ без признаков кардиогенного шока. В ходе лечения пациентов проводилась ТЛТ стрептокиназой в сочетании с антитромботической терапией препаратами гепарина и фраксипарина [31]. Состояние гемостаза при ОИМ анализировали с момента поступления больных на лечение до проведения ТЛТ, через 2 ч после ТЛТ, на 3-и, 7-е сутки и по прошествии 30 сут.

Для исследований мы использовали комплекс диагностических тестов, позволяющий определять более 20 параметров, характеризующих процесс агрегации тромбоцитов, параметры системы свертывания крови и фибринолиза. Некоторые из полученных данных представлены в табл. 5.6.

В первые часы после инфаркта у некоторых пациентов обнаруживается повышение содержания фибриногена в плазме крови до 4,6 г/л. Высокое содержание фибриногена, значительное сокращение времени свертывания плазмы крови в тесте АЧТВ (в 1,2—1,5 раза), а также накопление РФМК у 84 % больных (от 0,015 до 0,12 г/л) свидетельствует о глубоких нарушениях регуляции системы гемостаза.

Активация системы свертывания крови у больных с диагнозом ОИМ приводит к значительному потреблению основных ингибиторов системы свертывания крови — АТIII до $71,51 \pm 8,45$ % и протеина С до $67,1 \pm 6,54$ % (у 30 % больных активность протеина С < 50 %).

Использование экзогенного активатора протромбина — экамулина, выделенного из яда эфы многочиселуйчатой, позволило получить дополнительную информацию о степени активации системы свертывания крови. Экаму-

Таблица 5.6. Динамика изменений параметров системы гемостаза больных ОИМ при проведении тромболитической терапии стрептокиназой ($S \pm SD$)

Параметр гемостаза	Доноры (n = 8)	До лечения (n = 19)	3-и сутки (n = 13)	7-е сутки (n = 12)	30-е сутки (n = 9)
Ф, г/л	2,36 ± 0,03	3,08 ± 0,15	1,84 ± 0,20	3,22 ± 0,29	3,02 ± 0,27
ТВ, с	12 ± 0,07	11,32 ± 0,37	15,25 ± 2,48	10,9 ± 0,60	11,89 ± 0,51
АЧТВ, с	45,25 ± 0,36	37,56 ± 2,15	59,0 ± 3,94	59,3 ± 4,68	43,56 ± 1,65
ПС, %	100,1 ± 1,33	67,1 ± 6,54	63,31 ± 11,37	71,09 ± 7,00	84,42 ± 7,08
АТПП, %	99,75 ± 2,13	71,51 ± 8,45	91,63 ± 9,44	106,45 ± 15,50	107,42 ± 5,72
ПИ, %	100,38 ± 1,10	92,39 ± 2,30	90,42 ± 3,87	98,85 ± 11,92	99,96 ± 4,00
РФМК, г/л	0	0,056 ± 0,01	0,037 ± 0,008	0,055 ± 0,009	0,04 ± 0,01
ФНПР, мкг/мл	0	2,17 ± 0,33	0,32 ± 0,22	0,25 ± 0,17	0,89 ± 0,48
ФХ, %	100,5 ± 1,16	87,7 ± 5,93	89,17 ± 5,44	104,3 ± 6,13	114,22 ± 9,77
Пг, %	100 ± 1,38	97,32 ± 4,18	94,17 ± 6,79	114,92 ± 5,55	82,5 ± 11,22
α_2 -АП	100 ± 2,05	76,68 ± 4,36	90,33 ± 7,15	107,04 ± 6,28	109,69 ± 6,05

Примечание. Ф — фибриноген; ТВ — тромбиновое время; АЧТВ — активированное частично тромбопластиновое время; ПС — протеин С; АТПП — антитромбин III; ПИ — протромбиновый индекс; РФМК — растворимые фибрин-мономерные комплексы; ФНПР — функционально неактивные формы протромбина; ФХ — фактор X; Пг — пламиноген; α_2 -АП — α_2 -антиплазмин.

лин способен активировать не только протромбин, но и его функционально неактивные формы, которые появляются в кровотоке под действием тромбина (претромбин). Сравнение результатов тестов протромбиновое и экамулиновое время позволило выявить функционально неактивные формы протромбина и определить их содержание.

Согласно нашим исследованиям, в первые часы после инфаркта обнаруживается высокое содержание функционально неактивных форм протромбина (от 0,6 до 3,6 мкг/мл), что косвенно свидетельствует об активации системы свертывания и коррелирует с другими маркерами тромбинемии.

Характеристика фибринолитической системы свидетельствует, что содержание пламиногена — ключевого профермента фибринолитической системы крови в день поступления больных ОИМ соответствует норме: $97,3 \pm 4,18$ %. Уровень α_2 -антиплазмينا значительно снижен (до $76,68 \pm 4,36$ %), что на фоне практически постоянного уровня пламиногена вероятно связано с потреблением α_2 -АП активированными факторами системы свертывания крови [64, 65].

Данные об уровне активности ТАП на всех этапах лечения ОИМ представляют значительный интерес, так как отражают потенциал системы фибринолиза. При поступлении больных уровень активности ТАП в плазме их крови несколько снижен и составляет $1,16 \pm 0,14$ МЕ/мл (норма — 2,05 МЕ/мл). Введение стрептокиназы приводит к резкому повышению активности ТАП

до $7,88 \pm 3,47$ МЕ/мл. На последующих этапах лечения активность ТАП приближается к норме и через 30 сут составляет $2,21 \pm 0,38$ МЕ/мл, что свидетельствует о быстром восстановлении способности сосудистой стенки регулировать уровень активности ТАП. Однако следует отметить некоторые индивидуальные особенности пациентов: у 15 % обследованных лиц при поступлении в больницу был обнаружен повышенный уровень активности ТАП (3—4 МЕ/мл), который оставался высоким в течение всего периода лечения.

Причиной возникновения дисбаланса в системе гемостаза может быть не только активация системы свертывания крови и снижение активности ингибиторов, но также изменение активности ТАП и его ингибитора ПАИ-1 [8—13]. В связи с этим существенной является информация об изменениях активности ТАП в плазме крови, поскольку он обеспечивает 90—95 % фибринолитического потенциала крови [65].

Проведенными исследованиями выявлены наиболее характерные для этой патологии признаки нарушений системы свертывания крови и фибринолиза, что позволило разработать алгоритм лабораторной диагностики ОИМ. В алгоритм вошли следующие тесты: АЧТВ; определение содержания фибриногена, АТIII, протеина С, РФМК и функционально неактивных форм протромбина; общая фибринолитическая активность и активность ТАП. На всех этапах лечения необходимо контролировать процесс агрегации тромбоцитов, так как известно, что в некоторых случаях возможна значительная стимуляция агрегации в присутствии стрептокиназы [63].

Использование алгоритма диагностики важно для своевременной выработки правильной врачебной тактики и контроля эффективности проводимой терапии. Разработанный алгоритм информативен на всех этапах лечения, однако диагностика состояния системы гемостаза в 1-е сутки после проведения тромболитической терапии стрептокиназой имеет свои особенности, в связи с тем что выполнение хронометрических тестов (ТВ, АЧТВ) затруднено, так как активация фибринолиза приводит к расщеплению большей части находящегося в кровотоке фибриногена (рис. 5.8) [66].

После ТЛТ происходит постепенное восстановление уровня фибриногена,

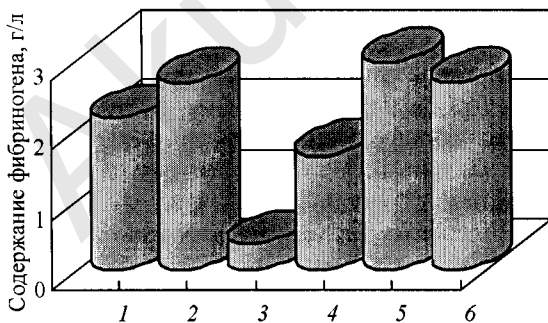


РИС. 5.8. Определение содержания фибриногена в плазме крови доноров (1), при инфаркте миокарда до лечения больных (2), через два часа после ТЛТ (3), на третьи (4), седьмые (5) и тридцатые сутки (6)

но у некоторых пациентов даже на 3-и сутки содержание фибриногена остается на низком уровне (1,0—1,5 г/л). Удлинение времени свертывания плазмы крови в тестах ТВ и АЧТВ в этот период очевидно связано со снижением содержания фибриногена и накоплением вторичных ингибиторов свертывания — продуктов деградации фибриногена/фибрина.

Уровень активности анти-тромбина III в этот период лечения приближается к норме,

но активность протеина С по-прежнему снижена, что может рассматриваться как показатель тромбоинемии. Уровень активности плазминогена и α_2 -антиплазмина после ТЛТ восстанавливается соответственно до $94,27 \pm 6,79$ и $90,33 \pm 7,15$ %.

РФМК образуются под действием тромбина в результате активации системы свертывания крови и представляют собой комплексы мономерного фибрина с фибриногеном и продуктами деградации фибрина/фибриногена. Накопление РФМК свидетельствует не только об активации системы свертывания крови, но и о нарушении динамического равновесия в функционировании систем свертывания крови и фибринолиза. На основании полученных данных мы пришли к заключению, что именно этот показатель является одним из основных при контроле эффективности антитромботической терапии.

Эффективность проведения ТЛТ стрептокиназой и антитромботической терапии низкомолекулярным гепарином подтверждается снижением содержания РФМК. Так, на 3-и сутки после ТЛТ у 15 % пациентов не обнаружено РФМК в плазме крови, а в среднем по группе уровень РФМК снижен до $0,037 \pm 0,008$ г/л по сравнению с $0,056 \pm 0,01$ г/л в 1-е сутки лечения. Функционально неактивные формы протромбина выявили только у трех пациентов.

При отмене фраксипарина на 7-е сутки наблюдается так называемая рикошетная реакция — значительное укорочение тромбинового времени, повышение уровня РФМК до $0,055 \pm 0,009$ г/л и у 25 % больных в плазме крови снова появляются функционально неактивные формы протромбина.

На рис. 5.9 представлены три наиболее типичных варианта изменения содержания РФМК у больных ОИМ в течение 30 сут. В плазме крови больного 1 при поступлении обнаружено высокое содержание РФМК, которое постепенно снижается к 30-м суткам лечения. У больного 2 применение стрептокиназы и последующее введение фраксипарина быстро снижает уровень РФМК, временный подъем которого наблюдался после отмены фраксипарина. Так же повышался уровень РФМК после отмены фраксипарина и у больного 3. В связи с этим можно сделать вывод, что отмена антитромботической терапии должна проводиться под строгим лабораторным контролем [67—69].

Спустя месяц после перенесенного ОИМ состояние системы гемостаза больных по многим параметрам приближается к норме, однако в плазме крови 66,5 % больных выявлены растворимый фибрин, а 33 % пациентов — функционально неактивные формы протромбина.

Отмечена корреляция между уровнем РФМК и функционально неактивными формами протромбина ($0,95$; $p < 0,05$), РФМК и фибриногеном ($0,8$; $p < 0,05$) на отдельных стадиях лечения ОИМ. В связи с этим можно сделать вывод, что повышение содержания РФМК и появление функционально неактивных форм протромбина на фоне повышенного содержания фибрино-

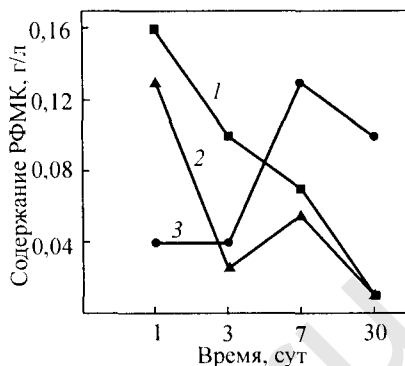


РИС. 5.9. Содержание растворимых фибрин-мономерных комплексов в плазме крови больных при инфаркте миокарда

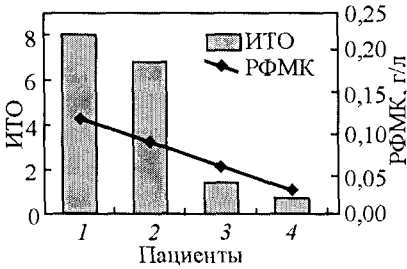


РИС. 5.10. Индекс тромботических осложнений (ИТО) четырех больных инфарктом миокарда на 7-е сутки и содержание РФМК в плазме их крови на 30-е сутки

гена на 30-е сутки лечения указывает на возрастание степени риска повторного тромбообразования и может быть важным прогностическим показателем тромботических осложнений.

Индекс тромботического осложнения.

Проведение комплексного анализа состояния системы гемостаза при инфаркте миокарда позволило не только выявить нарушение баланса между системами свертывания крови и фибринолиза, определить степень ее активации, но и контролировать эффективность проводимого лечения, а также еще раз доказало необхо-

димость комплексного подхода для характеристики такой сложной многокомпонентной системы, как гемостаз.

Необходимость комплексного анализа состояния системы гемостаза подчеркивал А.И. Грицюк, который предложил метод определения индекса тромбофилии, основанный на одновременном анализе показателей систем свертывания крови и фибринолиза, что является информативным для выявления нарушения баланса в системе гемостаза и позволяет прогнозировать развитие тромботических осложнений [70].

Проведенный нами анализ состояния системы гемостаза подтвердил, что содержание РФМК характеризует степень активации системы свертывания крови, а ТАП — потенциал системы фибринолиза. Соотношение этих двух параметров характеризует степень нарушения динамического баланса между основными звеньями системы гемостаза и может быть информативным для прогнозирования развития тромботического осложнения:

$$\text{ИТО} = -\text{РФМК}_n / (\text{ТАП}_д - \text{ТАП}_n),$$

где ИТО — индекс тромботического осложнения; РФМК_n — содержание растворимых фибрин-мономерных комплексов в исследуемой плазме крови пациентов; ТАП_д, ТАП_n — активности тканевого активатора пламиногена соответственно в плазме крови практически здоровых людей (доноров крови) и в исследуемой плазме крови пациентов (МЕ/мл).

В норме ИТО = 0. Чем больше показатель ИТО отличается от нуля, тем больший дисбаланс в системе гемостаза больного. Если ИТО имеет отрицательный знак, это значит, что потенциал системы фибринолиза снижен и в полной мере не выполняет свою функцию. В кровотоке накапливается РФМК, вследствие чего возможно тромбообразование. Если ИТО имеет положительное значение, то это свидетельствует о высоком потенциале фибринолитической системы на фоне гиперактивации системы свертывания крови, что также угрожает тромботическими осложнениями.

Информативность ИТО подтверждается данными анализа системы гемостаза больных инфарктом миокарда. В табл. 5.7 в качестве примера представлены данные расчета ИТО больных после проведения тромболитической терапии и завершения курса антитромботической терапии на 7-е сутки

Таблица 5.7. Индивидуальные показатели ИТО и активности протеина С в плазме крови больных на разных этапах лечения ОИМ

Показатель	Доноры крови (n = 11)	Больной			
		А	Б	В	Г
Индекс тромботических осложнений на 7-е сутки после ОИМ	0	-8	-7,5	1,4	0,7
РФМК, г/л, на 30-е сутки после ОИМ	0	0,12	0,09	0,06	0,03
Протеин С, %, на 30-е сутки после ОИМ	100 ± 5,3	46,2	72,5	86,3	95,5

после инфаркта миокарда (через 24 ч после отмены антитромботической терапии). У двух больных наблюдались высокие значения ИТО по сравнению с нормой (рис. 5.10), что свидетельствует о незавершенности курса лечения и угрозе развития тромботического осложнения.

Дальнейшими наблюдениями за этой группой больных выявлены высокий уровень содержания РФМК и снижение активности протеина С даже на 30-е сутки после инфаркта миокарда. На наш взгляд, это подтверждает информативность ИТО и может использоваться для прогнозирования развития повторных тромботических осложнений. В связи с этим больные с такими показателями системы свертывания крови должны находиться под особым контролем.

Таким образом, показатели ИТО характеризуют степень дисбаланса в системе гемостаза, коррелируют с данными других методов, подтверждают информативность и чувствительность предложенного метода прогнозирования развития ДВС-синдрома. ИТО позволяет своевременно применять антитромботическую терапию и проводить контроль эффективности лечения.

5.7. РАЗРАБОТКА АЛГОРИТМА РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ НАРУШЕНИЙ СОСТОЯНИЯ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА ПОСЛЕ ОПЕРАЦИИ КЕСАРЕВА СЕЧЕНИЯ. КОНТРОЛЬ ЭФФЕКТИВНОСТИ АНТИТРОМБОТИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫМИ ГЕПАРИНАМИ

Исследования последних десятилетий показали, что физиологическое течение беременности сопровождается значительными изменениями в системе гемостаза, увеличивая риск развития тромботических осложнений. Активация прокоагулянтного звена системы гемостаза характерна для нормального протекания беременности. При этом содержание и активность отдельных факторов системы гемостаза изменяются, что принято считать физиологической адаптацией, необходимой для обеспечения целостности гемоциркуляции матери и плода, а также для предупреждения кровотечения в третьем триместре и послеродовом периодах.

Отмечено, что при физиологическом течении беременности в третьем триместре наблюдается повышение уровня таких факторов, как фибрино-

ген, VII, VIII, X; содержание факторов свертывания крови IX и XII увеличивается умеренно [71—73].

Параллельно с повышением содержания фибриногена отмечается относительное снижение активности фактора XIIIa, что, по мнению А.Д. Макадаря, не нарушает его гемостатической функции, но облегчает процесс фибринолиза локальных отложений фибрина [74]. Увеличение содержания факторов прокоагулянтного звена системы свертывания крови сопровождается относительным снижением фибринолитической и антикоагулянтной активности (антитромбин III и протеин C). Кроме того, скорость кровотока в третьем триместре беременности в венах нижних конечностей будущей матери уменьшается. Таким образом, тенденция к стазу крови совместно с гиперкоагуляцией, угнетением фибринолиза и снижением активности физиологических ингибиторов системы свертывания крови даже при нормально протекающей беременности создают условия, содействующие развитию тромбообразования [75, 76].

Определенное место среди факторов риска тромбоэмболических осложнений принадлежит родоразрешению путем операции кесарева сечения (КС). Абдоминальное родоразрешение увеличивает риск возникновения тромбоэмболических осложнений по сравнению с физиологическими родами в 10—15 раз. В общем в структуре материнской смертности тромбоэмболическим заболеваниям принадлежит одно из первых мест и составляет от 5 до 20 % [77, 78]. В связи с этим целесообразными являются изучение особенностей состояния системы гемостаза при абдоминальном родоразрешении, а также разработка информативных методов ранней диагностики и внедрение эффективных методов профилактики тромботических осложнений перед операциями.

В отечественной клинической практике нет единого подхода к лабораторной диагностике тромбофилии. Это подтвердил ретроспективный анализ 57 историй болезни женщин, которые умерли от тромбозов и тромбоэмболий после операции кесарева сечения (КС). Для анализа состояния системы гемостаза этих женщин были использованы такие клинико-лабораторные тесты, как определение содержания фибриногена, время рекальцификации плазмы, протромбиновое время. В некоторых случаях определяли толерантность плазмы к гепарину и общую фибринолитическую активность. Несмотря на тяжелое состояние пациенток, показатели лабораторных тестов были близки к норме. Так, содержание фибриногена, определенное в плазме их крови по методу Рутберг, составляло $3,67 \pm 0,3$ г/л (у 60 % женщин — ниже 2,8 г/л), что не характерно для этого физиологического состояния и не согласуется с литературными данными [77—79].

О недостаточной информативности и низкой чувствительности используемых тестов свидетельствуют результаты теста время рекальцификации плазмы. Анализы показали, что у 62 % женщин показатели отвечали норме, тогда как пациентки находились в предтромботическом состоянии и спустя некоторое время умирали от тромбоэмболических осложнений.

Ретроспективный анализ подтвердил, насколько важна информативность используемых тестов, отражающих специфические особенности нарушений в системе гемостаза, характерных именно для данной патологии. Тесты могут быть основой разработки алгоритма лабораторной диагностики

состояния системы гемостаза. Разработка алгоритма ранней диагностики позволит выявить нарушения в системе гемостаза до проявления клинических признаков тромботических осложнений и даст возможность своевременно провести антитромботическую терапию. Алгоритм диагностики сокращает время верификации диагноза, что важно для своевременной выработки правильной врачебной тактики, а также помогает контролировать эффективность проводимой терапии.

С помощью разработанного нами комплекса лабораторных диагностических тестов обследовано состояние системы гемостаза беременных женщин до и после абдоминального родоразрешения ($n_I = 45$ женщин после абдоминального родоразрешения без тромбопрофилактики, $n_{II} = 23$ — тромбопрофилактика клеваринном, $n_{III} = 12$ — тромбопрофилактика фраксипарином). Низкомолекулярные гепарины (НМГ) назначали в профилактическом режиме: первая инъекция — за 2—4 ч до операции, вторая — через 12 ч после операции, затем инъекции делали один раз в сутки в течение 7—9 дней.

Для анализа системы гемостаза выполняли тесты, приведенные выше (см. с. 229). Как показали результаты наших исследований, еще накануне родоразрешения в системе гемостаза беременных наблюдается выраженное нарушение в виде патологической активации системы свертывания крови: сокращение времени свертывания в тесте АЧТВ, увеличения ПИ и активности фактора X системы свертывания крови. Накапливается маркер тромбинемии — РФМК и истощается антикоагулянтный резерв (АТIII и ПС); фибринолитическая активность крови определенной мерой компенсирует нарушение равновесия между про- и антикоагулянтным звеном системы гемостаза. Тем не менее в общем наблюдается выраженное тромбофилическое состояние (рис. 5.11).

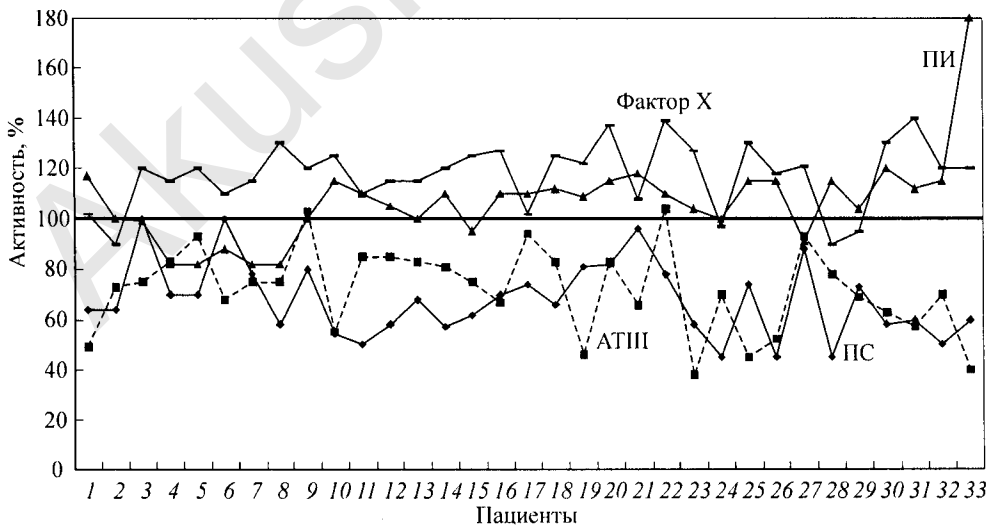


РИС. 5.11. Характеристика потенциала ингибиторов (ПС, АТIII), факторов свертывания крови (X и протромбина (ПИ))

Таблица 5.8. Влияние абдоминального родоразрешения на некоторые показатели системы гемостаза

Показатель гемостаза	Доноры крови	Накануне родоразрешения	После кесарева сечения
Ф, г/л	2,36 ± 0,03	4,59 ± 0,12	5,91 ± 0,28
АЧТВ, с	35,9 ± 0,36	35,3 ± 0,44	32,00 ± 1,98
ПИ, %	100,38 ± 1,10	107,6 ± 2,26	115,2 ± 2,02
ФХ, %	100,5 ± 1,16	119,1 ± 1,84	109,5 ± 3,69
РФМК, г/л	—	0,073 ± 0,004	0,09 ± 0,007
ПРФ, г/л	—	23,6 ± 1,71	20,30 ± 3,67
АТIII, %	99,75 ± 2,13	71,43 ± 2,53	86,70 ± 4,04
ПС, %	100,12 ± 1,33	67,10 ± 2,17	58,25 ± 4,63
ФА, мин	240,0 ± 7,29	218,53 ± 11,70	325,80 ± 7,97

Примечание. ФА — общая фибринолитическая активность.

Родоразрешение путем операции КС углубляет нарушения в прокоагулянтном звене системы гемостаза, выявленные еще до операции (табл. 5.8).

Патологическая активация системы свертывания крови выражена еще в большей степени и сопровождается значительным угнетением фибринолитической активности плазмы крови. Слабая тенденция увеличения активности АТIII, наблюдаемая в послеоперационный период, вероятно не полностью компенсирует дисбаланс между про- и антикоагулянтными звеньями системы гемостаза. Таким образом, по биохимическим тестам такое состояние системы гемостаза можно рассматривать как тромбофилическое.

Интересные данные представлены на рис. 5.11. Они дают возможность оценить степень нарушения баланса между прокоагулянтами (активность фактора X, протромбиновое время) и физиологическими антикоагулянтами (активность АТIII, протеина С).

Напряжение адаптационных механизмов предопределяет нестойкое равновесие между звеньями системы гемостаза — антитромбиновым, фибри-

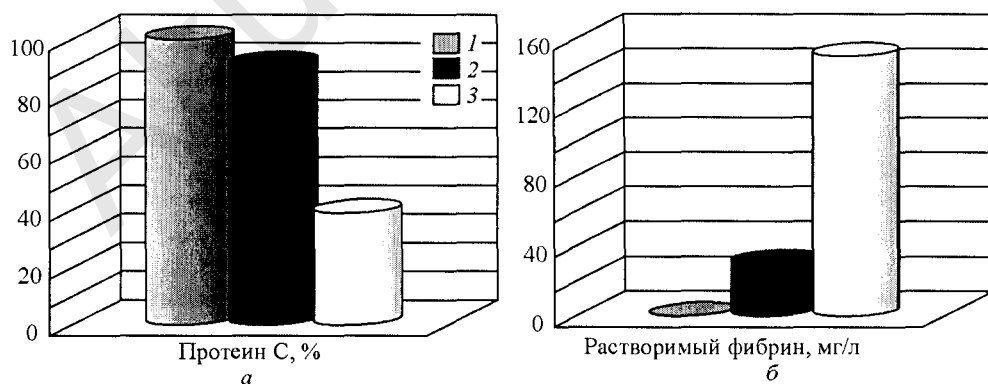


Рис. 5.12. Активность протеина С (а) и содержание растворимого фибрина (б) в плазме крови женщин после кесарева сечения:

1 — норма; 2 — беременные; 3 — женщины после операции кесарева сечения

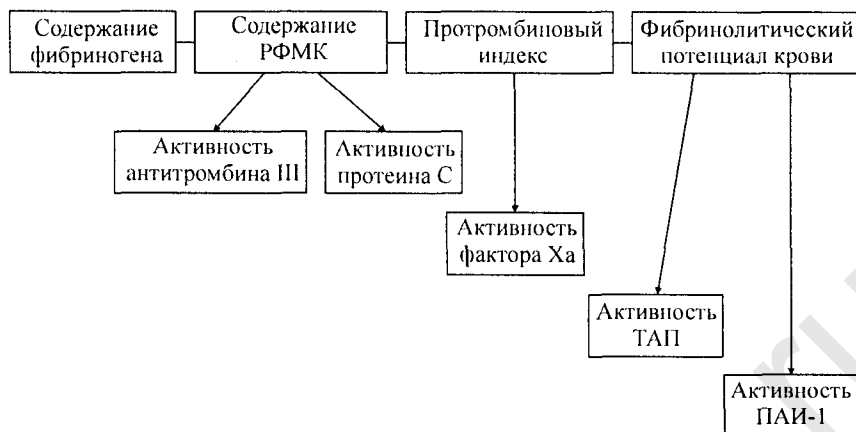


РИС. 5.13. Алгоритм диагностики состояния системы гемостаза женщин при беременности

нолитическим, свертывающим. При определенных условиях (например, гнойно-септические осложнения, патологическая кровопотеря в послеоперационный период) опасность тромбообразования может реализоваться (рис. 5.12).

Таким образом, на основании оценки диагностической и прогностической значимости использованных нами 23 гемостазиологических показателей системы гемостаза женщин до и после КС установлены следующие признаки тромбофилии при беременности: содержание фибриногена $> 5,5$ г/л; маркера тромбинемии — растворимых фибрин-мономерных комплексов $> 0,03$ г/л; фактора X > 115 %; значительное снижение содержания антитромбина III и протеина С < 75 %; увеличение протромбинового индекса > 115 %, снижение суммарной фибринолитической активности (рис. 5.13) [28, 30].

Тесты по определению указанных параметров вошли в алгоритм ранней диагностики тромбофилии в акушерской практике (рис. 5.13). Выявленные нами активация системы свертывания крови и снижение фибринолитического потенциала крови совпадают с данными литературы и подтверждают необходимость поиска методов профилактики тромботических осложнений после операции КС [80]. В связи с этим дальнейшие исследования были посвящены изучению эффективности действия низкомолекулярных гепаринов (НМГ) при коррекции нарушений системы свертывания крови при угрозе развития тромботических осложнений.

Основная область применения НМГ — профилактика венозных тромбозов у ортопедических, хирургических, неврологических и терапевтических больных [81—87].

Механизмы действия нефракционированного и низкомолекулярного гепаринов разные. Первый имеет высокие антитромбиновую (анти-IIIa) и анти-Ха-активности, а НМГ обеспечивают меньшую антикоагулянтную активность при высокой антитромботической (рис. 5.14). Это предопределяет снижение риска возникновения такого осложнения, как кровотечение. НМГ лучше абсорбируются, обладают высокой биодоступностью (свыше 90 %), а их клиренс замедлен и не зависит от введенной дозы. Более продол-

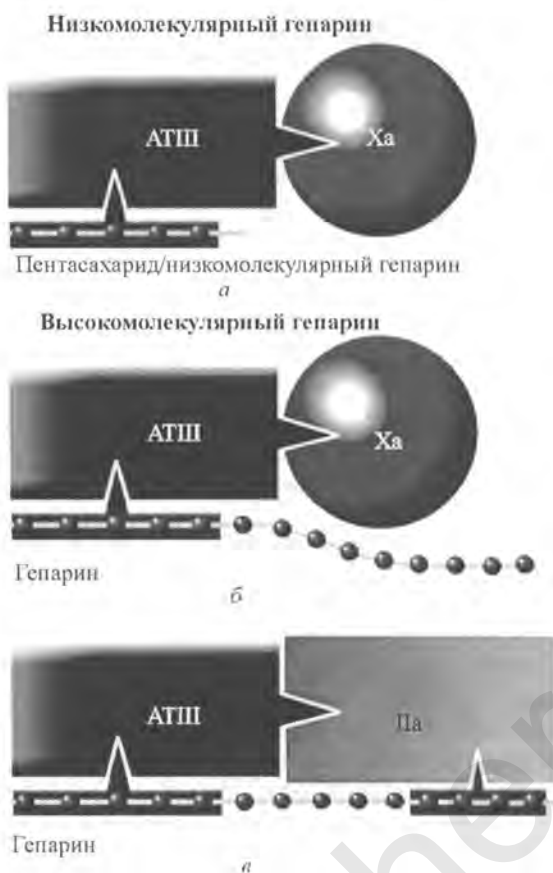


РИС. 5.14. Механизм действия гепарина:
а, б — ингибирование фактора Ха; *в* — ингибирование фактора IIa

высокое содержание фибриногена, сокращение времени свертывания в тесте АЧТВ, повышение ПИ и активности фактора X, накопление РФМК и ПРФ, истощение активности физиологических ингибиторов системы свертывания, угнетение фибринолиза.

Состояние системы гемостаза исследовали до операции КС и в послеоперационный период на 5–7-е сутки профилактической терапии. Контроль лечения проводили по 23 показателям гемостаза. Отобраны 9 наиболее чувствительных и информативных тестов, адекватно характеризующих равновесие между разными звеньями системы гемостаза. Кроме того, определяли 5 клинических показателей состояния крови, а также 4 показателя, характеризующих агрегационные свойства тромбоцитов.

Результаты проведенных нами и компаниями-производителями НМГ исследований подтверждают, что при применении этих препаратов не возникает существенного удлинения как общего времени свертывания крови, так и в тесте АЧТВ. Выявлено удлинение АЧТВ на 14 % в группе клеварина и на 4,5 % — в группе фраксипарина.

жительный период полужизни НМГ в организме больного позволяет уменьшить количество введений и дозу препарата. НМГ менее иммуногенные, вызывают более слабую активацию тромбоцитов; риск возникновения гепарининдуцированной тромбоцитопении и парадоксальных тромбозов ниже, чем при лечении обычным гепарином.

Лечение больных с помощью НМГ не требует частого лабораторного контроля, в частности определения тромбинового времени, активированного частично тромбопластинного времени и /или анти-Ха-активности.

При определении показаний тромбопрофилактики НМГ учтено наличие клинических и гемостазиологических факторов риска тромботических осложнений. Группы беременных женщин были подобраны по наличию клинических и биохимических факторов риска развития тромботических осложнений. Анализ подтвердил

Как свидетельствуют полученные данные, профилактические дозы исследуемых препаратов существенно не влияют на время свертывания крови, но имеют выраженное антитромботическое действие, отличающее НМГ от стандартного гепарина. Низкомолекулярные гепарины снижают ПИ, поскольку преимущественно ингибируют фактор X, вносящий основной вклад в показатели этого теста (табл. 5.9), что подтверждает эффективность профилактической терапии.

Уровень РФМК в результате тромбопрофилактики достоверно снижался по сравнению с его средним значением до операции КС, что обусловлено снижением патологической активации прокоагулянтного звена системы гемостаза и повышением его антитромбинового потенциала. Это, по нашему мнению, является прямым свидетельством эффективности тромбопрофилактики НМГ.

В литературе имеются данные о том, что незначительное снижение уровня АТIII может наблюдаться в случае гепаринотерапии в профилактических дозах. Мы не наблюдали снижения уровня АТIII при профилактической терапии низкомолекулярными гепаринами.

Более того, уровень АТIII повышается как при терапии клеваринном, так и при профилактике, проводимой с применением фраксипарина.

До антитромботической терапии наблюдается значительное снижение в плазме крови активности протеина С, что связано с его потреблением вследствие активации системы свертывания крови. По нашим данным, антитромботическая терапия НМГ снижает активацию системы свертывания и тем самым способствует восстановлению уровня антитромбинового резерва за счет увеличения активности ПС.

Интересно проанализировать фибринолитическую активность плазмы крови после тромбопрофилактики НМГ. Согласно проведенным нами исследованиям, при терапии НМГ наблюдается достоверное сокращение времени лизиса фибринового сгустка в тесте общая фибринолитическая актив-

Таблица 5.9. Состояние системы гемостаза беременных женщин до и после тромбопрофилактики низкомолекулярными гепаринами

Параметр гемостаза	До КС и клеваринотерапии ($n_I = 20$)	После КС и клеваринотерапии ($n_{II} = 23$)	До КС и фраксипаринотерапии ($n_{III} = 12$)	После КС и фраксипаринотерапии ($n_{IV} = 12$)
Ф, г/л	4,60 ± 0,22	6,38 ± 0,37*	4,65 ± 0,20	5,55 ± 0,27**
АЧТВ, с	35,80 ± 0,79	41,83 ± 0,93*	34,42 ± 0,91	37,67 ± 0,67
ПИ, %	108,20 ± 1,69	96,74 ± 2,38*	118,80 ± 5,80	94,75 ± 2,62**
ФХ, %	117,40 ± 3,02	97,40 ± 3,63*	122,60 ± 2,85	100,90 ± 3,39**
РФМК, г/л	0,074 ± 0,01	0,03 ± 0,004*	0,08* ± 0,009	0,02 ± 0,005**
ПРФ, мкг/мл	23,10 ± 3,22	13,20 ± 0,88*	21,60 ± 3,27	8,42 ± 1,93
ПС, %	66,20 ± 3,31	78,9 ± 5,33	63,60 ± 3,88	87,80 ± 4,44**
АТIII, %	72,60 ± 4,01	98,96 ± 3,91*	65,42 ± 3,94	85,92 ± 6,06**

Примечание. Возможное различие между показателями до и после клеваринотерапии (*) и фраксипаринотерапии (**).

ность крови, что указывает на повышение потенциала этого звена системы гемостаза. Так, показатель общей фибринолитической активности до родоразрешения соответствует $218,53 \pm 11,7$ мин (норма — 240 мин), после КС без тромбопрофилактики — $325,80 \pm 7,51$ мин. Профилактическая терапия клеварином приводит к повышению фибринолитического потенциала плазмы крови, что подтверждается сокращением времени лизиса в тесте общая фибринолитическая активность крови — $214,05 \pm 14,83$ мин.

Таким образом, разработанный алгоритм диагностики состояния системы гемостаза оказался информативным и для контроля эффективности антитромботической терапии НМГ. Так, при применении профилактических доз НМГ выявлены такие эффекты: нормализация показателей, характеризующих внутренний и внешний пути свертывания крови (АЧТВ и ПИ); снижение содержания маркеров тромбинемии — РФМК и ПРФ; увеличение и нормализация антитромбинового потенциала крови (АТIII и ПС).

По нашему мнению, интересным феноменом и важным условием восстановления баланса между разными звеньями системы гемостаза после абдоминального родоразрешения является увеличение фибринолитической активности крови в присутствии НМГ, что является залогом благоприятного прохождения послеоперационного периода и профилактики тромботических осложнений.

Таким образом, предложенный алгоритм диагностики нарушений состояния системы гемостаза при проведении операции кесарева сечения позволяет выявлять нарушения в системе гемостаза при беременности и абдоминальном родоразрешении, а также контролировать эффективность тромбопрофилактики низкомолекулярными гепаринами (клеварин, фраксипарин).

SUMMARY

For the last ten years the progress in the process blood coagulation studying is promoting the development of diagnostic and prevention of hemorrhagic diathesis's and thromboses.

Scientists will find theoretical and practical aspects of biochemical mechanisms and processes which are basis in the function of the hemostasis system in the given monograph. Last data according to the function of the basic parts of the hemostasis system, their interaction and mutual regulation, which are a basis of physiology of the biochemical processes directed on the blood maintenance in a liquid condition, are widely submitted.

The most essential data about general proteins, factors of the blood coagulation and fibrinolytic systems, physiological anticoagulants and fibrinolytic system inhibitors are submitted.

In the monograph it is examined the primary hemostasia, the platelets structure and functions, its activation, aggregation and participation in the blood clot formation are submitted.

Clinical physicians will discover for themselves in this book the data concerning processes based a syndrome of the disseminated intravascular blood coagulation. The pathological changes occurring in the hemostasis system at different diseases are widely displayed. Methodical and methodological approaches for duly and qualitative diagnostics of a condition of the hemostasis system, the diagnostics algorithms, the test complexes for analysis screening and more detailed studying of separate parameters of the hemostasis system are shown.

The monograph is designed for biologists, physicians and students.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

К главе 1

1. *Предтеченский В.Е.* Руководство по клиническим лабораторным исследованиям. — 5-е изд. — М.: Медгиз, 1960. — 964 с.
2. *Ruggeri Z.M.* Structure and biosynthesis of von Willebrand factor // *Von Willebrand Factor and Mechanism of Platelet Function* / Ed. by Z.M. Ruggeri. — Berlin, 1998. — P. 33—77.
3. *Luscher T.F., Barton M.H.* Biology of the endothelium // *Clin. Cardiol.* — 1997. — **11**, suppl. 2:II. — P. 3—10.
4. *Шевченко Н.А.* Эндотелий магистральных сосудов млекопитающих и его место в системе тканей // *Арх. анатомии.* — 1967. — **53**, № 12. — С. 3—18.
5. *Хлопин Н.Г.* Специфичность эндотелия, регенеративные возможности и взаимоотношения тканей сосудистой стенки // *Там же.* — 1958. — **35**, № 1. — С. 13—27.
6. *Stoclet J., Troncy E., Muller B. et al.* Molecular mechanisms underlying the role of nitric oxide in the cardiovascular system // *Exp. Opin. Invest. Drugs.* — 1998. — **11**. — P. 1769—1779.
7. *Гомазков О.А.* Эндотелин в кардиологии: молекулярные, физиологические и патологические аспекты // *Кардиология.* — 2001. — № 2. — С. 50—58.
8. *Cines D.B., Pollak E.S., Buck C.A.* Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders // *Blood.* — 1998. — **91**, N 10. — P. 3527—3561.
9. *Grabowski E.F., Jaffe E.A., Weksler B.B.* Prostacyclin production by cultured endothelial cell monolayers exposed to step increases in shear stress // *J. Lab. Clin. Med.* — 1985. — **105**, N 1. — P. 36—43.
10. *Арабидзе Г.Г., Арабидзе Гр.Г.* Гипотензивная терапия // *Кардиология.* — 1997. — № 3. — С. 88—95.
11. *Furchgott R.F., Zawadzki J.V.* The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine // *Nature.* — 1980. — **288**. — P. 373—376.
12. *Haller H.* Endothelial function. General considerations // *Drugs.* — 1997. — **53**, suppl. 1. — P. 1—10.
13. *Wu K.K., Thiagarajan P.* Role of endothelium in thrombosis and hemostasis // *Ann. Rev. Med.* — 1996. — **47**. — P. 315—331.
14. *Smzinger H., Uhn M.R., Neumann I. et al.* The prostacyclin stimulating plasma factor activity improves thromboresistance only if vascular PGI₂-production is intact // *Thromb. Res.* — 1996. — **84**, N 6. — P. 475—480.

15. *Bevilacqua M.P., Nelson R.M.* Selectins // *J. Clin. Invest.* — 1993. — **91**, N 2. — P. 379—387.
16. *Bevilacqua M.P.* Endothelial-leukocyte adhesion molecules // *Annu. Rev. Immunol.* — 1993. — **11**. — P. 767—804.
17. *Staunton D.E., Dustin M.Z., Springer T.A.* Functional cloning of ICAM-2, a cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM // *Nature.* — 1989. — **339**, N 6219. — P. 61—64.
18. *Kishimoto T.K., Larsan R.S., Corbi A.L. et al.* The leukocyte integrins // *Adv. Immun.* — 1989. — **46**. — P. 149—182.
19. *Elices M.J., Osborn L., Takada J. et al.* VCAM-1 on activated integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibrinectin binding site // *Cell.* — 1990. — **60**, N 4. — P. 577—584.
20. *Goto S., Salomon D.R., Ikeda Y. and Ruggeri Z.M.* Characterization of the unique mechanism mediating the shear-dependent binding of soluble von Willebrand factor to platelets // *J. Biol. Chem.* — 1995. — **270**, N 40. — P. 23352—23361.
21. *Asch E., Podack E.* Vitronectin binds to activated human platelets and plays a role in platelet aggregation // *J. Clin. Invest.* — 1990. — **85**. — P. 1372—1378.
22. *Bowditch R.D., Halloran C.E., Aota S. et al.* Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (platelet GPIIb/IIIa) recognizes multiple sites in fibrinectin // *J. Biol. Chem.* — 1991. — **266**, N 34. — P. 23323—23328.
23. *Brittain H.A., Eckman J.R., Swerlick R.A. et al.* Thrombospondin from activated platelets promotes sickle erythrocyte adherence to microvascular endothelium under physiologic flow: a potential role for platelet activation in sickle cell vaso-occlusion // *Blood.* — 1993. — **81**. — P. 2137—2145.
24. *Богачева Н.В., Гарсия Дж.Г., Верин А.Д.* Молекулярные механизмы индуцированной тромбином проницаемости эндотелия // *Биохимия.* — 2002. — **676**, № 1. — С. 88—98.
25. *Dahlback B., Villoutreix B.O.* Regulation of blood coagulation by the protein C anticoagulant pathway // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 2005. — **25**. — P. 1311—1320.
26. *Coleman R.A., Smith W.L., Narumiya S.* Classification of prostanoid receptors: Properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes // *Pharmacol. Rev.* — 1994. — **46**, N 2. — P. 205—229.
27. *Vanhoutte P.M., Scott-Burder T.* The endothelium in health and disease // *Mol. Cell Cardiol.* — 1994. — **21**, N 1. — P. 62—67.
28. *Bokarewa M.I., Morrisey J.H., Tarkowski A.* Tissue factor as a proinflammatory agent // *Arthritis Res.* — 2002. — **4**. — P. 190—195.
29. *Byzova T.V., Plow E.F.* Networking in the hemostatic system // *J. Biol. Chem.* — 1997. — **272**, N 43. — P. 27183—27188.
30. *Davie E.W., Fujikawa K., Kisiel W.* The coagulation cascade: initiation, maintenance and regulation // *Biochemistry.* — 1991. — **30**, N 43. — P. 10363—10370.
31. *Lawson J.H., Mann K.G.* Cooperative activation factor IX by the human extrinsic pathway of blood coagulation // *J. Biol. Chem.* — 1991. — **266**. — P. 11317—11327.
32. *Kalafatis M., Egan J.O., van't Veer C. et al.* The regulation of clotting factors // *Eukaryotic Gene Express.* — 1997. — **7**, N 3. — P. 241—280.
33. *Henri R., Lijnen H.R., Collen D.* Endothelium in haemostasis and thrombosis // *Progr. Cardiovasc. Diseases.* — 1997. — **39**. — P. 343—250.
34. *Gawaz M.P.* Blood platelets: physiology, pathophysiology, membrane receptors, antiplatelet principles and therapy for atherothrombotic disease. — Stuttgart; New York: Thieme, 2001. — 190 p.
35. *Isenberg W.M., Baiton D.F.* Megakaryocyte and Platelet Structure // *Hematology: Basic Principles and Practice.* — 2nd ed., / Ed. by R. Hofmann, E.J. Benz, S.J. Shattil et al. — New York: Churchill Livingstone, 1995. — P. 1516—1524.
36. *Morgenstern E.* Platelets Morphology/Ultrastructure // *Platelets and Their Factors. Handbook of Experimental Pharmacology* / Ed. by Von Bruchhausen et al. — Heidelberg: Springer Verlag, 1997. — P. 27—52.
37. *White J.G.* Anatomy and Structural Organization of the platelet // *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice.* — 2nd ed. / Ed. by R.W. Colman et al. — Philadelphia: Zippincott, 1994. — 1713 e.

38. *Morgenstern E., Bastian D., Dierichs R.* The formation of component granules from different types of secretory organelles in human platelets (dense granules and alpha-granules). A cryofixation-substitution study using serial sections // *Eur. J. Cell Biol.* — 1995. — **68**, N 2. — P. 183—190.
39. *Hartwig J.N., Barkalow K., Azim A., Italiano J.* The elegant platelet: signals controlling actin assembly // *Thromb. and Haemost.* — 1999. — **82**, N 2. — P. 392—398.
40. *Holt J.C., Niewiarowski S.* Biochemistry of α -granule proteins // *Semin. Hematol.* — 1985. — **22**, N 2. — P. 151—163.
41. *Weiler H., Iserman B.H.* Thrombomodulin // *J. Thromb. Haemost.* — 2003. — **1**, N 7. — P. 1515—1524.
42. *Yang Z., von Segesser L., Bauer E. et al.* Different activation of endothelial L-arginine and cyclooxygenase pathway in human internal mammary artery and saphenous vein // *Circ. Rec.* — 1991. — **68**, N 1. — P. 52—60.
43. *Фермилен Ж., Ферстрате М.* Тромбозы. — М.: Медицина, 1986. — 332 с.
44. *Баркаган З.С.* Геморрагические заболевания и синдромы. — М.: Медицина, 1988. — 528 с.
45. *Балуда В.П., Балуда М.В., Деянов И.И., Тепшуков И.К.* Физиология системы гемостаза. — М.: Медицина, 1995. — 244 с.
46. *Панченко Е.П., Добровольский А.Б.* Тромбозы в кардиологии. Механизмы развития и возможности терапии. — М.: Медицина, 1999. — 462 с.
47. *Savage B., Saldivar E., Ruggeri Z.M.* Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor // *Cell.* — 1996. — **84**, N 2. — P. 289—297.
48. *Ruggeri Z.M., Dent J.A., Saldivar E.* Contribution of distinct adhesive interaction to platelet aggregation in flowing blood // *Blood.* — 1999. — **94**. — P. 172—178.
49. *De Groot P.G., Sixma J.J.* Platelet adhesion // *Brit. J. Haematol.* — 1990. — **75**, N 1. — P. 308—312.
50. *Cooney K.A., Ginsburg D., Ruggeri Z.M.* Von Willebrand disease // *Thrombosis and Hemorrhage* / Ed. by J. Loscalo, A. Schafer. — Boston: Brackwell Sci. Publ., 1994. — P. 657—682.
51. *Schafer A.I.* Antiplatelet therapy with glycoprotein IIb/IIIa receptor inhibitors and other novel agents // *Tex. Heart Inst. J.* — 1997. — **24**, N 2. — P. 90—96.
52. *Ruggeri Z.M.* Old concept and new developments in the study of platelet aggregation // *J. Clin. Invest.* — 2000. — **105**, N 6. — P. 699—701.
53. *Paul B.Z.S., Jin J.G., Kunapuli S.P.* Molecular mechanism of thromboxan A_2 -induced platelet aggregation: essential role of P_2T_{AC} and α_{2A} receptors // *J. Biol. Chem.* — **274**. — P. 29108—29111.
54. *Sadler J.E.* Von Willebrand Factor // *Ibid.* — 1991. — **166**, N 34. — P. 22777—22780.
55. *Fowler W.E., Fretto L.J.* Electron microscopy of von Willebrand factor // *Coagulation and Bleeding Disorders. The Role of Factor VIII and von Willebrand Factor* / Ed. by T.S. Zimmerman, Z.M. Ruggeri. — New York: Marcel Dekker, 1989. — P. 181—193.
56. *Arya M., Anvary B., Romo G.M. et al.* Ultralarge multimers of von Willebrand factor from spontaneous high-strength bonds with the platelet glycoprotein Ib-IX complex: studies using optical tweezers // *Blood.* — 2002. — **99**, N 11. — P. 3971—3977.
57. *Ruggeri Z.M.* Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions // *J. Thromb. and Haemost.* — 2003. — **1**, N 7. — P. 1335—1342.
58. *Mazzucato M., Spessoto P., Mazotti A. et al.* Identification of domains responsible for von Willebrand factor type VI collagen interaction mediating platelet adhesion under high flow // *J. Biol. Chem.* — 1999. — **274**, N 5. — P. 3032—3041.
59. *Turitto V.T., Weiss H.J., Zimmerman T.S. et al.* Factor VIII/von Willebrand factor in subendothelium mediates platelet adhesion // *Blood.* — 1985. — **65**. — P. 823—831.
60. *Huizinga E.G., Tsuji S., Romijn R.A.P. et al.* Structures of glycoprotein Iba and its complex with von Willebrand factor A1 domain // *Science.* — 2002. — **297**, N 5584. — P. 1176—1179.
61. *Celikel R., Ruggeri Z.M., Varughese K.I.* Von Willebrand factor conformation and adhesive function is modulated by an internalized water molecule // *Nat. Struct. Biol.* — 2000. — **40**, N 10. — P. 881—884.

62. Sen U., Vasudevan S., Subbarao G. et al. Crystal structure of the von Willebrand factor modulator botrocetin // *Biochemistry*. — 2000. — **40**. — P. 345–352.
63. Xiong J.P., Stehle T., Goodman S.L., Arnaout M.A. Integrins, cations and ligands: making the connection // *J. Thromb. and Haemost.* — 2003. — **1**, N 7. — P. 1642–1654.
64. Poncz M.R., Eisman R., Heidenreich S.M. et al. Structure of platelet membrane glycoprotein Iib. Homology to the alpha subunits of the vitronectin and fibronectin membrane receptors // *J. Biol. Chem.* — 1987. — **262**, N 18. — P. 8476–8482.
65. Savage B., Cattaneo M., Ruggeri Z.M. Mechanism of platelet aggregation // *Curr. Opin. Hematol.* — 2001. — **8**, N 5. — P. 270–276.
66. Tomokiyo K., Kamikubo Y., Hanado T. et al. Von Willebrand factor accelerates platelet adhesion and thrombus formation on a collagen surface in platelet-reduced blood under flow conditions // *Blood*. — 2005. — **105**, N 3. — P. 1078–1084.
67. Ruf A., Froimovic M.M., Patscheke H. Platelet aggregation // *Platelets and their factors. Handbook of experimental pharmacology* / Ed. by von Bruchhausen et al. — Heidelberg: Springer Verlag, 1997. — P. 27–52.
68. Prevost N., Woulfe D., Tognolini M., Brass L.F. Contact-dependent signaling during the late events of platelet activation // *J. Thromb. and Haemost.* — 2003. — **1**, N 7. — P. 1613–1627.
69. Bennett J.S. Platelet-fibrinogen interactions // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* — 2001. — **936**. — P. 340–354.
70. Kroll M.H., Hellums D., McIntire L.V. et al. Platelets and shear stress // *Blood*. — 1996. — **88**, N 5. — P. 1525–1541.
71. Cattaneo M. Inherited platelet-based bleeding disorders // *J. Thromb. and Haemost.* — 2003. — **1**, N 7. — P. 1628–1636.
72. Savage B., Almus-Jacobs F., Ruggeri Z.M. Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow // *Cell*. — 1998. — **94**, N 4. — P. 657–666.
73. Kulkarni S., Dopheide S.M., Yap C.L. et al. A revised model of platelet aggregation // *J. Clin. Invest.* — 2000. — **105**, N 6. — P. 783–791.
74. Falati S., Gross P., Merrill-Skoloff G. et al. Real-time in vivo imaging of platelets, tissue factor and fibrin during arterial thrombus formation in the mouse // *Nat. Med.* — 2002. — **8**. — P. 1175–1180.
75. Davies P.F., Tripathi S.C. Mechanical stress mechanisms and the cell: An endothelial paradigm // *Circ. Res.* **72**, 1993. — N 2. — P. 239–245.
76. Siess W. Platelets Receptors: The Thrombin Receptor // *Platelets and Their Factors. Handbook of Experimental Pharmacology* / Ed. by von Bruchhausen et al. — Heidelberg: Springer Verlag, 1997. — P. 101–106.
77. Sambrano G.R., Weiss E.J., Zheng Y.-W., Coughlin S.R. Role of thrombin signalling in platelets in haemostasis and thrombosis // *Nature*. — 2001. — **413**, N 6851. — P. 26–27.
78. Saelman E.U., Nieuwenhuis H.K., Hese K.M. et al. Platelet-adhesion to collagen type-I through type-VIII under conditions of stasis and flow is mediated by GPIa/Iia (alpha2beta1-integrin) // *Blood*. — 1994b. — **83**, N 5. — P. 1244–1250.
79. Staatz W.D., Rajpara S.M., Wayner E.A. et al. The membrane glycoprotein Ia-Iia (VLA-2) complex mediates the Mg⁺⁺-dependent adhesion of platelets to collagen // *J. Cell Biol.* — 1989. — **108**. — P. 1917–1924.
80. Farndale R.W., Sixma J.J., Barnes M.J., de Groot P.G. The role of collagen in thrombosis and hemostasis // *J. Thromb. and Haemost.* — 2004. — **2**, N 4. — P. 561–573.
81. Jackson S.P., Nesbitt W.S., Kulkarni S. Signalling events underlying thrombus formation // *Ibid.* — 2003. — **1**, N 7. — P. 1602–1612.
82. Asazuma N., Ozaki Y., Saton K. et al. Glycoprotein Ib von Willebrand factor interactions activate tyrosine kinases in human platelets // *Blood*. — 1997. — **90**, N 12. — P. 4789–4798.
83. Suzuki-Inoue K., Ozaki Y., Kainoh M. et al. Rhodocytin induces platelet aggregation by interacting with glycoprotein Ia/IIa (GPIa/IIa, Integrin alpha2beta1): involvement of GPIa/IIa-associated arc and protein tyrosine phosphorylation // *J. Biol. Chem.* — 2001. — **276**, N 2. — P. 1643–1652.

84. *Savage B., Ginsberg M.H., Ruggeri Z.M.* Influence of fibrillar collagen structure on the mechanisms of platelet thrombus formation under flow // *Blood*. — 1999. — **94**. — P. 2704—2715.
85. *Nieswandt B., Brakebusch C., Bergmeir W. et al.* Glycoprotein VI but not alpha2beta1 integrin is essential for platelet interaction with collagen // *EMBO J.* — 2001. — **20**. — P. 2120—2130.
86. *Santoro S.A., Walsh J.J., Staatz W.D., Baranski K.J.* Distinct determinants on collagen support $\alpha_2\beta_1$ integrin-mediated platelet adhesion and platelet activation // *Cell Regulation*. — 1991. — **2**. — P. 905—913.
87. *Arai M., Yamamoto N., Moroi M. et al.* Platelets with 10 % of the normal amount of glycoprotein VI have an impaired response to collagen that results in a mild bleeding tendency // *Brit. J. Hematol.* — 1995. — **89**. — P. 124—130.
88. *Takabashi H., Moroi M.* Antibody against platelet membrane glycoprotein VI in a patient with systemic lupus erythematosus // *Amer J. Hematol.* — 2001. — **67**. — P. 262—267.
89. *Jandrot-Perrus M., Lagrue A.H., Okuma M., Bon C.* Adhesion and activation of human platelets induced by convulxin involved glycoprotein VI and integrin alpha2beta1 // *J. Biol. Chem.* — 1997. — **272**. — P. 27035—27041.
90. *Nieswandt B., Brgmeir W., Schulte V. et al.* Expression in function of the mouse collagen receptor glycoprotein VI is strictly dependent on its association with the FcRgamma chain // *Ibid.* — 2000. — **275**. — P. 23998—24002.
91. *Jarwis G.E., Atkinson B.T., Snell D.C., Watson S.P.* Distinct roles of GPVI and integrin alpha(2)beta(1) in platelet shape change and aggregation induced by different collagens // *Brit. J. Pharmacol.* — 2002. — **137**. — P. 107—117.
92. *Gibbins J.M.* Platelet adhesion signalling and the regulation of thrombus formation // *J. Cell Sci.* — 2004. — **117**. — P. 3417—3425.
93. *Kuijpers M.J.E., Schulte V., Bergmeier W. et al.* Complementary roles of platelet glycoprotein VI and integrin alpha2beta1 in collagen-induced thrombus formation in flowing whole blood ex vivo // *FASEB J.* — 2003. — **17**. — P. U372—U394.
94. *Siljander P.R.M., Munnix I.C.A., Smethurst P.A. et al.* Platelet receptor interplay regulates collagen-induced thrombus formation in flowing human blood // *Blood*. — 2004. — **103**. — P. 1333—1341.
95. *Goto S., Tamura S., Handa S. et al.* Involvement of glycoprotein VI in platelet thrombus formation on both collagen and von Willebrand factor surfaces under flow condition // *Circulation*. — 2002. — **106**. — P. 266—271.
96. *Tandon N.N., Kralisz U., Jamieson G.A.* Identification of glycoprotein IV (CD36) as a primary receptor for platelet-collagen adhesion // *J. Biol. Chem.* — 1988. — **264**. — P. 7576—7583.
97. *Daniel J.L., Dangelmaier C., Strouse R., Smith J.B.* Collagen induces normal signal transduction in platelets deficient in CD36 (platelet glycoprotein IV) // *Thromb. and Haemost.* — 1994. — **71**. — P. 352—256.
98. *Moog S., Mangin P., Lenain N. et al.* Platelet glycoprotein V binds to collagen and participates in platelet adhesion and aggregation // *Blood*. — 2001. — **98**. — P. 1038—1046.
99. *Massberg S., Gawaz M., Gruner S. et al.* A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo // *J. Exp. Med.* — 2003. — **197**. — P. 41—49.
100. *Nieswandt B., Schulte V., Bergmeier W. et al.* Long-term antithrombotic protection by in vivo depletion of platelet glycoprotein VI in mice // *Ibid.* — 2001. — **193**. — P. 459—470.
101. *Schulte V., Rabie T., Probst M. et al.* Targeting of the collagen-binding site on glycoprotein VI is not essential for in vivo depletion of the receptor // *Blood*. — 2003. — **101**. — P. 3948—3952.
102. *Billington C.K., Penn R.B.* Signaling and regulation of G protein-coupled receptors in airway smooth muscle // *Respir. Res.* — 2003. — **4**, N 1. — P. 28.
103. *Nieswandt B., Watson S.P.* Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? // *Blood*. — 2003. — **102**, N 2. — P. 449—461.
104. *Clemetson J.M., Polgar J., Mornenat E. et al.* The platelet receptor glycoprotein VI is a member of the immunoglobulin superfamily closely related to FcR and the natural killer receptors // *J. Biol. Chem.* — 1999. — **274**. — P. 29019—29024.

105. *Coller B.S., Beer J.H., Scudder L.E., Steinberg M.H.* Collagen-platelet interactions: evidence for a direct interaction of collagen with platelet GPIIb/IIIa and an indirect interaction with platelet GPIIb/IIIa mediated by adhesive proteins // *Blood*. — 1989. — **74**, N 1. — P. 182—192.
106. *Barnes M.J., Farndale R.W.* Collagens and atherosclerosis // *Exp. Gerontol.* — 1999. — **34**. — P. 513—525.
107. *Jung S.M., Moroi M.* Platelets interact with soluble and insoluble collagens through characteristically different reactions // *J. Biol. Chem.* — 1998. — **273**. — P. 14827—14837.
108. *Morton L.F., Hargreaves P.G., Farndale R.W. et al.* Integrin alpha2beta1-independent activation of platelets by simple collagen-like peptides: collagen tertiary (triple-helical) and quaternary (polymeric) structures are sufficient alone for alpha2beta1-independent platelet reactivity // *Biochem. J.* — 1995. — **306**. — P. 337—344.
109. *Asazuma N., Marshall S.J., Berlangue O. et al.* The snake venom toxin alboaggregin-A activates glycoprotein Vi // *Blood*. — 2001. — **97**. — P. 3989—3991.
110. *Andrews P.K., Kamiguti A.S., Berlangue O. et al.* The use of snake venom toxins as tools to study platelet receptors for collagen and von Willebrand factor // *Haemost.* — 2001. — **31**. — P. 155—172.
111. *Cattaneo M., Gachet C.* ADP receptors and clinical bleeding disorders // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 1999. — **19**. — P. 2281—2285.
112. *Woulfe D., Yang J., Brass L.* ADP and platelets: the end and the beginning // *J. Clin. Invest.* — 2001. — **107**, N 12. — P. 1503—1505.
113. *Penn R.B., Benovic J.L.* Regulation of G protein-coupled receptors // *Handbook of Physiology* / Ed. by P.M. Conn. — New York: Oxford Univ. Press, 1998. — P. 125—164.
114. *Offermanns S., Simon M.I.* Genetic analysis of mammalian G-protein signalling // *Oncogene*. — 1998. — **17**. — P. 1375—1381.
115. *Brass L.F.* More pieces of the platelet activation puzzle slide into place // *J. Clin. Invest.* — 1999. — **104**, N 12. — P. 1663—1665.
116. *Andre P., Delaney S.M., La Rocca T. et al.* P2Y₁₂ regulates platelet adhesion/activation, thrombus growth and thrombus stability in injured arteries // *Ibid.* — 2003. — **112**, N 3. — P. 398—407.
117. *Dorsam R.T., Kunapuli S.P.* Central role of the P2Y₁₂ receptor in platelet activation // *Ibid.* — 2004. — **113**, N 3. — P. 340—345.
118. *Vu T.K.H., Hung D.T., Wheaton V.I. et al.* Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation // *Cell*. — 1991. — **64**. — P. 1057—1068.
119. *Brass L.F.* Thrombin and platelet activation // *CHEST*. — 2003. — **124**, N 3. — P. 18—25.
120. *Ishihara H., Connolly A.J., Zehn D. et al.* Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans // *Nature*. — 1997. — **386**. — P. 502—506.
121. *Molino M., Baiton D.F., Hoxie J.A. et al.* Thrombin receptors on human platelets // *J. Biol. Chem.* — 1997. — **272**, N 9. — P. 6011—6017.
122. *Nakanishi-Matsui M., Zheng Y.W., Sulciner D.J. et al.* PAR3 is a cofactor for PAR4 activation by thrombin // *Nature*. — 2000. — **404**. — P. 609—613.
123. *Kahn M.L., Nakanishi-Matsui M., Shapiro M.J. et al.* Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin // *J. Clin. Invest.* — 1999. — **103**, N 6. — P. 879—887.
124. *Ruoslanti E.* Integrins // *Ibid.* — 1991. — **87**, N 1. — P. 1—5.
125. *Van der Flier A., Sonnenberg A.* Function and interactions of integrins // *Cell and Tissue Res.* — 2001. — **305**. — P. 285—298.
126. *Plow E.F., Haas T.A., Zhang L. et al.* Ligand binding to integrins // *J. Biol. Chem.* — 2000. — **275**. — P. 21785—21788.
127. *McDowall A., Inwald D., Leitinger B. et al.* A novel form of integrin dysfunction involving beta1, beta2, and beta3 integrins // *J. Clin. Invest.* — 2003. — **111**, N 1. — P. 51—60.
128. *Lanza F., Stierle A., Fournier D. et al.* A new variant of Glanzmann's thrombasthenia (Strasbourg I). Platelets with functionally defective glycoprotein IIb-IIIa complexes and a glycoprotein IIIa 214Arg—214Trp mutation // *Ibid.* — 1992. — **89**, N 6. — P. 1995—2004.

129. *Arnaout M.A.* Integrin structure: new twists and turn in dynamic cell adhesion // *Immunol. Rev.* — 2002. — **186**. — P. 125–140.
130. *Springer T.A.* Adhesion receptors of the immune system // *Nature*. — 1990. — **346**. — P. 425–434.
131. *McEver R.P., Cummings R.D.* Perspectives series: Cell. adhesion in vascular biology. Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment // *J. Clin. Invest.* — 1997. — **100**, N 3. — P. 485–491.
132. *Yamada K.M., Geiger B.* Molecular interactions in cell adhesion complexes // *Curr. Opin. Cell Biol.* — 1997. — **9**, N 1. — P. 76–85.
133. *Hantgan R.R., Paumi C., Rocco M., Weisel J.W.* Effects of ligand-mimetic peptides Arg-Gly-Asp-X (X-Phe, Trp, Ser) on alphaIIbeta3 integrin conformation and oligomerization // *Biochemistry*. — 1999. — **38**. — P. 14461–14474.
134. *Santoro S.A., Zutter M.M.* The $\alpha_2\beta_1$ integrin: A collagen receptor on platelets and other cells // *Thromb. and Haemost.* — 1995. — **74**, N 3. — P. 813–821.
135. *McLane M.A., Marcinkiewicz C., Vijay S. et al.* Viper venom disintegrins and related molecules // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* — 1998. — **219**. — P. 109–191.
136. *Harris E.S., Shigeoka A.O., Zi W. et al.* A novel syndrome of variant leukocyte adhesion deficiency involving defects in adhesion mediated by β_1 and β_2 integrins // *Blood*. — 2001. — **97**. — P. 767–776.
137. *Denda S., Reichardt L.F., Müller U.* Identification of osteopontin as a novel ligand for the integrin $\alpha_8\beta_1$ and potential roles for this integrin–ligand interaction in kidney morphogenesis // *Mol. Biol. Cell.* — 1998. — **9**, N 6. — P. 1425–1435.
138. *Stewart M., Hogg N.* Regulation of leukocyte integrin functions: affinity vs. avidity // *J. Cell. Biochem.* — 1996. — **61**. — P. 554–561.
139. *Lofthus J.C., Smith J.W., Ginsberg M.H.* Integrin-mediated cell adhesion: the extracellular face // *J. Biol. Chem.* — 1994. — **269**. — P. 25235–25238.
140. *Isberg R.R., Leong J.M.* Multiple β_1 chain integrins are receptors for invasion, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells // *Cell*. — 1990. — **60**. — P. 861–871.
141. *Mercurius K.O., Morla A.O.* Cell adhesion and signaling on the fibronectin 1st type III repeat; requisite roles for cell surface proteoglycans and integrins // *Cell. Biol.* — 2001. — **2**. — P. 18.
142. *Ruoslanti E., Giancotti F.G.* Integrins and tumor cell dissemination // *Cancer Cells*. — 1989. — **1**, N 1. — P. 119–126.
143. *Liddington R.C., Ginsberg M.H.* Integrin activation takes shape // *J. Cell. Biol.* — 2002. — **158**, N 5. — P. 833–839.
144. *Neri D., Montigiani S., Kirham P.M.* Biophysical methods for the determination of antigen-antibody affinities // *Trends Biotechnol.* — 1996. — **14**, N 12. — P. 465–470.
145. *Schwartz M.A., Schaller M.D., Ginsberg M.H.* Integrins: Emerging paradigms of signal transduction // *Annu. Rev. Cell. Biol.* — 1995. — **11**. — P. 549–599.
146. *Peerschke E.I.* Regulation of platelet aggregation by post-fibrinogen binding events // *Thromb. and Haemost.* — 1995. — **73**, N 5. — P. 862–867.
147. *Frojmovic M., Wong T., van de Ven T.* Dynamic measurements of the platelet membrane glycoprotein II_b-III_a receptor for fibrinogen by flow cytometry. I. Methodology, theory and results for two distinct activators // *Biophys. J.* — 1991. — **59**, N 4. — P. 815–827.
148. *Peerschke E.I.* Stabilization of platelet-fibrinogen interactions is an integral property of the glycoprotein IIb-IIIa complex // *J. Lab. Clin. Med.* — 1994. — **124**. — P. 439–446.
149. *Müller B., Zerwes H.-G., Tangemann K. et al.* Two-step binding mechanism of fibrinogen to $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin reconstituted into planar lipid bilayers // *J. Biol. Chem.* — 1993. — **268**, N 9. — P. 6800–6808.
150. *Simmons S.R., Albrecht R.M.* Self-association of bound fibrinogen on platelet surfaces // *J. Lab. Clin. Med.* — 1996. — **128**, N 1. — P. 39–50.
151. *Peerschke E.I.* Bound fibrinogen distribution on stimulated platelets. Examination by confocal scanning laser microscopy // *Amer. J. Pathol.* — 1995. — **14**, N 3. — P. 678–687.
152. *Kucik D.F., Dustin M.L., Miller J.M., Brown E.J.* Adhesion-activating phorbol ester increases the mobility of leukocyte integrin LFA-1 in cultured lymphocytes // *J. Clin. Invest.* — 1996. — **97**, N 9. — P. 2139–2144.

153. *Sims P.J., Ginsberg M.H., Plow E.F., Shattil S.J.* Effect of platelet activation on the conformation of the plasma membrane glycoprotein IIb-IIIa complex // *J. Biol. Chem.* — 1991. — **266**, N 12. — P. 7345—7352.
154. *Fox J., Shattil S.J., Kinlough-Rathbone R. et al.* The platelet cytoskeleton stabilizes the interaction between $\alpha_{IIb}\beta_3$ and its ligand and induces selective movements of ligand-occupied integrin // *Ibid.* — 1996. — **271**, N 2. — P. 7004—7011.
155. *Ugarova T.P., Budzynski A.Z., Shattil S.J. et al.* Conformational changes in fibrinogen elicited by its interaction with platelet membrane glycoprotein GPIIb-IIIa // *Ibid.* — 1993. — **268**, N 28. — P. 21080—21087.
156. *Savage B., Bottini E., Ruggeri Z.M.* Interaction of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ with multiple fibrinogen domains during platelet adhesion // *Ibid.* — 1995. — **270**, N 48. — P. 28812—28817.
157. *Marcus A.J., Broekman M.J., Drosopoulos J.H.F. et al.* The endothelial cell ecto-ADPase responsible for inhibition of platelet function is CD39 // *J. Clin. Invest.* — 1997. — **99**, N 6. — P. 1351—1360.
158. *Chen Y.-P., O'Toole T.E., Leong L. et al.* β_3 integrin-mediated fibrin clot retraction by nucleated cells: Differing behavior of $\alpha_{IIb}\beta_3$ and $\alpha_v\beta_3$ // *Blood.* — 1995. — **86**, N 7. — P. 2606—2615.
159. *Shattil S. J., Kashiwagi H., Pampori N.* Signaling: The Platelet Paradigm // *Ibid.* — 1998. — **91**, N 8. — P. 2645—2657.
160. *Teng C.-M., Ko F.-N.* Comparison of the platelet aggregation induced by three thrombin-like enzymes of snake venoms and thrombin // *Thromb. and Haemost.* — 1988. — **59**. — P. 304—309.
161. *Mounier C., Vargaftig B.B., Franken P.A. et al.* Platelet secretory phospholipase A_2 fails to induce rabbit platelet activation and to release arachidonic acid in contrast with venom phospholipase A_2 // *Biochim. et biophys. acta.* — 1994. — **1214**, N 1. — P. 88—96.
162. *Teng C.M., Chen Y.H., Ouyang C.* Biphasic effect on platelet aggregation by phospholipase purified from *Vipera russellii* snake venom // *Ibid.* — 1984. — **772**. — P. 393—402.
163. *Kini R.M., Evans H.J.* Effects of snake venom proteins on blood platelets // *Toxicon.* — 1990. — **28**. — P. 1387—1422.
164. *Ouyang C., Huang T.F.* A potent platelet aggregation inducer from *Trimeresurus gramineus* snake venom // *Biochim. and Biophys. acta.* — 1983. — **761**. — P. 126—134.
165. *Teng C.M., Hung M.L., Huang T.F. et al.* Triwaglerin: A potent platelet aggregation inducer purified from *Trimeresurus wagleri* snake venom // *Ibid.* — 1989. — **992**. — P. 258—264.
166. *Teng C.M., Ko F.N., Tsai I.H. et al.* Trimucytin: A collagen-like aggregating inducer isolated from *Trimeresurus mucrosquamatus* snake venom // *Thromb. and Haemost.* — 1993. — **69**. — P. 286—292.
167. *Huang T.F., Liu C.Z., Yang S.H.* Aggretin, a novel platelet-aggregation inducer from snake (*Calloselasma rhodostoma*) venom, activates phospholipase C by acting as a glycoprotein Ia/IIa agonist // *Biochem. J.* — 1995. — **309**. — P. 1021—1027.
168. *Markland F.S.* Snake venoms and hemostasis system // *Toxicon.* — 1998. — **36**, N 12. — P. 1749—1800.
169. *Scarborough R.M., Rose J.W., Naughton M.A. et al.* Characterization of the integrin specificities of disintegrins isolated from American pit viper venoms // *J. Biol. Chem.* — 1993. — **268**, N 2. — P. 1058—1065.
170. *Jacobson M.A., Forma F.M., Buenaga R.F. et al.* Expression and secretion of biologically active echistatin in *Saccharomyces cerevisiae* // *Gene.* — 1989. — **85**, N 2. — P. 511—516.
171. *Willis T.W., Tu A.T., Miller C.W.* Thrombolysis with a snake venom protease in a rat model of venous thrombosis // *Thromb. Res.* — **53**, N 1. — P. 19—29.
172. *Ohman E.M., Kleiman N.S., Gacoch G. et al.* Combined accelerated tissue-plasminogen activator and platelet glycoprotein IIb/IIIa integrin receptor blockade with Integrilin in acute myocardial infarction. Results of a randomized, placebo-controlled, dose-ranging trial // *Circulation.* — 1997. — **95**, N 4. — P. 846—854.
173. *Bell W.R.* Defibrinogenating enzymes // *Hemostasis and Thrombosis* Ed. by R.W. Colman, J. Hirsh. — Philadelphia: Zippincott, 1990. — P. 886—900.

174. Lu X., Rahman S., Deadman J.J. et al. Natural integrin antagonists from snake venoms: Ligand-specific inhibitors // *Blood Coagul. and Fibrinolysis*. — 1993. — 4. — P. 361–362.

175. Ohman E.M., Kleiman N.S., Gaglio G. et al. Combined accelerated tissue-plasminogen activator and platelet glycoprotein IIb/IIIa integrin receptor blockade with Integrilin in acute myocardial infarction. Results of a randomized, placebo-controlled, dose-ranging trial // *Circulation*. — 1997. — 95. — P. 846–854.

К главе 2

1. Davie E.W., Fujikawa K., Kistiel W. The coagulation cascade: initiation, maintenance and regulation // *Biochemistry*. — 1991. — 30, N 43. — P. 10363–10370.

2. Зубаиров Д.М. Молекулярные основы свертывания крови и тромбообразования. — Казань: ФЭН, 2000. — 367 с.

3. McClure D.B., Walls J.B., Grinell B.W. Post-translational processing events in the secretion pathway of human protein C, a complex vitamin K-dependent antithrombotic factor // *J. Biol. Chem.* — 1993. — 267, N 27. — P. 19710–19717.

4. Hill M.J. Intestinal flora and endogenous vitamin synthesis // *Eur. J. Cancer. Prev.* — 1997. — Suppl., — N 1. — P. 43–45.

5. Rosendaal F.R., Cannegieter S.C., van der Meer F. J. M., Brief E. A method to determine the optimal intensity of oral anticoagulant therapy // *Thromb. and Haemost.* — 1993. — 69, N 3 — P. 236–239.

6. Marris D.P., Saute B.A.M., Vermeer C., Staffard D.W. Characterization of the purified vitamin K-dependent gamma-glutamyl carboxylase // *J. Biol. Chem.* — 1993. — 268, N 12. — P. 8735–8742.

7. Morrissey J.H., Macik B.G., Neunswander P.F., Comp P.C. Quantitation of activated factor VII levels in plasma using a tissue factor mutant selectively deficient in promoting factor VII activation // *Blood*. — 1993. — 81. — P. 734–744.

8. Lawson J.H., Butenas S., Mann K.G. Complex-dependent inhibition of factor VIIa by antithrombin III and heparin // *J. Biol. Chem.* — 1993. — 268. — P. 11317–11327.

9. Tuddenham E.G., Pemberton S., Cooper D.N. Inherited factor VII deficiency genetic and molecular pathology // *Thromb. and Haemost.* — 1995. — 74, N 1. — P. 312–321.

10. Lawson J.H., Kalafatis M., Stram S., Mann K.G. A model for the tissue factor pathway to thrombin. 1. An empirical study // *J. Biol. Chem.* — 1993. — 269. — P. 23357–23366.

11. Carmeliet P., Collen D. Tissue factor // *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* — 1998. — 30, N 6. — P. 661–667.

12. Bach R., Konigsberg W., Nemerson Y. Human tissue factor contains thioester-linked palmitate and stearate on the cytoplasmic half-cysteine // *Biochemistry*. — 1988. — 27. — P. 4227–4231.

13. Mackman N., Morrissey J.H., Fowler B., Edgington T.S. Complete sequence of the human tissue factor gene, a highly regulated cellular receptor that initiates the coagulation protease cascade // *Ibid.* — 1989. — 28. — P. 1755–1762.

14. Cheung W.F., Hamaguchi N., Smith K.J., Stafford D.W. The binding of human factor IX to endothelial cells is mediated by residues 3–11 // *J. Biol. Chem.* — 1992. — 276, N 29. — P. 20529–20531.

15. Griffith M.J., Breitkreutz L., Trapp H., Briet E. et al. Characterization of the clotting activities of structurally different forms of activated factor IX // *J. Clin. Invest.* — 1985. — 75. — P. 4–10.

16. Braunstein K.M., Noyes C.M., Lundblad R.L., Roberts H.R. Characterization of the defect in activation of factor IX Chapel Hill by human factor XIa // *Ibid.* — 1981. — 68. — P. 1420–1426.

17. Giannelly F., Green S.S., Sommer S.S., Poon V.C. et al. Haemophilia B (sixth edition): database of point mutations and short additions and deletions // *Nucl. Acids Res.* — 1996. — 24, N 1. — P. 103–118.

18. Kalafatis M., Egan J.O., van't Veer C., Cawthorn K.M., Mann K.G. The regulation of clotting factors // *Clin. Rev. Eukaryotic Gene Exp.* — 1997. — 7, N 3. — P. 241–280.

19. Miao C.H., Leytus Y., Chung D.W., Davie E.W. Liver-specific expression of the gene coding for human factor X, a blood coagulation factor // *J. Biol. Chem.* — 1992. — **267**, N 11. — P. 7395—7401.
20. Baugh R.J., Krishnaswamy S. Role of the activation peptide domain in human factor X activation by the extrinsic Xase complex // *Ibid.* — 1996. — **271**, N 27. — P. 16126—16134.
21. Scandura J.M., Walsh P.N. Factor X bound to the surface of activated human platelets is preferentially activated by platelet-bound factor IXa // *Biochemistry.* — 1996. — **35**, N 27. — P. 8903—8913.
22. Williams R., Eshouf P., Lawrence H., Cederholm-Williams S.A. The similarities and differences in structures of kringle 1 of prothrombin and kringle 4 of plasminogen // *FEBS Lett.* — 1986. — **209**, N 1. — P. 111—116.
23. Tulinsky A., Park H., Boryeu M., Zlinas M. Lysine/fibrin binding sites of kringles modeled after the structure of kringle 1 of prothrombin // *Proteins.* — 1988. — **3**, N 2. — P. 85—96.
24. Sariano-Garcia M.W., Padmanabhan K., de Vas A.M., Tulinsky A. The Ca²⁺ ion and membrane binding structure of the Gla domain of Ca-prothrombin fragment // *Biochemistry.* — 1992. — **31**, N 9. — P. 2554—2566.
25. Evans T.C.Jr., Nelsestuen G.L. Importance of cys-proline 22 in the membrane binding conformation of bovine prothrombin // *Ibid.* — 1996. — **35**, N 25. — P. 8210—8215.
26. McDonald J.F., Evans T.C.Jr., Emergwalli D.B. et al. Ionic properties of membrane association by vitamin K-dependent proteins: the case for univalency // *Ibid.* — 1997. — **36**, N 50. — P. 15589—15598.
27. Wu J.R., Zhou C., Majumber R. et al. Role of procoagulant lipids in human prothrombin activation. I. Prothrombin activation by factor IIa in the absence of factor V(a) and in the absence and presence of membranes // *Ibid.* — 2002. — **51**, N 3. — P. 935—949.
28. Krishnaswamy S. Walker Contribution of the prothrombin fragment 2 domain to the function of factor Va in the prothrombinase complex // *Ibid.* — 1997. — **36**, N 11. — P. 3319—3330.
29. Тимербаев В.Н., Зубаиров Д.М., Куселев С.В. и др. Взаимодействие фрагмента I протромбина, претромбина I и α -тромбина человека с тканевым тромбопластином // *Биохимия.* — 1992. — **57**, № 1. — С. 77—90.
30. Dahlback B., Viloutreix B.O. Regulation of blood coagulation by the protein C anticoagulant pathway. Novel insights into structure-function relationships and molecular recognition // *Arter. Thromb. Vasc. Biol.* — 2005. — **25**. — P. 1311—1320.
31. Hogg P.J., Ohlin A.K., Srebfljo J. Identification of structural domain protein C involved in its interaction with thrombin-thrombomodulin on the surface of endothelial cells // *J. Biol. Chem.* — 1992. — **267**, N 2. — P. 703—706.
32. Comp P.C., Jacocks R.M., Ferrell G.L., Esmon C.T. Activation of protein C *in vivo* // *J. Clin. Invest.* — 1982. — **70**, N 1. — P. 127—134.
33. Веремеенко К.Н., Кизим А.И., Досенко В.Е. α_2 макроглобулин: структура, физиологическая роль и клиническое значение // *Лаб. диагностика.* — 2000. — № 2. — С. 3—8.
34. *Hematology: Basic Principles and Practice.* — 2nd ed. / R. Hoffman, E.J. Benz, S.J. Shatti et al. — New York: Churchill Livingstone, 1995. — 2369 p.
35. Dahlback B. Resistance to activated protein C as risk factor for thrombosis: molecular mechanisms, laboratory investigation, and clinical management // *Semin. Hematol.* — 1997. — **34**, N 3. — P. 217—234.
36. Jansson J.H., Boman K., Brannstrom M., Nilson T.K. High concentration of thrombomodulin in plasma is associated with hemorrhage: a prospective study in patients receiving long-term anticoagulant treatment // *Circulation.* — 1997. — **96**, N 9. — P. 2938—2943.
37. Mussolino C., Alonci A., Allegra A. et al. Increased levels of the soluble adhesion molecule E-selectin in patients with chronic myeloproliferative disorders and thromboembolic complications // *Amer. J. Hematol.* — 1998. — **57**, N 2. — P. 109—112.
38. Ye J., Liu L.W., Esmon C.T., Johnson A.E. The fifth and sixth growth factor-like domains of thrombomodulin bind to the anion-binding exosite of thrombin and alter its specificity // *J. Biol. Chem.* — 1992. — **267**, N 16. — P. 11023—11028.

39. *Schwalbe R.A., Ryan L., Stern D.M. et al.* Protein structural requirements and properties of membrane binding by γ -carboxyglutamic acid-containing plasma proteins and peptides // *Ibid.* — 1989. — **264**, N 34. — P. 20288—20296.
40. *Lu D., Xie R.L., Rydzewsky A., Long G.L.* The effect of N-linked glycosylation on molecular weight, thrombin cleavage, and functional activity of human protein S // *Thromb. and Haemost.* — 1997. — **77**, N 6. — P. 1156—1163.
41. *Borgel D., Gandrile S., Aiach M.* Protein S deficiency // *Ibid.* — 1997. — **78**, N 1. — P. 351—356.
42. *Nelson R.M., Long G.L.* The binding of protein S to C4b-binding protein: mutagenesis of protein S // *J. Biol. Chem.* — 1992. — **267**, N 12. — P. 8140—8145.
43. *Zoller B., Berntsdotter A., Garcia de Frutos P., Dahlback B.* Resistance to activated protein C as additional genetic risk factor in hereditary deficiency of protein S // *Blood.* — 1995. — **85**, N 12. — P. 3518—3523.
44. *Colman R.W., Schmaier A.* Contact system: a vascular biology modulator with anticoagulant, profibrinolytic, antiadhesive, and proinflammatory attributes // *Ibid.* — 1997. — **90**, N 10. — P. 3819—3843.
45. *Page J.D., You J.L., Harris R.B., Colman R.W.* Localization of the binding site on plasma kallikrein for high molecular weight kininogen to both apple 1 and 4 domains of the heavy chain // *Arch. Biochem. and Biophys.* — 1994. — **314**. — P. 154—160.
46. *Яровая Г.А., Блохина Т.Б., Нешкова Е.А.* Контактная система. Новые представления о механизмах активации и биорегулирующих функциях // *Биохимия.* — 2002. — **67**, № 1. — С. 16—29.
47. *Weisel J.W., Nagaswami C., Woodhead J.L. et al.* The shape of high molecular weight kininogen. Organization into structural domains, changes with activation, and interactions with prekallikrein, as determined by electron microscopy // *J. Biol. Chem.* — 1994. — **269**, N 13. — P. 10100—10106.
48. *Hasan A.A., Cines D.B., Ngaiza J.R. et al.* High-molecular-weight kininogen is exclusively membrane bound on endothelial cells to influence activation of vascular endothelium // *Blood.* — 1995. — **85**, N 11. — P. 3134—3143.
49. *Tankersley D.L., Finlayson J.S.* Kinetics of activation and autoactivation of human factor XII // *Biochemistry.* — 1984. — **23**, N 2. — P. 273—279.
50. *Schmaier A.H.* Contact activation: a revision // *Thromb. Haemost.* — 1997. — **87**, N 1. — P. 101—107.
51. *Gailani D., Broze G.J.* Factor XI activation in a revised model of blood coagulation // *Science.* — 1991. — **253**. — P. 909—912.
52. *Castaman G., Ruggeri M., Rodeghiero F.* Clinical usefulness of desmopressin for prevention of surgical bleeding in patients with symptomatic heterozygous factor XI deficiency // *Brit. J. Haematol.* — 1996. — **94**, N 1. — P. 168—170.
53. *Suzuki K., Dahlback B., Stenflo J.* Thrombin-catalyzed activation of human coagulation factor V // *J. Biol. Chem.* — 1982. — **257**. — P. 6556—6564.
54. *Nesheim M.E., Foster W.B., Hewick R., Mann K.G.* Characterization of factor V activation intermediates // *Ibid.* — 1984. — **259**. — P. 3187—3196.
55. *Vehar G., Keyt B., Eaton D. et al.* Structure of human factor VIII // *Nature.* — 1984. — **312**. — P. 337—342.
56. *McMullen B.A., Fujikawa K., Davie E.W. et al.* Localization of disulfide bonds and free cysteines in the heavy and light chains of recombinant factor VIII (anti-hemophilic factor A) // *Protein Sci.* — 1995. — N 4. — P. 740—746.
57. *Fay P.J., Smudzin T.M.* Human factor VIIa subunit structure. Reconstitution of factor VIIa from the isolated A1/A3-C1-C2 dimer and A2 subunit // *J. Biol. Chem.* — 1991. — **266**. — P. 8957—8962.
58. *Lentz S.R., Sadler J.E.* Homocysteine inhibits von Willebrand factor processing and secretion by preventing transport from endoplasmic reticulum // *Blood.* — 1993. — **81**, N 3. — P. 683—689.
59. *Blombäck B.* Fibrinogen and fibrin — proteins with complex roles in haemostasis and thrombosis // *Thromb. Res.* — 1996. — **83**, N 1. — P. 1—75.

60. Watt K.W.K., Cottrell B.A., Strong D.D., Doolittle R.F. Aminoacid sequence studies on the α -chain of human fibrinogen. Overlapping sequences providing the complete sequence // *Biochemistry*. — 1979. — **18**, N 24. — P. 5410—5416.
61. Watt K.W.K., Takagi T., Doolittle R.F. Aminoacid sequence of the β -chain of human fibrinogen: homology with γ -chain // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. — 1978. — **75**, N 4. — P. 1731—1735.
62. Zhang J.-Z., Redman C.M. Role of interchain disulfide bonds on the assembly and secretion of human fibrinogen. // *J. Biol. Chem.* — 1994. — **269**, N 2. — P. 652—658.
63. Huang S., Cao Z., Davie E.W. The role of amino-terminal disulfide bonds in the structure and assembly of human fibrinogen // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* — 1993. — **190**, N 2. — P. 488—495.
64. Doolittle R.F., Goldbarm D.M., Doolittle L.R. Designation of sequences involved in the "coiled-coil" interdomain connections in fibrinogen: construction of an atomic scale model // *J. Mol. Biol.* — 1978. — **120**, N 2. — P. 311—325.
65. Медведь Л.В., Туктопуло Е.И., Привалов П.Л., Варейская Т.В. Микрокалориметрические исследования температурных переходов в фибриногене и его протеолитических фрагментах // *Молекуляр. биология*. — 1980. — **14**, № 6. — С. 835—842.
66. Bachman L., Schnitt-Fumlan W.W., Hammel R., Lederer K. Size and shape of fibrinogen. I. Electron microscopy of the hydrated molecule // *Macromol. Chem.* — 1975. — **176**. — P. 2603—2618.
67. Lederer K. The shape of the fibrinogen molecule: sausage or banane? // *Thromb. and Haemost.* — 1979. — **41**, N 4. — P. 641—647.
68. Litvinovich S.V., Henschen A., Kreglstein K.G. et al. Structural and functional characterization of proteolytic fragments derived from C-terminal region of bovine fibrinogen // *Eur. J. Biochem.* — 1995. — **229**, N 2. — P. 609—615.
69. Medved L.V., Gorkun O.V., Privalov P.L. Structural organization of C-terminal part of fibrinogen A α -chain // *FEBS Lett.* — 1983. — **160**, N 2. — P. 291—295.
70. Gorkun O.V., Veklich Y.I., Medved L.V. et al. Role of the α C-domains of fibrin in clot formation // *Biochemistry*. — 1994. — **33**, N 22. — P. 6986—6997.
71. Veklich Y.I., Gorkun D.V., Medved L.V. et al. Carboxyl terminal portions of the α -chains of fibrinogen and fibrin. Localization by electron microscopy and the effects of isolated α C fragments on polymerization // *J. Biol. Chem.* — 1993. — **268**, N 18. — P. 13577—13585.
72. Medved L.V. Relationship between exons and domains in the fibrinogen molecule // *Blood Coagul. and Fibrinolysis*. — 1990. — **1**. — P. 439—442.
73. Weisel J.W., Veklich Y.I., Gorkun O. The sequence of cleavage of fibrinopeptides from fibrinogen is important for protofibril formation and enhancement of lateral aggregation of fibrin clots // *J. Mol. Biol.* — 1993. — **232**, N 1. — P. 285—292.
74. Nieuwenhuizen W., Havercate F. Calcium-binding region in fibrinogen // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* — 1983. — **408**. — P. 92—96.
75. Carr M.E., Powers P.L. Differential effects of divalent cations on fibrin structure // *Blood Coagul. and Fibrinolysis*. — 1991. — **2**. — P. 741—747.
76. Ferry J.D. Polymerization of fibrinogen // *Physiol. Rev.* — 1954. — **34**, N 4. — P. 753—760.
77. Mosesson M.W. Fibrinogen and fibrin polymerization: appraisal of the binding events that accompany fibrin generation and fibrin clot assembly // *Blood Coagul. and Fibrinolysis*. — 1997. — **8**. — P. 257—267.
78. Doolittle R.F. Structural aspects of fibrinogen to fibrin conversion // *Adv. Protein Chem.* — 1973. — **27**. — P. 1—109.
79. Laudano A.P., Doolittle R.F. Studies on synthetic peptides that bind to fibrinogen and prevent fibrin polymerization. Structural requirements, member of binding sites, and species differences // *Biochemistry*. — 1980. — **19**, N 3. — P. 1013—1019.
80. Pandya B.V., Gabriel J.L., O'Brien J., Budzynski A.Z. Polymerization site in the β -chain of fibrin: mapping of the B β 1-55 sequence // *Ibid.* — 1991. — **30**, N 1. — P. 162—168.
81. Pandya B.V., Cierniewski C.S., Budzynska A.Z. Conservation of human fibrinogen conformation after cleavage of the B β chain NH₂ terminus // *J. Biol. Chem.* — 1985. — **260**, N 5. — P. 2994—3000.

82. *Siebenlist K.I., DiOrio J.P., Budzynski A.Z.* The polymerization and thrombin-binding properties of des-(B β 1-42)-fibrin // *J. Biol. Chem.* — 1990. — **265**, N 30. — P. 18650—18655.
83. *Ugarova T.P., Budzynski A.Z.* Interaction between complementary polymerization sites in the structural D and E domains of human fibrin // *Ibid.* — 1992. — **267**, N 19. — P. 13687—13693.
84. *Medved L.V., Litvinovich S.V., Ugarova T.P. et al.* Localization of a fibrin polymerization site complementary to Gly-His-Arg-sequence // *FEBS Lett.* — 1993. — **320**, N 13. — P. 239—242.
85. *Толстых В.М., Варецкая Т.В., Белицер В.А.* Антиполимеризационная активность фрагмента Д фибриногена и фибрина и зависимость ее от наличия кальция при получении фрагментов фибриногена // *Укр. биохим. журн.* — 1976. — **48**, № 1. — С. 116—121.
86. *Kudryk B., Reuterby J., Blomback B.* Adsorption of plasminic fragment D to thrombin-modified fibrinogen-sepharose // *Thromb. Res.* — 1973. — **2**, N 5. — P. 423—450.
87. *Heene D.L., Mattias F.R.* Adsorption of fibrinogen derivatives on insolubilized fibrinogen and fibrin monomers // *Ibid.* — 1973. — **2**, N 2. — P. 137—154.
88. *Mosseson M.W.* Thrombin interactions with fibrinogen and fibrin // *Semin. Thromb. and Haemost.* — 1993. — **19**, N 4. — P. 361—367.
89. *Kudryk B.J., Collen D., Woods K.R., Blomback B.* Evidence for localization of polymerization sites in fibrinogen // *J. Biol. Chem.* — 1974. — **249**, N 10. — P. 3322—3325.
90. *Meh D.A., Siebenlist G.B., Bergstrom G., Mosseson M.M.* Sequence of release of fibrinopeptide A from fibrinogen molecules by thrombin or atroxin // *J. Lab. Clin. Med.* — 1995. — **125**, N 3. — P. 384—391.
91. *Lewis S.D., Shields P.P., Shafer J.A.* Characterization of the kinetic pathway for liberation of fibrinopeptides during assembly of fibrin // *J. Biol. Chem.* — 1985. — **260**, N 18. — P. 269—278.
92. *Scheraga H.A.* The thrombin—fibrinogen interaction // *Biophys. Chem.* — 2004. — **112**. — P. 117—130.
93. *Moskowitz K.A., Budzynski A.Z.* The (DD)E complex is maintained by a fibrin polymerization site // *Biochemistry.* — 1994. — **33**, N 44. — P. 12937—12944.
94. *Evers S.J., Pelleitier H., Doolittle R.F.* Crystallization of fragment D from human fibrinogen // *Protein Sci.* — 1995. — **4**. — P. 1013—1016.
95. *Yee V.C., Pratt K.P., Cote H.C.F. et al.* Crystal structure of a 30kDa carboxyl terminal fragment from the γ -chain of human fibrinogen // *Structure.* — 1997. — **5**. — P. 125—127.
96. *Medved L., Litvinovich S., Ugarova T., Matsuka Y.K.* Ingham domain structure and functional activity of recombinant human fibrinogen γ -module (γ 148-411) // *Biochemistry.* — 1997. — **36**, N 10. — P. 4685—4693.
97. *Mosesson M.W., Siebenlist K.R., Meh D.A.* Fibrinogen and fibrin polymerization: appraisal of the binding events that accompany fibrin generation and fibrin clot assembly // *Fibrinogen XVIth Int. fibrinogen workshop.* — New York, 2001. — P. 11—30.
98. *Medved' L., Tsurupa G., Yakovlev S.* Conformational changes upon conversion of fibrinogen into fibrin // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* — 2002. — **936**. — P. 185—204.
99. *Белицер В.А.* Домены — крупные, функционально важные блоки молекулы фибриногена и фибрина // *Биохимия животных и человека.* — 1982. — Вып. 6. — С. 38—57.
100. *Mihalyi E.* Kinetics and molecular mechanism of the proteolytic fragmentation of fibrinogen // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* — 1983. — **408**. — P. 60—70.
101. *Budzynski A.Z., Marder V.J., Shainoff J.B.* Structure of plasminic degradation products of human fibrinogen. Fibrinopeptide and polypeptide chain analysis // *J. Biol. Chem.* — 1974. — **242**, N 7. — P. 2294—2302.
102. *Marder V.J., Francis Ch.W.* Plasmin degradation of cross-linked fibrin // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* — 1983. — **408**. — P. 389—406.
103. *Lee L.V., Ewald G.A., McKenzie C.R., Eisenberg P.R.* The relationship of soluble fibrin and cross-linked fibrin degradation products to the clinical course of myocardial infarction // *Arterioscler., Thromb., and Vasc. Biol.* — 1997. — **17**. — P. 628—633.
104. *Hawiger J., Kloczewia K.M., Timmons S.* Interaction of fibrinogen with staphylococcal clumping factor and with platelets // *Ann. N.Y. Acad. Sci. USA.* — 1983. — **403**. — P. 521—535.

105. *Niewiarowski S., Kordecki E., Budzynski A. et al.* Fibrinogen interaction with platelet receptor // *Ibid.* — 1983. — **403**. — P. 535—555.
106. *Altieri D.C., Plescia J., Plow E.F.* The structural motif glycine 190-valine 202 of the fibrinogen γ -chain interacts CD116/CD18 integrin ($\alpha_M\beta_2$, Mac-1) and promotes leucocytes adhesion // *J. Biol. Chem.* — 1993. — **268**, N 3. — P. 1847—1853.
107. *Bell W.R., Graig M., Townsend R.R.* Stimulation of fibrinogen biosynthesis by fibrinogen fragments D and E // *Brit. J. Haematol.* — 1983. — **53**. — P. 599—610.
108. *Скоморовская Е.В., Гриненко Т.В., Кудинов С.А., Золотарева Э.Н.* Исследование протеолитической активности комплекса Glu-плазминогена с фрагментом Е фибриногена // *Биохимия.* — 1991. — **56**, № 3. — С. 458—466.
109. *Peeranclie E.I.B.* Reversibility of fibrinogen fragment D₁ binding to human platelets: comparison with native fibrinogen // *Thromb. Res.* — 1992. — **68**, N 3. — P. 259—267.
110. *Thompson W.D., Smith E.B., Stirk C.M., Wang J.* Fibrin degradation products in growth stimulatory extracts of pathological lesions // *Blood Coagul. and Fibrinol.* — 1993. — **4**, N 1. — P. 113—115.
111. *Fischer E.G., Vogel P., Ziegler A.S., Kirkpatrick C.J.* Effect of fibrinogen fragment D and E on the adhesive properties of human granulocytes to venous endothelial cells // *Haemostasis.* — 1992. — **21**, N 3. — P. 161—164.
112. *Stirk C.M., Kocher A., Smith E.B., Thompson W.D.* Presence of growth-stimulating fibrin degradation products containing fragment E in human atherosclerotic plaques // *Atherosclerosis.* — 1993. — **103**, N 2. — P. 159—169.
113. *Sakata Y., Aoki N.* Cross-linking of fibronectin and α_2 -antiplasmin to fibrin induced by factor XIIIa // *J. Clin. Invest.* — 1982. — **69**, N 3/4. — P. 536—542.
114. *Folk J.E., Finlayson J.S.* The ϵ -(γ -glutamyl)lysine cross-link and the catalytic role of transglutaminases // *Adv. Protein Chem.* — 1977. — **31**. — P. 1—133.
115. *Poon M.-C., Russel J.A., Low S., et al.* Haemopoietic origin of factor XIIIa subunits in platelets, monocytes and plasma. Evidence from bone marrow transplantation studies // *J. Clin. Invest.* — 1989. — **84**, N 3. — P. 787—792.
116. *Ichinose A.* The physiology and biochemistry of factor XIII. // *Haemostasis and Thrombosis* / Ed. by A.L. Bloom, C.D. Forbes, D.P. Thomas, E.G.D. Tuddenham. — New York: Churchill Livingstone, 1994. — P. 531—546.
117. *Carrell N.A., Erickson H.P., McDonagh J.* Electron microscopy and hydrodynamic properties of factor XIII subunits // *J. Biol. Chem.* — 1989. — **264**, N 1. — P. 551—556.
118. *Lee V.C., Pedersen L.C., Le Trong I. et al.* Three-dimensional structure of a transglutaminase: human blood coagulation factor XIII // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 1994. — **91**, N 23. — P. 7296—7300.
119. *Kurochkin I.V., Procyk R., Bishop P.D. et al.* Domain structure, stability and domain-domain interactions in recombinant factor XIII // *J. Mol. Biol.* — 1995. — **248**, N 1. — P. 414—430.
120. *Takahashi N., Takahashi J., Putnam I.W.* Primary structure of blood coagulation factor XIIIa (fibrinolygase, transglutaminase) from human placenta // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 1986. — **83**, N 21. — P. 8019—8023.
121. *Ichinose A., McMullen B.A., Fujikawa K., Davie E.W.* Amino acid sequence of the subunit of the human factor XIII, a protein composed of ten repetitive segments // *Biochemistry.* — 1986. — **25**, N 16. — P. 4633—4638.
122. *Hettasch J.M., Greenberg C.S.* Analysis of the catalytic activity of human factor XIIIa by site-directed mutagenesis // *J. Biol. Chem.* — 1994. — **269**, N 45. — P. 28309—28313.
123. *Hashiguchi T., Saito M., Matsuda T., Ichinose A.* Two genetic defects in a patient with complete deficiency of the beta-subunit for coagulation factor XIII // *Blood.* — 1993. — **82**, N 1. — P. 145—150.
124. *Tiemann C., Brinkmann T., Kleesiek K.* Detection of the three Kunitz-type single domains of membrane-bound tissue factor pathway (TFPI) by flow cytometry // *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* — 1997. — **35**, N 11. — P. 855—860.
125. *Warn-Cramer B.J., Rao V.M., Maki S.L., Rapaport S.* Modification of extrinsic pathway inhibitor (TEPI) and factor Xa that affect their ability to interact and to inhibit factor VIIa/tissue

- factor: evidence for a two-step model of inhibition // *Thromb. and Haemost.* — 1988. — **60**, N 3. — P. 453–456.
126. *Novotny W.F.* Tissue factor pathway inhibitor // *Semin. Thromb. and Haemost.* — 1994. — **20**, N 1. — P. 101–108.
127. *Olson S.T., Shore J.D.* Kinetic characterization of heparin-catalyzed and uncatalyzed inhibition of blood coagulation proteinases by antithrombin // *Meth. Enzymol.* — 1993. — **222**. — P. 525–559.
128. *Skiner R., Abrahams J.P., Whisstock J.C. et al.* The 2,6 Å structure of antithrombin indicates a conformational change at the heparin binding site // *J. Mol. Biol.* — 1997. — **266**. — P. 601–609.
129. *Desai U.R.* New antithrombin-based anticoagulants // *Med. Res. Reviews.* — 2004. — **24**, N 5. — P. 151–181.
130. *Blajchman M.A.* An overview of the mechanism of action of antithrombin and its inherited deficiency states // *Blood Coagul. and Fibrinol.* — 1994. — **5**. — P. 5–11.
131. *Walker C.P.R., Royson D.* Thrombin generation and its inhibition: a review of scientific basis and mechanism of action of anticoagulant therapies // *Brit. J. Anaesth.* — 2002. — **88**, N 6. — P. 848–863.
132. *Струкова С.М., Умарова Б.Ф., Куреева Е.Г. и др.* Механизмы регуляции свертывания крови // *Биохимия животных и человека.* — 1991. — Вып. 15. — С. 1–12.
133. *Scandura J.M., Ahmud S.S., Walsh P.N.* A binding site expressed on the surface of activated human platelets is shared by factor X and prothrombin // *Biochemistry.* — 1996. — **35**, N 27. — P. 8890–8902.
134. *Hovig T., Dodds W.J., Rowsell H.C., Mustard J.F.* The transformation of haemostatic platelet plugs in normal and factor IX-deficient dogs // *Am. J. Pathol.* — 1968. — **53**. — P. 355–374.
135. *Davie E.W., Rainof O.D.* Waterfall sequence for intrinsic blood clotting // *Science.* — 1964. — **145**. — P. 1310–1312.
136. *Mac Farlane R.G.* An enzyme cascade in the blood clotting mechanism and its function as biochemical amplifier // *Nature.* — 1964. — **202**. — P. 498–499.
137. *Citarella F., Ravon D.M., Felici A. et al.* Estrogen induction and contact phase activation of human factor XII // *Steroids.* — 1996. — **61**. — N 4. — P. 270–276.
138. *Citarella F., Ravon D.M., Pascucci B. et al.* Structure/function analysis factor XII using recombinant deletion mutants. Evidence for an additional region involved in the binding to negatively charged surfaces // *Eur. J. Biochem.* — 1996. — **238**, N 1. — P. 240–249.
139. *Silverberg M., Dunn J.T., Garen L., Kaplan A.P.* Autoactivation of human Hageman factor: demonstration utilizing a synthetic substrate // *J. Biol. Chem.* — 1980. — **257**. — P. 7281.
140. *Dunn J.T., Silverberg M., Kaplan A.P.* The cleavage and formation of activated human Hageman factor by autodigestion and by kallikrein // *Ibid.* — 1980. — **102**, N 1. — P. 31.
141. *Schousboe I.* Factor XIIa activation of plasminogen is enhanced by contact activating surfaces and $7n^{2+}$ // *Blood Coagul. and Fibrinol.* — 1997. — **8**, N 2. — P. 97–104.
142. *Braunstein K.M., Noyes C.M., Lundblad R.L., Roberts H.R.* Characterization of the defect in activation of factor IX_{Chapel Hill} by human factor XIa // *J. Clin. Invest.* — 1982. — **68**. — P. 1420–1426.
143. *Naglia R., Sinha D., Walsh P.N.* Functional domains in the heavy-chain region of factor XI: a high molecular weight kininogen-binding site and a substrate-binding site for IX // *Blood.* — 1989. — **74**. — P. 244–251.
144. *Colman R.W., Bagdasaria A., Talamo R.C. et al.* Williams trait: Human kininogen deficiency with diminished levels of plasminogen proactivator and prekallikrein associated with abnormalities of the Hageman factor-dependent pathway // *J. Clin. Invest.* — 1975. — **56**. — P. 1650–1654.
145. *You J.L., Page J.D., Scarsdale J.N. et al.* Conformational analysis of synthetic peptides encompassing the factor XI and prekallikrein overlapping binding domains of high molecular weight kininogen // *Peptides.* — 1993. — **14**. — P. 867–875.
146. *Colman R.W., Schmaier A.H.* Contact system: a vascular biology modulator with anticoagulant, profibrinolytic, antiadhesive, and proinflammatory attributes // *Blood.* — 1997. — **90**, N 10. — P. 3819–3843.

147. Бутенас С., Манн К.Г. Свертывание крови // Биохимия. — 2002. — 66, № 1. — С. 5—15.
148. Camerer E., Prydz H. Notes on cell biology of tissue factor // Haemostasis. — 1996. — 26, suppl. 1. — P. 25—30.
149. Братчик А.М. Клинические проблемы фибринолиза. — Киев: Здоровья, 1993. — 344 с.
150. Muller Y.A., Utsch M.H., Kelley R.F., de Vos A.M. Structures of the extracellular domain of human tissue factor: location of the factor VIIa binding site // Biochemistry. — 1994. — 33, N 36. — P. 10864—10870.
151. Golino P., Forte L., De Rosa S. Inhibition of the tissue factor coagulation pathway // Curr. Vasc. Pharmacol. — 2004. — 2, N 4. — P. 319—327.
152. Rapaport S.I., Rao L.V.M. The tissue factor pathway how it has become a 'prima ballerina' // Thromb. and Haemost. — 1995. — 74. — P. 7—17.
153. Rapaport S.I., Rao L.V.M. Initiation and regulation of tissue factor dependent blood coagulation // Arter. Thromb. — 1992. — 12. — P. 1111—1121.
154. Mann K.G., Nesheim M.E., Church W.R., Halry P., Krishnaswamy S. Surface-dependent reaction of the vitamin K-dependent enzyme complexes // Blood. — 1990. — 76. — P. 1—16.
155. Lawson J.H., Mann K.G. Cooperative activation of human factor IX by the human extrinsic pathway of blood coagulation // J. Biol. Chem. — 1991. — 266. — P. 11317—11327.
156. Ahmad S.S., Rawala-Sheikh R., Ashby B., Walsh P.N. Platelet receptor-mediated factor X activation by factor IXa. High-affinity IXa receptors induced by factor VIII are deficient on platelets in Scott syndrome // J. Clin. Invest. — 1989. — 94. — P. 824—828.
157. Van't Veer C., Mann K.G. Regulation of tissue factor initiated thrombin generation by the stoichiometric inhibitors tissue factor pathway inhibitor, antithrombin III, and heparin cofactor-II // J. Biol. Chem. — 1997. — 272. — P. 4367—4377.
158. Monkovic D.D., Tracy P.B. Functional characterization of human platelet-released factor V and its activation by factor Xa and thrombin // Ibid. — 1990. — 265, N 28. — P. 17132—17140.
159. Monkovic D.D., Tracy P.B. Activation of human factor V by factor Xa and thrombin // Biochemistry. — 1990. — 29, N 5. — P. 1118—1128.
160. Evans T.C.Jr., Nelsestuen G.L. Importance of cys-proline 22 in the membrane binding conformation of bovine prothrombin // Ibid. — 1996. — 35, N 25. — P. 8210—8215.
161. Prydz H. The role of factor VII in intrinsic pathway: a brief review // Haemost. — 1983. — 13, N 3. — P. 111—134.
162. Osterud B., Rapoport S.I. Synthesis of intrinsic factor X activator. Inhibition of the function of formed activator by antibodies to factor VIII and factor IX // Biochemistry. — 1979. — 9. — P. 1854—1861.
163. Luskov E.A., Lyons D.A., Ridgeway T.M. et al. Interaction of clotting factor V heavy chain with prothrombin and prothrombin 1 and role of activated protein C in regulating this interaction: analysis by analytical ultracentrifugation // Ibid. — 1989. — 28, N 5. — P. 2348—2354.
164. Liu L., Rodgers G.M. Characterization of an inducible endothelial cell prothrombin activator // Blood. — 1996. — 88, N 8. — P. 2989—2994.
165. Boskovic D.S., Bajzar L.S., Nesheim M.E. Channeling during prothrombin activation // J. Biol. Chem. — 2001. — 276, N 31. — P. 28686—28693.
166. Chen Q., Lentz B.R. Fluorescence resonance energy transfer study of shape changes in membrane-bound bovine prothrombin and meizothrombin // Biochemistry. — 1997. — 36, N 15. — P. 4701—4711.
167. Brufatto N., Nesheim M.E. Analysis of the kinetics of prothrombin activation and evidence that two equilibrating forms of prothrombinase are involved in the process // J. Biol. Chem. — 2003. — 278, N 9. — P. 6755—6764.
168. Kalafatis M., Swords N.A., Rand M.D., Mann K.G. Membrane-dependent reaction in blood coagulation: role vitamin K-dependent enzyme complexes // Biochim. et biophys. acta. — 1994. — 1227. — P. 113—129.
169. Серейская А.А., Осадчук Т.В., Корнелюк А.И. и др. Ферментативные свойства изолированной В-цепи тромбина человека // Биохимия. — 1989. — 54, № 4. — С. 542—548.

170. *Stubbs M.T., Bode W.* A player of many spotlight falls on thrombins structure // *Thromb. Res.* — 1993. — **69**, N 1. — P. 1—58.
171. *Кибирев В.К., Гершкович А.А.* Природные и синтетические ингибиторы тромбина. // *Укр. биохим. журн.* — 1999. — **71**, № 1. — С. 5—26.
172. *Кибирев В.К., Гершкович А.А., Серебряный С.Б.* Структурные основы специфичности тромбина. Роль вторичных взаимодействий // *Биохимия.* — 1983. — **48**, № 6. — С. 937—943.
173. *Гершкович О.А., Кібіреє В.К., Зубак С.В., Серебряний С.Б.* Антитромбінова активність синтетичних пептидів — аналогів ділянки 30-44 Аа-ланцюга фібриногену // *Доп. АН УРСР. Сер. Б.* — 1986. — № 5. — С. 59—62.
174. *Струкова С.М.* Тромбин — регулятор процессов воспаления и репарации тканей // *Биохимия.* — 2001. — **66**, № 1. — С. 14—27.
175. *Струкова С.М., Струков А.И.* Тромбоз. — Общая патология человека. — М.: Триада-х, 1990. — С. 297—360.
176. *Fenton J.W.* Structural regions and bioregulatory functions of thrombin // *Control of animal cell proliferation.* — New York: Acad. Press, 1987. — P. 133—151.
177. *Shuman M.A.* Thrombin — cellular interactions // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* — 1986. — **485**. — P. 228—239.
178. *Nesheim M.E., Wang W., Boffa M. et al.* Thrombin, thrombomodulin and TAFI in the molecular link between coagulation and fibrinolysis // *Thromb. and Haemost.* — 1997. — **78**. — P. 386—391.
179. *Dahlback B.* The protein C anticoagulant system: inherited defects as basis for venous thrombosis // *Thromb. Res.* — 1995. — **77**, N 1. — P. 1—44.
180. *Кибирев В.К., Серейская А.А.* Структурные основы специфичности тромбина // *Биохимия животных и человека.* — 1989. — Вып. 13. — С. 10—18.
181. *Sheehan J.P., Sadler J.E.* Molecular mapping of the heparin-binding exosite of thrombin // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 1994. — **91**, N 12. — P. 5518—5522.
182. *Di Gera E., Dang Q.D., Ayala Y.M.* Molecular mechanisms of thrombin function // *Cell. Mol. Life Sci.* — 1997. — **53**, N 9. — P. 701—730.
183. *Zhang E., Tulinsky A.* The molecular environment of the Na⁺ binding site of thrombin // *Biophys. Chem.* — 1997. — **63**, N 2/3. — P. 185—200.
184. *Wun T.C.* Lipoprotein associated coagulation inhibition (LACI) is a cofactor for heparin: synergic anticoagulant action between LACI and sulfated polysaccharides // *Blood.* — 1992. — **79**, P. 430—438.
185. *Broze G.J.* Tissue factor pathway inhibitor and the revised theory of coagulation // *Ann. Rev. Med.* — 1995. — **46**. — P. 103—112.
186. *Wesselschmidt R.L., Girard T.J., Likert K.M. et al.* Tissue factor pathway inhibitor: the carboxy-terminus is required for optimal inhibition of factor Xa // *Blood.* — 1992. — **79**. — P. 2004—2010.
187. *Gettins P.G.W.* Serpin structure, mechanism and function // *Chem. Rev.* — 2002. — **102**. — P. 4751—4803.
188. *Owen W.G.* Evidence for the formation of an ester between thrombin and heparin cofactor // *Biochim. et biophys. acta.* — 1975. — **405**, N 2. — P. 380—387.
189. *Pratt C.W., Church F.C., Pizzo S.V.* In vivo catabolism of heparin cofactor II and its complex with thrombin // *Arch. Biochem. and Biophys.* — 1988. — **262**. — P. 111—117.
190. *Rao L.V.M., Rapaport S.I., Hoag A.D.* Binding of factor VIIa to tissue factor permits rapid antithrombin III/heparin inhibition of factor VIIa // *Blood.* — 1993. — **81**. — P. 2000—2007.
191. *Curell R., Skinner R., Jin L., Abruham J.P.* Structural mobility of antithrombin and its modulation by heparin // *Thromb. and Haemost.* 1997. — **78**, N 1. — P. 516—519.
192. *Marciniak E.* Thrombin-induced proteolysis of human antithrombin III: an outstanding contribution of heparin // *Brit. J. Hamatol.* — 1981. — **48**, N 21. — P. 325—336.
193. *Huntington J.A., Gettins P.G.* Conformational conversion of antithrombin to a fully activated substrate of factor Xa without need for heparin // *Biochemistry.* — 1998. — **37**, N 10. — P. 3272—3277.

194. Jin L., Abrachams J.P., Skinner R. et al. The anticoagulant activation of antithrombin by heparin // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1997. — **94**, N 26. — P. 14683—14688.
195. De Flouw N.D., van Hinsbergh V.W.M., de Jong Y.F. et al. The interaction of activated protein C and thrombin with plasminogen activator inhibitor released from human endothelial cells // Thromb. and Haemost. — 1987. — **57**, N 2. — P. 176—182.
196. Miletich J.P. Laboratory diagnosis of protein C deficiency // Semin. In Thromb. and Haemost. — 1990. — **16**, N 2. — P. 169—176.
197. Kessler C.M., Strickland B.K. Protein C and protein S clinical perspectives // Clin. Chim. Acta. — 1987. — **170**. — P. 25—36.
198. Heeb M.J., Mesteirs R.M., Tans G. et al. Binding of protein S to factor Va associated with inhibition of prothrombinase that is independent of activated protein C // J. Biol. Chem. — 1993. — **268**, N 4. — P. 2872—2877.
199. Haskeng T.M., van't Veer C., Meijers J.C., Bouma B.N. Human protein S inhibits prothrombinase complex activity on endothelial cells and platelets via direct interactions with factors Va and Xa // Ibid. — 1994. — **269**, N 33. — P. 21051—21058.
200. Paling C. Clinical relevance of protein C // Blood. — 1986. — **53**, N 2. — P. 63—72.
201. Amiral J., Fareed J. Thromboembolic diseases: biochemical mechanisms and new possibilities of biological diagnosis // Semin. Thromb. and Haemost. — 1996. — **22**, suppl. 1. — P. 41—48.
202. Marlar R.R., Montgomery, R.M. Madden Homozygous protein C deficiency // Protein C and related proteins / Ed. by R.M. Bertina. — New York: Churchill Livingstone, 1988. — 233 с.
203. Козинец Г.И., Макаров В.А. Исследование системы свертывания крови в клинической практике. — М.: — Триада-Х, 1997. — 480 с.
204. Orthner C.L., Brattacharia P., Strickland D.K. Characterization of a protein C activator from the venom of *Agkistrodon contortrix* // Biochemistry. — 1988. — **27**, N 7. — P. 2558—2564.
205. Muelier M.M., Bomke S., Seifried E. Fresh frozen plasma in patients with disseminated intravascular coagulation or in patients with liver diseases // Thromb. Res. — 2002. — **107**, suppl. 1. — P. 9—17.
206. Smith E.B., Thompson W.D. Fibrin as a factor in atherogenesis // Ibid. — 1994. — **73**, N 1. — P. 1—19.
207. Smith E.B., Keen G.A., Grant A., Stirk C. Fat fibrinogen in human arterial intima // Arteriosclerosis. — 1990. — **10**. — P. 263—265.
208. Mammen E.F. Disseminated intravascular coagulation (DIC) // Clin. Lab. Sci. — 2000. — **13**, N 4. — P. 239—245.
209. Bouman C.S.C., Ypma S.T., Sybesma J.P.H.B. Comparison of the efficacy of D-dimer, fibrin degradation products and prothrombin fragment 1+2 in clinically suspected deep venous thrombosis // Thromb. Res. — 1995. — **77**, N 3. — P. 225—235.
210. Monroe D.M., Hoffman M., Roberts H. Platelets and thrombin generation // Arterioscler Thromb. Vasc. Biol. — 2002. — **22**. — P. 1381—1389.

К главе 3

1. Добровольский А.Б., Титаева Е.В. Система фибринолиза: регуляция активности и физиологические функции ее основных компонентов // Биохимия. — 2002. — № 67. — С. 116—127.
2. Веремсенко К.Н., Голобородько О.П., Кізім О.І. Протеоліз в нормі і при патології К.: Здоров'я, 1988. — 200 с.
3. Зубаиров Д.М. Молекулярные основы свертывания крови и тромбообразования. — Казань: ФЭН, 2000. — 364 с.
4. Lijnen H.R. Pathophysiology of the plasminogen/plasmin system // Int. J. Clin. Lab. Res. — 1996. — **26**. — P. 1—6.
5. Henri R. Lijnen H. R., Collen D. Endothelium in haemostasis and thrombosis // Progr. Cardiovascul. Dis. — 1997. — **39**. — P. 342—350.
6. Osgton D. Natural activators of plasminogen // Fibrinolysis. Current fundamental and clinical conspects / Ed. by D. Collen et al. — Amsterdam; New York: Elsevier / North-Holland Biomedical Press, 1978. — P. 1—15.

7. *Smith O., Gilbert M., Owen W.G.* Tissue plasminogen activator release in vivo in response to vasoactive agents // *Blood*. — 1985. — **66**, N 3. — P. 835—839.
8. *Дикун Я.В.* 40 років клінічного досвіду тромболітичної терапії гострого інфаркту міокарда // *Укр. мед. часопис*. — 1998. — **5**, № 7. — P. 49—53.
9. *Максименко А.В.* Молекулярные взаимодействия при фибринолизе. Поиск новых активаторов плазминогена // *Молекуляр. биология*. — 1995. — **29**. — С. 38—60.
10. *Ферстрате М.* Новейшие тромболитические препараты // *Тромбоз, гемостаз и реология*. — 2001. — **5**. — С. 4—13.
11. *Wiman B., Collen D.* Molecular mechanism of physiological fibrinolysis // *Nature*. — 1978. — **272**, N 5653. — P. 549—550.
12. *Sigurdardottir O.* Studies on PAI-1, vitronectin and their interaction // *Stockholm: Repro Print AB*. — 1994. — P. 10.
13. *Wallen P., Wiman B.* Characterization of human plasminogen // *Biochim. et biophys. acta*. — 1970. — **221**. — P. 20—30.
14. *Collen Desire, Lijnen H.R.* Fibrinolysis and the control of hemostasis // *The molecular basis of blood diseases*. — New York: W.B. Saunders comp., 1987. — P. 662—679.
15. *Wiman B., Wallen P.* Amino acid sequence of human plasminogen and plasmin // *Eur. J. Biochem.* — 1975. — **57**. — P. 387—394.
16. *Sottrup-Jensen L., Claeys H., Zajdel M. et al.* The primary structure of human plasminogen: Isolation of two lysine-binding fragments and one “miniplasminogen” (MW 38,000) by elastase-catalyzed-specific limited proteolysis // *Progress in chemical fibrinolysis and thrombolysis*. — New York: Raven Press, — 1978. — Vol. 3. — P. 191—209.
17. *Wiman B., Wallen P.* Amino-acid sequence of the cyanogen-bromide fragment from human plasminogen that forms the linkage between the plasmin chains // *Eur. J. Biochem.* — 1975. — **58**. — P. 539—547.
18. *Forsgren M., Raden B., Israelsson M. et al.* Molecular cloning and characterization of a full-length cDNA clone for human plasminogen // *FEBS Lett.* — 1987. — **213**. — P. 254—260.
19. *Shaller J., Moser P.W., Dannegger-Muller G.A. et al.* Complete amino acid sequence of bovine plasminogen. Comparison with human plasminogen // *Eur. J. Biochem.* — 1985. — **149**. — P. 267—278.
20. *Marti T., Schaller J., Rickli E.E.* Determination of the complete amino acid sequence of porcine miniplasminogen // *Ibid.* — 1985. — **149**. — P. 279—285.
21. *Shaller J., Straub C., Kampfer U., Rickli E.E.* Complete amino acid sequence of canine miniplasminogen // *Protein Seq. Data Anal.* — 1989. — **2**. — P. 445—450.
22. *Shaller J., Straub C., Kampfer U., Rickli E.E.* Complete amino acid sequence of equine miniplasminogen // *Ibid.* — 1991. — **4**. — P. 69—74.
23. *Shaller J., Straub C., Kampfer U., Rickli E.E.* Complete amino acid sequence of ovine miniplasminogen // *Ibid.* — 1992. — **5**. — P. 21—25.
24. *Degen S.J., Bell S.M., Schaefer L.A., Elliott R.W.* Characterization of the cDNA coding for mouse plasminogen and localization of the gene to mouse chromosome 17 // *Genomics*. — 1990. — **8**. — P. 49—61.
25. *Novokhatny V.V., Kudinov S.A., Privalov P.L.* Domains in human plasminogen // *J. Mol. Biol.* — 1984. — **179**, N 2. — P. 215—232.
26. *Lerch P.G., Rickli E.E., Lergier W., Gillessen D.* Localisation of individual lysine-binding regions in human plasminogen and investigations on their complex-forming properties // *Eur. J. Biochem.* — 1980. — **107**. — P. 7—13.
27. *Verevka S.V., Kudinov S.A., Grinenko T.V.* Arginyl-binding sites of human plasminogen // *Thromb. Res.* — 1986. — **41**. — P. 689—698.
28. *Winn E.S., Hu S.P., Hochschwender S.M., Laursen R.A.* Studies on the lysine-binding sites of human plasminogen. The effect of ligand structure on the binding of lysine analogs to plasminogen // *Eur. J. Biochem.* — 1980. — **104**, N 2. — P. 579—586.
29. *Wu T.P., Padmanabhan K., Tulinsky A., Mulichak A.M.* The refined structure of the ϵ -aminocaproic acid complex of human plasminogen kringle 4 // *Biochemistry*. — 1991. — **30**. — P. 10589—10594.

30. *Christensen U.* C-terminal lysine residues of fibrinogen fragments essential for binding to plasminogen // *FEBS Lett.* — 1985. — **182**. — P. 43–46.
31. *Rejante M.R., Byeon I.J., Llinas M.* Ligand specificity of plasminogen kringle 4 // *Biochemistry.* — 1991. — **30**. — P. 11081–11092.
32. *Ponting C.P., Marshall J.M., Cederholm-Williams S.A.* Plasminogen: a structural review // *Blood Coagul. and Fibrinol.* — 1992. — **3**. — P. 605–614.
33. *Wang X., Lin X., Loy J.A. et al.* Crystal structure of the catalytic domain of human plasmin complexed with streptokinase // *Science.* — 1998. — **281**. — P. 1662–1665.
34. *Raum D., Marcus D., Apler C.A. et al.* Synthesis of human plasminogen by the liver // *Ibid.* — 1980. — **208**. — P. 1036–1037.
35. *Zijnen H.R.* Elements of the fibrinolytic system // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* — 2001. — **936**. — P. 226–236.
36. *Carmeliet P., Schoonjans L., Kieckens L. et al.* Physiological consequences of loss of plasminogen activator gene function in mice // *Nature.* — 1994. — **368**. — P. 419–424.
37. *Collen D., Lijnen H.R.* Tissue-type plasminogen activator, mechanism of action and thrombolytic properties // *Haemostasis.* — 1986. — **16**, suppl. 3. — P. 25–32.
38. *Wittwer A., Howard S.* Glycosylation at Asn-184 inhibits the conversion of single-chain to two-chain tissue-type plasminogen activator by plasmin // *Biochemistry.* — 1990. — **29**, N 17. — P. 4175–4180.
39. *Silverstein R.L., Nachman R.L., Leung L.L., Harpel P.C.* Activation of immobilized plasminogen by tissue activator. Multimolecular complex formation // *J. Biol. Chem.* — 1985. — **260**. — P. 10346–10352.
40. *Stack S., Gonzalez-Gronow M., Pizzo S.V.* Regulation of plasminogen activation by components of the extracellular matrix // *Biochemistry.* — 1990. — **29**. — P. 4966–4970.
41. *Bode W., Renatus M.* Tissue-type plasminogen activator: variants and crystal/solution structures demarcate structural determinants of function // *Curr. Opin. Struct. Biol.* — 1997. — **7**, N 6. — P. 865–872.
42. *Hoylaerts M., Rijken D.S., Lijnen H.R., Collen D.* Kinetics of the activation of plasminogen by human tissue plasminogen activator. Role of fibrin // *J. Biol. Chem.* — 1982. — **257**. — P. 2912–2919.
43. *Vassali J.D., Sappino A.P., Belin D.* The plasminogen activator/plasmin system // *J. Clin. Invest.* — 1991. — **88**. — P. 1067.
44. *Nieuwenhuizen W.* Sites on fibrin involved in the acceleration of plasminogen activation by t-PA. Possible role of plasminogen polymerization // *Thromb. Res.* — 1994. — **75**, N 3. — P. 343–347.
45. *Dano K., Andersen P.A., Grondahl-Hansen J. et al.* Plasminogen activator, tissue degradation and cancer // *Adv. Cancer Res.* — 1985. — **44**. — P. 140–266.
46. *Lijnen H.R., Collen D.* Strategies for the improvement of thrombolytic agents // *Thromb. and Haemostasis.* — 1991. — **66**. — P. 88–110.
47. *Wun T.C., Schleuning W.-D., Reich E.* Isolation and characterization of urokinase from human plasma // *J. Biol. Chem.* — 1982. — **257**, N 6. — P. 3276–3283.
48. *Steffens G.J., Gunzler W., Otting F. et al.* The complete amino acid sequence of low molecular mass urokinase from human urine // *Hoppe-Zeyler's Z. Physiol.Chem.* — 1982. — **363**, N 9. — P. 1043–1058.
49. *Gunzler W.A., Steffens G.J., Otting F. et al.* The primary structure of high molecular mass urokinase from human urine. The complete amino acid sequence of A-chain // *Hoppe-Zeyler's Z. Physiol. Chem.* — 1982. — **363**. — P. 1155–1165.
50. *Novochatny V.V., Medved L.V., Mazar A.P. et al.* Domain structure and interactions of recombinant urokinase-type plasminogen activator // *J. Biol. Chem.* — 1992. — **267**, N 8. — P. 3878–3885.
51. *Ichinose A., Fujikawa K., Suyama T.* The activation of pro-urokinase by plasma kallikrein and its activation by thrombin // *Ibid.* — 1986. — **261**, N 8. — P. 3486–3489.
52. *Lijnen H., Collen D.* Molecular mechanisms of thrombolytic therapy // *Haemostasis.* — 1986. — **16**. — P. 3–15.

53. *DeMunk G.A.W., Rijken D.C.* Fibrinolytic properties of single chain urokinase-type plasminogen activator (pro-urokinase) // *Fibrinolysis*. — 1990. — **4**, N 1. — P. 1–9.
54. *Lijnen H., Collen D.* Fibrinolytic agents: mechanisms of activity and pharmacology // *Thromb. and Haemost.* — 1995. — **74**. — P. 387–390.
55. *Rohrlich S.T., Rifkin D.B.* Proteases and cell invasion // *Ann. Rep. Med. Chem.* — 1979. — **14**. — P. 229–239.
56. *Saksela O.* Plasminogen activation and regulation of pericellular proteolysis // *Biochim. et biophys. acta.* — 1985. — **823**, N 1. — P. 35–65.
57. *Степанова В.В., Ткачук В.А.* Урокиназа как ультидоменный белок и полифункциональный регулятор клеток // *Биохимия*. — 2002. — **67**, № 1. — С. 127–138.
58. *Lijnen H.R., Zammaron C., Blaber M. et al.* Activation of plasminogen by pro-urokinase. 1. Mechanism // *J. Biol. Chem.* — 1986. — **261**, N 3. — P. 1253–1258.
59. *Stump D.C., Lijnen H.R., Collen D.* Purification and characterization of a novel low molecular weight form of single-chain urokinase-type plasminogen activator // *Ibid.* — 1986. — **261**, N 36. — P. 17120–17126.
60. *Gurevich V., Pannell R.* A comparative study of the efficacy and specificity of tissue plasminogen activator and urokinase: demonstration of synergism and different thresholds of non-selectivity // *Thromb. Res.* — 1986. — **44**, N 2. — P. 217–228.
61. *Яровая Г.А., Блохина Т.Б., Нешкова Е.А.* Контактная система. Новые представления о механизмах активации и биорегулирующих функциях // *Биохимия*. — 2002. — **67**, № 1. — С. 16–29.
62. *Ichinose A., Fujikawa K., Suyama T.* The activation of pro-urokinase by plasma kallikrein and its inactivation by thrombin // *J. Biol. Chem.* — 1986. — **261**, N 8. — P. 3486–3489.
63. *Lenich C., Pannell R., Gurevich V.* Assembly and activation of the intrinsic fibrinolytic pathway on the surface of human endothelial cells in culture // *Thromb. and Haemost.* — 1995. — **74**, N 2. — P. 698–703.
64. *Loza J.P., Gurevich V., Johnstone M., Pannell R.* Platelet-bound prekallikrein promotes pro-urokinase-induced clot lysis: a mechanism for targeting the factor XII dependent intrinsic pathway of fibrinolysis // *Ibid.* — 1994. — **71**, N 3. — P. 347–352.
65. *Herwald H., Debio J., Kellner R. et al.* Isolation and characterization of the kininogen-binding protein p33 from endothelial cells. Identity with the gC1q receptor. // *J. Biol. Chem.* — 1996. — **271**, N 22. — P. 13040–13047.
66. *Gurevich V., Johnstone M., Loza J.P., Pannell R.* Pro-urokinase and prekallikrein are both associated with platelets. Implications for the intrinsic pathway of fibrinolysis and for therapeutic thrombolysis // *FEBS Lett.* — 1993. — **318**, N 3. — P. 317–321.
67. *Tans G., Rosing J.* Structural and functional characterization of factor XII // *Semin. Thromb. and Haemost.* — 1987. — **13**, N 1. — P. 1–14.
68. *Сидоркина А.Н., Сидоркин В.Г., Преснякова М.В.* Биохимические основы системы гемостаза и диссеминированное внутрисосудистое свертывание крови. — Н. Новгород: ННИИТО, 2005. — 112 с.
69. *Баркаган З.С.* Геморрагические заболевания и синдромы. — М.: Медицина, 1988. — 527 с.
70. *Berrettini M., Schleaf R.R., Espana F. et al.* Interaction of type I plasminogen activator inhibitor with the enzymes of the contact activation system. // *J. Biol. Chem.* — 1989. — **264**, N 20. — P. 11738–11743.
71. *Both N.A., Anderson J.A., Bennet B.* The plasma inhibitors of plasminogen activator, studied by a zymographic technique // *Thromb. Res.* — 1985. — **38**, N 3. — P. 261–267.
72. *Sprengers E.D., Kluff C.* Plasminogen activator inhibitors // *Blood*. — 1987. — **69**, N 1. — P. 381–387.
73. *Lindahl T.L., Ohlsson P.-I., Wiman B.* The mechanism of the reaction between human plasminogen-activator inhibitor I and tissue plasminogen activator // *Biochem. J.* — 1990. — **265**, N 1. — P. 109–113.
74. *Bode W., Huber R.* Proteinase-protein inhibitor interaction // *Fibrinolysis*. — 1995. — **9**, suppl 1. — P. 161–171.

75. *Krisnamurti Ch., Alving B.* Plasminogen activator inhibitor type 1: biochemistry and evidence for modulation of fibrinolysis in vivo // *Semin. Thromb. and Hemost.* — 1992. — **18**. — P. 67—80.
76. *Stefansson S., Haudenschild C., Lawrence D.A.* Beyond fibrinolysis: the role of plasminogen activator inhibitor and vitronectin in vascular wound healing // *Trends Cardiovascul. Med.* — 1998. — **8**. — P. 175—180.
77. *Debrock S., Declerck P.J.* Identification of a functional epitope in plasminogen activator inhibitor-1, not localized in the reactive center loop // *Biochim. et biophys. acta.* — 1997. — **8**. — P. 257—266.
78. *Alessi M.C., Juhan-Vague I., Declerck P.J., Collen D.* Molecular forms of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) and tissue-type plasminogen activator (t-PA) in human plasma // *Thromb. Res.* — 1991. — **62**, N 4. — P. 275—285.
79. *Declerck P.J., De Mol M., Vaughan D.E., Collen D.* Identification of a conformationally distinct form of plasminogen activator inhibitor-1, acting as a noninhibitory substrate for tissue-type plasminogen activator // *J. Biol. Chem.* — 1992. — **267**, N 17. — P. 11693—11696.
80. *Hekman C.M., Loskutoff D.J.* Endothelial cells produce a latent inhibitor of plasminogen activators that can be activated by denaturants // *Ibid.* — 1985. — **260**, N 21. — P. 11581—11587.
81. *Levin E., Santell L.* Association of a plasminogen activator inhibitor (PAI-1) with the growth substratum and membrane of human endothelial cells // *Blood.* — 1987. — **70**, N 3. — P. 1090—1098.
82. *Nishioka J., Ning M., Hayashi T.* Protein C inhibitor secreted from activated platelets efficiently inhibits activated protein C on phosphatidylethanolamine of platelet membrane and microvesicles // *J. Biol. Chem.* — 1998. — **273**. — P. 11281—11287.
83. *Wiman B., Collen D.* Purification and characterization of human antiplasmin, the fast-acting plasmin inhibitor in plasma // *Eur. J. Biochem.* — 1977. — **78**, N 1. — P. 19—26.
84. *Wiman B., Collen D.* On the kinetics of the reaction between human antiplasmin and plasmin // *Ibid.* — 1978. — **84**, N 2. — P. 573—578.
85. *Bangert K., Johnsen A., Christensen U., Thorsen S.* Different NH₂-terminal forms of α_2 -plasmin inhibitor in human plasma // *Biochem. J.* — 1993. — **291**. — P. 623—625.
86. *Kluft C., Los N.* Demonstration of two forms of alpha 2-antiplasmin in plasma by modified crossed immunoelectrophoresis // *Thromb. Res.* — 1981. — **21**. — P. 65—71.
87. *Kimura S., Aoki N.* Cross-linking site in fibrinogen for alpha 2-plasmin inhibitor // *J. Biol. Chem.* — 1986. — **261**, N 33. — P. 15591—15595.
88. *Weisel J.W., Veklich Y., Collet J.P., Francis C.W.* Structural studies of fibrinolysis by electron and light microscopy // *Thromb. and Haemost.* — 1999. — **82**. — P. 277—282.
89. *Sakharov D.V., Plow E.F., Rijken D.C.* On the mechanism of the antifibrinolytic activity of plasma carboxypeptidase B // *J. Biol. Chem.* — 1997. — **272**. — P. 14477—14482.
90. *Веремеенко К.Н., Кизим А.И., Колесник Л.А.* α_2 -Макроглобулин и механизм его взаимодействия с протеиназами // *Вестн. АМН СССР.* — 1984. — № 8. — С. 60—64.
91. *Haverback B.J., Dyce B., Bundy H. et al.* Protein binding of pancreatic proteolytic enzymes // *J. Clin. Invest.* — 1962. — **41**, N 5. — P. 972—980.
92. *Веремеенко К.Н., Кизим А.И., Досенко В.Е.* α_2 -Макроглобулин: структура, физиологическая роль и клиническое значение // *Лаб. диагностика.* — 2000. — № 2. — С. 3—9.
93. *Feinman R.D.* The proteinase-binding reaction of α_2 -macroglobulin // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* — 1994. — **737**. — P. 245—266.
94. *Sottrup-Jensen L., Stepanin T.M., Kristensen T. et al.* Primary structure of human α_2 -macroglobulin // *J. Biol. Chem.* — 1984. — **259**, N 13. — P. 8318—8327.
95. *Bonner J.C., Badgett A., Hoffman M., Lindroos P.M.* Inhibition of platelet-derived growth factor-BB-induced fibroblast proliferation by plasmin-activated alpha 2-macroglobulin is mediated via an alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein-dependent mechanism // *Ibid.* — 1995. — **270**, N 11. — P. 6389—6395.
96. *Lysiak J.J., Hussaini I.M., Webb D.J. et al.* Alpha 2-macroglobulin functions as a cytokine carrier to induce nitric oxide synthesis and cause nitric oxide-dependent cytotoxicity in the RAW 264.7 macrophage cell line // *Ibid.* — 1995. — **270**, N 37. — P. 21919—21927.

97. *Sottrup-Jensen L.* Alpha-macroglobulins: structure, shape, and mechanism of proteinase complex formation // *Ibid.* — 1989. — **264**, N 20. — P. 11539—11542.
98. *Mosnier L.O., Buijtenhuijs P., Marx P.F. et al.* Identification of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) in human platelets // *Blood.* — 2003. — **101**, N 12. — P. 4844—4846.
99. *Bajzar L., Manuel R., Nesheim M.E.* Purification and characterization of TAFI, a thrombin activatable fibrinolysis inhibitor // *J. Biol. Chem.* — 1995. — **270**. — P. 14477—14484.
100. *Bajzar L., Nesheim M.E., Tracy P.B.* The profibrinolytic effect of activated protein C in clots formed from plasma is TAFI-dependent // *Blood.* — 1996. — **88**, N 6. — P. 2093—2100.
101. *Stromqvist M., Schaiteman K., Leurs J. et al.* Immunological assay for the determination of procarboxypeptidase U antigen levels in human plasma // *Thromb. and Haemost.* — 2001. — **85**, N 1. — P. 12—17.
102. *Wang W., Boffa M.B., Bajzar L. et al.* A study of the mechanism of inhibition of fibrinolysis by activated thrombin-activable fibrinolysis inhibitor // *J. Biol. Chem.* — 1998. — **273**, N 42. — P. 27176—27181.
103. *Eaton D.L., Malloy B.E., Tsai S.P. et al.* Isolation, molecular cloning, and partial characterization of a novel carboxypeptidase B from human plasma // *Ibid.* — 1991. — **266**, N 32. — P. 21833—21838.
104. *Bajzar L., Morser J., Nesheim M.* TAFI, or plasma procarboxypeptidase B, couples the coagulation and fibrinolytic cascades through the thrombin-thrombomodulin complex // *Ibid.* — 1996. — **271**, N 28. — P. 16603—16608.
105. *Mao S.S., Cooper C.M., Wood T. et al.* Characterization of plasmin-mediated activation of plasma procarboxypeptidase B. Modulation by glycosaminoglycans // *Ibid.* — 1999. — **274**, N 49. — P. 35046—35052.
106. *Boffa M.B., Wang W., Bajzar L., Nesheim M.E.* Plasma and recombinant thrombin-activable fibrinolysis inhibitor (TAFI) and activated TAFI compared with respect to glycosylation, thrombin/thrombomodulin-dependent activation, thermal stability, and enzymatic properties // *Ibid.* — 1998. — **273**, N 4. — P. 2127—2135.
107. *Broze G.J. Jr., Higuchi D.A.* Coagulation-dependent inhibition of fibrinolysis: role of carboxypeptidase-U and the premature lysis of clots from hemophilic plasma // *Blood.* — 1996. — **88**, N 10. — P. 3815—3823.
108. *Dahlback B.* The protein C anticoagulant system: inherited defects as basis for venous thrombosis // *Thromb. and Res.* — 1995. — **77**, N 1. — P. 1—43.
109. *Mosnier L.O., Meijers J.C., Bouma B.N.* Regulation of fibrinolysis in plasma by TAFI and protein C is dependent on the concentration of thrombomodulin // *Thromb. and Haemost.* — 2001. — **85**, N 1. — P. 5—11.
110. *Klement P., Liao P., Bajzar L.* A novel approach to arterial thrombolysis // *Blood.* — 1999. — **94**, N 8. — P. 2735—2743.
111. *Nagashima M., Werner M., Wang M. et al.* An inhibitor of activated thrombin-activable fibrinolysis inhibitor potentiates tissue-type plasminogen activator-induced thrombolysis in a rabbit jugular vein thrombolysis model // *Thromb. Res.* — 2000. — **98**, N 4. — P. 333—342.
112. *Colucci M., D'Aprile A.M., Italia A. et al.* Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) does not inhibit in vitro thrombolysis by pharmacological concentrations of t-PA // *Thromb. Haemost.* — 2001. — **85**, N 4. — P. 661—666.
113. *Bajzar L.* Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and an antifibrinolytic pathway // *Arterioscl., Thromb. and Vasc. Biol.* — 2000. — **20**. — P. 2511—2518.
114. *Van Tilburg N.H., Rosendaal F.R., Bertina R.M.* Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and the risk for deep vein thrombosis // *Blood.* — 2000. — **95**, N 9. — P. 2855—2859.
115. *Van Thiel D.H., George M., Fareed J.* Low levels of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) in patients with chronic liver disease // *Thromb. and Haemost.* — 2001. — **85**, N 4. — P. 667—670.
116. *Meijers J.C., Oudijk E.J., Mosnier L.O. et al.* Reduced activity of TAFI (thrombin-activable fibrinolysis inhibitor) in acute promyelocytic leukaemia // *Brit. J. Haematol.* — 2000. — **108**, N 3. — P. 518—523.

117. *Sakata Y., Loskutoff D.J., Gladson C.L. et al.* Mechanism of protein C-dependent clot lysis: role of plasminogen activator inhibitor // *Blood*. — 1986. — **68**, N 6. — P. 1218—1223.
118. *Sakata Y., Curriden S., Lawrence D. et al.* Activated protein C stimulates the fibrinolytic activity of cultured endothelial cells and decreases antiactivator activity // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. — 1985. — **82**, N 4. — P. 1121—1125.
119. *Rezaie A.R.* Vitronectin functions as a cofactor for rapid inhibition of activated protein C by plasminogen activator inhibitor-1. Implications for the mechanism of profibrinolytic action of activated protein C. // *J. Biol. Chem.* — 2001. — **276**, N 19. — P. 15567—15570.
120. *Bajzar L., Nesheim M.E., Tracy P.B.* The profibrinolytic effect of activated protein C in clots formed from plasma is TAFI-dependent // *Blood*. — 1996. — **88**, N 6. — P. 2093—2100.
121. *Mosnier L.O., Meijers J.C., Bouma B.N.* The role of protein S in the activation of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) and regulation of fibrinolysis // *Thromb. and Haemost.* — 2001. — **86**, N 4. — P. 1040—1046.
122. *Ben N.A., Wistedt A., Ringdahl U., Sjobring U.* Streptokinase activates plasminogen bound to human group C and G streptococci through M-like proteins // *Eur. J. Biochem.* — 1994. — **222**. — P. 267—276.
123. *Lottenberg R., DesJardin L.E., Wang H., Boyle M.D.* Streptokinase-producing streptococci grown in human plasma acquire unregulated cell-associated plasmin activity // *J. Infect. Dis.* — 1992. — **166**. — P. 436—440.
124. *Collen D.C., Gold H.K.* New developments in thrombolytic therapy // *Tromb. Res.* — 1990. — **10**, suppl. X. — P. 105—131.
125. *Malke H., Ferretti J.J.* Streptokinase: cloning, expression, and excretion by *Escherichia coli* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1984. — **81**. — P. 3557—3561.
126. *Huang T.-T., Malke H., Ferretti J.J.* The streptokinase gene of group A streptococci cloning, expression in *Escherichia coli*, and sequence analysis // *Mol. Microbiol.* — 1989. — **3**, N 2. — P. 197—205.
127. *Jackson K.W., Tang J.* Complete amino acid sequence of streptokinase and its homology with serine protease // *Biochemistry*. — 1982. — **21**. — P. 6620—6625.
128. *Brockway W.J., Castellino F.J.* A characterization of native streptokinase and altered streptokinase isolated from a human plasminogen activator complex // *Ibid.* — 1974. — **13**. — P. 2063—2070.
129. *Parrado J., Conejero-Lara F., Smith R.A.G.* The domain organisation of streptokinase: Nuclear magnetic resonance, circular dichroism, and functional characterization of proteolytic fragments // *Protein Sci.* — 1996. — **5**. — P. 693—704.
130. *Кудинов С.А., Гриненко Т.В.* Активация плазминогена стрептокиназой // *Энзимология тромболитика и стрептокиназа*. — Минск: Белорус. НИИ эпидемиологии и микробиологии, 1982. — С. 34—40.
131. *Kline D.L., Reddy K.N.N.* Fibrinolysis. — Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc., 1980. — P. 243.
132. *Barlow G.H., Summaria L., Robbins K.C.* Hydrodynamic studies on the streptokinase complexes of human plasminogen, Val-442 plasminogen, plasmin, and the plasmin-derived light (B) chain // *Biochemistry*. — 1981. — **23**. — P. 2384—2387.
133. *Rodriguez P., Fuentes D., Munoz E. et al.* The streptokinase domains responsible for plasminogen binding // *Fibrinolysis*. — 1994. — **8**. — P. 276—285.
134. *Radek J.T., Castellino F.J.* Conformational properties of streptokinase // *J. Biol. Chem.* — 1989. — **264**. — P. 9915—9922.
135. *Welfle H., Misselwitz R., Fabian H.* Conformational properties of streptokinase — secondary structure and localization of aromatic amino acids // *Int. J. Biol. Macromol.* — 1992. — **14**. — P. 9—22.
136. *Medved L.V., Solovjov D.A., Ingham K.C.* Domain structure, stability and interaction in streptokinase // *Eur. Biochem. J.* — 1996. — **239**. — P. 333—339.
137. *Teuten A.J., Broadhurst R.W., Smith R.A.G., Dobson C.M.* Characterization of structural and folding properties of streptokinase by n.m.r. spectroscopy // *Biochem. J.* — 1993. — **290**. — P. 313—319.

138. *Welfle K., Misselwitz R., Schaup A. et al.* Conformation and stability of streptokinases from nephritogenic and nonnephritogenic strains of streptococci // *Proteins.* — 1997. — **27.** — P. 26—35.
139. *Reddy K.N.N.* Streptokinase — biochemistry and clinical application // *Enzyme.* — 1988. — **40.** — P. 79—89.
140. *Summaria L., Wohl R.C., Boreisha I.G., Robbins H.C.* A virgin enzyme derived from human plasminogen. Specific cleavage of the Arg560-Valile peptide bond in the diisopropoxyphenyl virgin enzyme by plasminogen activators // *Biochemistry.* — 1982. — **21.** — P. 2056—2059.
141. *Castellino F.J., Urano T., de Ceprano V.* Control of human plasminogen activation // *Haemostasis.* — 1988. — **18.** — P. 15—23.
142. *Shi G., Chang B., Wu D., Wu H.* Interaction of immobilized human plasminogen and plasmin with streptokinase // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* — 1993. — **195.** — P. 192—200.
143. *Cederholm-Williams S.A., De Cock F., Lijnen H.R., Collen D.* Kinetics of the reactions between streptokinase, plasmin and a₂-antiplasmin // *Eur. J. Biochem.* — 1979. — **100.** — P. 125—132.
144. *Edelberg J.M., Gonzalez-Gronow M., Pizzo S.V.* Lipoprotein a inhibits streptokinase-mediated activation of human plasminogen // *Biochemistry.* — 1989. — **28.** — P. 2370—2374.
145. *Аковлев С.А.* Роль отдельных участков плазминогена в активации его стрептокиназой: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Киев, 1997. — 16 с.
146. *Powell J.R., Castellino F.J.* Activation of human neoplasminogen-Val442 by urokinase and streptokinase and kinetic characterization of neo-plasmin-Val442 // *J. Biol. Chem.* — 1980. — **255.** — P. 5329—5335.
147. *Summaria L., Robbins K.C.* Isolation of a human plasmin-derived, functionally active, light (B) chain capable of forming with streptokinase an equimolar light (B) chain-streptokinase complex with plasminogen activator activity // *Ibid.* — 1976. — **251.** — P. 5810—5813.
148. *Serrano R.L., Rodriguez P., Pizzo S.V., Gonzalez-Gronow M.* ATP-regulated activity of the plasmin-streptokinase complex: a novel mechanism involving phosphorylation of streptokinase // *Biochem. J.* — 1996. — **313.** — P. 171—177.
149. *Leigh J.A.* Activation of bovine plasminogen by *Streptococcus uberis* // *FEMS Microbiol. Lett.* — 1993. — **114.** — P. 67—71.
150. *Ellis R.P., Armstrong C.H.* Production of capsules, streptokinase, and streptodornase by *Streptococcus* group E // *Amer. J. Vet. Res.* — 1971. — **32.** — P. 349—356.
151. *Marcum J.A., Kline D.L.* Species specificity of streptokinase // *Comp. Biochem. and Physiol.* — 1983. — **75,** N 3. — P. 389—394.
152. *Nikandrov V.N., Vorobyova G.V., Yankovskaya G.S., Demidchik N.V.* Conformation ability test of human, rabbit and bovine plasminogens and their specific interaction with streptokinase // *Int. J. Biol. Macromol.* — 1992. — **14.** — P. 229—234.
153. *Бокарев И.Н., Довголис С.А.* Тромболитическая терапия инфаркта миокарда // *РМЖ.* — 1998. — **6,** № 3. — С. 15—24.
154. *Сидоренко Б.А., Преображенский Д.В.* Клиническое применение антитромботических препаратов. — М.: Медицина, 1998. — 176 с.

К главе 4

1. *Исследования системы крови в клинической практике /* Под ред. Г.И. Козинца, В.А. Макарова. — М.:Триада-Х, 1997. — 495 с.
2. *Wu K.K., Thiagarajan P.* Role of endothelium in thrombosis and hemostasis // *Ann. Rev. Med.* — 1996. — **47.** — P. 315—331.
3. *Cines D.B., Pollak E.S., Buck C.A.* Endothelial Cells in Physiology and in the Pathophysiology of Vascular Disorders // *Blood.* — 1998. — **91,** N 10. — P. 3527—3561.
4. *Vanhoutte P.M., Scott-Burder T.* The endothelium in health and disease // *Mol. and Cell. Cardiol.* — 1994. — **21,** N 1. — P. 62—67.
5. *Byzova T.V., Plow E.F.* Networking in the hemostatic system // *J. Biol. Chem.* — 1997. — **272,** N 43. — P. 27183—27188.

6. *Henri R., Lijnen H.R., Collen D.* Endothelium in haemostasis and thrombosis // *Progr. Cardio. Disease.* — 1997. — **39**. — P. 343—350.
7. *Gawaz M.P.* Blood platelets: physiology, pathophophysiology, membrane receptors, antiplatelet principles and therapy for atherothrombotic disease. — Stuttgart; New York: Thieme, 2001. — 190 p.
8. *Haller H.* Endothelial function. General considerations // *Drugs.* — 1997. — **53**, suppl. 1. — P. 1—10.
9. *Luscher T.F., Barton M.* Biology of the endothelium // *Clin. Cardiol.* — 1997. — **11**, (suppl. 2):II. — P. 3—10.
10. *Grabowski E.F., Jaffe E.A., Wekster B.B.* Prostacyclin production by cultured endothelial cell monolayers exposed to step increases in shear stress // *J. Lab. and Clin. Med.* — 1985. — **105**, N 1. — P. 36—43.
11. *Smzinger H., Uhn M.R., Neumann I. et al.* The prostacyclin stimulating plasma factor activity improves thromboresistance only if vascular PGI₂-production is intact // *Thromb. Res.* — 1996. — **84**, N 6. — P. 475—480.
12. *Гомазков О.А.* Эндотелин в кардиологии: молекулярные, физиологические и патологические аспекты // *Кардиология.* — 2001. — № 2. — С. 50—58.
13. *Smith O., Gilbert M., Owen W.G.* Tissue plasminogen activator release in vivo in response to vasoactive agents // *Blood.* — 1985. — **66**, N 3. — P. 835—839.
14. *Desire C., Lijnen H.R.* Fibrinolysis and the control of hemostasis // *The molecular basis of blood diseases.* London; New York: W.B. Saunders comp., 1987. — P. 662—679.
15. *Weiler H., Iserman B.H.* Thrombomodulin // *J. Thromb. Haemost.* — 2003. — **1**, N 7. — P. 1515—1524.
16. *Бодачева Н.В., Гарсия Дж.Г., Верин А.Д.* Молекулярные механизмы индуцированной тромбином проницаемости эндотелия // *Биохимия.* — 2002. — **67**, № 1. — С. 88—98.
17. *Curell R., Skinner R., Jin L., Abruham J.P.* Structural mobility of antithrombin and its modulation by heparin // *Thromb. and Haemost.* — 1997. — **78**, N 1. — P. 516—519.
18. *Marciniak E.* Thrombin-induced proteolysis of human antithrombin III: an outstanding contribution of heparin // *Brit. J. Hamatol.* — 1981. — **48**, N 21. — P. 325—336.
19. *Sambrano G.R., Weiss E.J., Zheng Y.-W., Coughlin S.R.* Role of thrombin signalling in platelets in haemostasis and thrombosis // *Nature.* — 2001. — **413**, N 6851. — P. 26—27.
20. *Cines D.B., Pollak E.S., Buck C.A.* Endothelial Cells in Physiology and in the Pathophysiology of Vascular Disorders // *Blood.* — 1998. — **91**, N 10. — P. 3527—3561.
21. *Киберева В.К., Гершкович А.А., Серебряный С.Б.* Структурные основы специфичности тромбина. Роль вторичных взаимодействий // *Биохимия.* — 1983. — **48**, № 6. — С. 937—943.
22. *Гершкович О.А., Кібірев В.К., Зубак С.В., Серебряный С.Б.* Антитромбінова активність синтетичних пептидів — аналогів ділянки 30-44 Аα-ланцюга фібриногену // *Доп. АН УССР. Сер. Б.* — 1986. — № 5. — С. 59—62.
23. *Струкова С.М.* Тромбин — регулятор процессов воспаления и репарации тканей // *Биохимия.* — 2001. — **66**, № 1. — С. 14—27.
24. *Струкова С.М., Струков А.И.* Тромбоз // *Общая патология человека.* — М.: Трианда-Х, 1990. — С. 297—360.
25. *Fenton J.W.* Structural regions and bioregulatory functions of thrombin // *Control of animal cell proliferation.* — New York: Acad. Press, 1987. — P. 133—151.
26. *Shuman M.A.* Thrombin — cellular interactions // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* — 1986. — **485**. — P. 228—239.
27. *Brouwers G.J., Vos H.L., Leebeek F.W., Bulk S.* A novel, possibly functional, single nucleotide polymorphism in the coding region of the thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) gene is also associated with TAFI levels // *Blood.* — 2001. — **98**, N 6. — P. 1992—1995.
28. *Sprengers E.D., Kluft C.* Plasminogen activator inhibitors // *Ibid.* — 1987. — **69**, N 1. — P. 381—387.
29. *Bode W., Huber R.* Proteinase-protein inhibitor interaction // *Fibrinolysis.* — 1995. — **9**, suppl. 1. — P. 161—171.

30. *Stefansson S., Haudenschild C., Lawrence D.A.* Beyond fibrinolysis: the role of plasminogen activator inhibitor and vitronectin in vascular wound healing // *Trends Cardiovascul. Med.* — 1998. — **8**. — P. 175—180.
31. *Hekman C.M., Loskutoff D.J.* Endothelial cells produce a latent inhibitor of plasminogen activators that can be activated by denaturants // *J. Biol. Chem.* — 1985. — **260**, N 21. — P. 11581—11587.
32. *Levin E., Santell L.* Association of a plasminogen activator inhibitor (PAI-1) with the growth substratum and membrane of human endothelial cells // *Blood.* — 1987. — **70**, N 3. — P. 1090—1098.
33. *Alessi M.C., Juhan-Vague I., Declerck P.J., Collen D.* Molecular forms of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) and tissue-type plasminogen activator (t-PA) in human plasma // *Thromb. Res.* — 1991. — **62**, N 4. — P. 275—285.
34. *Bokarewa M.I., Morrisey J.H., Tarkowski A.* Tissue factor as a proinflammatory agent // *Arthritis Res.* — 2002. — **4**. — P. 190—195.
35. *Nesheim M.E., Wang W., Boffa M.* Thrombin, thrombomodulin and TAFI in the molecular link between coagulation and fibrinolysis // *Thromb. and Haemost.* — 1997. — **78**. — P. 386—391.
36. Фермилен Ж., Ферстрате М. Тромбозы. — М: Медицина, 1986. — 125 с.
37. Панченко Е.П., Добровольский А.Б. Тромбозы в кардиологии. Механизмы развития и возможности терапии. — М: Спорт и культура, 1999. — 94 с.
38. *Prevost N., Woulfe D., Tognolini M., Brass L.F.* Contact-dependent signaling during the late events of platelet activation // *J. Thromb. Haemost.* — 2003. — **1**, N 7. — P. 1613—1627.
39. *Bennett J.S.* Platelet-Fibrinogen Interactions // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* — 2001. — **936**. — P. 340—354.
40. *Kroll M.H., Hellums D., McIntire L.V. et al.* Platelets and shear stress // *Blood.* — 1996. — **88**, N 5. — P. 1525—1541.
41. *Cattaneo M.* Inherited platelet-based bleeding disorders // *J. Thromb. Haemost.* — 2003. — **1**, N 7. — P. 1628—1636.
42. Черний В.И., Кабанько Т.П., Кузнецова И.В. Нарушения в системе гемостаза при критических состояниях. — Киев: Здоровья, 2000. — 107 с.
43. Савицкий Г.А., Иванова Р.Д., Шеглов И.Ю., Попов П.А. Хирургическое лечение синдрома тазовых болей в гинекологической клинике. — М.: ООО Изд-во Новая Линия, 2000. — 137 с.
44. Савельев В.С., Гологорский В.А., Кириенко А.И. и др. Флебология: руководство для врачей. — М.: Медицина, 2001. — С. 279—319.
45. Шифман Е.М. Преэклампсия, эклампсия, HELLP-синдром. — Петрозаводск: ИнтелТек, 2002. — 432 с.
46. Тодуров Б.М., Ковтун Г.И., Гончаренко Н.В. и др. Хирургическое лечение тромбоэмболии легочной артерии в сочетании с тромбозом нижней полой вены // Актуальні проблеми тромбозу і порушень гемостазу в клінічній медицині: Матеріали наук.-практ. конф. — К.: Четверта хвиля, 2003. — С. 106—107.
47. *Kokkola A., Naarinen R., Laxen F. et al.* Risk of gastric carcinoma in patients with mucosal dysplasia associated with atrophic gastritis: a follow up study // *J. Clin. Pathol.* — 1996. — **49**. — P. 979—984.
48. Мазур А.П., Тодуров Б.М., Сморжевский В.И. и др. Профилактика и лечение тромбоэмболии легочной артерии // *Клін. хірургія.* — 2002. — № 10. — С. 27—30.
49. Айламазян Э.К., Новикова Б.Н., Павлова Л.П. и др. Неотложная помощь при экстремальных состояниях в акушерской практике: Руководство. — М.: ООО Изд-во Новая Линия, 2002. — 432 с.
50. Евдокимов А.Г., Тополянский В.Д. Болезни артерий и вен: Справ. руководство для практ. врача. — 2-е изд. — М.: Сов. спорт, 2001. — С. 85—86.
51. Сенчук А.А., Венцовский Б.М., Гарник Т.П. Тромбоэмболические осложнения в акушерстве и гинекологии. — Киев: Маком, 2003. — 360 с.
52. Корячкин В.А. Эмболии и тромбозы // Интенсивная терапия угрожающих состояний / Под ред. В.А. Корячкина и В.А. Страшнова. — СПб.: Санкт-Петерб. мед. изд-во, 2002. — С. 196—204.

53. *Гинекология* по Эмилю Новаку / Под ред. Дж. Берека, И. Адаши, П. Хиллард: Пер. с англ. — М.: Практика, 2002. — 896 с.
54. *Detarmels F., Lammler B., Luthy A.R.* Inferior vena cava thrombosis in a child with nephroblastoma and combined deficiency of antithrombin III and free protein S. // *Blut.* — 1990. — **61**, N 5. — P. 295—297.
55. *Баркаган З.С., Момот А.П.* Основы диагностики нарушений гемостаза. — М.: Ньюдиамед-АО, 1999. — 224 с.
56. *Bonnar J.* Can more be done in obstetric and gynecologic practice to reduce morbidity and mortality associated with venous thromboembolism? // *Amer. J. Obstet. and Gynecol.* — 1996. — **39**. — P. 87—100.
57. *Peddi V.R., Kant K.S.* Catastrophic secondary antiphospholipid syndrome with concomitant antithrombin III deficiency // *Amer. J. Soc. Nephrol.* — 1995. — N 5(11). — P. 1882—1887.
58. *Perry P.J., Herron G.R., King J.C.* Heparin half-life in normal and impaired renal function // *Clin. Pharmacol. Res.* — 1974. — **16**. — P. 514—516.
59. *Баркаган З.С.* Геморрагические заболевания и синдромы. — М.: Медицина, 1988. — 527 с.
60. *Баркаган З.С.* Классификация гематогенных тромбофилий // Клинико-лабораторная диагностика претромбоза и тромботических состояний. — СПб.: Санкт-Петербург. мед. изд-во, 1991. — С. 5—15.
61. *Баркаган З.С., Момот А.П.* Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза. — 2-е изд., доп. — М.: Ньюдиамед, 2001. — 296 с.
62. *Макаров О.В., Озолина Л.А.* Венозные тромбозы в акушерстве и гинекологии. — М.: АО ПЦ “Эфир”, 1998. — 261 с.
63. *Макацария А.Д., Мищенко А.Л., Бицадзе В.О., Макаров С.В.* Синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови в акушерской практике. — М.: Триада-Х, 2002. — 495 с.
64. *Fan S.Z., Yeh M., Tsay W.* Caesarean section in a patient with protein S deficiency // *Anaesthesia.* — 1995. — N 50(3). — P. 251—253.
65. *Samaha M., Trossaert M., Conard J. et al.* Prevalence and patient profile in activated protein C resistance // *Amer. J. Clin. Pathol.* — 1995. — N 104(4). — P. 450—454.
66. *Faught W., Garner P., Schaller M.D. et al.* Changes in protein C and protein S levels in normal pregnancy. // *Amer. G. Obstet. and Gynec.* — 1995. — N 72. — P. 147—150.
67. *Lefkowitz J.B., Clarke S., Barbour L.* Comparison of protein S function and antigenic assays in normal pregnancy // *Ibid.* — 1996. — **175**. — P. 660—675.
68. *Ridker P.M., Miletich J.P., Tangemann K. et al.* Ethnic distribution of factor V leiden in 4047 men and women: implications for venous thromboembolism screening // *JAMA.* — 1997. — **277**. — P. 1305—1307.
69. *Фаткуллин И.Ф., Зубаиров Д.М.* Наследственные и приобретенные дефекты системы гемостаза в акушерско-гинекологической практике. — М.: МЕДпрессинформ, 2002. — 64 с.
70. *Марченко Л.А., Макацария А.Д., Барабанова Е.В.* Влияние заместительной терапии на систему гемостаза при патологическом климактерии // *Акушерство и гинекология.* — 1986. — № 5. — С. 35—38.
71. *Hughes G.R.* The antiphospholipid syndrome: ten years on // *Lancet.* — 1993. — **342**. — N 8867. — P. 486—489.
72. *Triplett D.A.* Protein clinical presentation of antiphospholipid — protein antibodies (APA) // *Thromb. and Haemost.* — 1995. — N 74(1). — P. 329—337.
73. *Бокарев И.Н., Щепотин Б.М., Ена Я.М.* Внутрисосудистое свертывание крови. — Киев: Здоровья, 1989. — 240 с.
74. *Жизневский Я.А.* Основы инфузионной терапии: Справочно-практическое пособие. — Минск: Вышэйш. шк., 1994. — 228 с.
75. *Назаренко Г.И., Кишкун А.А.* Клиническая оценка результатов лабораторных исследований. — М.: Медицина, 2002. — 544 с.
76. *Мачабели М.С.* Тромбеморрагическая теория общей патологии // *Успехи физиол. наук.* — 1986. — **17**, № 2. — С. 56—82.

77. Грицюк А.И., Амосова Е.Н., Грицюк И.А. Практическая гемостазиология. — Киев: Здоровья, 1994. — 256 с.
78. Зубаиров Д.М. Молекулярные основы свертывания крови и тромбообразования. — Казань: Фэн, 2000. — 364 с.
79. Bick R.L. Disseminated intravascular coagulation and related syndromes: etiology, pathophysiology, diagnosis, and management // Amer. J. Hematol. — 1978. — 5, N 3. — С. 265—282.
80. Сидоркина А.Н., Сидоркин В.Г., Преснякова М.В. Биохимические основы системы гемостаза и диссеминированное внутрисосудистое свертывание крови // Н. Новгород: ННИИТО, 2005. — 112 с.
81. Федорова З.Д., Кацадзе Ю.Л., Котовщикова М.А. и др. Клинические и экспериментальные аспекты регуляции агрегатного состояния крови // Тр. Саратов. мед. ин-та. — Саратов: Изд-во Саратов. мед. ин-та, 1984. — Т. 128. — С. 64—67.
82. Баркаган З.С. Руководство по гематологии. — М.: Медицина, 1985. — Т. 2. — С. 290—311.
83. Бышевский А.Ш., Терсенов О.А. Биохимия для врача. — Екатеринбург: Урал. рабочий, 1994. — 383 с.
84. Воробьев П.А. Синдромы диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови. — М.: Ньюдиамед, 1994. — 32 с.
85. Балуда В.П., Балуда М.В., Деянов И.И., Теплуков И.К. Физиология системы гемостаза: Пособие для студентов и слушателей ин-тов усовершенств. врачей. — М., 1995. — 243 с.
86. Балуда В.П., Деянов И.И., Балуда М.В. и др. Профилактика тромбозов. — Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 1992. — 176 с.
87. Лычев В.Г. Диагностика и лечение диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови. — М.: Медицина, 1993. — 159 с.
88. Мокеев И.Н. Справочник по инфузионно-трансфузионной терапии. Общая часть. — Н. Новгород: Изд-во НГМА, 1996. — 216 с.
89. Мачабели М.С. Коагулопатические синдромы. — М.: Медицина, 1970. — 304 с.
90. Walker F.J. Regulation of activated protein C by a new protein. A possible function for bovine protein S. // J. Biol. Chem. — 1980. — 255, N 12. — P. 5521—5524.
91. Bick R.L. Clinical implications of molecular markers in hemostasis and thrombosis // Semin. Thromb. and Haemost. — 1984. — 10, N 4. — P. 290—293.
92. Textbook of anaesthesia / Ed. by A.R. Aitkenhead, G. Smith. — London; New York, 1990. — P. 129—137.
93. Балуда В.П. Актуальные проблемы гемостазиологии // Молекулярно-биологические и физиологические аспекты. — М.: Наука, 1979. — С. 14—26.
94. Toh C.H., Dennis M. Disseminated intravascular coagulation: old disease, new hope // BMJ. — 2003. — N 327. — P. 974—977.
95. Bick R.L. Disseminated intravascular coagulation and related syndromes: A clinical review // Semin. Thromb. and Haemost. — 1988. — 14, N 4. — P. 299—337.
96. Love G.D., Prentice C.R. Haemostasis and Thrombosis. — London, 1985. — P. 284—318.

К главе 5

1. Момот А.П. Принципы, методы и средства лабораторной диагностики патологии гемостаза на современном этапе // Лаб. диагностика. — 2004. — № 2. — С. 52—70.
2. Hoffman R., Benz E.J., Shatti S.J. et al. Hematology: Basic Principles and Practice. — 2nd end. — New York: Churchill Livingstone, 1995. — 2369 p.
3. Исследование системы крови в клинической практике / Под ред. Г.И. Козинца, В.А. Макарова. — М.: Триада-Х, 1997. — 480 с.
4. Вавилова Т.В. Антитромботическая терапия и методы ее лабораторного контроля // Клин. лаб. диагностика. — 2004. — № 12. — С. 12—34.
5. Баркаган З.С., Момот А.П. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза. — 2-е изд., доп. — М.: Ньюдиамед-АО, 2001. — 296 с.

6. Назаренко Г.И., Кишкун А.А. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований. — М.: Медицина, 2000. — 451 с.
7. Michiels J.J., Hamulyak K. Laboratory diagnosis of hereditary thrombophilia // *Semin. Thromb. and Haemost.* — 1998. — 24, N 4. — P. 309—320.
8. Меньшиков В.В. Лабораторные методы исследования в клинике. — М.: Медицина, 1987. — 221 с.
9. Иванов Е.П. Диагностика нарушений гемостаза. — Минск: Беларусь, 1983. — 221 с.
10. Токар А.В., Макогоненко Е.М., Платонова Т.М. та ін. Сучасні методи лабораторної діагностики внутрішньосудинного мікрозсідання крові: Метод. рекомендації. — К., 1994. — 22 с.
11. Платонова Т.М., Чернишенко Т.М., Горницька О.В. та ін. Лабораторна діагностика стану системи гемостазу // *Укр. біохім. журн.* — 2000. — 72, № 6. — С. 67—73.
12. Братчик А.М. Клинические проблемы фибринолиза. — Киев: Здоровья, 1993. — 344 с.
13. Белицер В.О., Варецка Т.В., Веремснко К.М. та ін. Кількісне визначення фібриногену в плазмі крові людини // *Лаб. діагностика.* — 1997. — № 2. — С. 53—55.
14. Платонова Т.М., Сушко О.О., Лукінова Н.І. Аналіз порушення фази фібриноутворення у практично здорових осіб похилого та старечого віку за допомогою анцистронового тесту // *Фізіол. журн.* — 1994. — 40, № 3/4. — С. 63—70.
15. Соколовська А.С., Платонова Т.М., Гриненко Т.В. та ін. Порівняльна характеристика методів визначення вмісту фібриногену в плазмі крові // *Експерим. та клін. фізіологія і біохімія.* — 2002. — № 3. — С. 82—86.
16. Михаловская Л.И., Варецка Т.В., Белицер В.А. Взаимодействие фибриногена и фибрина с протаминсульфатом // *Укр. биохим. журн.* — 1988. — 60, № 4. — С. 3—8.
17. Варецкая Т.В., Михаловская Л.И., Свистальская Л.А., Ена Я.М. Определение растворимого фибрина в плазме крови // *Клин. лаб. диагностика.* — 1992. — № 7/8. — С. 10—14.
18. Белицер В.А., Мусялковская А.А., Платонова Т.Н., Ена Я.М. Определение активности антитромбина III в плазме крови // *Лаб. дело.* — 1987. — № 4. — С. 241—320.
19. Горницькая О.В., Платонова Т.Н., Волков Г.Л. Ферменты змеиных ядов // *Укр. биохим. журн.* — 2003. — 75, № 3. — С. 22—32.
20. Платонова Т.М., Горницька О.В., Мороз Є.Д. Застосування активатора протеїну С з отрути щитомордника (*Agkistrodon halys halys*) для визначення активності протеїну С у плазмі крові за різних патологій // *Лаб. діагностика.* — 2001. — № 3. — С. 28—31.
21. Методы исследования фибринолитической системы крови / Под ред. Г.В. Андренко. — М.: Изд-во Моск. ун-та., 1981. — 131 с.
22. Савчук О.М., Краснобрижа Є.М., Макогоненко Є.М. Визначення активності тканинного активатора плазміногену у хворих на гострий інфаркт міокарда // *Експерим. та клін. фізіологія і біохімія.* — 2002. — № 3. — С. 87—92.
23. Платонова Т.Н., Чернышенко Т.М., Савчук А.Н. и др. Определение активности тканевого активатора плазминогена и содержания растворимого фибрина в плазме больных с различной патологией // *Лаб. диагностика.* — 2000. — № 2. — С. 15—18.
24. Белицер В.А., Мусялковская А.А., Платонова Т.Н., Ена Я.М. Определение активности антитромбина III в плазме крови // *Лаб. дело.* — 1987. — № 4. — С. 255—258.
25. Беляев А.В., Заремба А.М., Платонова Т.Н. Гемостаз у больных, оперированных по поводу абдоминальных кровотечений. 4. Концепция изменений гемостаза // *Укр. биохим. журн.*, 1997. — 69, № 5/6. — С. 190—195.
26. Беляев А.В., Заремба А.М., Платонова Т.Н. Гемостаз у больных, оперированных по поводу абдоминальных кровотечений. 3. Крайние варианты отклонения гемостаза // *Укр. биохим. журн.*, 1997. — 69, № 5/6. — С. 183—190.
27. Беляев А.В., Заремба А.М., Платонова Т.Н. Гемостаз у больных, оперированных по поводу абдоминальных кровотечений. 4. Характеристика процесса активации факторов системы свертывания крови // Там само, 1997. — 69, № 4. — С. 112—118.
28. Голота В.Я., Гамісонія М.Ш., Платонова Т.М., Макогоненко Є.М. Діагностика предтромботичного стану за допомогою сучасних коагулологічних тестів в акушерській практиці // *Лаб. діагностика.* — 1998. — № 3. — С. 15—17.

29. Платонова Т.М., Чернишенко Т.М., Горницька О.В. та ін. Лабораторна діагностика стану системи гемостазу // Укр. біохім. журн. — 2000. — 72, № 6. — С. 67—73.
30. Голота В.Я., Гамісонія М.Ш., Платонова Т.М., Макогоненко Є.М. Рання діагностика і профілактика тромботичних ускладнень після операції кесарського розтину // Педіатрія, акушерство і гінекологія. — 2000. — № 3. — С. 104—107.
31. Платонова Т.М., Ровінська І.М., Савчук О.М. Стан системи гемостазу при гострому інфаркті міокарда в ході лікування стрептокіназою // Лаб. діагностика. — 2001. — № 1. — С. 3—6.
32. Петик А.В., Платонова Т.Н., Андрианов С.И. и др. Показатели системы гемостаза при развитии карциномы льюисы // Эксперим. онкология. — 2001. — 23, № 1. — С. 73—75.
33. Пархоменко А.Н., Иркин О.И., Скаржевский А.А. и др. Антикоагулянтная активность надропарина у больных с острым инфарктом миокарда после фибринолитической терапии стрептокиназой // Укр. мед. часопис. — 2001. — № 1(21). — С. 23—27.
34. Платонова Т.М., Горницька О.В., Мстелицина І.П., Савчук О.М. Компоненти системи зсідання крові та фібринолізу в субретинальній рідині у людей з регматогенним відшаруванням сітківки ока // Мед. хімія. — 2001. — № 4. — С. 5—8.
35. Платонова Т.М., Савчук О.М., Горницька О.В. та ін. Особливості порушень стану системи гемостазу при цукровому діабеті // Мед. хімія. — 2002. — 4, № 2. — С. 5—9.
36. Савчук О.М., Краснобрижа Є.М., Чернишенко Т.М. та ін. Особливості порушення системи гемостазу при серцево-судинних захворюваннях // Міжвідомчий збірник “Гематологія і переливання крові”: — Матеріали міжнар. симп. “Гемостаз — проблеми и перспективы”, 5—6 листоп. 2002 р., Київ. — 2002. — Вип. 31. — С. 94—99.
37. Савчук О.М., Платонова Т.М., Волков Г.Л. та ін. Комплексна лабораторна діагностика порушень системи гемостазу при дисемінованому внутрішньосудинному зсіданні крові // Матеріали II міжнародної наук. конф. “Мікроциркуляція та її вікові зміни”. — 2002. — К., 2002. — С. 269—270.
38. Козинец Г.П., Коваленко О.Н., Платонова Т.М., Козинец К.Г. Принципы гемостатической терапии при проведении ранних оперативных вмешательств у тяжело обожженных больных // Матеріали II міжнар. наук. конф. “Мікроциркуляція та її вікові зміни”. — К., 2002. — С. 199—204.
39. Платонова Т.М., Савчук О.М., Козинец К.Г., Малинська Л.М. Діагностика порушень системи гемостазу при глибоких опіках // Експерим. та клін. фізіологія і біохімія. — 2002. — № 2. — С. 44—47.
40. Yee K.O., Schwatz S.M. Why atherosclerotic vessels narrow: the fibrin hypothesis // Thromb. and Haemost. — 1999. — 82, N 2. — P. 762—771.
41. Galvani M., Ferrini D., Ottani F., Eisenberg P.R. Early risk stratification of unstable angina/non-Q myocardial infarction: biochemical markers of coronary thrombosis // Int. J. Cardiol. — 1999. — 68, suppl. 1. — P. 55—61.
42. Соловьев Д.А., Угарова Т.П. Выделение и характеристика α -специфичных тромбиноподобных ферментов из ядов щитомордника обыкновенного (*Agkistrodon halys halys*) и щитомордника восточного (среднеазиатский подвид *Agkistrodon halys blomhoffii*) // Биохимия. — 1993. — 58, № 8. — С. 1221—1233.
43. Платонова Т.М., Соловйов Д.О., Єна Я.М. Визначення вмісту фібриногену в плазмі крові людини за допомогою тромбіноподібного ферменту анцистрону-Н та аналіз стану гемостазу при наявності інгібіторів зсідання крові // Фізіол. журн. — 1993. — № 1. — С. 15—19.
44. Соловьев Д.А., Платонова Т.Н., Угарова Т.П. Выделение и характеристика экамулина — активатора протромбина из яда эфы многочиселуистой // Биохимия. — 1996. — 61, № 6. — С. 1094—1105.
45. Karnalik F. Use of ecarin in diagnosis of coagulant disorders // Haemos. and animal venoms in hematology. — 1985. — 7. — P. 603—610.
46. Wilkes H.C., Meade T.W., Barzegar S. et al. Gemfibrozil reduces plasma prothrombin fragment F_{1+2} concentration, a marker of coagulability, in patients with coronary heart disease // Thromb. and Haemost. — 1992. — 67, N 5. — P. 503—506.

47. Платонова Т.Н., Сушко Е.А., Петров А.В., Соловьев Д.А. Определение общего уровня протромбина и выявление его функционально неактивных форм с помощью фермента экамулина, выделенного из яда эфы многощупчатой // Укр. биохим. журн. — 1995. — 67, № 4. — С. 75—80.
48. Горницкая О.В., Платонова Т.Н. Выделение и свойства протеина С из яда Щитомордника обыкновенного (*Agkistrodon halys halys*) // Вопр. мед. химии. — 2001. — № 2.
49. Smith F.B., Lee A.J., Rumley A. Tissue — plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor and risk of peripheral arterial disease // *Thromb. and Haemost.* — 1995. — 73 (5). — P. 835—840.
50. Stirling Y., Woolf L., North W.R. Haemostasis in normal pregnancy // *Ibid.* — 1984. — 52, N 2. — P. 176—182.
51. Eriksson B., Eriksson E., Gyzander E. et al. Thrombosis after hip replacement. Relationship to the fibrinolytic system // *Acta Orthop. Scand.* — 1989. — 60. — P. 159—163.
52. Wilson L., Francis G.E. Differentiation-linked secretion of urokinase and tissue plasminogen activator by normal human hemopoietic cells // *J. Exp. Med.* — 1987. — 165. — P. 1609—1623.
53. Chan H., Jia H., Song H., Wang J. Changes in plasma levels of tissue plasminogen activator and its inhibitor in aged myocardial infarction patients // *Clin. Med. J. (Engl.)*. — 1990. — 103, N 7. — P. 541—545.
54. Booth S.L. Skeletal functions of vitamin K-dependent proteins: not just for clotting anymore // *Nutr. Rev.* — 1997. — 55, N 7. — P. 282—284.
55. Hill M.J. Intestinal flora and endogenous vitamin sintesis // *Eur. J. Cancer. Prev.* — 1997. — Suppl., N 1. — P. 43—45.
56. Косырев А.Б., Добровольский А.Б. Современные методы лабораторного контроля антикоагулянтной терапии // *Лаб. медицина.* — 1998. — № 1. — С. 20—24.
57. Rosendaal F.R., Cannegieter S.C., van der Meer F.J.M., Brieff E. A method to determine the optimal intensity of oral anticoagulant therapy // *Thromb. and Haemost.* — 1993. — 69, N 3. — P. 236—239.
58. Solano C., Cobcroft R.G., Scott D.C. Prediction of vitamin K response using the echis time and echis-prothrombin time ratio // *Ibid.* — 1990. — 64, N 3. — P. 352—357.
59. Bruhn H.D., Liebsch J., Wagner C. Documentation of hypercoagulability by measurement of prothrombin fragment f1+2 when introducing oral anticoagulant therapy // *Thromb. Res.* — 1992. — 68, N 4. — P. 317—319.
60. Granger C.B., Becker R., Tracy R.P. et al. Thrombin generation, inhibition and clinical outcomes in patients with acute myocardial infarction treated with thrombolytic therapy and heparin: results from the GUSTO-I trial. GUSTO-I hemostasis substudy group. Global utilization of streptokinase and t-PA for occluded coronary arteries // *J. Amer. Coll. Cardiol.* — 1998. — 31, N 3. — P. 497—505.
61. Амосова Е.Н., Дыкун Я.В., Мишалов В.Г. Руководство по тромболитической терапии. — Киев: ТТ-studio, 1998. — 168 с.
62. Chandler W., Stratton J. Laboratory evaluation of fibrinolysis in patiens with a history of myocardial infarction // *Amer. J. Clin. Pathol.* — 1994. — 102, N 2. — P. 248—252.
63. John J.A., Gold H.K., Leinbach R.C. et al. Prevention of coronary artery reocclusion and reduction in late coronary artery stenosis after thrombolytic therapy in patients with acute myocardial infarction // *Circulation.* — 1988. — 78. — P. 546—556.
64. Korninger C., Cllen D. Neutralization of human extrinsic (tissue-type)plasminogen activator in human plasma: no evidence for a specific inhibitor // *Thromb. and Haemost.* — 1981. — 46. — P. 662—665.
65. Chandler W., Stratton J. Laboratory evaluation of fibrinolysis in patiens with a history of myocardial infarction // *Amer. J. Clin. Pathol.* — 1994. — 102, N 2. — P. 248—252.
66. Mentzer R.L., Budzynski A.Z., Sherry S. High-dose, brief-duration intravenous infusion of streptokinase in acute myocardial infarction: description of effects in the circulation // *Amer. J. Cardiol.* — 1986. — 57, N 15. — P. 1220—1226.
67. Kontry F., Dempfle C.E., Abildgaard U. Fibrin monomer antigen: a novel marker of mortality in acute myocardial infarction // *Eur. Heart. J.* — 1999. — 20, N 11. — P. 808—812.

68. *Galvani M., Ferrini D., Ottani F., Eisenberg P.R.* Early risk stratification of unstable angina/non-Q myocardial infarction: biochemical markers of coronary thrombosis // *Int. J. Cardiol.* — 1999. — **68**, suppl. 1. — P. 55–61.
69. *Wada H., Sakuragawa N., Mori Y. et al.* Hemostatic molecular markers before the onset of disseminated intravascular coagulation // *Amer. J. Haematol.* — 1999. — **60**, N 4. — P. 273–278.
70. *Грицюк А.И., Амосова Е.Н., Грицюк И.А.* Практическая гемостазиология. — Киев: Здоровья, 1994. — 256 с.
71. *Артамонов В.С., Федун З.В., Жесткова И.В.* ДВС-синдром в акушерстве и гинекологии. — Киев: Здоровья, 1993. — 192 с.
72. *Бицадзе В.О., Макацария А.Д.* Патогенетическое обоснование и возможности применения низкомолекулярных гепаринов в акушерской практике // *Акушерство и гинекология.* — 1999. — № 2. — С. 37–41.
73. *Генералов С.И., Костенко В.С., Мареева Т.Е.* Нарушение гемостаза при гипоксии у беременных с пороками сердца // Там же. — 1991. — № 9. — С. 21–23.
74. *Макацария А.Д., Мищенко А.Л.* Вопросы циркуляторной адаптации системы гемостаза при физиологической беременности и синдроме диссеминированного внутрисосудистого свертывания // Там же. — 1997. — № 1. — С. 38–41.
75. *Gibson J.L., Ekevall K., Walker I., Greer I.A.* Puerperal thromboprophylaxis: comparison of the anti-Xa activity of enoxaparin and unfractionated heparin // *Brit. J. Obstet. and Gynaecol.* — 1998. — **105**. — P. 795–797.
76. *Arafeh J.M.* Disseminated intravascular coagulation in pregnancy: an update // *J. Perinat Neonatal Nurs.* — 1997. — **11**, N 3. — P. 30–45.
77. *Фролова О.Г.* Материнская смертность в Российской Федерации в 1995 г. // *Акушерство и гинекология.* — 1997. — № 6. — С. 55–57.
78. *Кулаков В.И., Чернуха Е.А., Комиссарова Л.М.* Кесарево сечение. — М.: Медицина, 1998. — 192 с.
79. *Krauss T., Rath W., Dittmer U., Kuhn W.* Prevention of thromboembolism with low molecular weight heparin (Fragmin) in obstetrics // *Z. Geburtshilfe Perinatal.* — 1994. — **189**, N 4. — P. 120–125.
80. *Сенчук А.Я., Венцовский Б.М., Гарник Т.П. и др.* Тромбоэмболические осложнения в акушерстве и гинекологии. — Киев: МАККОМ, 2003. — 360 с.
81. *Балуда М.В., Балуда В.П.* Низкомолекулярные гепарины — эффективный путь профилактики тромбозов // *Юж.-Рос. мед. журн.* — 1997. — № 1. — С. 43–47.
82. *Wahlberg T.B., Kher A.* Low molecular weight heparin as thromboprophylaxis in pregnancy // *Haemostasis.* — 1994. — **24**. — P. 55–56.
83. *Kakkar V.V., Cohen A.T., Mohamed M.S.* Patients at risk of venous thromboembolism—clinical results with reviparin // *Thromb. Res.* — 1996. — **81**, N 2. — P. 39–45.
84. *The European Fraxiparin Study (EFS) Group.* Comparison of a low molecular weight heparin and unfractionated heparin for the prevention of deep vein thrombosis in patients undergoing abdominal surgery // *Brit. J. Surg.* — 1988. — **75**, N 11. — P. 1058–1063.
85. *Blomback M., Bremme K., Hellgren M., et al.* Thromboprophylaxis with low molecular mass heparin, “Fragmin” (dalteparin), during pregnancy — a longitudinal safety study. — 1998. — **9**, N 1. — P. 473–474.
86. *Krauss T., Rath W., Dittmer U., Kuhn W.* Prevention of thromboembolism with low molecular weight heparin (fragmin) in obstetrics // *Z. Geburtshilfe Perinatal.* — 1994. — **189**, N 4. — P. 120–125.
87. *Bruhn H.D., Liesch J., Wagner C.* Documentation of hypercoagulability by measurement of prothrombin fragment f1+2 when introducing oral anticoagulant therapy // *Thromb. Res.* — 1992. — **68**, N 4. — P. 317–319.

СОДЕРЖАНИЕ

ПРЕДИСЛОВИЕ	5
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	7
ГЛАВА 1. СОСУДИСТО-ТРОМБОЦИТАРНЫЙ ГЕМОСТАЗ	9
1.1. Эндотелий	13
1.1.1. Вещества, продуцируемые эндотелиоцитами	14
1.1.2. Основные функции сосудистого эндотелия	18
1.1.3. Физиология и биохимия эндотелия	22
1.2. Тромбоциты	27
1.2.1. Морфология тромбоцитов	28
1.2.2. Адгезия тромбоцитов	31
1.2.3. Роль фактора фон Виллебранда в адгезии тромбоцитов ..	35
1.2.4. Агрегация тромбоцитов	40
1.2.5. Активация тромбоцитов	42
1.2.6. Секреция	44
1.3. Мембранные рецепторы и активация тромбоцитов	46
1.3.1. Рецепторы адгезии тромбоцитов	48
1.3.2. Рецепторы коллагена	48
1.4. Адгезия тромбоцитов и коллаген	57
1.5. Тромбоциты и аденозиндифосфат	60
1.6. Тромбоциты и тромбин	63
1.7. Интегрины	66
1.7.1. Интегриновый сигналинг	74
1.8. Ингибиторы и активаторы агрегации тромбоцитов, содер-	
жащиеся в яде змей	80
ГЛАВА 2. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ	85
2.1. Компоненты системы свертывания крови	85
2.2.1. Витамин К-зависимые белки	85
2.1.2. Белки контактной фазы	97
2.1.3. Белковые кофакторы	103
2.1.4. Фибриноген и другие белки	106
2.1.5. Ферментативное расщепление фибриногена/фибрин ..	114
2.2. Система свертывания крови и ее регуляция	120
2.2.1. Ферментативный каскад системы свертывания крови ..	120
2.2.2. Структура и регуляторные функции тромбина	129
2.2.3. Регуляция системы свертывания крови	131
ГЛАВА 3. СИСТЕМА ФИБРИНОЛИЗА ПЛАЗМЫ КРОВИ	141
3.1. Плазминоген / плазмин — ключевой компонент системы	
фибринолиза	143
3.2. Физиологические активаторы плазминогена	146

3.2.1. Тканевый активатор плазминогена	146
3.2.2. Активатор плазминогена урокиназного типа	150
3.2.3. Роль белков контактной активации в регуляции системы фибринолиза	152
3.3. Ингибиторы активаторов плазминогена	153
3.4. Ингибиторы плазмينا	156
3.4.1. α_2 -Антиплазмин	156
3.4.2. α_2 -Макроглобулин	158
3.5. Активируемый тромбином ингибитор фибринолиза (TAFI)	159
3.6. Роль протеина С в регуляции системы фибринолиза	161
3.7. Стрептокиназа — активатор плазминогена экзогенного происхождения	162
3.8. Тромболитические препараты	165
3.8.1. История тромболитической терапии	165
3.8.2. Механизм действия тромболитических препаратов, оценка эффективности и тромболитической терапии	166
ГЛАВА 4. НАРУШЕНИЯ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА	175
4.1. Патологическое тромбообразование (тромбозы)	175
4.2. Эмболии	185
4.2.1. Эмболии эндогенного происхождения	186
4.2.2. Эмболии экзогенного происхождения	188
4.3. Тромбофилии	188
4.4. ДВС-синдром	202
ГЛАВА 5. АНАЛИЗ СОСТОЯНИЯ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА	219
5.1. Методы исследования сосудисто-тромбоцитарного (первичного) гемостаза	220
5.2. Методы исследования плазменного (коагуляционного) гемостаза	222
5.2.1. Скрининговые тесты	223
5.2.2. Оценка результатов общих коагуляционных тестов	225
5.2.3. Уточняющие тесты	226
5.3. Комплексная лабораторная диагностика нарушений системы свертывания крови и фибринолиза	229
5.4. Комплексное определение степени нарушения равновесия между компонентами системы свертывания крови и фибринолиза при термической травме	239
5.5. Проведение контроля эффективности терапии антикоагулянтами непрямого действия	241
5.6. Анализ состояния системы гемостаза и прогнозирование тромботических осложнений при остром инфаркте миокарда в ходе лечения стрептокиназой	244
5.7. Разработка алгоритма ранней диагностики нарушений состояния системы гемостаза после операции кесарева сечения	249
SUMMARY	257
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	258
СОДЕРЖАНИЕ	291

Наукове видання

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ім. О.В. ПАЛЛАДІНА

ВОЛКОВ Георгій Леонідович
ПЛАТОНОВА Тетяна Миколаївна
САВЧУК Олексій Миколайович
ГОРНИЦЬКА Ольга Володимирівна
ЧЕРНИШЕНКО Тамара Мартинівна
КРАСНОБРИЖА Євгенія Миколаївна

СУЧАСНІ УЯВЛЕННЯ ПРО СИСТЕМУ ГЕМОСТАЗУ

Російською мовою

Київ, видавництво “Наукова думка”, 2005

Художнє оформлення *А.К. Яської*
Художній редактор *І.П. Савицька*
Технічний редактор *Г.М. Ковальова*
Коректор *О.В. Лакейчук*
Комп'ютерна верстка *Л.М. Каткової*

Підп. до друку 25.12.2005. Формат 70 × 100/16.
Папір офс. № 1. Гарн. Таймс. Друк. офс.
Фіз.-друк. арк. 18,5 + 1,25 вкл. на крейд. пап.
Ум. друк. арк. 25,68. Ум. фарбо-відб. 31,2.
Обл.-вид. арк. 26,35. Наклад 300 прим. Зам. № 6—732

Оригінал-макет підготовлено
у видавництві “Наукова думка”
Р.с. № 05417561 від 16.03.95
01601 Київ 1, вул. Терещенківська, 3

ЗАТ фірма “Віпол”
03151 Київ 151, вул. Волинська, 60



**Владимир Александрович БЕЛИЦЕР —
основоположник учения о системе гемостаза**

В середине 70-х годов прошлого века в русском переводе появился замечательный учебник Альберта Ленинджера "Биохимия". В нем — первом, где биохимические процессы рассматривались в контексте объединения структуры и функции клетки, был интересный исторический раздел — "Хронология биохимии", посвященный основным этапам развития этой науки. Там среди мировых корифеев биохимии упоминается имя Владимира Александровича Белицера. Он удостоился этой высокой чести за одно из эпохальных биологических открытий — процесса окислительного фосфорилирования, совершенного в 1930-е годы.

К моменту выхода упомянутого учебника ученый являлся признанным мировым лидером, но уже другого научного направления — биохимии гемостаза, изучения процессов самосборки белковых надмолекулярных структур. И в этих исследованиях Владимир Александрович проявил, можно сказать без преувеличения, гениальность ученого: за массой фактической информации он увидел систему явлений, которые подчиняются определенной закономерности.

Эпохальная личность, всемирно известный ученый и авторитет, он по достоинству был оценен страной: академик Академии наук Украины, заслуженный деятель науки Украины, лауреат Государственной премии Украины, доктор биологических наук, профессор.

Владимир Александрович Белицер прожил долгую плодотворную творческую жизнь экспериментатора. Его интересовали глобальные вопросы биохимии. Талантливый ученый, один из основателей функциональной биохимии, он расшифровал неизвестные механизмы биоэнергетики и формирования надмолекулярных структур белков, создал направление по изучению структуры и функционирования белков системы гемостаза. Его работы являются классическими, хрестоматийными, в них отражены важнейшие проблемы современной биохимии.

В.А. Белицер закончил биологическое отделение физико-математического факультета 1-го Московского университета. Работал во Всесоюзном институте экспериментальной медицины им. А.М. Горького (ВИЭМ). Первые его научные работы публиковались не только на русском языке в журналах "Успехи современной биологии", "Бюллетень экспериментальной биологии", но и в иностранных научных изданиях, в частности в широко известных и авторитетных немецких журналах "Biochemische Zeitschrift" (1932, 1933, 1936), "Acta Cancrologica" (1935); "Protoplasma"

(1934), главными редакторами которых были основатели биохимической науки С. Нейберг (S. Neuberger) и В. Гроссманн (W. Grossmann). Эти публикации заявили о появлении в мировой науке молодого, талантливого и вдумчивого ученого. За пионерские работы в области тканевого обмена (главным образом, мозговой ткани) в 1935 г. В.А. Белицеру была присвоена ученая степень кандидата биологических наук без защиты диссертации, а в 1936 г. — звание профессора.

С 1936 г. начался новый этап научной деятельности В.А. Белицера, в течение которого он впервые установил процесс фосфорилирования, сопряженный с процессом дыхания. Эти работы были широко признаны биохимиками и физиологами. Даже если бы Владимир Александрович больше ничего не сделал в науке — его имя навсегда вошло бы в историю биохимии и было бы достойно оценено современниками и будущими поколениями научных работников, как в своей стране, так и за рубежом, его имя широко цитируется учеными-биохимиками.

Приоритет В.А. Белицера в этой области признан всемирной наукой. В своей нобелевской лекции известный биоэнергетик и автор “хемиосмотической” гипотезы П. Митчелл (P. Mitchell, 1978) назвал работу В.А. Белицера и Э.Т. Цыбаковой пионерской в изучении механизмов окислительного фосфорилирования АДФ наряду с работами Г. Калькара, С. Очоа, Ф. Липманна, А. Ленинджера. Этот вопрос является центральным в современной биохимии и до этого времени полностью не расшифрован. Природа иногда не дает возможности ученым проникнуть в ее тайны, и это подтвердил Ефроим Рекер: “Всякий, кто не запутался в проблеме окислительного фосфорилирования — просто не понял ситуации”.

Во время Великой отечественной войны работа института ВИЭМ, эвакуированного в г. Томск, проводилась на базе большого военного госпиталя. В этот период В.А. Белицера интересовали сугубо практические вопросы — консервирование крови и создание белковых кровезаменителей, необходимых раненым на фронте.

В 1944 г. академик А.В. Палладин пригласил В.А. Белицера на работу в новую лабораторию ферментов Института биохимии АН УССР (г. Киев) на должность заведующего. Вся дальнейшая жизнь Владимира Александровича была связана с этим институтом, где он проработал 44 года, создал свою всемирно известную школу, воспитал большую когорту учеников, которые продолжают развивать созданное им научное направление по изучению функционирования системы гемостаза.

Многие годы научных исследований В.А. Белицер посвятил изучению процесса самосборки фибрина — заключительного этапа свертывания крови. Он доказал, что процесс образования сгустка не является результатом денатурации белка, а происходит в две стадии (ферментативная стадия и стадия свертывания). Изучая последнюю стадию — полимеризацию мономерного фибрина, В.А. Белицер обнаружил закономерность самосборки различных надмолекулярных биологических структур и предложил модель, которая объясняет переход фибриногена в фибрин, а также обосновал кинетическую теорию этой реакции.

Дальнейшие исследования руководимого им коллектива были посвящены изучению ферментативного расщепления фибриногена и фибрина, характеристике продуктов расщепления, изучению их роли в поддержании гемостаза.

Установив, что молекулы мономерного фибрина взаимодействуют не только между собой, но и с исходным белком — фибриногеном, он экспериментально показал, что для образования волокон фибрина важное значение имеют специфические центры полимеризации, в которых определенная роль принадлежит химическим группам.

Одновременно с научной работой В.А. Белицер занимался педагогической деятельностью: на кафедре биохимии Киевского государственного (ныне — национального) университета им. Т.Г. Шевченко он читал специальный курс “Ферменты” и нормативный курс “Радиобиология”, который был первым не только в Украине, но и во всем Советском Союзе.

Особенно притягательной для окружающих была интеллигентность Владимира Александровича, его деликатность и благожелательность в общении.

Семинары отдела, которым руководил ученый, были открытыми для всех. Это была великолепная методологическая и человеческая школа для молодых сотрудников института.

Владимир Александрович глубоко знал мировую литературу, музыку, живопись, любил и особенно тонко ощущал классическую музыку, владел иностранными языками. В анкете с присущей ему скромностью он писал: «читаю и могу “изъясняться” английским и немецким, читаю на французском». Знание иностранных языков дало ему возможность публиковать работы с первых дней научной деятельности во всемирно известных изданиях за рубежом.

В.А. Белицер — целая эпоха в отечественной биохимии. Очень хорошо сказал о нем один из его учеников — доктор биологических наук А.П. Демченко: “Учитель — это не тот, который учит, а тот, у которого учатся”. Мы имели большое счастье быть учениками выдающегося ученого, ощутить на себе влияние его незаурядной личности. Зажженный им факел творческого горения сопутствует нашей жизни, передается нашим ученикам. Наука развивается, дифференцируется, возникают новые направления, ставятся и решаются новые проблемы. Но основанная В.А. Белицером национальная школа биохимиков известна в научном мире. Ее характеризует широкое применение физико-химических и биофизических методов и подходов, построение молекулярных моделей, четкая логика в постановке научных задач, в формулировке результатов и выводов, высокая надежность самого эксперимента. Отличает ее и стиль работы. Каждый результат должен быть проверен многократно, все сомнения проанализированы и перепроверены. ... И длительная, серьезная работа над текстом каждой рукописи. Владимир Александрович торопиться не любил, каждую свою статью он переписывал многократно, тщательно шлифовал каждое слово, так же как и каждый результат опыта, каждую точку на графике, каждую цифру в таблице. Именно так его работы становились классикой, именно поэтому обращаемся мы к ним сегодня.