

ОБРАЗОВАНИЕ ТРОМБИНА И ЕГО ФУНКЦИИ В СИСТЕМЕ ГЕМОСТАЗА

А. Б. Добровольский, Е. В. Титаева

Институт кардиологии им. А. Л. Мясникова ФГБУ РКНПК МЗ РФ

Система гемостаза обеспечивает сохранение жидкого состояния крови в пределах кровеносных сосудов, быстрое образование локальных тромбов в зоне повреждения стенки сосуда и их растворение после восстановления поврежденной области. Достигается это благодаря множественным взаимодействиям компонентов стенки сосуда, клеток крови и плазменных факторов.

Традиционно процесс гемостаза принято подразделять на последовательные, дополняющие друг друга этапы:

- локальная вазоконстрикция
- адгезия тромбоцитов к поврежденному участку сосуда
- образование тромбоцитарной пробки (первичный гемостаз)
- образование фибрина, стабилизирующего тромбоцитарные агрегаты (вторичный гемостаз)
- растворение тромбов (фибринолиз), обеспечивающее восстановление кровотока после регенерации стенки сосуда.

Основанием для выделения в процессе гемостаза отдельных этапов служило то, что в условиях эксперимента каждый из них можно моделировать независимо от других. Однако в действительности перечисленные этапы тесно взаимосвязаны и во многом регулируются одним ферментом – тромбином.

Классическая схема реакций системы свертывания крови

В 1964 г. Davie E.W., Ratnoff O.D. [1] и MacFarlane R.G. [2] предложили схему, опи-

сывающую последовательность реакций активации компонентов плазмы, участвующих в свертывании крови. Вскоре в схему была внесена модификация, заключающаяся в выделении 2-х альтернативных путей активации свертывания крови *in vitro*: «внутреннего пути», инициирующегося при контакте крови с чужеродной поверхностью (стекло, каолин), и «внешнего пути», инициатором которого является тканевой фактор (ТФ), содержащийся в стенке сосуда (рис. 1). Представление о наличии 2-х альтернативных путей активации хорошо согласовалось с данными о влиянии дефицита того или иного фактора свертывания на скорость образования фибрина в одном из 2-х скрининговых тестов – активированном частичном тромбопластиновом времени (АЧТВ) или протромбиновом тесте (ПТ-тест). Оно послужило основой для разработки относительно простого алгоритма выявления дефектного звена в системе свертывания крови, но не позволяло объяснить, почему дефицит факторов контактной активации не связан с повышенной кровоточивостью, а дефицит стоящих ниже в каскаде свертывания факторов VIII и IX (гемофилия А или В) проявляется в виде тяжелых геморрагий.

Объяснить эти факты удалось благодаря исследованиям, выполненным в 1980–1990-е гг., результаты которых привели к существенной модификации классической схемы реакций активации свертывания крови [3–7]. Во-первых, было установлено, что комплекс ТФ-фактор VIIa – «теназа внешнего пути» активирует не только фактор X, но и фактор IX. Во-вторых, было показано, что комплекс факторов VIIIa и IXa – «теназа внутреннего пути» активирует фактор X

со скоростью в 50–100 раз большей, чем «теназа внешнего пути». В-третьих, было показано, что фактор XI может активироваться тромбином при участии гликопротеина Iba тромбоцитов, или полифосфатов. Эти данные послужили основанием для внесения существенных модификаций в схему реакций активации свертывания крови (рис. 2).

Динамическая модель активации системы свертывания крови

Очень важные для понимания физиологии гемостаза данные были получены при исследовании динамики образования тромбина. Оказалось, что в начальном периоде активации свертывания крови тромбин образуется с относительно низкой скоростью, затем в процессе наступает перелом и его скорость резко возрастает. Следовательно, в образовании тромбина выделяют две фазы – инициации и распространения (тромбиновой вспышки). Причем эти фазы обеспечиваются разными факторами, регулируются разными ингибиторами и протекают на разных клетках.

Инициация активации свертывания крови происходит на поверхности клеток, в состав мем-

бран которых входит ТФ, а фаза распространения на поверхности активированных тромбоцитов. Тканевой фактор постоянно экспрессируется только клетками стенки сосудов, которые в норме с кровью не контактируют. Эндотелий и моноциты могут экспрессировать ТФ под воздействием повреждающих стимулов, что может быть одним из механизмов развития синдрома ДВС.

Повреждение стенки сосудов открывает доступ плазменных факторов свертывания к клеткам, экспрессирующим тканевой фактор. Фактор VIIa, связавшийся с этими клетками, инициирует активацию фактора X, который в этих условиях может активировать протромбин, хотя и с низкой скоростью. Образующийся тромбин далее может значительно усилить свое образование, активируя тромбоциты, а также факторы V и VIII.

При дефиците факторов VIII или IX (гемофилии A и B) тромбина образуется много меньше, чем в норме, т. к. нарушаются две реакции, посредством которых тромбин может усилить свое образование, обеспечивая развитие фазы распространения. У больных гемофилией C (дефицит фактора XI) нарушена только одна из этих реакций и по образованию тромбина они занимают промежуточное положение между нормой

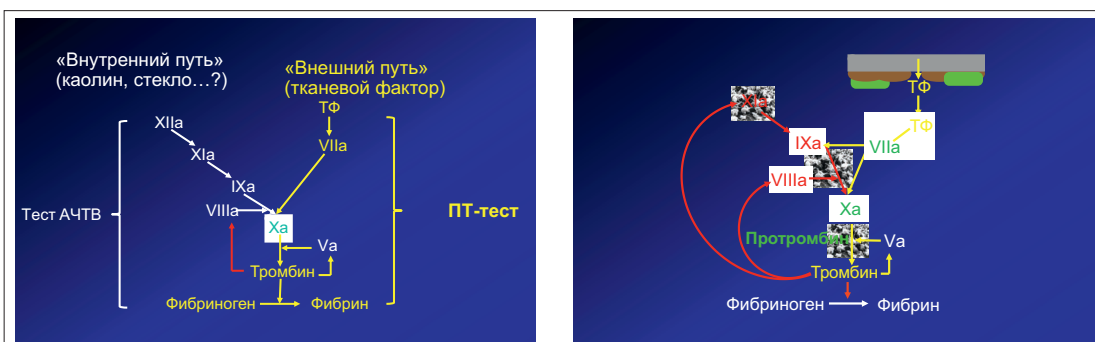


Рисунок 1. Классическая схема реакций активации свертывания крови

Рисунок 2. Схема реакций активации свертывания крови. Пусковой реакцией является связывание ТФ с фактором VIIa. Этот комплекс активирует факторы IX и X. Образующийся фактор Xa обеспечивает начальную генерацию тромбина, который активирует тромбоциты и часть факторов V и VIII. Фактор VIIIa формирует на поверхности активированных тромбоцитов комплекс с фактором IXa – «теназу внутреннего пути», которая значительно повышает скорость образования фактора Xa и тромбина. Тромбин далее усиливает свое образование, активируя факторы V, VIII и XI

и больными гемофилией А или В. По характеру кровотечений гемофилия С относится к мягким формам. Спонтанные кровотечения случаются редко, преимущественно кровотечения случаются при повреждении тканей с повышенной фибринолитической активностью [8].

Тромбоциты играют очень важную роль в образовании тромбина *in vivo* [5–7]. Во-первых, благодаря способности к адгезии и наличию множественных механизмов активации эти клетки скапливаются в области повреждения сосуда. Во-вторых, только тромбоциты обладают участками специфического связывания факторов VIII, V, IX, XI и тромбина, что обеспечивает локальное повышение концентрации этих факторов в области формирования первичной тромбоцитарной пробки. В-третьих, при активации тромбоциты экспрессируют прокоагулянтные фосфолипиды. На их поверхности формируются «теназный» (факторы VIIIa-IXa+X) и «протромбиназный» (факторы Va-Xa+протромбин) комплексы, в которых активация фактора X и протромбина протекает в тысячи раз быстрее, чем в растворе. Наконец, на поверхности активированных тромбоцитов тромбин активирует фактор XI, что представляет собой альтернативный фактору XIIa механизм активации «внутреннего пути» свертывания крови [9].

В условиях артериального кровотока только тромбоциты могут обеспечить эффективное образование тромбина, а образование тромбина необходимо для стабилизации агрегатов тромбоцитов. Исследование динамики образования тромбов *in vivo* показало, что формирование тромбоцитарной пробки и образование фибрина протекают практически одновременно [10], а инактивация генов факторов IX или XI, обеспечивающих усиление тромбином своего образования, значительно замедляет образование артериальных тромбов [11]. В завершение данного раздела отметим, что поскольку активированные тромбоциты экспонируют участки специфического связывания фибриногена и факторов свертывания, которые обеспечивают образование основного количества тромби-

на, то таким образом, фактически реализуется и один из механизмов, обеспечивающих локализацию свертывания крови в области повреждения сосуда. Кроме этого, факторы IXa и Xa в составе «теназного» и «протромбиназного» комплексов в значительной степени защищены от инактивации антитромбином, т. к. кофакторы и субстраты, формирующие эти комплексы, создают стерические препятствия для связывания ингибитора с протеиназами.

Система противосвертывания

В данном обзоре мы ограничимся лишь кратким описанием 3-х наиболее изученных систем, которые, используя разные механизмы, контролируют образование тромбина и его активность на нескольких уровнях и фактически дополняют друг друга.

Ингибитор пути тканевого фактора (ИПТФ). В середине 1980-х гг. в крови был идентифицирован новый ингибитор свертывания крови с необычным механизмом действия. При его участии продукт реакции – фактор Xa ингибировал свой активатор – комплекс фактор VIIa-ТФ, причем ингибирование началось лишь после образования определенного количества фактора Xa. Дальнейшие исследования показали, что ИПТФ должен вначале связаться с активным центром фактора Xa, а затем уже этот комплекс связывается с комплексом фактор VIIa-ТФ. Прочность взаимодействия ингибиторных доменов с активными центрами факторов Xa и VIIa значительно повышается при образовании комплекса, состоящего из 4-х компонентов: фактор Xa – ИПТФ – фактор VIIa – ТФ. Недавно показано, что протеин S на порядок повышает эффективность связывания ИПТФ с факторами Xa и VIIa [12].

Исследование связи уровня ИПТФ с риском тромбозов затруднено тем, что в организме этот ингибитор распределен на несколько пулов. Основное количество ИПТФ (~80%) связано с эндотелием. Большая часть циркулирующего в кровотоке ингибитора находится

в комплексе с липопротеинами, и только ~2% приходится на свободную, обладающую наибольшей активностью, форму [13]. Врожденный дефицит ИПТФ у человека не описан, однако тот факт, что у мышей инактивация гена ИПТФ приводит к внутриутробной гибели плода, свидетельствует о важной роли этого ингибитора в регуляции образования тромбина.

Антитромбин. Антитромбин (приставка III в настоящее время не используется) ингибирует протеазы системы свертывания, образуя с ними ковалентный комплекс. Скорость ингибирования значительно повышается в присутствии сульфатированных олигосахаридов, одним из которых является гепарин. Минимальной структурой гепарина, обеспечивающей увеличение скорости ингибирования, является последовательность из 5-ти остатков сахара, содержащая 4 специфически расположенные сульфогруппы. Связывание с этой структурой повышает на 3 порядка скорость ингибирования. Молекулы гепарина, содержащие более 18 звеньев, могут еще на порядок повышать скорость ингибирования, выполняя роль матрицы, обеспечивающей эффективное взаимодействие протеазы с ингибитором. Эффект матрицы проявляется в случае ингибирования тромбина и факторов IXa и XIa, но не фактора Xa, который с гепарином не связывается. В кровеносных сосудах активация антитромбина обеспечивается гликопротеидами люминальной поверхности эндотелия, содержащими гепарансульфат. Связывание антитромбина с этими структурами является одним из механизмов, обеспечивающих антитромботические свойства эндотелия.

Система протеина С. Эндотелий сосудов не только инактивирует тромбин, но и может с помощью тромбина прерывать каскад коагуляции. Осуществляется это с помощью системы протеина С, основными компонентами которой являются два циркулирующих в плазме витамин К-зависимых белка – протеины С и S и два компонента мембран эндотелия – тромбомодулин и рецептор протеина С. Тромбин, вымывающийся из зоны тромбообразования,

при контакте с неповрежденным эндотелием связывается с тромбомодулином. Это связывание изменяет субстратную специфичность тромбина. Он теряет прокоагулянтные свойства (способность активировать тромбоциты, факторы V и VIII, свертывать фибриноген), но приобретает способность активировать связанный с эндотелиальным рецептором протеин С. Активированный протеин С при участии протеина S расщепляет факторы Va и VIIIa, что приводит к распаду «теназного» и «протромбиназного» комплексов, и входившие в их состав протеиназы инактивируются антитромбином.

Функции тромбина

Тромбин был открыт как фермент, образующий фибрин – структурную основу тромба. Его первое историческое название – фибрин-фермент. Дальнейшие исследования показали, что функции тромбина намного шире (рис. 3).

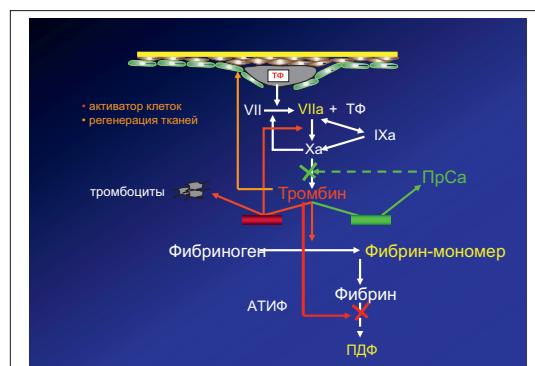


Рисунок 3. Тромбин – многофункциональный фермент. В области повреждения эндотелия тромбин стимулирует свое образование, активируя тромбоциты и факторы свертывания крови, а также провоспалительные реакции. При связывании с тромбомодулином неповрежденного эндотелия он активирует протеин С, который прерывает каскад свертывания и обладает противовоспалительными функциями. Кроме этого, комплекс тромбин-тромбомодулин активирует прокарбоксипептидазу В, получившую название активированного тромбином ингибитора фибринолиза, который замедляет фибринолиз и инактивирует C5a компонент комплемента

Разнообразие функций обеспечивается тем, что помимо активного центра тромбин обладает участками специфического узнавания многочисленных субстратов и кофакторов, связывание с которыми определяет направленность его действия. Исследование динамики появления маркеров реакций катализируемых тромбином при свертывании крови *in vitro* показало, что в первую очередь тромбин активирует тромбоциты, затем фактор XIII, далее фактор V, фибриноген и фактор VIII [14]. Свертывание фибриногена происходит примерно в точке перехода фазы инициации в фазу распространения, когда количество образовавшегося тромбина составляет ~5% от максимального. Тромбин, который продолжает генерироваться уже после свертывания фибриногена, необходим для повышения механической и протеолитической стабильности фибрина.

Одним из механизмов стабилизации является активация фактора XIII, который образует межмолекулярные и внутримолекулярные «сшивки» мономеров фибрина, повышающие механическую стабильность тромбов, а также «сшивает» с фибрином два ингибитора фибринолиза – ингибитор активаторов плазминогена типа 1 (ИАП-1) и активируемый тромбином ингибитор фибринолиза (АТИФ) [15]. Поскольку АТИФ является проферментом, степень активации которого зависит от концентрации тромбина, то его недостаточная активация может быть одной из причин кровоточивости при гемофилиях [16]. В ряде работ показано, что добавление ингибиторов фибринолиза может повышать эффективность заместительной терапии у больных тяжелыми формами гемофилии [17]. О важной роли тромбина в регуляции протеолитической стабильности фибрина свидетельствует также то, что практически все антитромботические препараты, ингибирующие фазу распространения в образовании тромбина, повышают скорость стимулированного тканевым активатором плазминогена лизиса фибрина [17, 18].

Антифибринолитические функции тромбина не ограничиваются только активацией

фактора XIII и АТИФ. Образование первичных нитей фибрина (протофибрилл) и характер их упаковки в 3-мерную структуру зависят от концентрации тромбина. С ее повышением толщина формирующихся протофибрилл снижается, но при этом увеличивается степень их ветвления, что приводит к более плотной упаковке протофибрилл [19]. Анализ с помощью конфокальной микроскопии выявил значительную неоднородность структуры фибрина, образующегося при свертывании богатой тромбоцитами плазмы. Плотность упаковки нитей фибрина в области агрегатов тромбоцитов была значительно выше, чем в свободных от них участках. Наблюдение за динамикой лизиса сгустков *in vitro* показало, что диффузия тканевого активатора плазминогена значительно замедлялась в области тромбоцитарных агрегатов. Фронт лизиса фактически обходил эти участки, и далее они распадались на более мелкие фрагменты. Блокирование IIb/IIIa рецепторов приводило к значительному уменьшению размеров тромбоцитарных агрегатов, а по плотности упаковки нитей фибрина и продвижению фронта лизиса зоны, содержащие тромбоциты, практически не отличались от других участков фибринового геля [20].

Таким образом, тромбин является ключевым компонентом системы гемостаза. Его образование обеспечивается взаимодействием клеток стенки сосудов, крови и белков плазмы. Они же дирижируют функциями тромбина, с помощью которых этот фермент может как стимулировать, так и ингибировать свое образование, что обеспечивает локальное образование тромбов в области повреждения стенки сосуда. Тромбин регулирует и финальную стадию процесса гемостаза – растворение тромбов после регенерации поврежденной области стенки сосуда, а наличие у тромбина и пролиферативных активностей позволяет предположить, что он участвует и в ее регенерации [21]. От того, насколько образование тромбина адекватно повреждающему стимулу, зависит риск развития основных проявлений нарушений системы гемостаза – тромбозов или кровотечений.

Лабораторная диагностика нарушений системы гемостаза

Отметим два основных фактора, ограничивающих возможности лаборатории в диагностике: 1) объектом исследования являются только компоненты крови; 2) в пробирке невозможно воспроизвести, а тем более стандартизовать повреждающий стимул. Поэтому на сегодняшний день наибольшее развитие получили методы, направленные на: 1) выявление дефектного звена (врожденный или приобретенный дефицит, полиморфизм, патологические ингибиторы); 2) контроль терапии; 3) определение маркеров патологических процессов (тромбозы, индуцированная гепарином тромбоцитопения и т. д.).

Тест агрегации тромбоцитов. Агрегатометрия используется для выявления тромбоцитопатий и диагностики болезни Виллебранда. Все попытки использовать этот тест для оптимизации терапии антиагрегантами пока оказались безуспешными [22]. Величина остаточной реакционной способности тромбоцитов коррелирует с неблагоприятными исходами (высокая – с тромбозами, низкая – с кровотечениями), но, по данным 2-х больших исследований – GRAVITAS и RECLOSE 2-ACS, увеличение дозы клопидогрела «резистентным» больным не приводит к достоверному снижению частоты неблагоприятных исходов. В качестве возможных причин неудачи рассматриваются отсутствие четких критериев «резистентности» и разнообразие приборов и методик выполнения теста. На наш взгляд, еще одним из недостатков методов агрегатометрии является то, что в этих тестах не оценивается такая функция тромбоцитов, как образование тромбина.

Альтернативным подходом к определению индивидуальной чувствительности больных к клопидогрелу является определение полиморфизмов генов, участвующих в метаболизме этого препарата, однако доказательная база целесообразности такого подхода пока слабая [22–24].

Клоттинговые тесты. Наиболее широко используемыми тестами этой группы являются

протромбиновый тест (ПТ) и активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ). Особенностью этих тестов является то, что в них определяется только начальная скорость образования тромбина, т. е. свертывание фибриногена происходит после активации всего ~5% протромбина (рис. 4). Наиболее частыми причинами снижения скорости образования сгустка является дефицит факторов свертывания, или лечение антикоагулянтами, реже – наличие патологических ингибиторов к факторам свертывания или полимеризации фибрина. В то же время дефицит ингибиторов свертывания крови, или протромботические изменения факторов свертывания крови, влияют преимущественно на количество образующегося тромбина, от которого и зависит стабильность тромбов.



Литература

1. Davie E.W., Ratnoff O.D. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting//Science. 1964. № 145. P. 1310–1312.
2. MacFarlane R.G. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biological amplifier//Nature. 1964. № 202. P. 498–499.
3. Furie B., Furie B.C. Molecular and cellular biology of blood coagulation//N. Engl. J. Med. 1992. № 326. P. 800–806.

4. Бутенас С., Манн К.Г. Свертывание крови (обзор)//Биохимия. 2002. № 67. P. 5–15.
5. Heemskerk J.W.M., Mattbeij N.J.A., Cosemans J.M.E.M. Platelet-based coagulation: different populations, different functions//J. Thromb. Haemost. 2013. № 11. P. 2–16.
6. Hoffman M., Monroe III D.M. A cell-based model of hemostasis//Thromb. Haemost. 2001. № 85. P. 958–965.
7. Heemskerk J.W.M., Mattbeij N.J.A., Cosemans J.M.E.M. Platelet-based coagulation: different populations, different functions//J. Thromb. Haemost. 2013. № 11. P. 2–16.
8. Cawthern K.M., van 't Veer C., Lock J.B., DiLorenzo M.E., Branda R.F., Mann K.G. Blood Coagulation in Hemophilia A and Hemophilia C//Blood. 1998. Vol. 91. № 12 (June 15). P. 4581–4592.
9. Choi S.H., Smith S.A., Morissey J.H. Polyphosphate is a cofactor for the activation of factor XI by thrombin//Blood. 2011. № 118. P. 6963–6970.
10. Furie B., Furie B.C. In vivo thrombus formation//J. Thromb. Haemost. 2007. № 5 (Suppl.1). P. 12–17.
11. Wang X., Cheng Q., Xu L., Feuerstein G.Z., Hsu M.-Y., Smith P.L., Seiffert D.A., Schumacher W.A., Ogletree M.L., Gailani D. Effects of factor IX or factor XI deficiency on ferric chloride-induced carotid artery occlusion in mice//J. Thromb. Haemost. 2005. № 3. P. 695–702.
12. Peraramelli S., Jan Rosing J., Hackeng T.M. TFPI-dependent activities of Protein S//Thromb. Res. 2012. № 129. S. 23–26.
13. Kasthuri R.S., Glover S.L., Boles J., Mackman N. Tissue Factor and Tissue Factor Pathway Inhibitor as Key Regulators of Global Hemostasis: Measurement of Their Levels in Coagulation Assays//Semin. Thromb. Hemost. 2010. № 36. P. 764–771.
14. Mann K.G., Brummel K., Butenas S. What is all that thrombin for?//J. Thromb. Haemost. 2003. № 1. P. 1504–1514.
15. Muszbek L., Bereczky Z., Bagoly Z., Komáromi I., Katona E. Factor XIII: A Coagulation Factor With Multiple Plasmatic and Cellular Functions//Physiol. Rev. 2011. № 91. P. 931–972.
16. Foley J.H., Nesheim M.E., Rivard G.E., Brummel-Ziedins K.E. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor activation and bleeding in haemophilia A//Haemophilia. 2012. № 18 (3). e316–322.
17. Colucci M., Semeraro N. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor: At the nexus of fibrinolysis and inflammation//Thromb. Res. 2012. № 129. P. 314–319.
18. Incampo F., Carrieri C., Galasso R., Scaraggi F.A., di Serio F., Woodbams B., Semeraro N., Colucci M. Effect of warfarin treatment on thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) activation and TAFI-mediated inhibition of fibrinolysis//J. Thromb. Haemost. 2013. № 11. P. 315–324.
19. Wölberg A.S. Thrombin generation and fibrin clot structure//Blood Reviews. 2007. № 21. P. 131–142.
20. Collet J.-P., Montalescot G., Lesty C., Weisel J.W. A structural and dynamic investigation of the facilitating effect of glycoprotein IIb/IIIa inhibitors in dissolving platelet-rich clots//Circ. Res. 2002. № 90. P. 428–434.
21. Siller-Matula J.M., Schwameis M., Blann A., Mannhalter C., Jilma B. Thrombin as a multi-functional enzyme: Focus on *in vitro* and *in vivo* effects//Thromb. Haemost. 2011. № 106. P. 1020–1033.
22. Cattaneo M. Response variability to clopidogrel: is tailored treatment, based on laboratory testing, the right solution?//J. Thromb. Haemost. 2012. № 10. P. 327–336.
23. Супроткина О.В., Вавилова Т.В. Алгоритм лабораторного молекулярно-генетического исследования для определения индивидуальной чувствительности к антиагрегантным препаратам – шаг навстречу персонализированной медицине//Атеротромбоз. 2012. № 1. P. 49–55.
24. Комаров А.Л., Шахматова О.О., Илющенко Т.А., Донников А.Е., Добровольский А.Б., Панченко Е.П. Оценка риска сердечно-сосудистых осложнений у больных стабильной ИБС, получающих клопидогрел: функция тромбоцитов или генетические исследования?//Доктор Ру. 2012. № 7. С. 11–19.