

Современные представления о системе фибринолиза и методах диагностики ее нарушений

А.С. Жалылов¹, А.Н. Баландина^{1,2}, А.Д. Купраш^{1,2}, А. Шривастава³,
А.М. Шибек¹

¹ Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, Москва, Россия.

² ФГБУ «Национальный научно-практический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва.

³ Христианский медицинский колледж, Веллор, Индия.

Фибринолиз – важный биохимический процесс, отвечающий за разрушение фибриновых сгустков, образующихся в результате работы системы свертывания. Сбои в работе системы фибринолиза могут приводить к состояниям, угрожающим жизни, – тромбозам и неконтролируемым кровотечениям. Наблюдается стремительный прогресс в понимании молекулярных механизмов работы системы фибринолиза, детально описаны все основные участники и реакции процесса, тем не менее вопросы регуляции и оценки состояния системы фибринолиза изучены слабо. В данном обзоре представлен анализ накопленной информации о работе системы фибринолиза и сопутствующей патологии. Подробно рассмотрены методы оценки и диагностики состояния системы фибринолиза.

Ключевые слова: фибринолиз, свертывание крови, плазмин, методы исследования фибринолиза.

The overview of fibrinolysis system contemporary concepts and of its disorders diagnostic methods

A.S. Zhalyalov¹, A.N. Balandina^{1,2}, A.D. Kuprash^{1,2}, A.Srivastava³, A.M. Shibeko¹

¹ Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology RAS, Moscow, Russia.

² National Scientific and Practical Centre of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology n.a. D. Rogachev, Moscow, Russia.

³ Christian Medical College, Vellore, India.

Fibrinolysis is an important biochemical process responsible for the dissolution of fibrin clots, which appear during the blood coagulation process. Disorders in fibrinolysis system may result in life-threatening conditions like thrombosis and bleedings. At this time, we know a lot about the molecular mechanism of fibrinolysis, all reactions are described in details, and yet its regulation and evaluation of fibrinolysis state are still unclear. In this review we analyze the information about how fibrinolysis functions and what disorders of this system can be met. We describe in details the methods used to evaluate the state of fibrinolysis system.

Key words: fibrinolysis, blood coagulation, plasmin, evaluation of fibrinolysis state.

При повреждении сосуда происходит активация системы свертывания, цель которой – закрыть место повреждения, защищая организм от кровопотери и позволяя восстановить целостность сосудистого русла. При этом запускается множество процессов: одни отвечают за формирование тромбоцитарного агрегата, другие обеспечивают образование фибринового сгустка, третьи вызывают растворение тромба. Отдельные белки могут принимать участие во всех процессах, обеспечивая взаимную регуляцию различных этапов свертывания. В данном обзоре мы остановимся на функционировании и регуляции финального этапа существования тромба – фибринолизе.

Нарушения в системе фибринолиза могут быть связаны с увеличением риска развития венозного тромбоза [1], но не во всех работах такая закономерность была обнаружена [2]. В ряде случаев, таких как инфаркт миокарда, тромбоз глубоких вен, легочная эмболия, инсульт, возникает необходимость экстренного удаления тромба, препятствующего кровотоку. Для этого фибринолитическую систему организма приводят в гиперактивное состояние при помощи таких препаратов, как тканевый активатор плазминогена, стрептокиназа [3] или урокиназный активатор плазминогена [4]. Фибринолитическая терапия показала свою эффективность при лечении пациентов с инсультом, однако такая терапия сопровожда-

Контактная информация:

Алексей Михайлович Шибек,
канд. биологич. наук,
ведущий научный сотрудник лаборатории физиологии и биофизики клетки Центра теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН.
Тел.: +7 (495) 938-2533
E-mail: alshibeko@gmail.com

DOI: 10.24287/1726-1708-2017-16-1-69-82

Correspondence:

Alexey M. Shibeko, PhD in biophysics, leading researcher, Laboratory of Cell Physiology and Biophysics, Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology RAS.
Tel.: +7 (495) 938-2533
E-mail: alshibeko@gmail.com

ется осложнениями в виде кровотечений, рестенозов и эмболий [5].

Необходимо дальнейшее изучение механизмов регуляции фибринолиза и его взаимосвязи с другими процессами свертывания, и многое уже известно.

Цель данного обзора: рассмотрение вопросов устройства системы фибринолиза и ее нарушений, описание методов диагностики таких нарушений и существующих на данный момент представлений о взаимосвязи нарушений системы фибринолиза с клиническими проявлениями у пациента.

СИСТЕМЫ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ И ЛИЗИСА ФИБРИНОВОГО СГУСТКА

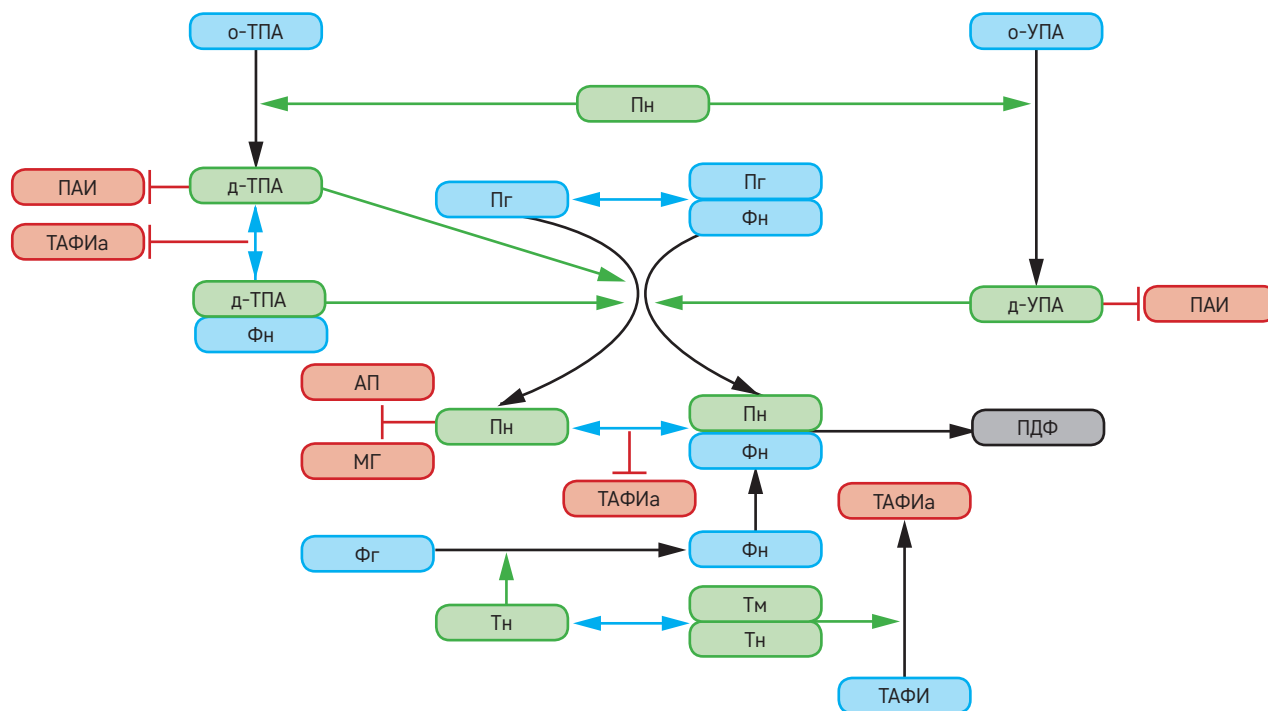
Свертывание представляет собой каскад ферментативных реакций, запуск которых происходит при контакте крови с тканью, находящейся под эндотелием, выстилающим сосуды, вследствие повреждения стенки сосуда. Там находятся коллаген, активирующий агрегацию тромбоцитов [6], и тканевой фактор, гликопротеид, активирующий плазменное свертывание [7]. Фактор свертывания VIIa, постоянно присутствующий в крови в концентрации 0,1 нМ, связывается с тканевым фактором, приобретая высокую ферментативную активность по отношению к факторам IX и X [8]. Фактор IX после активации (IXa) может активировать фактор X [9]. Активный фактор X (Xa) активи-

рует протромбин до тромбина [10], вместе с последним фактор Xa активируют кофакторы V и VIII [11, 12]. На фосфолипидных поверхностях везикул и тромбоцитов активные кофакторы VIIIa и Va собираются в комплексы соответственно с факторами IXa и Xa [9, 13]. При этом ферментативная активность факторов в комплексах возрастает на несколько порядков. Комплекс IXaVIIIa (внутренняя теназа) – основной активатор фактора X в тех областях сосуда, где нет тканевого фактора, а комплекс XaVa (протромбиназа) – основной активатор тромбина. Последний активирует фибриноген до фибрина, который, полимеризуясь, образует плазменный сгусток [14].

При повреждении сосуда из тканей, находящихся в его выстилке, выходит тканевый активатор плазминогена (ТПА) – основной активатор лизиса сгустка. Помимо него, в крови постоянно циркулирует другой активатор лизиса – урокиназный активатор плазминогена. Оба этих белка изначально представлены малоактивной одноцепочечной формой, которая протеолитически активируется плазмином до более активной, двухцепочечной формы. Активаторы лизиса могут активировать плазминоген до плазмина напрямую, но это очень медленная реакция. Тканевый активатор плазминогена способен связываться с фибрином, при этом скорость активации плазминогена возрастает на порядки [15]. Плазмин связывается с фибрино-

Рисунок 1

Схема реакций системы фибринолиза



Примечание: синим цветом выделены неактивные предшественники-зимогены; зеленым – активированные ферменты; красным – ингибиторы; черные стрелки указывают переход из неактивной формы в активную; синие стрелки – обратимое образование комплексов; зеленые стрелки указывают, какая реакция происходит под действием данного фермента. Сокращения: Пг – плазминоген; Пн – плазмин; Фг – фибриноген; Фн – фибрин; о/д-ТПА – одно-/двухцепочечная форма тканевого активатора плазминогена; о/д-УПА – одно-/двухцепочечная форма урокиназного активатора плазминогена; Тн – тромбин; Тм – тромбомодулин; ПАИ – ингибитор активатора плазминогена; АП – антиплазмин; МГ – макроглобулин; ТАФИа – тромбин активируемый ингибитор фибринолиза (активный); ПДФ – продукты деградации фибрина.

вой сетью и начинает отрезать от нее кусочки, приводя к постепенному растворению сгустка. В системе лизиса присутствуют ингибиторы плазмينا (антиплазмин, альфа-2 макроглобулин), ингибиторы активаторов пламиногена (ПАИ-1, ПАИ-2), а также особый фермент – ТАФИ (тромбин-активируемый ингибитор фибринолиза), который модифицирует сайты связывания фибрина с ТПА и пламиногеном, делая такую связь невозможной [16], что приводит к уменьшению скорости активации плазмينا и ухудшает лизис. Общая схема реакций системы фибринолиза представлена на *рисунке 1*.

Процессы образования и разрушения сгустка достаточно тесно переплетены между собой. Так, тромбин стимулирует выброс ТПА из эндотелия [17], что улучшает лизис; тромбин активирует фактор XIII – фермент, который ковалентно сшивает сгусток, делая его более устойчивым к лизису [18, 19]; тромбин активирует ТАФИ, ухудшая лизис. Плазмин – неспецифическая сериновая протеаза – может расщеплять многие факторы свертывания, приводя к его ухудшению [20]. Только комплексные исследования, включающие в себя одновременную диагностику всех компонентов системы свертывания и лизиса, способны дать общую картину состояния гемостаза.

СИСТЕМА ФИБРИНОЛИЗА И МЕТОДЫ ЕЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования в области свертывания крови привели к значительному прогрессу в понимании роли различных компонент в процессе образования сгустков. Были разработаны клинические тесты, позволяющие оценить влияние каждого из них: тромбоцитов, факторов свертывания, ингибиторов. О фибринолизе этого сказать нельзя. Несколько десятилетий фундаментальных исследований не привели к созданию тестов фибринолиза, востребованных в клинической практике [21]. Исключение составляет лишь тест оценки D-димера, измеряющий концентрацию димеризованных D-доменов фибрина, остающихся после протекания лизиса сгустка.

Существуют тесты оценки активности факторов фибринолиза. Их плюс – относительная простота и универсальность методов. В большинстве случаев используют иммунологические или функциональные тесты. Иммунологические тесты основаны на реакции антиген-антитело, в которой антиген – исследуемое вещество, антитело – специальная иммунологическая метка. Образец смешивают с меткой; с помощью фото-/флуорометрических методов измеряют концентрацию образовавшихся комплексов, на основании этих данных происходит расчет концентрации исследуемого вещества. Плюс этого метода – высокая точность, позволяющая определять пикомолярные концентрации; минус – слабая физиологическая

информативность, поскольку концентрация фермента не всегда однозначно отражает его активность (а значит, и функциональную роль) по отношению к физиологическому субстрату.

Другая группа методов – функциональные тесты, суть которых заключается в добавлении в образец хромо-/флуорогенного субстрата для исследуемого вещества. Взаимодействие образца и субстрата приводит к активации последнего, концентрация которого регистрируется в системе. Информативность таких тестов ограничена, так как концентрация фибринолитических факторов может сильно варьировать даже у одного индивидуума (например, эндотелий сосудов локально выделяет значительное количество факторов фибринолиза в период наличия тромба). Другая причина состоит том, что оценка по отдельности каждого компонента фибринолиза малоинформативна и отражает лишь потенциальный уровень активности системы. Таким образом, основной областью их применения остается диагностика редких генетических заболеваний, связанных с дефицитом одного из факторов системы фибринолиза.

Фибриноген и фибрин. Фибриноген, предшественник фибрина, циркулирует в крови в концентрации 8,8 мкМ, его молекулярная масса – 340 кДа. В отличие от большинства плазменных белков, фибриноген имеет выраженную неглобулярную форму, напоминая эллипсоид длиной 45 нм, толщиной 5–9 нм. Фибриноген – это димер, каждая его половинка состоит из трех полипептидных цепей, связанных дисульфидными мостиками. Структурно молекула фибриногена представлена в виде нескольких доменов: два D-домена, центральный E-домен и два α C домена. Половинки димера связаны между собой на N-концах всех трех пар полипептидных цепей (E-домен), там же находятся активные сайты молекулы. Активация фибриногена производится путем отрезания тромбином фибринопептидов А и В. Сначала происходит отщепление фибринопептида А – этого достаточно для начала полимеризации, молекулы фибрина начинают образовывать полимерную нить. После отщепления фибринопептидов В нити фибрина получают возможность агрегировать латерально, образуя трехмерную фибриновую сеть. Дополнительно нити фибрина укрепляются поперечными сшивками благодаря фактору XIIIa (кроме того, фактор XIIIa присоединяет к нитям фибрина молекулы α 2-антиплазмينا, что ухудшает процесс лизиса [22]).

Параметры фибриновой сети (толщина фибрилл и средняя длина между ветвлениями) зависят от условий полимеризации – pH среды, концентрации солей, ионной силы, концентрации тромбина [23].

D-димер – продукт деградации фибрина, косвенно отражающий результат совместной работы системы свертывания и фибринолиза. Низкая концентра-

ция D-димера соответствует нормальному состоянию системы гемостаза; повышение D-димера наблюдается при тромбозах, беременности, у пожилых людей и при широком спектре воспалительных и онкологических состояний [24]. В связи с этим специфичность такого теста для оценки состояния фибринолиза довольно низкая. Обычно этот метод используют для исключения тромбоза глубоких вен и ТЭЛА, предполагая нормальное функционирование фибринолитической системы. К тому же данный тест показывает ложноположительный результат при липемии, гипербилирубинемии, гемолизе и повышенном уровне ревматоидных факторов [24].

Иммунологические методы измерения D-димера показывают высокую чувствительность в отношении тромбозов (93–96%), но низкую специфичность (43–53%) [25]. Показания теста D-димера рекомендуется использовать в скоринговых расчетах вероятности тромбоза глубоких вен нижних конечностей и легочной эмболии [26].

Плазминоген и плазмин. Основной белок системы фибринолиза – плазмин. Именно на нем замыкается большинство петель обратной связи, именно он проводит единственную физиологически значимую реакцию фибринолиза – гидролиз нитей фибрина. Плазмин, как и большинство ферментов свертывания и лизиса, является сериновой протеиназой. Он образуется из своего предшественника – плазминогена (Пг), циркулирующего в крови в концентрации 2 мкМ. Плазминоген представляет собой одноцепочечный гликопротеин с молекулярной массой 92 кДа. Время жизни свободного плазминогена – порядка двух дней [27]. Основным органом, синтезирующим плазминоген, – печень, но этот белок представлен в экстравазальном пространстве многих других тканей. Известно, что помимо печени, он может синтезироваться почками и роговицей

Превращение плазминогена в плазмин происходит под действием активаторов плазминогена, которые

расщепляют пептидную связь Арг561–Вал562, вследствие чего молекула переходит в двухцепочечную (цепи соединены двумя дисульфидными мостиками).

Мутации плазминогена могут вызывать псевдомембранные заболевания, такие как фиброзный (лигнеозный) конъюнктивит. У плазминоген-дефицитных мышей также наблюдаются фиброзный конъюнктивит, тромбозы, отложения фибрина в интра- и экстравазальном пространстве многих тканей [28]. Сводная характеристика плазминогена представлена в *таблице 1*.

Концентрацию плазминогена в плазме крови человека и его активность измеряют в основном при помощи функционального хромогенного теста. В качестве внешнего активатора плазминогена используется стрептокиназа, которая образует с ним автокаталитический комплекс, инициирующий образование плазмина, который в свою очередь активирует хромогенную метку [29].

Снижение функциональной активности плазминогена наблюдается у некоторых этнических групп (в основном в странах Азии [30]), но связи с повышенным риском тромбоза не выявлено [31]. Даже в случае гомозиготной недостаточности плазминогена у таких больных тромботические патологии не наблюдаются [32]. Отсутствие тромботических патологий у таких пациентов, вероятно, вызвано тем, что даже низкие концентрации плазминогена (от 4 до 51%) достаточны для нормального функционирования системы фибринолиза.

Активаторы плазминогена. В нашем организме имеются два основных активатора плазминогена – урокиназный активатор плазминогена (УПА) и тканевой активатор плазминогена (ТПА). Активаторы плазминогена применяются у пациентов при терапии тромбозов и тромботических осложнений. Помимо физиологических активаторов плазминогена, в клинике применяются активаторы животного и бактериального происхождения. Наиболее распростра-

Таблица 1

Сводная характеристика плазминогена

Концентрация, масса	2 мкМ, 92 кДа
Роль в организме	Разрушение фибрина, заживление ран, воспаление, ангиогенез
Производится	Печень (а также эозинофилы, почки, роговица и др.)
Время полувыведения	2,2 дня, посредством печени
Избыток	Неизвестно
Дефицит у людей	Конъюнктивит, гидроцефалия (редкая патология, 1,6 случая на 1 млн)
Дефицитные мыши	Депонирование фибрина в органах

ненный из них – стрептокиназа. Со стрептокиназой плазмин образует автокаталитический комплекс, который переводит другие молекулы плазминогена в активное состояние.

Тканевый активатор плазминогена. ТПА – это сериновая протеиназа с молекулярной массой 68 кДа. ТПА секретируется в основном эндотелиальными клетками [17], поэтому его называют также васкулярным активатором плазминогена. В плазме ТПА циркулирует в концентрации 70 пМ, причем в свободной форме находится лишь 20% этого количества, остальные молекулы ТПА – в связанном состоянии со своим ингибитором (ПАИ) [33].

ТПА секретируется в виде одноцепочечной формы (о-ТПА). При взаимодействии с плазмином, который расщепляет пептидную связь Арг275-Иле276, ТПА переходит в двухцепочечную форму (д-ТПА).

Интересен тот факт, что о-ТПА, хотя и является ферментом, в отсутствие фибрина проявляет очень низкую активность к плазмину. При появлении фибрина начинается образование тройных комплексов (ТПА-Пг-фибрин), и активность о-ТПА возрастает примерно в 1000 раз [15].

Экспериментальные данные по кинетике активации плазминогена при помощи ТПА сильно варьируют, по-видимому, это связано с тем, что на активацию Пг влияют многие факторы: различные процедуры подготовки ТПА и Пг, разные концентрации субстратов, а при исследовании с фибриногеном и его производными – еще и условия формирования фибрина.

Поскольку ТПА обладает высокой специфичностью к плазмину и начинает работать непосредственно в области тромба (для этого ему необходимо наличие фибрина), он стал основной мишенью для исследователей в области генной инженерии – они стремились улучшить его показатели, пытались создать эффективный терапевтический препарат. Наиболее успешным в этом направлении стало создание серии мутантов ТПА, резистентных к ПАИ-1 (его основному ингибитору). Группа исследователей обнаружила взаимодействие между положительно заряженным участком ТПА (298–302) и отрицательно заряженным участком ПАИ-1 (350–355) [34]. Мутагенез в остатках Арг298, 299 и 304 молекулы ТПА позволил создать мутантную молекулу, ингибирующуюся в 120 000 раз хуже, чем молекулы обычного ТПА. Эти исследования легли в основу создания препарата Тенектеплаза – мутанта ТПА, в котором последовательность 296–299 (Лиз-Гис-Арг-Арг) была заменена на четыре аланина [35]. Данный мутант показал более медленное выведение из кровотока и более высокую селективность к фибрину.

На экспрессию ТПА влияют такие вазоактивные вещества, как тромбин и гистамин, они взаимодействуют с клетками посредством G-белковых рецеп-

торов. Отметим, что не все эндотелиальные клетки синтезируют ТПА; известно, что в мелких сосудах экспрессия ТПА ограничена [36, 37].

Свободный ТПА и комплексы ТПА с ингибиторами быстро удаляются из кровотока, связываясь с рецепторами эндотелиальных клеток и гепатоцитов. Время полувыведения составляет в норме около 3 мин [38].

Случаи врожденного дефицита ТПА и УПА у людей не были описаны. Считалось, что дефицит этих белков несовместим с жизнью. Однако эксперименты на мышах показали неожиданный результат: мыши, дефицитные по ТПА, развивались нормально. Микроскопический анализ выявил у этих мышей умеренный гломерулонефрит. Лизис сгустка шел у них хуже, чем у особей дикого типа. Полный нокаут активаторов схож по фенотипу с нокаутом самого плазминогена; это показывает, что ТПА и УПА – основные активаторы плазминогена у млекопитающих [39].

При измерении уровня ТПА фиксируется, как правило, неактивный комплекс с ПАИ-1, поэтому повышенный уровень такого ТПА может характеризовать не повышение активности фибринолиза, а наоборот, его ингибирование [40]. В некоторых лабораториях проводят фибринолитический тест венозной окклюзии с помощью манжеты: пациенту на руку надевают манжету для измерения давления; на 10–20 мин нагнетается давление – среднее между систолическим и диастолическим (но < 100 мм рт. ст.). Взятие крови производится до и после процедуры, ниже все еще надутая манжета. Считается, что результат данной процедуры – выброс эндотелиальных факторов лизиса, однако не ясно, отражает ли данная процедура физиологическое состояние пациента лучше, нежели обычное взятие крови [2].

ТПА может повышаться в острой фазе воспаления [41], а также изменяться в зависимости от циркадного ритма [42]. Связь между повышенным уровнем ТПА и заболеваниями сердечно-сосудистой системы (ССС) была показана в многочисленных исследованиях, хотя зачастую их результаты существенно отличаются. Так, например, в одних исследованиях, повышенный уровень ТПА коррелирует с риском тромботических артериальных заболеваний [43], а другие исследования показывают отсутствие корреляции [44]. Аналогичная ситуация наблюдается с венозными тромбозами [45].

Можно предположить, что такая нечеткая картина, описывающая взаимосвязь уровня ТПА и клинических проявлений нарушений гемостаза/фибринолиза связана с тем, что ТПА – это белок острой фазы: в состоянии покоя в крови присутствуют следовые концентрации ТПА, а основная его часть выходит из эндотелия под действием тромбина [17], образующегося в процессе свертывания крови. Обычный анализ венозной крови не покажет, сколько ТПА вый-

дет из эндотелия и, соответственно, как будет протекать лизис сгустка.

Урокиназный активатор плазминогена. УПА обнаруживают в моче в концентрации 40–80 мкг/л [46]. Он синтезируется целым рядом клеток – эпителиальными, соединительнотканными, макрофагами, эндотелиальными клетками и др. УПА активирует плазминоген, расщепляя связь Арг561–Вал562, так же, как ТПА, но в отличие от последнего УПА для данной реакции не требуется присутствие фибрина. Это свойство позволяет предположить, что основная физиологическая роль УПА – это участие в процессах разрушения внеклеточного матрикса, клеточной миграции, воспаления, заживления ран, метастазирования, в то время как основная задача ТПА – разрушение фибриновых сгустков в крови [47].

УПА синтезируется в виде одноцепочечной формы, которая под действием плазмина переходит в двухцепочечную, что в 250 раз повышает ее активность в реакции превращения плазминогена в плазмин [48].

Время полувыведения УПА из плазмы составляет порядка 7 мин, расщепление происходит в печени [49]. При связывании с урокиназным рецептором

(УПА-Р) активность о-УПА возрастает на два порядка [50]. Предполагается, что благодаря этому моноциты могут мигрировать внутрь тромба [51].

Генетических заболеваний, связанных с дефицитом УПА и УПАР, не зафиксировано. Исследования на мышцах с нокаутацией гена УПА показали, что такие мыши (УПА-/-), как и мыши ТПА-/-, имеют отложения фибрина в органах, тем не менее спонтанным тромбообразованием не страдают [52]. У УПА-/- мышшей значительно замедлен процесс заживления ран [53]. Интересно, что у мышшей с УПАР-/- раны заживают так же, как у здоровых особей [54].

Сводная характеристика активаторов плазминогена представлена в *таблице 2*.

Ингибиторы фибринолиза (ингибиторы плазмина, ПАИ, ТАФИ). По механизму действия ингибиторы системы фибринолиза делятся на несколько типов. Первая группа (ПАИ-1, ПАИ-2) ингибирует активаторы плазминогена, урокиназу и тканевый активатор. Белки второй группы (антиплазины и макроглобулины) ингибируют непосредственно плазмин. К третьей группе можно отнести ТАФИ, ингибирующее действие которого связано с удалением на фибриновых молекулах сайтов связывания плазмина и ТПА.

Таблица 2

Сводная характеристика активаторов плазминогена

Показатель	УПА	ТПА
Концентрация, масса	40 нМ, 54 кДа	70 пМ*, 68 кДа
Роль в организме	Активация Пг, клеточная миграция, ангиогенез	Активация Пг, нейрогенез
Производится	Фибрибласты, эпителиальные клетки, лейкоциты	В основном эндотелиальные клетки
Время полувыведения, t _{1/2}	Печень, 7 мин	Печень, эндотелиальные клетки, 3 мин
Избыток у людей	Онкология, отложенные (12–14 ч) послеоперационные кровотечения (болезнь Квебека), амилоидоз	Заболевания ССС, меноррагия
	Заболевания/трансплантация печени, кровотечения, геморрагический диатез, ДВС, острый миелоидный лейкоз, неоплазии	
Дефицит у людей (генетический)	Не зафиксировано	
Дефицит у людей (фенотипический)	Сахарный диабет 2-го типа, гипергликемия	Не зафиксировано
Избыток у мышшей	Внутричерепные кровотечения, улучшенная обучаемость	Улучшенная обучаемость
Дефицит у мышшей	Депонирование фибрина в органах	Нормальное развитие, незначительные тромбозы

* После повреждения эндотелия, концентрация ТПА возрастает на порядок за 20 мин [55].

Ингибиторы активаторов плазминогена (ПАИ).

ПАИ-1 – основной ингибитор активаторов плазминогена, урокиназы и тканевого активатора. Молекула ПАИ обладает свойством автоинактивации (происходит вследствие спонтанного перемещения петли активного центра вглубь молекулы). Данная автоинактивация пассивна и имеет обратимый характер (вернуть активность можно с помощью денатурации) [56]. Время полувыведения ПАИ-1 короткое – порядка 10 мин; концентрация в плазме варьирует в широких пределах – от 1 до 40 нг/мл. ПАИ-1 синтезируется многими тканями. Основной вклад в синтез ПАИ-1 в организме вносят тромбоциты [57], эндотелиальные клетки [58], гепатоциты и адипоциты [59]. Около половины количества циркулирующего ПАИ содержится в тромбоцитах, которые выбрасывают его при формировании тромба [60], вследствие чего тромб приобретает резистентность к лизису.

Дефицит ПАИ-1 встречается у людей редко и, как правило, сопровождается длительными и отложенными кровотечениями [61]. Оральный прием транексамовой кислоты нормализует состояние гемостаза у таких пациентов [62]. Повышенный уровень ПАИ-1 связывают с различными патологиями ССС [63],

онкологией [64], ожирением, сахарным диабетом 2-го типа [65] и др.

ПАИ-2 был обнаружен в плаценте и считался плацентарным ингибитором УПА [66]. ПАИ-2 играет роль ингибитора активаторов плазминогена в тканях эпидермиса, пищевода, роговицы, языка и вагины [67]. В норме ПАИ-2 в плазме не обнаруживается, появляясь лишь при беременности. Концентрация ПАИ-2 достигает максимума на 33-й неделе гестации – порядка 250 нг/мл [68]. ПАИ-2 обнаруживают также у пациентов с миелобластным лейкозом типов М4 и М5 [69], у пациентов с сепсисом – у них также повышен уровень ПАИ-1 [70]. Ингибиторы фибринолиза представлены в *таблице 3*.

Измерение концентрации ПАИ-1 в плазме не отражает его реальную ингибирующую способность, так как большая часть ПАИ-1 высвобождается активированными тромбоцитами непосредственно в тромбе [71].

Уровень ПАИ-1 может повышаться при сахарном диабете и инсулин-резистентности [40], при беременности [41], изменяется в зависимости от циркадного ритма [42]. Исследования зависимости риска тромботических заболеваний от уровня ПАИ-1 обнаружива-

Таблица 3

Ингибиторы фибринолиза

Показатель	ПАИ-1	Антиплазмин	α2-Макроглобулин
Концентрация, масса	200 пМ*, 52 кДа	1 мкМ, 70 кДа	3 мкМ, 725 кДа
Роль в организме	Ингибитор активаторов плазминогена	Ингибитор плазмина	Универсальный ингибитор протеиназ плазмы
Производится	Эндотелий сосудов, тромбоциты, адипоциты и др.	Печень	Печень, предстательная железа
Время полувыведения, t _{1/2}	Печень (+автоинактивация), 10–120 мин	Печень, 3 дня (0,5 д в комплексе с Пн)	Печень, 7 дней
Избыток у людей	Сахарный диабет 2-го типа, метаболический синдром, повышение уровня глюкозы, инсулина, онкология, беременность, преэклампсия, сепсис, заболевания ССС, послеоперационный период	Сахарный диабет, стрептококковая инфекция, послеоперационный период	Фиброз печени, нефротический синдром, сахарный диабет
Дефицит у людей (генетический)	Кровотечения после хирургических вмешательств	Кровотечения, (известна лишь одна семья)	Нормальное развитие
Дефицит у людей (фенотипический)	Кровотечения	Заболевания печени, ДВС, тромболитическая терапия	Заболевания печени, панкреатит
Избыток у мышей	Венозные тромбозы, ишемия конечностей		
Дефицит у мышей	Нормальное развитие	Нормальное развитие	

* Концентрация ПАИ в сгустке может увеличиваться до 30 раз [60].

ют такую же разнородную картину, как и для ТПА [43–45, 72], показывая то положительную, то нулевую, то отрицательную корреляцию. По-видимому, это связано еще и с тем, что ПАИ-1 выходит из тромбоцитов в процессе образования тромба, и локально его концентрация может увеличиться в несколько раз по сравнению с базовым уровнем (во время взятия крови).

α 2-Антиплазмин. Он играет роль основного ингибитора плазмينا в организме. Концентрация α 2-антиплазмينا в плазме составляет 70 мг/л (1 мкМ), что соответствует приблизительно половине концентрации плазминогена в молярном эквиваленте. Время полувыведения свободной молекулы – трое суток (антиплазмин-плазминный комплекс выводится за 12 ч) [73]. Антиплазмин, так же как плазмин, может связываться с фибрином посредством лизин-связывающих центров. Плазмин, связанный таким образом с фибрином, становится защищенным от инактивации α 2-антиплазмином [74].

Повышенный уровень плазмин-антиплазминовых комплексов, снижение концентрации антиплазмينا характеризует гиперфибринолитическое состояние, которое может быть вызвано травмами [75], ДВС [76], острым промиелоцитарным лейкозом [77]. Однако корреляции между концентрацией антиплазмينا и тяжестью патологий установлено не было, видимо, в связи с высоким базовым уровнем антиплазмينا. Даже при отклонении в несколько раз от базового значения концентрация антиплазмينا остается достаточно высокой для поддержания относительно нормального лизиса в обычных условиях и не приводит к изменению клинической картины. Тест, определяющий концентрацию антиплазмينا, используется для диагностики редких генетических заболеваний, которые могут повлиять на исход обширного операционного вмешательства, когда гемостаз функционирует за пределами нормальных условий.

α 2-Макроглобулин. Макроглобулин – высокомолекулярный белок, основной ингибитор широкого спектра протеиназ, он также играет роль запасного ингибитора для ряда ферментов, включая плазмин [78]. Его концентрация в плазме крови – 3 мкМ. Макроглобулин начинает оказывать заметный эффект на систему фибринолиза, когда истощаются запасы α 2-антиплазмينا и роль основного ингибитора плазмينا переходит к макроглобулину, хотя его эффективность по отношению к плазмину в 10 раз ниже, чем у α 2-антиплазмينا. Макроглобулин играет роль ловушки, захватывая мишень, вследствие чего к субстрату блокируется доступ извне.

Повышение концентрации макроглобулина в крови наблюдается при заболеваниях, связанных с фибризом печени (цирроз, гепатиты, болезнь Вильсона–Коновалова), нефротическом синдроме, аденоме простаты и сахарном диабете.

Тромбин-активируемый ингибитор фибринолиза. ТАФИ – это одноцепочечный гликопротеин с молекулярной массой 60 кДа. Концентрация ТАФИ в крови может варьировать в диапазоне от десятков до сотен нМ [79, 80]. Под воздействием тромбин-тромбомодулинового комплекса ТАФИ переходит в активную форму (ТАФИа) [81]. ТАФИа удаляет С-концевые лизиновые аминокислотные остатки с фибрина, что препятствует связыванию плазмينا с фибриновой сетью. ТАФИа нестабилен при 37 °С; время полужизни молекулы – 8–9 мин.

Ряд исследований показывает корреляцию повышенного уровня ТАФИ с риском тромбоза, а также связь с уровнем белков острой фазы воспаления [82].

ТАФИ измеряют с помощью как иммунологических, так и функциональных тестов. Функциональные тесты имеют преимущество в связи с тем, что измеряют только активный ТАФИ, а иммунологические – как активный, так и инактивированный ТАФИ. Существуют различные способы постановки функционального теста ТАФИ. Первый способ: образец разводят в 20 раз в дефицитной по ТАФИ плазме, в раствор добавляют тромбин, активирующий свертывание и сам ТАФИ, и рекомбинантный ТПА, запускающий лизис. Затем измеряют замедление лизиса по сравнению с контрольным экспериментом. Второй способ: исследуемый образец активируют с помощью тромбина, после этого реакцию останавливают, добавляя *ppack* (D-фенилаланил-пролил-аргинил хлорметилкетон – низкомолекулярный ингибитор тромбина); активность образовавшегося ТАФИа измеряют с помощью специфичного к нему субстрата.

Повышение уровня ТАФИ коррелирует с вероятностью венозной тромбоэмболии: концентрация ТАФИ выше 90 перцентиль соответствует двукратному увеличению риска ТГВНК [83]. Кроме того, известна связь между ТАФИ и различными патологическими состояниями: почечная и печеночная недостаточность, эндокринные заболевания, онкология, ДВС, а также беременность [84].

Регуляция работы системы фибринолиза. Основная реакция системы фибринолиза – расщепление фибрина плазмином. Благодаря данной реакции решается физиологическая задача удаления фибриновых сгустков в организме. Запуск системы фибринолиза начинается с появления фибринового сгустка. С одной стороны, с фибрином начинают связываться молекулы плазминогена и ТПА, что защищает последние от ингибирования, а также образуются тернарные комплексы, увеличивая каталитическую способность ТПА по отношению к Пг в несколько сотен раз. Это смещает баланс между активными ферментами и ингибиторами в сторону активации фибринолиза. Плазмин превращает о-ТПА и о-УПА в двухцепочечные формы, которые начинают быстрее нарабатывать

плазмин, тем самым замыкая петлю положительной обратной связи. С другой стороны, появление тромба приводит к увеличению экспрессии фибринолитических ферментов эндотелиальными клетками сосудов, что также влияет на фибринолиз. Если концентрация плазминогена в крови достаточно стабильна (микромолярные концентрации), то концентрации ТПА, УПА и их ингибиторов составляют десятки пикомолей, и регуляция происходит в основном за счет изменения экспрессии последних. Об этом свидетельствует тот факт, что время жизни активаторов плазминогена составляет минуты и десятки минут, а для плазминогена данный параметр измеряется сутками. Система фибринолиза должна удалять фибрин не слишком быстро, чтобы поврежденные стенки сосудов успели восстановиться, но и не слишком медленно, чтобы не образовалось отложений фибрина в сосудах и органах. Превращение ПГ в плазмин во всем объеме плазмы приведет к деградации многих факторов свертывания, таких как фактор V, VIII, фактор фон Виллебранда и других, так как плазмин – довольно неспецифичный фермент [85–87]. От таких последствий организм защищен тем, что плазмин подвержен быстрому ингибированию в кровеносном русле, кроме тех областей, где содержится фибрин, который защищает плазмин от ингибирования. Деградация фибрина под действием плазмينا происходит с С-конца альфа-цепи, что способствует увеличению С-концевых лизинов, с которыми связываются другие молекулы плазмينا. Фибрин, подвергшийся частичной деградации, связывает глу-ПГ до десяти раз лучше, чем недеградированный.

Связь системы фибринолиза и воспаления. Система фибринолиза тесно связана с воспалительным процессом. Так, ТАФИ обладает противовоспалительным действием благодаря своей способности инактивировать компонент С5а системы комплемента [88]. Плазмин и урокиназа участвуют в процессах разрушения внеклеточного матрикса и клеточной миграции, а плазминоген – в процессе миграции макрофагов в области формирования атеросклеротических бляшек [89]. В экспериментах с трансплантат-ассоциированным атеросклерозом мыши с нокаутированным геном плазминогена показывали значительное уменьшение объема поражения по сравнению с обычными особями [90]. Фактор некроза опухоли, провоспалительный цитокин, синтезируемый в основном моноцитами и макрофагами, резко повышает эндотелиальную экспрессию ПАИ-1 и подавляет фибринолитическую активность [91].

Все эти факты указывают на то, что фибринолиз и воспаление – связанные процессы. Действительно, при повреждении целостности покрова организма с жидкой внутренней средой встают две глобальные задачи: во-первых, препятствие потере собствен-

ной жидкости, которую решает система свертывания (запускающая в дальнейшем фибринолиз), а во-вторых, устранение воздействия патогенных раздражителей, которые могут попасть во внутреннюю среду организма (воспаление).

ГЛОБАЛЬНЫЕ ФИБРИНОЛИТИЧЕСКИЕ ТЕСТЫ

Как описано выше, измерение активности отдельных фибринолитических параметров отражает лишь потенциальный уровень активности системы. Для оценки совокупной работы системы фибринолиза используют глобальные тесты.

Эуглобулиновое время лизиса сгустка, фактор XIIIa-зависимый фибринолиз. Тест эуглобулинового времени лизиса сгустка разработан в 1950-х годах для скрининга гиперфибринолиза [92]. Классическая постановка теста выглядит следующим образом: кровь в цитратной пробирке центрифугируют при +4 °С; плазму отбирают и разводят уксусной кислотой, инкубируют 15 мин на льду. Осадок содержит эуглобулиновую фракцию (плазминоген, плазмин, ТПА, ПАИ-1, фибриноген). Надосадок удаляют, а осадок растворяют в буфере, затем запускают свертывание (тромбином) и регистрируют время лизиса.

Этот тест отражает способность системы лизировать стандартный сгусток, однако в исследуемом образце нет большей части естественных ингибиторов фибринолиза, таких как антиплазмин, ТАФИ, в несколько раз снижена концентрация фибриногена, поэтому тест может оценить только гиперактивность системы лизиса без выявления ее причин.

Модификация этого теста, фактор XIIIa-зависимый фибринолиз, была разработана в 1970-х годах [93]. Содержащиеся в плазме крови белки – калликреин и фактор XIa – могут активировать плазминоген. При этом оба этих белка активируются фактором XIIIa (фактором Хагемана), образующимся в крови из своего неактивного предшественника при контакте с отрицательно заряженной поверхностью (контактная активация).

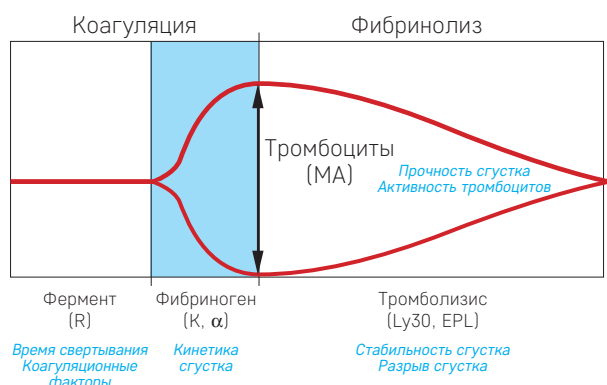
При проведении теста плазму смешивают с каолином (для контактной активации фактора XIIIa) и уксусной кислотой (для осаждения эуглобулиновой фракции), инкубируют при +37 °С 30 мин, центрифугируют и избавляются от надосадка. Осадок разводят в буфере, добавляют кальций и инкубируют при +37 °С. Регистрируют время лизиса.

Как и в классическом тесте эуглобулинового времени лизиса, образец не содержит многих ингибиторов фибринолиза, более того, наработка плазмينا связана не только с активностью естественных активаторов плазминогена (ТПА, УПА), но и с работой калликреин-кининовой системы, уровнем фактора XII, что очень сильно затрудняет интерпретацию результата.

Тромбоэластография (ТЭГ) представляет собой метод графической регистрации процессов свертывания крови и фибринолиза, разработанный в 1948 году. Метод базируется на принципе изменения вязкости образца вследствие полимеризации фибрина. В пластиковую кювету заливают образец (около 0,4 мл цельной крови), добавляют активатор свертывания и вставляют металлический стержень. Кювета совершает медленные вращательные колебания, при образовании сгустка стержень начинает вращаться вместе с кюветой. Амплитуду отклонения стержня регистрируют как функцию времени. По кривой тромбоэластограммы измеряют параметры роста и лизиса сгустка (рис. 2). Для оценки фибринолиза используют параметр $Ly30$, характеризующий процент лизиса сгустка за 30 мин с момента максимальной амплитуды отклонения стержня.

Рисунок 2

Типичная кривая тромбоэластографии
(<http://teg.haemonetics.com>)



ТЭГ позволяет фиксировать гиперфибринолитические состояния и используется для контроля гемостаза и корректировки антифибринолитической терапии при трансплантациях печени, кардиологических операциях с экстракорпоральным кровообращением и травматических коагулопатиях.

К достоинствам тромбоэластографии относится факт измерения процессов в цельной крови, что ближе к ситуации *in vivo* и упрощает процедуру подготовки образца. К минусам ТЭГ относится, в частности, довольно низкая скорость таких экспериментов, которая не подходит для массовых одновременных анализов. ТЭГ измеряет только скорость образования и разрушения фибринового сгустка, упуская полезную информацию, которую можно извлечь из кинетики образования основных регуляторных белков – тромбина и пламина.

Время лизиса сгустка. Определение времени лизиса сгустка проводится на планшетном фотометре. В лунку планшета заливают образец, в который

добавляют фосфолипиды, кальций и тканевый фактор свертывания для инициации коагуляции. В лунку добавляют также ТПА, запускающий процесс фибринолиза. Детектируется проходящий через образец оптический сигнал. Время лизиса сгустка определяется как промежуток времени между моментом образования сгустка (половина максимальной интенсивности светорассеяния при росте сгустка) и полулизиса сгустка (половина максимальной интенсивности светорассеяния при лизисе сгустка).

К плюсам метода можно отнести простоту постановки, возможность использования замороженных образцов, комплексное измерение фибринолиза с участием многих компонент процесса. Тест времени лизиса сгустка чувствителен к уровню пламиногена, антипламина, ПАИ-1, ТАФИ, в то время как фибриноген, протромбин, факторы VII, X, XI слабо влияют на показания теста [45]. Минусы метода: концентрация добавленного ТПА значительно выше физиологических значений; отсутствуют тромбоциты.

Сниженный фибринолитический потенциал, проявляющийся в удлинении времени лизиса сгустка, – фактор риска венозной тромбоэмболии, артериального тромбоза, синдрома Бадда–Киари, преэклампсии и других заболеваний.

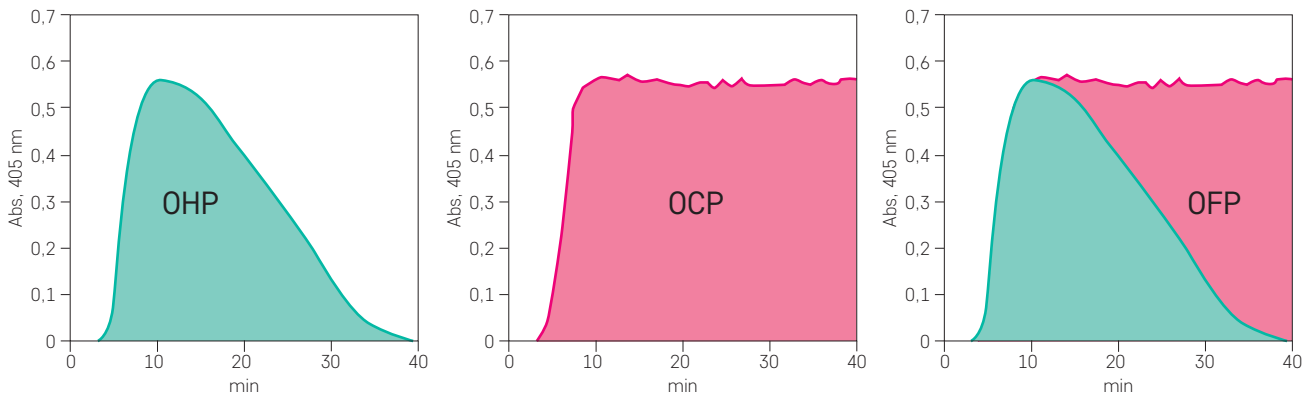
Общий гемостатический потенциал. Тест времени лизиса сгустка позволяет получать лишь один параметр – время существования сгустка. Развитием этого теста является тест общего гемостатического потенциала. Суть его заключается в том, что параллельно в двух лунках запускается процесс свертывания (аналогично тесту времени лизиса сгустка), но в одну из лунок не добавляют ТПА. Таким образом, в лунке с ТПА фиксируется как процесс свертывания, так и процесс лизиса. В лунке без ТПА фиксируется только процесс коагуляции (рис. 3).

Площадь под графиком светорассеяния в постановке с ТПА характеризует общий гемостатический потенциал (*ОНП* – *Overall Haemostatic Potential*), под графиком без ТПА – общий коагуляционный потенциал (*ОСР* – *Overall Coagulation Potential*). Разность площадей под графиками – общий фибринолитический потенциал (*ОФП* – *Overall Fibrinolytic Potential*). Помимо интегральных параметров, в тесте измеряется параметр задержки – время от начала эксперимента до момента роста сгустка (корреляция с АЧТВ), максимальная интенсивность (корреляция с уровнем фибриногена) и скорость образования фибрина. *ОНП* чувствителен к факторам II, V, VII, VIII, IX, X и XI [99]; *ОФП* – к концентрациям пламиногена, антипламина, ПАИ-1, ТАФИ.

Тесты времени лизиса сгустка и общего гемостатического потенциала во многом похожи, имеют схожие достоинства и недостатки – например, нечув-

Рисунок 3

Общий гемостатический потенциал [101]: площадь под графиком светорассеяния в постановке с ТПА характеризует общий гемостатический потенциал (*OHP – Overall Haemostatic Potential*); под графиком без ТПА – общий коагуляционный потенциал (*OCP – Overall Coagulation Potential*); разность площадей под графиками – общий фибринолитический потенциал (*OFP – Overall Fibrinolytic Potential*)



ствительность к эндогенной концентрации активаторов плазминогена. Существует много вариаций теста общего гемостатического потенциала (в частности, вместо тромбина для активации свертывания добавляют тромбопластин), тесты с добавлением и без добавления фосфолипидов. Отсутствие единого стандарта постановки теста не позволяет широко применять его в клинической практике и сравнивать результаты различных лабораторий.

Выводы

Корректная диагностика состояния системы фибринолиза потенциально способна перевести терапию различных заболеваний сердечно-сосудистой системы на новый уровень, упростить постановку диагноза и улучшить качество лечения. Однако нельзя проводить такой анализ в отрыве от анализа состояния системы гемостаза. Существующие лабораторные тесты или не способны отражать клиническую картину (например, измерение концентрации или активности фибринолитических факторов), так как дают информацию только об отдельных компонентах системы, или дают результат, сильно искаженный экспериментальной постановкой (глобальные тесты фибринолиза), – уровень экзогенного активатора лизиса на порядок превосходит эндогенный уровень. Более того, локальные концентрации факторов лизиса многократно увеличиваются из-за секреции из эндотелия и тромбоцитов, что приводит к крайне высокой сложности оценки реальной работы данной системы в условиях *in vitro*. Необходимо разработать новые методы интегральной оценки состояния системы образования и лизиса сгустка, пригодные для использования в клинике.

Основываясь на имеющихся данных, можно предложить, что оптимальный тест для комплексной диагностики состояния системы фибринолиза

и ее взаимодействия с системой гемостаза должен рассматривать ответ системы на различный уровень активации как свертывания, так и лизиса, имитируя спектр возможных начальных условий, возникающих в организме. Такой тест или панель тестов позволит выяснить поведение системы свертывания и лизиса в различных случаях и отразить картину состояния гемостаза гораздо детальнее по сравнению с классическими тестами с одним набором начальных условий.

Сбои в работе системы фибринолиза могут приводить к серьезным патологическим состояниям, кровотечениям или, наоборот, к тромбозам и депонированию фибрина в тканях. Эти состояния надо уметь заранее диагностировать и точно корректировать, не нарушая баланс между другими системами. Понимание деталей регуляции фибринолитического процесса даст возможность разрабатывать диагностические тесты, позволяющие с высокой точностью оценить фибринолитическое состояние пациента и определить оптимальную тактику лечения.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа авторов поддержана грантами Президента РФ для молодых кандидатов МК-9245.2016.4 и МК-913.2017.4 и грантом РФФИ 15-54-45036.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

А.С. Жалылов <http://orcid.org/0000-0002-9032-3465>
А.Н. Баландина <http://orcid.org/0000-0002-7032-6951>
А.Д. Купраш <http://orcid.org/0000-0002-1210-9156>
А. Шривастава <http://orcid.org/0000-0001-5032-5020>
А.М. Шибекко <http://orcid.org/0000-0003-1494-3125>

Литература

- Meltzer M.E., Doggen C.J., de Groot P.G., Rosendaal F.R., Lisman T. The impact of the fibrinolytic system on the risk of venous and arterial thrombosis. *Semin Thromb Hemost.* 2009;35(5):468–477.
- Gorog D.A. Prognostic value of plasma fibrinolysis activation markers in cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol.* 2010;55(24):2701–2709.
- Chesebro J.H., Knatterud G., Roberts R., Borer J., Cohen L.S., Dalen J. et al. Thrombolysis in Myocardial Infarction (TIMI) Trial, Phase I: A comparison between intravenous tissue plasminogen activator and intravenous streptokinase. Clinical findings through hospital discharge. *Circulation.* 1987;76(1):142–154.
- Urokinase pulmonary embolism trial. Phase 1 results: a cooperative study. *JAMA.* 1970;214(12):2163–2172.
- Meneveau N., Schiele F., Vuilleminot A., Valette B., Grollier G., Bernard Y. et al. Streptokinase vs alteplase in massive pulmonary embolism. A randomized trial assessing right heart haemodynamics and pulmonary vascular obstruction. *Eur Heart J.* 1997;18(7):1141–1148.
- Heemskerk J.W., Bevers E.M., Lindhout T. Platelet activation and blood coagulation. *Thromb Haemost.* 2002;88(2):186–193.
- Carson S.D., Brozna J.P. The role of tissue factor in the production of thrombin. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1993;4(2):281–292.
- Morrison S.A., Jesty J. Tissue factor-dependent activation of tritium-labeled factor IX and factor X in human plasma. *Blood.* 1984;63(6):1338–1347.
- van Dieijen G., Tans G., Rosing J., Hemker H.C. The role of phospholipid and factor VIIIa in the activation of bovine factor X. *J Biol Chem.* 1981;256(7):3433–3442.
- Wu J.R., Zhou C., Majumder R., Powers D.D., Weinreb G., Lentz B.R. Role of procoagulant lipids in human prothrombin activation. 1. Prothrombin activation by factor X(a) in the absence of factor V(a) and in the presence of membranes. *Biochemistry.* 2002;41(3):935–949.
- Monkovic D.D., Tracy P.B. Activation of human factor V by factor Xa and thrombin. *Biochemistry.* 1990;29(5):1118–1128.
- Lollar P., Knutson G.J., Fass D.N. Activation of porcine factor VIII:C by thrombin and factor Xa. *Biochemistry.* 1985;24(27):8056–8064.
- Mathur A., Zhong D., Sabharwal A.K., Smith K.J., Bajaj S.P. Interaction of factor IXa with factor VIIIa. Effects of protease domain Ca²⁺ binding site, proteolysis in the autolysis loop, phospholipid, and factor X. *J Biol Chem.* 1997;272(37):23418–23426.
- Weisel J.W., Litvinov R.I. Mechanisms of fibrin polymerization and clinical implications. *Blood.* 2013;121(10):1712–1719.
- Rijken D.C. Fibrinolytic properties of one-chain and two-chain human extrinsic (tissue-type) plasminogen activator. *J Biol Chem.* 1982;257(6):2920–2925.
- Bajzar L., Manuel R., Nesheim M.E. Purification and characterization of TAFI, a thrombin-activable fibrinolysis inhibitor. *J Biol Chem.* 1995;270(24):14477–14484.
- Levin E.G., Marzec U., Anderson J., Harker L.A. Thrombin stimulates tissue plasminogen activator release from cultured human endothelial cells. *J Clin Invest.* 1984;74(6):1988–1995.
- Sidemann J.J., Gram J., Jespersen J., Kluft C. Fibrin clot formation and lysis: basic mechanisms. *Semin Thromb Hemost.* 2000;26(6):605–618.
- Muszbec L., Bereczky Z., Bagoly Z., Komaromi I., Katona E. Factor XIII: a coagulation factor with multiple plasmatric and cellular functions. *Physiol Rev.* 2011;91(3):931–972.
- Samis J.A., Ramsey G.D., Walker J.B., Nesheim M.E., Giles A.R. Proteolytic processing of human coagulation factor IX by plasmin. *Blood.* 2000;95(3):943–951.
- Prins M.H., Hirsh J. A critical review of the evidence supporting a relationship between impaired fibrinolytic activity and venous thromboembolism. *Arch Intern Med.* 1991;151(9):1721–1731.
- Reed G.L., Matsueda G.R., Haber E. Platelet factor XIII increases the fibrinolytic resistance of platelet-rich clots by accelerating the crosslinking of alpha 2-antiplasmin to fibrin. *Thromb Haemost.* 1992;68(3):315–320.
- Di Stasio E., Nagaswami C., Weisel J.W., Di Cera E. Cl-regulates the structure of the fibrin clot. *Biophys J.* 1998;75(4):1973–1979.
- Bates S.M. D-dimer assays in diagnosis and management of thrombotic and bleeding disorders. *Semin Thromb Hemost.* 2012;38(7):673–682.
- Di Nisio M., Squizzato A., Rutjes A.W., Buller H.R., Zwinderman A.H., Bossuyt P.M. Diagnostic accuracy of D-dimer test for exclusion of venous thromboembolism: a systematic review. *J Thromb Haemost.* 2007;5(2):296–304.
- Bates S.M., Jaeschke R., Stevens S.M., Goodacre S., Wells P.S., Stevenson M.D. et al. Diagnosis of DVT: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed. American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest.* 2012;141(2 Suppl):418.
- Collen D., de Maeyer L. Molecular biology of human plasminogen. I. Physicochemical properties and microheterogeneity. *Thromb Diath Haemorrh.* 1975;34(2):396–402.
- Drew A.F., Kaufman A.H., Kombrinck K.W., Danton M.J., Daugherty C.C., Degen J.L. et al. Ligneous conjunctivitis in plasminogen-deficient mice. *Blood.* 1998;91(5):1616–1624.
- Brandt J.T. Plasminogen and tissue-type plasminogen activator deficiency as risk factors for thromboembolic disease. *Arch Pathol Lab Med.* 2002;126(11):1376–1381.
- Schuster V., Hugle B., Tefs K. Plasminogen deficiency. *J Thromb Haemost.* 2007;5(12):2315–2322.
- Tait R.C., Walker I.D., Conkie J.A., Islam S.I., McCall F. Isolated familial plasminogen deficiency may not be a risk factor for thrombosis. *Thromb Haemost.* 1996;76(6):1004–1008.
- Tefs K., Gueorgieva M., Klammt J., Allen C.M., Aktas D., Anlar F.Y. et al. Molecular and clinical spectrum of type I plasminogen deficiency: A series of 50 patients. *Blood.* 2006;108(9):3021–3026.

33. Stalder M., Hauert J., Kruihof E.K., Bachmann F. Release of vascular plasminogen activator (v-PA) after venous stasis: electrophoretic-zymographic analysis of free and complexed v-PA. *Br J Haematol.* 1985;61(1):169–176.
34. Madison E.L., Goldsmith E.J., Gerard R.D., Gething M.J., Sambrook J.F. Serpin-resistant mutants of human tissue-type plasminogen activator. *Nature.* 1989;339(6227):721–724.
35. Paoni N.F. A slow clearing, fibrin-specific, PAI-1 resistant variant of tPA (T103N, KHRR 296-299 AAAA). *Thromb Haemost.* 1993;70(2):307–312.
36. Kooistra T., Opdenberg J.P., Toet K., Hendriks H.F., van den Hoogen R.M., Emeis J.J. Stimulation of tissue-type plasminogen activator synthesis by retinoids in cultured human endothelial cells and rat tissues *in vivo*. *Thromb Haemost.* 1991;65(5):565–572.
37. Medh R.D., Santell L., Levin E.G. Stimulation of tissue plasminogen activator production by retinoic acid: synergistic effect on protein kinase C-mediated activation. *Blood.* 1992;80(4):981–987.
38. Tanswell P., Seifried E., Su P.C., Feuerer W., Rijken D.C. Pharmacokinetics and systemic effects of tissue-type plasminogen activator in normal subjects. *Clin Pharmacol Ther.* 1989;46(2):155–162.
39. Carmeliet P., Schoonjans L., Kieckens L., Ream B., Degen J., Bronson R. et al. Physiological consequences of loss of plasminogen activator gene function in mice. *Nature.* 1994;368(6470):419–424.
40. Meltzer M.E., Doggen C.J., de Groot P.G., Rosendaal F.R., Lisman T. The impact of the fibrinolytic system on the risk of venous and arterial thrombosis. *Semin Thromb Hemost.* 2009;35(5):468–477.
41. Meltzer M.E., Doggen C.J., de Groot P.G., Rosendaal F.R., Lisman T. Plasma levels of fibrinolytic proteins and the risk of myocardial infarction in men. *Blood.* 2010;116(4):529–536.
42. Grimaudo V., Hauert J., Bachmann F., Kruihof E.K. Diurnal variation of the fibrinolytic system. *Thromb Haemost.* 1988;59(3):495–499.
43. Smith A., Patterson C., Yarnell J., Rumley A., Ben-Shlomo Y., Lowe G. Which hemostatic markers add to the predictive value of conventional risk factors for coronary heart disease and ischemic stroke? The Caerphilly Study. *Circulation.* 2005;112(20):3080–3087.
44. Folsom A.R., Aleksic N., Park E., Salomaa V., Juneja H., Wu K.K. Prospective study of fibrinolytic factors and incident coronary heart disease: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21(4):611–617.
45. Meltzer M.E., Lisman T., de Groot P.G., Meijers J.C., le Cessie S., Doggen C.J. et al. Venous thrombosis risk associated with plasma hypofibrinolysis is explained by elevated plasma levels of TAFI and PAI-1. *Blood.* 2010;116(1):113–121.
46. Husain S.S., Gurewich V., Lipinski B. Purification and partial characterization of a single-chain high-molecular-weight form of urokinase from human urine. *Arch Biochem Biophys.* 1983;220(1):31–38.
47. Dano K., Andreasen P.A., Gron Dahl-Hansen J., Kristensen P., Nielsen L.S., Skriver L. Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer. *Adv Cancer Res.* 1985;44:139–266.
48. Pannell R., Gurewich V. Activation of plasminogen by single-chain urokinase or by two-chain urokinase—a demonstration that single-chain urokinase has a low catalytic activity (pro-urokinase). *Blood.* 1987;69(1):22–26.
49. van der Kaaden M.E. Plasma clearance of urokinase-type plasminogen activator. *Fibrinolysis Proteolysis.* 1998;12:251–258.
50. Manchanda N., Schwartz B.S. Single chain urokinase. Augmentation of enzymatic activity upon binding to monocytes. *J Biol Chem.* 1991;266(22):14580–14584.
51. McGuinness C.L., Humphries J., Waltham M., Burnand K.G., Collins M., Smith A. Recruitment of labelled monocytes by experimental venous thrombi. *Thromb Haemost.* 2001;85(6):1018–1024.
52. Carmeliet P. Targeted gene manipulation and transfer of the plasminogen and coagulation systems in mice. *Fibrinolysis.* 1996;10:195–213.
53. Carmeliet P. Urokinase but not tissue type plasminogen activator mediates arterial neointima formation in mice. *Circ Res.* 1997;81:829–839.
54. Deindl E., Ziegelhoffer T., Kanse S.M., Fernandez B., Neubauer E., Carmeliet P. et al. Receptor-independent role of the urokinase-type plasminogen activator during arteriogenesis. *FASEB J.* 2003;17(9):1174–1176.
55. Nicoloso G., Hauert J., Kruihof E.K., van Melle G., Bachmann F. Fibrinolysis in normal subjects – comparison between plasminogen activator inhibitor and other components of the fibrinolytic system. *Thromb Haemost.* 1988;59(2):299–303.
56. 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(21):11581–11587.
57. Konkle B.A., Schick P.K., He X., Liu R.J., Mazur E.M. Plasminogen activator inhibitor-1 mRNA is expressed in platelets and megakaryocytes and the megakaryoblastic cell line CHR-288. *Arterioscler Thromb.* 1993;13(5):669–674.
58. van Mourik J.A., Lawrence D.A., Loskutoff D.J. Purification of an inhibitor of plasminogen activator (antiactivator) synthesized by endothelial cells. *J Biol Chem.* 1984;259(23):14914–14921.
59. Cwikel B.J., Barouski-Miller P.A., Coleman P.L., Gelehrter T.D. Dexamethasone induction of an inhibitor of plasminogen activator in HTC hepatoma cells. *J Biol Chem.* 1984;259(11):6847–6851.
60. Robbie L.A., Bennett B., Croll A.M., Brown P.A., Booth N.A. Proteins of the fibrinolytic system in human thrombi. *Thromb Haemost.* 1996;75(1):127–133.
61. Dieval J., Nguyen G., Gross S., Delobel J., Kruihof E.K. A lifelong bleeding disorder associated with a deficiency of plasminogen activator inhibitor type 1. *Blood.* 1991;77(3):528–532.
62. Lee M.H., Vosburgh E., Anderson K., McDonagh J. Deficiency of plasma plasminogen activator inhibitor 1 results in hyperfibrinolytic bleeding. *Blood.* 1993;81(9):2357–2362.
63. Vaughan D.E. Plasminogen activator

- inhibitor-1: a common denominator in cardiovascular disease. *J Investig Med*. 1998;46(8):370–376.
64. Carroll V.A., Binder B.R. The role of the plasminogen activation system in cancer. *Semin Thromb Hemost*. 1999;25(2):183–197.
 65. Scarabin P.Y., Aillaud M.F., Amouyel P., Evans A., Luc G., Ferrieres J. et al. Associations of fibrinogen, factor VII and PAI-1 with baseline findings among 10,500 male participants in a prospective study of myocardial infarction—the PRIME Study. Prospective Epidemiological Study of Myocardial Infarction. *Thromb Haemost*. 1998;80(5):749–756.
 66. Kawano T., Morimoto K., Uemura Y. Partial purification and properties of urokinase inhibitor from human placenta. *J Biochem*. 1970;67(3):333–342.
 67. Risse B.C., Brown H., Lavker R.M., Pearson J.M., Baker M.S., Ginsburg D. et al. Differentiating cells of murine stratified squamous epithelia constitutively express plasminogen activator inhibitor type 2 (PAI-2). *Histochem Cell Biol*. 1998;110(6):559–569.
 68. Kruihof E.K., Tran-Thang C., Gudinchet A., Hauert J., Nicoloso G., Genton C. et al. Fibrinolysis in pregnancy: a study of plasminogen activator inhibitors. *Blood*. 1987;69(2):460–466.
 69. Scherrer A., Kruihof E.K., Grob J.P. Plasminogen activator inhibitor-2 in patients with monocytic leukemia. *Leukemia*. 1991;5(6):479–486.
 70. Robbie L.A., Dummer S., Booth N.A., Adey G.D., Bennett B. Plasminogen activator inhibitor 2 and urokinase-type plasminogen activator in plasma and leucocytes in patients with severe sepsis. *Br J Haematol*. 2000;109(2):342–348.
 71. Torr-Brown S.R., Sobel B.E. Attenuation of thrombolysis by release of plasminogen activator inhibitor type-1 from platelets. *Thromb Res*. 1993;72(5):413–421.
 72. Cushman M., Lemaitre R.N., Kuller L.H., Psaty B.M., Macy E.M., Sharrett A.R. et al. Fibrinolytic activation markers predict myocardial infarction in the elderly. The Cardiovascular Health Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19(3):493–498.
 73. Mast A.E., Enghild J.J., Pizzo S.V., Salvesen G. Analysis of the plasma elimination kinetics and conformational stabilities of native, proteinase-complexed, and reactive site cleaved serpins: comparison of alpha 1-proteinase inhibitor, alpha 1-antichymotrypsin, antithrombin III, alpha 2-antiplasmin, angiotensinogen, and ovalbumin. *Biochemistry*. 1991;30(6):1723–1730.
 74. Collen D. On the regulation and control of fibrinolysis. Edward Kowalski Memorial Lecture. *Thromb Haemost*. 1980;43(2):77–89.
 75. Ostrowski S.R., Sorensen A.M., Larsen C.F., Johansson P.I. Thrombelastography and biomarker profiles in acute coagulopathy of trauma: a prospective study. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med*. 2011;19:64.
 76. Favaloro E.J. Laboratory testing in disseminated intravascular coagulation. *Semin Thromb Hemost*. 2010;36(4):458–467.
 77. Breen K.A., Grimwade D., Hunt B.J. The pathogenesis and management of the coagulopathy of acute promyelocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2012;156(1):24–36.
 78. Sakurai Y., Takahashi T. Trypsin-like endopeptidase(s) naturally entrapped in human blood < 2-macroglobulin. *Biomed Res*. 1996;17:347–350.
 79. Nesheim M. Fibrinolysis and the plasma carboxypeptidase. *Curr Opin Hematol*. 1998;5(5):309–313.
 80. Stromqvist M., Schatteman K., Leurs J., Verkerk R., Andersson J.O., Johansson T. et al. Immunological assay for the determination of procarboxypeptidase U antigen levels in human plasma. *Thromb Haemost*. 2001;85(1):12–17.
 81. Bajzar L., Nesheim M., Morser J., Tracy P.B. Both cellular and soluble forms of thrombomodulin inhibit fibrinolysis by potentiating the activation of thrombin-activable fibrinolysis inhibitor. *J Biol Chem*. 1998;273(5):2792–2798.
 82. Silveira A., Schatteman K., Goossens F., Moor E., Scharpe S., Stromqvist M. et al. Plasma procarboxypeptidase U in men with symptomatic coronary artery disease. *Thromb Haemost*. 2000;84(3):364–368.
 83. van Tilburg N.H., Rosendaal F.R., Bertina R.M. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and the risk for deep vein thrombosis. *Blood*. 2000;95(9):2855–2859.
 84. Heylen E., Willemse J., Hendriks D. An update on the role of carboxypeptidase U (TAFIa) in fibrinolysis. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2011;16:2427–2450.
 85. Osterud B., Laake K., Prydz H. The activation of human factor IX. *Thromb Diath Haemorrh*. 1975;33(3):553–563.
 86. Lee C.D., Mann K.G. Activation/inactivation of human factor V by plasmin. *Blood*. 1989;73(1):185–190.
 87. Rick M.E., Krizek D.M. Platelets modulate the proteolysis of factor VIII:C protein by plasmin. *Blood*. 1986;67(6):1649–1654.
 88. Myles T., Nishimura T., Yun T.H., Nagashima M., Morser J., Patterson A.J. et al. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor, a potential regulator of vascular inflammation. *J Biol Chem*. 2003;278(51):51059–51067.
 89. Plow E.F., Ploplis V.A., Busuttill S., Carmeliet P., Collen D. A role of plasminogen in atherosclerosis and restenosis models in mice. *Thromb Haemost*. 1999;82 Suppl 1:4–7.
 90. Moons L., Shi C., Ploplis V., Plow E., Haber E., Collen D. et al. Reduced transplant arteriosclerosis in plasminogen-deficient mice. *J Clin Invest*. 1998;102(10):1788–1797.
 91. van Hinsbergh V.W., Kooistra T., Emeis J.J., Koolwijk P. Regulation of plasminogen activator production by endothelial cells: role in fibrinolysis and local proteolysis. *Int J Radiat Biol*. 1991;60(1-2):261–272.
 92. Kowalski E., Kopec M., Niewiarowski. An evaluation of the euglobulin method for the determination of fibrinolysis. *J Clin Pathol*. 1959;12(3):215–218.
 93. Mandle R.J. Jr, Kaplan A.P. Hageman-factor-dependent fibrinolysis: generation of fibrinolytic activity by the interaction of human activated factor XI and plasminogen. *Blood*. 1979;54(4):850–862.