



О.С. Напалкова

## Тромбин как ключевой фермент гемостаза и его роль в атеросклерозе и воспалении

**О.С. Напалкова**, аспирант кафедры КДЛ с курсом молекулярной медицины<sup>1</sup>, м.н.с. НИО кардиоангиологии<sup>2</sup>

**В.Л. Эмануэль**, д.м.н., проф., зав. кафедры КДЛ с курсом молекулярной медицины<sup>1</sup>

**С.В. Лапин**, к.м.н., зав. лабораторией диагностики аутоиммунных заболеваний<sup>1</sup>

**М.А. Карпенко**, д.м.н., проф., зам. директора по научно-лечебной работе<sup>2</sup>

**Т.В. Вавилова**, д.м.н., проф., зав. кафедры КДЛ<sup>2</sup>

**Г.А. Березовская**<sup>1</sup>, к.м.н., с.н.с. НИЛ острого коронарного синдрома<sup>2</sup>

**А.Н. Яковлев**, к.м.н., зав. НИЛ острого коронарного синдрома<sup>2</sup>

**В.А. Юдина**, ассистент кафедры КДЛ, зав. КДЛ<sup>2</sup>

**Е.Ю. Васильева**, зав. ЦКДЛ, ассистент кафедры КДЛ<sup>2</sup>



В.Л. Эмануэль



М.А. Карпенко



Т.В. Вавилова

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» (ПСПБГМУ) Минздрава России, г. Санкт-Петербург

<sup>2</sup>ФГБУ «Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» (СЗФМИЦ) Минздрава России, г. Санкт-Петербург

### **Thrombin as key enzyme of hemostasis and its role in atherosclerosis and inflammation**

O.S. Napalkova, V.L. Emanuel, M.A. Karpenko, T.V. Vavilova, G.A. Berезovskaya, A.N. Yakovlev, V.A. Yudina, E.U. Vasileva, S.V. Lapin

The First State Medical University of Saint-Petersburg n.a. I.P. Pavlov; the Federal North-West Medical Research Center n.a. V.A. Almazov, Saint-Petersburg, Russia

#### Резюме

**В обзоре литературы представлены данные о роли тромбина в воспалении, атеросклерозе, миграции и пролиферации клеток. Описано исследование генерации тромбина как нового диагностического маркера состояний гиперкоагуляции.**

**Ключевые слова:** тромбин, атеросклероз, воспаление, гиперкоагуляция.

#### Summary

**The review of literature provides data on the role of thrombin in inflammation, atherosclerosis, migration and proliferation. The thrombin generation is researched as a new diagnostic marker of hypercoagulable state.**

**Key words:** thrombin, atherosclerosis, inflammation, hypercoagulation.

### Введение

Все больше внимания в последние годы уделяется изучению функций тромбина, ключевого фермента гемостаза. Тромбин — это уникальная сериновая протеаза, которая играет главную роль в системе свертывания, регулирует тонус сосудов, участвует в клеточной пролиферации и воспалении, и других биологических процессах.

Кроме своей основной роли в каскаде коагуляции, тромбин обладает множеством дополнительных эффектов, в том числе за счет воздействия на эндотелий и сосу-

дистую стенку. Тромбин действует на эндотелий посредством ферментативного протеолиза рецепторов PAR (protease-activated receptors, англ., протеазо-активируемые рецепторы). Эти рецепторы образуются семью доменами и сопряжены с G-белком. Как было обнаружено, PAR могут регулировать NO-синтазу, фосфорилируя ее в нескольких сайтах, тем самым модулируя тонус сосудистой стенки [1]. Экспрессия этих рецепторов увеличивается под действием липополисахарида, а также провоспалительных медиаторов IL-1 $\alpha$ ,  $\beta$ , TNF- $\alpha$  [2, 3]. Длительная

инкубация с тромбином ингибирует NO-синтазу как при прямом воздействии, так и посредством увеличения активности аргиназы на эндотелиальных клетках, вызывая сосудосуживающий эффект [4–6]. Также тромбин способствует выработке простагландина (PGH<sub>2</sub>), тромбоксана A<sub>2</sub> и эндотелина-1, что приводит к вазоконстрикции [7]. Однако в здоровых артериях краткосрочное воздействие тромбином имеет обратное действие, поддерживая вазодилатацию посредством активации синтеза NO и простагландинов (PGI<sub>2</sub>).

Помимо действия на сосудистый тонус, тромбин также регулирует миграцию, пролиферацию и гипертрофию гладкомышечных клеток (ГМК). Эти клетки экспрессируют на своей поверхности PAR-1, -2 и -4, которые также являются мишенью для тромбина [8]. Повышение экспрессии PAR-1 на ГМК *in vivo* повышает выработку трансформирующего рогового фактора бета, фактора роста тромбоцитов, серотонина [9]. Таким образом, повышение экспрессии рецепторов семейства PAR в поврежденных сосудах усиливает проатерогенные свойства тромбина.

Тромбин повышает продукцию активных форм кислорода, способствуя перекисному окислению липидов и апоптозу. Он также увеличивает индукцию про-воспалительных интерлейкинов (IL-6, IL-8), хемоаттрактантов моноцитов (MCP-1, CCL2), молекул адгезии (VCAM-1, ICAM-1), тем самым облегчая миграцию моноцитов в очаг атеросклероза [10]. Тромбин увеличивает образование м-РНК, кодирующей MCP-1, CCL2, IL-1, TNF- $\alpha$  на ГМК. В опытах на мышах с экспериментальным перитонитом было показано, что у животных, которым вводился ингибитор тромбина гирудин, подавлялась адгезия макрофагов в ответ на введение липолисахарида. В этой же модели внутрибрюшинное введение очищенного тромбина вызывало повышение адгезии макрофагов и увеличение концентрации IL-6 и MCP-1 [11]. Посредством повышения экспрессии на эндотелии P-, L-, E-селектинов тромбин активирует миграцию моноцитов, нейтрофилов, T- и B-лимфоцитов [12]. Тромбин активирует факторы C3 и C5 системы комплемента, которые непосредственно принимают участие в хемотаксисе воспалительных клеток [13]. Так, у пациентов со стабильной ИБС и острым коронарным синдромом (ОКС) в очагах поражения тромбин обнаруживается в высокой концентрации и выступает как провоспалительный медиатор [14, 15].

Тромбин выполняет важнейшие функции как в сосудистом, так и в тромбоцитарном гемостазе. Под действием тромбина происходит ограниченный протеолиз фибрин-мо-

номеров. Этот фермент активирует факторы V, VIII, VII, XI, XIII свертывания крови, тромбоциты, в комплексе с тромбомодулином действует на протеин С. Состояние гиперкоагуляции является патогенетическим звеном внутрисосудистого тромбоза и атеросклероза. Тромбин является важнейшим прокоагулянтным белком, который находится в центре коагуляционного каскада и поддерживает состояние гиперкоагуляции. Морфологическое исследование материала атеросклеротических бляшек выявило, что активность протромбина, X и XII факторов выше на стадии образования липидных пятен и полосок по сравнению со стабильными бляшками покрытых фиброзной капсулой. Это исследование, как утверждают его авторы, позволяет рассмотреть по-новому роль коагуляционного гемостаза в атерогенезе и атеротромбозе [16]. Тканевой фактор, экспрессированный на клетках воспаления в атеросклеротической бляшке, способен активировать тромбин, вовлекая последний в атерогенез [17–18]. У ApoE-нокаутных мышей отмечается снижение активности атеросклеротического процесса в сонных артериях после введения им прямого ингибитора тромбина мелагатрана [19]. В недавно опубликованном исследовании было обнаружено, что повышение ультразвуковой плотности бляшки, по данным доплерографии, связано с повышением генерации тромбина и не зависит от липидной структуры бляшки [20].

Все изменения в каскаде плазменного гемостаза влияют на скорость генерации и количество активного тромбина. Поэтому метод определения генерации тромбина позволяет комплексно анализировать весь каскад образования фибринового сгустка, оценивая как прокоагулянтные, так и антикоагулянтные факторы. С точки зрения информативности, этот тест представляет практический интерес для выявления состояния гиперкоагуляции. Арсенал методов лабораторной оценки системы гемостаза велик, но, к сожалению, большинство из них нечувствительны к гиперкоагуляционным состояниям. Так, показатели рутинно использу-

ющихся клоттинговых тестов определения активированного частичного тромбопластинового, протромбинового и тромбинового времени чаще всего остаются неизменными даже при наступлении тромбоза [21]. Уровень фибриногена, активность фактора свертывания VIII и фактора Виллебранда ассоциированы с гиперкоагуляцией, но отражают лишь отдельные компоненты в ходе активации, а не процесс в целом [22]. В лабораторной практике для оценки гиперкоагуляции используются так называемые маркеры тромбинемии: уровень D-димера, тромбин-анти-тромбиновый комплекс, фрагменты протромбина F1+2. Повышение этих показателей свидетельствует об интенсивности образования ключевого энзима гемостаза тромбина, а повышение уровня D-димера — и об интенсивности расщепления фибрина плазмином. К сожалению, перечисленные выше показатели лишь косвенно оценивают тромбинемия [23].

Непосредственное измерение концентрации тромбина это исключительно трудная лабораторная задача из-за нестойкости и короткого времени жизни фермента. Однако еще в 1953 году R. Macfarlane и R. Biggs разработали комплексный тест оценки гемостаза посредством определения генерации тромбина (ГТ) [24]. В последующем группа исследователей под руководством H. Hemker видоизменила технологию и разработала автоматизированный метод определения ГТ одновременно в нескольких образцах плазмы крови, что стандартизовало и упростило оценку результатов [25]. В основе теста генерации тромбина лежит амидолитический принцип. Для детекции образования тромбина было предложено использовать специфичный, медленно реагирующий флюорогенный субстрат — пептид, меченный 7-амино-4-метилкумарином (ZGly-Gly-Arg-AMC) [26].

Модификация теста генерации тромбина (ГТТ) с тромбомодулином (ТМ) позволяет оценить работу системы протеина С. Эквивалентный (1 : 1) комплекс тромбин-тромбомодулин не вызывает превращения фибриногена в фибрин, увеличивает инактивацию тромбина антитром-

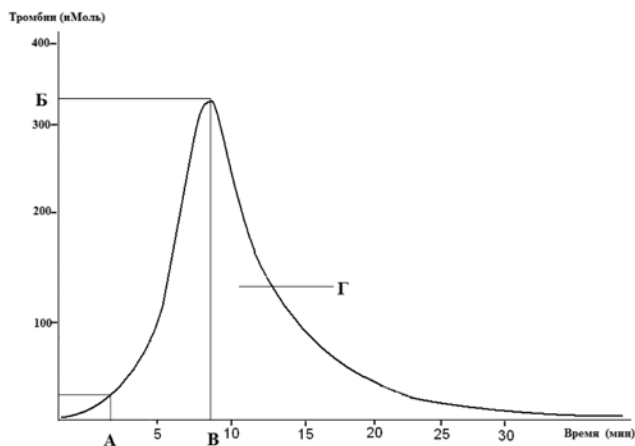


Рисунок 1. Кривая генерации тромбина и измеряемые параметры. Примечание: А — время инцициации свертывания, мин., (Lag time/LT); Б — пиковая концентрация тромбина, нМоль (Peak thrombin, Peakthr.); В — время достижения пиковой концентрации тромбина, мин., (Time to peak, †Peak); Г — эндогенный тромбиновый потенциал, нМоль/мин/, (ETP).

бином III и многократно ускоряет активацию протеина С. Таким образом, измерение ТГТ с ТМ позволяет оценить физиологическую работу антикоагулянтной системы протеина С.

Типичный вид кривой ГТ и измеряемые параметры ТГТ представлены на рис. 1.

На сегодняшний день существуют полностью автоматизированные анализаторы, использующие как флуориметрический, так и хромогенный методы измерения ГТ. Для определения эндогенного тромбинового потенциала в хромогенном методе используется кинетика конверсии медленно реагирующего синтетического тромбинового субстрата и определяется по высвобождению хромогена в образце обедненной тромбоцитами плазмы. Таким образом, современно развивающиеся технологии измерения генерации тромбина открывают возможность рутинно использовать этот тест в лабораториях [27].

Накоплен значительный опыт использования оценки генерации тромбина в клинической практике при разных состояниях. Увеличение генерации тромбина наблюдается при хронических заболеваниях легких [28], ожирении и диабете [29–31], ревматоидном артрите [32], курении, гипертензии [33]. Показано, что снижение веса приводит к снижению ГТ [34]. Также было установлено, что у пациентов с ОКС ГТ повышена в момент госпитализации и через шесть месяцев после выписки по сравнению

с группой контроля [35]. В другом исследовании было обнаружено, что концентрация аполипопротеина С-III, равная или более 10,5 мг, у пациентов с ИБС увеличивает риск смертности от сердечно-сосудистых событий в следующие пять лет после реваскуляризации миокарда. Такая концентрация положительно коррелирует с повышением ГТ [36].

В другом исследовании было показано, что у пациентов на фоне ОКС выявляется характерный протромботический профиль за счет повышения генерации тромбина, фактора VIII и снижения антиромбина III. Авторы считают, что изменения этих факторов определяют переход стабильной формы в нестабильную форму стенокардии [37]. Эти исследования подтверждают роль тромбинемии в развитии острых коронарных событий, а также неблагоприятных исходов реваскуляризации.

В результате проведенной ранее работы нами были обследованы в динамике 37 пациентов со стабильной ИБС, перенесших плановое чрескожное коронарное вмешательство (ЧКВ) в условиях кардиологического стационара СЗФМИЦ имени В. А. Алмазова [38].

В итоге наблюдения пациентов с ИБС после ЧКВ в динамике было выявлено достоверное повышение показателей ТГТ на 1–3 сутки реваскуляризации миокарда ( $p < 0,05$ ). Такое состояние гиперкоагуляции, наблюдаемое в ранние сроки после оперативного вмешательства, возникает в результате воспаления и повреждения эндотелия. Эти патофизиологические процессы играют ключевую роль в образовании тромба внутри стента после ЧКВ и могут быть причиной ранних осложнений интраваскулярного вмешательства [10, 39–42].

Активация коагуляционного гемостаза на 1–3 сутки после ЧКВ, выяв-

ленная с помощью ТГТ, при нормальных результатах других тестов, в том числе АЧТВ, протромбинового индекса, D-димера, антиромбина III, говорит о том, что метод исследования генерации тромбина высокочувствителен в диагностике гиперкоагуляции. Однако мы не обнаружили значимых различий по показателям ТГТ между пациентами со стабильной ИБС и группой здоровых доноров, это обуславливает необходимость дальнейшего поиска методов диагностики нарушения системы гемостаза при атеросклерозе.

#### Список литературы

1. Watts V. L. and Motley E. D. Role of protease-activated receptor-1 in endothelial nitric oxide synthase-Thr495 phosphorylation. *Exp. Biol. Med.* (Maywood), 2009. 234 (2): p. 132–9.
2. Nysted S., Ramakrishnan V. and Sundelin J. The proteinase-activated receptor 2 is induced by inflammatory mediators in human endothelial cells. Comparison with the thrombin receptor. *J. Biol. Chem.*, 1996. 271 (25): p. 14910–5.
3. Mactough S. C., et al. Diaryl ether inhibitors of farnesyl-protein transferase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2001. 11 (10): p. 1257–60.
4. Eto M., et al. Thrombin suppresses endothelial nitric oxide synthase and upregulates endothelin-converting enzyme-1 expression by distinct pathways: role of Rho/ROCK and mitogen-activated protein kinase. *Circ. Res.*, 2001. 89 (7): p. 583–90.
5. Ming X. F., et al. Rho GTPase/Rho kinase negatively regulates endothelial nitric oxide synthase phosphorylation through the inhibition of protein kinase B/Akt in human endothelial cells. *Mol. Cell Biol.*, 2002. 22 (24): p. 8467–77.
6. Ming X. F., et al. Thrombin stimulates human endothelial arginase enzymatic activity via RhoA/ROCK pathway: implications for atherosclerotic endothelial dysfunction. *Circulation*, 2004. 110 (24): p. 3708–14.
7. Delerive P., et al. Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit thrombin-induced endothelin-1 production in human vascular endothelial cells by inhibiting the activator protein-1 signaling pathway. *Circ. Res.*, 1999. 85 (5): p. 394–402.
8. McNamara C. A., et al. Thrombin stimulates proliferation of cultured rat aortic smooth muscle cells by a proteolytically activated receptor. *J. Clin. Invest.*, 1993. 91 (1): p. 94–8.
9. Schini-Kerth V. B., et al. Aggregating human platelets stimulate the expression of thrombin receptors in cultured vascular smooth muscle cells via the release of transforming growth factor-beta1 and platelet-derived growth factor AB. *Circulation*, 1997. 96 (11): p. 3888–96.
10. Borisoff J. I., et al. Is thrombin a key player in the 'coagulation-atherogenesis' maze? *Cardiovasc. Res.*, 2009. 82 (3): p. 392–403.
11. Szaba F. M. and Smiley S. T. Roles for thrombin and fibrin(ogen) in cytokine/chemokine production and macrophage adhesion in vivo. *Blood*, 2002. 99 (3): p. 1053–9.
12. Davies M. J., et al. The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis. *J. Pathol.*, 1993. 171 (3): p. 223–9.
13. Huber-Lang M., et al. Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway. *Nat. Med.*, 2006. 12 (6): p. 682–7.

14. Hatton M. W., Moar S. L. and Richardson M. Deendothelialization in vivo initiates a thrombogenic reaction at the rabbit aorta surface. Correlation of uptake of fibrinogen and antithrombin III with thrombin generation by the exposed subendothelium. *Am. J. Pathol.*, 1989. 135 (3): p. 499–508.
15. Merlini P. A., et al. Persistent activation of coagulation mechanism in unstable angina and myocardial infarction. *Circulation*, 1994. 90 (1): p. 61–8.
16. Borissoff J. I., et al. Early atherosclerosis exhibits an enhanced procoagulant state. *Circulation*, 2010. 122 (8): p. 821–30.
17. Smith E. B., Fibrin deposition and fibrin degradation products in atherosclerotic plaques. *Thromb. Res.*, 1994. 75 (3): p. 329–35.
18. Bini A., et al. Identification and distribution of fibrinogen, fibrin, and fibrin(ogen) degradation products in atherosclerosis. Use of monoclonal antibodies. *Arteriosclerosis*, 1989. 9 (1): p. 109–21.
19. Bea F., et al. Melagatran reduces advanced atherosclerotic lesion size and may promote plaque stability in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2006. 26 (12): p. 2787–92.
20. With Noto A. T., et al. Increased thrombin generation in persons with echogenic carotid plaques. *Thromb Haemost.*, 2008. 99 (3): p. 602–8.
21. Hemker H. C., Al Dieri R. and Beguin S. Thrombin generation assays: accruing clinical relevance. *Curr. Opin. Hematol.*, 2004. 11 (3): p. 170–5.
22. van Veen J. J., Gaff A. and Makris M., Thrombin generation testing in routine clinical practice: are we there yet? *Br. J. Haematol.*, 2008. 142 (6): p. 889–903.
23. Ю. А. Наместников, О. Г. Головина, О. Ю. Матвиенко, А. Е. Николаева, Е. А. Хаит, Л. П. Папаян, Условия постановки теста генерации тромбина для выявления состояний гиперкоагуляции. *Клиническая лабораторная диагностика*, 2011. 7.
24. Macfarlane R. G. and Biggs R. A thrombin generation test; the application in haemophilia and thrombocytopenia. *J. Clin. Pathol.*, 1953. 6 (1): p. 3–8.
25. Hemker H. C., et al. The thrombogram: monitoring thrombin generation in platelet-rich plasma. *Thromb. Haemost.*, 2000. 83 (4): p. 589–91.
26. Hemker H. C., et al. The calibrated automated thrombogram (CAT): a universal routine test for hyper- and hypocoagulability. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.*, 2002. 32 (5–6): p. 249–53.
27. О. Н. Соловьев, Т. И. Петренко, Глобальный тест оценки состояния системы гемостаза-эндогенный потенциал тромбина. *Медицинский алфавит. Современная лаборатория*, 2013. 4: p. 41–42.
28. Undas A., et al. Thrombin generation in chronic obstructive pulmonary disease: dependence on plasma factor composition. *Thromb. Res.*, 2011. 128 (4): p. e24–8.
29. Beijers H. J., et al. Body composition as determinant of thrombin generation in plasma: the Hoorn study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2010. 30 (12): p. 2639–47.
30. Tripodi A., et al. Hypercoagulability in patients with type 2 diabetes mellitus detected by a thrombin generation assay. *J. Thromb. Thrombolysis*, 2011. 31 (2): p. 165–72.
31. Fritsch P., et al. Haemostatic alterations in overweight children: associations between metabolic syndrome, thrombin generation, and fibrinogen levels. *Atherosclerosis*, 2010. 212 (2): p. 650–5.
32. Undas A., et al. Thrombin generation in rheumatoid arthritis: dependence on plasma factor composition. *Thromb Haemost.*, 2010. 104 (2): p. 224–30.
33. Rudez G., et al. Effects of ambient air pollution on hemostasis and inflammation. *Environ Health Perspect*, 2009. 117(6): p. 995–1001.
34. Ay L., et al. Thrombin generation in morbid obesity: significant reduction after weight loss. *J. Thromb Haemost.*, 2010. 8 (4): p. 759–65.
35. Skeppholm M., et al. Is fibrin formation and thrombin generation increased during and after an acute coronary syndrome? *Thromb Res.*, 2011. 128 (5): p. 483–9.
36. Olivieri O., et al. Apolipoprotein C-III predicts cardiovascular mortality in severe coronary artery disease and is associated with an enhanced plasma thrombin generation. *J. Thromb Haemost.*, 2010. 8 (3): p. 463–71.
37. Brummel-Ziedins K., et al. Thrombin generation in acute coronary syndrome and stable coronary artery disease: dependence on plasma factor composition. *J. Thromb Haemost.*, 2008. 6 (1): p. 104–10.
38. Напалкова О. С., Эмануэль В. Л., Карпенко М. А., Березовская Г. А. Тест генерации тромбина в динамике у пациентов, перенесших чрескожное коронарное вмешательство. *Клиническая лабораторная диагностика*, 2015. 4: p. 40–45.
39. Gomes W. J. and Buffolo E. Coronary stenting and inflammation: implications for further surgical and medical treatment. *Ann. Thorac. Surg.*, 2006. 81 (5): p. 1918–25.
40. Gaspardone A. and Versaci F. Coronary stenting and inflammation. *Am. J. Cardiol.*, 2005. 96 (12A): p. 65L–70L.
41. Borissoff J. I., Spronk H. M. and ten Cate H., The hemostatic system as a modulator of atherosclerosis. *N. Engl. J. Med.*, 2011. 364 (18): p. 1746–60.
42. Esmon C. T. The interactions between inflammation and coagulation. *Br. J. Haematol.*, 2005. 131 (4): p. 417–30.



## Парма Диагностика Россия

- Высокая скорость поставки в любую точку России
- Уверенность в качестве исследований благодаря многоступенчатой системе контроля
- Современный уровень обслуживания и поддержки, предоставляемый клиенту на каждом этапе работы



## РЕАКТИВЫ ДЛЯ БИОХИМИИ

ЭНЗИМЫ  
СУБСТРАТЫ  
ЭЛЕКТРОЛИТЫ  
ЛИПИДЫ

Санкт-Петербург, 194044  
Б. Сампсониевский пр., 32  
тел./факс: +7 (812) 324-27-78  
тел./факс: +7 (812) 324-59-60  
info@parma-d.ru

Москва, 129075  
ул. Шереметьевская, 85, стр. 2  
тел./факс: +7 (495) 787-44-01  
moscow@westmedica.com

www.parma-d.ru  
www.westmedica.com