

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки центр теоретических проблем
физико-химической фармакологии Российской академии наук

На правах рукописи

Жалялов
Ансар Сайярович

**Исследование пространственной динамики роста и лизиса
фибринового сгустка в условиях тромболитической
терапии**

Специальность 03.01.02 - биофизика

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук,
Алексей Михайлович Шибeko

Москва 2019

Содержание

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ	5
1. Обзор литературы.....	10
1.1. ГЕМОСТАЗ. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ	10
1.2. СИСТЕМА ФИБРИНОЛИЗА	13
1.2.1. ФИБРИНОГЕН И ФИБРИН	15
1.2.2. ПЛАЗМИНОГЕН И ПЛАЗМИН.....	17
1.2.3. АКТИВАТОРЫ ПЛАЗМИНОГЕНА	20
1.2.3.1. ТКАНЕВЫЙ АКТИВАТОР ПЛАЗМИНОГЕНА.....	20
1.2.3.2. УРОКИНАЗНЫЙ АКТИВАТОР ПЛАЗМИНОГЕНА	25
1.2.4. ИНГИБИТОРЫ ФИБРИНОЛИЗА (ИНГИБИТОРЫ ПЛАЗМИНА, PAI, TAFI).....	27
1.2.4.1. ИНГИБИТОРЫ АКТИВАТОРОВ ПЛАЗМИНОГЕНА (PAI)	27
1.2.4.2. А2-АНТИПЛАЗМИН	30
1.2.4.3. А2-МАКРОГЛОБУЛИН	30
1.2.4.4. ТРОМБИН-АКТИВИРУЕМЫЙ ИНГИБИТОР ФИБРИНОЛИЗА	31
1.2.5. РЕГУЛЯЦИЯ РАБОТЫ СИСТЕМЫ ФИБРИНОЛИЗА	32
1.3. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СИСТЕМЫ ФИБРИНОЛИЗА	33
1.3.1. ИЗМЕРЕНИЕ ФИБРИНОЛИТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ.....	34
1.3.1.1. ПЛАЗМИН И АНТИПЛАЗМИН	34
1.3.1.2. ТРА И PAI-1.....	35
1.3.1.3. TAFI.....	37
1.3.1.4. D-ДИМЕР.....	38
1.3.2. ГЛОБАЛЬНЫЕ ФИБРИНОЛИТИЧЕСКИЕ ТЕСТЫ	38
1.3.2.1. ЭУГЛОБУЛИНОВОЕ ВРЕМЯ ЛИЗИСА СГУСТКА, ФАКТОР XIII ЗАВИСИМЫЙ ФИБРИНОЛИЗ	38
1.3.2.2. ТРОМБОЭЛАСТОГРАФИЯ.....	40
1.3.2.3. ВРЕМЯ ЛИЗИСА СГУСТКА.....	41
1.3.2.4. ОБЩИЙ ГЕМОСТАТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ.....	42
1.4. ПРИМЕНЕНИЕ ТЛТ, ОСЛОЖНЕНИЯ.....	43
1.5. ПОСТАНОВКА ЗАДАЧИ.....	45
2. Материалы и методы.....	47
2.1. МАТЕРИАЛЫ.....	47
2.2. ПАЦИЕНТ (ДАННЫЕ М.ГРАЧЕВОЙ)	49
2.3. МЕТОДЫ	49

3. Результаты.....	56
3.1. ПРОСТРАНСТВЕННЫЙ ЛИЗИС ФИБРИНОВОГО СГУСТКА В ПРИСУТСТВИИ АКТИВАТОРА ПЛАЗМИНОГЕНА НАЧИНАЕТСЯ С ОБЛАСТИ АКТИВАЦИИ СВЕРТЫВАНИЯ	56
3.2. ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОСТРАНСТВЕННОГО РОСТА И ЛИЗИСА СГУСТКА	57
3.3. ТРИ ТИПА ВОЛНЫ ЛИЗИСА СГУСТКА	58
3.4. ПРОСТРАНСТВЕННЫЙ ЛИЗИС СГУСТКА В ПРИСУТСТВИИ РАЗЛИЧНЫХ ТРОМБОЛИТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ.....	59
3.5. КОНЦЕНТРАЦИЯ ТРА ОПРЕДЕЛЯЕТ НАЧАЛО ЛИЗИСА И ЕГО СКОРОСТЬ	62
3.6. КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ РОСТА И ЛИЗИСА СГУСТКА В ПРОСТРАНСТВЕ	62
3.7. СКОРОСТИ ФИБРИНОЛИТИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ ОКАЗЫВАЮТ НЕЗНАЧИТЕЛЬНОЕ ВЛИЯНИЕ НА СКОРОСТЬ ПРОСТРАНСТВЕННОГО ЛИЗИСА	65
3.8. СКОРОСТЬ ПРОСТРАНСТВЕННОГО ЛИЗИСА СГУСТКА ЗАВИСИТ ОТ СКОРОСТИ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ВОЛНЫ СВЕРТЫВАНИЯ	66
3.9. АКТИВАЦИЯ ФАКТОРА IX ПЛАЗМИНОМ.....	68
4. Обсуждение результатов	73
5. Заключение	78
6. Выводы.....	79
7. Благодарности.....	80
8. Приложения	81
Приложение 1. ПАЦИЕНТ.....	81
Приложение 2. ПРОСТРАНСТВЕННЫЙ ЛИЗИС СГУСТКА IN VITRO	82
Приложение 3. МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ	84
ОПИСАНИЕ МАТЕМАТИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ	88
УРАВНЕНИЯ.....	89
Таблица А. ПАРАМЕТРЫ МОДЕЛИ: КИНЕТИЧЕСКИЕ КОНСТАНТЫ	95
Таблица Б. ПАРАМЕТРЫ МОДЕЛИ: КОЭФФИЦИЕНТЫ ДИФфуЗИИ.....	96
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	97

Список сокращений

АДФ	– аденозиндифосфат
ДВС	– диссеминированное внутрисосудистое свертывание
ТЛТ	– тромболитическая терапия
ТЭЛА	– тромбоэмболия легочной артерии
АР	– антиплазмин
FDP	– продукты деградации фибрина;
Fn	– фибрин;
MG	– макроглобулин
РАІ	– ингибитор активаторов плазминогена;
Pg	– плазминоген;
Pn	– плазмин;
sc-ТРА	– одноцепочечный тканевый активатор плазминогена;
sc-УРА	– одноцепочечный урокиназный активатор плазминогена;
СК	– стрептокиназа;
ТАFI	– тромбин-активируемый ингибитор фибринолиза;
tc-ТРА	– двухцепочечный тканевый активатор плазминогена;
tc-УРА	– двухцепочечный урокиназный активатор плазминогена;

Введение

Свертывание крови и фибринолиз являются взаимосвязанными системами, регулирующими образование и разрушение фибриновых сгустков в организме человека. Обе системы представлены каскадами реакций, с положительными и отрицательными петлями обратной связи. Система свертывания запускается контактом крови с тканевым фактором (ТФ), трансмембранным гликопротеином, присутствующим в области повреждения сосуда. Связывание тканевого фактора с циркулирующим в плазме фактором VIIa приводит к образованию комплекса, активирующего фактор X, что в конечном итоге приводит к образованию тромбина. Тромбин в свою очередь превращает белок фибриноген в фибрин, который полимеризуется и образует фибриновый сгусток, препятствующий кровопотере.

После того, как потребность в сгустке исчезает, в работу включается другая ферментативная система, отвечающая за разрушение сгустка – система фибринолиза. Каскад реакций фибринолиза может быть инициирован либо тканевым активатором пламиногена (ТРА), секретлируемым сосудистой стенкой, либо урокиназным активатором пламиногена (УРА) [1]. Важнейшим триггером и кофактором для работы системы фибринолиза является сам фибрин, который не только защищает плазмин от инактивации [2], но и на порядки ускоряет действие ТРА [3].

Тромболитическая терапия (ТЛТ) является медикаментозным способом устранения окклюзии кровеносных сосудов, заключающаяся в введении в кровоток препаратов, активирующих систему фибринолиза. В общем случае, причина образования тромбов может не исчезнуть, и тогда, в период ТЛТ, могут образовываться новые тромбы, поэтому исследование процессов свертывания и лизиса в плазме в период ТЛТ является важной практической задачей.

Следует учитывать, что функционирование систем коагуляции и фибринолиза, происходит в пространственно неоднородной среде: ферменты, образованные в одном месте, транспортируются диффузией и течением крови в

другое [4]. Более того, сами процессы свертывания и лизиса пространственно неоднородны: сгустки должны формироваться и растворяться строго в месте повреждения [5–7]. И это, вероятно, является решающим фактором в их регуляции: известно множество примеров того, что роли отдельных реакций изменяются в пространстве и времени [8, 9] или в присутствии потока [10, 11]. Исследования, проводившиеся на протяжении последних десятилетий, привели к значительному прогрессу представлений о роли пространственной компоненты в процессе свертывания крови [12–14], в то время как для фибринолиза данный вопрос остается открытым.

Целью настоящей работы являлось изучение процессов свертывания и лизиса в системе, моделирующей образование сгустка в период тромболитической терапии, учитывая пространственный аспект фибринолиза.

Была разработана пространственно-диффузионная экспериментальная модель, в которой свертывание запускалось иммобилизованным на поверхности тканевым фактором, а лизис запускался с помощью добавления в плазму активаторов плазминогена. С помощью системы видеомикроскопии проводилось наблюдение за ростом и лизисом сгустка *in vitro*.

Цель работы: Изучить пространственную динамику роста и лизиса фибринового сгустка в условиях, моделирующих тромболитическую терапию.

Задачи исследования:

1. Разработать экспериментальную методику исследования пространственной динамики роста и лизиса фибринового сгустка в условиях, моделирующих рост сгустка в период ТЛТ, на базе системы для исследования пространственного роста сгустка “Тромбодинамика” (ООО Гемакор).
2. Установить зависимость типов и параметров пространственного лизиса сгустка от концентрации тканевого активатора плазминогена.
3. Определить влияние скорости распространения волны свертывания на скорость распространения волны лизиса.
4. Исследовать влияние высоких концентраций тромболитических препаратов на пространственную динамику свертывания и лизиса.

Научная новизна:

В рамках данной работы была построена экспериментальная реакционно-диффузионная система для оценки параметров роста и лизиса фибринового сгустка, моделирующая процессы в период ТЛТ, позволяющая наблюдать рост и лизис сгустка в реальном времени. Было обнаружено три основных типа волны лизиса – фронт лизиса, распространяющийся изнутри сгустка, фронт лизиса, распространяющийся от активирующей свертывание поверхности и, его частный случай, лизис, останавливающийся через некоторое время. Тип волны лизиса сгустка зависит от концентрации фибринолитического агента в плазме и не зависит от типа активатора плазминогена (ТРА, УРА, СК). При терапевтических концентрациях ТРА волна лизиса начинается от поверхности на которой растет сгусток. При высоких концентрациях активаторов плазминогена экспериментально наблюдается явление замедления лизиса, вплоть до его остановки. С помощью компьютерного моделирования показано, что данное явление вызвано истощением свободного плазминогена. Скорость распространения фронта волны лизиса линейно зависит от скорости распространения фронта свертывания ($r^2 = 0,91$). Экспериментально установлено, что при высоких концентрациях тромболитических препаратов в плазме происходит активация свертывания в результате реакции активации фактора IX плазмином.

Научно-практическое значение:

Разработанная *in vitro* методика оценки показателей пространственной динамики фибринолиза может быть использована в клинической практике для корректировки ТЛТ. Обнаруженное явление распространения волны лизиса, отделяющей образующийся сгусток от области крепления, может послужить базой для разработки новых методов устранения сгустков. Полученные результаты, свидетельствующие о снижении фибринолитической активности при высоких концентрациях ТРА, могут быть использованы при подборе дозировок препаратов. Открытый эффект активации фактора IX плазмином важно учитывать

при разработке новых протоколов ТЛТ, лекарственных средств и стратегий их использования.

Положения, выносимые на защиту:

1. Разработана *in vitro* методика исследования пространственной динамики роста и лизиса фибринового сгустка в условиях, моделирующих рост сгустка в период ТЛТ. При терапевтических концентрациях ТРА, волна лизиса появляется на поверхности, активирующей свертывание, отделяя образующийся сгусток от поверхности, создавая риск отрыва сгустка.

2. Обнаружено три типа волны лизиса в зависимости от концентрации ТРА. При увеличении концентрации ТРА до сотен нМ, время задержки лизиса уменьшается, скорость лизиса увеличивается, выходя на плато. При дальнейшем увеличении концентрации ТРА фибринолитическая активность снижается.

3. Определено, что скорость волны лизиса в диапазоне терапевтических концентраций ТРА линейно зависит от скорости распространения волны свертывания.

4. Установлено, что при высоких концентрациях тромболитических препаратов в плазме происходит активация свертывания в результате активации фактора IX плазмином. С помощью компьютерного моделирования показано, что снижение фибринолитической активности при высоких концентрациях ТРА связано со снижением концентрации плазминогена.

Апробация работы: Материалы диссертации докладывались на международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых по фундаментальным наукам "Ломоносов-2012" (Москва, апрель 2012), на IV съезде биофизиков России (Нижний Новгород, август 2012), на XXIV International Society on Thrombosis and Haemostasis Congress, (Amsterdam, Голландия, июль 2013), на 38th Federation of the European Biochemical Societies Congress (Санкт-Петербург, август 2013).

Публикации: По материалам диссертации опубликовано 3 статьи в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК РФ и тезисы 5 докладов в сборниках трудов международных и российских конференций.

1. Обзор литературы

1.1. Гемостаз. Общие сведения

Гемостаз – биологическая система, обеспечивающая остановку кровотечения при повреждении кровеносных сосудов и сохранение крови в жидком состоянии вне места повреждения.

Система гемостаза состоит из следующих элементов – сосудистый, тромбоцитарный и плазменный гемостаз.

При повреждении эндотелия кровеносных сосудов происходит высвобождение в кровь специальных веществ, вызывающих активацию тромбоцитов и вазоконстрикцию [15]. Тромбоциты, безъядерные клетки крови размером 2-4 мкм, имеют свойство активироваться при взаимодействии с широким спектром веществ, таких как АДФ, тромбин, коллаген, адреналин, тромбоксан А₂, вазопрессин и другими [16]. В результате активации тромбоциты начинают секретировать про- и антикоагулянтные вещества, а также меняют свою форму, становясь шарообразными либо выпуская псевдоподии. Активированные тромбоциты приобретают способность к адгезии (прилипание к месту повреждения) и агрегации, закрывая собой место повреждения сосуда. Тромбоцитарный сгусток задерживает крупные частицы (клетки крови), хотя продолжает пропускать плазму крови с растворенными в ней белками.

В результате выброса серотонина и тромбоксана А₂ активированными тромбоцитами происходит сокращение мышц оболочки сосуда. Запускается так называемый сосудистый гемостаз (уменьшение просвета сосудов). Вазоконстрикция обеспечивает уменьшение потока крови через сосуд, что также способствует предотвращению кровопотери. Характерные времена сосудисто-тромбоцитарного гемостаза – 1-3 мин [17].

Под влиянием активных факторов свертывания, выбрасываемых тромбоцитами, а также при контакте с поврежденными эндотелиальными клетками, способными экспрессировать тканевой фактор и субэндотелиальными

внеклеточными структурами, запускается следующее звено гемостаза – плазменное свертывание.

На рисунке 1 представлены основные реакции данной системы.

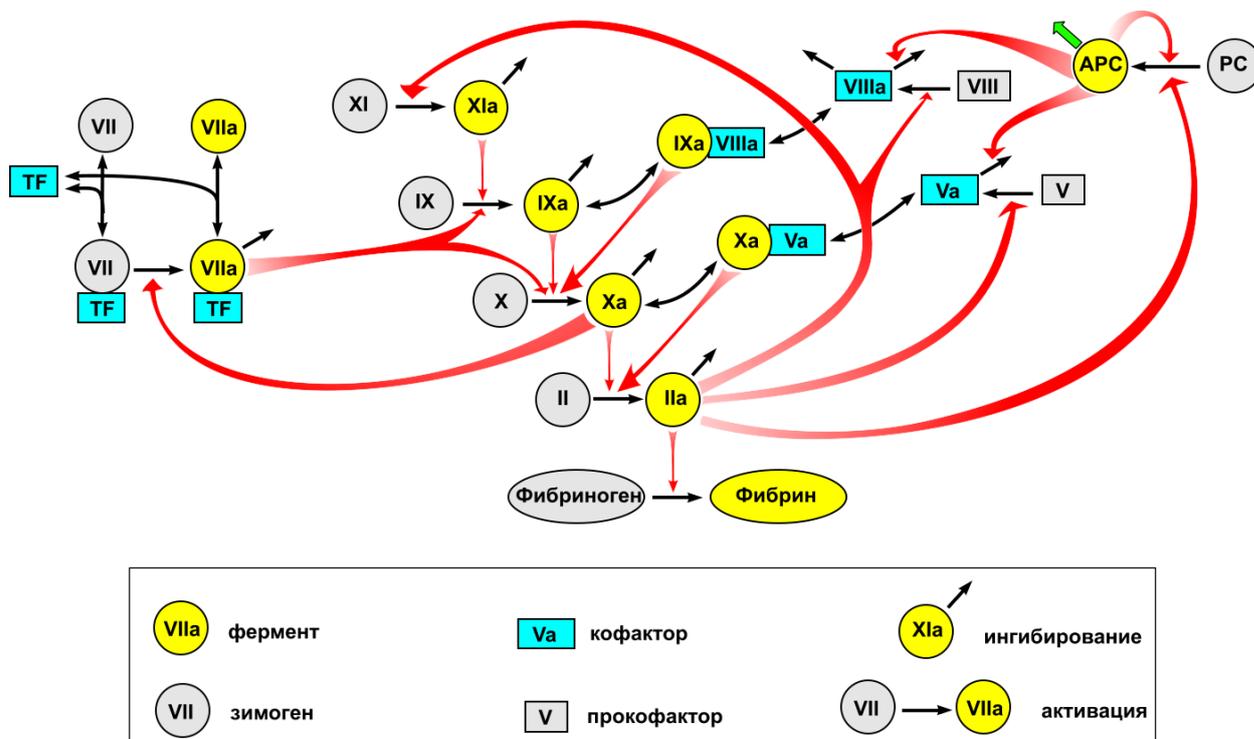


Рисунок 1. Основные реакции системы свертывания крови, воспроизведено из [18]. Реакции ферментативного катализа показаны красными стрелками. Превращения под действием катализа - черными стрелками. Ингибирование показано короткими стрелками. Условные обозначения: римскими цифрами обозначены факторы свертывания, TF – тканевой фактор, PC – протеин С, APC – активированный протеин С. Два находящихся рядом фактора свертывания – комплекс, образованный этими факторами (например, VIIIa IXa).

Принято различать два основных пути свертывания – внешний (при контакте с тканевым фактором) и внутренний (при контакте с отрицательно заряженными поверхностями).

В процессе формирования фибринового сгустка различают несколько этапов. Работа плазменного звена свертывания начинается с фазы инициации (TF совместно с фактором VII образуют теназу, активирующую фактор X, который в свою очередь активирует незначительное количество тромбина). Затем наступает фаза амплификации – в который участвуют факторы VIII, IX, X, XI, V и фактор фон Виллебранда. Основной регуляторной ролью данной фазы является усиление генерации тромбина на поверхностях активированных тромбоцитов. Далее

выделяют фазу распространения, в которой задействованы петли положительной обратной связи между тромбином и каскадом факторов XI, IX и X. Регуляторная роль данной фазы также сводится к усилению генерации тромбина. Финальной, четвертой фазой формирования сгустка является непосредственно наработка фибрина, а также стабилизация сгустка под действием фактора XIII, который образует связи между соседними альфа- и гамма-цепями фибрина, защищая сгусток от деградации [19]. В фазу стабилизации также относится процесс контракции – уплотнение сгустка под действием контракtilного белка тромбоцитов и ионов кальция. В результате данного процесса из сгустка выдавливается жидкость, происходит уплотнение фибриновой сети, стягиваются края раны и увеличивается резистентность сгустка к лизису. Чем выше уровень тромбоцитов, тем больше связей образуется между фибриновыми волокнами, и тем хуже он лизируется. Так, к примеру, у пациентов имеющих повышенный уровень контракции сгустка, скорость лизиса снижена [20].

Основной реакцией свертывания крови (и единственной физиологически значимой) является превращение фибриногена в фибрин под действием тромбина. Остальные реакции в данной системе имеют регуляторное значение. В результате работы плазменного звена свертывания образуется трехмерная сеть из полимеризованных молекул фибрина, способных удерживать в своих ячейках жидкость, многократно превышающую фибрин по массе. Таким образом, плазма в области повреждения сосуда переходит из жидкого состояния в гелеобразное, образуя собой фибриновый сгусток, который не пропускает жидкость, что препятствует потере крови, а также проникновению микроорганизмов из вне. Характерное время образования фибринового сгустка - около 10 минут [21], поэтому плазменное звено гемостаза часто называют вторичным (сосудисто-тромбоцитарное – первичное).

Система свертывания также включает в себя набор ингибиторов. В отсутствии ингибиторов, одна молекула тканевого фактора могла бы привести к наработке неограниченного количества тромбина, вследствие чего каскад свертывания запустился бы во всем объеме крови. Но этого не происходит

благодаря присутствию в крови ингибиторов сериновых протеиназ свертывания. В плазме присутствуют как неспециализированные ингибиторы сериновых протеиназ (такие как α_2 -макроглобулин) выполняющие роль универсальных “мусорщиков”, подавляя активность любых сериновых протеиназ (в том числе фибринолитических), так и более специализированные, основные из которых – антитромбин III и ингибитор пути тканевого фактора свертывания (TFPI). Анти тромбин III, связываясь с активными сайтами факторов IIa, Xa, IXa, XIa, ингибирует их. Единственный фактор, на который он не оказывает почти никакого воздействия – фактор VIIa. Для его ингибирования в плазме присутствует TFPI, причем связываться с фактором VIIa он может лишь в связанном состоянии с фактором Xa (то есть необходимо присутствие в плазме активированного фактора X). К тому же, TFPI действует только на фактор VIIa связанный с тканевым фактором (образуя четверичный белковый комплекс).

Другой важной реакцией ингибирования свертывания является путь протеина C [22]. Активация протеина C происходит под действием тромбина. После активации, протеин C приобретает возможность ингибировать ряд белков, таких как Va и VIIIa (при участии кофактора протеина S), заставляя их терять свою активность. Также, важным кофактором протеина C является тромбомодулин – мембранный белок, экспрессируемый клетками эндотелия в большом количестве. Тромбомодулин связывает тромбин с протеином C, тем самым ускоряя активацию последнего на клетках эндотелия, что играет важную регуляторную роль, ограничивая рост сгустка вдоль сосуда.

1.2. Система фибринолиза

После восстановления целостности сосуда, необходимость в сгустке исчезает и перед организмом встает задача его растворить, чтобы восстановить кровоток. Решением данной задачи занимается система фибринолиза.

Запуск системы фибринолиза начинается в момент образования фибрина [23]. Наличие фибрина увеличивает скорость активации плазминогена с помощью ТРА до 1000 раз (образуя тройные белковые комплексы – фибрин-плазминоген-ТРА). К тому же, плазмин, связанный с фибрином гораздо слабее (в 430 раз) подвержен инактивации своим основным ингибитором – антиплазмином. С другой стороны, в процессе образования сгустка, тромбоциты выделяют большое количество PAI [24] (ингибитор активаторов плазминогена), что предотвращает преждевременный фибринолиз. Во время активации плазменного звена свертывания происходит активация TAFI комплексом тромбин-тромбомодулин. TAFI удаляет C-концевые лизиновые аминокислотные остатки на фибрине, что ухудшает связывание плазмينا с фибрином, а, следовательно, и лизис сгустка.

Плазмин, являясь сериновой протеиназой, начинает разрезать пептидные связи своих активаторов – ТРА и UРА, превращая их из одноцепочечной формы в двухцепочечные, увеличивая тем самым их каталитическую активность по отношению к плазминогену (активность двухцепочечной урокиназы по отношению к плазминогену в 250-1000 раз выше, чем одноцепочечной). Активаторы плазминогена, в свою очередь, продолжают нарабатывать плазмин. Положительная петля обратной связи замыкается.

Как мы видим, все три компонента гемостаза тесно связаны: тромбоциты выбрасывают активные факторы свертывания и ингибиторы фибринолиза, предоставляют мембраны для реакций свертывания [25], Ключевой фермент реакции свертывания, тромбин, в свою очередь, активирует тромбоциты [26] и TAFI, подавляя фибринолиз [27]. Общая схема реакций системы фибринолиза представлена на рисунке 2.

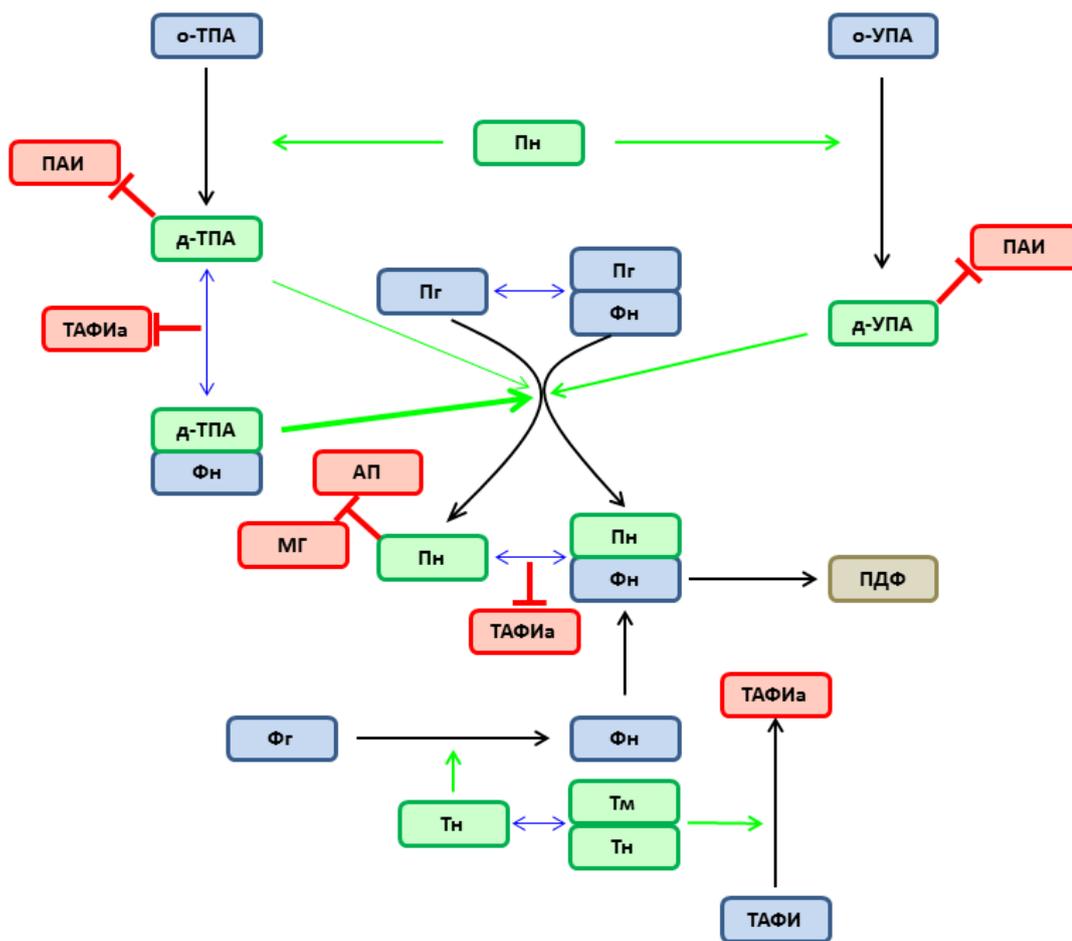


Рисунок 2. Схема реакций системы фибринолиза [28]. Синим цветом показаны неактивные предшественники-зимогены, зеленым – активированные ферменты. Красным – ингибиторы. Черные стрелки показывают переход из неактивной формы в активную, синие стрелки показывают обратимое образование комплексов, зеленые стрелки показывают, какая реакция происходит под действием данного фермента. Сокращения: Фг – фибриноген; Фн – фибрин; Пг – пламиноген; Пн – пламин; о/д-УПА – одно-/двухцепочечная форма урокиназного активатора пламиногена; о/д-ТПА – одно-/двухцепочечная форма тканевого активатора пламиногена; ПАИ – ингибитор активатора пламиногена; ТАФИа – тромбин активируемый ингибитор фибринолиза (активный); Тн – тромбин; Тм – тромбомодулин; АП – антипламин; МГ – макроглобулин; ПДФ – продукты деградации фибрина.

1.2.1. Фибриноген и фибрин

Появление фибрина в плазме инициирует запуск фибринолиза. Он защищает пламин от ингибирования, который, в свою очередь, запускает несколько петель положительной обратной связи, в частности переход

активаторов плазминогена в двухцепочечные формы, а также превращение плазминогена и пламина в Лиз-форму. Фибриноген, являющийся предшественником фибрина, циркулирует в крови в концентрации 8.8 мкМ и имеет молекулярную массу 340 кДа. На рисунке 3 показан схематичный вид молекулы фибриногена. Фибриноген является димером, каждая из его половинок состоит из трех полипептидных цепей ($A\alpha$ -66,5 кДа, $B\beta$ -52 кДа и γ -46,5 кДа), связанных дисульфидными мостиками. В структурном плане, молекула фибриногена представлена в виде пяти доменов - два D-домена, центральный E-домен и два αC домена. Половинки фибринового димера связаны между собой на N-концах всех трех пар полипептидных цепей (E-домен). В той же части находятся активные сайты молекулы. Активация фибриногена происходит вследствие отделения тромбином фибринопептидов А и В. Сперва происходит отрезание фибринопептида А, что является достаточным для начала полимеризации, молекулы фибрина начинают образовывать полимерную цепочку. После отделения фибринопептидов В фибриновые нити получают возможность к латеральной агрегации, образуя трехмерную сеть фибрина. Дополнительное укрепление нитей фибрина производится поперечными сшивками благодаря фактору XIIIa (в добавок к этому, фактор XIIIa присоединяет молекулы $\alpha 2$ -антипламина к нитям фибрина, что ухудшает процесс лизиса [19]). Олигомеры молекул фибрина в виде нитей называют протофибриллами. Сцепленные между собой протофибриллы образуют ветвящиеся комплексы, называемые фибриллами – структурными единицами фибриновой сети. Известно, что фибриноген также способен образовывать комплексы с фибрином [29].

Параметры сети фибрина, такие как средняя длина между ветвлениями и толщина фибрилл влияют на восприимчивость фибрина к лизису и зависят от условий полимеризации – концентрации солей, рН среды, ионной силы, концентрации фибриногена и тромбина [30]. Фибриновое волокно с более плотной структурой имеет более высокую резистентность к лизису [31]. Наличие эритроцитов в сгустке также увеличивает лизисную резистентность [32]. Эксперименты с использованием сканирующей электронной микроскопии

показали, что посредством взаимодействия через эптифибатид-чувствительные рецепторы с фибриногеном, эритроциты влияют на структуру фибринового волокна (нити становятся более тонкими и ветвящимися), что снижает скорость лизиса сгустка [33].

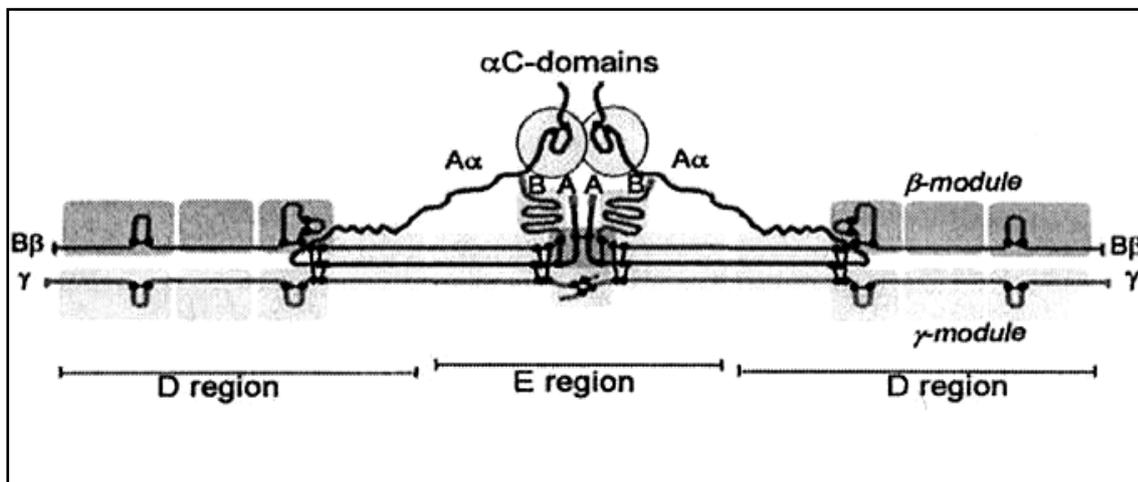


Рисунок 3 Схема молекулы фибрина [34].

1.2.2. Плазминоген и плазмин

Несомненно, основным белком системы фибринолиза является плазмин. Именно на нем замыкается большинство петель обратной связи, и именно он проводит единственно физиологически значимую реакцию всего процесса фибринолиза – расщепление фибриновых нитей. Плазмин, как и большая часть белков лизиса и свертывания, относится к классу сериновых протеиназ. Предшественником плазмينا является плазминоген, циркулирующий в крови в концентрации 2 мкМ.

Плазминоген является одноцепочечным гликопротеином с молекулярной массой 92кДа, содержащим 791 аминокислотный остаток. Время жизни ($t_{1/2}$) свободного плазминогена составляет порядка 2.2 дня (для Глу- формы) и 0.8 дней (для Лиз- формы) [35].

Основным органом, синтезирующим плазмин, является печень. Также данный белок представлен в экстраваскулярном пространстве многих других тканей. Кроме печени, он может синтезироваться почками и роговицей.

Структурно, в молекуле плазминогена выделяют 7 доменов – протеазный домен, пять крингл доменов (K1-K5) и преактивационный домен. Каждый из 5 крингл доменов состоит из 78-80 аминокислотных остатков. Они отвечают за связывание плазминогена с лизиновыми участками на фибрине, антиплазмине, коллагене, кининогене и клеточных рецепторах [36]. Аффинность крингл-доменов к лизиновым аминокислотным остаткам используется в аффинной хроматографии при выделении плазминогена из человеческой плазмы [37].

Плазминоген синтезируется в виде глу- формы (Glu-Pg) – имея на N-конце глутамин. Под действием плазмина Glu-Pg переходит в Lys-Pg, имеющую более открытую конформацию, лучшее связывание с фибрином и с активаторами плазминогена [38]. У Glu-Pg аминокислотный остаток Лиз50 связывается с центрами связывания лизина на крингл доменах, вследствие чего эти центры становятся занятыми и не могут связываться с С-концевым лизином на фибрине. Поэтому Glu-Pg имеет более низкую аффинность к фибрину, нежели Lys-Pg. Более открытая форма Lys-Pg обеспечивает лучшую активацию плазминогена с помощью ТРА и UРА (K_m для Lys-Pg в 10 раз меньше).

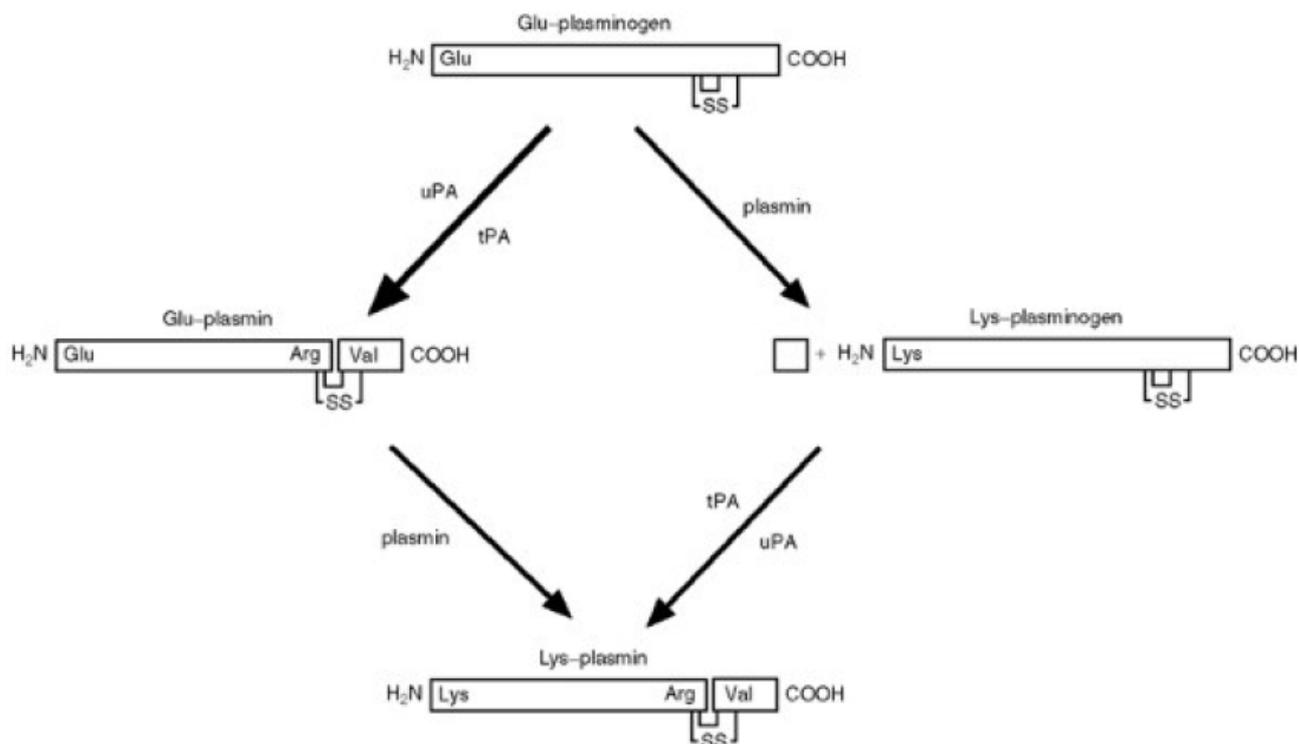


Рисунок 4. Схема активации плазминогена [39]. Основными белками, влияющими на плазминоген и плазмин, являются активаторы плазминогена, ингибиторы плазмина и фибрин.

Протеазный домен плазминогена состоит из 230 аминокислотных остатков и является гомологичным семейству трипсиноподобных сериновых протеиназ. Его активный сайт содержит 3 аминокислоты – Гис603, Асп646 и Сер741.

Переход плазминогена в плазмин происходит под действием белков активаторов плазминогена, разрезающих пептидную связь Арг561–Вал562, из-за чего молекула переходит в двуцепочечную форму (цепи соединены двумя дисульфидными мостиками). Помимо этого, плазмин начинает отрезать у молекул плазминогена и плазмينا преактивационный домен, превращая их в Lys- форму (рисунок 4). Конечным продуктом реакции активации плазминогена является Lys-Pn. При нормальных физиологических условиях превращение Glu-Pg и Lys-Pg в кровеносном русле не происходит. Вероятно, это связано с тем, что свободный (не связанный с фибрином) плазмин быстро инактивируется антиплазмином. Частичная деградация фибринового волокна плазмином создает петлю положительной обратной связи, в которой Glu-Pg начинает связываться с открывающимися С-концевыми лизинами фибрина. Плазминоген соединяется с данными лизинами с помощью кринглов 1 и 5. Константа диссоциации между Glu-Pg и фибрином составляет приблизительно 5мкМ, для Lys-Pg этот показатель на порядок ниже. Для частично разрушенного фибрина константа диссоциации для Glu-Pg выравнивается с показателем Lys-Pg и составляет 0.5мкМ. Вероятно, это связано с тем, что Glu-Pg, связавшись с фибрином приобретает более открытую конформацию.

Плазмин является довольно неспецифичным ферментом, разрушающим такие факторы свертывания, как V, VIII, IX и другие. Считается, что разрушение факторов свертывания плазмином, в том числе фактора IX, играет антикоагуляционную роль в гемостазе [40].

Мутации плазминогена вызывают псевдомембранные заболевания, такие как лигнеозный (фиброзный) конъюнктивит. У плазминоген-дефицитных мышей также наблюдается фиброзный конъюнктивит, а также тромбозы и отложения фибрина в интра- и экстравакулярном пространстве тканей [41].

Таблица 1. Плазминоген, сводная характеристика.

Концентрация в крови, масса	2 мкМ, 92 кДа
Роль в организме	разрушение фибрина, заживление ран, воспаление, ангиогенез
Производится	печень (а также эозинофилы, почки, роговица и др.)
Место и время полувыведения (t1/2)	печень, 2.2 дня
Избыток	Не известно
Дефицит у людей	Конъюнктивит, гидроцефалия (редкая патология, 1.6 случаев на миллион)
Последствия дефицита у мышей	Депонирование фибрина в органах

1.2.3. Активаторы плазминогена

В нашем организме имеются 2 основных активатора плазминогена – урокиназный активатор плазминогена (УРА) и тканевой активатор плазминогена (ТРА). Активаторы плазминогена применяются при лечении тромбозов и тромботических осложнений у пациентов. Помимо физиологических активаторов плазминогена, в клинической практике применяются активаторы плазминогена животного и бактериального происхождения. Наиболее распространенный из таких активаторов – стрептокиназа. Со стрептокиназой молекулы плазминогена образуют автокаталитический комплекс, способный переводить другие молекулы плазминогена в активное состояние. Активация плазминогена осуществляется разрезанием связи Арг561-Вал562.

1.2.3.1. Тканевый активатор плазминогена

ТРА является сериновой протеиназой, с молекулярной массой 68кДа. Это одноцепочечный гликопротеин, состоящий из 527 аминокислотных остатков. ТРА секретируется в основном эндотелиальными клетками сосудов [42], поэтому его часто называют васкулярным активатором плазминогена. Концентрация ТРА в плазме составляет 70пМ, причем в свободной форме находится лишь 20% молекул, остальные молекулы ТРА находятся в связанном со своим ингибитором (РАІ) состоянии [43].

Структурно, молекула ТРА состоит из finger-домена, домена эпидермального фактора роста (ЭФР), двух крингл-доменов в А-цепи и протеазного домена в В-цепи. Finger-домен располагается между 6-м и 43-м аминокислотным остатком и на 34% идентичен первому finger-домену бычьего фибринектина. Он, вместе со вторым крингл-доменом, участвует в связывании ТРА с фибрином (опыты с мутантными крингл-доменами показывают, что finger-домен влияет на связывание с, Были проведены опыты, показывающие, что молекулы ТРА, потерявшие 12кДа с N-конца – finger-домен – хуже связываются с фибрином, чем обычный ТРА [44]). Связывание finger-домена с фибрином отлично от аналогичного механизма Pg, которое происходит через лизин-связывающие центры. Структурно finger-домен очень похож на седьмой тип первого вхождения человеческого фибринектина.

Каталитический домен ТРА схож с аналогичными доменами других сериновых протеиназ, имеет каталитическую триаду Гис322, Асп371 и Сер478. Кристаллическая структура протеазного домена сильно похожа на каталитические домены других трипсиноподобных протеиназ, в частности тромбина. Каталитический домен, совместно со вторым крингл-доменом и аминокислотными остатками 296-304 взаимодействует с РАІ.

ТРА секретируется в виде одноцепочечной формы (sc-ТРА). При взаимодействии с плазмином, разрезающим пептидную связь Арг275-Иле276, ТРА переходит в двухцепочечную форму (tc-ТРА).

Интересным является тот факт, что sc-ТРА, хоть и является ферментом, в отсутствие фибрина проявляет очень низкую активность по отношению к плазмину. Но при появлении молекул фибрина, начинают образовываться тройные комплексы (ТРА-Pg-фибрин), и активность sc-ТРА к плазминогену возрастает примерно в 1000 раз [45].

ТРА очень специфичный фермент. Его главный субстрат – плазминоген, в котором он расщепляет пептидную связь Арг561-Вал562. Увеличение активности sc-ТРА к плазмину при добавлении фибрина было тщательно изучено. Связывание sc-ТРА и tc-ТРА с фибрином примерно одинаково, хоть sc-ТРА

связывается немного лучше [46]. K_d между ТРА и фибрином в отсутствие P_g колеблется от 140 нМ до 400 нМ. При появлении P_g, аффинность ТРА к фибрину возрастает приблизительно в 20 раз (K_d 20нМ) [47]. Это объясняется тем, что ТРА, P_g и фибрин образуют тройные комплексы, а также тем, что P_g, связанный с фибрином, приобретает более открытую конформацию, что упрощает связывание с ТРА.

Экспериментальные данные по кинетике активации плазминогена при помощи ТРА довольно сильно варьируют, т.к. на активацию плазминогена влияет очень много факторов – различные процедуры подготовки ТРА и P_g, разные концентрации субстратов, а для исследований с фибриногеном или его производными – добавляются условия формирования фибрина. В отсутствие фибрина, K_m активации плазминогена при помощи ТРА варьирует от 1 до 100 мкМ [45, 48, 49]. В этих условиях, K_m для tc-ТРА в 3-4 раза ниже, чем для sc-ТРА. Разница между sc-ТРА и tc-ТРА исчезает при появлении фибрина. K_m уменьшается на 2 порядка и составляет 0.16-1.1 мкМ [49]. Ряд исследователей в своих экспериментах обнаружили нелинейную ферментативную кинетику активации P_g при помощи ТРА в присутствии фибрина [50]. Это объясняется тем, что вначале реакция идет не так быстро ($K_m=1.05$ мкМ), затем, по мере деградации фибрина, на нем начинают открываться дополнительные сайты связывания для P_g и ТРА ($K_m = 0.07$ мкМ). Важный результат данных исследований состоит в том, что в отсутствие фибрина, активация плазминогена почти не идет, т.к. только при добавлении фибрина, константа Михаэлиса начинает соответствовать концентрации плазминогена, циркулирующего в плазме – 2 мкМ.

Известны участки фибрина, ускоряющие активацию ТРА. D-регион фибрина способен связывать как P_g, так и ТРА на участке Aa148-160, а также только ТРА на участке u312-324 (рисунок 5). Высокоаффинные сайты связывания P_g и ТРА находятся на С-концевом участке альфа цепи, в области Aa392-610 [51]. Эти регионы недоступны для связывания в молекуле фибриногена [34], поэтому появление фибрина является причиной усиления активации плазминогена.

Так как ТРА обладает довольно высокой специфичностью по отношению к плазмину и начинает работать непосредственно в области тромба (для работы ему необходимо наличие молекул фибрина), он стал основной мишенью для исследователей в области генной инженерии, которые стремились улучшить его показатели в попытках создания наиболее эффективного терапевтического препарата. Наиболее успешным из этих исследований было создание серии мутантов ТРА, резистентных к PAI-1 (его основному ингибитору). Было выявлено, что взаимодействие происходит между положительно заряженным участком ТРА (298-302) и отрицательно заряженным участком PAI-1 (350-355) [52]. Мутагенез в остатках Арг298, 299 и 304 молекулы ТРА позволил исследователям создать мутантную молекулу, ингибирующуюся в 120 000 раз хуже, чем молекулы обычного ТРА. Эти исследования стали основой для создания препарата тенектеплаза – мутантного варианта ТРА, в котором последовательность 296-299 (Лиз-Гис-Арг-Арг) была заменена на 4 аланина [53] (рисунок б). Данный мутант показал более медленное выведение из кровотока и более высокую селективность к фибрину.

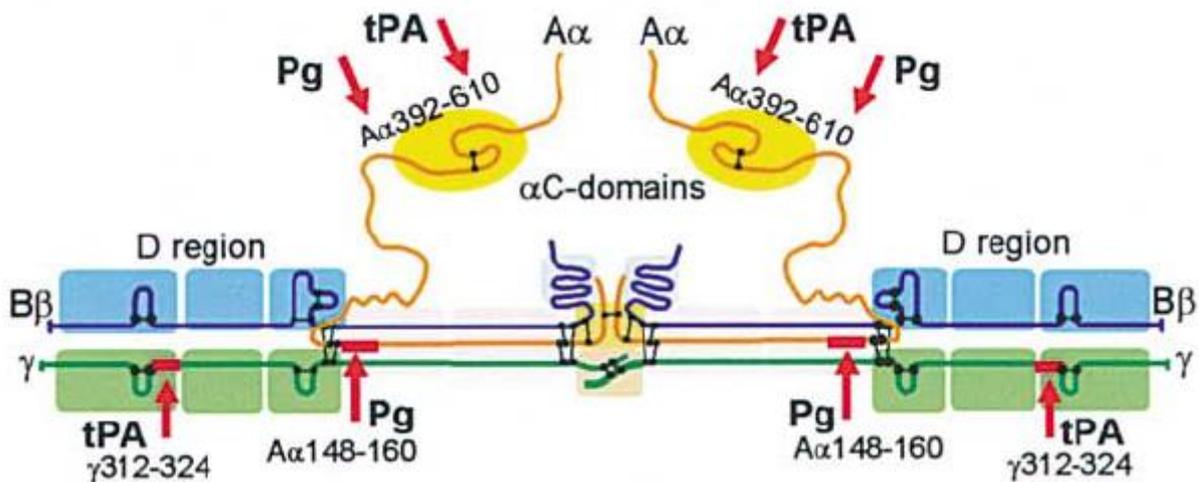


Рисунок 5. Сайты связывания плазминогена, ТРА и фибрина [34]. Аα, Вβ и γ цепи представлены оранжевым, синим и зеленым цветом, соответственно. Аα392-610 – область связывания как плазминогена, так и ТРА. γ312-324 - сайт связывания ТРА, Аα148-160 – сайт связывания плазминогена.

ТРА синтезируется многими тканями, но основной источник синтеза – эндотелиальные клетки. На экспрессию ТРА влияют такие vasoактивные вещества, как гистамин и тромбин, взаимодействуя с клетками посредством G-белковых клеточных рецепторов.

Важно отметить, что не все эндотелиальные клетки синтезируют ТРА, например, известно, что в небольших сосудах экспрессия ТРА ограничена [54, 55].

Свободные молекулы ТРА и их комплексы с ингибиторами быстро удаляются из кровотока, связываясь с рецепторами гепатоцитов и эндотелиальных клеток. В норме, время полувыведения составляет около 3-х минут [56]. Опыты на изолированных гепатоцитах крысы показывают, что комплексы ТРА с ингибиторами удаляются быстрее чем свободный ТРА [57], хотя *in vivo* исследования других групп показывают, что удаление ТРА происходит быстрее у людей с пониженным уровнем PAI-1 (3.5 мин), в отличие от людей с высоким уровнем PAI-1 (5.3 мин) [58]. В связи с тем, что выведение ТРА происходит посредством клеток печени, время полувыведения может быть увеличено у пациентов с заболеваниями печени [59].

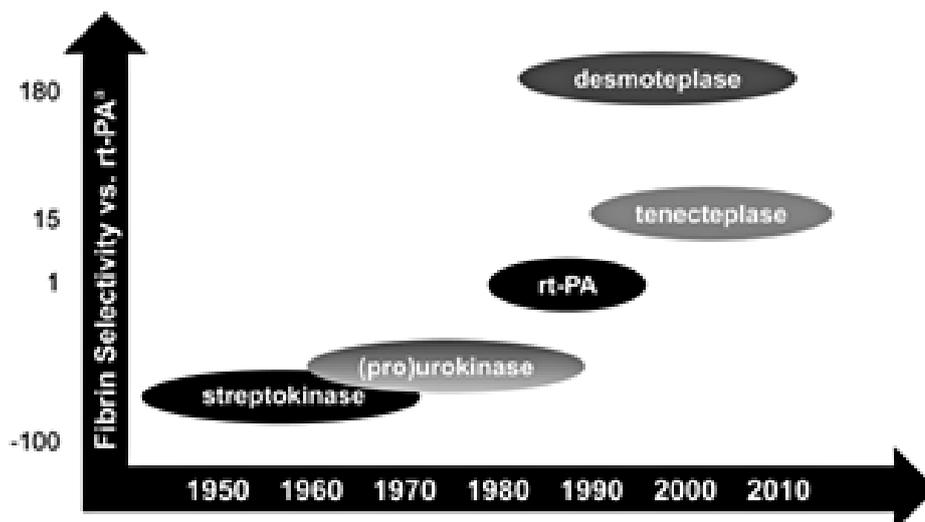


Рисунок 6. Разработка фибрин-селективных тромболитических препаратов [60]. По горизонтали – год появления на рынке. По вертикали – селективность вещества к фибрину по отношению к селективности к фибрину рекомбинантного ТРА.

Случаи врожденного дефицита ТРА и UPA не были описаны у людей, и до определенного времени считалось, что дефицит данных белков несовместим с жизнью. Однако эксперименты на мышах показали неожиданный результат. Мыши, дефицитные по ТРА развивались вполне нормально. Микроскопический анализ показал у данных мышей умеренный гломерулонефрит. Лизис сгустка у таких мышей шел хуже, чем у особей дикого типа. Осложнения после эндотоксин-индуцированного тромбоза у мышей ТРА^{-/-} были серьезнее, чем у ТРА^{+/+} мышей [61]. Это можно объяснить тем, что у мышей есть какой-то запасной механизм активации плазминогена. С другой стороны, очевидно, что полный нокаут активаторов плазминогена приводит к тромботическим последствиям. Полный нокаут активаторов плазминогена схож по фенотипу с нокаутом самого плазминогена, что показывает, что ТРА и UPA являются основными активаторами плазминогена у млекопитающих [62].

1.2.3.2. Урокиназный активатор плазминогена

Урокиназный активатор плазминогена обнаруживается в моче в концентрации 40-80 мкг/л [63]. Он синтезируется целым рядом клеток – эпителиальные, эндотелиальные, макрофаги, соединительнотканые клетки и другие. UPA активирует молекулы плазминогена расщепляя связь Arg561–Val562, также, как и ТРА, но в отличие от последнего, UPA для данной реакции не требуется наличие фибрина. Это важное свойство позволяет сделать предположение, что основная физиологическая роль UPA – это участие в процессах разрушения внеклеточного матрикса, клеточной миграции, заживления ран, воспаления, метастазирования, в то время как для ТРА основной задачей является разрушение фибриновых сгустков в крови [64].

Sc-UPA состоит из домена эпидермального фактора роста (участвует в связывании с клеточными рецепторами), крингл-домена и каталитического домена (гомологичного трипсиновым протеиназам). Расщепление плазмином связи Лиз158-Иле159 переводит одноцепочечную форму урокиназного

активатора (sc-UPA) в двухцепочечную (tc-UPA), что в 250 раз повышает ее активность в реакции превращения молекул плазминогена в плазмин [65].

Время полувыведения UPA из плазмы составляет около 7 минут, расщепление происходит в клетках печени [66]. При связывании с урокиназным рецептором (UPA-R), активность sc-UPA увеличивается на 2 порядка [67]. Предполагается, что благодаря данному явлению, моноциты крови могут мигрировать внутрь тромба [68].

Генетических заболеваний у людей, связанных с дефицитом UPA и UPA-рецепторов не выявлено. Исследования на мышах с нокаутацией гена UPA, показали, что такие мыши (UPA-/-) аналогично мышам TPA-/- имеют отложения фибрина в органах, но, тем не менее спонтанных тромбообразований у них не обнаружено [62]. У UPA-/- мышей существенно замедлен процесс заживления ран [69]. Что интересно, у мышей с UPAR-/- раны заживают также, как у здоровых особей [70].

Таблица 2. Сводная характеристика активаторов плазминогена.

	UPA	TPA
Концентрация, масса	40 pM, 54kDa	70pM*, 68kDa
Роль в организме	активация Pg, клеточная миграция, ангиогенез	активация Pg, нейрогенез
Производится	фибробласты, эпителиальные клетки, лейкоциты	в основном эндотелиальные клетки
Время полувыведения, t1/2	Печень, 7 мин	Печень, эндотелиальные клетки, 3 мин
Избыток у людей	Онкология Отложенные (12-14ч) 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 мышей	Внутричерепные кровотечения, Улучшенная обучаемость	Улучшенная обучаемость
Дефицит у мышей	Депонирование фибрина в органах	Нормальное развитие, незначительные тромбозы

*После повреждения эндотелия, локальная концентрация ТРА возрастает на порядок за 20 мин [71].

1.2.4. Ингибиторы фибринолиза (ингибиторы плазмина, PAI, TAFI)

Ингибиторы системы фибринолиза, по механизму действия, делятся на несколько типов. Первая группа (PAI-1, PAI-2) ингибирует активаторы плазминогена – молекулы урокиназы и тканевого активатора. Белки второй группы ингибиторов (антиплазмины и макроглобулины) воздействуют непосредственно плазмин. К третьей группе можно отнести TAFI (тромбин активируемый ингибитор фибринолиза), ингибирующее воздействие которого заключается в удалении на фибриновых молекулах сайтов связывания плазмина.

1.2.4.1. Ингибиторы активаторов плазминогена (PAI)

PAI-1 – основной ингибитор активаторов плазминогена - молекул урокиназы и тканевого активатора. PAI-1 состоит из 379 аминокислотных остатков и имеет массу 52 кДа. PAI обладает свойством автоинактивации (происходит из-за спонтанного перемещения петли активного центра внутрь молекулы). Данная автоинактивация является пассивной и имеет обратимый

характер (активность возвращается при денатурации белка) [72]. Время полувыведения PAI-1 довольно короткое и составляет около 10 минут, концентрация в плазме колеблется в широких пределах – от 1 до 40 нг/мл. PAI-1 синтезируется многими тканями. Основной вклад в синтез PAI-1 вносят тромбоциты [73], эндотелиальные клетки [74], гепатоциты и адипоциты [75]. Около 50% количества циркулирующего PAI содержится в тромбоцитах, которые выбрасывают его при формировании сгустка [76], вследствие чего тромб становится резистентен к лизису.

Дефицит PAI-1 встречается у людей довольно редко и, как правило, сопровождается длительными и отложенными гемorragиями [77]. Оральный прием таких препаратов, как транексамовая кислота, нормализует состояние гемостаза у таких пациентов [78].

Дефицитные по PAI-1 мыши имеют нормальные показатели развития и выживаемости. Отсутствие PAI-1 приводит к усилению фибринолиза, а также ускорению заживления ран – при артериальном повреждении, заживление у PAI-1 дефицитных мышей происходит быстрее, чем у обычных, за счет ускоренной миграции клеток гладкой мускулатуры из здоровой ткани [69].

Повышенная концентрация PAI-1 встречается гораздо чаще. Ее связывают с рядом патологий ССС [79], онкологией [80], ожирением, сахарным диабетом второго типа [81] и другими.

PAI-2 – молекула состоящая из 415 аминокислотных остатков, была обнаружена в плаценте и долгое время считалась плацентарным ингибитором UPA [82]. Позже, PAI-2 был выделен из плаценты и из моноцитоидного ряда U-937 [83]. PAI-2 играет роль ингибитора активаторов плазминогена в тканях эпидермиса, роговицы, языка, пищевода и вагины [84]. Важными источниками PAI-2 являются моноциты, которые выделяют при миграции в фибриновый сгусток, что делает последний более устойчивым к лизису, в частности потому, что PAI-2 имеет способность связываться с фибрином [85].

В норме, PAI-2 в плазме не обнаруживается, и фиксируется лишь при беременности. Концентрация PAI-2 достигает максимума на 33-й неделе

беременности, имея значения порядка 250нг/мл [86]. Также, PAI-2 обнаруживается у пациентов с миелобластным лейкозом типов M4 и M5 [87], у пациентов с сепсисом, у которых также повышена концентрация PAI-1 [88].

Таблица 3. Сводная характеристика ингибиторов фибринолиза.

	PAI-1	Антиплазмин	α 2-Макроглобулин
Концентрация, масса	200пМ*, 52 кДа	1мкМ, 70 кДа	3мкМ, 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, t1/2	Печень (+автоинактивация), 10-120 мин	Печень, 3 дня (0.5д в комплексе с Pn)	Печень, 7 дней
Избыток у людей	Сахарный диабет 2-го типа, метаболический синдром, инсулина, онкология, беременность, 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 (хотя скрининговые тесты ПВ, АЧТВ, как правило, в норме)	Кровотечения, (известна лишь 1 семья)	Нормальное развитие

Дефицит у людей (фенотипически)	Кровотечения	Заболевания печени ДВС ТЛТ	Заболевания печени Панкреатит
Избыток у мышей	Венозные тромбозы, ишемия конечностей		
Дефицит у мышей	Нормальное развитие	Нормальное развитие	

* Концентрация PAI в сгустке может увеличиваться до 30 раз [76].

1.2.4.2. α 2-Антиплазмин

α 2-Антиплазмин играет роль основного ингибитора плазмина в организме. Одноцепочечная молекула, массой 70кДа состоит из 452 аминокислотных остатков. Концентрация α 2-антиплазмина в плазме составляет порядка 70 мг/л (1мкМ), что соответствует приблизительно 50% концентрации плазминогена в молярном эквиваленте. α 2-антиплазмин синтезируется в печени, поэтому, при заболеваниях печени, его концентрации в крови снижается. Время полувыведения свободной молекулы α 2-антиплазмина – 3 суток, в то время, как антиплазмин-плазминный комплекс выводится за 12 часов [89].

α 2-антиплазмин в плазме присутствует в 4-х формах (в зависимости от степени протеолиза молекулы с С- и N- концов). Но это не влияет на ингибирующую способность α 2-антиплазмина, за которую отвечает центральная часть молекулы. Антиплазмин, также, как молекулы плазмина может связываться с фибрином с помощью лизин-связывающих центров. Плазмин, связанный таким образом с фибрином, становится защищен от инактивации α 2-антиплазмином [90].

1.2.4.3. α 2-Макроглобулин

Макроглобулин – высокомолекулярный белок, являющийся основным ингибитором широкого спектра протеиназ, также играющий роль запасного ингибитора, для ряда ферментов, в том числе, плазмина [91]. Молекулярная масса макроглобулина 725кДа, концентрация в плазме крови составляет 3мкМ.

Макроглобулин начинает оказывать существенный эффект на систему лизиса, когда истощаются запасы α 2-антиплазмина и роль основного ингибитора плазмина переходит к макроглобулину, хотя его эффективность в 10 раз ниже, чем у α 2-антиплазмина. Макроглобулин также способен взаимодействовать с ТРА и УРА [92]. Молекула макроглобулина играет роль ловушки, захватывая мишень, вследствие чего к молекуле-субстрату блокируется доступ из вне.

Макроглобулин синтезируется в печени, попадает в плазму, из которой диффундирует в другие ткани в минимальных количествах из-за большого размера его молекул.

Повышение уровня макроглобулина в плазме наблюдается при заболеваниях, связанных с фиброзом печени (гепатиты, цирроз, болезнь Вильсона-Коновалова), аденоме простаты, нефротическом синдроме и сахарном диабете.

1.2.4.4. Тромбин-активируемый ингибитор фибринолиза

Тромбин-активируемый ингибитор фибринолиза (ТАФИ) – одноцепочечный гликопротеин, масса молекул составляет порядка 60кДа. Концентрация ТАФИ в крови может колебаться в диапазоне от десятков, до сотен нМ [93]. При воздействии тромбин-тромбомодулинового комплекса, ТАФИ переходит в свою активную форму (ТАФИа) [94]. ТАФИа удаляет С-концевые лизиновые аминокислотные остатки с фибрина, тем самым препятствуя связыванию плазмина с фибриновой сетью. Молекулы ТАФИа нестабильны при 37°C, время полужизни составляет 8-9 минут.

Ряд исследований показывают корреляцию повышенной концентрации ТАФИ с риском тромбозов, а также связь с концентрацией белков острой фазы воспаления [95]. Предполагается, что усиленный фибринолиз у пациентов страдающих гемофилией вызван недостаточным количеством нарабатываемого ТАФИа. In vivo эксперименты на кроликах показали, что ингибирование ТАФИа антителами приводит к двукратному ускорению лизиса сгустка [96]

1.2.5. Регуляция работы системы фибринолиза

Основная реакция в системе фибринолиза – расщепление нитей фибрина плазмином. С помощью данной реакции решается физиологическая задача удаления фибриновых сгустков в сосудах. Запуск системы фибринолиза стартует с момента появления фибринового сгустка. С фибрином начинают связываться плазминоген и ТРА, что защищает их от ингибирования, а также образуют тернарные комплексы, которые увеличивают каталитическую способность ТРА по отношению к P_g в сотни раз. Это существенно смещает баланс между активными ферментами и ингибиторами в сторону активации системы фибринолиза. Плазмин превращает sc-ТРА и sc-УРА в их двухцепочечные формы, которые начинают еще быстрее нарабатывать плазмин, тем самым замыкая петлю положительной обратной связи. Помимо этого, появление тромба приводит к увеличению экспрессии фибринолитических ферментов эндотелиальными клетками сосудов, что также ускоряет фибринолиз. В то время как концентрация плазминогена в крови довольно стабильна (микромольные концентрации), то концентрации ТРА, УРА и их ингибиторов составляют десятки пикомолей, и регуляция системы происходит в основном за счет изменения экспрессии последних. Об этом также свидетельствует тот факт, что время жизни активаторов плазминогена составляет от минут и десятков минут, в то время, как для плазминогена данный параметр измеряется сутками. Система лизиса должна удалять фибрин не слишком быстро, чтобы поврежденные ткани сосудов успели восстановиться, но и не слишком медленно, чтоб не происходило отложений фибрина в сосудах и органах. Переход P_g в свою активную форму, плазмин, по всему объему плазмы будет приводить к разрушению многих факторов свертывания, таких как фактор V, VIII, IX, фактор фон Виллебранда и других, так как плазмин является очень неспецифичным ферментом. От такой ситуации организм защищен тем, что плазмин подвержен быстрому ингибированию в кровотоке, кроме тех областей, где содержится фибрин, защищающий плазмин от

ингибирования. Деградация молекул фибрина под действием плазмина идет с С-конца альфа-цепи, что способствует увеличению С-концевых лизинов, с которыми связываются другие молекулы плазмина. Фибрин, который подвергся частичной деградации, связывает glu-Pg значительно лучше, чем не деградированный.

1.3. Методы исследования системы фибринолиза

Исследования свертывания крови привели к значительному прогрессу в понимании процесса образования сгустков и роли различных ее компонент, были разработаны разнообразные клинические тесты, позволяющие оценить влияние каждого из них – факторов свертывания, ингибиторов, тромбоцитов. Чего нельзя сказать о фибринолизе. За последние несколько десятилетий, фундаментальные исследования так и не привели к появлению тестов фибринолиза, активно применяющихся в клинике. Исключением является лишь тест оценки D-димера, являющийся одновременно как тестом свертывания, так и процесса лизиса. Во многом, это связано с тем, что концентрации фибринолитических факторов могут серьезно варьировать даже в рамках одного индивидуума (например, эндотелий сосудов локально выделяет значительное количество факторов фибринолиза в период наличия тромба). Другой причиной является то, что оценка отдельного каждой из компонент фибринолиза является малоинформативной и отражает лишь потенциальный уровень активности системы. Правильным решением было бы использование глобальных тестов, оценивающих работу системы фибринолиза в целом, как это происходит в организме, но и здесь мы сталкиваемся с рядом проблем. В частности, характерные времена работы системы свертывания в организме – единицы и десятки минут. Для фибринолиза характерные времена измеряются десятками часов, а за такие времена образец может претерпевать серьезные физико-химические изменения. Вследствие перечисленных выше причин, тесты фибринолиза на данный момент малоинформативны и слабо распространены в клинической практике. Тем не менее, ряд тестов все же заслуживает внимания, речь о них пойдет ниже.

1.3.1. Измерение фибринолитических факторов

Первой группой фибринолитических тестов являются тесты оценки активности факторов фибринолиза. Их плюсом является универсальность и относительная простота методов. В большинстве случаев используются функциональные или иммунологические тесты. Иммунологические тесты основаны на реакции антиген-антитело, в которой антителом является специальная иммунологическая метка, а антигеном - исследуемое вещество. Образец смешивается с меткой, и с помощью фото-/флуорометрических методов измеряется концентрация образовавшихся комплексов, на базе чего рассчитываются концентрации исследуемого вещества. Плюсом является высокая точность метода, позволяющая определять пикомолярные концентрации. Минусом – слабая физиологическая информативность, т.к. концентрация фермента не всегда однозначно определяет его активность (а, следовательно, и функциональную роль) по отношению к физиологическому субстрату. Другой группой методов являются функциональные тесты, суть которых заключается в добавлении в образец флуоро-/хромогенных субстратов для исследуемых веществ. Взаимодействие образца с субстратом приводит к активации субстрата, концентрация которого регистрируется системой. Первая производная от концентрации субстрата характеризует концентрацию исследуемого вещества. Данный метод физиологически более информативен, нежели иммунологический, т.к. оценивается именно функциональная активность вещества.

1.3.1.1. Плазмин и антиплазмин

Концентрация плазминогена в плазме крови человека достаточно велика (2мкМ) и его активность измеряется в основном при помощи функционального хромогенного теста. Чаще всего, в качестве внешнего активатора плазминогена используется белок стрептокиназа, который образует с плазминогеном автокаталитический комплекс, инициирующий образование плазмينا, который, в

свою очередь, активирует хромогенную метку [97]. Кроме этого, с помощью функционального хромогенного теста проводится измерение активности антиплазмина. Концентрация плазмин-антиплазминовых комплексов измеряется с помощью иммунологических тестов.

Снижение функциональной активности плазминогена в крови наблюдается у некоторых этнических групп, но связи с повышенным риском тромбоза не выявлено [98]. Даже в случае гомозиготной недостаточности плазминогена, у таких больных тромботические патологии не наблюдаются [99]. Отсутствие тромботических патологий у таких пациентов, вероятно, вызвано тем, что даже остаточные концентрации плазминогена (от 4% до 51%) достаточны для нормальной работы системы фибринолиза.

Повышение концентрации плазмин-антиплазминовых комплексов, снижение уровня антиплазмина характеризует гиперфибринолитическое состояние которое может быть вызвано травмами [100], ДВС [101], острым промиелоцитарным лейкозом [102]. Однако, корреляции между концентрацией данных веществ и тяжестью перечисленных патологий установлено не было.

Таким образом, функциональные тесты плазмина и антиплазмина являются слабо информативными. Вероятно, это вызвано тем, что они циркулируют в плазме в относительно высоких концентрациях и не являются лимитирующими фибринолиз факторами. В некоторых случаях такие тесты могут использоваться для диагностики редких генетических отклонений.

1.3.1.2. TPA и PAI-1

TPA и PAI-1 циркулируют в крови в гораздо более низких концентрациях (десятки и сотни пикомолей), чем плазминоген и антиплазмин. Они имеют короткие времена полувыведения, и считается, что именно данные белки регулируют процесс фибринолиза в организме. TPA, связываясь с фибрином становится защищенным от ингибирования PAI-1. В свободной же форме, TPA быстро ингибируется, образуя неактивные комплексы с PAI-1. Вследствие этого,

концентрация ТРА несвязанного с РАІ-1 в крови довольно мала, и для ее измерения используются иммунологические методы. Концентрацию РАІ-1 измеряют как с помощью иммунологических, так и с помощью функциональных тестов.

Тесты на ТРА и РАІ-1 имеют ряд ограничений. Во-первых, при измерении уровня ТРА, фиксируется, как правило, неактивный комплекс с РАІ-1, поэтому повышенная концентрация такого ТРА может характеризовать не повышение активности фибринолиза, а наоборот, его ингибирование [103]. Некоторые лаборатории проводят фибринолитический тест венозной окклюзии с помощью манжеты. Для этого, пациенту на руку надевается манжета для измерения давления, нагнетается давление, среднее между систолическим и диастолическим уровнем (но менее 100 мм. рт. ст.) на время 10-20 минут. Взятие крови у пациента производится до и после процедуры, ниже все еще надутый манжеты. Считается, что в результате данной процедуры, происходит выброс эндотелиальных факторов лизиса, однако, не ясно, является ли данная процедура лучшим отражением физиологического состояния, нежели обычное взятие крови [104]. Ко всему прочему, концентрация РАІ-1 в плазме не отражает его реальную ингибирующую способность, так большая часть молекул РАІ-1 высвобождается тромбоцитами непосредственно в самом тромбе [105].

Уровни ТРА и РАІ-1 могут варьировать по разным причинам. РАІ-1, в частности, играет в организме не только фибринолитическую роль, поэтому его уровень повышается при сахарном диабете и инсулин-резистентности [106]. Уровни ТРА и РАІ-1 могут повышаться в острой фазе воспаления, при беременности [107], а также меняться в зависимости от циркадного ритма [108].

Связь между повышенными уровнями ТРА, РАІ-1 и заболеваниями ССС была показана в многочисленных исследованиях, хотя их результаты зачастую серьезно различаются. Так, к примеру, в одних исследованиях, повышенная концентрация ТРА и РАІ-1 коррелирует с риском тромботических артериальных заболеваний [109], другие исследования показывают отсутствие корреляции [110], в третьих, наоборот, повышение РАІ-1 связано с уменьшением риска [111].

Схожая ситуация наблюдается с венозными тромбозами [106]. Таким образом, отсутствие общей методологической базы и противоречащие результаты не позволяют использовать ТРА и РАІ-1 как объективные прогностические параметры в клинике.

1.3.1.3. TAFI

TAFI измеряется как с помощью функциональных, так и с помощью иммунологических тестов. Функциональные тесты имеют преимущество, т.к. они измеряют только активный TAFI, в то время как, иммунологические измеряют как активный, так и инактивированный TAFI. Существуют несколько различных способов постановки функционального теста TAFI. В одних вариантах, образец разводится в 20 раз в дефицитной по TAFI плазме, в раствор добавляется тромбин, который активирует свертывание, сам TAFI, и рекомбинантный ТРА, запускающий лизис. Измеряется замедление лизиса по сравнению с контрольным экспериментом. В другой постановке исследуемый образец активируется с помощью тромбина, после чего реакцию останавливают добавлением рраск (D-фенилаланил-пролил-аргинил хлорметилкетон – низкомолекулярный ингибитор тромбина), активность образовавшегося TAFIa измеряется с помощью специфичного к нему субстрата.

Повышение концентрации TAFI в плазме коррелирует с вероятностью венозной тромбозии – концентрация TAFI выше 90 перцентиль соответствует двукратному увеличению риска тромбоза глубоких вен нижних конечностей [112]. Помимо этого, известна связь между TAFI и различными патологическими состояниями, такими как печеночная, почечная недостаточность, эндокринными заболеваниями, ДВС, онкологией, беременностью [113].

Также, как и для остальных тестов фибринолитических факторов, информативность таких исследований довольно низка, так как она отражает лишь потенциальный уровень активности системы.

1.3.1.4. D-димер

D-димер является продуктом деградации фибрина. Он косвенно отражает результат совместной работы систем свертывания и фибринолиза. Низкая концентрация D-димера соответствует нормальному состоянию, в то время как повышение концентрации D-димера часто наблюдается при тромбозах, беременности, у пожилых и при широком спектре воспалительных и онкологических состояний [114]. Вследствие данных причин, специфичность такого теста для оценки состояния фибринолиза является низкой. Помимо этого, данный тест показывает ложноположительные результаты при гипербилирубинемии, липемии, гемолизе и повышенном уровне ревматоидных факторов [114].

Иммунологические методы измерения концентрации D-димера показывают высокую чувствительность в отношении тромбозов (93-96%), но низкую специфичность (43-53%) [115]. Тест D-димера рекомендуется использовать в скоринговых расчетах вероятности легочной эмболии и тромбоза глубоких вен [116].

1.3.2. Глобальные фибринолитические тесты

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

1.3.2.1. Эуглобулиновое время лизиса сгустка, фактор XIIIa зависимый фибринолиз

Тест эуглобулинового времени лизиса сгустка был разработан в 1950-х годах для скрининга состояний гиперфибринолиза [117]. Классическая постановка эуглобулинового теста выглядит следующим образом: кровь в пробирке с цитратом центрифугируется при +4° С, плазма отбирается и

разводится уксусной кислотой, инкубируется 15 минут на льду. Осадок содержит эуглобулиновую фракцию (плазминоген, плазмин, ТРА, PAI-1, фибриноген). Надосадок отбирается при помощи центрифугирования при температуре +4°C и удаляется. Осадок растворяется в буфере. Затем запускается свертывание (тромбином) и регистрируется время лизиса.

Этот тест отражает способность плазмы лизировать стандартный сгусток [118], однако в исследуемом образце не остается большей части ингибиторов фибринолиза, таких как антиплазмин, TAFI, в несколько раз снижена концентрация фибриногена, поэтому данный тест может оценить только гиперактивность системы лизиса, без выявления ее причин.

Модифицированный вариант данного теста, фактор XIIa зависимый фибринолиз, был разработан в 1970х годах [119]. Плазменные белки калликреин и фактор XIa могут активировать плазминоген. При этом, оба этих белка активируются фактором XIIa (фактором Хагемана), который нарабатывается в крови из своего неактивного предшественника при контакте с отрицательно заряженными поверхностями (контактная активация).

При проведении теста плазму пациента смешивают с каолином (для контактной активации фактора XIIa) и уксусной кислотой (для осаждения эуглобулиновой фракции), инкубируют при +37°C 30 минут, центрифугируют и избавляются от надосадка. Осадок разводится в буфере, к нему добавляют кальций и инкубируют при +37°C. Регистрируется время лизиса.

Как и в базовом тесте эуглобулинового времени лизиса сгустка, образец не содержит многих ингибиторов фибринолиза, более того, образование плазмينا связано не только с активностью естественных активаторов плазминогена (ТРА, UРА), но и с работой калликреин-кининовой системы, уровнем фактора XII, что очень сильно затрудняет интерпретацию результатов.

1.3.2.2. Тромбоэластография

Тромбоэластография (ТЭГ) представляет собой метод графической регистрации процессов свертывания крови и фибринолиза. Метод был разработан в 1948 году и базируется на принципе изменения вязкости образца вследствие полимеризации фибрина.

Установка представляет из себя пластиковую кювету, в которую заливается образец (около 0.4 мл цельной крови), добавляется активатор свертывания и вставляется металлический стержень. Кювета совершает плавные вращательные колебания, и, при образовании сгустка, стержень начинает вращаться вместе с кюветой. Амплитуда отклонения стержня регистрируется как функция времени. С помощью кривой тромбоэластографии измеряются параметры роста и лизиса сгустка (см. рис). Для оценки уровня фибринолиза используется параметр $Ly30$, характеризующий процент лизиса сгустка за 30 минут с момента максимальной амплитуды отклонения стержня.

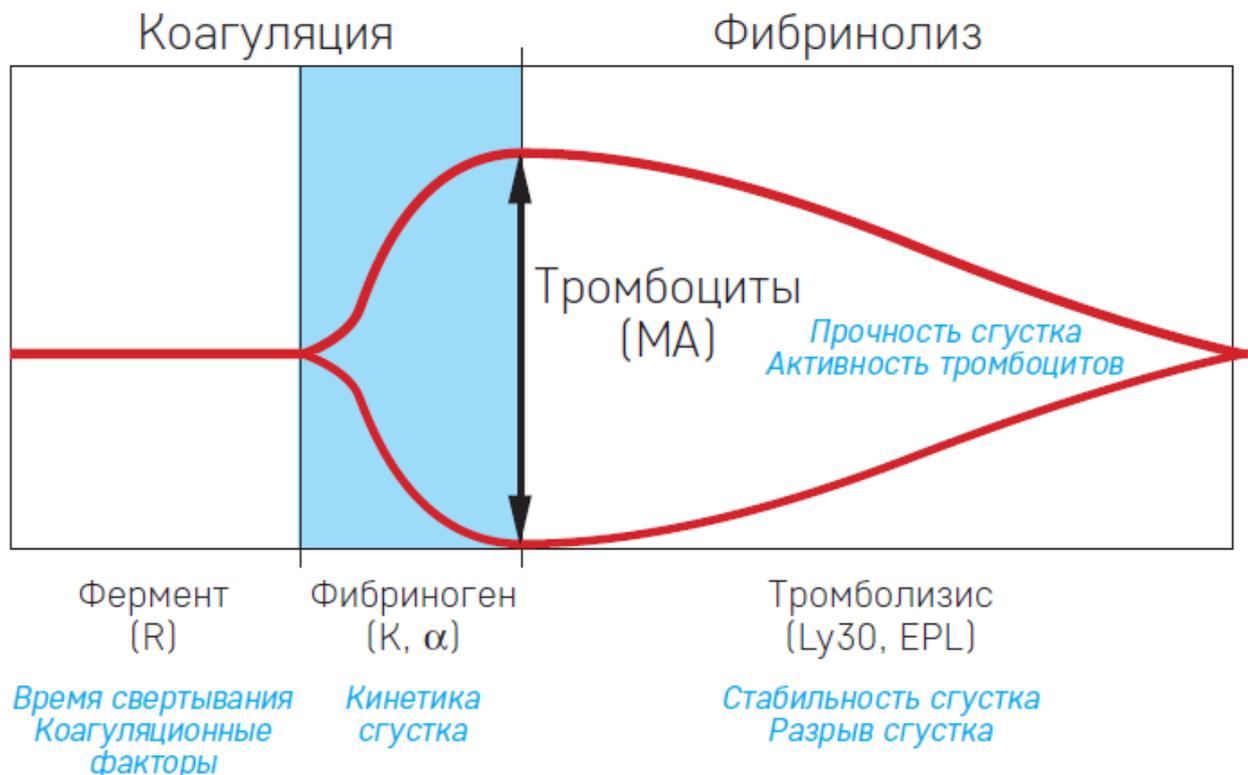


Рисунок 7 Типичная кривая тромбоэластографии (<http://teg.haemonetics.com>)

ТЭГ позволяет регистрировать гиперфибринолитические состояния и используется в клинике для контроля гемостаза и корректировки антифибринолитической терапии при трансплантациях печени [120], кардиологических операциях с экстракорпоральным кровообращением [121] и травматических коагулопатиях. В исследовании CRASH-2 было показано уменьшение уровня смертности у тех пациентов, которые получали транкесамовую кислоту, ингибирующую фибринолиз, в течение 3-х часов после получения [122].

К достоинствам тромбоэластографии можно отнести факт измерения процесса лизиса в цельной крови, что ближе к ситуации *in vivo* и упрощает процедуру подготовки образца. Это позволяет проводить измерения “у кровати пациента”, без необходимости транспортировки образцов в лабораторию. ТЭГ измеряет реальную плотность сгустка, а не косвенные характеристики светопропускания. В то же время ТЭГ имеет свои минусы, в частности то, что скорость таких экспериментов довольно низкая и не подходит для массовых параллельных анализов. ТЭГ измеряет только скорость образования и разрушения фибринового сгустка, упуская полезную информацию, которую можно извлечь из кинетики образования тромбина и плазмина.

1.3.2.3. Время лизиса сгустка

Тест времени лизиса сгустка проводится на планшетном фотометре. В лунку планшета заливается образец, в который добавляются фосфолипиды, кальций и тканевый фактор свертывания для запуска коагуляции. Также в лунку добавляется ТРА, инициирующий процесс фибринолиза. Измеряется проходящий через образец оптический сигнал. Время лизиса сгустка рассчитывается как промежуток времени между моментом образования сгустка (половина максимальной интенсивности светорассеяния при росте сгустка) и полулизиса сгустка (половина максимальной интенсивности при лизисе сгустка).

К плюсам метода относится простота постановки, возможность использования замороженных образцов, комплексное измерение фибринолиза с

участием многих компонент системы. Тест времени лизиса сгустка является чувствительным к уровню плазминогена, антиплазмина, PAI-1, TAFI, в то время как протромбин, фибриноген, факторы VII, X, XI слабо влияют на показания теста [106]. Минусами данного теста является то, что концентрация добавленного ТРА значительно выше физиологических значений, а также отсутствие тромбоцитов.

Сниженный фибринолитический потенциал, который проявляется удлинением времени лизиса сгустка, является фактором риска таких патологий, как венозная тромбоэмболия [123], артериальный тромбоз [124], синдром Бадда-Киари, преэклампсия и других заболеваний.

1.3.2.4. Общий гемостатический потенциал

Тест времени лизиса сгустка позволяет получать единственный параметр – время существования сгустка. Развитием теста времени лизиса является тест общего гемостатического потенциала. Суть теста заключается в том, что параллельно в двух лунках запускается процесс свертывания (аналогично тесту времени лизиса сгустка), но в одну из лунок не добавляется ТРА. Таким образом, в лунке с ТРА фиксируются оба процесса - процесс свертывания и процесс лизиса. В лунке без ТРА фиксируется только процесс коагуляции (см. рисунок 8). Площадь под графиком светорассеяния в постановке с ТРА характеризует значение общего гемостатического потенциала (ОНП - Overall Haemostatic Potential), под графиком без ТРА – общий коагуляционный потенциал (ОСР - Overall Coagulation Potential). Разность площадей под графиками – общий фибринолитический потенциал (ОФП - Overall Fibrinolytic Potential). Помимо интегральных параметров в тесте также измеряется параметр задержки – время от начала эксперимента, до момента роста сгустка (корреляция с АЧТВ), максимальная интенсивность (корреляция с уровнем фибриногена) и скорость наработки фибрина [125]. ОНП чувствителен к факторам II, V, VII, VIII, IX, X и XI [126]. ОФП чувствителен к концентрациям плазминогена, антиплазмина, PAI-1, TAFI [127].

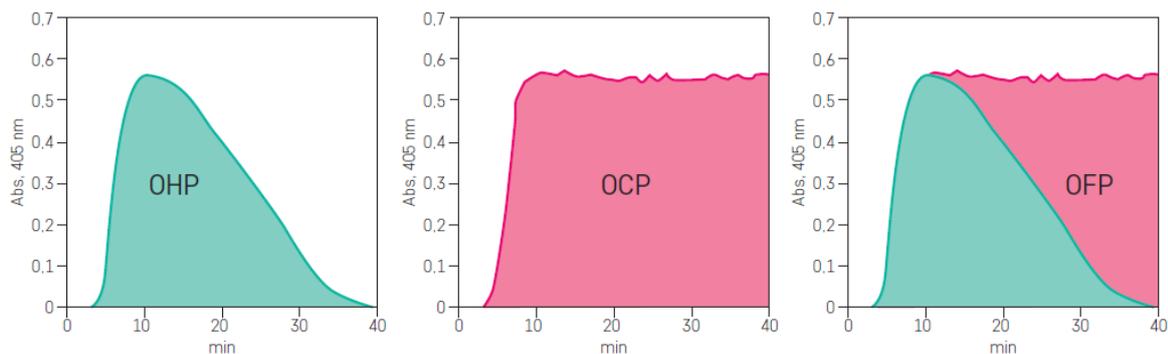


Рисунок 8 Общий гемостатический потенциал [128]. Площадь под графиком светорассеяния в постановке с ТРА характеризует общий гемостатический потенциал (OHP - Overall Haemostatic Potential), под графиком без ТРА – общий коагуляционный потенциал (OCP - Overall Coagulation Potential). Разность площадей под графиками – общий фибринолитический потенциал (OFP - Overall Fibrinolytic Potential).

Тесты времени лизиса сгустка и общего гемостатического потенциала довольно похожи и имеют схожие достоинства и недостатки, такие как нечувствительность к эндогенным концентрациям активаторов плазминогена. На текущий момент существует много вариаций теста общего гемостатического потенциала, в частности, вместо тромбина для активации свертывания добавляют тромбопластин, проводятся тесты с добавлением и без добавления фосфолипидов. Отсутствие единого стандарта постановки теста на данный момент не позволяет широко применять его в клинической практике и сравнивать результаты различных лабораторий.

1.4. Применение ТЛТ, осложнения

Тромболитическая терапия – процедура восстановления сосудистого кровотока за счет введения препаратов, активирующих систему фибринолиза, и последующего лизиса сгустка внутри сосудов. Активация фибринолиза пациента достигается путем введения тромболитического агента, как правило, активатора плазминогена – ТРА, УРА или стрептокиназы (или их модификаций).

Тромболитическая терапия представляет для пациента довольно опасную процедуру из-за возможных осложнений. Можно выделить следующие типы

осложнений тромболитической терапии: геморрагические (в особенности, внутричерепные кровотечения), реперфузионные нарушения ритма и проводимости, аллергические, тромботические, гипотония, разрыв миокарда.

Одним из основных и наиболее грозных осложнений является внутричерепное кровотечение. Геморрагический инсульт в условиях тромболитической терапии имеет чрезвычайно неблагоприятный прогноз. По данным GUSTO-1 тридцатидневная смертность у таких пациентов составляет 60%, а 27% становятся инвалидами [129]. У пожилых больных ОИМ после ТЛТ вероятность геморрагического инсульта в примерно 2-3 раза выше, чем у молодых пациентов [130]. Относительная частота развития инсульта у пациентов моложе 65 лет – 0.5%, а для лиц 75-85 лет – 1.7% [131].

При высоком риске геморрагического инсульта тромболитическая терапия не проводится. Во всех остальных случаях польза от тромболиза превосходит риск данных осложнений: 36 спасенных жизней против 2 случаев инсульта на 1000 пациентов [132]. Частота внечерепных кровотечений различается в зависимости от исследования (различные критерии оценки). Большие кровотечения встречались у 0.5% больных при использовании стрептокиназы, малые кровотечения – у 3.5% (GISSI- 1 и ISIS-2) [133]. Частота нецеребральных малых кровотечений у пациентов, получавших производные ТРА – тенектеплазу и альтеплазу составила 25-30%, необходимость гемотрансфузий – 5% (ASSENT-2 [134]). Для коррекции гиперфибринолитического состояния применяется транексамовая кислота [135].

Реперфузия коронарной артерии зачастую сопровождается реперфузионными нарушениями проводимости и ритма, что ухудшает прогноз. По данным EMIP повышенная смертность в первые сутки развития ОИМ у пациентов получающих тромболитическую терапию связана с фибрилляцией желудочков, частота которой составила 5-10% [136].

Аллергические реакции характерны для терапии стрептокиназой и ее производными и встречаются у 2,3-4,4% (GISSI- 1 и ISIS-2). Факт аллергической реакции требует немедленного прекращения инфузии препарата.

Наиболее распространенным тромботическими осложнениями являются рестенозы коронарных артерий, феномен “no-reflow”, инфаркты мозга, ДВС [137]. В исследовании эффективности ТРА-терапии (J-АСТ) [137], из 103 пациентов, у семи наблюдались осложнения в виде мозгового инфаркта, у одного - случай ДВС синдрома, и один случай инфаркта миокарда. Феноменом “no-reflow” обозначается явление микроэмболизации периферического сосудистого русла фрагментами разрушенного сгустка. На ЭКГ это проявляется как отсутствие снижения сегмента ST, а на КАГ - как резкое замедление кровотока по пораженной артерии при устранении ее окклюзии. Феномен активации системы свертывания в период тромболитической терапии также отмечен в работе [138]. В данном исследовании отмечается повышение уровня фибринопептида А, являющегося маркером тромбина, у пациентов, проходящих тромболитическую терапию стрептокиназой, и получивших осложнения в виде реокклюзий сосудов разной степени тяжести.

1.5. Постановка задачи

Анализ современных исследований систем свертывания и фибринолиза крови показывает, что полное понимание всех составляющих их процессов все еще не достигнуто. Чем вызваны тромботические осложнения в период тромболитической терапии и каков механизм ретромбозов? От каких условий это зависит? От чего зависит скорость лизиса и какие реакции являются лимитирующими в данном процессе? Как происходит рост сгустка в ситуации наличия в плазме пациента высоких концентраций тромболитических препаратов?

Сложное взаимодействие реакций систем свертывания и фибринолиза в условиях диффузии, требует разработки экспериментальной системы оценки параметров роста и лизиса фибринового сгустка, учитывающей диффузионный компонент, а также использования математического моделирования.

Необходимо создание модели, обладающей следующими свойствами:

1) детально описывать биохимию свертывания и фибринолиза плазмы крови;

2) учитывать диффузию компонентов в жидкости;

3) согласовываться с экспериментальными данными.

Помимо этого, необходимо понимание, насколько разработанная экспериментальная модель отражает реальные процессы, происходящие в организме живого человека. Для этого был рассмотрен клинический случай *ex vivo* исследования пространственной динамики фибринолиза в плазме пациента, получавшего фибринолитическую терапию (Приложение 1), и сравнение этих данных с результатами *in vitro*.

2. Материалы и методы

2.1. Материалы

Стрептокиназа. Очищенный белок Streptokinase from hemolytic Streptococcus (PN S3134), активность >4200МЕ/мг, Sigma-Aldrich (Сент-Луис, США).

Урокиназа. Высокомолекулярная урокиназа, HMW-uPA, American Diagnostica (Стенфорд, США), M=52 кДа. Белок находился в буфере 50 мМ TRIS-HCl, 100 мМ NaCl, 0.1% PEG, 200 мМ Mannitol, pH 7.4.

Тканевый активатор плазминогена. В экспериментах использовался медицинский препарат “Актилизе” от Boehringer Ingelheim (Германия). 1 флакон содержит альтеплаза 50 мг (1 мл готового р-ра - алтеплаза 1 мг); вспомогательные вещества: L-аргинин (1.742 г/фл.), фосфорная кислота (536 мг/фл.), полисорбат 80 (менее 5 мг/флакон, менее 100 мкг/1 мл готового раствора).

Набор “Тромбодинамика”: HEPES, кукурузный ингибитор трипсина (КТИ), Ca(CH₃COO)₂, поверхность с иммобилизованным тканевым фактором от компании Гемакор (Москва, Россия). Человеческий рекомбинантный тканевый фактор (рекомбипластин 2G, Instrumentation Laboratory Company, Бедфорд, США) был иммобилизован на поверхность компанией Гемакор, методом, описанным в статье [139].

Гепарин: Нефракционированный гепарин, производитель Ферейн (Москва, Россия).

Активированный фактор XI: очищенный фактор, растворенный в 50% (по объему) смеси глицерол/H₂O, лот HСХIA-0160, Haematologic Technologies (Вермонт, США).

Фосфолипиды: Phospholipid-TGT, фосфолипидная эмульсия, содержащая смесь высокоочищенного фосфатидилхолина, фосфатидилсерина и сфингомиелина, PL604T, Rossix (Швеция).

Дефицитная по фактору IX плазма: FDP09-10, Precision biologic (Дартмут, Канада)

Дефицитная по фактору XI плазма: FRDP110125, Affinity biological (Анкастер, Канада)

Дефицитная по плазминогену плазма: PG-DP, Affinity biologicals (Анкастер, Канада)

Фактор IX: очищенный фактор IX, American Diagnostica inc (Стамфорд, США)

Плазминоген: Человеческий плазминоген, American Diagnostica inc (Стамфорд, США)

S299: MeSO₂-D-CHG-Gly-Arg-pNA.АсОН, флуорогенный субстрат на фактор IXa, American Diagnostica inc (Стамфорд, США)

VFK-СМК: H-D-Val-Phe-Lys-СМК, ингибитор плазмина, Calbiochem Chemicals inc (Сан-Диего, США)

Подготовка плазмы: Плазма была подготовлена из цельной крови здоровых добровольцев национальным медицинским исследовательским центром детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева (Москва, Россия). Кровь бралась в 4.5 мл пробирки (Greetmed, China) с 3.8% цитратом натрия в объемном соотношении кровь:антикоагулянт = 9:1. Кровь центрифугировалась при 100g в течение 5 минут для отделения эритроцитов от плазмы (богатая тромбоцитами плазма, PRP). После отделения от эритроцитов PRP плазма центрифугировалась на ускорении 10 000g в течение 5 минут для удаления тромбоцитов (свободная от тромбоцитов плазма, PFP). PRP разбавлялась PFP плазмой для получения итоговой концентрации тромбоцитов 300 тыс. кл./мкл.

Другая порция крови центрифугировалась при 1600g в течение 15 мин, забирался надосажок (бедная тромбоцитами плазма, PPP). После чего PPP плазма центрифугировалась при 10 000g в течение 5 минут для получения PFP плазмы. PPP и PFP были собраны в пул из 5 доноров и заморожены при -80С.

Клеточная культура: Клеточная линия фибробластов легких эмбриона человека была предоставлена НИИ вирусологии имени Д. И. Ивановского (Москва, Россия). Пленки полиэтилентерефталата с монослоем фибробластов

были получены по методу описанному ранее [140]. Плотность клеточного монослоя составляла 1000 кл/мм^2 , со стандартным отклонением, не превышающим 10% как для различных участков одной пленки, так и для различных пленок. Средняя плотность тканевого фактора на пленках измерялась с использованием набора Actichrome-TF (Sekisui Diagnostics, США), и она составляла $140 \pm 15 \text{ пмоль/м}^2$.

2.2. Пациент (данные М.Грачевой)

Мальчик, 1,5 года, с миеломоноцитарным лейкозом, осложненным катетер-ассоциированным тромбозом левой подвздошной вены. Пациент получал терапию ТРА $0,03 \text{ мг/кг/ч}$ с гепарином 10 МЕ/кг/ч . Подробное описание пациента приведено в Приложении 1.

2.3. Методы

Видеомикроскопия: Эксперименты по росту и лизису сгустка проводились с использованием системы видеомикроскопии, схема которой представлена на рисунке 9. Обработка изображений производилась с помощью приложения “Тромбодинамика” (ООО “Гемакор”), описанного в статьях [141, 142] с дополнениями в части расчета скорости волны фибринолиза. Плазма размораживалась при 37°C в течение 30 минут на водяной бане, после чего в плазму добавлялся раствор HEPES в конечной концентрации 30 мМ для стабилизации $\text{pH}=7.4$ и КТИ в конечной концентрации 0.2 мг/мл для предотвращения контактной активации свертывания. Образец инкубировался 15 минут при 37°C , после чего в него добавлялся активатор плазминогена (ТРА, УРА или SK) и проводилась рекальцификация плазмы путем добавления $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ в конечной концентрации 20 мМ. Полученный образец заливался в кювету, в которую вставлялась пластинка с иммобилизованным тканевым фактором, запускавшим свертывание. Кювета с растущим сгустком освещалась красным светодиодом с длиной волны 625 нм. При образовании сгустка плазма переходила из жидкого в гелеобразное состояние, вследствие чего изменялась ее

интенсивность светорассеяния. Сигнал светорассеяния попадал на матрицу видеокамеры, оцифровывался и передавался на компьютер для обработки.

После помещения активатора в кювету, программе “Тромбодинамика” давалась команда начала съемки, далее, каждые 15 секунд программа сохраняла изображение на жесткий диск (выдержка составляет 50 мсек).

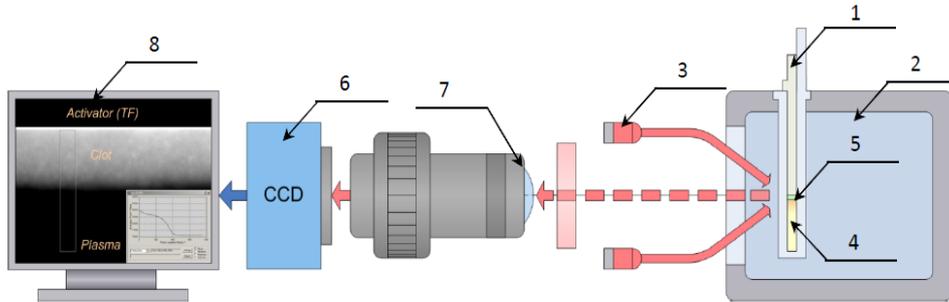


Рисунок 9. Схема установки: Система состоит из кюветы (1), которая помещается в воду, находящуюся в прозрачном термостатируемом контейнере при 37°C (2), и освещается сбоку светодиодами длиной волны 625нм (3). Изображение исследуемой области контакта плазмы (4) с активатором (5) фокусируется на матрице видеокамеры (6) при помощи фотообъектива (7). Оцифрованное изображение передается на компьютер (8).

Обработка данных: В результате эксперимента был получен набор фотографий фибринового сгустка (рисунок 10). Как было показано ранее [143], интенсивность рассеянного сигнала прямо пропорциональна концентрации фибрина, вследствие чего мы могли рассматривать интенсивность сигнала как относительную концентрацию фибрина. Поскольку светорассеяние зависит также от толщины фибринового волокна [144], которая, в свою очередь зависит от концентрации тромбина, мы можем предположить, что в нашей экспериментальной системе структура сгустка фибрина являлась однородной, т.к. распространяющаяся автоволна тромбина имеет постоянную пиковую концентрацию 50 нМ [8], вследствие чего сигнал светорассеяния зависит, в основном, только от концентрации фибрина. Сигнал светорассеяния в исследуемой области усреднялся в горизонтальном направлении (60-80 пикселей в ширину) (рисунок 10 А1, желтый прямоугольник), что позволяло перейти к одномерной зависимости сигнала от вертикальной координаты для каждого момента времени (рисунок 10 А4 и Б4). Первый профиль светорассеяния считается фоновым и вычитается из всех последующих профилей. Был введен

пороговый уровень сигнала, выше которого считали сгусток в заданной области сформированным. Как только в какой-либо области данный порог был превышен, мы считали, что там появился сгусток, и когда уровень сигнала уменьшался ниже этого порога, мы считали, что сгусток растворился. Были определены координаты этих двух событий для каждого момента и построены их зависимости от времени (рисунок 10 А5 и Б5) для оценки времени задержки свертывания (лизиса), и скорости роста и лизиса сгустка. Время задержки свертывания (лизиса) определяли, как время, прошедшее с момента активации коагуляции до момента, когда фронт роста (лизиса) сгустка начал двигаться. На рисунке 10 показано, что скорость распространения фронта роста (лизиса) сгустка со временем уменьшается. Для оценки скорости использовалось линейное приближение скорости для первых пяти минут с момента начала роста (лизиса) сгустка. Были проведены сравнения различных пороговых уровней сигнала (10% -50% от максимального, приложение 2, рисунок Б) и получены согласующиеся результаты. В качестве порогового был выбран уровень сигнала, составляющий 20% от максимального, который и был использован при обработке полученных данных.

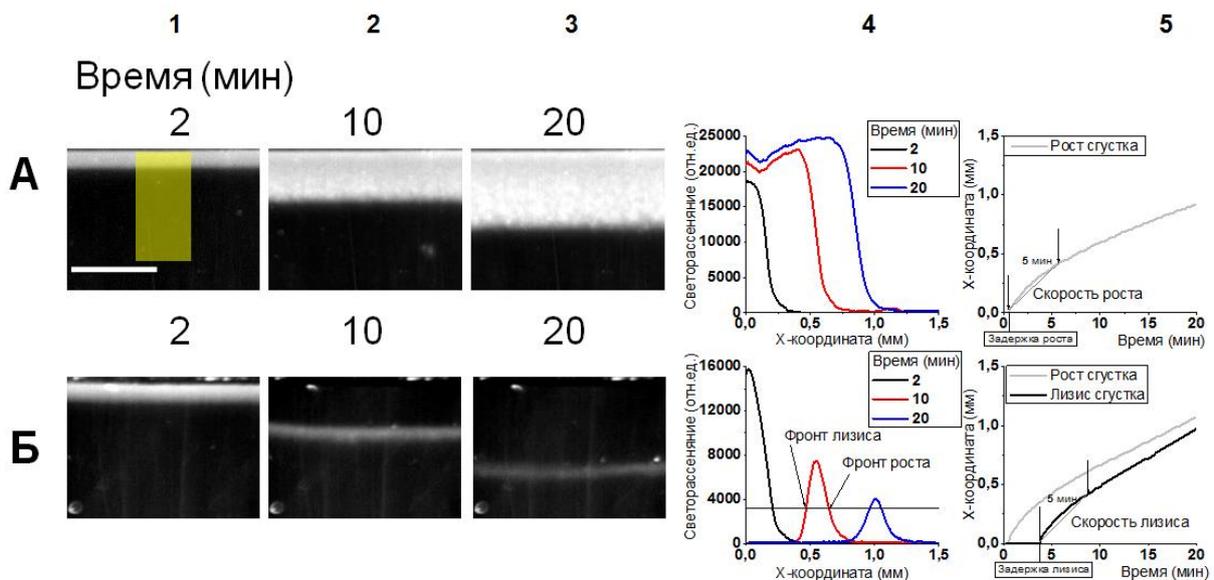


Рисунок 10. (А) Фотографии роста фибринового сгустка в отсутствие активаторов плазминогена через различное время после запуска свертывания: А1 – 2, А2 – 10 и А3 – 20 минут. (Б) Аналогичные фотографии в случае добавления ТРА 30 нМ. Желтый прямоугольник на панели А1 – область обработки экспериментальных данных по

светорассеянию. Полоса масштаба 1 мм. На рисунке А4 показано пространственное распределение фибрина в отсутствие активатора плазминогена. На рисунке Б4 - распределение в присутствии ТРА 30 нМ. Черные, красные и синие линии показывают пространственное распределение сигнала светорассеяния (пропорционален концентрации фибрина) на 2-й, 10-й и 20-й минуте после запуска свертывания, соответственно. Как только в какой-либо области сигнал превышал пороговый уровень, мы считали, что там появился сгусток, и когда уровень сигнала уменьшался ниже порога, считали, что сгусток растворился. Координаты этих событий обозначены как фронты роста и лизиса сгустка. Зависимость координаты фронта роста сгустка (А5) и фронтов роста и лизиса сгустка (Б5) от времени позволяет рассчитать скорости роста (лизиса) сгустка в виде средней скорости роста (лизиса) сгустка в течение первых 5 минут с момента начала процесса. Использовалось линейное приближение скорости для первых пяти минут с момента начала роста (лизиса) сгустка. Время задержки свертывания (лизиса) рассчитывалось как время с момента вставки активатора, до момента, когда координата фронта свертывания (лизиса) начинала увеличиваться.

Статистический анализ экспериментальных данных: Использовался U-критерий Манна-Уитни с уровнем ошибки $p = 0,05$ для оценки различий между независимыми выборками.

Компьютерная модель роста и лизиса фибринового сгустка: Была разработана компьютерная модель, описывающая процесс образования и лизиса фибринового сгустка. Общая схема модели отображена на рисунке 11. Моделирование проводилось в одномерной области длиной 3 мм с помощью программы Comsol 4.3 (Берлингтон, США). Рост сгустка был инициирован тканевым фактором, расположенным в точке $x = 0$. ТРА был равномерно распределен на всей области моделирования (приложение 2, рисунок Д). При расчете схемы (рисунок 11) использовались уравнения Михаэлиса, связывающего скорость реакции, катализируемой ферментом, от концентрации субстрата. Подробное описание модельных уравнений можно найти в приложении 3 (уравнения S1-S58). Большинство параметров модели было взято из экспериментальных данных приведенных в таблицах А и Б в приложении 3.

Коагуляционная часть была основана на компьютерной модели одномерного пространственного роста сгустка, разработанной в лаборатории физической биохимии системы крови НМИЦ гематологии и описанной в работах ранее [14, 18, 145]. Данная часть включала в себя несколько различных модулей: а) связывание/диссоциацию VII/VIIa с TF, активацию VII; б) активацию X и IX посредством VIIa-TF; в) активацию II с помощью Xa; д) активацию петель

обратной связи V и VIII, и XI тромбином; е) усиленную активацию IX, X, II с помощью XIa, IXa-VIIIa, Xa-Va соответственно; ф) действия всех основных стехиометрических ингибиторов и отрицательную обратную связь пути протеина C, который ингибировал активные факторы Va и VIIIa. Переменными в модели были концентрации факторов VIIa, VII, IXa, IX, Xa, X, IIa, II, VIIIa, VIII, Va, V, XIa, XI, зимогена протеина C, активной формы протеина C, Xa-TFPI, TFPI, AT-III, фибриноген, фибрин. Для моделирования активации свертывания от поверхности, мы использовали поверхностные плотности TF, VIIa-TF и VII-TF и связывали поверхностные и объемные реакции при помощи граничных условий.

«Фибринолитическая» часть модели совершенно новая. В модель были введены переменные концентрации TPA, плазминогена в глы- и лиз-формах, плазмينا, в свободной, а также, в связанной с фибрином форме. Также были введены концентрации α 2-макроглобулина, α 2-антиплазмина и PAI-1. Фибринолиз инициировался связыванием плазминогена и TPA с фибрином, что приводило к образованию плазмина и деградации фибрина.

Основные допущения модели: а) равновесное связывание всех мембранных комплексов [146]; б) тромбоцитарные микрочастицы и липопротеины обеспечивают большую часть площадей мембранных поверхностей в плазме [147]; в) отсутствие обратной связи образования двухцепочечной TPA; г) образование и разрушение фибрина считаются простыми одностадийными реакциями; е) мы не рассматривали активацию тромбин активируемого ингибитора фибринолиза (TAFI), и фактор XIII-зависимые реакции прямого действия.

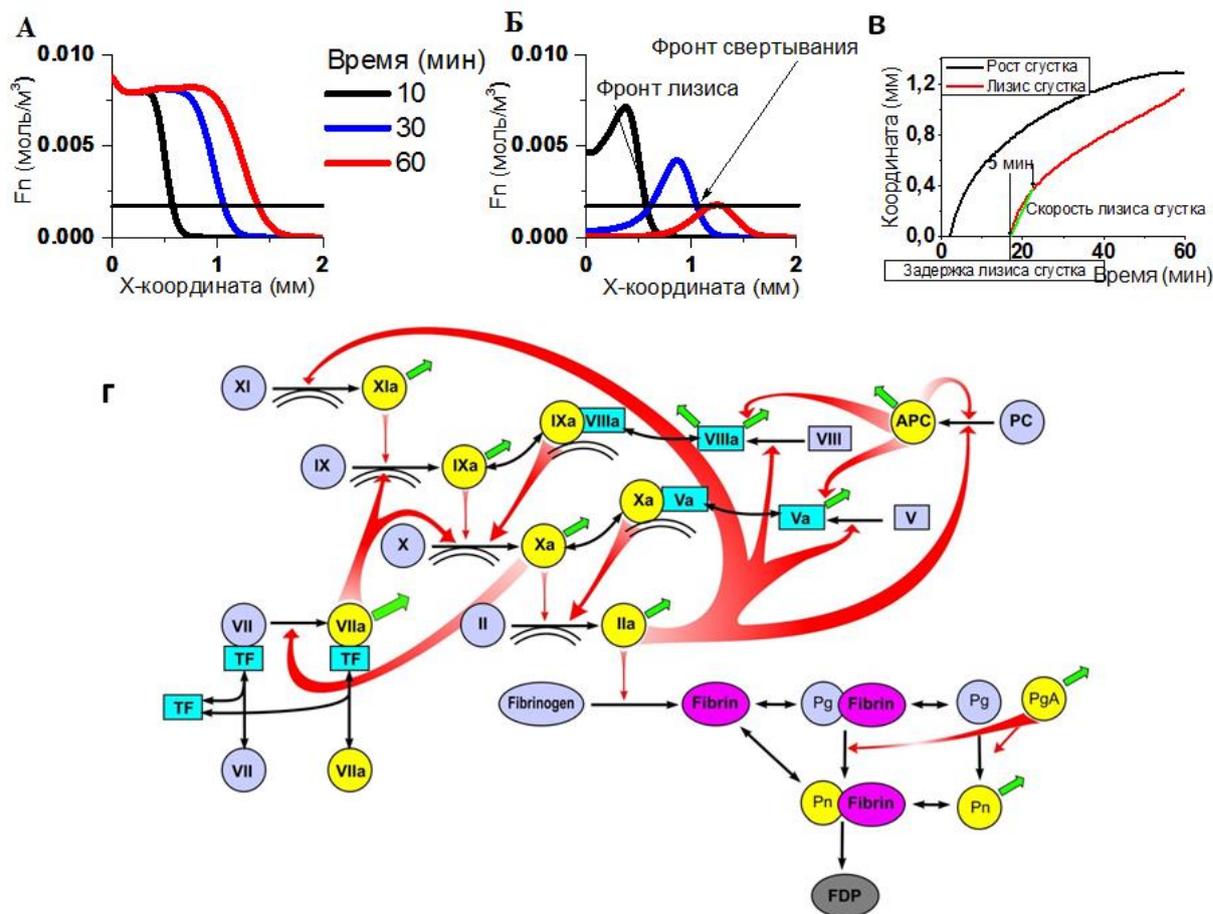


Рисунок 11. Пространственная кинетика генерации фибрина в отсутствие (А) и в присутствии (Б) ТРА в концентрации 50 нМ. Распределение фибрина в пространстве показано для 10-й (черная линия), 30-й (синяя линия) и 60-й (красная линия) минут симуляции. (В) Зависимость координаты фронта роста/лизиса сгустка от времени. (Г) Схема каскада свертывания крови, основные реакции. Зимогены изображены в виде синих кругов, активированные белки показаны желтыми кругами. Неактивные кофакторы показаны как синие прямоугольники, активированные кофакторы - как голубые прямоугольники. Красные стрелки показывают активацию, черные стрелки показывают переход от неактивной к активной форме и формирование комплексов. Зеленые стрелки показывают ингибирование. Двойная дуга - поверхность фосфолипидов, которая необходима для образования и активации комплексов. P_gA - активатор плазминогена; FDP - продукты деградации фибрина.

Типичное уравнение поверхностных реакций для ТФ-иницированного свертывания крови:

$$\frac{d\sigma_{VII-TF}}{dt} = \left(k_a^{VII,TF} \cdot [VII] \cdot \sigma_{TF} - k_d^{VII-TF} \cdot \sigma_{VII-TF}^F \right) + \frac{k_{cat}^{VII-TF,IIa} \cdot \sigma_{VII-TF} \cdot [IIa^F]_{x=0}}{K_M^{VII-TF,IIa} + [IIa^F]_{x=0}} - k_{eff}^{VII-TF,Xa} \cdot \sigma_{VII-TF} \cdot [Xa^F]_{x=0};$$

Слева показано изменение концентрации неактивной внешней теназы σ_{VII-TF} со временем. Согласно уравнению, она определяется двумя способами: 1) ассоциация и диссоциация TF с FVII (первое и второе слагаемые); 2) активация неактивной внешней теназы тромбином (третий член) и FXa (четвертый член).

Типичное уравнение объемных реакций:

$$\frac{\partial[TPA]}{\partial t} = D_{TPA} \cdot \frac{\partial^2[TPA]}{\partial x^2} - k_i^{TPA, PAI1} \cdot [TPA] \cdot [PAI1] - k_a^{TPA, Fn} \cdot [TPA] \cdot ([Fn] - [TPA_B]) + k_d^{TPA_B} \cdot [TPA_B]$$

Слева показано изменение концентрации TPA со временем. Согласно уравнению, она определяется тремя процессами: 1) диффузией TPA (первое слагаемое); 2) ингибированием TPA PAI-1 (второе слагаемое); 3) ассоциацией и диссоциацией TPA с фибрином (третий и четвертый члены).

Поверхностные реакции генерируют поток активированных факторов, который задается как граничное условие для объемных реакций. Основываясь на известных концентрациях всех участников данных реакций в заданный момент времени и на кинетических константах, мы можем вычислить дальнейшую динамику коагуляции с использованием набора уравнений (приложение 3).

3. Результаты

3.1. Пространственный лизис фибринового сгустка в присутствии активатора плазминогена начинается с области активации свертывания

Пространственная динамика образования сгустков в плазме у здоровых добровольцев [148, 149], пациентов с гемофилией А [148], сепсисом [141] показала, что в течение эксперимента (1 час) при отсутствии активаторов плазминогена, лизиса сгустка не происходит.

Рост сгустка *ex vivo* в PFP плазме у пациента (Приложение 1), получающего фибринолитическую терапию рекомбинантным ТРА (“Актилизе” от Boehringer Ingelheim) сопровождался одновременным лизисом: фронт лизиса образуется в области активации свертывания и следует за фронтом роста сгустка (рисунок 12 А).

Дизайн нашего эксперимента моделировал ситуацию, когда свертывание и лизис активировались в плазме одновременно. Мы попытались это реализовать в простой и воспроизводимой модели пространственного лизиса сгустка, в которой мы можем ставить любые начальные условия. Мы наблюдали фибринолиз в PFP плазме у пациента, получавшего ТРА-терапию, а также у здоровых добровольцев, добавляя в плазму ТРА *in vitro* (рисунок 12 Б).

Для исследования явления в условиях более близких к физиологичным, были также проведены эксперименты в богатой тромбоцитами плазме (PRP, 300 тыс. тромбоцитов/мкл, рисунок 12 В). Была обнаружена аналогичная картина пространственного лизиса сгустка, хотя скорости роста сгустка и распространения волны лизиса были приблизительно в 2 раза выше, а время задержки лизиса 2 раза ниже, чем для PFP (115±9 мкм/мин, 8±1 мин для PRP и 63±5 мкм/мин, 17,2±2,1 мин для PFP соответственно). В качестве активатора свертывания в работе использовался TF, ковалентно пришитый к поверхности

вставки. Чтобы показать, что наблюдаемые эффекты сохраняются при использовании ТФ на поверхности клеток, были использованы фибробласты. Такое моделирование применяется не впервые [6]. В экспериментах активации свертывания в PFP конфлюэнтным слоем фибробластов (рисунок 12 Г) наблюдалась аналогичная картина пространственного лизиса. Такой же результат был в PRP, в которой свертывание активировалось фибробластами (приложение 2, рисунок В). Исходя из полученных данных, все дальнейшие исследования проводились в PFP с активацией свертывания иммобилизованным ТФ, поскольку данная постановка была наиболее простой и воспроизводимой.

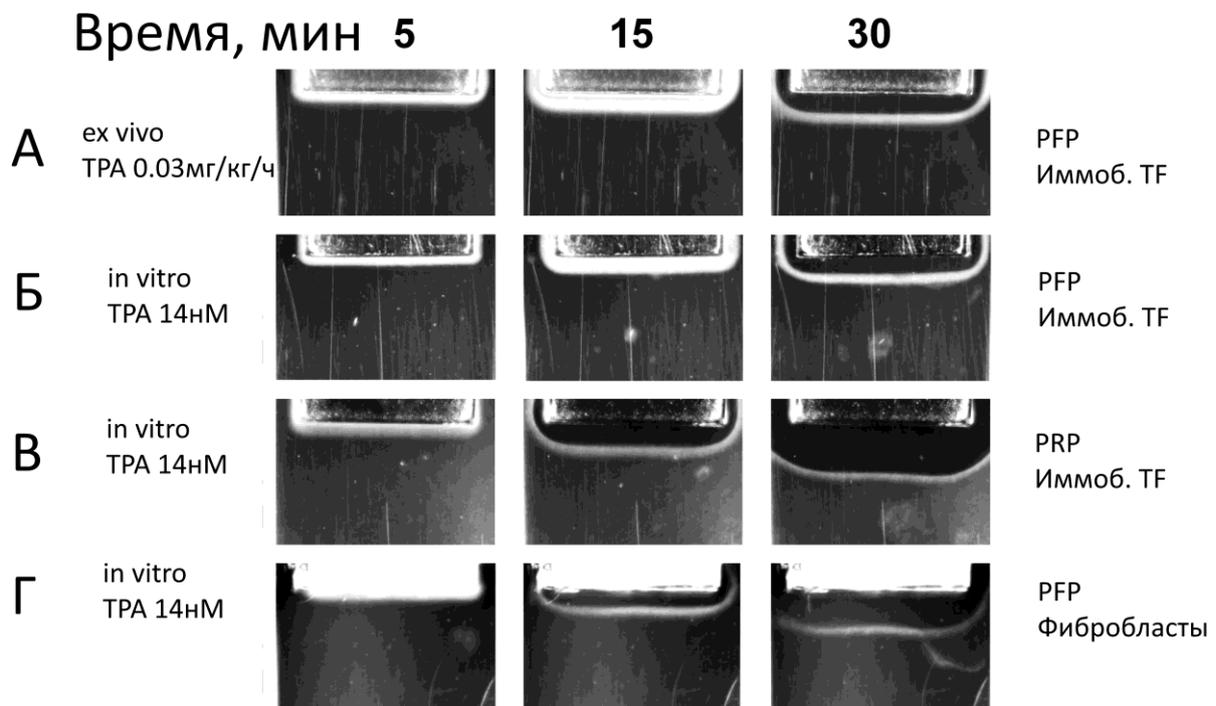


Рисунок 12. Фотографии роста и лизиса фибринового сгустка в плазме крови через 5, 15 и 30 минут после начала эксперимента. Серый прямоугольник в верхней части каждого изображения - вставка с иммобилизованным ТФ. Фибрин - белый, жидкая плазма - черная/темно-серая. (А) PFP пациента, получавшего ТРА-терапию 0,03 мг/кг/ч. (Б) Пул PFP здоровых добровольцев, с добавлением ТРА 14 нМ *in vitro*. (В) Пул PRP здоровых добровольцев, с добавлением ТРА 14 нМ *in vitro*. (Г) Пул PFP здоровых добровольцев, с добавлением ТРА 14 нМ *in vitro*, свертывание запускалось с помощью монослоя фибробластов на пластинке, содержащих ТФ. Рост и лизис сгустка наблюдался в плазме, подготовленной по протоколу, описанному в разделе «Методы». Показаны характерные эксперименты.

3.2. Характеристика пространственного роста и лизиса сгустка

Рост фибринового сгустка в отсутствии активаторов плазминогена в плазме начинался вблизи пластинки с иммобилизованным тканевым фактором и

распространялся по объему плазмы (рисунок 10 А1-А3). На рисунке 10 А4 показана зависимость интенсивности светорассеяния сгустка фибрина от расстояния до активирующей поверхности. Рост сгустка характеризуется крутым фронтом изменения интенсивности сигнала, который движется во времени с постепенно уменьшающейся скоростью (рисунок 10 А5). В присутствии ТРА в концентрации 30 нМ (рисунок 10 Б1-Б3) рост сгустка начался аналогичным образом, но после определенного времени происходило уменьшение сигнала светорассеяния, которое начиналось с той же области старта роста сгустка и распространялось в том же направлении. Для характеристики начала свертывания и лизиса использовались параметры времени задержки (см. Материалы и методы); а также параметры скорости свертывания и лизиса для описания пространственного аспекта процесса.

3.3. Три типа волны лизиса сгустка

Для исследования зависимости параметров пространственного лизиса сгустка от концентрации тромболитического препарата в плазме, исследовалась зависимость скорости и времени задержки лизиса от концентрации ТРА. Было обнаружено, что в зависимости от концентрации ТРА, лизис может происходить по 3-м сценариям:

- 1) Лизис сгустка начинается на расстоянии около 200 мкм от активатора свертывания. Из данной области начинают распространяться в противоположных направлениях два фронта лизиса (ТРА 6 нМ (рисунок 13 А)). Для концентрации ТРА 6 нМ, данное событие происходило в 100% случаев (n=4), для 14 нМ – 73% (n=19), для 30 нМ – 11% (n=18). Для концентраций ТРА выше 30 нМ лизирование сгустка всегда начиналось с поверхности, несущей ТФ.
- 2) Лизис сгустка начинался с поверхности, несущей ТФ, фронт лизиса двигался за фронтом свертывания, сгусток полностью растворялся (ТРА 100 нМ (рисунок 13 Б));

3) Лизис сгустка начинался с поверхности, несущей ТФ, и, через некоторое время, останавливался, в то время как рост сгустка продолжался (ТРА 800 нМ (рисунок 13 С)). С помощью компьютерного моделирования (приложение 3) показано, что снижение фибринолитической активности при высоких концентрациях ТРА связано с ингибированием свободного плазмина и снижением концентрации плазминогена.

3.4. Пространственный лизис сгустка в присутствии различных тромболитических препаратов

Концентрации активаторов плазминогена были выбраны в диапазонах, соответствующих концентрациям, используемым при фибринолитической терапии (ТРА 50 нМ (60 нМ для острого инфаркта миокарда [150]), УРА 30 нМ (180 МЕ/мл [151]), СК 1200 нМ (200 МЕ/мл [152])).

Схема распространения фронта лизиса сгустка для УРА (рисунок 14 А) была аналогична картине для низкой концентрации ТРА (рисунок 13 А): фронт лизиса образовывался примерно в 100 мкм от поверхности, несущей ТФ, и фиксировалось два фронта лизиса, распространяющихся в сторону активатора свертывания крови и от него. Данный результат может быть объяснен тем, что одноцепочечный УРА, использовавшийся в экспериментах, имел ограниченную активность в отношении плазминогена. Тип волны лизиса сгустка для СК (рисунок 14 Б) был аналогичен типу для экспериментов с высокой концентрацией ТРА (рисунок 13 В): лизис прекращался на некотором расстоянии от активатора свертывания крови, в то время как рост сгустка продолжался.

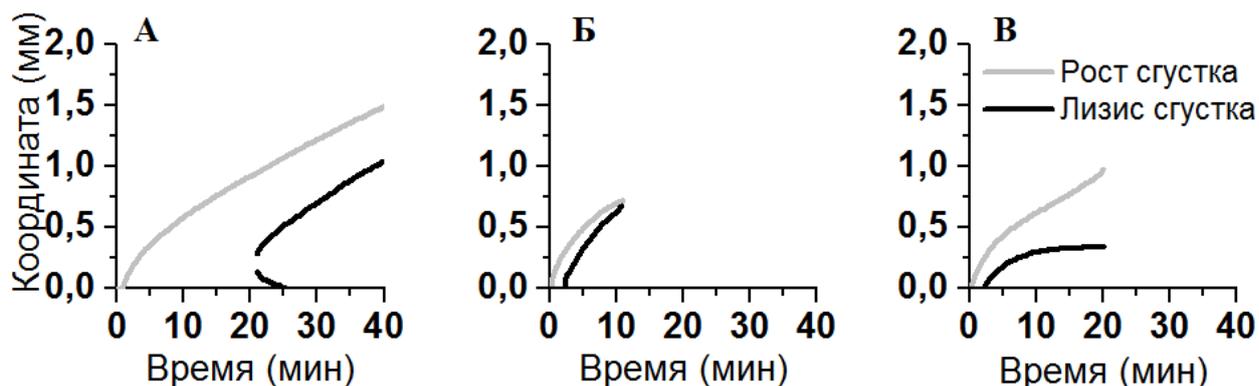


Рисунок 13. Три типа волны лизиса сгустка. Зависимость координат фронтов свертывания и лизиса от времени. Пул PFP здоровых доноров, с добавлением ТРА в различных концентрациях. Лизис сгустка начинался на расстоянии 200 мкм от поверхности активации свертывания крови в присутствии ТРА 6 нМ (А); полное растворение тромба наблюдалось в присутствии ТРА 100 нМ (Б); пространственный лизис сгустка останавливался на расстоянии 300 мкм от поверхности активации свертывания в присутствии ТРА 800 нМ (В). Эксперименты проводились на свежемороженом пуле плазмы в соответствии с протоколом, описанным в разделе “Материалы и методы”. Показаны характерные эксперименты.

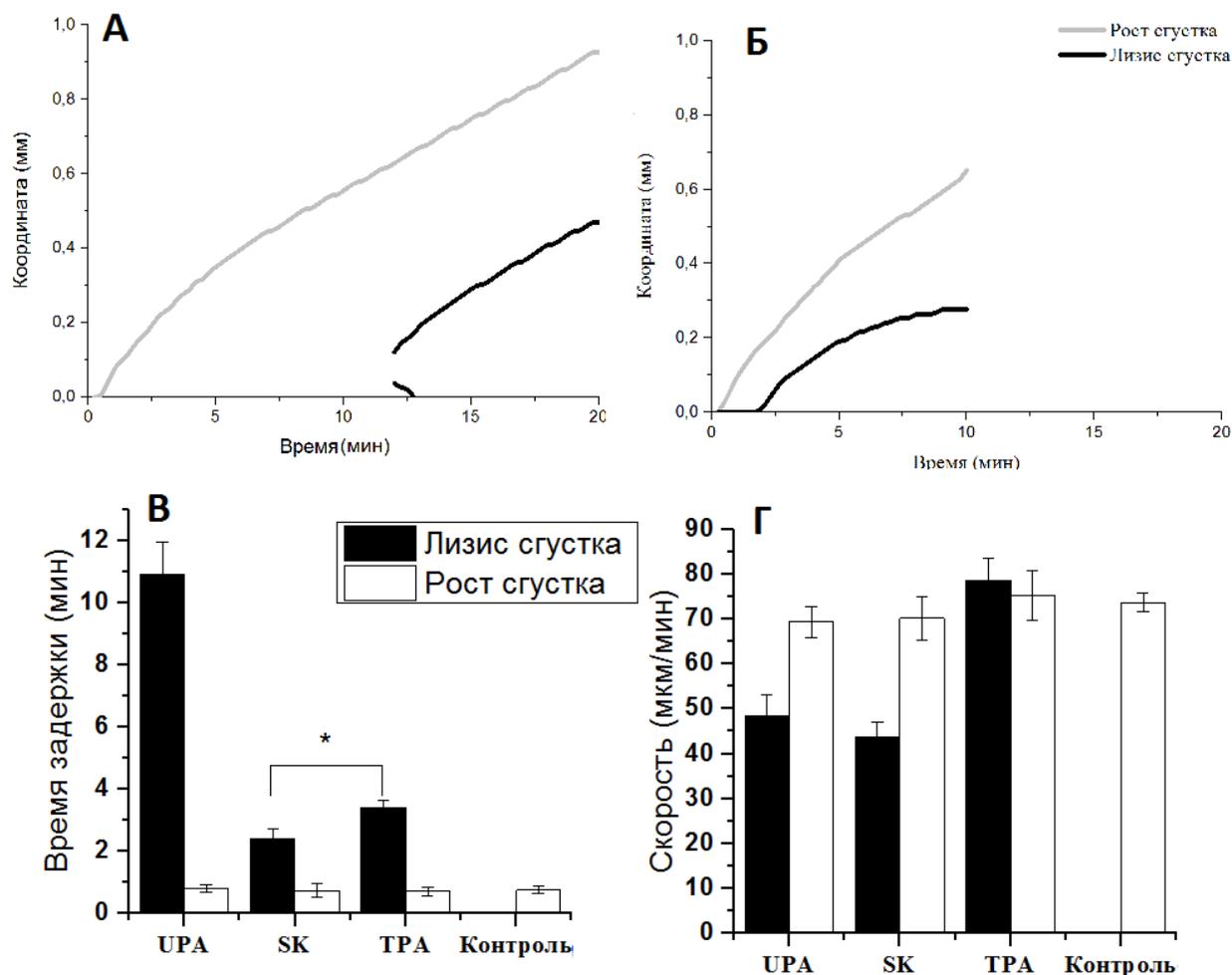


Рисунок 14. Пространственный лизис сгустка в присутствии 30 нМ UPA (А) и 1200 нМ SK (Б). Время задержки и скорость волны лизиса сгустка зависят от типа активатора

плазминогена, в то время как параметры роста сгустка не имеют значительных отличий от контроля. Время задержки лизиса (В) статистически значимо ($p < 0,05$) различалось для разных активаторов плазминогена ($2,4 \pm 0,3$ мин для СК, $3,4 \pm 0,2$ мин для ТРА и 11 ± 1 мин для УРА). Скорость волны лизиса (Г) была примерно одинаковой для УРА (48 ± 4 мкм/мин) и СК (44 ± 3 мкм/мин), и была примерно в 1,5 раза выше для ТРА (78 ± 5 мкм/мин). Время задержки и скорость роста сгустка существенно не отличались от контроля (74 ± 2 мкм/мин и $0,77 \pm 0,14$ мин соответственно). Эксперименты по росту и лизису сгустка проводились в свежемороженой PFP, подготовленной в соответствии с протоколом, описанным в разделе «Методы», дополненной активатором лизиса (контроль, $n = 7$), ТРА 50 нМ ($n = 9$), УРА 30 нМ ($n = 7$) или СК 1200 нМ ($n = 7$).

В плазме, в которую были добавлены СК или УРА, фибриновые сгустки образовывались точно так же, как и в контрольном эксперименте. Существенных различий в скорости роста сгустка или времени задержки между различными типами активаторов плазминогена (табл. 4, рисунок 14 В и Г) не выявлено. Время задержки лизиса сгустка составляло $2,4 \pm 0,3$ мин для СК, $3,4 \pm 0,2$ мин для ТРА и 11 ± 1 мин для УРА. Скорость пространственного лизиса сгустка составила $43,7 \pm 3,2$ мкм/мин для СК, $48,4 \pm 4,7$ мкм/мин для УРА (без существенной разницы), хотя для ТРА скорость была значительно выше: $78,7 \pm 4,8$ мкм/мин.

Активатор лизиса	Рост сгустка		Лизис сгустка	
	Время задержки (мин)	Скорость (мкм/мин)	Время задержки (мин)	Скорость (мкм/мин)
Отсутствует	0.8 ± 0.1	73.6 ± 2.1	-	-
УРА (30 нМ)	0.8 ± 0.1	69.4 ± 3.5	11 ± 1	48.4 ± 4.7
СК (1200 нМ)	0.7 ± 0.2	70.1 ± 4.9	2.4 ± 0.3	43.7 ± 3.2
ТРА (6 нМ)	0.7 ± 0.1	73.9 ± 4.2	22.3 ± 1.8	55.3 ± 3.4
ТРА (50 нМ)	0.7 ± 0.1	75.2 ± 5.6	3.4 ± 0.2	78.7 ± 4.8
ТРА (200 нМ)	0.6 ± 0.1	78 ± 3	2.0 ± 0.2	77.3 ± 4.4
ТРА (800 нМ)	0.7 ± 0.1	76.6 ± 4.3	2.5 ± 0.4	41.2 ± 5.6

Таблица 4. Значения параметров роста и лизиса сгустка в отсутствии и присутствии тромболитических препаратов.

Таким образом, варьируя концентрации ТРА, можно получить различные типы волн лизиса. А результаты экспериментов с СК и УРА укладываются в режимы, получаемые в экспериментах с ТРА. В то же время, терапевтические концентрации УРА в данных экспериментах соответствуют “низким” концентрациям ТРА, в то время как СК – “высоким”.

3.5. Концентрация ТРА определяет начало лизиса и его скорость

Время задержки роста сгустка существенно не менялось с увеличением концентрации ТРА (табл. 4, рисунок 15 А). Скорость роста сгустка составляла 73 - 78 мкм/мин в диапазоне концентраций ТРА 0-800 нМ (без существенной разницы) (табл. 4, рисунок 15 Б). Таким образом, концентрация ТРА не влияет на начало свертывания.

Время задержки лизиса сгустка уменьшилось с 22 ± 2 мин при ТРА 6 нМ до $2,0 \pm 0,2$ мин для ТРА 200 нМ и немного увеличилось до $2,5 \pm 0,4$ мин при ТРА 800 нМ (рисунок 15 А). Пространственная скорость лизиса сгустка увеличилась с 55 ± 3 мкм/мин при ТРА 6 нМ до 75 - 78 мкм/мин для диапазона концентрации ТРА от 30 до 200 нМ и уменьшилась до 41 ± 5 мкм/мин при ТРА 800 нМ (рисунок 15 Б).

3.6. Компьютерное моделирование роста и лизиса сгустка в пространстве

Сравнение пространственной динамики образования фибрина в присутствии ТРА *in vitro* с моделью, разработанной в лаборатории, показало, в целом, схожие результаты – фиксировалась волна лизиса, бегущая за волной свертывания, при росте концентрации ТРА лизис усиливается, затем начинает спадать, тогда как на свертывание существенного влияния не наблюдается (рисунок 15). В то же время, имеются некоторые различия, а именно: в экспериментах *in silico* лизис всегда стартовал с области активации свертывания, время задержки свертывания составляло 2,5 минуты ($0,77 \pm 0,14$ мин *in vitro*), а скорость роста сгустка составляла 77 мкм/мин (74 ± 2 мкм/мин *in vitro*). Это может означать, что модель инициации свертывания крови, реализованная ранее, требует улучшения. Кроме того, необходимо отметить, что, поскольку коммерчески доступный иммобилизованный ТФ был недостаточно охарактеризован, точные константы реакций активации фактора X внешней теназой, константы ассоциации/диссоциации фактора VII(a) с ТФ могут отличаться от тех, которые были получены из литературы. В экспериментах *in*

in silico скорость лизиса сгустка при низких и высоких концентрациях ТРА хорошо коррелирует с результатами экспериментов *in vitro*, но для концентраций ТРА порядка десятков нМ выраженного увеличения скорости не наблюдается. Тем не менее, данные несоответствия в результатах *in silico* и *in vitro* оказали минимальное влияние на предмет данной работы – основные зависимости скоростей и времен задержек от концентрации тромболитического препарата, в случаях *in silico* и *in vitro* качественно совпадают.

Нами было обнаружено, что системы свертывания и лизиса в плазме, дополненной активатором плазминогена, генерируют две волны, которые переводят плазму из жидкого состояния в твердое (гелеобразное), и обратно в жидкость (приложение 3, рисунок Е). Волна тромбина, стартовавшая от активатора, вызывала образование фибрина и переводила плазму в гелеобразное состояние. Волна плазмина вызывала деградацию фибрина, и переводила плазму в жидкое состояние. Сигнал инициации (TF) находился на границе области, и, волны свертывания и лизиса распространялись самоподдерживающимся образом, что означало, что плазма, с добавленным активатором плазминогена, была активной средой, поддерживающей два разных автоволновых режима.

Компьютерное моделирование (рисунок 15 А и Б) показало высокую корреляцию с экспериментальными данными. Время задержки лизиса сократилось с 74,5 мин для ТРА 4,5 нМ до 13 мин для ТРА 400 нМ и увеличилось до 19,5 мин для ТРА 1600 нМ (рисунок 15 А), показав аналогичную зависимость, что и в экспериментах *in vitro*. Скорость распространения волны лизиса сгустка увеличилась с 50 мкм/мин для ТРА 4,5 нМ до 60 мкм/мин для ТРА 15 нМ, незначительно снижаясь в диапазоне концентраций ТРА 15 - 400 нМ. Скорость лизиса уменьшалась до 24 мкм/мин для ТРА 1600 нМ.

Отключение в модели активации свободного плазминогена тканевым активатором (пунктирная линия) устраняло увеличение времени задержки и падение скорости лизиса при высоких концентрациях ТРА.

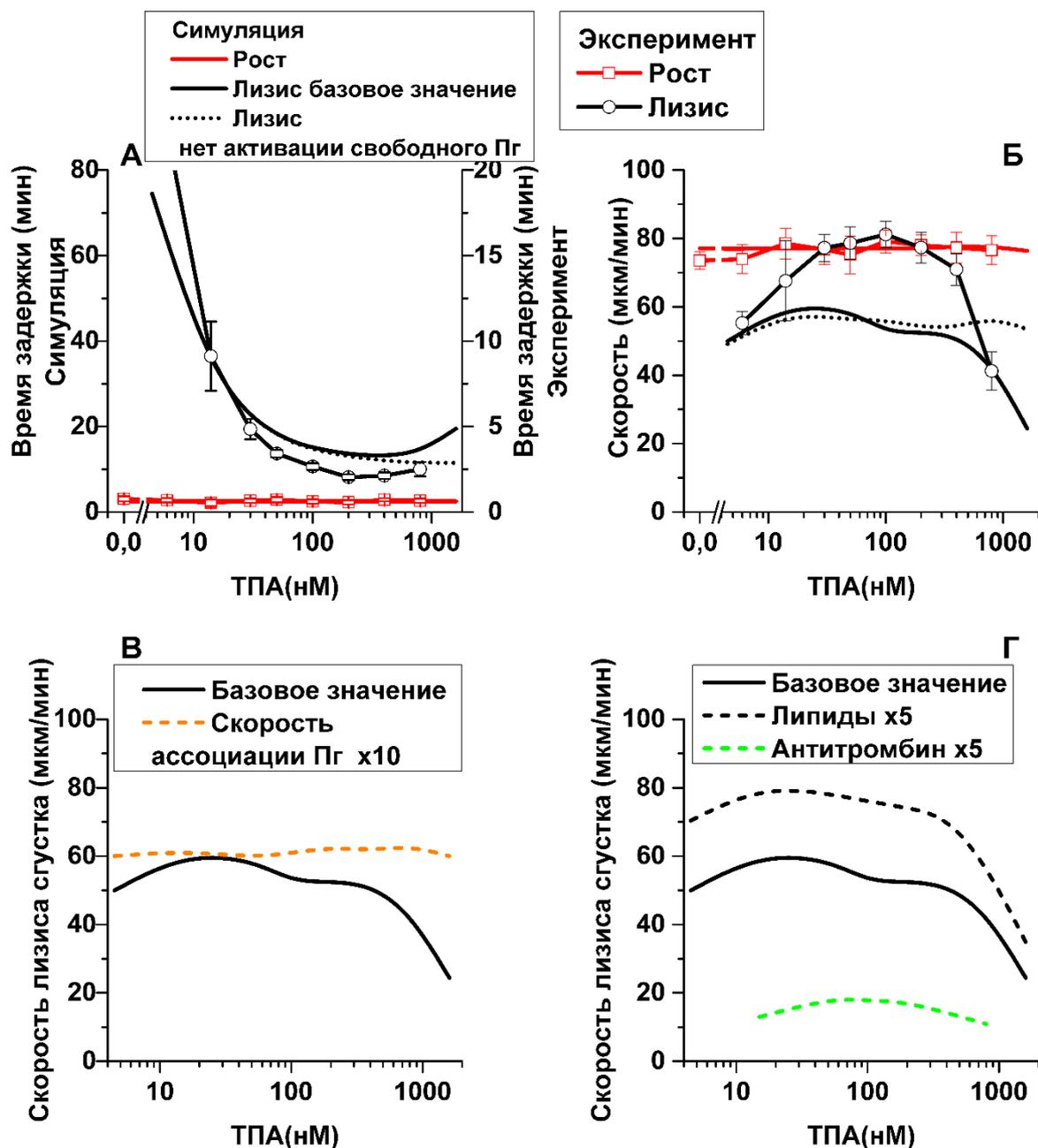


Рисунок 15. Зависимость времени задержки и скоростей роста и лизиса сгустка от концентрации ТРА. (А) Время задержки *in silico* (сплошные линии) было примерно в 4 раза выше, чем в эксперименте (линии с точками), как для роста сгустка (красные), так и для лизиса (черные). (Б) Скорость роста и лизиса сгустка. (В) Десятикратное увеличение (оранжевая пунктирная линия) скорости связывания плазминогена с фибрином показало, что скорость лизиса сгустка нечувствительна к концентрации ТРА. Десятикратное уменьшение скорости связывания плазминогена с фибрином останавливает лизис. (Г) Изменения в прокоагулянтном состоянии плазмы: добавление антитромбина III (увеличение в 5 раз по сравнению с базовым значением, зеленая пунктирная линия), или фосфолипидов (увеличение в 5 раз по сравнению с базовым значением, черная пунктирная линия). PFP плазма (панели А и Б), дополненная ТРА в различных концентрациях (n = 4 - 11).

3.7. Скорости фибринолитических реакций оказывают незначительное влияние на скорость пространственного лизиса

С помощью компьютерного моделирования были исследованы механизмы, регулирующие скорость распространения волны лизиса. В модель были включены следующие реакции: 1) активация плазминогена; 2) деградация фибрина; 3) связывание плазмина с фибрином; 4) ингибирование плазмина; 5) связывание плазминогена с фибрином. Для определения лимитирующих реакций производились увеличения и уменьшения скоростей различных реакций в десять раз. Изменение скорости распространения волны лизиса не превышало 5% в случаях модификации параметров реакций активации плазминогена (реакция 1), деградации фибрина (реакция 2), связывания плазмина с фибрином (реакция 3) и ингибирования плазмина (реакция 4) (приложение 3 рисунок Ж). При изменении значения скорости связывания плазминогена с фибрином, было обнаружено, что уменьшение скорости связывания вызывает прекращение лизиса (лизис не наблюдается в течение 90 минут эксперимента). Увеличение значения данного параметра (рисунок 15 В, пунктирная оранжевая линия) делало скорость распространения лизиса нечувствительной к изменению концентрации ТРА. Подавление пространственного лизиса сгустка (увеличение времени задержки и снижение скорости распространения волны лизиса) наблюдалось как *in vitro*, так и *in silico*. *In silico* эксперимент показал, что высокая концентрация ТРА может вызвать активацию плазминогена во всей области моделирования, что приводит к снижению концентрации плазминогена (приложение 3 рисунок З). Это происходит потому, что ТРА может активировать свободный, не связанная с фибрином, плазминоген (как с Glu, так и с Lys-формы). В течение 60 минут моделирования 50 нМ ТРА активировало около 10% плазминогена, тогда как 1600 нМ ТРА активировало около 98%. Свободный плазмин не был защищен фибрином от ингибирования альфа-2-макроглобулином и антиплазмином, поэтому он был ингибирован, и потерял способность растворять фибрин. Когда мы «выключили» активацию свободного плазминогена с помощью ТРА, увеличения времени задержки лизиса (рисунок 15 А, пунктирная линия) или

уменьшения скорости распространения волны лизиса (рисунок 15 Б, пунктирная линия) при увеличении концентрации ТРА, не наблюдалось.

В диапазоне концентраций ТРА 30-200 нМ, при которых не наблюдалось активации свободного плазминогена в степени, достаточной для его полного истощения в растворе, скорость лизиса сгустка была почти нечувствительна к изменению любых параметров фибринолиза.

3.8. Скорость пространственного лизиса сгустка зависит от скорости распространения волны свертывания

Была измерена скорость пространственного лизиса сгустка в системе с искусственной гиперкоагуляцией - при добавлении фосфолипидов (PL), скорость роста сгустка составляла 93 мкм/мин (рисунок 15 Г, черная пунктирная линия) и в системе с гипокоагуляцией - добавление дополнительного АТШ, скорость роста сгустка составляла 37 мкм/мин (рисунок 15 Г, зеленая пунктирная линия). Качественно, кривая дозозависимости скорости пространственного лизиса от концентрации ТРА была такой же, как и в контрольном эксперименте, но количественно скорости лизиса были выше в системе с PL и ниже в системе с АТШ.

Для анализа экспериментальных данных А.Шибeko были проведены *in silico* эксперименты (рисунок 16), моделирующие добавление в плазму 100 нМ ТРА, где была вызвана искусственная гиперкоагуляция путем добавления 1-20 нМ FXIa (черные пятиугольники) или $45 - 180 \times 10^{-5}$ нМ PL в конечной концентрации (черные круги), и эксперименты в которых коагуляция была подавлена добавлением АТШ в конечной концентрации 7 - 17 мкМ (черные треугольники). Скорость лизиса сгустка показала хорошую корреляцию со скоростью роста сгустка ($r^2 = 0,96$).

Кроме этого, были проведены эксперименты *in vitro* в PFP плазме (рисунок 16), дополненной 30 нМ ТРА (красный квадрат), 50 нМ ТРА (зеленый квадрат) и 100 нМ ТРА (черный квадрат) для запуска лизиса; 0,5 или 4 мкМ PL (закрашенные круги); или 5, 10 и 50 пМ FXIa (закрашенные пятиугольники) для

искусственной гиперкоагуляции; для моделирования гипокоагуляции в плазму был добавлен нефракционированный гепарин (закрашенный треугольник) в конечной концентрации 0,0025 МЕ/мл (профилактическая доза). Также была измерена скорость пространственного лизиса в PPF, дополненной 50 нМ ТРА (закрашенная звезда). Было обнаружено, что скорость пространственного лизиса сгустка коррелирует с скоростью роста сгустка ($r^2 = 0,91$). Хотя результаты моделирования количественно расходились с экспериментальными результатами, качественное соответствие было очень высоким.

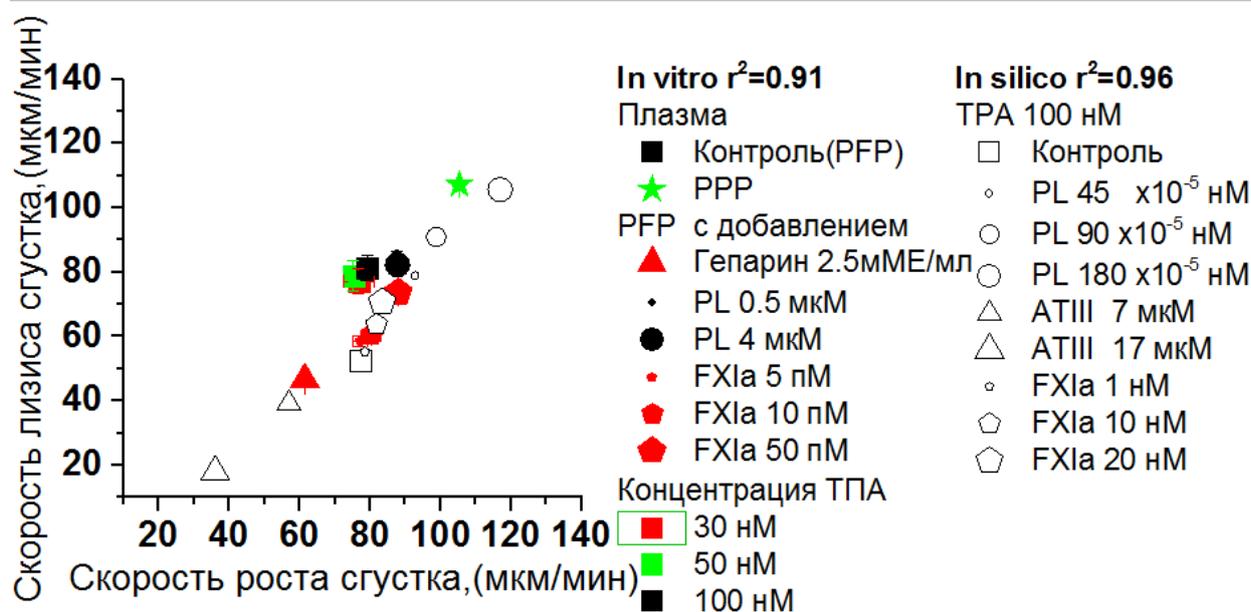


Рисунок 16. Скорость лизиса сгустка коррелирует со скоростью роста сгустка в математической ($r^2 = 0,96$, незакрашенные точки) и экспериментальной *in vitro* модели ($r^2 = 0,91$, закрашенные точки, $N = 2 - 6$). При моделировании *in silico* в плазму добавлялся ТРА в конечной концентрации 100 нМ; 1, 10 и 20 нМ FXIa (пятиугольники) или 45, 90 и 180 $\times 10^{-5}$ нМ PL (круги) в конечной концентрации; 7 и 17 мкМ АТIII (треугольники) в конечной концентрации. В экспериментах *in vitro* в PPF добавлялся 30 (красный), 50 (зеленый) и 100 (черный) нМ ТРА; 0,5 и 4 мкМ PL (круги); 5, 10 и 50 пМ FXIa (пятиугольники); 2,5 мМЕ/мл нефракционированного гепарина (треугольник). Эксперимент по лизису сгустка в PPP, дополненной 50 нМ ТРА, имел высокую скорость пространственного роста и лизиса сгустка (звезда). Эксперименты по росту и лизису сгустка проводились в плазме, подготовленной в соответствии с протоколом, описанным в разделе «Методы».

3.9. Активация фактора IX плазмином

При добавлении высоких концентраций тромболитических препаратов в плазму, был обнаружен эффект гиперактивации системы свертывания по всему объему плазмы (рисунок 17). Были проведены эксперименты с основными тромболитическими препаратами – ТРА, УРА, СК, а также с плазмином. Во всех случаях добавления тромболитического препарата наблюдалась спонтанная активация плазмы по всему объему (с дальнейшим лизисом в случае ТРА и УРА).

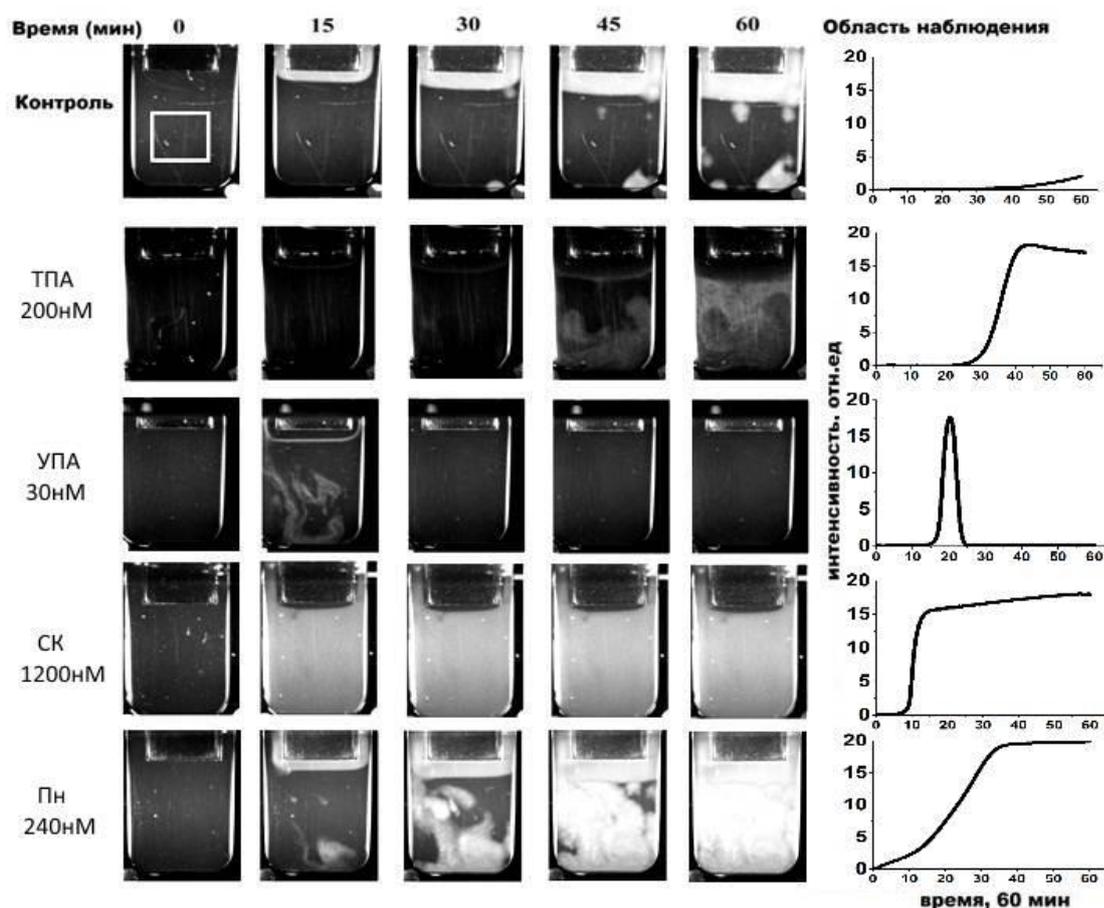


Рисунок 17. Активация системы свертывания фибринолитическими препаратами. По столбцам: время от начала эксперимента, мин (0, 15, 30, 45, 60); правый столбец характеризует изменение интенсивности от времени [интенсивность усреднена в области, удаленной от активатора на несколько мм (белый прямоугольник)]. Строки: контроль - PFP плазма без добавления тромболитического агента, ТРА – PFP с добавлением ТРА 200 нМ; УРА – PFP с добавлением УРА 30 нМ; СК – PFP с добавлением СК 1200 нМ; Pn – PFP с добавлением Pn 240 мкМ. Характерные эксперименты, N=6. Эксперименты по росту и лизису сгустка проводились в свежемороженой PFP, подготовленной в соответствии с протоколом, описанным в разделе «Методы».

Так как активация свертывания происходила при добавлении любого активатора фибринолиза или пламина, была предложена гипотеза, что свертывание активируется через плазмин. Для проверки гипотезы была проведена серия *in vitro* экспериментов в дефицитной по плазминогену плазме с добавлением ТРА, Рg и ТРА+Рg (рисунок 18). При добавлении ТРА и Рg по отдельности образования пламина в растворе не происходит. При добавлении ТРА+Рg совместно, происходит реакция активации Рg, образуется плазмин. В этом случае фиксировалось образование фибрина по объему плазмы, а также фиксировался лизис сгустка вблизи активатора. Таким образом, вероятно, именно плазмин является тем ферментом фибринолиза, через который происходит активация системы свертывания.

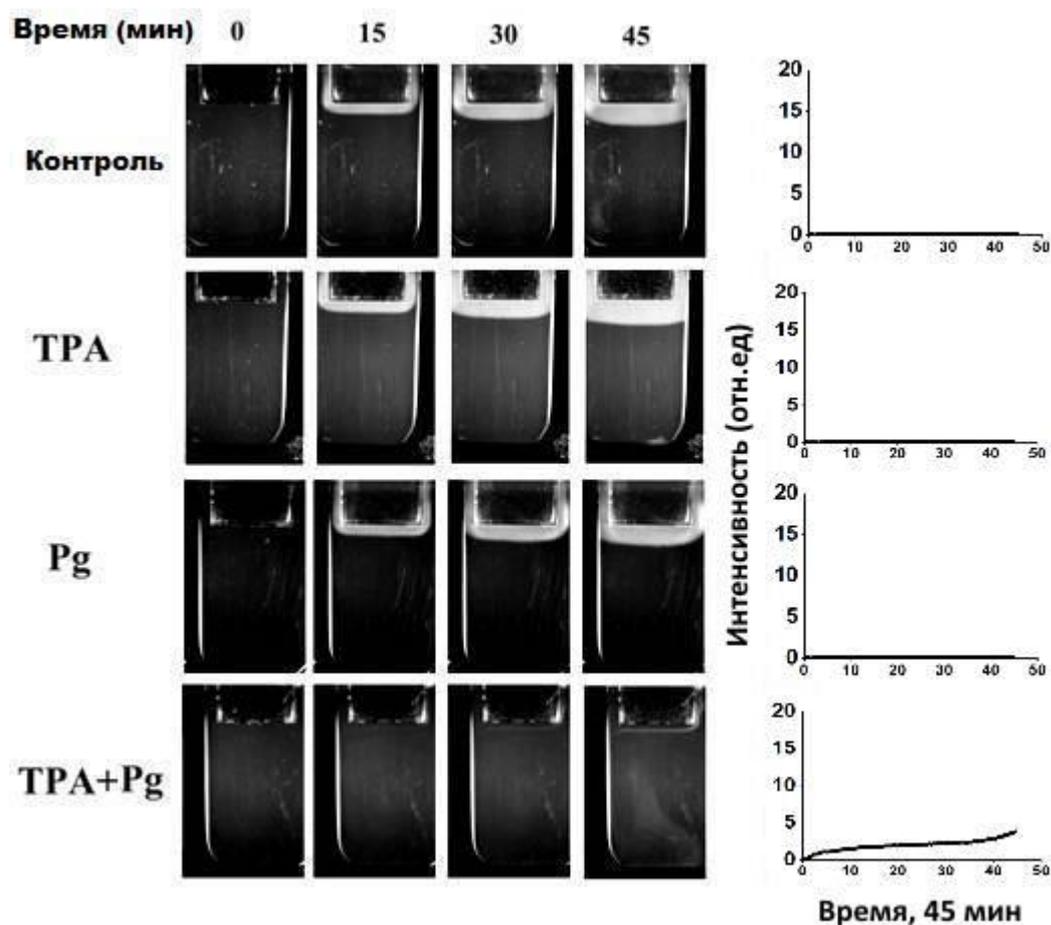


Рисунок 18. Исследование активации свертывания в дефицитной по плазминогену плазме. 1-я строка – контроль (PFP без добавления тромболитического фермента); 2-я строка –

добавление ТРА 400 нМ; 3-я строка – добавление P_g1.5 мкМ; 4-я строка – добавление ТРА 400 нМ и P_g1.5 мкМ. Время эксперимента 45 мин.

Дальнейшим шагом была задача определить фактор свертывания, который активируется фибринолитическими препаратами. Для этого были поставлены эксперименты в плазмах, дефицитных по различным факторам свертывания.

На рисунке 19 изображены результаты экспериментов на плазме, дефицитной по фактору IX. При добавлении в такую плазму фибринолитических агентов (ТРА 400нМ и плазмина 720нМ) активации свертывания по объему плазмы не наблюдается. При восполнении плазмы фактором IX при добавлении тромболитических препаратов происходит активация свертывания. Эти результаты свидетельствуют о том, что фактор свертывания, отвечающий за активацию системы свертывания фибринолитиками – это фактор IX или же фактор, лежащий выше по каскаду свертывания.

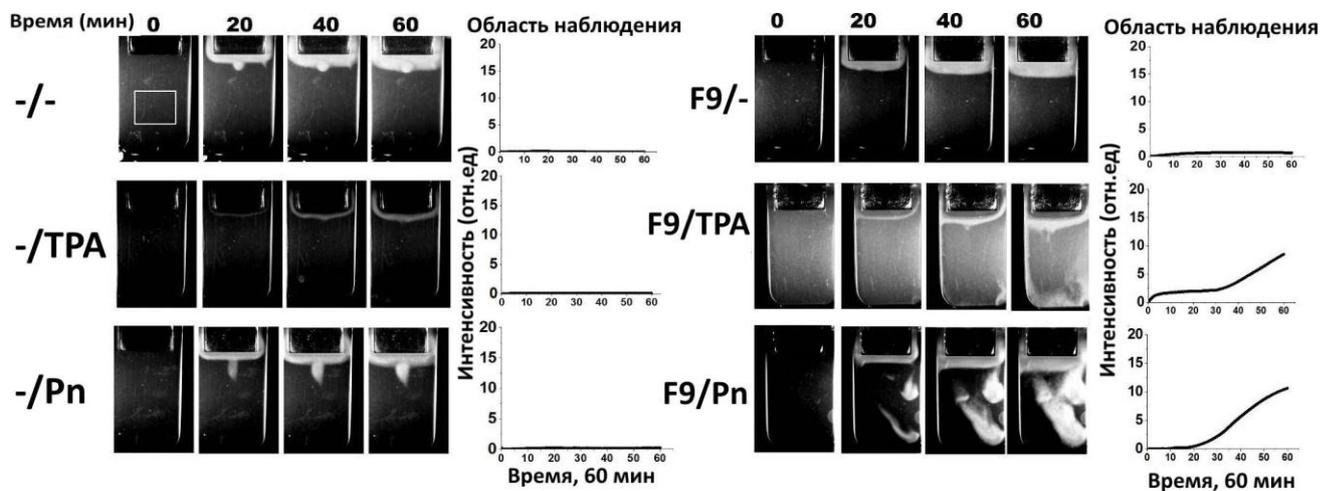


Рисунок 19. Исследование активации свертывания в дефицитной по фактору IX плазме. Эксперименты с добавлением в PFP плазму дефицитной по фактору IX фибринолитических препаратов (ТРА 400 нМ, Pn 720 нМ) и восполнением фактора IX (добавление фактора в концентрации 100нМ). Время эксперимента 60 мин.

Для того, чтобы выяснить, какой из факторов каскада свертывания активируется при добавлении тромболитических препаратов были поставлены эксперименты в плазме, дефицитной по фактору XI (одиннадцатый фактор

активирует фактор XI, находясь на уровень выше по каскаду). В результате экспериментов (рисунок 20) было выяснено, что при добавлении тромболитических препаратов (плазмин 720 нМ, ТРА 200 нМ) происходит активация свертывания по объему плазмы. Это означает, что свертывание активируется ниже по каскаду, чем фактор XI, а значит, наиболее вероятный белок, ответственный за активацию свертывания фибринолитическими препаратами – это фактор IX.

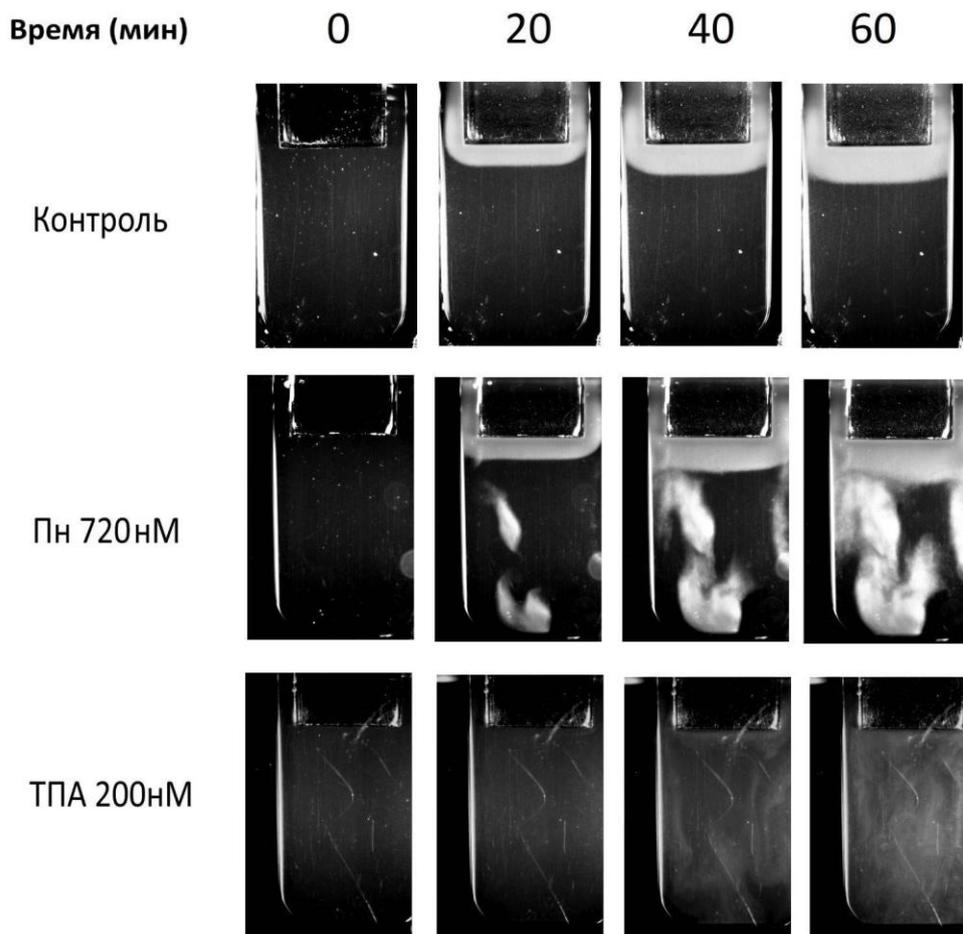


Рисунок 20. Исследование активации свертывания в дефицитной по фактору XI плазме. Добавление плазмина 720 нМ, ТРА 200 нМ. Время эксперимента 60 мин.

На основании полученных результатов был проведен эксперимент в буферном растворе, в котором фактор IX инкубировался с плазмином, после чего в раствор добавлялся препарат VFK-СМК - ингибитор плазмина (рисунок 21).

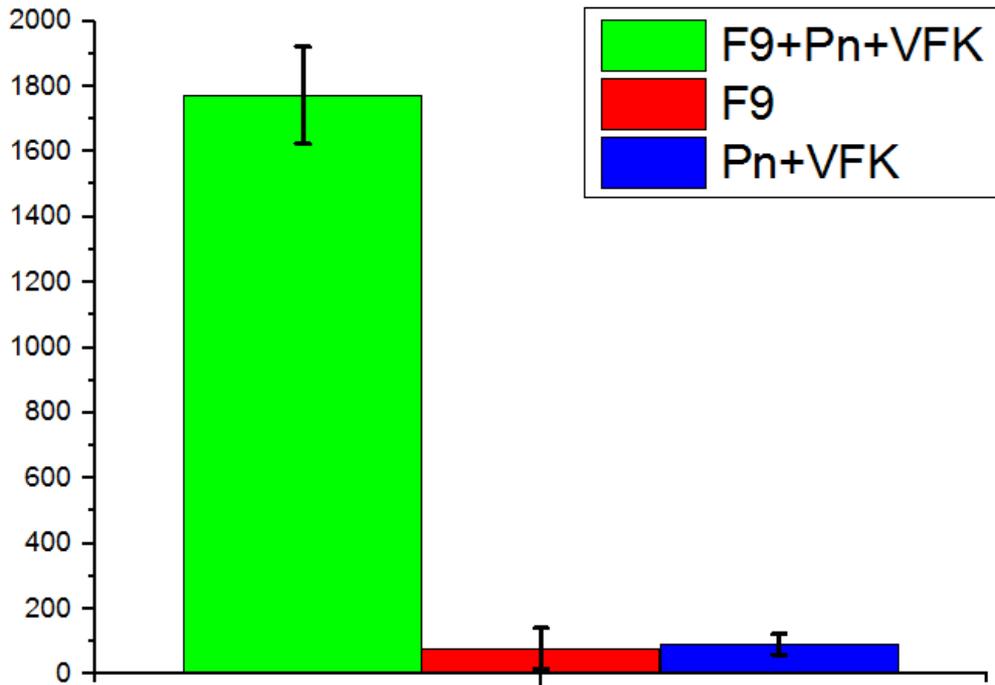


Рисунок 21. Эксперимент по активации фактора IX плазмином с использованием флуорогенного субстрата S299 (субстрат на активированный фактор IX). Инкубация фактора IX 2400нМ с плазмином (Pn) 30нМ в течение 30 минут в буферном растворе (50 мМ HEPES, 0.15M NaCl, pH 7.4). Последующее добавление VFK-СМК 1300нМ (ингибирование плазмينا, инкубация 10 мин). Добавление в раствор флуорогенного субстрата S299, запуск эксперимента. Время эксперимента 1ч, n=4. Планшетная флуориметрия.

Полученный раствор заливался в буфер с флуорогенным субстратом S299 (субстрат на активированный фактор IX). Также были проведены контрольные эксперименты: фактор IX до инкубации с плазмином (проверка чистоты фактора); плазмин с VFK-СМК, но без фактора IX (проверка ингибирования плазмينا). В отличие от контрольных экспериментов, в базовом эксперименте фиксируется значимый рост интенсивности флуоресценции, что свидетельствует об активации фактора IX плазмином.

4. Обсуждение результатов

В данной работе были исследованы механизмы пространственного лизиса сгустка в плазме, дополненной активаторами плазминогена в терапевтических концентрациях. Исследования проводились *in vitro*, *in silico*, а также рассматривался клинический случай с постановкой фибринолиз теста *ex vivo*.

Возможны два сценария лизиса сгустка – 1) когда сгусток образовался, после чего начал контактировать с тромболитическим агентом; 2) когда рост сгустка и процесс фибринолиза идут параллельно, т.е. рост сгустка протекает в плазме, содержащей достаточное количество фибринолитических факторов. Первый сценарий описывает процессы, протекающие в период тромболитической терапии, когда пациенту с тромбозом вводят тромболитические препараты, такие как ТРА, СК [153] или УРА [154]. Исследование механизмов тромболизиса в такой пространственной постановке [155–158] позволило изучить зависимость лизиса от толщины фибриновых волокон [5, 159], сдвигового напряжения в момент образования сгустка [160], роль различных ингибиторов лизиса [161]. Было показано, что лизис начинается с внешней части сгустка; скорость распространения фронта лизиса увеличивалась с увеличением концентрации ТРА [156]. Компьютерное моделирование данного процесса помогло исследовать зависимости лизиса от толщины волокна [162] и скорости потока [163]. В рамках текущей работы исследовался второй сценарий, внутренний лизис, который описывает физиологический процесс разрушения сгустка; ускорение данного процесса происходит во время тромболитической терапии.

Было обнаружено, что фронт волны лизиса появляется на поверхности, активирующей свертывание крови, и распространяется в том же направлении, что и фронт роста сгустка, отделяя образующийся сгусток от поверхности, несущей ТФ. Хотя в большинстве экспериментов использовался PFP и иммобилизованный ТФ, предполагается что результаты могут быть использованы для оценки процесса лизиса *in vivo*, поскольку процесс пространственного лизиса не изменился ни в PRP, ни в случае, когда свертывание было активировано клетками, несущими ТФ. В данном случае были использованы фетальные фибробласты легких,

высвобождающие UPA на очень низком уровне [164]. Кроме того, UPA секретируется как одноцепочечный профермент (pro-uPA), который обладает незначительной протеолитической активностью. В качестве основного тромболитического агента, в данном исследовании использовался TPA, у которого одноцепочечная форма имеет схожую активность с двухцепочечной, когда TPA связан с фибрином [165], поэтому вкладом фибрибластного UPA можно пренебречь. По литературным данным, значимые концентрации TPA при секреции из эндотелия достигаются через 8-10 часов после индукции секреции [167]. В нашем же случае весь эксперимент занимает менее часа.

Феномен пространственного лизиса также наблюдался в плазме пациента, получавшего фибринолитическую терапию, когда активаторы плазминогена не добавлялись в плазму *in vitro*. Этот эксперимент является наглядной демонстрацией того, что концентрация активаторов плазминогена во время тромболитической терапии может быть достаточно высокой, чтобы вызвать внутренний лизис сгустка. Дальнейшее исследование плазмы пациентов при фибринолитической терапии необходимо для оценки клинической значимости пространственного лизиса сгустка.

В экспериментах исследовался широкий диапазон концентраций TPA – от единиц до 800 нМ. Этот диапазон намного превышает уровень TPA 70 пМ, который соответствует концентрации TPA в интактной плазме. После индукции тромбоза фибринолитическая активность плазмы увеличивается в 20 раз [166]. Одним из механизмов, ответственных за это, является высвобождение TPA из эндотелиальных клеток [167]. Локальная концентрация TPA в окрестности стенки эндотелия (где образовался сгусток) довольно высока, и, предположительно, может достигать десятков нМ. Кроме этого, высокая концентрация TPA может достигаться в плазме в период тромболитической терапии. Во время двойного болюсного режима введения TPA (у пациентов с ОИМ, запускался системный тромболизис путем введения двух болюсов 50 мг альтеплазы с интервалом 30 минут) [168], пиковая концентрация TPA может достигать 200 - 300 нМ (оценка, для среднего объема крови и предположения 100% биодоступности TPA). Чтобы

лучше понять механизмы взаимодействия систем фибринолиза и свертывания крови, диапазон концентраций ТРА был увеличен до 800 нМ.

Кроме этого, в работе было показано, что высокая концентрация активатора плазминогена вызывает прекращение лизиса в объеме плазмы. Компьютерное моделирование пространственного лизиса показало, что данное явление вызывалось истощением плазминогена, когда свободный плазминоген активировался свободным ТРА, а затем плазмин, который не был защищен фибрином, ингибировался, и больше не мог выполнять своей функции разрушения сгустка. Этот вывод также был косвенно подтвержден нашим экспериментом с SK, не фибринспецифическим фибринолитическим агентом, который активирует как свободный, так и связанный с фибрином плазминоген [169]. Тип волны лизиса, начинающейся от поверхности на которой растет сгусток, может быть потенциально опасным для пациента, поскольку может вызвать образование эмбол и ретромбозов, что приводит к необходимости мониторинга терапии посредством метода пространственной динамики лизиса сгустка.

Анализ компьютерного моделирования показал, что скорость пространственного лизиса не зависит от скорости взаимодействия плазминогена с его активаторами, и в основном определяется скоростью роста сгустка. Эта зависимость была экспериментально подтверждена в данной работе, когда была найдена высокая корреляция скорости пространственного лизиса и скорости роста сгустка. Таким образом, для описания пространственного лизиса необходимо более подробно рассмотреть механизмы роста сгустка. Рост сгустка вызван импульсной волной распространения тромбина [8] с постоянной высотой пика концентрации, которая генерирует фибриновый сгусток с однородной структурой. Генерация плазмينا начинается на фибриновом сгустке, как только он появляется, что приводит к растворению сгустка вблизи активатора свертывания крови, после чего волна плазмينا двигается вслед за волной роста сгустка. Таким образом, плазма крови, дополненная активатором плазминогена, представляет собой активную среду, которая поддерживает две волны, переключающие ее

состояние из жидкого в твердое (тромбиновая волна), а затем обратно в жидкое (плазминовая волна).

In silico эксперименты не смогли воспроизвести картину лизиса сгустка, наблюдаемую при низких концентрациях ТРА, когда растворение сгустка началось на некотором расстоянии от места активации свертывания крови. Предполагается следующее объяснение этого явления. Концентрация тромбина во время образования сгустка очень высока в области 150-200 мкм от активатора свертывания [8], после чего распределение концентрации тромбина изменяется в пространстве и времени как у бегущей волны с почти постоянной высотой пика. Высокие концентрации тромбина вблизи активатора свертывания образуют более плотный сгусток (было показано для фибробластов [6, 170]), который более устойчив к лизису. Высокая концентрация тромбина может активировать больше FXIII, что делает фибриновый сгусток более резистентным к лизису. Помимо этого, высокая концентрация тромбина может активировать больше TAFI, препятствующего связыванию плазмина с фибрином, что также замедляет лизис. Дальнейшее включение этих факторов в модель, в сочетании с экспериментами *in vitro* в FXIII- и TAFI-дефицитных плазмах может быть полезно для понимания механизмов пространственного лизиса сгустка.

Рассуждая о процессе пространственного лизиса сгустка, мы можем предположить следующий сценарий. Несмотря на низкий период полувыведения ТРА (менее 5 минут [171]), непрерывные инфузии (от 3 ч для острого инфаркта миокарда [172] до 24 - 36 ч при ишемии и ДВС [173, 174]) могут поддерживать высокие концентрации циркулирующего ТРА достаточно долго, чтобы развить картину пространственного лизиса, которая исследуется в данной работе. Любое тромбообразование в период тромболитической терапии может сопровождаться одновременным лизисом с возможностью отцепления сгустка от места его образования. Отцепленный сгусток может полностью раствориться, но при определенных условиях он может стать частью эмбола, что позволяет объяснить такие побочные эффекты тромболитической терапии как ретромбоз [175] или тромбоэмболии [176, 177]. Опасность этих эффектов значительно возрастает у

пациентов с гиперкоагуляцией. Можно также предположить, что избыток активаторов плазминогена в крови в период тромболитической терапии может вызвать истощение плазминогена, что увеличивает шансы отцепленного сгустка остаться нерастворенным и вызвать тромбоз. Таким образом, использование глобальных тестов для непрерывного контроля состояния системы гемостаза пациента при фибринолитической терапии, с целью внесения соответствующих поправок в гемостаз, может быть полезным для снижения риска побочных явлений и летальности процедуры тромболитической.

Было обнаружено, что высокие концентрации тромболитических препаратов запускают свёртывание по всему объёму плазмы. При физиологических концентрациях фибринолитических ферментов такой активации в плазме не наблюдается. В плазме, дефицитной по фактору IX активация свертывания фибринолитиками начинается только при восполнении фактора IX. В плазме, дефицитной по фактору XI активация свертывания фибринолитиками наблюдается даже без восполнения плазмы фактором XI. Это все говорит о том, что активация происходит через реакцию активации фактора IX плазмином. Плазмин известен своей неспецифичностью в отношении факторов свертывания, и, считается, что данная неспецифичность носит антикоагуляционный характер – плазмин разрушает факторы свертывания, из-за чего они не могут в дальнейшем участвовать в каскаде коагуляции. В данной же работе показана прокоагуляционная роль плазмина. Таким образом, при подборе тромболитической терапии необходимо быть крайне внимательным к активации фактора IX и явлениям ретромбоза.

5. Заключение

В результате проведенной работы была разработана экспериментальная методика оценки параметров роста и лизиса фибринового сгустка, в условиях имитирующих ТЛТ терапию. Было установлено, что пространственный лизис в присутствии активатора плазминогена в терапевтических концентрациях начинается с области активации свертывания, что скорость лизиса линейно зависит от скорости распространения волны свертывания. При исследовании влияния различных концентраций ТРА (от нескольких нМ до 800 нМ) на параметры пространственного лизиса было обнаружено три типа волны лизиса сгустка. Обнаруженные явления снижения концентрации плазминогена и распространения волны лизиса от поверхности, активирующей свертывание, отделяющей образующийся сгусток от области крепления, могут быть использованы для разработки новых методик тромболитической терапии.

6. Выводы

1. Разработана экспериментальная методика оценки параметров роста и лизиса фибринового сгустка в условиях, моделирующих ТЛТ на базе системы “Тромбодинамика”.
2. Обнаружено три типа волны лизиса сгустка в зависимости от концентрации ТРА (от единиц до тысячи нМ, по мере увеличения) – фронт лизиса, распространяющийся изнутри сгустка, фронт лизиса, распространяющийся от активирующей поверхности и, его частный случай, лизис, останавливающийся через несколько минут после старта.
3. Установлено, что в присутствии терапевтических концентраций ТРА (30-100 нМ), волна лизиса появляется на поверхности, активирующей свертывание крови, и распространяется в том же направлении, что и фронт роста сгустка, отделяя образующийся сгусток от поверхности, создавая риск отрыва сгустка.
4. Показано, что при увеличении концентрации ТРА до сотен нМ, время задержки лизиса уменьшается, скорость лизиса увеличивается, выходя на плато. При дальнейшем увеличении концентрации, время задержки лизиса начинает увеличиваться, а скорость лизиса – спадать. С помощью компьютерного моделирования показано, что данное явление вызвано истощением свободного плазминогена.
5. Скорость движения фронта волны лизиса линейно зависит от скорости распространения волны свертывания.
6. Установлено, что при высоких концентрациях тромболитических препаратов в плазме происходит активация свертывания в результате реакции активации фактора IX плазмином.

7. Благодарности

Я бы хотел выразить искреннюю благодарность коллегам, чья помощь и поддержка сделали возможным выполнение данной работы. Я хочу поблагодарить сотрудников лаборатории физической биохимии системы крови и ЦТП ФХФ РАН: Михаила Александровича Пантелеева (человек, который привел меня и многих моих сокурсников в большую науку), Сергея Ивановича Обыденного, Андрея Александровича Бутылина, Синауридзе Елену Ивановну, Анну Баландину, Елену Липец, Софию Кузнецову, Подоплелову Надежду, Вуймо Татьяну, Грачеву Марину, Колядко Владимира.

За создание замечательной профессиональной атмосферы в лаборатории я хочу особо поблагодарить Фазоида Иноятовича Атауллаханова.

Для меня огромное удовольствие поблагодарить моего научного руководителя, Алексея Михайловича Шибeko, за его постоянное внимание, чуткие наставления, помощь и поддержку.

8. Приложения

Приложение 1. Пациент

1,5-годовалый мальчик, с ювенильным миеломоноцитарным лейкозом, мутацией гена PAI-1 и тромбофилией, проходивший лечение в национальном медицинском исследовательском центре детской гематологии, онкологии и иммунологии (НМИЦ ДГОИ) им. Рогачёва. Исследования пациента проводились до и после тромболитической терапии. Клинический протокол был одобрен комитетом по этике Федерального научно-клинического центра детской гематологии, онкологии и иммунологии. У пациента развился тромбоз на левой ноге, который был диагностирован с помощью ультразвукового исследования. Пациент находился на антитромботической профилактике гепарином (12,5-20 МЕ/кг/ч). Видеомикроскопическое исследование плазмы пациента (описание системы в разделе “методы”) никакого лизиса сгустка не фиксировало. Ультразвуковое исследование показало прогрессирующий рост тромба около катетера, поэтому было принято решение начать системную тромболитическую терапию (актилизе 0,03 мг/кг/ч, гепарин 10 МЕ/кг/ч). На следующий день диаметр левого бедра уменьшился на 2,5 см, произошла нормализация кровообращения. Видеомикроскопическое исследование плазмы пациента фиксировало лизис сгустка (рисунок П).

Время, мин

5



15



30

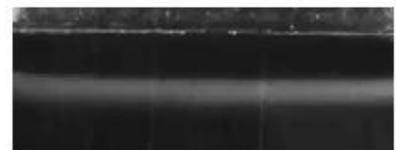


Рисунок А. Фотографии роста и лизиса фибринового сгустка в плазме пациента, получающего фибринолитическую терапию (актилизе 0,03 мг/кг/ч, гепарин 10 МЕ/кг/ч). Фотографии сделаны после 5, 15 и 30 минут с начала эксперимента. Рост сгустка инициировался пластиной с иммобилизированным ТГ.

Приложение 2. Пространственный лизис сгустка *in vitro*

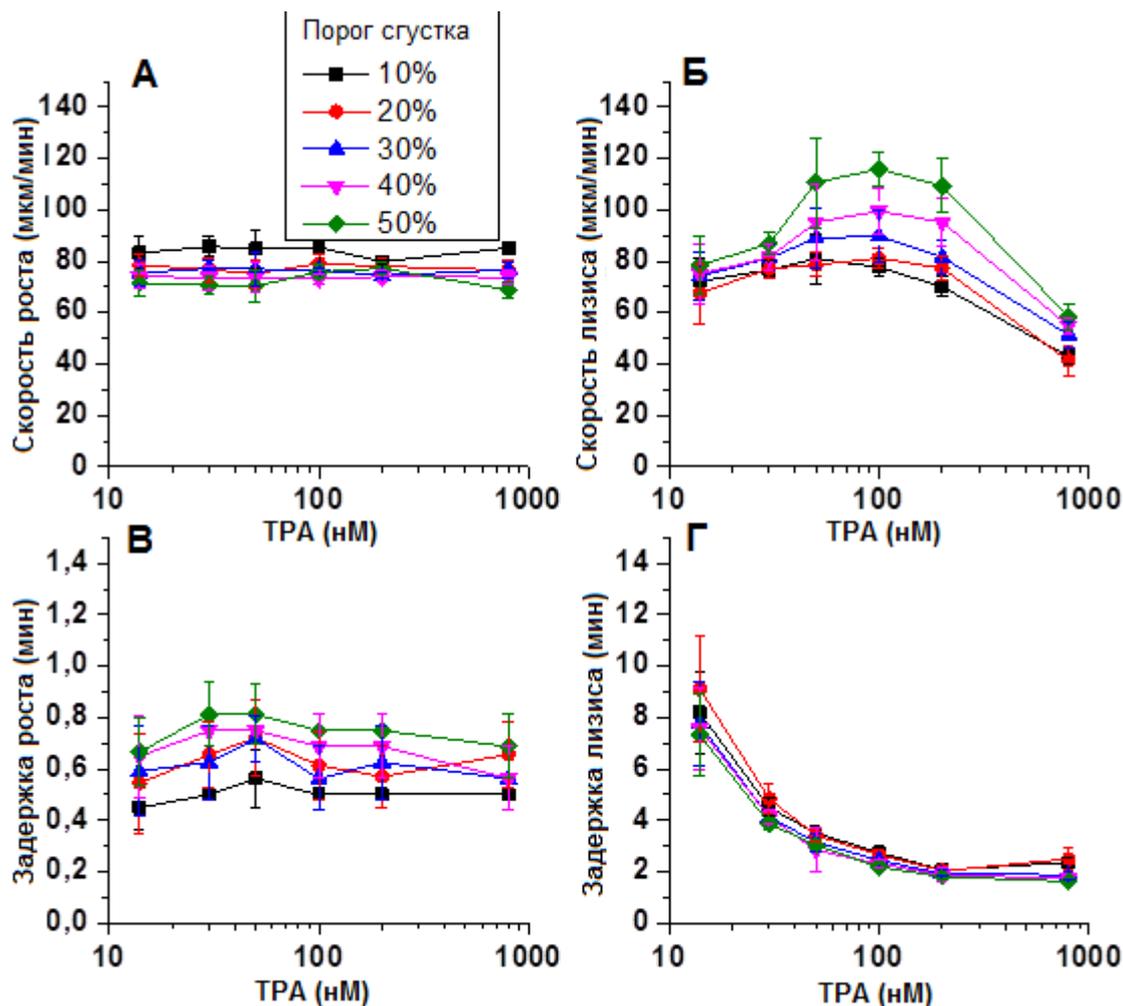


Рисунок Б. Зависимость параметров пространственного свертывания и лизиса от уровня интенсивности сигнала. Использовались различные уровни интенсивности сигнала светорассеяния (10-50% от максимального), для разграничения жидкой и твердой фазы сгустка. Скорость роста сгустка (А) нечувствительна к значению порогового уровня интенсивности; скорость лизиса сгустка (Б) постепенно увеличивалась с увеличением уровня порога, но общая зависимость от концентрации ТРА качественно не изменялась. Время задержки роста сгустка (В) увеличивалось с увеличением порога интенсивности, тогда как время задержки лизиса сгустка почти не изменялось (Г). Исходя из этих наблюдений, мы выбрали 20% максимального сигнала в качестве порогового уровня интенсивности и использовали его для обработки всех последующих данных.

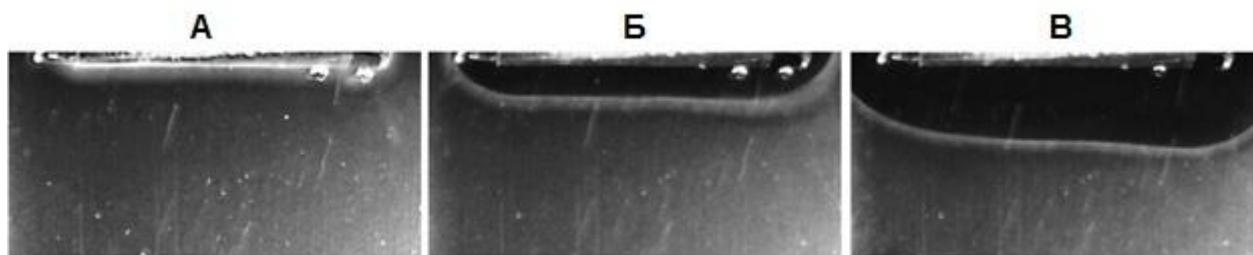


Рисунок В. Фотографии роста и лизиса фибринового сгустка в плазме, богатой тромбоцитами. Фотографии роста фибринового сгустка в плазме, богатой тромбоцитами, в присутствии 14 нМ ТРА. Фотографии сделаны после 5 (А), 15 (Б) и 30 (В) минут с начала эксперимента. Рост сгустка инициировался конфлюэнтным слоем фибробластов, несущих ТФ.

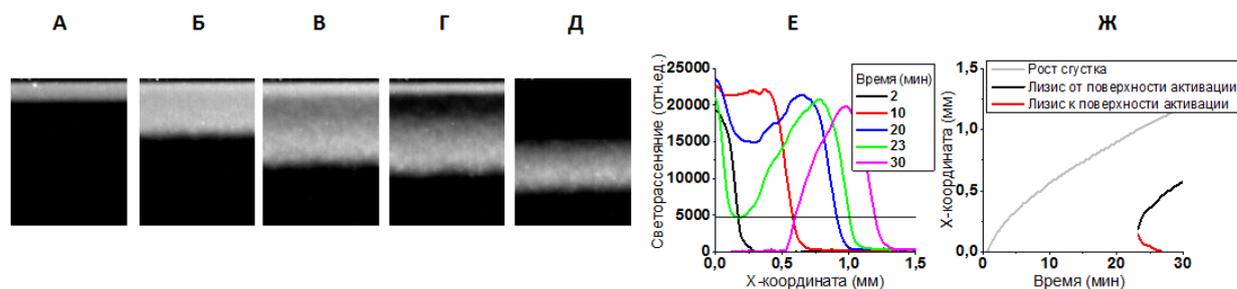


Рисунок Г. Фотографии роста и лизиса фибринового сгустка в PRP в присутствии 6 нМ ТРА. Фотографии сделаны после 2 (А), 10 (Б), 20 (В), 23 (Г) и 30 (Д) минут с начала эксперимента. Пространственная кинетика генерации фибрина показывает, что лизис сгустка начинается примерно в 200 мкм от поверхности с нанесенным ТФ (Е) и распространялся в обоих направлениях от и в сторону поверхности (черная и красная линии соответственно), несущей ТФ (Ж).

Приложение 3. Математическая модель

Математическое моделирование происходило в одномерной области длиной 3 мм, с сеткой из 300 узлов. Активатор свертывания (TF) был расположен по координате $x = 0$, тогда как активатор фибринолиза (ТРА) был равномерно распределен по всей области моделирования.

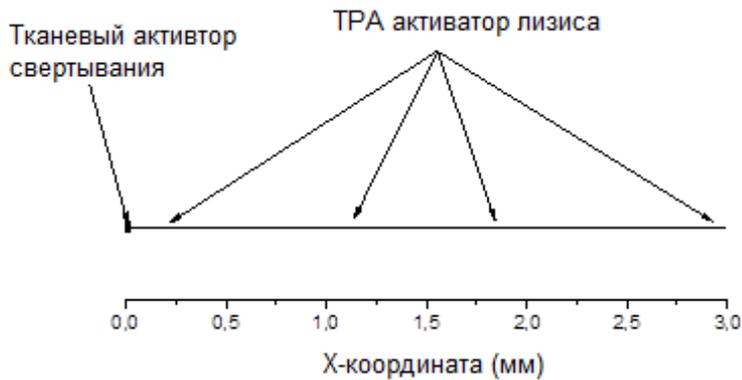


Рисунок Д. Область моделирования. Активатор коагуляции (TF) был расположен в точке $x = 0$, тогда как активатор лизиса (ТРА) находился во всей области моделирования

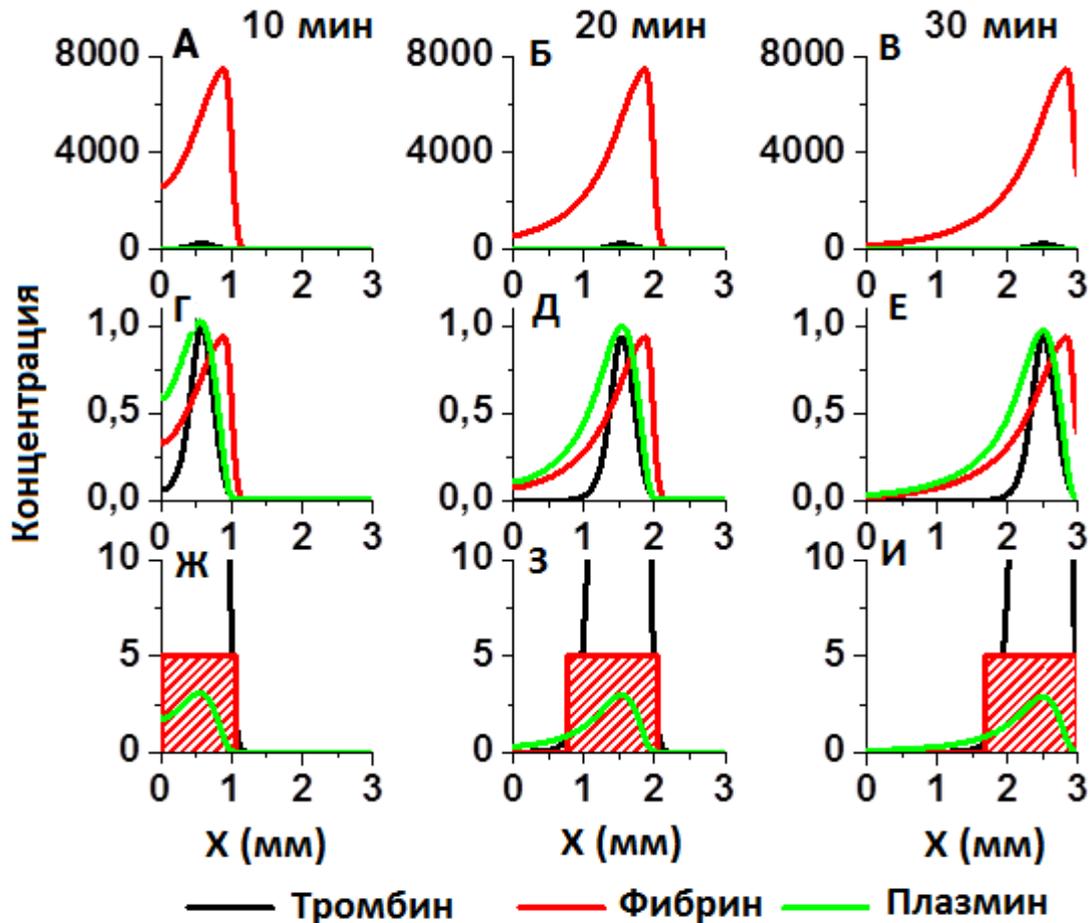


Рисунок Е. Две волны переключения агрегатного состояния в плазме, дополненной активатором пламиногена. В математическом моделировании роста и лизиса сгустка использовался ТРА в концентрации 100 нМ и фосфолипиды в концентрации $180 \cdot 10^{-5}$ нМ. Пространственное распределение тромбина (черный цвет), фибрина (красный цвет) и плазмينا (зеленый цвет) показано на 10-й (графики А, Г, Ж), 20-й (графики Б, Д, З) и 30-й (графики В, Е, И) минутах моделирования. Панели А, Б и В показывают концентрацию тромбина, фибрина и плазмينا в нМ; концентрация тромбина и плазмينا намного ниже, чем у фибрина. Панели Г, Д, Е показывают нормализованные к максимальным значениям концентрации тромбина, фибрина и плазмينا. Так как даже очень низкая концентрация тромбина может вызвать образование сгустка, и большая часть тромбина образуется уже после образования фибрина, может сложиться ложное впечатление, что волна тромбина следует за волной распространения фибрина. Но в масштабе 10 нМ (графики Ж, З, И), хорошо видно, что свернутое состояние плазмы (красная прямоугольная область) следует

за распространением волны тромбина. После чего проходит волна плазмينا и происходит обратное переключение плазмы в жидкое состояние (белая область).

Исследуя механизмы, регулирующие скорость пространственного лизиса, были изменены скорости следующих реакций, участвующих в процессе лизиса сгустка: 1) деградация фибрина; 2) связь плазмина с фибрином; 3) ингибирование плазмина. Было обнаружено, что десятикратное увеличение или уменьшение скоростей данных реакций не меняло скорость пространственного лизиса более чем на 3% от базовой (рисунок Ж).

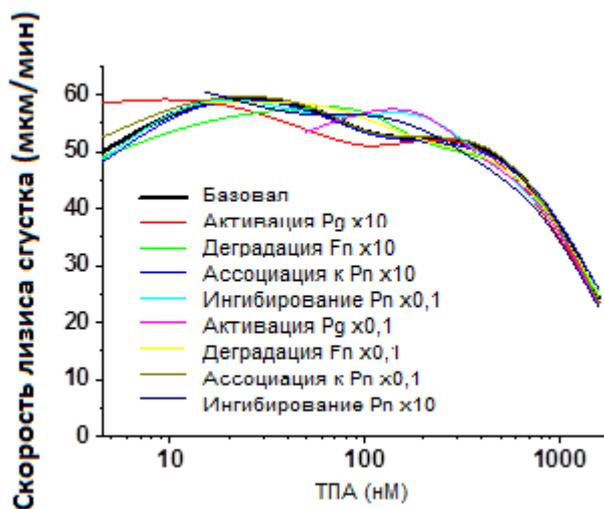


Рисунок Ж. Моделирование пространственного лизиса сгустка.

Десятикратное увеличение или уменьшение скоростей следующих реакций: 1) активация плазминогена (красная – десятикратное увеличение, розовая – десятикратное уменьшение); 2) деградация фибрина (зеленый – десятикратное увеличение, желтый – десятикратное уменьшение); 3) ассоциация плазмина (синий – десятикратное увеличение, темно-желтый – десятикратное уменьшение); 4) ингибирование плазмина (голубой – десятикратное уменьшение, темно-синий – десятикратное увеличение) не изменяло существенно пространственную скорость лизиса сгустка.

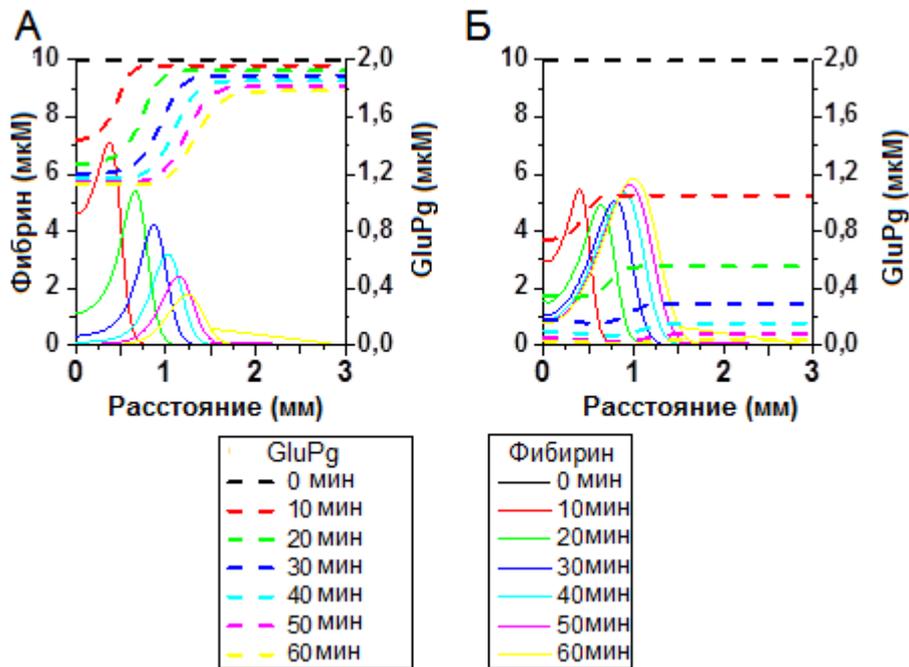


Рисунок 3. Уменьшение скорости пространственного лизиса вследствие истощения плазминогена. Пространственная кинетика генерации фибрина и потребления плазминогена в присутствии (А) ТРА 50 нМ; (Б) ТРА 1600 нМ. При высокой концентрации ТРА происходит истощение плазминогена в плазме, что приводит к ухудшению лизиса. Не связанный с фибрином плазминоген, превращаясь в плазмин, быстро деактивируется ингибиторами плазмина, и не может участвовать в дальнейшем процессе лизиса сгустка.

Описание математической модели

Обозначения: Концентрацию фактора F будем обозначать [F]. Все модельные переменные представляют собой суммарные концентрации: например, [IXa] представляет собой общую концентрацию IXa, включая fIXa в растворе, fIXa в комплексе с fVIIIa, fIXa в фермент-субстратном комплексе с fX и т. д. Концентрация свободного фактора F в растворе будем обозначать $[F^F]$; для большинства факторов $[F^F] \sim [F]$. Концентрацию фактора F, связанного с активированными тромбоцитами, обозначим $[F^B]$; $[F^B]$ обозначает фактор F, который связан с активированными тромбоцитами, но является свободным, то есть не находится в комплексе с другими факторами на мембране тромбоцитов. Исключением для этих обозначений будет $[Va^{BF}]$, что представляет собой fVa, связанный как с интактными, так и с активированными тромбоцитами и восприимчивым к инактивации APC.

Константы скоростей ассоциации и диссоциации F_1 и F_2 составляют $k_a^{F_1, F_2}$ и $k_d^{F_1, F_2}$, соответственно; $K_d^{F_1, F_2}$ - равновесная константа диссоциации. Подстрочный индекс i обозначает константу конкурентного ингибирования. K_d^F и n^F являются константой равновесной диссоциации и количеством сайтов связывания на тромбоцит, соответственно, для фактора F. Константы $k_{cat}^{F_1, F_2}$, $K_M^{F_1, F_2}$, и $k_{eff}^{F_1, F_2}$ - каталитическая, Михаэлиса и эффективная для катализа фактора F_1 ферментом F_2 . Верхний индекс "local" обозначает локальную, двумерную константу для реакций на фосфолипидных мембранах. D_F - коэффициент диффузии фактора F. Символ ρ^F характеризует количество молекул фактора F, выделившихся на тромбоците при активации. Поверхностная концентрация факторов, находящихся на активирующей поверхности, обозначается символом σ . Например, σ_{TF} - поверхностная плотность TF. Коэффициент диффузии фактора F обозначается D_F .

Уравнения

1. Инициация:

$$\frac{d\sigma_{VIIa-TF}}{dt} = \left(k_a^{VIIa,TF} \cdot [VIIa]_{x=0} \cdot \sigma_{TF} - k_d^{VIIa-TF} \cdot \sigma_{VIIa-TF}^F \right) + \frac{k_{cat}^{VII-TF,IIa} \cdot \sigma_{VII-TF} \cdot [IIa^F]_{x=0}}{K_M^{VII-TF,IIa} + [IIa^F]_{x=0}} +$$

$$+ k_{eff}^{VII-TF,Xa} \cdot \sigma_{VII-TF} \cdot [Xa^F]_{x=0} -$$

$$- k_a^{VIIa-TF,Xa-TFPI} \cdot [Xa-TFPI]_{x=0} \cdot \sigma_{VIIa-TF}^F - k_a^{Xa-VIIa-TF,TFPI} \cdot \sigma_{Xa-VIIa-TF} \cdot [TFPI]_{x=0}$$

$$\frac{d\sigma_{VII-TF}}{dt} = \left(k_a^{VII,TF} \cdot [VII]_{x=0} \cdot \sigma_{TF} - k_d^{VII-TF} \cdot \sigma_{VII-TF} \right) - \frac{k_{cat}^{VII-TF,IIa} \cdot \sigma_{VII-TF} \cdot [IIa^F]_{x=0}}{K_M^{VII-TF,IIa} + [IIa^F]_{x=0}} -$$

$$- k_{eff}^{VII-TF,Xa} \cdot \sigma_{VII-TF} \cdot [Xa^F]_{x=0}$$

$$\frac{d\sigma_{TF}}{dt} = - \left(k_a^{VIIa,TF} \cdot [VIIa]_{x=0} \cdot \sigma_{TF} - k_d^{VIIa-TF} \cdot \sigma_{VIIa-TF}^F \right) -$$

$$- \left(k_a^{VII,TF} \cdot [VII]_{x=0} \cdot \sigma_{TF} - k_d^{VII-TF} \cdot \sigma_{VII-TF} \right)$$

$$\frac{\partial [VIIa]}{\partial t} = D_{VIIa} \cdot \frac{\partial^2 [VIIa]}{\partial x^2} + \frac{k_{cat}^{VII,IIa} \cdot [VII] \cdot [IIa^F]}{K_M^{VII,IIa} + [IIa^F]}$$

$$\frac{\partial [VII]}{\partial t} = D_{VII} \cdot \frac{\partial^2 [VII]}{\partial x^2} - \frac{k_{cat}^{VII,IIa} \cdot [VII] \cdot [IIa^F]}{K_M^{VII,IIa} + [IIa^F]}$$

2. Основа каскада:

$$\frac{\partial [IXa]}{\partial t} = D_{IXa} \cdot \frac{\partial^2 [IXa]}{\partial x^2} + \frac{k_{cat}^{IX,VIIa-TF} \cdot [IX] \cdot [VIIa-TF]^F}{K_M^{IX,VIIa-TF}} +$$

$$+ \frac{k_{cat}^{IX,XIa} \cdot [IX] \cdot [XIa^B]}{K_M^{IX,XIa} + [IX]} - k_a^{IXa,AT-III} \cdot [AT-III] \cdot [IXa]$$

$$\frac{\partial [IX]}{\partial t} = D_{IX} \cdot \frac{\partial^2 [IX]}{\partial x^2} - \frac{k_{cat}^{IX,VIIa-TF} \cdot [IX] \cdot [VIIa-TF]^F}{K_M^{IX,VIIa-TF}} - \frac{k_{cat}^{IX,XIa} \cdot [IX] \cdot [XIa^B]}{K_M^{IX,XIa} + [IX]}$$

$$\frac{\partial [Xa]}{\partial t} = D_{Xa} \cdot \frac{\partial^2 [Xa^F]}{\partial x^2} + \frac{k_{cat}^{X,IXa local} \cdot [IXa^{B^F}] \cdot [X^B]}{N_a \cdot K_M^{X,IXa local} / k} +$$

$$+ \frac{k_{cat}^{X,IXa-VIIIa local} \cdot [IXa^{B^F}] \cdot [VIIIa^{B^F}] \cdot [X^B]}{N_a \cdot K_d^{IXa-VIIIa local} / k \cdot N_a \cdot K_M^{X,IXa-VIIIa local} / k} -$$

$$- \left(k_a^{Xa,AT-III} \cdot [AT-III] + k_a^{Xa,\alpha_2M} \cdot [\alpha_2M]_0 + k_a^{Xa,\alpha_1AT} \cdot [\alpha_1AT]_0 + k_a^{Xa,PCI} \cdot [PCI]_0 \right) \cdot [Xa^F] -$$

$$- k_a^{Xa-Va^B, AT-III} \cdot [AT-III] \cdot [Xa-Va^B] - \left(k_a^{Xa, TFPI} \cdot [Xa^F] \cdot [TFPI] - k_d^{Xa-TFPI} \cdot [Xa-TFPI] \right)$$

$$\frac{\partial[X]}{\partial t} = D_X \cdot \frac{\partial^2[X]}{\partial x^2} - \frac{k_{cat}^{X, IXa\ local} \cdot [IXa^{B^F}] \cdot [X^B]}{N_a \cdot K_M^{X, IXa\ local} / k} - \quad (S9)$$

$$- \frac{k_{cat}^{X, IXa-VIIIa\ local} \cdot [IXa^{B^F}] \cdot [VIIIa^{B^F}] \cdot [X^B]}{N_a \cdot K_d^{IXa-VIIIa\ local} / k \cdot N_a \cdot K_M^{X, IXa-VIIIa\ local} / k}$$

$$\frac{\partial[IIa]}{\partial t} = D_{IIa} \cdot \frac{\partial^2[IIa^F]}{\partial x^2} + k_{eff}^{II, Xa} \cdot N_a \cdot [Xa^F] \cdot [II] + \frac{k_{cat}^{localII, Xa-Va} \cdot [Xa-Va^B] \cdot [II^B]}{K_M^{localII, Xa-Va} / k \cdot N_a} - \quad (S10)$$

$$- \left(k_a^{IIa, AT-III} \cdot [AT-III] + k_a^{IIa, \alpha_2M} \cdot [\alpha_2M]_0 + k_a^{IIa, \alpha_1AT} \cdot [\alpha_1AT]_0 + k_a^{IIa, PCI} \cdot [PCI]_0 \right) \cdot [IIa^F]$$

$$\frac{\partial[II]}{\partial t} = D_{II} \cdot \frac{\partial^2[II]}{\partial x^2} - k_{eff}^{II, Xa} \cdot N_a \cdot [Xa^F] \cdot [II] - \frac{k_{cat}^{localII, Xa-Va} \cdot [Xa-Va^B] \cdot [II^B]}{K_M^{localII, Xa-Va} / k \cdot N_a} \quad (S11)$$

$$\frac{\partial[Fn]}{\partial t} = \frac{k_{cat}^{Fg, IIa} \cdot [Fg] \cdot [IIa^F]}{K_M^{Fg, IIa}} - \theta \cdot k_{cat}^{Fn, Pn} \cdot [Pn^B] \quad (S12)$$

$$\frac{\partial[Fg]}{\partial t} = D_{Fg} \cdot \frac{\partial^2[Fg]}{\partial x^2} - \frac{k_{cat}^{Fg, IIa} \cdot [Fg] \cdot [IIa^F]}{K_M^{Fg, IIa}} \quad (S13)$$

3. Активация кофакторов:

$$\frac{\partial[VIIIa]}{\partial t} = D_{VIIIa} \cdot \frac{\partial^2[VIIIa]}{\partial x^2} + \frac{k_{cat}^{VIII, IIa} \cdot [VIII] \cdot [IIa^F]}{K_M^{VIII, IIa} + [IIa^F]} - h^{VIIIa} \cdot [VIIIa] \quad (S14)$$

$$\frac{\partial[VIII]}{\partial t} = - \frac{k_{cat}^{VIII, IIa} \cdot [VIII] \cdot [IIa^F]}{K_M^{VIII, IIa} + [IIa^F]} \quad (S15)$$

$$\frac{\partial[Va]}{\partial t} = D_{Va} \cdot \frac{\partial^2[Va]}{\partial x^2} + \frac{k_{cat}^{V, IIa} \cdot [V] \cdot [IIa^F]}{K_M^{V, IIa} + [IIa^F]} - \quad (S16)$$

$$- \frac{k_{cat}^{localVa, PCa}}{K_M^{localVa, PCa}} \cdot [PCa] \cdot [Va^{B^F}] - \frac{k_{cat}^{localPS, Va, PCa}}{K_M^{localPS, Va, PCa}} \cdot [PCa] \cdot [PS - Va^{B^T}]$$

$$\frac{\partial[V]}{\partial t} = D_V \cdot \frac{\partial^2[V]}{\partial x^2} - \frac{k_{cat}^{V, IIa} \cdot [V] \cdot [IIa^F]}{K_M^{V, IIa} + [IIa^F]} \quad (S17)$$

4. Ингибирование:

$$\frac{\partial[APC]}{\partial t} = D_{PCa} \cdot \frac{\partial^2[APC]}{\partial x^2} + \frac{k_{cat}^{PC, IIa} \cdot [PC] \cdot [IIa^F]}{K_M^{PC, IIa}} + k_{eff}^{PC, APC} \cdot [PC] \cdot [APC] - \quad (S18)$$

$$- \left(k_a^{APC, \alpha_2M} \cdot [\alpha_2M]_0 + k_a^{APC, \alpha_2AP} \cdot [\alpha_2AP]_0 + k_a^{APC, \alpha_1AT} \cdot [\alpha_1AT]_0 + k_a^{APC, PCI} \cdot [PCI]_0 \right) \cdot [APC]$$

$$\frac{\partial[PC]}{\partial t} = D_{PC} \cdot \frac{\partial^2[PC]}{\partial x^2} - \frac{k_{cat}^{PC, IIa} \cdot [PC] \cdot [IIa^F]}{K_M^{PC, IIa}} - k_{eff}^{PC, APC} \cdot [PC] \cdot [APC] \quad (S19)$$

$$\frac{\partial[Xa - TFPI]}{\partial t} = D_{Xa-TFPI} \cdot \frac{\partial^2[Xa - TFPI]}{\partial x^2} + (k_a^{Xa, TFPI} \cdot [Xa^F] \cdot [TFPI] - k_d^{Xa-TFPI} \cdot [Xa - TFPI]) \quad (S20)$$

$$\frac{\partial[TFPI]}{\partial t} = D_{TFPI} \cdot \frac{\partial^2[TFPI]}{\partial x^2} - (k_a^{Xa, TFPI} \cdot [Xa^F] \cdot [TFPI] - k_d^{Xa-TFPI} \cdot [Xa - TFPI]) \quad (S21)$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial[AT - III]}{\partial t} = & D_{AT-III} \cdot \frac{\partial^2[AT - III]}{\partial x^2} - k_a^{IXa, AT-III} \cdot [AT - III] \cdot [IXa] - \\ & - k_a^{Xa, AT-III} \cdot [AT - III] \cdot [Xa^F] - k_a^{Xa-Va^B, AT-III} \cdot [AT - III] \cdot [Xa - Va^B] - \\ & - k_a^{IIa, AT-III} \cdot [AT - III] \cdot [IIa^F] - k_a^{XIIa, AT-III} \cdot [AT - III] \cdot [XIIa] - k_a^{IIa, AT-III} \cdot [AT - III] \cdot [IIa] \end{aligned} \quad (S22)$$

5. Обратная связь:

$$\frac{\partial[XIIa]}{\partial t} = D_{XIIa} \cdot \frac{\partial^2[XIIa]}{\partial x^2} + k_{eff}^{XI, IIa} \cdot N_a \cdot [XI] \cdot [IIa^F] - \quad (S23)$$

$$- (k_a^{XIIa, AT-III} \cdot [AT - III] + k_a^{XIIa, \alpha_2 AP} \cdot [\alpha_2 AP]_0 + k_a^{XIIa, \alpha_1 AT} \cdot [\alpha_1 AT]_0 + k_a^{XIIa, PCI} \cdot [PCI]_0 + k_a^{XIIa, CII} \cdot [CII]_0) \cdot [XIIa]$$

$$\frac{\partial[XI]}{\partial t} = D_{XI} \cdot \frac{\partial^2[XI]}{\partial x^2} - k_{eff}^{XI, IIa} \cdot N_a \cdot [XI] \cdot [IIa^F] \quad (S24)$$

6. Лизис

$$\frac{\partial[TPA]}{\partial t} = D_{TPA} \cdot \frac{\partial^2[TPA]}{\partial x^2} - k_i^{TPA, PAI1} \cdot [TPA] \cdot [PAI1] - k_a^{TPA, Fn} \cdot [TPA] \cdot ([Fn] - [TPA_B]) + \quad (S25)$$

$$+ k_d^{TPA_B} \cdot [TPA_B]$$

$$\frac{\partial[TPA_B]}{\partial t} = k_a^{TPA, Fn} \cdot [TPA] \cdot ([Fn] - [TPA_B]) - k_d^{TPA_B} \cdot [TPA_B] \quad (S26)$$

$$\frac{\partial[Pg - G]}{\partial t} = D_{Pg-G} \cdot \frac{\partial^2[Pg - G]}{\partial x^2} - k_{cat}^{Pg-G, Pn} \cdot [Pn] \cdot [Pg - G] - \quad (S27)$$

$$k_a^{Pg-G, Fn} \cdot [Pg - G] \cdot (2 \cdot [Fn] - [Pn_B] - [Pg - G_B] - [Pg - L_B]) + k_d^{Pg-G_B} \cdot [Pg - G_B] -$$

$$k_{cat}^{Pg-G, TPA} \cdot [TPA] \cdot [Pg - G]$$

$$\frac{\partial[Pg-L]}{\partial t} = D_{Pg-L} \cdot \frac{\partial^2[Pg-L]}{\partial x^2} + k_{cat}^{Pg-G, Pn} \cdot [Pn] \cdot [Pg-G] - \quad (S28)$$

$$k_a^{Pg-L, Fn} \cdot [Pg-L] \cdot (2 \cdot [Fn] - [Pn_B] - [Pg-G_B] - [Pg-L_B]) + k_d^{Pg-L_B} \cdot [Pg-L_B] -$$

$$k_{cat}^{Pg-L, TPA} \cdot [TPA] \cdot [Pg-L] - k_i^{Pg-L, a2AP} \cdot [a2AP] \cdot [Pg-L]$$

$$\frac{\partial[Pg-G_B]}{\partial t} = k_a^{Pg-G, Fn} \cdot [Pg-G] \cdot (2 \cdot [Fn] - [Pn_B] - [Pg-G_B] - [Pg-L_B]) - k_d^{Pg-G_B} \cdot [Pg-G_B] -$$

$$k_{cat}^{Pg-G, TPA} \cdot [TPA] \cdot [Pg-G] - k_{cat}^{Pg-G_B, Pn} \cdot [Pn] \cdot [Pg-G_B] - k_{cat}^{Pg-G_B, TPA_B} \cdot [TPA_B] \cdot [Pg-G_B] \quad (S29)$$

$$\frac{\partial[Pg-L_B]}{\partial t} = k_a^{Pg-L, Fn} \cdot [Pg-L] \cdot (2 \cdot [Fn] - [Pn_B] - [Pg-G_B] - [Pg-L_B]) - k_d^{Pg-L_B} \cdot [Pg-L_B] +$$

$$k_{cat}^{Pg-G_B, Pn} \cdot [Pn] \cdot [Pg-G_B] - k_{cat}^{Pg-L_B, TPA_B} \cdot [TPA_B] \cdot [Pg-L_B] \quad (S30)$$

$$\frac{\partial[Pn]}{\partial t} = D_{Pn} \cdot \frac{\partial^2[Pn]}{\partial x^2} + k_{cat}^{Pg-G, TPA} \cdot [TPA] \cdot [Pg-G] + k_{cat}^{Pg-L, TPA} \cdot [TPA] \cdot [Pg-L] -$$

$$k_a^{Pn, Fn} \cdot [Pn] \cdot (2 \cdot [Fn] - [Pn_B] - [Pg-G_B] - [Pg-L_B]) + k_d^{Pn_B} \cdot [Pn_B] - k_i^{Pn, a2AP} \cdot [a2AP] \cdot [Pn] -$$

$$k_i^{Pn, a2M} \cdot [a2M] \cdot [Pn] + \theta \cdot k_{cat}^{Fn, Pn} \cdot [Pn^B] \quad (S31)$$

$$\frac{\partial[Pn_B]}{\partial t} = k_a^{Pn, Fn} \cdot [Pn] \cdot (2 \cdot [Fn] - [Pn_B] - [Pg-G_B] - [Pg-L_B]) - k_d^{Pn_B} \cdot [Pn_B] - \theta \cdot k_{cat}^{Fn, Pn} \cdot [Pn^B] +$$

$$k_{cat}^{Pg-G_B, TPA_B} \cdot [TPA_B] \cdot [Pg-G_B] + k_{cat}^{Pg-L_B, TPA_B} \cdot [TPA_B] \cdot [Pg-L_B] - k_i^{Pn, a2AP} \cdot [a2AP] \cdot [Pn_B] \quad (S32)$$

$$\frac{\partial[PAI1]}{\partial t} = D_{PAI1} \cdot \frac{\partial^2[PAI1]}{\partial x^2} - k_i^{TPA, PAI1} \cdot [TPA] \cdot [PAI1] \quad (S33)$$

$$\frac{\partial[a2M]}{\partial t} = D_{a2M} \cdot \frac{\partial^2[a2M]}{\partial x^2} - k_i^{Pn, a2M} \cdot [a2M] \cdot [Pn] - k_a^{IIa, \alpha_2M} \cdot [\alpha 2M] \cdot [IIa^F] - k_a^{Xa, \alpha_2M} \cdot [\alpha 2M] \cdot [Xa^F] -$$

$$- k_a^{APC, \alpha_2M} \cdot [\alpha 2M] \cdot [APC] \quad (S34)$$

$$\frac{\partial[a2AP]}{\partial t} = D_{a2AP} \cdot \frac{\partial^2[a2AP]}{\partial x^2} - k_i^{Pn, a2AP} \cdot [a2AP] \cdot [Pn] - k_a^{XIIa, \alpha 2AP} \cdot [\alpha 2AP] \cdot [XIIa^F] -$$

$$k_a^{Pn_B, \alpha 2AP} \cdot [\alpha 2AP] \cdot [Pn_B] \quad (S35)$$

7. Компактную запись для концентраций свободных и связанных факторов и фактор-комплексов из разделов 1-6 выше следует читать следующим образом:

$$\sigma_{VIIa-TF}^F = \frac{\sigma_{VIIa-TF}}{1 + \frac{[IX]_{x=0}}{K_M^{IX, VIIa-TF}} + \frac{[X]_{x=0}}{K_M^{X, VIIa-TF}}} \quad (S36)$$

$$\sigma_{X-VIIa-TF} = \frac{[X]_{x=0} \cdot \sigma_{VIIa-TF}}{K_M^{X, VIIa-TF} \cdot \left(1 + \frac{[IX]_{x=0}}{K_M^{IX, VIIa-TF}} + \frac{[X]_{x=0}}{K_M^{X, VIIa-TF}} \right)} \quad (S37)$$

$$\sigma_{Xa-VIIa-TF} = \frac{k_{cat}^{X, VIIa-TF} \cdot \sigma_{X-VIIa-TF}}{k_d^{Xa-VIIa-TF}} \quad (S38)$$

$$[IXa^{BF}] = \frac{[IXa] \cdot N_a \cdot n^{IXa}}{K_d^{IXa} + [IXa]} \quad (S39)$$

$$\frac{1}{\left(1 + \frac{[X^B]}{N_a \cdot K_M^{X, IXa local} / k} + \frac{[VIIIa^{BF}]}{N_a \cdot K_d^{IXa-VIIIa local} / k} + \frac{[VIIIa^{BF}] \cdot [X^B]}{N_a \cdot K_d^{IXa-VIIIa local} / k \cdot N_a \cdot K_M^{X, IXa-VIIIa local} / k} \right)}$$

$$[VIIIa^{BF}] = \frac{[VIIIa] \cdot N_a \cdot n^{VIIIa}}{(K_d^{VIIIa} + [VIIIa]) \cdot \left(1 + \frac{[X^B]}{N_a \cdot K_d^{VIIIa-X local} / k} \right)} \cdot \frac{1}{1 + \frac{PS}{K_i^{VIIIa, PS}}} \quad (S40)$$

$$[Xa-Va^B] = \frac{[Xa] \cdot [Va^B]}{K_d^{Xa-Va} \cdot \left(1 + \frac{[PS]}{K_i^{Va, PS}} + \frac{[Xa]}{K_d^{Xa-Va}} \right) + [Va^B]} \quad (S41)$$

$$[Xa^F] = [Xa] - [Xa-Va^B] \quad (S42)$$

$$[X^B] = \frac{[X] \cdot N_a \cdot n^{X(I)}}{K_d^X \cdot \left(1 + \frac{[X]}{K_d^X} + \frac{[II]}{K_d^{II}} \right)} \quad (S43)$$

$$[IIa^F] = \frac{[IIa]}{1 + \frac{[Fg] + [Fn]}{K_M^{Fg, IIa}}} \quad (S44)$$

$$[II^B] = \frac{[II] \cdot N_a \cdot n^{X(II)}}{K_d^{II} \cdot \left(1 + \frac{[X]}{K_d^X} + \frac{[II]}{K_d^{II}} \right)} \quad (S45)$$

$$[Va^B] = \frac{[Va] \cdot N_a \cdot n^{Va}}{K_d^{Va} + [Va]} \quad (S46)$$

$$[Va^{BF}] = \frac{[Va] \cdot N_a \cdot n^{Va}}{K_d^{Va} + [Va]} - [PS - Va^{BT}] - [Xa-Va^B] \quad (S47)$$

$$(S48)$$

$$\left[PS - Va^{BT}\right] = \frac{[PS] \cdot [Va^B]}{K_i^{Va, PS} \cdot \left(1 + \frac{[PS]}{K_i^{Va, PS}} + \frac{[Xa]}{K_d^{Xa-Va}}\right)}$$

8. Граничные условия:

Для большинства факторов на обеих границах интервала моделирования использовались условия непроницаемости.

Ниже приведен пример для протромбина:

$$D_{IIa} \cdot \frac{\partial [II]}{\partial x} \Big|_{x=0} = 0 \quad (S49)$$

$$D_{IIa} \cdot \frac{\partial [II]}{\partial x} \Big|_{x=l} = 0 \quad (S50)$$

Исключениями являются fIXa, fIX, fXa, fX, Xa-TFPI, TFPI, поскольку реакции активации, происходящие на левом конце моделируемого интервала, вызывают изменения в граничных условиях, соответствующих «поток» этих факторов по границе:

$$D_{VIIa} \cdot \frac{\partial [VIIa]}{\partial x} \Big|_{x=0} = \left(k_a^{VIIa, TF} \cdot [VIIa]_{x=0} \cdot \sigma_{TF} - k_d^{VIIa-TF} \cdot \sigma_{VIIa-TF}^F \right) \quad (S51)$$

$$D_{VII} \cdot \frac{\partial [VII]}{\partial x} \Big|_{x=0} = \left(k_a^{VII, TF} \cdot [VII]_{x=0} \cdot \sigma_{TF} - k_d^{VII-TF} \cdot \sigma_{VII-TF} \right) \quad (S52)$$

$$D_{IXa} \cdot \frac{\partial [IXa]}{\partial x} \Big|_{x=0} = - \frac{k_{cat}^{IX, VIIa-TF} \cdot [IX]_{x=0} \cdot \sigma_{VIIa-TF}^F}{K_M^{IX, VIIa-TF}} \quad (S53)$$

$$D_{IX} \cdot \frac{\partial [IX]}{\partial x} \Big|_{x=0} = \frac{k_{cat}^{IX, VIIa-TF} \cdot [IX]_{x=0} \cdot \sigma_{VIIa-TF}^F}{K_M^{IX, VIIa-TF}} \quad (S54)$$

$$D_{Xa} \cdot \frac{\partial [Xa^F]}{\partial x} \Big|_{x=0} = - \frac{k_{cat}^{X, VIIa-TF} \cdot [X]_{x=0} \cdot \sigma_{VIIa-TF}^F}{K_M^{X, VIIa-TF}} \quad (S55)$$

$$D_X \cdot \frac{\partial [X]}{\partial x} \Big|_{x=0} = \frac{k_{cat}^{X, VIIa-TF} \cdot [X]_{x=0} \cdot \sigma_{VIIa-TF}^F}{K_M^{X, VIIa-TF}} \quad (S56)$$

$$D_{Xa-TFPI} \cdot \frac{\partial [Xa-TFPI]}{\partial x} \Big|_{x=0} = k_a^{VIIa-TF, Xa-TFPI} \cdot [Xa-TFPI]_{x=0} \cdot \sigma_{VIIa-TF}^F \quad (S57)$$

$$D_{TFPI} \cdot \left. \frac{\partial [TFPI]}{\partial x} \right|_{x=0} = k_a^{Xa-VIIa-TF, TFPI} \cdot \sigma_{Xa-VIIa-TF} \cdot [TFPI] \quad (S58)$$

Следует отметить, что для тех факторов, которые имеют диффузионные условия, включая свободные факторы (факторы Ха и Па), граничные условия должны быть также записаны для свободных факторов (для Ха^F и Па^F).

Концентрации факторов, кинетические константы и коэффициенты диффузии гемостазной части модели приведены в статье [178]

Таблица А. Параметры модели: кинетические константы

Константа	Значение	Источник
$k_i^{TPA, PAI1}$	1.5 нМ ⁻¹ мин ⁻¹	[179]*
$k_a^{TPA, Fn}$	6.9 · 10 ⁻⁶ нМ ⁻¹ мин ⁻¹	[46]
$k_d^{TPA_B}$	0.004 мин ⁻¹	[46]
$k_{cat}^{Pg-G, Pn}$	3.4 · 10 ⁻⁶ нМ ⁻¹ мин ⁻¹	[180]
$k_a^{Pg-G, Fn}$	6.5 · 10 ⁻⁶ нМ ⁻¹ мин ⁻¹	[38]
$k_d^{Pg-G_B}$	0.25 мин ⁻¹	[38]
$k_{cat}^{Pg-G, TPA}$	4 · 10 ⁻⁵ нМ ⁻¹ мин ⁻¹	[38]*
$k_a^{Pg-L, Fn}$	6.5 · 10 ⁻⁶ нМ ⁻¹ мин ⁻¹	[38]
$k_d^{Pg-L_B}$	0.003 мин ⁻¹	[38]
$k_{cat}^{Pg-L, TPA}$	5.4 · 10 ⁻⁴ нМ ⁻¹ мин ⁻¹	[48]*
$k_i^{Pg-L, a2AP}$	0.06 нМ ⁻¹ мин ⁻¹	[181]
$k_{cat}^{Pg-G_B, Pn}$	1.36 · 10 ⁻⁴ нМ ⁻¹ мин ⁻¹	[180]
$k_{cat}^{Pg-G_B, TPA_B}$	0.02 нМ ⁻¹ мин ⁻¹	[48]*
$k_{cat}^{Pg-L_B, TPA_B}$	0.32 нМ ⁻¹ мин ⁻¹	[48]*
$k_a^{Pn, Fn}$	6 · 10 ⁻⁶ нМ ⁻¹ мин ⁻¹	[182]
$k_d^{Pn_B}$	3 · 10 ⁻³ мин ⁻¹	[182]

$k_i^{Pn,a2AP}$	0.258 нМ ⁻¹ мин ⁻¹	[183]
$k_i^{Pn,a2M}$	0.018 нМ ⁻¹ мин ⁻¹	[46]
$k_{cat}^{Fn,Pn}$	300 мин ⁻¹	[184]
θ	0.1 [¶]	-
$k_i^{Pn_B, a2AP}$	$6 \cdot 10^{-4}$ нМ ⁻¹ мин ⁻¹	[183]

* расчётное значение

¶ приближительное значение

Таблица Б. Параметры модели: коэффициенты диффузии

Переменная	M_r	Коэффициент диффузии*, мм ² /мин
Pg_G	92,000	0.0027
Pg_L	92,000	0.0027
Pn	85,000	0.0027
TPA	68,000	0.0029
PAI1	52,000	0.0031
a2M	725,000	0.0006
a2AP	70,000	0.0029

* Значения коэффициентов диффузии были рассчитаны на базе молекулярных масс, используя данные из публикации [185]

Список литературы

1. Collen, D. On the regulation and control of fibrinolysis. Edward Kowalski Memorial Lecture / D. Collen // *Thromb.Haemost.* – 1980. – Vol. 43, №2. – P.77–89.
2. Wiman, B. On the kinetics of the reaction between human antiplasmin and a low-molecular-weight form of plasmin / B. Wiman, L. Boman, D. Collen // *Eur.J.Biochem.* – 1978. – Vol. 87, №1. – P.143–146.
3. Liu, J.N. A comparative study of the promotion of tissue plasminogen activator and pro-urokinase-induced plasminogen activation by fragments D and E-2 of fibrin / J.N. Liu, V. Gurewich // *J.Clin.Invest.* – 1991. – Vol. 88, №6. – P.2012–2017.
4. Panteleev, M.A. Hemostasis and thrombosis beyond biochemistry: roles of geometry, flow and diffusion / M.A. Panteleev, N.M. Dashkevich, F.I. Ataullakhanov // *Thromb.Res.* – 2015. – Vol. 136, №4. – P.699–711.
5. Physical determinants of fibrinolysis in single fibrin fibers / I. Bucay, O'Brien,E.T.,III, S.D. Wulfe [et al.] // *PLoS.One.* – 2015. – Vol. 10, №2. – P.e0116350.
6. Cellular procoagulant activity dictates clot structure and stability as a function of distance from the cell surface / R.A. Campbell, K.A. Overmyer, C.R. Bagnell, A.S. Wolberg // *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* – 2008. – Vol. 28, №12. – P.2247–2254.
7. Molecular mechanisms of the effect of ultrasound on the fibrinolysis of clots / I.N. Chernysh, C.E. Everbach, P.K. Purohit, J.W. Weisel // *J.Thromb.Haemost.* – 2015. – Vol. 13, №4. – P.601–609.
8. Thrombin activity propagates in space during blood coagulation as an excitation wave / N.M. Dashkevich, M.V. Ovanesov, A.N. Balandina [et al.] // *Biophys.J.* – 2012. – Vol. 103, №10. – P.2233–2240.
9. A systems approach to hemostasis: 1. The interdependence of thrombus architecture and agonist movements in the gaps between platelets / J.D. Welsh, T.J. Stalker, R. Voronov [et al.] // *Blood.* – 2014. – Vol. 124, №11. – P.1808–1815.

10. Blood flow controls coagulation onset via the positive feedback of factor VII activation by factor Xa / A.M. Shibeko, E.S. Lobanova, M.A. Panteleev, F.I. Ataulakhanov // *BMC.Syst.Biol.* – 2010. – Vol. 4, №1752-0509 (Linking). – P.5.
11. Flow profoundly influences fibrin network structure: implications for fibrin formation and clot stability in haemostasis / R.A. Campbell, M. Aleman, L.D. Gray [et al.] // *Thromb.Haemost.* – 2010. – Vol. 104, №6. – P.1281–1284.
12. Task-oriented modular decomposition of biological networks: trigger mechanism in blood coagulation / M.A. Panteleev, A.N. Balandina, E.N. Lipets [et al.] // *Biophys.J.* – 2010. – Vol. 98, №9. – P.1751–1761.
13. Luan, D. Computationally derived points of fragility of a human cascade are consistent with current therapeutic strategies / D. Luan, M. Zai, J.D. Varner // *PLoS.Comput.Biol.* – 2007. – Vol. 3, №7. – P.e142.
14. The impact of uncertainty in a blood coagulation model / C.M. Danforth, T. Orfeo, K.G. Mann [et al.] // *Math.Med.Biol.* – 2009. – Vol. 26, №4. – P.323–336.
15. Platelets and phospholipids in tissue factor-initiated thrombin generation / S. Butenas, R.F. Branda, C. van't Veer [et al.] // *Thrombosis and haemostasis.* – 2001. – Vol. 86, №2. – P.660–667.
16. Solum, N.O. Procoagulant expression in platelets and defects leading to clinical disorders / N.O. Solum // *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* – 1999. – Vol. 19, №12. – P.2841–2846.
17. Пантелеев М.А. Свертывание крови: биохимические основы / Пантелеев М.А., Атауллаханов Ф.И. // *Клиническая онкогематология.* – 2008. – Т.1, №1.
18. Шибeko А.М. Моделирование формирования фибринового сгустка и исследование влияния потока крови на этот процесс. Диссертация на соискание ученой степени / Шибeko А.М., 2009.
19. Reed, G.L. Platelet factor XIII increases the fibrinolytic resistance of platelet-rich clots by accelerating the crosslinking of alpha 2-antiplasmin to fibrin / G.L. Reed, G.R. Matsueda, E. Haber // *Thrombosis and haemostasis.* – 1992. – Vol. 68, №3. – P.315–320.

20. Platelet-related fibrinolysis resistance in patients suffering from PV. Impact of clot retraction and isovolemic erythrocytapheresis / T. Rusak, J. Piszcz, T. Misztal [et al.] // *Thrombosis research*. – 2014. – Vol. 134, №1. – P.192–198.
21. Mann, K.G. What is all that thrombin for? / K.G. Mann, K. Brummel, S. Butenas // *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. – 2003. – Vol. 1, №7. – P.1504–1514.
22. Walker, F.J. Regulation of blood coagulation by the protein C system / F.J. Walker, P.J. Fay // *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. – 1992. – Vol. 6, №8. – P.2561–2567.
23. Fractal kinetic behavior of plasmin on the surface of fibrin meshwork / I. Varjú, K. Tenekedjiev, Z. Keresztes [et al.] // *Biochemistry*. – 2014. – Vol. 53, №40. – P.6348–6356.
24. Platelets inhibit fibrinolysis in vitro by both plasminogen activator inhibitor-1-dependent and -independent mechanisms / W.P. Fay, D.T. Eitzman, A.D. Shapiro [et al.] // *Blood*. – 1994. – Vol. 83, №2. – P.351–356.
25. Heemskerk, J.W.M. Platelet activation and blood coagulation / J.W.M. Heemskerk, E.M. Bevers, T. Lindhout // *Thrombosis and haemostasis*. – 2002. – Vol. 88, №2. – P.186–193.
26. Smith, R.D. Platelet responses to compound interactions with thrombin / R.D. Smith, W.G. Owen // *Biochemistry*. – 1999. – Vol. 38, №28. – P.8936–8947.
27. Bajzar, L. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and an antifibrinolytic pathway / L. Bajzar // *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. – 2000. – Vol. 20, №12. – P.2511–2518.
28. Современные представления о системе фибринолиза и методах диагностики ее нарушений / Жалялов А.С., Баландина А.Н., Купраш А.Д. [и др.] // *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии*. – 2017. – Т.16, №1. – С.69–82.
29. Kinetics of the interaction of desAABB-fibrin monomer with immobilized fibrinogen / L.A. Chtcheglova, M. Vogel, H.J. Gruber [et al.] // *Biopolymers*. – 2006. – Vol. 83, №1. – P.69–82.

30. Cl- regulates the structure of the fibrin clot / E. Di Stasio, C. Nagaswami, J.W. Weisel, E. Di Cera // *Biophysical journal*. – 1998. – Vol. 75, №4. – P.1973–1979.
31. Lord, S.T. Molecular mechanisms affecting fibrin structure and stability / S.T. Lord // *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. – 2011. – Vol. 31, №3. – P.494–499.
32. Litvinov, R.I. Role of red blood cells in haemostasis and thrombosis / R.I. Litvinov, J.W. Weisel // *ISBT science series*. – 2017. – Vol. 12, №1. – P.176–183.
33. Lytic resistance of fibrin containing red blood cells / N. Wohner, P. Sótonyi, R. Machovich [et al.] // *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. – 2011. – Vol. 31, №10. – P.2306–2313.
34. Medved, L. Molecular mechanisms of initiation of fibrinolysis by fibrin / L. Medved, W. Nieuwenhuizen // *Thrombosis and haemostasis*. – 2003. – Vol. 89, №3. – P.409–419.
35. Collen, D. Molecular biology of human plasminogen. I. Physicochemical properties and microheterogeneity / D. Collen, L. de Maeyer // *Thrombosis et diathesis haemorrhagica*. – 1975. – Vol. 34, №2. – P.396–402.
36. Lijnen, H.R. Isolation and characterization of a human plasma protein with affinity for the lysine binding sites in plasminogen. Role in the regulation of fibrinolysis and identification as histidine-rich glycoprotein / H.R. Lijnen, M. Hoylaerts, D. Collen // *The Journal of biological chemistry*. – 1980. – Vol. 255, №21. – P.10214–10222.
37. Deutsch, D.G. Plasminogen: purification from human plasma by affinity chromatography / D.G. Deutsch, E.T. Mertz // *Science (New York, N.Y.)*. – 1970. – Vol. 170, №3962. – P.1095–1096.
38. Lucas, M.A. The binding of human plasminogen to fibrin and fibrinogen / M.A. Lucas, L.J. Fretto, P.A. McKee // *The Journal of biological chemistry*. – 1983. – Vol. 258, №7. – P.4249–4256.
39. Colman RW. Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice / Colman RW, 2006.
40. Proteolytic processing of human coagulation factor IX by plasmin / J.A. Samis, G.D. Ramsey, J.B. Walker [et al.] // *Blood*. – 2000. – Vol. 95, №3. – P.943–951.

41. Ligneous conjunctivitis in plasminogen-deficient mice / A.F. Drew, A.H. Kaufman, K.W. Kombrinck [et al.] // *Blood*. – 1998. – Vol. 91, №5. – P.1616–1624.
42. Levin EG. Cultured bovine endothelial cells produce both urokinase and tissue-type plasminogen activators / Levin EG // *J Cell Biol*. – 1982. – Vol. 94. – P.631–636.
43. Stalder M. Release of vascular plasminogen activator (vPA) after venous stasis: electrophoretic-zymographic analysis of free and complexed vPA / Stalder M // *Br J Haematol*. – 1985. – Vol. 61. – P.169–176.
44. Bányai L. Common evolutionary origin of the fibrin-binding structures of fibronectin and tissue-type plasminogen activator / Bányai L, Váradi A, Patthy L // *FEBS Letters*. – 1983. – Vol. 163. – P.37–41.
45. Rijken DC. Fibrinolytic properties of one-chain and two-chain human extrinsic (tissue-type) plasminogen activator / Rijken DC // *J Biol Chem*. – 1982. – Vol. 257. – P.2920–2925.
46. Higgins, D.L. Interaction of one-chain and two-chain tissue plasminogen activator with intact and plasmin-degraded fibrin / D.L. Higgins, G.A. Vehar // *Biochemistry*. – 1987. – Vol. 26, №24. – P.7786–7791.
47. Ranby, M. Enzymatic properties of the one- and two-chain form of tissue plasminogen activator / M. Ranby, N. Bergsdorf, T. Nilsson // *Thrombosis research*. – 1982. – Vol. 27, №2. – P.175–183.
48. Ranby, M. Studies on the kinetics of plasminogen activation by tissue plasminogen activator / M. Ranby // *Biochimica et biophysica acta*. – 1982. – Vol. 704, №3. – P.461–469.
49. Kinetics of the activation of plasminogen by human tissue plasminogen activator. Role of fibrin / M. Hoylaerts, D.C. Rijken, H.R. Lijnen, D. Collen // *The Journal of biological chemistry*. – 1982. – Vol. 257, №6. – P.2912–2919.
50. Norrman, B. Fibrinolysis mediated by tissue plasminogen activator. Disclosure of a kinetic transition / B. Norrman, P. Wallen, M. Ranby // *European journal of biochemistry*. – 1985. – Vol. 149, №1. – P.193–200.

51. Tsurupa, G. Identification and characterization of novel tPA- and plasminogen-binding sites within fibrin(ogen) alpha C-domains / G. Tsurupa, L. Medved // *Biochemistry*. – 2001. – Vol. 40, №3. – P.801–808.
52. Serpin-resistant mutants of human tissue-type plasminogen activator / E.L. Madison, E.J. Goldsmith, R.D. Gerard [et al.] // *Nature*. – 1989. – Vol. 339, №6227. – P.721–724.
53. Paoni NF. A slow clearing, fibrin-specific, PAI-1 resistant variant of tPA (T103N, KHRR 296-299 AAAA). / Paoni NF // *Thromb Haemost*. – 1993. – T.70. – C.307–312.
54. Stimulation of tissue-type plasminogen activator synthesis by retinoids in cultured human endothelial cells and rat tissues in vivo / T. Kooistra, J.P. Opdenberg, K. Toet [et al.] // *Thrombosis and haemostasis*. – 1991. – Vol. 65, №5. – P.565–572.
55. Medh, R.D. Stimulation of tissue plasminogen activator production by retinoic acid: synergistic effect on protein kinase C-mediated activation / R.D. Medh, L. Santell, E.G. Levin // *Blood*. – 1992. – Vol. 80, №4. – P.981–987.
56. Pharmacokinetics and systemic effects of tissue-type plasminogen activator in normal subjects / P. Tanswell, E. Seifried, P.C. Su [et al.] // *Clinical pharmacology and therapeutics*. – 1989. – Vol. 46, №2. – P.155–162.
57. Wing LR. Clearance of t-PA, PAI-1, and t-PA-PAI-1 complex in an isolated perfused rat liver system. / Wing LR // *J Lab Clin Med*. – 1991. – Vol. 117. – P.109–114.
58. Clearance of tissue plasminogen activator (TPA) and TPA/plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) complex: relationship to elevated TPA antigen in patients with high PAI-1 activity levels / W.L. Chandler, M.C. Alessi, M.F. Aillaud [et al.] // *Circulation*. – 1997. – Vol. 96, №3. – P.761–768.
59. Hepatic synthesis and clearance of components of the fibrinolytic system in healthy volunteers and in patients with different stages of liver cirrhosis / K. Huber, J.C. Kirchheimer, C. Korninger, B.R. Binder // *Thrombosis research*. – 1991. – Vol. 62, №5. – P.491–500.

60. Planas, A.M. Advances in translational medicine 2010 / A.M. Planas, R.J. Traystman // *Stroke*. – 2011. – Vol. 42, №2. – P.283–284.
61. Physiological consequences of loss of plasminogen activator gene function in mice / P. Carmeliet, L. Schoonjans, L. Kieckens [et al.] // *Nature*. – 1994. – Vol. 368, №6470. – P.419–424.
62. Carmeliet P. Targeted gene manipulation and transfer of the plasminogen and coagulation systems in mice / Carmeliet P // *Fibrinolysis*. – 1996. – Vol. 10. – P.195–213.
63. Husain, S.S. Purification and partial characterization of a single-chain high-molecular-weight form of urokinase from human urine / S.S. Husain, V. Gurewich, B. Lipinski // *Archives of biochemistry and biophysics*. – 1983. – Vol. 220, №1. – P.31–38.
64. Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer / K. Dano, P.A. Andreasen, J. Grondahl-Hansen [et al.] // *Advances in cancer research*. – 1985. – Vol. 44. – P.139–266.
65. Pannell, R. 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) / R. Pannell, V. Gurewich // *Blood*. – 1987. – Vol. 69, №1. – P.22–26.
66. van der Kaaden ME. Plasma clearance of urokinase-type plasminogen activator / van der Kaaden ME // *Fibrinolysis and Proteolysis*. – 1998. – T.12. – C.251–258.
67. Manchanda, N. Single chain urokinase. Augmentation of enzymatic activity upon binding to monocytes / N. Manchanda, B.S. Schwartz // *The Journal of biological chemistry*. – 1991. – Vol. 266, №22. – P.14580–14584.
68. Recruitment of labelled monocytes by experimental venous thrombi / C.L. McGuinness, J. Humphries, M. Waltham [et al.] // *Thrombosis and haemostasis*. – 2001. – Vol. 85, №6. – P.1018–1024.
69. Inhibitory role of plasminogen activator inhibitor-1 in arterial wound healing and neointima formation: a gene targeting and gene transfer study in mice / P.

- Carmeliet, L. Moons, R. Lijnen [et al.] // *Circulation*. – 1997. – Vol. 96, №9. – P.3180–3191.
70. Receptor-independent role of the urokinase-type plasminogen activator during arteriogenesis / E. Deindl, T. Ziegelhoffer, S.M. Kanse [et al.] // *FASEB journal* : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. – 2003. – Vol. 17, №9. – P.1174–1176.
71. Fibrinolysis in normal subjects--comparison between plasminogen activator inhibitor and other components of the fibrinolytic system / G. Nicoloso, J. Hauert, E.K. Kruithof [et al.] // *Thrombosis and haemostasis*. – 1988. – Vol. 59, №2. – P.299–303.
72. Hekman, C.M. Endothelial cells produce a latent inhibitor of plasminogen activators that can be activated by denaturants / C.M. Hekman, D.J. Loskutoff // *The Journal of biological chemistry*. – 1985. – Vol. 260, №21. – P.11581–11587.
73. Plasminogen activator inhibitor-1 mRNA is expressed in platelets and megakaryocytes and the megakaryoblastic cell line CHRF-288 / B.A. Konkle, P.K. Schick, X. He [et al.] // *Arteriosclerosis and thrombosis : a journal of vascular biology*. – 1993. – Vol. 13, №5. – P.669–674.
74. van Mourik, J.A. Purification of an inhibitor of plasminogen activator (antiactivator) synthesized by endothelial cells / J.A. van Mourik, D.A. Lawrence, D.J. Loskutoff // *The Journal of biological chemistry*. – 1984. – Vol. 259, №23. – P.14914–14921.
75. Dexamethasone induction of an inhibitor of plasminogen activator in HTC hepatoma cells / B.J. Cwikel, P.A. Barouski-Miller, P.L. Coleman, T.D. Gelehrter // *The Journal of biological chemistry*. – 1984. – Vol. 259, №11. – P.6847–6851.
76. Proteins of the fibrinolytic system in human thrombi / L.A. Robbie, B. Bennett, A.M. Croll [et al.] // *Thrombosis and haemostasis*. – 1996. – Vol. 75, №1. – P.127–133.
77. A lifelong bleeding disorder associated with a deficiency of plasminogen activator inhibitor type 1 / J. Dieval, G. Nguyen, S. Gross [et al.] // *Blood*. – 1991. – Vol. 77, №3. – P.528–532.

78. Deficiency of plasma plasminogen activator inhibitor 1 results in hyperfibrinolytic bleeding / M.H. Lee, E. Vosburgh, K. Anderson, J. McDonagh // *Blood*. – 1993. – Vol. 81, №9. – P.2357–2362.
79. Vaughan, D.E. Plasminogen activator inhibitor-1: a common denominator in cardiovascular disease / D.E. Vaughan // *Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research*. – 1998. – Vol. 46, №8. – P.370–376.
80. Carroll, V.A. The role of the plasminogen activation system in cancer / V.A. Carroll, B.R. Binder // *Seminars in thrombosis and hemostasis*. – 1999. – Vol. 25, №2. – P.183–197.
81. 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 / P.Y. Scarabin, M.F. Aillaud, P. Amouyel [et al.] // *Thrombosis and haemostasis*. – 1998. – Vol. 80, №5. – P.749–756.
82. Kawano T. Partial purification and properties of urokinase inhibitor from human placenta / Kawano T // *J Biochem (Tokyo)*. – 1970. – Vol. 67. – P.333–342.
83. Åstedt B. Purification of a specific placental plasminogen activator inhibitor by monoclonal antibody and its complex formation with plasminogen activation / Åstedt B // *Thromb Haemost*. – 1985. – Vol. 53. – P.122–125.
84. Differentiating cells of murine stratified squamous epithelia constitutively express plasminogen activator inhibitor type 2 (PAI-2) / B.C. Risse, H. Brown, R.M. Lavker [et al.] // *Histochemistry and cell biology*. – 1998. – Vol. 110, №6. – P.559–569.
85. Monocyte plasminogen activator inhibitor 2 (PAI-2) inhibits u-PA-mediated fibrin clot lysis and is cross-linked to fibrin / H. Ritchie, L.A. Robbie, S. Kinghorn [et al.] // *Thrombosis and haemostasis*. – 1999. – Vol. 81, №1. – P.96–103.
86. Fibrinolysis in pregnancy: a study of plasminogen activator inhibitors / E.K. Kruihof, C. Tran-Thang, A. Gudinchet [et al.] // *Blood*. – 1987. – Vol. 69, №2. – P.460–466.

87. Scherrer, A. Plasminogen activator inhibitor-2 in patients with monocytic leukemia / A. Scherrer, E.K. Kruithof, J.P. Grob // *Leukemia*. – 1991. – Vol. 5, №6. – P.479–486.
88. Plasminogen activator inhibitor 2 and urokinase-type plasminogen activator in plasma and leucocytes in patients with severe sepsis / L.A. Robbie, S. Dummer, N.A. Booth [et al.] // *British journal of haematology*. – 2000. – Vol. 109, №2. – P.342–348.
89. 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 / A.E. Mast, J.J. Enghild, S.V. Pizzo, G. Salvesen // *Biochemistry*. – 1991. – Vol. 30, №6. – P.1723–1730.
90. Collen, D. On the regulation and control of fibrinolysis. Edward Kowalski Memorial Lecture / D. Collen // *Thrombosis and haemostasis*. – 1980. – Vol. 43, №2. – P.77–89.
91. Sakurai Y. Trypsin-like endopeptidase(s) naturally entrapped in human blood α-2-macroglobulin / Sakurai Y, Takahashi T // *Biomed Res*. – 1996. – Vol. 17. – P.347–350.
92. The bleeding disorder in acute promyelocytic leukaemia: fibrinolysis due to u-PA rather than defibrination / B. Bennett, N.A. Booth, A. Croll, A.A. Dawson // *British journal of haematology*. – 1989. – Vol. 71, №4. – P.511–517.
93. Nesheim, M. Fibrinolysis and the plasma carboxypeptidase / M. Nesheim // *Current opinion in hematology*. – 1998. – Vol. 5, №5. – P.309–313.
94. Both cellular and soluble forms of thrombomodulin inhibit fibrinolysis by potentiating the activation of thrombin-activable fibrinolysis inhibitor / L. Bajzar, M. Nesheim, J. Morser, P.B. Tracy // *The Journal of biological chemistry*. – 1998. – Vol. 273, №5. – P.2792–2798.
95. Plasma procarboxypeptidase U in men with symptomatic coronary artery disease / A. Silveira, K. Schatteman, F. Goossens [et al.] // *Thrombosis and haemostasis*. – 2000. – Vol. 84, №3. – P.364–368.

96. Enhancement of rabbit jugular vein thrombolysis by neutralization of factor XI. In vivo evidence for a role of factor XI as an anti-fibrinolytic factor / M.C. Minnema, P.W. Friederich, M. Levi [et al.] // *The Journal of clinical investigation*. – 1998. – Vol. 101, №1. – P.10–14.
97. Brandt, J.T. Plasminogen and tissue-type plasminogen activator deficiency as risk factors for thromboembolic disease / J.T. Brandt // *Archives of pathology & laboratory medicine*. – 2002. – Vol. 126, №11. – P.1376–1381.
98. Isolated familial plasminogen deficiency may not be a risk factor for thrombosis / R.C. Tait, I.D. Walker, J.A. Conkie [et al.] // *Thrombosis and haemostasis*. – 1996. – Vol. 76, №6. – P.1004–1008.
99. Molecular and clinical spectrum of type I plasminogen deficiency: A series of 50 patients / K. Tefs, M. Gueorguieva, J. Klammt [et al.] // *Blood*. – 2006. – Vol. 108, №9. – P.3021–3026.
100. Thrombelastography and biomarker profiles in acute coagulopathy of trauma: a prospective study / S.R. Ostrowski, A.M. Sorensen, C.F. Larsen, P.I. Johansson // *Scandinavian journal of trauma, resuscitation and emergency medicine*. – 2011. – Vol. 19. – P.64.
101. Favaloro, E.J. Laboratory testing in disseminated intravascular coagulation / E.J. Favaloro // *Seminars in thrombosis and hemostasis*. – 2010. – Vol. 36, №4. – P.458–467.
102. Breen, K.A. The pathogenesis and management of the coagulopathy of acute promyelocytic leukaemia / K.A. Breen, D. Grimwade, B.J. Hunt // *British journal of haematology*. – 2012. – Vol. 156, №1. – P.24–36.
103. The impact of the fibrinolytic system on the risk of venous and arterial thrombosis / M.E. Meltzer, C.J.M. Doggen, P.G. de Groot [et al.] // *Seminars in thrombosis and hemostasis*. – 2009. – Vol. 35, №5. – P.468–477.
104. Gorog, D.A. Prognostic value of plasma fibrinolysis activation markers in cardiovascular disease / D.A. Gorog // *Journal of the American College of Cardiology*. – 2010. – Vol. 55, №24. – P.2701–2709.

105. Torr-Brown, S.R. Attenuation of thrombolysis by release of plasminogen activator inhibitor type-1 from platelets / S.R. Torr-Brown, B.E. Sobel // *Thrombosis research.* – 1993. – Vol. 72, №5. – P.413–421.
106. Venous thrombosis risk associated with plasma hypofibrinolysis is explained by elevated plasma levels of TAFI and PAI-1 / M.E. Meltzer, T. Lisman, P.G. de Groot [et al.] // *Blood.* – 2010. – Vol. 116, №1. – P.113–121.
107. Plasma levels of fibrinolytic proteins and the risk of myocardial infarction in men / M.E. Meltzer, C.J.M. Doggen, P.G. de Groot [et al.] // *Blood.* – 2010. – Vol. 116, №4. – P.529–536.
108. Diurnal variation of the fibrinolytic system / V. Grimaudo, J. Hauert, F. Bachmann, E.K. Kruihof // *Thrombosis and haemostasis.* – 1988. – Vol. 59, №3. – P.495–499.
109. Which hemostatic markers add to the predictive value of conventional risk factors for coronary heart disease and ischemic stroke? The Caerphilly Study / A. Smith, C. Patterson, J. Yarnell [et al.] // *Circulation.* – 2005. – Vol. 112, №20. – P.3080–3087.
110. Prospective study of fibrinolytic factors and incident coronary heart disease: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study / A.R. Folsom, N. Aleksic, E. Park [et al.] // *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* – 2001. – Vol. 21, №4. – P.611–617.
111. Fibrinolytic activation markers predict myocardial infarction in the elderly. The Cardiovascular Health Study / M. Cushman, R.N. Lemaitre, L.H. Kuller [et al.] // *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* – 1999. – Vol. 19, №3. – P.493–498.
112. van Tilburg, N.H. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and the risk for deep vein thrombosis / N.H. van Tilburg, F.R. Rosendaal, R.M. Bertina // *Blood.* – 2000. – Vol. 95, №9. – P.2855–2859.
113. Heylen, E. An update on the role of carboxypeptidase U (TAFIa) in fibrinolysis / E. Heylen, J. Willemse, D. Hendriks // *Frontiers in bioscience (Landmark edition).* – 2011. – Vol. 16. – P.2427–2450.

114. Bates, S.M. D-dimer assays in diagnosis and management of thrombotic and bleeding disorders / S.M. Bates // *Seminars in thrombosis and hemostasis*. – 2012. – Vol. 38, №7. – P.673–682.
115. Diagnostic accuracy of D-dimer test for exclusion of venous thromboembolism: a systematic review / M. Di Nisio, A. Squizzato, A.W.S. Rutjes [et al.] // *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. – 2007. – Vol. 5, №2. – P.296–304.
116. Diagnosis of DVT: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines / S.M. Bates, R. Jaeschke, S.M. Stevens [et al.] // *Chest*. – 2012. – Vol. 141, №2 Suppl. – P.e351S-418S.
117. KOWALSKI, E. An evaluation of the euglobulin method for the determination of fibrinolysis / E. KOWALSKI, M. KOPEC, NIEWIAROWSKI // *Journal of clinical pathology*. – 1959. – Vol. 12, №3. – P.215–218.
118. Kolev, K. Bleeding related to disturbed fibrinolysis / K. Kolev, C. Longstaff // *British journal of haematology*. – 2016. – Vol. 175, №1. – P.12–23.
119. Mandle, R.J., JR. Hageman-factor-dependent fibrinolysis: generation of fibrinolytic activity by the interaction of human activated factor XI and plasminogen / R.J. Mandle, JR, A.P. Kaplan // *Blood*. – 1979. – Vol. 54, №4. – P.850–862.
120. Intraoperative changes in blood coagulation and thrombelastographic monitoring in liver transplantation / Y.G. Kang, D.J. Martin, J. Marquez [et al.] // *Anesthesia and analgesia*. – 1985. – Vol. 64, №9. – P.888–896.
121. MacIvor, D. How do we integrate thromboelastography with perioperative transfusion management? / D. MacIvor, A. Rebel, Z.-U. Hassan // *Transfusion*. – 2013. – Vol. 53, №7. – P.1386–1392.
122. Effects of tranexamic acid on death, vascular occlusive events, and blood transfusion in trauma patients with significant haemorrhage (CRASH-2): a randomised, placebo-controlled trial / H. Shakur, I. Roberts, R. Bautista [et al.] // *Lancet (London, England)*. – 2010. – Vol. 376, №9734. – P.23–32.

123. Reduced plasma fibrinolytic potential is a risk factor for venous thrombosis / T. Lisman, P.G. de Groot, J.C.M. Meijers, F.R. Rosendaal // *Blood*. – 2005. – Vol. 105, №3. – P.1102–1105.
124. Reduced plasma fibrinolytic capacity as a potential risk factor for a first myocardial infarction in young men / M.E. Meltzer, C.J.M. Doggen, P.G. de Groot [et al.] // *British journal of haematology*. – 2009. – Vol. 145, №1. – P.121–127.
125. Reduced fibrinolysis and increased fibrin generation can be detected in hypercoagulable patients using the overall hemostatic potential assay / J.L. Curnow, M.-C. Morel-Kopp, C. Roddie [et al.] // *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. – 2007. – Vol. 5, №3. – P.528–534.
126. Identifying hypocoagulable states with a modified global assay of overall haemostasis potential in plasma / A. Antovic, M. Blomback, M. Sten-Linder [et al.] // *Blood coagulation & fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis*. – 2005. – Vol. 16, №8. – P.585–596.
127. Overall haemostatic potential can be used for estimation of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor-dependent fibrinolysis in vivo and for possible follow-up of recombinant factor VIIa treatment in patients with inhibitors to factor VIII / J.P. Antovic, A. Antovic, S. He [et al.] // *Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia*. – 2002. – Vol. 8, №6. – P.781–786.
128. Antovic, A. The overall hemostasis potential: a laboratory tool for the investigation of global hemostasis / A. Antovic // *Seminars in thrombosis and hemostasis*. – 2010. – Vol. 36, №7. – P.772–779.
129. Stroke after thrombolysis. Mortality and functional outcomes in the GUSTO-I trial. Global Use of Strategies to Open Occluded Coronary Arteries / J.M. Gore, C.B. Granger, M.L. Simoons [et al.] // *Circulation*. – 1995. – Vol. 92, №10. – P.2811–2818.
130. Thieman D. Thrombolytic therapy does not benefit elderly myocardial infarction patients / Thieman D // *Circulation*. – 2000. – Vol. 101. – P.2239–2246.
131. Mahaffey K. Neurosurgical evacuation of intracranial hemorrhage after thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: experience from the G U STO

- I trial / Mahaffey K, Granger C // *Am. Heart J.* – 1999. – Vol. 138 (3 Pt 1). – P.493–499.
132. Verstraete, M. Optimising thrombolytic therapy in elderly patients with acute myocardial infarction / M. Verstraete, D. Collen // *Drugs & aging.* – 1996. – Vol. 8, №1. – P.17–22.
133. Incidence and predictors of bleeding after contemporary thrombolytic therapy for myocardial infarction. The Global Utilization of Streptokinase and Tissue Plasminogen activator for Occluded coronary arteries (GUSTO) I Investigators / S.D. Berkowitz, C.B. Granger, K.S. Pieper [et al.] // *Circulation.* – 1997. – Vol. 95, №11. – P.2508–2516.
134. Single-bolus tenecteplase compared with front-loaded alteplase in acute myocardial infarction: the ASSENT-2 double-blind randomised trial / F. van de Werf, J. Adgey, D. Ardissino [et al.] // *Lancet (London, England).* – 1999. – Vol. 354, №9180. – P.716–722.
135. Roberts, I. Tranexamic acid in trauma: how should we use it? / I. Roberts // *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH.* – 2015. – Vol. 13 Suppl 1. – P.S195-9.
136. Ventricular fibrillation following administration of thrombolytic treatment. The EMIP experience. European Myocardial Infarction Project / J.P. Boissel, A. Castaigne, C. Mercier [et al.] // *European heart journal.* – 1996. – Vol. 17, №2. – P.213–221.
137. Alteplase at 0.6 mg/kg for acute ischemic stroke within 3 hours of onset: Japan Alteplase Clinical Trial (J-ACT) / T. Yamaguchi, E. Mori, K. Minematsu [et al.] // *Stroke.* – 2006. – Vol. 37, №7. – P.1810–1815.
138. Eisenberg, P.R. Paradoxical elevation of fibrinopeptide A after streptokinase: evidence for continued thrombosis despite intense fibrinolysis / P.R. Eisenberg, L.A. Sherman, A.S. Jaffe // *Journal of the American College of Cardiology.* – 1987. – Vol. 10, №3. – P.527–529.
139. Thromboplastin immobilized on polystyrene surface exhibits kinetic characteristics close to those for the native protein and activates in vitro blood

- coagulation similarly to thromboplastin on fibroblasts / O.A. Fadeeva, M.A. Panteleev, S.S. Karamzin [et al.] // *Biochemistry (Mosc.)*. – 2010. – Vol. 75, №6. – P.734–743.
140. Positive feedback loops for factor V and factor VII activation supply sensitivity to local surface tissue factor density during blood coagulation / A.N. Balandina, A.M. Shibeko, D.A. Kireev [et al.] // *Biophys.J.* – 2011. – Vol. 101, №8. – P.1816–1824.
141. Predicting prothrombotic tendencies in sepsis using spatial clot growth dynamics / N.P. Soshitova, S.S. Karamzin, A.N. Balandina [et al.] // *Blood.Coagul.Fibrinolysis*. – 2012. – Vol. 23, №6. – P.498–507.
142. Жалялов А.С. Экспериментальное исследование пространственной динамики фибринолиза in-vitro в присутствии урокиназы и стрептокиназы / Жалялов А.С. // *Описание публикации Ученые записки физического факультета*. – 2012. – Т.2. – С.2–6.
143. Initiation and propagation of coagulation from tissue factor-bearing cell monolayers to plasma: initiator cells do not regulate spatial growth rate / M.V. Ovanesov, N.M. Ananyeva, M.A. Panteleev [et al.] // *J.Thromb.Haemost.* – 2005. – Vol. 3, №2. – P.321–331.
144. Carr, M.E., Jr. Size and density of fibrin fibers from turbidity / Carr, M.E., Jr., J. Hermans // *Macromolecules*. – 1978. – Vol. 11, №1. – P.46–50.
145. Hemophilia A and B are associated with abnormal spatial dynamics of clot growth / M.V. Ovanesov, J.V. Krasotkina, L.I. Ul'yanova [et al.] // *Biochim.Biophys.Acta*. – 2002. – Vol. 1572, №1. – P.45–57.
146. Kinetics of Factor X activation by the membrane-bound complex of Factor IXa and Factor VIIIa / M.A. Panteleev, E.L. Saenko, N.M. Ananyeva, F.I. Ataullakhanov // *Biochem.J.* – 2004. – Vol. 381, №Pt 3. – P.779–794.
147. Circulating contact-pathway-activating microparticles together with factors IXa and XIa induce spontaneous clotting in plasma of hematology and cardiologic patients / E. Lipets, O. Vlasova, E. Urnova [et al.] // *PLoS.One*. – 2014. – Vol. 9, №1. – P.e87692.

148. Effect of factor VIII on tissue factor-initiated spatial clot growth / M.V. Ovanesov, E.G. Lopatina, E.L. Saenko [et al.] // *Thromb.Haemost.* – 2003. – Vol. 89, №2. – P.235–242.
149. More efficient reversal of dabigatran inhibition of coagulation by activated prothrombin complex concentrate or recombinant factor VIIa than by four-factor prothrombin complex concentrate / T.L. Lindahl, M. Wallstedt, K.M. Gustafsson [et al.] // *Thromb.Res.* – 2015. – Vol. 135, №3. – P.544–547.
150. Pharmacokinetics and fibrin specificity of alteplase during accelerated infusions in acute myocardial infarction / P. Tanswell, U. Tebbe, K.L. Neuhaus [et al.] // *J.Am.Coll.Cardiol.* – 1992. – Vol. 19, №5. – P.1071–1075.
151. Michels, H.R. Pharmacokinetics and hemostatic effects of saruplase in patients with acute myocardial infarction: comparison of infusion, single-bolus, and split-bolus administration / H.R. Michels, J.J. Hoffman, F.W. Bar // *J.Thromb.Thrombolysis.* – 1999. – Vol. 8, №3. – P.213–221.
152. A comparison of the pharmacokinetic properties of streptokinase and anistreplase in acute myocardial infarction / J.D. Gemmill, K.J. Hogg, J.M. Burns [et al.] // *Br.J.Clin.Pharmacol.* – 1991. – Vol. 31, №2. – P.143–147.
153. Thrombolysis in Myocardial Infarction (TIMI) Trial, Phase I: A comparison between intravenous tissue plasminogen activator and intravenous streptokinase. Clinical findings through hospital discharge / J.H. Chesebro, G. Knatterud, R. Roberts [et al.] // *Circulation.* – 1987. – Vol. 76, №1. – P.142–154.
154. Urokinase pulmonary embolism trial. Phase 1 results: a cooperative study // *JAMA.* – 1970. – Vol. 214, №12. – P.2163–2172.
155. Sakharov, D.V. Rearrangements of the fibrin network and spatial distribution of fibrinolytic components during plasma clot lysis. Study with confocal microscopy / D.V. Sakharov, J.F. Nagelkerke, D.C. Rijken // *J.Biol.Chem.* – 1996. – Vol. 271, №4. – P.2133–2138.
156. Influence of fibrin network conformation and fibrin fiber diameter on fibrinolysis speed: dynamic and structural approaches by confocal microscopy / J.P. Collet, D.

- Park, C. Lesty [et al.] // *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* – 2000. – Vol. 20, №5. – P.1354–1361.
157. The interplay between tissue plasminogen activator domains and fibrin structures in the regulation of fibrinolysis: kinetic and microscopic studies / C. Longstaff, C. Thelwell, S.C. Williams [et al.] // *Blood.* – 2011. – Vol. 117, №2. – P.661–668.
158. Direct microscopic monitoring of initial and dynamic clot lysis using plasmin or rt-PA in an in vitro flow system / N. Bizjak, F. Bajd, J. Vidmar [et al.] // *Thromb.Res.* – 2014. – Vol. 133, №5. – P.908–913.
159. Dynamic changes of fibrin architecture during fibrin formation and intrinsic fibrinolysis of fibrin-rich clots / J.P. Collet, C. Lesty, G. Montalescot, J.W. Weisel // *J.Biol.Chem.* – 2003. – Vol. 278, №24. – P.21331–21335.
160. Hindered dissolution of fibrin formed under mechanical stress / I. Varju, P. Sotonyi, R. Machovich [et al.] // *J.Thromb.Haemost.* – 2011. – Vol. 9, №5. – P.979–986.
161. TAFIa, PAI-1 and alpha-antiplasmin: complementary roles in regulating lysis of thrombi and plasma clots / N.J. Mutch, L. Thomas, N.R. Moore [et al.] // *J.Thromb.Haemost.* – 2007. – Vol. 5, №4. – P.812–817.
162. Modelling fibrinolysis: 1D continuum models / B.E. Bannish, J.P. Keener, M. Woodbury [et al.] // *Math.Med.Biol.* – 2014. – Vol. 31, №1. – P.45–64.
163. Wootton, D.M. An experimental and theoretical study on the dissolution of mural fibrin clots by tissue-type plasminogen activator / D.M. Wootton, A.S. Popel, B.R. Alevriadou // *Biotechnol.Bioeng.* – 2002. – Vol. 77, №4. – P.405–419.
164. Increased secretion of urokinase-type plasminogen activator by human lung microvascular endothelial cells / K. Takahashi, Y. Uwabe, Y. Sawasaki [et al.] // *Am.J.Physiol.* – 1998. – Vol. 275, №1 Pt 1. – P.L47-L54.
165. Functional role of proteolytic cleavage at arginine-275 of human tissue plasminogen activator as assessed by site-directed mutagenesis / K.M. Tate, D.L. Higgins, W.E. Holmes [et al.] // *Biochemistry.* – 1987. – Vol. 26, №2. – P.338–343.
166. Kruihof, E.K. Plasminogen activator inhibitor 1: development of a radioimmunoassay and observations on its plasma concentration during venous

- occlusion and after platelet aggregation / E.K. Kruithof, G. Nicolosa, F. Bachmann // *Blood*. – 1987. – Vol. 70, №5. – P.1645–1653.
167. Thrombin stimulates tissue plasminogen activator release from cultured human endothelial cells / E.G. Levin, U. Marzec, J. Anderson, L.A. Harker // *The Journal of clinical investigation*. – 1984. – Vol. 74, №6. – P.1988–1995.
168. Alteplase: double bolus versus accelerated regimen / M. Ruiz-Bailen, H.E. Aguayo de, B. Hurtado-Ruiz [et al.] // *Med.Sci.Monit*. – 2002. – Vol. 8, №10. – P.I85-I92.
169. A catalytic switch and the conversion of streptokinase to a fibrin-targeted plasminogen activator / G.L. Reed, A.K. Houg, L. Liu [et al.] // *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* – 1999. – Vol. 96, №16. – P.8879–8883.
170. Contributions of extravascular and intravascular cells to fibrin network formation, structure, and stability / R.A. Campbell, K.A. Overmyer, C.H. Selzman [et al.] // *Blood*. – 2009. – Vol. 114, №23. – P.4886–4896.
171. Pharmacokinetics and haemostatic status during consecutive infusions of recombinant tissue-type plasminogen activator in patients with acute myocardial infarction / E. Seifried, P. Tanswell, D. Ellbruck [et al.] // *Thromb.Haemost.* – 1989. – Vol. 61, №3. – P.497–501.
172. Randomized comparison of coronary thrombolysis achieved with double-bolus reteplase (recombinant plasminogen activator) and front-loaded, accelerated alteplase (recombinant tissue plasminogen activator) in patients with acute myocardial infarction. The RAPID II Investigators / C. Bode, R.W. Smalling, G. Berg [et al.] // *Circulation*. – 1996. – Vol. 94, №5. – P.891–898.
173. Catheter-directed thrombolysis with argatroban and tPA for massive iliac and femoropopliteal vein thrombosis / M. Sharifi, C. Bay, S. Nowroozi [et al.] // *Cardiovasc.Intervent.Radiol.* – 2013. – Vol. 36, №6. – P.1586–1590.
174. Thrombolytic therapy compared with mechanical recanalization in non-acute peripheral arterial occlusions: a randomized trial / M.F. Meyerovitz, D. Didier, J.J. Vogel [et al.] // *J.Vasc.Interv.Radiol.* – 1995. – Vol. 6, №5. – P.775–781.

175. Evaluation of combination thrombolytic therapy and timing of cardiac catheterization in acute myocardial infarction. Results of thrombolysis and angioplasty in myocardial infarction--phase 5 randomized trial. TAMI Study Group / R.M. Califf, E.J. Topol, R.S. Stack [et al.] // *Circulation*. – 1991. – Vol. 83, №5. – P.1543–1556.
176. Effects of intravenous urokinase versus alteplase on total pulmonary resistance in acute massive pulmonary embolism: a European multicenter double-blind trial. The European Cooperative Study Group for Pulmonary Embolism / G. Meyer, H. Sors, B. Charbonnier [et al.] // *J.Am.Coll.Cardiol.* – 1992. – Vol. 19, №2. – P.239–245.
177. Streptokinase vs alteplase in massive pulmonary embolism. A randomized trial assessing right heart haemodynamics and pulmonary vascular obstruction / N. Meneveau, F. Schiele, A. Vuilleminot [et al.] // *European heart journal*. – 1997. – Vol. 18, №7. – P.1141–1148.
178. Co-ordinated spatial propagation of blood plasma clotting and fibrinolytic fronts / A.S. Zhalyalov, M.A. Pantelev, M.A. Gracheva [et al.] // *PloS one*. – 2017. – Vol. 12, №7. – P.e0180668.
179. Chmielewska, J. Kinetics of the inhibition of plasminogen activators by the plasminogen-activator inhibitor. Evidence for 'second-site' interactions / J. Chmielewska, M. Rånby, B. Wiman // *The Biochemical journal*. – 1988. – Vol. 251, №2. – P.327–332.
180. Suenson, E. The course and prerequisites of Lys-plasminogen formation during fibrinolysis / E. Suenson, S. Thorsen // *Biochemistry*. – 1988. – Vol. 27, №7. – P.2435–2443.
181. Wiman, B. On the specific interaction between the lysine-binding sites in plasmin and complementary sites in alpha2-antiplasmin and in fibrinogen / B. Wiman, H.R. Lijnen, D. Collen // *Biochimica et biophysica acta*. – 1979. – Vol. 579, №1. – P.142–154.
182. Suenson, E. Secondary-site binding of Glu-plasmin, Lys-plasmin and miniplasmin to fibrin / E. Suenson, S. Thorsen // *The Biochemical journal*. – 1981. – Vol. 197, №3. – P.619–628.

183. Regulation of fibrinolytic activity of neutrophil leukocyte elastase, plasmin, and miniplasmin by plasma protease inhibitors / K. Kolev, I. Léránt, K. Tenekejiev, R. Machovich // *The Journal of biological chemistry*. – 1994. – Vol. 269, №25. – P.17030–17034.
184. Wu, J.H. A fluorescence quench and dequench assay of fibrinogen polymerization, fibrinogenolysis, or fibrinolysis / J.H. Wu, S.L. Diamond // *Analytical biochemistry*. – 1995. – Vol. 224, №1. – P.83–91.
185. Marshal AG. *Biological chemistry: principles, technics, and applications* / Marshal AG: New York: John Wiley and Sons, 1978.