

REVIEW ARTICLE

Actions of thrombin in the interstitium

G. G. DE RIDDER,* R. L. LUNDBLAD† and S. V. PIZZO*

*Department of Pathology, Duke University Medical Center, Durham; and †Department of Pathology, University of North Carolina, Chapel Hill, NC, USA

ИНТЕРСТИЦИАЛЬНЫЕ ЭФФЕКТЫ ТРОМБИНА

Перевод М.А. Нестеровой, интерна кафедры анестезиологии и реаниматологии ФПК и ППС ДВГМУ



ИНТЕРСТИЦИАЛЬНЫЕ ЭФФЕКТЫ ТРОМБИНА

Введение

Тромбин – ключевой фермент системы гемостаза, принимающий участие как в коагуляционном, так и в сосудисто-тромбоцитарных звеньях. Он напрямую активирует IX, VIII, V и I факторы свертывания крови. На мембранах тромбоцитов тромбин взаимодействует с протеаз-активированными рецепторами (PAR), усиливая активацию и агрегацию тромбоцитов.

Вполне вероятно, что тромбин принимает участие в этиологии интерстициального фиброза через образование фибрина и активацию фибробластов. Целью данного обзора – суммировать полученные данные в пользу данной гипотезы. Но, так же стоит понимать, что без достоверных доказательств роль тромбина в этиологии интерстициального фиброза чисто гипотетическая; однако, косвенные данные подтверждают роль тромбина в развитии интерстициального фиброза.

Образование и роль тромбина в сосудистом пространстве

Хорошо известна роль тромбина в системе гемостаза: образование фибрина из фибриногена через отщепление фибринопептидов А и В, активация тромбоцитов через расщепление протеаз-активированных рецепторов, активация/инактивация VIII и V факторов свертывания крови, активация фибрин-стабилизирующего XIII фактора свертывания крови, активация тромбин-активируемого ингибитора фибринолиза и XI фактора свертывания крови. Таким образом, тромбин отвечает за конечный результат системы гемостаза – регуляцию образования и растворение фибринового/тромбоцитарного сгустка. Процессы гемостаза и фибринолиза



происходят в сосудистом пространстве, но тромбин, принимающий участие в репаративных процессах и заживлении ран, может работать как в сосудистом, так и в экстравазальном пространствах. Сразу же после образования в кровеносном русле тромбин блокируется ингибиторами протеаз, например, антитромбином-III; однако, связанная с эндотелием фракция тромбина защищена от действия ингибиторов протеаз. Несмотря на то, что присутствие тромбина в крови заключается из его свойств (т.е. наличие тромбин-индуцированных продуктов, таких как фибринопептиды А и В), прямое измерение тромбина в крови или плазме невозможно. В действительности, переливание плазмы может пройти без явных тромботических осложнений, что предполагает быструю инактивацию активного тромбина плазмы; тромбин скорее всего находится в связанном состоянии с антитромбином или другими ингибиторами активатора плазминогена. Образование тромбина может быть измерено при изучении тромбин-антитромбинового комплекса. Вполне вероятно, что тромбин образуется и действует в микросреде и подвергается быстрой инактивации в большей части раствора.

Тромбин в экстравазальном пространстве

Существует немало данных о влиянии тромбина на белки и клеточные производные в экстравазальном пространстве. Впрочем, невозможно точно измерить активность тромбина в экстравазальном пространстве. Тромбин можно обнаружить в различных тканях: яичниках, головном мозге и почечной ткани. Тромбин-антитромбиновый комплекс в низких концентрациях присутствует в синовиальной жидкости, значительно увеличиваясь при ревматоидных артритах, не такое сильное повышение выявляется при остеоартритах. Образование тромбина может быть обнаружено в синовиальной жидкости, но оценка синтеза ограничена низкими концентрациями V и VIII факторов свертывания крови. Повышенный уровень



тромбин-антитромбинового комплекса в экссудате обнаруживается при бактериальном перитоните.

Тромбин в интерстициальном пространстве.

Тезисом данного обзора является то, что воспаление – это результат активации тромбина в интерстициальном пространстве с исходом в фиброз. Следующий постулат – образование тромбина в дальнейшем приводит к развитию интерстициального фиброза через активацию PAR-1 рецепторов фибробластов. Синтез тромбина в интерстициальном пространстве вторичен по отношению к воспалению, как к патологическому процессу, и не следует путать его роль в ремоделировании тканей репарации, так как это перивазальный процесс.

Интерстициальная жидкость занимает большой объем экстраваскулярного пространства, за исключением внутриклеточной жидкости. Большинство компонентов, необходимых для образования из протромбина тромбина, находятся в интерстициальном пространстве, их наличие можно обнаружить при анализе лимфы. Как и в крови, нельзя напрямую измерить тромбин в лимфатической или интерстициальной жидкости, но присутствие фибрина в этих жидкостях точно определяет присутствие тромбина в них. Тем не менее, единственное доказательство нахождения фибрина, как косвенного подтверждения присутствия тромбина в интерстициальной жидкости, было получено при изучении опухолей. Тромбин, который вводился кроликам или обезьянам, быстро связывался с эндогенными плазменными ингибиторами протеаз, и нет никаких данных о его выходе в экстравасальное пространство. Следовательно, тромбин интерстициального пространства синтезируется непосредственно в нем.

Механизм образования тромбина в интерстициальном пространстве.



Интерстиций – это неомогенное пространство с клеточными элементами, структурными компонентами (коллагеном и базальной мембраной), сигнальными молекулами и метаболитами. Нет не только тканеспецифической дифференцировки, но и гетерогенности в пределах одной ткани. Последние исследования опухолевых клеток выявили, что тканевой фактор на мембранах клеток связан с GPR78 (регулируемый глюкозой протеин 78), и этот комплекс должен диссоциировать для активации тканевого фактора.

1. Основной физиологической ролью VII фактора свертывания является активация X фактора свертывания крови. После повреждения сосуда VII фактор свертывания крови связывается с тканевым фактором и переходит в активную форму. Комплекс тканевого фактора и VII фактора свертывания крови служит для активации X фактора. Активированный X фактор в свою очередь участвует в процессах активации протромбина и переходе его в тромбин. Это «внешний» путь свертывания крови. Растворенный тканевой фактор находится в интерстициальной жидкости и лимфе. Антитела к тканевому фактору могут диагностироваться в экстравазальной жидкости: синовиальной жидкости, перитонеальной жидкости и плевральном выпоте. Кроме того, моноциты, попадающие в интерстиций, являются потенциальными источниками тканевого фактора, который локально или дистанционно продуцируется тканевыми фактор-нагруженными микрочастицами (MPs). Роль прокоагулянтной активности, связанной с тромбоцитами, моноцитами и MPs широко представлена в другом обзоре. Роль MPs в активации тромбина в интерстиции и развитии фиброза будут изучаться в дальнейшем. Будущие исследования с использованием моделей локального тканевого повреждения, такие как легочный фиброз, инфаркт миокарда или повреждение ткани после облучения, позволили бы выявить вход MPs в интерстиций и дополнительно изучить локальную прокоагулянтную и профибротическую активности MPs. Существуют



непосредственные клинические выводы для каждой модели локального тканевого повреждения по изучению роли MPs в развитии заболеваний. Нейтрофильные внеклеточные «ловушки» - это другие потенциальные источники тканевого фактора в интерстициальном пространстве. «Нагруженный информацией» путь тканевого фактора способствует гемостазу на специфических участках, что и продемонстрировало исследование Hoffman и соавторов при изучении активности тканевого фактора в комплексе с активированным VII фактором свертывания крови вокруг дермальных кровеносных сосудов даже при отсутствии воспаления.

Другая группа ученых сделала выводы на основе исследования внутривенного введения рекомбинантного VII фактора свертывания крови, который может связать активный VII фактор свертывания крови в интерстиции, окружающим дермальные сосуды, и не подавляется эндогенным активным комплексом тканевого фактора и фактора VII.

2. Контактная активация приводит к синтезу активированного X фактора свертывания крови и активации протромбина через «внутренний» путь свертывания крови. Контактная активация ускоряет свертываемость лимфы, и в последнее время появились данные, полученные *in vivo*, о том, что эндотелий сосудов способствует более значительной реализации «внутреннего» пути свертывания крови, чем тромбоциты. Эндотелий лимфатических сосудов может играть схожую роль в контактной активации.

3. Существует прямая активация протромбина через фибриноген-подобный протеин-2 (Fgl2) /фибролейкин. Наличие различных классов лейкоцитов в интерстиции почти в каждом типе патологического процесса предполагает, что клеточный Fgl2 путь может играть важную роль в образовании тромбина в интерстиции. Fgl2 активирует протромбин, как и активированный X фактор свертывания крови, что требует оптимального уровня ионов кальция, активированного V фактора свертывания крови, фосфолипидных везикул или



тромбоцитов. Предыдущие исследования экспрессии Fgl2 в вирусе мышинного гепатита-3 показали обширные фибриновые отложения в синусоидах гепатоцитов. Fgl2 - клеточный мембранный протеин с протромбиназной активностью в клетках. Растворимые формы Fgl2 секретируются через CD4+ и CD8+ Т-клеток, так же как через FOXP3+/CD25+ регуляторных Т-клеток. В данной ситуации, растворенный Fgl2 модулирует иммунный ответ, включая повреждение вирусной оболочки и потенцирование прогрессирования вирусного гепатита С, ускорение клеточного отторжения экспериментального почечного трансплантата. Тем не менее, отложение фибрина в почечном интерстиции ассоциируют с экспрессией Fgl2.

4. Другие возможные активаторы протромбина в интерстициальном пространстве – манноза-связывающая лецитин-ассоциированная сериновая протеаза-1 (MAPS-1), MAPS-2 и матриксная металлопротеиназа-12 (MMP12).

5. Высвобождение гистонов в интерстиции из погибших клеток может способствовать аутоактивации протромбина, что было выявлено с гистоном H4.

Несмотря на то, что тромбин хоть и образуется в интерстиции, но его синтез происходит медленно, в течение нескольких дней-недель, даже при наличии воспаления.

Регуляция функции тромбина в интерстициальном пространстве

Удаление тромбина из большей части раствора через связывание с экстрацеллюлярным матриксом может иметь решающее значение для его функции в интерстициальном пространстве. Bar-Shavit и соавторы продемонстрировали, что тромбин связывается с экстрацеллюлярным матриксом, депонируемым на культуре эндотелиальных клеток. Связанный тромбин полимеризует фибрин, активирует тромбоциты, гидролизует синтетический трипептидный нитроанилидный субстрат. Но в связанном



состоянии тромбину сложно образовывать комплекс с антитромбином, при этом он не ингибируется гирудином. Salatti и соавторы так же выяснили, что связанный тромбин в субэндотелиальном матриксе сохраняет возможность образовывать фибрин и агрегировать тромбоциты. Natton позже обнаружил, что обработка субэндотелия аорты кролика хондроитиназой-ABC уменьшает связывание тромбина, но его высвобождение происходит лишь малыми порциями.

Действие тромбина в интерстициальном пространстве может быть смодулировано наличием в этой микросреде экстрацеллюлярных компонентов матрикса, таких как коллаген и гиалуроновая кислота. Гиалуроновая кислота – высокомолекулярный, отрицательно заряженный полисахарид, занимающий значительную часть интерстициального пространства, который ограничивает поступление других растворимых молекул в зависимости от их заряда и размера. Например, альбумин проникает приблизительно в 60% интерстициального пространства. Активность тромбина в интерстиции может регулироваться скоростью его образования и инактивации. В нашей нынешней модели, скорость синтеза тромбина контролируется воспалительным процессом. Активность тромбина в крови определяется наличием там естественных антикоагулянтов, таких как ингибиторы сериновых протеаз - серпины. Двое из этих белков, антитромбин-III и кофактор гепарина 2 (КФГ-2), находятся в интерстициальном пространстве. КФГ-2 – серпин, преимущественно встречающийся в экстравазальном пространстве, ингибирующий тромбин. Инактивация тромбина КФГ-2 ускоряется при добавлении дерматана сульфата, что блокирует развитие фиброза в сердце. Протеазный нексин-1 – ингибитор протеаз, расположенный на мембране фибробластов, инактивирующий тромбин в присутствии гликозаминогликанов. Казалось бы, что в интерстициальном пространстве имеется достаточная концентрация ингибиторов для инактивации тромбина и



всех компонентов «внешнего» пути свертывания крови, активированных VII и X факторами свертывания крови, которые могут способствовать образованию тромбина. И этот же аргумент применим к крови, однако, чистая кровь сворачивается.

Тромбин и интерстициальный фиброз.

Фиброз – это патологическое разрастание соединительной ткани, как извращенный результат нормальных защитных механизмов организма, например, при заживлении ран или в ответ на хроническое воспаление. Фиброзирование может происходить в различных органах: почках, печени, сердце, легких, и играть значительную роль в заболеваниях данных органов. Интерстициальный фиброз в данном обзоре – это состояние, при котором накапливаются коллаген 1 и 3 типов, а также гликозаминогликаны. Anstee и соавторы обнаружили влияние гиперкоагуляции на развитие фиброза в печени. По обзорам различных исследований ученые выяснили, что тромбофилии такие как мутация Лейдена, дефицит протеина С, повышение уровня VIII фактора свертывания крови, могут способствовать развитию фиброза, и предположили, что образование тромбина, является одним из факторов, участвующих в формировании воспаления.

Известно, что фибробласты отвечают за синтез соединительной ткани. Мы подчеркиваем роль тромбина в первичной стимуляции фибробластов, необходимых для развития интерстициального фиброза. Фибрин, сформированный с помощью тромбина, устанавливается как условный матрикс для миграции фибробластов, которые синтезируют коллаген. Тромбин, связанный с фибриновым матриксом, активирует фибробласты.

Существует огромный пласт данных литературы по взаимодействию тромбина с фибробластами, который мы не можем полностью раскрыть в данном обзоре. По существу, мы ограничимся рассмотрением взаимодействия



тромбина с фибробластами, которое приведет к развитию интерстициального фиброза. Тромбин плотно связывается с фибробластами и активирует их через расщепление PAR-1 рецепторов. Hewitson и соавторы выявили, что *in vitro* тромбин является агонистом для фибробластов почек. В этих исследованиях наблюдалось увеличение пролиферации фибробластов в культуре клеток, рост экспрессии проколлагена $\alpha 1$ и степени сжатия коллагенового геля в присутствии тромбина. Тромбин так же может способствовать дифференцировке фибробластов в миофибробласты через PAR-1-опосредованный процесс. Миофибробласты ассоциируются с различными патологическими фиброзными процессами, такими как склеродермия, но они, кроме этого, и часть нормального процесса заживления ран. Snead и Insel продемонстрировали, что активация тромбина кардиальных фибробластов крыс происходила через расщепление PAR-1 рецепторов, и приводила к увеличению ингибитора активатора плазминогена (PAI-1), увеличению α SMA (α -гладкий мышечный актин как маркер миофибробластов) и увеличению синтеза экстрацеллюлярного матрикса. В последнее время, Atanelishvili и соавторы доказали, что тромбин поддерживает состояние легочного фиброза и способствует клеточному апоптозу совместно с фибропролиферацией, наблюдаемой при склеродермии легких. Процесс активации фибробластов не зависит от PAR-рецепторов. Это последнее наблюдение очень важно, с учетом разработки препаратов для блокирования функции PAR-рецепторов.

Тромбин-опосредованная активация эпителиальных клеток может воздействовать на фиброзирование через управление эпителиально-мезенхимального транспорта, в процессе которого задействованы PAR-1 и PAR-3 рецепторы. Тромбин запускает митогенез в гладкомышечных клетках. Фибробласты активируются цитокинами, образованными макрофагами и другими клетками, которые активированы тромбином. Один комплексный потенциальный механизм включает в себя инсулино-подобный фактор-



связывающий белок-3 (IGFBP-3), который связывает и удерживает неактивным инсулино-подобный фактор роста (IGF). IGFBP-3 подвержен деградации тромбином, в особенности когда не связан с эндотелиальными клетками (т.е. в интерстициальном пространстве). Деградация IGFBP-3 высвобождает действие IGF на фибробласты. *In vitro* эффекты IGF-1 на фибробласты различны в зависимости от состава и неподвижности субстрата культуры, что подчеркивает важность экстрацеллюлярного структурного компонента в развитии интерстициального фиброза.

Тромбин активирует матриксные металлопротеиназы (MMPs), участвующие в модулировании фиброза, взаимосвязь которых носит комплексный характер. Гепарансульфат повышает скорость активации тромбином про-MMP-2, обладающей профибротической активностью. С другой стороны, при рассмотрении модели блеомицин-индуцированного легочного фиброза, тромбин активирует pro-MMP-9, избыточная экспрессия которой наблюдается в макрофагах, что приводит к уменьшению фиброзированию ткани. Мы полагаем, что при острых и хронических повреждениях, когда биохимические свойства экстрацеллюлярного матрикса извращены, будут определять, является ли такой механизм профибротическим, или направлен на физиологическое заживление.

Варианты лечебных воздействий.

Последнее десятилетие отмечено созданием нескольких специфичных, низкомолекулярных ингибиторов тромбина, используемых в лечебной практике для профилактики тромбозов. Часть исследователей занимается изучением эффектов ингибиторов в моделях фиброза. Favreau и соавторы продемонстрировали, что прямой ингибитор тромбина мелагатран (ксимелагатран) предотвращает развитие фиброза *in vivo* на модели трансплантированной свиной почки. Bogatkevich и соавторы обнаружили, что



другой ингибитор тромбина, дабигатрана этаксилат, обладает противовоспалительной и противофиброзной активностью на модели легочного фиброза у мышей. Действие прямых ингибиторов тромбина на фиброз – результат плейотропных эффектов данных препаратов. Торможение интерстициального фиброза дабигатраном на модели блеомицин-индуцированного легочного фиброза мышей выявило отсутствие зависимости от концентрации дабигатрана, необходимой для антикоагулянтной активности препарата. Тем не менее, ингибирование всех витамин К-зависимых факторов свертывания крови варфарином не приводит к торможению интерстициального фиброза легких; более того, применение варфарина ухудшает функцию легких и повышает летальность среди пациентов. Несмотря на это, в одном небольшом исследовании было отражено снижение летальности при применении низкомолекулярного гепарина или варфарина и стероидов при лечении острых вспышек идиопатического легочного фиброза. Ковалентный комплекс гепарина и анротромбина-III или КФГ-2 используется в терапии при экстравазальной коагуляции. Wygreka и соавторы опубликовали обзор по потенциальному применению различных антикоагулянтов в лечении интерстициального легочного фиброза. Использование ингибиторов тканевого фактора в модели легочного повреждения не подтвердило эффективность на 3 этапе исследования. Гепарин, антитромбин, активированный протеин С и растворимый тромбомодулин оценивались при сепсисе с сомнительным прогнозом. Комплексные модели на основе системного введения этих макромолекулярных соединений не могут быть применены в естественных условиях, так как эти соединения не достигают интерстициального пространства.

Возможные методы изучения роли тромбина в интерстициальном пространстве



Выше изложенная информация подтверждает роль тромбина в развитии интерстициального фиброза. Хотя остается большой вопрос по механизму формирования тромбина в интерстиции. Несмотря на возможность извлечь ограниченное количество интерстициальной жидкости, используя блистер или тампон, не понятно, что представляет собой хороший репрезентативный образец этой жидкости. Вторая проблема – проведение анализа *ex vivo*. В качестве примера, поиск биомаркеров гиперкоагуляционных структур остается без ответа и по сей день. Но, возможно современные методы протеомики принесут свои плоды. Разработка новых аналитических методов, включая спектроскопию Рамана и ближнюю инфракрасную аутофлюоресценцию изображений, позволят в дальнейшем более четко изучать интерстициальную жидкость; к сожалению, эти технологии еще не применяются повсеместно. Создание *in vitro* моделей для изучения интерстициального фиброза может позволить прояснить отдельные моменты биохимических взаимодействий в этой области.

Блеомицин-индуцированный фиброз легких используется как модель идиопатического фиброза. Эффект нокаута или нокдауна на развитие блеомицин-индуцированного фиброза может применяться в определяющих путях распространения фиброза. По литературным данным эффект нокдауна более предпочтителен для исследований, чем эффект нокаута, ибо нокаут тромбина сам по себе летален. Снижение гепсина, трипсиноподобной сериновой протеазы с трансмембранным доменом 2 типа, тормозит активацию VII фактора свертывания крови и «внешний» путь свертывания крови, который оценивается через кинетику протромбинового времени. Гепсин – хороший вариант для модуляции образования интерстициального тромбина. Снижение Fgl2 оказалось успешным для определения роли данного фермента в опухолевом росте через образование тромбина; предположительное влияние Fgl2 на синтез тромбина в интерстиции обсуждалось ранее. Понижение X



фактора свертывания крови может быть наиболее пригодной моделью для изучения, с оговоркой, что активированный X фактор свертывания крови может влиять на развитие интерстициального фиброза независимо от тромбина. Если уменьшение X фактора свертывания крови способствует фиброзированию в блеомицин-индуцированной модели, то это можно было бы использовать в случае прямой активации протромбина.

Выводы

Большинство исследований доказали, что тромбин может синтезироваться в интерстициальном пространстве и способствовать развитию фиброза. Следовательно, ингибирование тромбина или его синтеза может применяться при лечении фиброза легких или цирроза печени. Но остались некоторые вопросы по тромбину в интерстициальном пространстве:

1. Каков механизм образования тромбина в интерстициальном пространстве? Возможная роль Fgl2 протромбиназы в образовании тромбина имеет практическую значимость. Ведь более эффективно предупредить образование тромбина, чем заблокировать синтезированный фермент.
2. Является ли последовательная активация тромбина новой целью в антифибротической терапии? Например, подавление пролиферации фибробластов через блокатор эндотелина-1 бозентан, который ускоряет деление фибробластов.
3. Большая ли часть тромбина связывается с экстрацеллюлярным матриксом? Если так, то это должно объяснять неспособность антитромбина и/или КФГ-2 ингибировать тромбин. Эти данные могут быть полезными для определения тромбин-антитромбинового или тромбин-КФГ-2 комплексов в лимфе или интерстициальной жидкости.
4. Может ли тромбин селективно ингибироваться в интерстициальном пространстве? Необходимо определять ингибиторы тромбина, особенно ту



часть, что находится в интерстициальном пространстве, для подтверждения данной концепции.

Fg12 – фибриноген-подобный протеин 2 типа

FOXP3 – семейство транскрипционных белков

GPR78 - регулируемый глюкозой протеин 78

IGF - инсулино-подобный фактор роста

IGFBP-3 - инсулино-подобный фактор-связывающий белок 3 типа

MAPS - манноза-связывающая лецитин-ассоциированная сериновая протеаза

MMP матриксная металлопротеиназа

MPs – микрочастицы

PAI – ингибитор активатора плазминогена

PAR – протеаз-активированные рецепторы

α SMA - α -гладкий мышечный актин

КФГ 2 - кофактор гепарина 2 типа



