

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ АНТИКОАГУЛЯНТЫ В ОРГАНИЗМЕ ЧЕЛОВЕКА И МЕХАНИЗМ ИХ ДЕЙСТВИЯ.

А.А. Мельник, к.б.н.

Кровь представляет собой важнейшую интегрирующую систему, которая обеспечивает обмен метаболитами и информацией между клетками и тканями. Протекая по замкнутому контуру она выполняет пластическую и защитную функцию, контактирует со всеми органами, доставляя кислород и питательные вещества. При повреждении кровеносного сосуда образуются сгустки, которые останавливают кровотечение. Система гемостаза требует баланса между образованием и растворением фибрина для предотвращения свободного тока крови в местах повреждения и для обеспечения перфузии крови через ткани. Слишком низкая свертываемость приводит к кровотечению, тогда как слишком высокая может способствовать образованию тромбов.

В месте повреждения сосудов быстро происходит генерация тромбина и образование фибрина. Как только начинается коагуляция, другие вещества в крови (физиологические антикоагулянты) действуют как тормозные механизмы, ограничивая свертываемость в определенной области повреждения, тем самым предотвращают образования сгустков, достаточно больших, чтобы препятствовать нормальному кровотоку.

Регуляция свертывания проявляется на различных уровнях - либо путем ингибирования ферментов, либо путем модуляции активности кофакторов. Наиболее важными физиологическими антикоагулянтами являются антитромбин III (АТ), Протеин С (РС), Протеин S (PS), тромбомодулин (ТМ), кофактор гепарина II (ГКII), ингибитор тканевого пути свертывания (ТАFI), гепарин и др. (1,2) (табл.1).

№ п/п	Наименование антикоагулянта	Механизм действия
1.	Антитромбин III	Прогрессивно действующий ингибитор тромбина, фактора Ха и в меньшей степени других факторов свертывания. Плазменный кофактор гепарина.
2.	Протеин С	Витамин К-зависимый ингибитор факторов Va и VIIa. Активируется комплексом «тромбин-тромбомодулин».
3.	Протеин S	Витамин К-зависимый кофактор РС.
4.	Тромбомодулин	Рецепторный белок, блокирующий тромбин, в комплексе с которым активирует РС и PS.
5.	Кофактор гепарина II	Образует комплекс с гепарином. Особенно активен в плазме, лишенной АТ III.
6.	Ингибитор тканевого пути свертывания (ТАFI)	Ингибитор комплекса «ТФ-VIIa-Ха-Са ⁺⁺ ».
7.	Гепарины	Образуют комплексы с АТIII, превращая его в антикоагулянт.
8.	Аннексин V	Один из мембраносвязанных гликопротеинов, ингибирующий взаимодействие ферментных факторов свертывания крови между собой на фосфолипидных мембранах клеток.
9.	α2-макроглобулин, α1-антитрипсин	Ингибиторы лейкоцитарных протеаз. Слабые ингибиторы тромбина, фактора XIa, калликрейна.

10.	β 2-гликопротеин-1	Гликопротеин, встроенный в фосфолипидные мембраны клеток. Неспецифический ингибитор факторов X и II.
11.	Контактные ингибиторы	Нарушают активацию факторов XII и XI.
12.	Ингибитор комплемента 1	Слабый ингибитор фактора XIa, XIIa, калликреина, C1-компонента комплемента.
13.	Ингибиторы полимеризации фибрин-мономеров	Тормозят образование фибрина. Значение в регуляции гемостаза не установлено.

Табл.1. Основные первичные физиологические антикоагулянты.

1. АНТИТРОМБИН III.

В начале 20-го века благодаря исследовательским работам Contanjan C., Morawitz P. и Howell W. обнаружено, что такой фермент как тромбин постепенно теряет свою активность при его добавлении к дефибринированной плазме или сыворотке (3-5). Основываясь на этом факте, было высказано предположение, что специфическим инактиватором этого фермента в плазме при нормальных физиологических условиях может быть присутствующий «антитромбин». В 1916 г. McLean J. выделил гепарин из печени, а также сердца и продемонстрировал его мощное антикоагулянтное действие (6). Доказательство в отношении его ингибирующего действия на очищенные прокоагулянты осуществили в 1939 г. Brinkhous K., et al., которые показали, что гепарин эффективен как антикоагулянт только в присутствии одного из компонентов плазмы, получившим название кофактор гепарина или антитромбин (7). В работах Waugh et al. и Monkhouse et al. (8,9) отмечена тесная связь между активностью антитромбина и гепарина в плазме. Эти исследователи предположили, что гепарин ускоряет в 50–100 раз скорость, с которой АТ нейтрализует тромбин. В 1968 году данная гипотеза была окончательно подтверждена Abilgaard U. (10,11).

Характеристика антитромбина III.

Антитромбин III синтезируется в печени и представляет собой гликопротеин с молекулярной массой 58 кДа, состоящий из одной аминокислотной цепи (432 аминокислоты на которых расположены четыре N-гликозилированные олигосахаридные цепи). Нормальная концентрация уровня АТ в плазме крови человека составляет примерно 0,12 мг/мл, что соответствует молярной концентрации 2,3 мкмоль с периодом полураспада около 3-х дней. Антитромбин III представляет собой ингибитор сериновой протеазы (SERPIN, **S**ERine **P**rotease **I**Nhibitors), который действует как псевдосубстрат для ингибирования факторов IIa (тромбин), IXa, Xa, XIa, XIIa, а также калликреина и плазмина посредством ковалентного связывания Arg393 в петле реактивного сайта АТ с активным центром сериновой протеазы. В плазме циркулируют две изоформы антитромбина, а именно формы α и β , не отличающиеся друг от друга по эффекту ингибирования тромбина, однако они различаются по своему родству к гепарину. В нормальных условиях 85-95% циркулирующего АТ гликозилированы по четырем молекулам аспарагиновой кислоты (относятся к α -изоформе). Остальные 5-15% представлены β -изоформой и имеют большее родство к гепарину.

Механизм действия антитромбина III.

Инактивация тромбина антитромбином III происходит путем образования ковалентной связи, в результате чего образуется неактивный стехиометрический комплекс (1:1) между ними, включающий взаимодействие активного серина тромбина и реактивного участка аргинина на АТ. Скорость нейтрализации сериновых протеаз под действием АТ протекает медленно в отсутствие гепарина, но значительно ускоряется в его присутствии. Поскольку терапевтический антитромботический эффект гепарина опосредован АТ, гепарин *in vivo* неэффективен при отсутствии или почти отсутствии АТ. У больных с наследственной недостаточностью АТ, после его введения, он временно заменяет отсутствующий.

Минимальной структурой, обеспечивающей активацию АТ гепарином, является пентасахарид, содержащий четыре специфически расположенные сульфогруппы (12).

Активирующее действие такого пентасахарида обусловлено влиянием на четвертичную структуру АТ, а именно на положение петли, содержащей реактивный центр (рис.1).

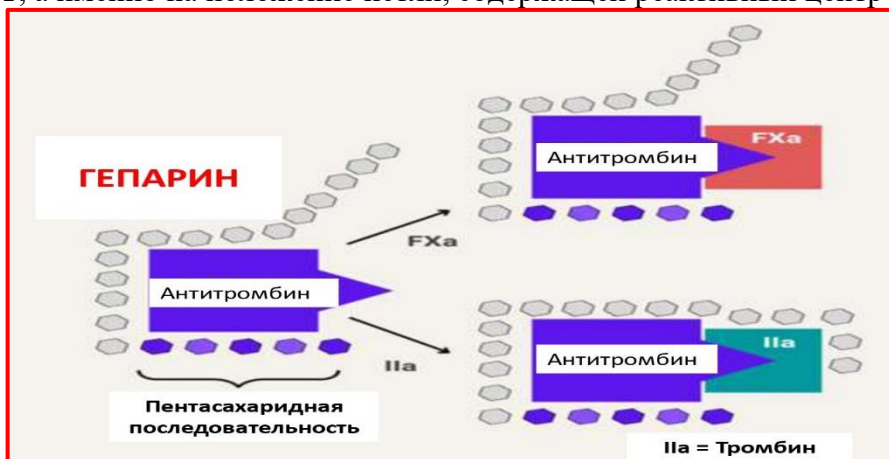


Рис.1. Механизм антикоагулянтного действия Антитромбина III.

Гепарин с высоким сродством связывается с АТ через пентасахаридную последовательность, в результате чего происходит изменение его конформационной структуры, что приводит к ускорению взаимодействия АТ с тромбином (фактор IIa) или фактором Ха. Изменение pH и ионной силы значительно влияют на результат этого взаимодействия. Это свидетельствует об электростатической природе связывания (13). Активация АТ, которая обеспечивается пентасахаридным фрагментом, содержащим в определенных положениях сульфогруппы, является очень важным, но не единственным механизмом, определяющим антикоагулянтное действие гепарина. Высокая скорость ингибирования тромбина, примерно на порядок превышающая скорость ингибирования фактора Ха, обусловлена тем, что в этой реакции гепарин не только активирует АТ, но связываясь с тромбином, выполняет роль матрицы, обеспечивая тем самым эффективное взаимодействие протеазы с ингибитором.

Таким образом, для эффективного ингибирования протеаз АТ необходим гепарин, который синтезируется тучными клетками. В стенке сосудов и на люминальной поверхности эндотелия присутствует значительное количество гликозаминогликанов и гликопротеинов, углеводные цепи которых несут гепариновые структуры, участвующие в активации АТ и нейтрализации тромбина.

Дефицит антитромбина III.

Дефицит антитромбина может быть приобретенным или наследственным.

Приобретенный дефицит антитромбина III.

Приобретенный дефицит АТ возникает в результате различных механизмов:

- усиление экскреции: почечная недостаточность, связанная с протеинурией, нефротическим синдромом, массивной кровопотерей;
- снижение синтеза: синдром недостаточности питания, заболевания печени, неонатальный период;
- увеличение потребления: ДВС-синдром, веноокклюзионная болезнь, оперативное вмешательство, преэклампсия, тяжелая травма;
- применение лекарственных препаратов: оральные эстрогены, L-аспарагиназа, гепарин.

Причины приобретенного дефицита антитромбина III обнаружить легче, чем наследственный дефицит (14,15).

Наследственный дефицит антитромбина III.

Это генетическое заболевание, вызывающее свертывание крови больше, чем обычно. Относится к аутосомно-доминантному расстройству, при котором человек наследует одну копию гена SERPINC1 на хромосоме 1q25.1, который кодирует АТ. Это состояние приводит к повышенному риску венозных и артериальных тромбозов с проявлением клини-

ческих симптомов обычно в юношеском возрасте. Наследственный дефицит АТ возникает тогда, когда человек получает одну аномальную копию гена антитромбина III одного из родителей. В зависимости от того, какая из функций АТ нарушена, различают несколько типов наследственного дефицита.

Тип I. Характеризуется тем, что в примерно одинаковой степени снижены функциональная активность АТ и его концентрации. Это классический, наиболее часто встречающийся тип дефицита.

Тип II. У пациентов концентрация АТ находится в пределах нормы, но его свойства изменены.

Так как сам по себе дефицит АТ не обязательно приводит к развитию тромбозов и носители могут дожить до глубокой старости, не имея тромботических осложнений, то лечение целесообразно рекомендовать при развитии тромбоза или наличии дополнительных факторов риска.

Показания для проведения Антитромбин III – тестирования.

1. Скрининг и диагностика дефицита АТ.
2. Рецидивирующие тромбозомболические явления.
3. Подозрение на наследственную недостаточность АТ.
4. Подозрение на приобретенный дефицит АТ.
5. Мониторинг при заместительной терапии.
6. Отсутствие ответа на терапию гепарином.

Референсные значения Антитромбина III: 83-128%.

Интерпретация значений показателей АТ III (% активности):

Повышение значений: Воспалительные процессы, острый гепатит, холестаз, дефицит витамина К, прием антикоагулянтов, тяжелый острый панкреатит, рак поджелудочной железы, менструация, лечение анаболическими препаратами.

Снижение значений (менее 70%): Врожденный дефицит, последний триместр беременности, послеоперационный период, заболевания печени (хронический гепатит, цирроз), острый ДВС-синдром, хроническая печеночная недостаточность, тромбозомболия, сепсис, введение гепарина, прием пероральных контрацептивов.

2. ПРОТЕИН С.

РС является витамин К-зависимым неактивным предшественником сериновой протеазы, которая является ключевым компонентом в физиологически важной природной антикоагулянтной системе.

Структура и функциональные аспекты.

РС синтезируется в печени в виде длинной одноцепочечной цепи, содержащей 461-аминокислоту. До секреции, он превращается в двухцепочечный полипептид, содержащий одну легкую (155 аминокислот) и одну тяжелую (262 аминокислот) цепи, которые связаны дисульфидными связями. Молекулярная масса зрелого белка составляет примерно 62 кДа. Циркулирует в плазме человека в концентрации 3-5 мкг/мл с периодом полувыведения 6-8 часов (16).

Активация протеина С.

РС преобразуется в активную сериновую протеазу, которая должна быть физиологически функциональной. N-концевая легкая цепь протеина С содержит девять γ-карбоксилированных остатков Glu (Gla-домен) и два домена, подобные эпидермальному фактору роста (EGF). Активация протеина С человека происходит путем ферментативного удаления небольшого пептида от тяжелой цепи (17). В естественных условиях активация опосредуется комплексом тромбин-тромбомодулин (18,19), а *in vitro* достигается с использованием тромбина, трипсина или протеаз различных змеиных ядов (20-22).

Тромбин-Тромбомодулин.

Активация PC только тромбином происходит медленно и не имеет физиологической функции. Однако, когда тромбин связывается с интегральным мембранным белком тромбомодулином, присутствующим в сосудах эндотелия, это приводит к увеличению скорости в 20 000 раз с которой тромбин активирует PC (23). Ионы Ca^{2+} являются важным регулятором, которые усиливают активацию протеина С за счет комплекса тромбин-ТМ и ингибируют активацию тромбина (24). Тромбин, поступающий в микроциркуляцию быстро связывается с ТМ и способствует активации PC (рис.2).

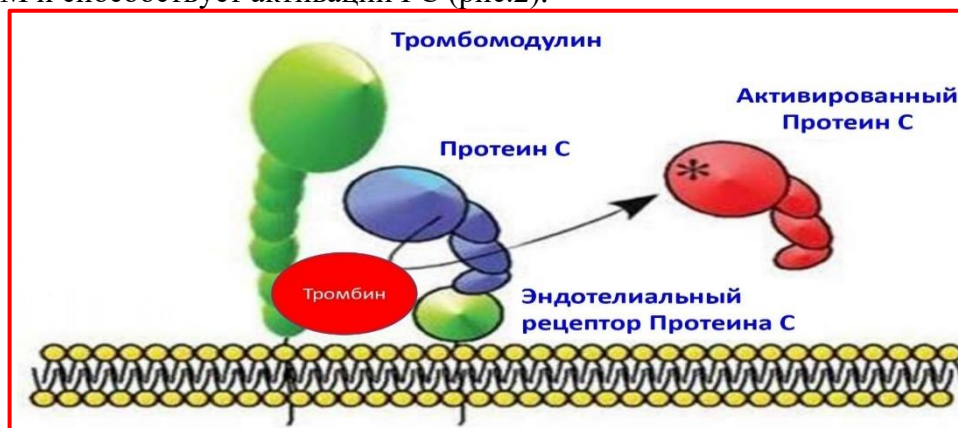


Рис.2. Активация Протеина С при связывании тромбина с тромбомодулином.

Змеиные яды.

Известно несколько змеиных ядов, которые могут активировать PC, в частности, из рода ядовитых змей *Agkistrodon* (щитомордник). Три сериновые протеазы были выделены и охарактеризованы из ядов этого семейства, включающее виды *A. bilineatus*, *A. h. halys* и *A. c. contortrix*, ферменты которых являются быстродействующими специфическими активаторами протеина С.

Функция активированного протеина С.

Доказана антикоагулянтная функция активированного PC за счет удлинения протромбинового времени (ПВ) и активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ). Активированный PC (APC) расщепляет и инактивирует два мембраносвязанных прокоагулянтных белка - фактор Va и фактор VIIIa, что приводит к снижению образования тромбина (рис.3).

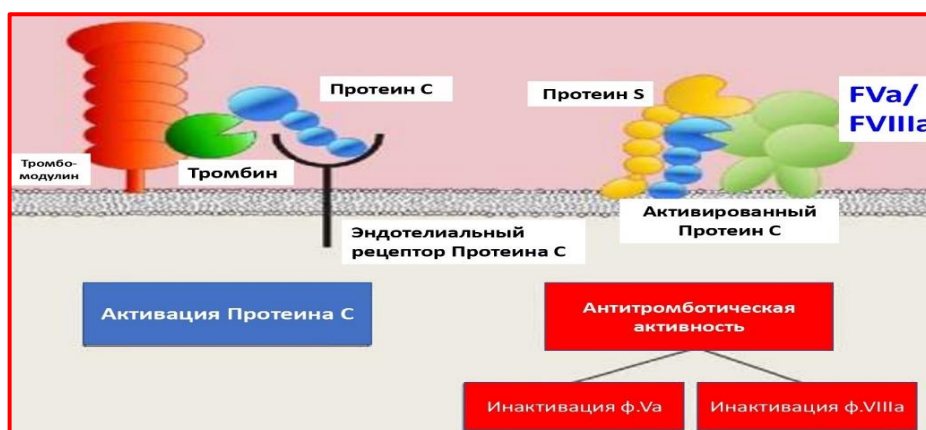


Рис.3. Активированный Протеин С расщепляет и инактивирует два мембраносвязанных прокоагулянтных белка - фактор Va и фактор VIIIa.

Кофакторы APC.

Молекулярные механизмы, принимающие участие в антикоагулянтной системе PC очень сложные и до сих пор не совсем понятные. Однако доказанным для проявления максималь-

ной каталитической эффективности APC являются кофакторы к которым относятся PS и фактор V (25).

Протеин S.

PS является витамин К-зависимым белком плазмы, который помимо того, что является кофактором APC, он также связывает регуляторный белок острой фазы системы комплемента C4bBP и опосредует его присоединение к фосфолипидам (26). Приблизительно 60% PS в плазме связывается с C4bBP. Только свободная форма PS имеет функцию кофактора APC. PS усиливает связывание APC с фосфолипидами тромбоцитов и эндотелиальными клетками.

Фактор V

Недавние исследования показали возможную антикоагулянтную роль фактора V. APC в присутствии фактора V и PS эффективно расщепляет свои субстраты, тогда как APC отдельно или вместе с фактором V является неэффективным. Считается, что PS и фактор V функционируют как синергетические кофакторы для APC в мультимолекулярном комплексе на поверхности мембраны.

Ингибиторы APC.

APC ингибируется относительно медленно, по крайней мере, тремя ингибиторами протеаз в плазме, включая ингибитор PC (известный как PAI-3), ингибитор трипсина и $\alpha 2$ - макроглобулин.

Дефицит протеина С.

Венозный тромбоз представляет собой серьезную медицинскую проблему. Патогенез заболевания, скорее всего, многофакторный и связанный как с косвенными, так и с наследственными факторами риска. Важность обнаружения патологии, лежащей в основе генетической причины является очевидной, так как до 40% пациенты с тромбозом имеют положительную семейную историю.

Наследственный дефицит протеина С

Актуальность оценки уровня протеина С в плазме пациентов стала очевидной начиная с 1981 года, когда о первом случае наследственного дефицита PC, связанного с тромботической болезнью сообщили Griffin et al. (27). Дальнейшие исследования это подтвердили. Было показано, что у лиц с изолированным дефицитом PC риск венозного тромбоза может увеличиваться в 6-9 раз. (28,29). Наследственный дефицит PC наследуется как аутосомно-доминантный признак. Гетерозиготы по дефициту PC имеют активность на уровне от 30 до 70% от нормы. У гомозигот с легким дефектом PC уровни находятся в пределах 10-24%, а с сильным дефектом (компаунд-гетерозиготы) этот показатель меньше 1%.

Нормальные уровни протеина С.

Нормальный уровень протеина С у взрослых составляет от 70% до 130%.

Распространенность дефицита PC.

Распространенность дефицита PC составляет 2-5% у пациентов с тромбоэмболией. Отдельные группы пациентов с тромбозом, возникшим в молодом возрасте, как правило, имеют более высокую распространенность (до 10-15%).

Клинические особенности.

Наиболее частым клиническим проявлением симптоматического гетерозиготного дефицита PC является тромбоз глубоких вен нижних конечностей. Первое тромботическое событие обычно происходит после полового созревания. Среди группы пациентов (50-80%) это проявляется в возрасте до 30–45 лет. К важным косвенным факторам риска, которые связаны с возникновением тромбоза, относятся хирургическое вмешательство, иммобилизация, беременность и прием оральных контрацептивов. Однако примерно 50% всех первых

тромботических событий и 65% рецидивов возникают спонтанно без видимой причины. В отличие от гетерозиготного состояния, которое само по себе является относительно слабым фактором риска тромбоза, пациенты с гомозиготным дефицитом РС обычно страдают от тяжелых и фатальных тромбозов в раннем возрасте. Клиническая картина проявляется в виде молниеносной пурпуры, тромбоза головного мозга и ДВС-синдрома. Частота гомозиготного дефицита протеина С встречается крайне редко (1 на 500 000 рождений).

Состояния и препараты, связанные с изменением уровня РС.

Пониженные уровни.

ДВС-синдром, тромбоз глубоких вен, легочная эмболия, заболевание печени, послеоперационные пациенты, инфекционные заболевания, рак, L-аспарагиназная терапия, респираторный дистресс-синдром, гемолитический уремический синдром, тромботическая тромбоцитопеническая пурпура, оральные антикоагулянты, дефицит витамина К, неонатальный период.

Повышенные уровни.

Диабет, нефротический синдром, поздняя беременность, оральные контрацептивы.

3. ПРОТЕИН S.

В 1977 году при очистке протеина С из бычьей плазмы исследователи обнаружили новый белок, содержащий γ -карбоксиглутамат (Gla), который они назвали протеином S в честь Seattle города его открытия (30). В последующие годы PS был признан белком с широким набором функций.

Белок S - это витамин К-зависимый гликопротеин плазмы. PS секретируется преимущественно эндотелиальными клетками, мегакариоцитами, гепатоцитами и клетками Лейдига (31). Эти клетки изначально синтезируют PS в виде белка-предшественника, имеющего 676 аминокислоту (32), который, после расщепления его сигнального и пропептидов превращается в белок из 635 аминокислот с м.в. 70 кДа, состоящий из N-концевого домена Gla, тромбонечувствительной области (TSR), четырех эпидермальных ростовых факторов (EGF)-подобных доменов и глобулина, связывающего половые гормоны (SHBG). Протеин S циркулирует в крови в концентрации 350 нмоль с периодом полураспада 42 часа. Около 60% PS связаны с компонентом комплемента C4bBP, а остальные 40% являются «свободными» (33). Преимущественно биологическую активность проявляет только свободная форма протеина S.

Антикоагулянтная функция протеина S.

Протеин S известен как кофактор антикоагулянтной и профибринолитической активности протеина С. Вместе с РС и мембранным рецептором к протеину С составляет так называемую «систему протеина С», которая обеспечивает ингибирование таких факторов свертывания как Va и VIIIa. Кроме этого, PS обладает и независимым от активированного протеина С антикоагулянтным действием, выступая кофактором ингибитора пути тканевого фактора, который ингибирует комплекс тканевого фактора (ф.VIIIa-TF) и как следствие, активацию фактора X (34).

Коферментная функция протеина S.

Так как PS является кофактором APC и TFPI, то это выражается в усилении функции APC в 3–10 раз, а TFPI в 3–5 раз (35) (рис.4).

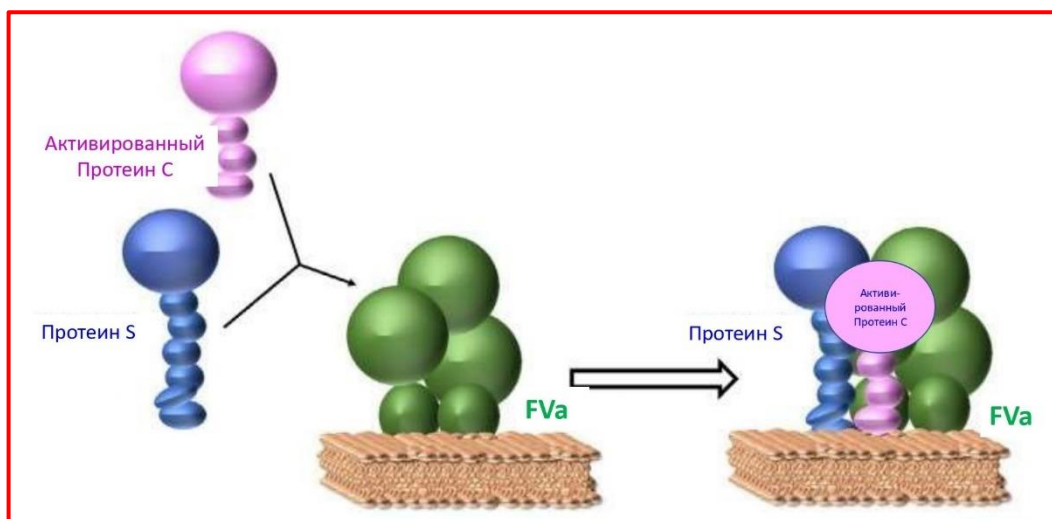


Рис. 4. Молекулярный механизм, демонстрирующий участие PS с активированным протеином С для инактивации фактора Va.

Кофактор для APC.

Наблюдается слабая протеолитическая активность APC при отсутствии взаимодействия с PS. Исследования показали необходимость участия таких доменов PS как TSR, EGF1 и EGF2 для APC (36-38).

Взаимодействие PS с FV, FVa и FXa.

Интересно, что зимогенная форма FV может действовать как антикоагулянт, образуя комплекс с протеином S для усиления PS-APC-опосредованной протеолитической инактивации FVa.

Генная регуляция и PS.

Ген PS расположен на третьей хромосоме 3q11.2 и состоит из 15 экзонов, 14 интронов (39,40). 5'-промоторная область гена PS содержит сайты связывания факторов транскрипции, такие как Sp1, рецептор эстрогена (ER), изоформу прогестерона B (PR-B), FOXA2, CRE/ATF, NFY, STAT3 и C/EBP β . PS также регулируется гормонами - прогестероном и эстрогеном (41). Прогестерон способствует экспрессии PS на 25%, в то время как эстроген подавляет экспрессию.

Референтные значения.

Содержание протеина S зависит от пола, гормонального фона, меняется с возрастом.

Нормальные уровни в плазме 65 – 135 %.

Таким образом, протеин S играет важную роль в предотвращении излишнего образования тромбов. При его дефиците баланс в свертывающей системе крови сдвигается в сторону гиперкоагуляции.

Недостаточность протеина S может носить приобретенный или наследственный характер.

1. Снижение протеина S.

Приобретенный дефицит.

Снижение концентрации в плазме свободного протеина S может происходить при аутоиммунных, острых воспалительных заболеваниях или обострении хронических. Это объясняется увеличением уровня C4-компонента комплемента и, соответственно, C4b-белка C4bBP. Доля связанного с ним протеина S увеличивается, а свободного - снижается. При болезнях почек, сопровождающихся нефротическим синдромом, также нарушается соотношение между свободной и общей формами протеина S из-за потери свободной. Тяжелые поражения печени, гиповитаминоз витамина K, терапия варфарином приводят к нарушению витамина K-зависимого синтеза протеина S. Уровень протеина S может также

снижаться при беременности, ДВС-синдроме, некоторых системных заболеваниях (красная волчанка), лечение L-аспарагиназой, приеме эстрогенов (оральных контрацептивов). Степень увеличения риска тромботических осложнений при приобретенном дефиците неизвестна.

Наследственный дефицит.

Более серьезное клиническое значение имеет наследственный дефицит протеина S. Ген, кодирующий данный белок, находится на третьей хромосоме. К настоящему моменту описано около 200 разных его мутаций. Недостаточность протеина S наследуется ауто-сомно - доминантно и является редким заболеванием. Человек получает от каждого родителя по одному варианту (аллелю) гена протеина S. Если мутация имеет место в обоих аллелях, то это свидетельствует о гомозиготной форме заболевания. Она встречается крайне редко (в настоящее время в литературе описано всего два случая), Проявляется у новорожденных и характеризуется развитием тяжелого диссеминированного свертывания крови. При гетерозиготном варианте один из аллелей нормален, а второй отсутствует или имеет мутацию, что приводит к синтезу только 50 % нормального протеина S (количественная и качественная недостаточность). Гетерозиготный дефицит протеина S в 10 раз увеличивает риск возникновения венозных и артериальных тромбозов, а также различных осложнений беременности (повторные выкидыши, преэклампсия, эклампсия, задержка внутриутробного развития плода).

В зависимости от содержания в крови общего количества протеина S и его свободной формы различают три типа наследственного дефицита:

I тип - количественная недостаточность - сниженный уровень общей и свободной форм протеина S;

II тип - качественная недостаточность - нормальный уровень общей и свободной форм, однако есть функциональная недостаточность;

III тип - снижение свободной формы при нормальном количестве общей.

2.Повышение протеина S.

Повышенный уровень свободного протеина S обычно не связан с медицинской проблемой и считается клинически незначимым.

4. ТРОМБОМОДУЛИН.

Белок тромбомодулин впервые был идентифицирован Esmon C. и Owen W. в 1981 (42). Он представляет собой трансмембранный гликопротеин и кодируется безинтронным геном (THBD), расположенный на хромосоме 20p12-сеп.2.

ТМ играет центральную роль для нормального функционирования всех органов, так как экспрессируется эндотелиальными клетками, выстилающими все сосуды (артерии, вены, капилляры и лимфатические сосуды). Принимает участие в регуляции свертывания крови, врожденного иммунитета, воспалении и переносе клеток. ТМ синтезируется несколькими типами клеток у мышей и человека, включая гемопоэтические клетки-предшественники, дендритные клетки, уротелиальные клетки, гладкомышечные клетки сосудов, моноциты и макрофаги, нейтрофилы, синцитиотрофобласт плаценты, роговицей эпителиальных клеток глаза, кератиноцитами, легочным альвеолярным эпителием, мезотелиальным эпителием и некоторыми опухолевыми клетками.

ТМ взрослого человека состоит из 557 аминокислотных остатков с молекулярным весом 74 кДа и включает 5 структурных областей (43-45) (рис. 5).

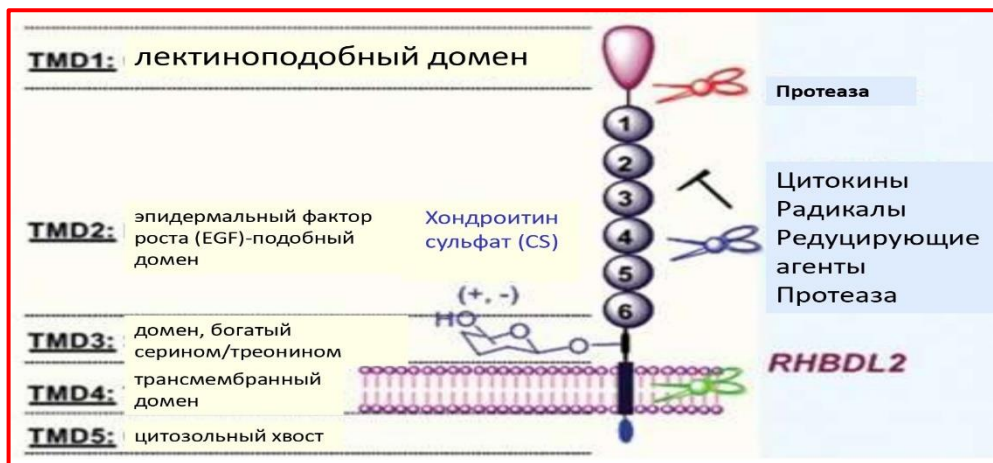


Рис. 5. Схематическое представление пяти структурных доменов ТМ.

Начиная от N-конца эти домены представляют собой: лектиноподобный домен (TMD1), эпидермальный фактор роста (EGF)-подобный домен (TMD2), домен, богатый серином/треонином (TMD3), трансмембранный домен (TMD4) и цитозольный хвост (TMD5).

Антикоагулянтная активность ТМ.

Тромбомодулин, также известный как антиген CD141, представляет собой эндотелиально-специфический мембранный рецептор типа 1, образующий комплекс с тромбином, что способствует активации протеина С. Это приводит к деградации факторов свертывания Va и VIIIa, снижению уровня тромбина. Растворимый тромбомодулин (sTM) был предложен в качестве потенциального маркера эндотелиального повреждения.

ТМ образует высокоаффинный комплекс с тромбином, ингибирующим образование фибрина. Комплексы Тромбин-ТМ активируют протеин С, а активированный протеин С инактивирует факторы коагуляции Va и VIIIa, тем самым подавляя дальнейшее образование тромбина (рис.6).



Рис.6. Механизм действия тромбомодулина как антикоагулянта (домены ТМ-D2 и ТМ-D3 тромбомодулина принимают участие в ингибировании тромбина и активации Протеина С).

Уровень тромбомодулина в сыворотке.

Кроме экспрессии в качестве мембранного белка на поверхности клеток, фрагменты ТМ также присутствуют в циркулирующей крови, моче и других биологических жидкостях. Эти фрагменты ТМ не имеют трансмембранного домена и известны как растворимый тромбомодулин (sTM). Они продуцируются из мембранного ТМ путем расщепления посредством протеолиза, либо химического или физического стресса. sTM состоит из фрагментов разной молекулярной массы, наличие которых может варьироваться в зависимости от заболевания (46-48). При различных патологиях увеличивается циркулирующий растворимый ТМ.

Уровни тромбомодулина колеблются от 3 до 300 нг/мл. Считается, что нормальный уровень составляет $3,1 \pm 1,3$ нг/мл.

Циркулирующий тромбомодулин при некоторых заболеваниях.

Инфекции и заболевания легких.

Острое повреждение легких и острый респираторный дистресс-синдром.

Патогенез острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) связан с серией воспалительных реакций, которые приводят к накоплению нейтрофилов в легких, что вызывает повреждение эндотелиальных клеток. Легкие богаты ТМ и имеют один из самых высоких уровней ТМ среди органов человека. Поскольку патогенез и клиническая картина проявления ОРДС тесно связаны с повреждением эндотелиальных клеток, sTM изучался как возможный биомаркер тяжести и прогрессирования заболевания. Было показано, что пациенты с ОРДС имеют повышенные уровни sTM в плазме и легочной жидкости. У пациентов с уже диагностированным ОРДС и имеющими тяжелые осложнения уровни sTM были выше по сравнению с теми, у кого были менее тяжелые проявления (49-52).

Сепсис.

Ключевую роль в патогенезе сепсиса играют неконтролируемые воспалительные реакции, вызывающие повреждение эндотелиальных клеток. Уровни sTM использовались в качестве диагностических и прогностических показателей у больных с сепсисом. Многочисленные исследования показали положительную корреляционную связь между уровнями sTM и тяжестью сепсиса как у взрослых, так и у детей (53).

Сердечно-сосудистые заболевания.

Появляется все больше экспериментальных данных о том, что эндотелиальная дисфункция представляет собой важный компонент сердечно-сосудистых заболеваний и инсульта. Уровни циркулирующего sTM тесно связаны с этими патологиями.

Диссеминированное внутрисосудистое свертывание крови.

У пациентов с ДВС-синдромом уровень sTM в плазме почти в два раза выше по сравнению с здоровыми. sTM лучше коррелировал с развитием органной недостаточности по сравнению с t-PA, PAI-1 и vWF (фактор фон Виллебранда) (54).

Инсульт.

Уровни sTM и vWF в плазме определяли для оценки риска ишемического и геморрагического инсультов. Более раннее исследование не обнаружили связи между повышенной концентрацией sTM и риском инфаркта головного мозга. Однако в более поздних работах было подтверждено, что уровень sTM связан с лакунарным инсультом (55).

Ожирение.

Изучалась концентрация sTM в плазме у детей и подростков с ожирением (56). Кроме определения концентрации sTM в плазме, исследовали также липидный профиль, креатинин и его клиренс. Обнаружено, что концентрация sTM в плазме в группе с ожирением достоверно выше, чем что в контрольной группе (56).

Рак.

Уровень sTM оценивали для прогноза при метастазировании рака. Было обнаружено, что злокачественные опухоли имели значительно более высокую концентрацию sTM по сравнению с доброкачественными. Эти результаты показали, что высокий уровень sTM может быть важным предиктором метастазирования и плохого прогноза у пациентов с раком. sTM является молекулярным маркером-кандидатом для пациентов с высоким риском метастазирования опухоли и может быть полезным для выбора соответствующей стратегии лечения (57-59).

Преэклампсия.

ТМ присутствует на синцитиотрофобластах и эндотелии сосудистого русла, покрывающего трофобластическую поверхность и является основным медиатором антикоагулянтной системы в плаценте. Minakami et al впервые изучили уровни sTM в плазме у женщин с преэклампсией по сравнению с нормальными беременными и небеременными женщинами.

Они обнаружили, что уровни sTM в плазме значительно повышен у женщин с преэклампсией по сравнению с контрольной группой (60-62).

Сахарный диабет.

Уровни sTM увеличиваются в биологических жидкостях пациентов с диабетом, а также имеют слабую положительную корреляцию с длительностью заболевания и количеством осложнений (63-66).

5. КОФАКТОР ГЕПАРИНА II.

В 1974 году Briginshaw G. и Shanberge J. показали, что человеческая плазма содержит два гепарин-зависимые ингибиторы тромбина. (67,68). При использовании исследователями методов гель-фильтрации и ионно-обменной хроматографии они идентифицировали 2 ингибитора. Один из ингибиторов принадлежал известному белку антитромбину III, а второй ингибитор не реагировал с фактором Ха и имел сравнительно слабую антитромбинную активность. Несколько лет спустя Tollefsen D. и Blank M. продемонстрировали, что ¹²⁵I-тромбин образует два SDS-стабильных комплекса в плазме, содержащей гепарин (69). Другими исследователями было отмечено, что активность кофактора гепарина плазмы превышает количество прогнозируемого исходя из концентрации антитромбинового антигена (70,71). Наличие второго кофактора гепарина, теперь называемого Кофактор Гепарина II или ГКII, была окончательно установлена, когда ингибитор был очищен до гомогенности из плазмы человека и показано, что он отличается от антитромбина (72).

Биохимия ГКII.

Ген ГКII (SERPIND1) идентифицирован у различных видов позвоночных, включая человека. Матричная РНК ГКII в высокой степени экспрессируется в печени и, по-видимому, является основным источником ГКII в плазме крови. Кофактор гепарина II циркулирует в плазме человека в концентрации 1 моль/л и имеет период полувыведения от 2 до 3 дней. Молекула ГКII человека представляет собой одноцепочечный гликопротеин, содержащий 480 аминокислотных остатков и гомологична антитромбину и другим представителям семейства серпинов с которыми имеет 30% идентичную аминокислотную последовательность (73).

В противоположность антитромбину ГКII воздействует на несколько протеаз свертывания крови, включая тромбин, фактор Ха и фактор IXa. Сам по себе он ингибирует тромбин очень медленно, но скорость резко возрастает в присутствии гепарина, гепаторансульфата или дерматансульфата, а также других природных, синтетических или полусинтетических полианионов (некоторые из них представляют фармакологический интерес), что приводит к стимулированию ГКII активности (74,75).

Физиологическая функция ГКII.

Обнаружение комплексов тромбин-ГКII у нормального человека в плазме убедительно свидетельствует о том, что ГКII ингибирует тромбин *in vivo* (76).

Повышение ГКII обнаружено у больных с наследственным дефицитом Антитромбина III и при беременности. Специфическое потребление ГКII отмечено у больных эритробластической анемией, что может быть одной из причин повышенного риска тромбообразования при гемолитических состояниях.

Тромбоз.

Несмотря на большие усилия многих исследователей, убедительная связь между дефицитом ГКII и венозным или артериальным тромбозом не была установлена (77).

Считается, что основная физиологическая функция ГКII может состоять не в инактивации тромбина в кровотоке, а в контроле его образования и активности в месте повреждения стенки сосуда.

6. ИНГИБИТОР ПУТИ ТКАНЕВОГО ФАКТОРА (TFPI).

В 1957 году впервые о наличии в плазме ингибитора, названного антиконвертином, который способен подавлять активацию проконвертина тромбопластином сообщил Hjord P.

(78). Почти 25 лет спустя Carson S. (79) сообщил, что липопротеины плазмы ингибируют каталитическую активность комплекса фактор VIIa/тканевой фактор, а Dahl et al. показали, что антиконвертиновая активность подтверждается обнаружением двух высокомолекулярных пиков при гель-фильтрации плазмы (доказательство связи с липопротеинами плазмы) (80). Этот ингибитор вначале имел несколько названий, а именно антитромбопластин, антиконвертин, ингибитор тканевого фактора, ингибитор внешнего пути и липопротеин-ассоциированный ингибитор свертывания крови. В 1991 году подкомитет Научно-исследовательского Комитета по стандартизации Международного общества тромбоза и гемостаза остановился на используемом в настоящее время названии - ингибитор пути тканевого фактора (TFPI). Хотя TFPI может играть дополнительную роль во врожденном иммунитете, защите от микроорганизмов, воспалении, ангиогенезе, метаболизме липидов, передаче сигналов клетками, пролиферации, миграции и апоптозе, все таки основная его роль – это участие в регуляции свертывания крови.

Структура TFPI.

TFPI имеет две изоформы. Первичная структура TFPI α уникальна. Зрелый белок имеет 276 аминокислотных остатков (32 кДа) и содержит кислую аминоконцевую область, за которой следуют три tandemных домена, ингибирующих протеазу типа Кунитца, а также основной карбоксиконцевой участок. В молекуле TFPI β отсутствуют домены Кунитца-3 и основные карбоксиконцевые домены TFPI α , а вместо них содержится карбоксиконцевая последовательность из 42 аминокислот. Предполагается, что эта карбоксиконцевая последовательность проявляет протеолитическое расщепление пептида. Молекулярная масса TFPI β меньше, чем TFPI α (22 против 32 кДа) (рис.7).

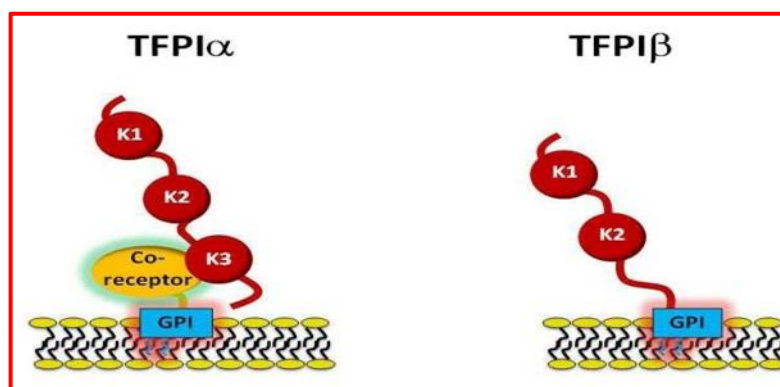


Рис.7. Структура TFPI α и TFPI β .

TFPI в плазме.

Средняя концентрация TFPI в плазме у здоровых людей составляет ~ 70 нг/мл (1,6 нМ) (81). Большая часть циркулирующего TFPI связана с липопротеинами ($\sim 80\%$). Повышенный уровень TFPI наблюдается при нарушениях липидного обмена (83-86). Наиболее высокое содержание TFPI характерно для IIa и IIb типов гиперлипидемии, что обусловлено повышенным уровнем Х-ЛПНП, являющихся основным носителем TFPI в плазме.

Антикоагулянтная функция TFPI.

Антикоагулянтная функция TFPI включает FXa-зависимое ингибирование ТФ/ FVIIa. TFPI напрямую ингибирует начальную фазу коагуляции, что включает обратимое ингибирование FXa.

После образования комплекса ТФ/FVIIa, циркулирующий зимоген FX связывается с ТФ/FVIIa (1) и после этого активируется (2). После активации FXa может диссоциировать (3a) от активирующего комплекса. Затем FXa может проявлять свою прокоагулянтную функцию или альтернативно, становиться инактивированным клеточно-ассоциированным или плазменным TFPI через свой второй домен Кунитца. Этот комплекс теперь может повторно связаться с ТФ/FVIIa (4) с первым доменом Кунитца TFPI, связывающимся с

активным центром FVIIa. Хотя это описывают как 2-х стадийный процесс, предпочтение отдается модели, согласно которой TFPI связывает и инактивирует TF-FVIIaFXa перед высвобождением FXa (3b/4). В каждом случае получается неактивный четвертичный комплекс (рис.8).

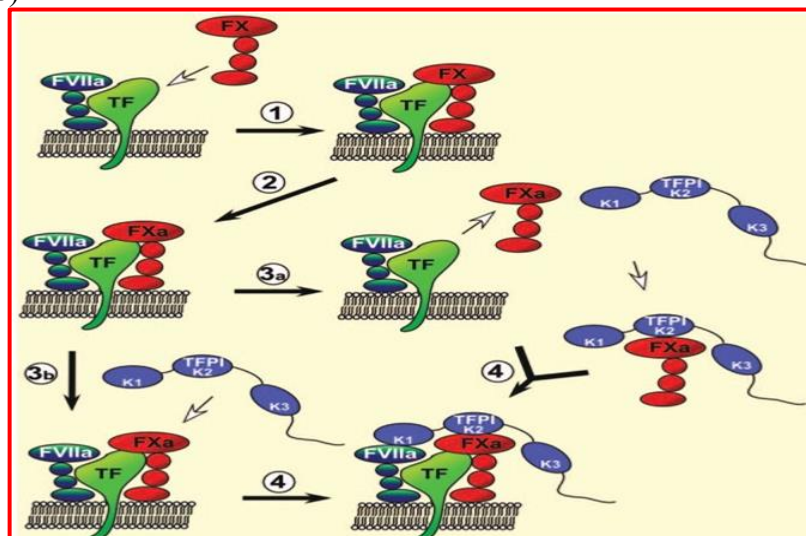


Рис.8. Схематическое представление ингибирования TF-зависимой коагуляции с помощью TFPI.

Ряд клинических и экспериментальных исследований свидетельствуют о важной роли TFPI в регуляции начальных стадий свертывания крови и поддержании стационарного уровня активации свертывания.

Хотя TFPI не является белком острой фазы, однако некоторое повышение его уровня наблюдается у пожилых, в 3-м триместре беременности, при нарушениях липидного обмена и онкологических больных.

7. ГЕПАРИН.

Гепарин является одним из старейших биологических антикоагулянтов, используемым в клинической медицине. Его антитромботические свойства были открыты более 100 лет назад. Однако, необходимо отметить, как это ни парадоксально, но гепарин обнаружен Mclean J. 1916 году при попытке выделения тромбопластического агента.

Гепарин представляет собой гетерогенную смесь сульфированных полисахаридов (гликоз-аминогликанов) с антикоагулянтным действием, которая содержится преимущественно в гранулах базофильных гранулоцитов и тучных клетках. В норме он присутствует в организме (продуцируется тучными клетками, встречается в основном в печени, легких и кишечнике). Гепарин получают экстракцией из слизистой кишечника свиней и легких крупного рогатого скота.

Гепарин превращает АТ в антикоагулянт немедленного действия. С фибриногеном, плазмином и адреналином образует комплексы, обладающие противосвертывающим и фибринолитическим действием. В малых концентрациях ингибирует реакцию между факторами IXa, VIII, аутокаталитическую активацию тромбина и действие фактора Ха. В высоких концентрациях ингибирует коагуляцию во всех фазах, в том числе и тромбин-фибриногеновую. Тормозит некоторые функции тромбоцитов. Гепарин оказывает свое действие только при наличии полноценного АТ в крови. Гепарин в плазме рекомендуется определять с целью мониторинга гепаринотерапии, определении резистентности больных к гепарину.

В течение столетия после его открытия гепарин успешно применялся в различных клинических ситуациях и продолжает оставаться одним из наиболее часто используемых антикоагулянтов сегодня. Были достигнуты определенные успехи в понимании механизма действия и спектра его биологической активности (87).

Заключение.

Физиологические антикоагулянты – ингибиторы факторов свертывания. Антикоагулянты тормозят, прекращают или угнетают действие активных факторов системы свертывания, чем поддерживают равновесие в системе гемостаза, препятствуя внутрисосудистому свертыванию крови. Физиологические антикоагулянты разделяют на первичные и вторичные. Первичные антикоагулянты всегда присутствуют в крови, а вторичные образуются в результате коагуляционных реакций.

Сохранение крови в жидком состоянии и регуляция скоростей взаимодействия факторов во все фазы коагуляции во многом определяются наличием в кровотоке естественных веществ, обладающих антикоагулянтной активностью. Жидкое состояние крови обеспечивает равновесие между факторами, активирующими свертывание крови и факторами, препятствующими его развитию, причем последние не выделяются в отдельную функциональную систему, так как реализация их эффектов чаще всего невозможна без участия прокоагулянтных факторов. Вещества, обладающие антикоагулянтной активностью, постоянно синтезируются в организме и с определенной скоростью выделяются в кровоток. К ним относятся антитромбин III, протеины С и S, тромбомодулин, кофактор гепарина II, ингибитор тканевого пути свертывания и др. Природные антикоагулянты оказывают выраженное действие на все фазы свертывания крови. Поэтому исследование их концентрации и активности при нарушениях свертывания является очень важным.

ЛИТЕРАТУРА

1. Riddel, J. P. Jr., Aouizerat, B. E., Miaskowski, C. & Lillicrap, D. P. Teories of blood coagulation. Journal of pediatric oncology nursing: oficial journal of the Association of Pediatric Oncology Nurses 24, 123–131, (2007).
2. R. Caterina, S. Husted, L. Wallentin et al. General mechanisms of coagulation and targets of anticoagulants (Section I). Thromb Haemost 2013; 109: 569–579.
3. Contanjan, C. (1895) Arch. Physiol. Norm. Pathol. 7, 45-53.
4. Morawitz, P. (1958) The Chemistry of Blood Coagulation, Charles C Thomas, Springfield, Illinois.
5. Howell, W. H. (1916) Harvey Lect. 2, 272-323.
6. McLean, J. (1916) Amer. J. Physiol. 41, 250-257.
7. Brinkhous, K, Smith H.P, Warner E.D. (1939) Amer. J. Physiol. 125, 683-687.
8. Waugh D.F., and Fitzgerald M.A. (1956) Amer. J. Physiol. 184, 627-638.
9. Monkhouse F.C., France E.S. (1955), Circ. Res.3, 397-402.
10. Abilgaard U, (1968), Scand. J.Clin. Lab Invest. 21, 89-91.
11. Abildgaard U: Binding of thrombin to antithrombin III. Scand J ClinLabInvest 1969, 24:23-27.
12. Choay J., Petitou M., Lormeau J.C. et al. Structure-activity relationship in heparin: a synthetic pentasaccharide with high affinity for antithrombin III and eliciting high anti-factor Xa activity. Biochem.Biohys.Res.Comm., 1983, 116, 492-499.
13. Nordenmann B., Danielson A., Bjork I. The binding of low-affinity and high-affinity heparin to antithrombin. Fluorescence studies. Eur.J.Biochem., 1978, 90,1-6.
14. Khor, B., Van Cott, EM. (2010). Laboratory tests for antithrombin deficiency. American Journal of Hematology.85 (12): 947-50.
15. Kottke-Marchant K. Arch Pathol Lab Med 2002; 126: 1326-1336.
16. Castellino FJ. Human protein C and activated protein C. Components of the human anticoagulation system. TCM 5, 55- 62 (1995).
17. Kisiel W. Human plasma protein C. Isolation, characterization and mechanism of action by α -thrombin. J Clin Invest 64, 761-769 (1979).

18. Esmon CT, Owen WG. Identification of an endothelial cell cofactor for thrombin catalyzed activation of protein C. *Proc Natl Acad Sci USA* 78, 2249-2252 (1981).
19. Esmon CT, Esmon NL, Harris KW. Complex formation between thrombin and thrombomodulin inhibits both thrombin catalyzed fibrin formation and factor V activation. *J Biol Chem* 257, 7944-7947 (1982).
20. Kisiel W, Ericsson LH, Davie EW. Proteolytic activation of protein C from bovine plasma. *Biochemistry* 16, 4893-4900 (1976).
21. Stocker K, Fischer H, Meier J et al. Protein C activators in snake venoms. *Behring Inst Mitt* 79, 37-47 (1986).
22. Marsh NA. Snake venoms affecting the haemostatic mechanism- a consideration of their mechanisms, practical applications and biological significance. *Blood Coagul Fibrinol* 5, 399- 410 (1994).
23. Bourin MC, Lindahl U. Glycosaminoglycans and the regulation of blood coagulation. *Biochem J* 289, 313-330 (1993).
24. Esmon CT. Molecular events that control the protein C anticoagulant pathway. *Thromb Haemost* 70, 29-35 (1993).
25. Dahlbäck B. Protein S and C4b-binding protein: components involved in the regulation of the protein C anticoagulant system. *Thromb Haemost* 66, 49-61 (1991).
26. Dahlbäck B. Protein S and C4b-binding protein: components involved in the regulation of the protein C anticoagulant system. *Thromb Haemost* 66, 49-61 (1991).
27. Griffin J, Evatt B, Zimmerman T et al. Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease. *J Clin Invest* 68, 1370-1373 (1981).
28. Allaart CF, Poort SR, Rosendaal FR et al. Increased risk of venous thrombosis in carriers of hereditary protein C deficiency defect. *Lancet* 341, 134-138 (1993).
29. Koster T, Rosendaal FR, Briët E et al. Protein C deficiency in a controlled series of unselected outpatients: an infrequent but clear risk factor for venous thrombosis (Leiden Thrombophilia study). *Blood* 10, 2756-2761 (1995).
30. Di Scipio RG, Hermodson MA, Yates SG, Davie EW. A comparison of human prothrombin, factor IX (Christmas factor), factor X (Stuart factor), and protein S. *Biochemistry*. 1977; 16:698–706.
31. Lemke G, Rothlin CV. Immunobiology of the TAM receptors. *Nat Rev Immunol*. 2008; 8:327–336.
32. Stenflo J. Contributions of Gla and EGF-like domains to the function of vitamin K-dependent coagulation factors. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 1999; 9:59–88.
33. Dahlbäck B. The tale of protein S and C4b-binding protein, a story of affection. *Thromb Haemost*. 2007; 98:90–96.
34. Castoldi E, Hackeng TM. Regulation of coagulation by protein S. *Curr Opin Hematol*. 2008; 15:529–536.
35. Hackeng TM, Seré KM, Tans G, Rosing J. Protein S stimulates inhibition of the tissue factor pathway by tissue factor pathway inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 103:3106–3113.
36. Walker FJ. Regulation of activated protein C by a new protein. A possible function for bovine protein S. *J Biol Chem*. 1980; 255:5521–5524.
37. Heeb MJ, Mesters RM, Tans G, Rosing J, Griffin JH. Binding of protein S to factor Va associated with inhibition of prothrombinase that is independent of activated protein C. *J Biol Chem*. 1993; 268:2872–2877.
38. Heeb MJ, Rosing J, Bakker HM, Fernandez JA, Tans G, Griffin JH. Protein S binds to and inhibits factor Xa. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 91:2728–2732.
39. García de Frutos P, Fuentes-Prior P, Hurtado B, Sala N. Molecular basis of protein S deficiency. *Thromb Haemost*. 2007; 98:543–556.
40. Ploos van Amstel JK, van der Zanden AL, Bakker E, Reitsma PH, Bertina RM. Two genes homologous with human protein S cDNA are located on chromosome 3. *Thromb Haemost*. 1987; 58:982–987.

41. Sankpal UT, Goodison S, Abdelrahim M, Basha R. Targeting Sp1 transcription factors in prostate cancer therapy. *Med Chem.* 2011; 7:518–525.
42. Esmon CT, Owen WG. Identification of an endothelial cell cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;78(04):2249–2252.
43. Suzuki K, Kusumoto H, Deyashiki Y, Maruyama I, Zushi M, Kawahara S, Honda G, Yamamoto S, Horiguchi S: Structure and expression of human thrombomodulin, a thrombin receptor on endothelium acting as a cofactor for protein C activation. *EMBO J* 1987, 6:1891-1897.
44. Jackman RW, Beeler DL, Fritze L, Soff G, Rosenberg RD. Human thrombomodulin gene is intron depleted: nucleic acid sequences of the cDNA and gene predict protein structure and suggest sites of regulatory control. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987; 84(18):6425-6429.
45. Dittman WA, Majerus PW. Structure and function of thrombomodulin: a natural anti-coagulant. *Blood.* 1990;75(2):329-336.
46. Boehme MWJ, Galle P, Stremmel W. Kinetics of thrombomodulin release and endothelial cell injury by neutrophil-derived proteases and oxygen radicals. *Immunology* 2002;107(03):340–349.
47. Ishii H, Majerus PW. Thrombomodulin is present in human plasma and urine. *J Clin Invest* 1985;76(06):2178–2181.
48. Conway EM, Nowakowski B. Biologically active thrombomodulin is synthesized by adherent synovial fluid cells and is elevated in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Blood* 1993; 81(03):726–733.
49. Rousseau A, Favier R, Van Dreden P. Elevated circulating soluble thrombomodulin activity, tissue factor activity and circulating procoagulant phospholipids: new and useful markers for pre-eclampsia? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2009;146(01): 46–49.
50. Brunelli T, Prisco D, Fedi S, et al. High prevalence of mild hyperhomocysteinemia in patients with abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg* 2000;32(03):531–536.
51. Donnelly SC, MacGregor I, Zamani A, et al. Plasma elastase levels and the development of the adult respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151(05):1428–1433.
52. Bajaj MS, Kuppuswamy MN, Manepalli AN, Bajaj SP. Transcriptional expression of tissue factor pathway inhibitor, thrombomodulin and von Willebrand factor in normal human tissues. *Thromb Haemost* 1999;82(03):1047–1052.
53. 105 Mihajlovic DM, Lendak DF, Draskovic BG, et al. Thrombomodulin is a strong predictor of multiorgan dysfunction syndrome in patients with sepsis. *Clin Appl Thromb Hemost* 2015;21(05):469–474.
54. Gando S, Nakanishi Y, Kameue T, Nanzaki S. Soluble thrombomodulin increases in patients with disseminated intravascular coagulation and in those with multiple organ dysfunction syndrome after trauma: role of neutrophil elastase. *J Trauma* 1995; 39(04):660–664.
55. Nomura E, Kohriyama T, Kozuka K, Kajikawa H, Nakamura S, Matsumoto M. Significance of serum soluble thrombomodulin level in acute cerebral infarction. *Eur J Neurol* 2004;11(05): 329–334.
56. Urban M, Wojtkielewicz K, Głowińska B, Peczyńska J. [Soluble thrombomodulin—a molecular marker of endothelial cell injury in children and adolescents with obesity]. *Endokrynol Diabetol Chor Przemiany Materii Wieku Rozw* 2005;11(02):73–77.
57. Hanly AM, Winter DC. The role of thrombomodulin in malignancy. *Semin Thromb Hemost* 2007;33(07):673–679.
58. Iqbal S. Role of thrombomodulin in cancer biology. *Breast* 2000;9 (05):264–266.
59. Asanuma K, Nakamura T, Asanuma Y, et al. Serum thrombomodulin as a metastatic and prognostic marker in soft tissue sarcomas. *Cancer Biomark* 2019;26(02):163–170.
60. Minakami H, Takahashi T, Izumi A, Tamada T. Increased levels of plasma thrombomodulin in preeclampsia. *Gynecol Obstet Invest* 1993;36(04):208–210.
61. Bontis J, Vavilis D, Agorastos T, Zournatzi V, Konstantinidis T, Tagou K. Maternal plasma level of thrombomodulin is increased in mild preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1995;60 (02):139–141.

62. Dusse LM, Carvalho MG, Getliffe K, Voegeli D, Cooper AJ, Lwaleed BA. Increased circulating thrombomodulin levels in pre-eclampsia. *Clin Chim Acta* 2008;387(1-2):168–171.
63. Gabat S, Keller C, Kempe HP, et al. Plasma thrombomodulin: a marker for microvascular complications in diabetes mellitus. *Vasa* 1996;25(03):233–241.
64. Aslan B, Eren N, Cığırli Ş, Müldür F, Yücel N. Evaluation of plasma protein C antigen, protein C activity and thrombomodulin levels in type 2 diabetic patients. *Turk J Med Sci* 2005;35:305–310.
65. Lorenzi M, Cagliero E, Toledo S. Glucose toxicity for human endothelial cells in culture. Delayed replication, disturbed cell cycle, and accelerated death. *Diabetes* 1985;34(07):621–627.
66. von Scholten BJ, Reinhard H, Hansen TW, et al. Markers of inflammation and endothelial dysfunction are associated with incident cardiovascular disease, all-cause mortality, and progression of coronary calcification in type 2 diabetic patients with microalbuminuria. *J Diabetes Complications* 2016;30(02): 248–255.
67. Briginshaw GF, Shanberge JN. Identification of two distinct heparin cofactors in human plasma. Separation and partial purification. *Arch Biochem Biophys*. 1974;161:683– 690.
68. Briginshaw GF, Shanberge JN. Identification of two distinct heparin cofactors in human plasma. II. Inhibition of thrombin and activated factor X. *Thromb Res*. 1974;4:463–477.
69. Tollefsen DM, Blank MK. Detection of a new heparin-dependent inhibitor of thrombin in human plasma. *J Clin Invest*. 1981;68:589–596.
70. Friberger P, Egberg N, Holmer E, Hellgren M, Blombäck M. Antithrombin assay - the use of human or bovine thrombin and the observation of a “second” heparin cofactor. *Thromb Res*. 1982;25:433–436.
71. Griffith MJ, Carraway T, White GC, Dombrose FA. Heparin cofactor activities in a family with hereditary antithrombin III deficiency: evidence for a second heparin cofactor in human plasma. *Blood*. 1983;61:111–118.
72. Tollefsen DM, Majerus DW, Blank MK. Heparin cofactor II. Purification and properties of a heparin-dependent inhibitor of thrombin in human plasma. *J Biol Chem*. 1982;257:2162–2169.
73. Kamp P, Strathmann A, Ragg H. Heparin cofactor II, antithrombin-beta and their complexes with thrombin in human tissues. *Thromb Res*. 2001;101:483–491.
74. Tollefsen DM, Pestka CA, Monafó WJ. Activation of heparin cofactor II by dermatan sulfate. *J Biol Chem*. 1983;258:6713–6716.
75. Colwell NS, Grupe MJ, Tollefsen DM. Amino acid residues of heparin cofactor II required for stimulation of thrombin inhibition by sulphated polyanions. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1431:148–156.
76. Liu L, Dewar L, Song Y, Kulczycky M, Blajchman MA, Fenton JW, 2nd, Andrew M, Delorme M, Ginsberg J, Preissner KT, Ofosu FA. Inhibition of thrombin by antithrombin III and heparin cofactor II in vivo. *Thromb Haemost*. 1995;73:405–412.
77. Tollefsen DM. Heparin cofactor II deficiency. *Arch Pathol Lab Med*. 2002; 126:1394–1400.
78. Hjort PF. Intermediate reactions in the coagulation of blood with tissue thromboplastin. *Scand J Clin Lab Invest*. 1957; 9(suppl 27):1–182.
79. Carson SD. Plasma high density lipoproteins inhibit the activation of coagulation factor X by factor VIIa and tissue factor. *FEBS Lett*. 1981; 132:37–40.
80. Dahl PE, Abildgaard U, Larsen ML, Tjensvoll L. Inhibition of activated coagulation factor VII by normal human plasma. *Thromb Haemost*. 1982; 48:253–256.
81. Dahm A, Van Hylckama Vlieg A, Bendz B, Rosendaal F, Bertina RM, Sandset PM. Low levels of tissue factor pathway inhibitor (TFPI) increase the risk of venous thrombosis. *Blood*. 2003; 101:4387–4392.
82. Lesnik P, Vonica A, Guerin M, Moreau M, Chapman MJ. Anticoagulant activity of tissue factor pathway inhibitor in human plasma is preferentially associated with dense subspecies of LDL and HDL and with Lp(a). *Arterioscler Thromb*. 1993; 13:1066–1075.
83. Sandset PM, Lund H, Norseth J, Abildgaard U, Ose L. Treatment with hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors in hypercholesterolemia induces changes in the components of

the extrinsic coagulation system. *Arterioscler Thromb.* 1991; 11:138–145.

84. Hansen JB, Huseby NE, Sandset PM, Svensson B, Lyngmo V, Nordoy A. Tissue-factor pathway inhibitor and lipoproteins. Evidence for association with and regulation by LDL in human plasma. *Arterioscler Thromb.* 1994; 14:223–229.

85. Abumiya T, Nakamura S, Takenaka A, Takenaka O, Yoshikuni Y, Miyamoto S, Kimura T, Enjyoji K, Kato H. Response of plasma tissue factor pathway inhibitor to diet-induced hypercholesterolemia in crab-eating monkeys. *Arterioscler Thromb.* 1994; 14:483–488.

86. Hansen JB, Huseby KR, Huseby NE, Sandset PM, Hanssen TA, Nordoy A. Effect of cholesterol lowering on intravascular pools of TFPI and its anticoagulant potential in type II hyperlipoproteinemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995; 15:879–885.

87. Oduah E.I, Robert J., Sharfstein L. *Pharmaceuticals* 2016, 9, 38.