

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ІМ. О.В. ПАЛЛАДИНА**

На правах рукопису

ПИРОГОВА ЛЮДМИЛА ВІТАЛІЇВНА

УДК 577.112.7:612.115

**ФОРМУВАННЯ ТА ГІДРОЛІЗ ФІБРИНОВОГО ЗГУСТКУ В ПЛАЗМІ
КРОВІ ЛЮДИНИ ЗА ПАТОЛОГІЧНИХ СТАНІВ ТА ЗА ДІЇ
ЕКЗОГЕННИХ ФАКТОРІВ.**

03.00.20 – біотехнологія

Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело _____ Пирогова Л.В.

Науковий керівник

д.б.н., проф..

Є.М. Макогоненко

Київ - 2020

АНОТАЦІЯ

Пирогова Л.В. Формування і гідроліз фібринового згустку в плазмі крові людини за патологічних станів та за дії екзогенних факторів. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія. - Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ, 2020.

Дисертаційна робота присвячена розробці методу аналізу стану системи гемостазу, який дозволяє визначити рівень активації, взаємодії і зв'язку компонентів системи гемостазу в процесі формування та гідролізу фібринового згустку в плазмі крові людини за деяких патологій, пов'язаних з порушенням системи гемостазу, та за дії антитромботичних агентів.

Дослідження проводили в плазмі крові донорів та пацієнтів, хворих на інфаркт міокарду, інсульт, стеноз аорти, стенокардію, хронічну хворобу нирок та пацієнтів зі захворюваннями тазостегнового суглобу (ЗТСС), яку аналізували у двох експериментальних системах: в першій – процес формування і гідролізу фібринового згустку ініціювали АЧТЧ-реагентом, що активує внутрішній шлях зсідання крові, і характеризували за параметрами гемостатичного потенціалу (ЗП – потенціал зсідання, ЗГП – загальний гемостатичний потенціал, ФП – фібринолітичний потенціал) та окремих ділянок турбідиметричної кривої (τ – лаг-період, V_1 – швидкість латеральної асоціації протофібрил, H – максимальна мутність згустку, L – час напівлізису згустку, V_2 – швидкість гідролізу фібринового згустку). У другій – стан системи гемостазу в плазмі крові визначали за концентраціями молекулярних маркерів – фібриногену, розчинного фібрину, протеїну С, D-димеру на момент її забору у пацієнтів.

Було знайдено, що відношення потенціалу зсідання до фібринолітичного потенціалу (ЗП/ФП) є важливим показником балансу між активністю коагуляційної та фібринолітичної ланок гемостазу та є важливим показником для оцінки напрямку зміни в стані системи гемостазу плазми крові пацієнта.

Порівняльний аналіз величин параметрів гемостатичного потенціалу, турбідиметричної кривої і концентрацій молекулярних маркерів показав, що активність системи гемостазу у жінок з хронічними захворюваннями нирок вища, ніж у чоловіків.. Встановлено, що у хворих на хронічну хворобу нирок з підвищенням концентрації розчинного фібрину зростає сила кореляційного зв'язку до сильного та дуже сильного між концентрацією протеїну С та концентрацією фібриногену (-0,73), потенціалом зсідання (-0,81) та фібринолітичним потенціалом (-0,93), що свідчить про існування чітких кореляційних зв'язків між системами зсідання крові, фібринолізу і антикоагулянтною системою протеїну С і є перспективним для розробки методів прогнозування стану системи гемостазу.

Встановлено, що концентрація розчинного фібрину має слабкий рівень кореляційного зв'язку з такою D димеру і не є прямим попередником останнього. Запропоновано гіпотезу про утворення фібринових мікрозгустків у плазмі крові як необхідного проміжного ланцюга для активації фібринолітичної системи і утворення D-димеру.

Застосування удосконаленого нами методу гемостатичного потенціалу для аналізу дії антизгортаючих агентів на систему гемостазу плазми крові донорів дозволив встановити, що калікс[4]арен С-145 інгібує утворення фібринового згустку зі збереженням динамічної рівноваги між коагуляційною та фібринолітичною ланками системи гемостазу. Було також встановлено, що гепарин змінює структуру фібринового згустку в плазмі крові, що прискорює дію системи фібринолізу.

Ключові слова: фібриноген, полімеризація фібрину, загальний гемостатичний потенціал, розчинний фібрин, D-димер, протеїн С.

SUMMARY.

Pyrogova L. V. Formation and hydrolysis of the fibrin clot in blood plasma at pathological conditions and under the action of exogenous factors. – Manuscript.

Thesis for the PhD degree in the biological sciences for specialty 03.00.20 – biotechnology. - Palladin Institute of biochemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2020.

The research is dedicated to the development of a method of the haemostasis system analysis that would allow to determine the level of activation, interaction and interconnection of the system's components in the process of formation and hydrolysis of the fibrin clot in human blood plasma under certain pathologies associated with haemostasis disregulation and under the action of antithrombotic agents.

The study was performed in blood plasma of donors and patients which had myocardial infarction, stroke, aortic stenosis, stenocardia, chronic renal disease and hip replacement therapy, analyzed in two experimental setups. The first one targeted the process of formation and hydrolysis of the fibrin clot. The process was initiated by the APTT reagent which activates the intrinsic pathway of blood clotting cascade and is characterized by the parameters of the haemostatic potential (clotting potential (CP), fibrinolytic potential (FP) and overall hemostatic potential (OHP)) and certain segments of the turbidity curve (τ – lag-period, V_1 – speed of lateral protofibril association, H – maximum turbidity of clot, L – half-lysis time, V_2 – clot hydrolysis speed). The second setup included evaluating the haemostasis system by such molecular markers as fibrinogen, soluble fibrin, protein C and D-dimer at the time of blood collection.

The ratio of the clotting potential to fibrinolytic potential (CT/FP) was found to be an important marker of the balance between the coagulation and fibrinolysis and an important parameter of the overall direction of change in the patient's haemostasis.

Comparative analysis of the values of the haemostatic potential, turbidity curve and concentrations of molecular markers showed that the activity of the haemostasis system in women with chronic renal disease is higher than in men. In patients with chronic renal disease, protein C concentration became highly anti-correlated with fibrinogen (-0,73), clotting potential (-0,81) and fibrinolytic potential (-0,93). This suggests the existence of strong correlational links binding together the clotting cascade, fibrinolysis and the anticoagulant system of protein C and is a promising target of developing prognostic methods to evaluate haemostasis.

Soluble fibrin was found to be only weakly correlated with D-dimer and not its direct antecedent. We offer a hypothesis about the formation of fibrin microclots in blood plasma as a necessary intermediate chain for the activation of fibrinolytic system and the formation of D-dimer.

Application of the improved method of hemostatic potential to the analysis of anticlotting agents' effect on the donors' hemostatic system allowed us to establish that calix[4]arene C-145 inhibited the formation of the fibrin clot without unsettling the dynamic balance of the coagulational and fibrinolytic parts of the haemostasis. Also, heparine was shown to change the fibrin clot's structure in plasma, thus accelerating fibrinolysis

Key words: fibrinogen, fibrin polimerization, total haemostatic potential, soluble fibrin, D-dimer, protein C.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Чернуха Л.М., Каширова Е.В., Луговской Э.В., Комисаренко С.В., Колесникова И.Н., Макогоненко Е.М., Платонова Т.Н., Пирогова Л.В., Горницкая О.В. Характеристика состояния системы гемостаза при артериовенозных формах врожденных сосудистых мальформаций. Новости хирургии. 2014;22(2):191-198. *(Дисертантка брала участь у виконанні експериментальної частини досліджень)*.
2. Chernyshenko V.O., Korolova D.S., Dosenko V.E., Pashevin D.O., Kalchenko V.I., Pirogova L.V., Chernyshenko T.M., Lugovska O.E., Kravchenko N.A., Makogonenko Y.M., Lugovskoy E.V. and Komisarenko S.V. Calix[4]arene.-145. Effects on Plasma Haemostasis. Pharmaceutica Analytica Acta. 2015;6(8):1-5. *(Дисертантка брала участь у виконанні експериментальної частини досліджень)*.
3. Пирогова Л.В., Чернищенко Т.М., Колеснікова І.М., Платонова Т.М., Березницький Г.К., Макогоненко Є.М., Луговської Е.В. Рівень загального гемостатичного, згортаючого і фібринолітичного потенціалу у плазмі крові донорів і хворих при різних захворюваннях. Укр. біох. журн. 2016;88(2):56-65. *(Дисертантка брала участь у виконанні експериментальної частини досліджень, у аналізі результатів досліджень, написанні та оформленні статті)*.
4. Chernyshenko V.O., Pirogova L.V., Cherenok S.V., Dosenko V.E., Pashevin D.O., Kalchenko V.I., Makogonenko E.M., Lugovskoy E.V. Effects of Calix[4]arene C-145 on overall haemostatic potential of blood plasma *in vitro* and *in vivo*. J. Int. Res. in Med. Pharm. Sci. 2016;10(3):146-151. *(Дисертантка брала участь у виконанні експериментальної частини досліджень)*.
5. Чернищенко В.О., Савчук О.В., Черенок С.О., Силенко О.М., Негеля А.О., Касаткіна Л.О., Пирогова Л.В., Дідківський В.А., Юсова О.І., Кальченко В.І., Гарманчук Л.В., Гриненко Т.В., Луговської Е.В., Комісаренко С.В. Дія калікс[4]арен-метиленбісфосфонової кислоти C-145 та її сірковмісного аналога на гемостаз. Укр. біох. журн. 2018; 90(6):21-30.

(Дисертантка брала участь у виконанні експериментальної частини досліджень).

6. Сторожук Б.Г., Пирогова Л.В., Чернишенко Т.М., Костюченко О.П., Колеснікова І.М., Платонова Т.М., Сторожук О.Б., Сторожук Л.О., Березницький Г.К., Цап П.Ю., Масенко О.О., Макогоненко Є.М., Луговської Е.В. Загальний гемостатичний потенціал плазми крові і його зв'язок із деякими молекулярними маркерами системи гемостазу у хворих на хронічні захворювання нирок VD стадії. Укр. біох. журн. 2018;90(5):60-70. *(Дисертантка брала участь у виконанні експериментальної частини досліджень, взяла активну участь у аналізі результатів досліджень, написанні та оформленні статті).*

ПАТЕНТИ

1. Спосіб визначення коагуляційного балансу плазми крові. Сторожук Н.В., Сторожук Б.Г., Макогоненко Є.М., Сторожук Л.О., Пирогова Л.В., Сторожук О.Б., Платонова Т.М., Луговської Е.В. Заявка № а201809400 від 17.09.2018. Позитивне рішення щодо патенту на винахід.

2. Патент на корисну модель № 143853. від 10.08.2020, Бюл. №15. Спосіб інгібування полімеризації фібрину синтетичними пептидами, які імітують фрагментисуперспіральної ділянки фібрин(оген)у. Комісаренко С.В., Чернишенко В.О., Макогоненко Є.М., Пирогова Л.В., Луговська Н.Е., Горницька О.В., Грабовський О.О. Заявка № u202002124.

ЗМІСТ.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	10
ВСТУП	12
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.	18
1.1. СИСТЕМА ГЕМОСТАЗУ ТА ЇЇ КОМПОНЕНТИ	18
1.1.1. Система зсідання крові.	20
1.1.2. Фібринолітична система.	25
1.1.3. Антикоагулянтна система.	27
1.2. ДОСЛІДЖЕННЯ СТАНУ СИСТЕМИ ГЕМОСТАЗУ.	29
1.2.1. Методи дослідження плазмового коагуляційного гемостазу.	30
1.2.2. Комплексна лабораторна діагностика порушень системи зсідання крові і фібринолізу.	33
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.	
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	
2.1. Матеріали та реактиви	45
2.2. Методи дослідження	46
2.2.1. <i>Визначення гемостатичного потенціалу плазми крові людини.</i>	46
2.2.2. <i>Електрофорез в РААГ.</i>	47
2.2.3. <i>Одержання фібриногену</i>	48
2.2.4. <i>Визначення концентрації білків</i>	49
2.2.5. <i>Визначення фібриногену в плазмі рові.</i>	49
2.2.6. <i>Визначення протеїну С в плазми крові.</i>	50
2.2.7. <i>Дослідження впливу гепарину на формування та гідроліз фібринового згустку в системі фібриноген + тромбін.</i>	50
2.2.8. <i>Імуноферментний аналіз.</i>	51
2.2.9. <i>Біотинилування антитіл.</i>	52
2.2.10. <i>Математична обробка.</i>	52

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

РОЗДІЛ 3. ДОСЛІДЖЕННЯ СИСТЕМИ ГЕМОСТАЗУ ЛЮДИНИ В НОРМІ ТА ЗА ПАТОЛОГІЧНИХ СТАНІВ.

	53
3.1. Характеристика кривої утворення і руйнування згустку плазми крові і її параметрів.	54
3.2. Характеристика процесу формування та гідролізу фібринового згустку та параметри гемостатичного потенціалу в плазмі крові в нормі та за патологічних станів	57
<i>3.2.1 Параметри процесу формування та гідролізу фібринового згустку та гемостатичного потенціалу в плазмі крові донорів та пацієнтів, хворих на інфаркт міокарду, інсульт та ЗТСС</i>	57
<i>3.2.2. Параметри процесу формування та гідролізу фібринового згустку та гемостатичного потенціалу в плазмі крові донорів та пацієнтів, хворих на стеноз аорти і стенокардію</i>	63.
<i>3.2.3. Параметри процесу формування та гідролізу фібринового згустку та гемостатичного потенціалу в плазмі крові донорів та пацієнтів, хворих на хронічну хворобу нирок, які регулярно проходять процедуру гемодіалізу</i>	68
3.3. Визначення концентрації молекулярних маркерів стану системи гемостазу - розчинного фібрину, D-димеру, протеїну С та фібриногену в плазмі крові хворих на інфаркт міокарда, інсульт, стеноз аорти, стенокардію, хронічну хворобу нирок та ЗТСС.	70
3.4. Дослідження зв'язку між величинами параметрів гемостатичного потенціалу та концентраціями молекулярних маркерів системи гемостазу у плазмі крові пацієнтів при хронічній хворобі нирок.	73
3.5. Аналіз кореляції між величинами параметрів системи гемостазу і концентраціями маркерів стану системи гемостазу на хронічну хворобу нирок.	80

РОЗДІЛ 4. ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ЕКЗОГЕННИХ ФАКТОРОІВ (ОРГАНІЧНИХ ТА НЕОРГАНІЧНИХ РЕЧОВИН) НА ПРОЦЕС ФОРМУВАННЯ І ГІДРОЛІЗУ ФІБРИНОВОГО ЗГУСТКУ В ПЛАЗМІ КРОВІ.	86
4.1. Дія С-145 на загальний гемостатичний потенціал плазми крові <i>in vitro</i> .	86
4.2. Вплив гепаринів на процес зсідання крові і фібринолізу.	92
4.3. . Вплив хітозану на параметри процесу зсідання плазми крові.	102
Узагальнення результатів роботи.	106
ВИСНОВКИ	109
СПИСОК ВИКОРСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	111
ДОДАТКИ	126

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

Fg – фібриноген

Pm – плазмін

Thr – тромбін

Sf - розчинний фібрин

NEPES – 4-(2-гідроксиетил)-1-піперазинетансульфоновою кислота

AncH – анцистрон H

монАТ – моноклональне антитіло

ІФА – імуноферментний аналіз

PAGE – поліакриламідний гель

ε-АКК – ε-амінокапронова кислота

SDS – додецилсульфат натрію

EDTA – етилендіамінтетраацетат

ВСТУП

Актуальність теми дослідження. Система гемостазу є однією з основних систем крові, яка забезпечує цілісність і прохідність судин системи кровообігу, попереджає або зупиняє кровотечу, а також підтримує кров у рідкому стані. В основі функціонування системи гемостазу лежить збалансована взаємодія між її коагуляційною, антикоагуляційною та фібринолітичною ланками. Порушення цього балансу спричинює внутрішньосудинне тромбоутворення або кровотечу, що призводять до патологічних наслідків різного ступеня складності. В зв'язку з цим вивчення процесів утворення та лізису тромбів, механізму їх взаємозалежності, регуляції та ролі в патогенезі захворювань разом з розробкою та удосконаленням методів дослідження цих процесів в нормі, при патологіях та за дії антитромботичних препаратів залишається актуальним напрямком досліджень сучасної гемостазіології, біотехнології та клінічної біохімії.

Одним з методів загальної оцінки стану системи гемостазу в плазмі крові людини є метод визначення загального гемостатичного потенціалу (ЗГП), запропонований М. Blomback у 1999 році [1-8].. Він дозволяє охарактеризувати загальну функціональну активність системи гемостазу, її коагуляційної та фібринолітичної ланок, зокрема зв'язок між ними. Цей метод було використано для вивчення впливу різних концентрацій фактору VIIa на загальний гемостаз і TAFI-залежний фібриноліз у плазмі крові пацієнтів з дефіцитом факторів II, V, VII, VIII, IX, XI і XII, а також для діагностики стану системи гемостазу у хворих на тромбоз глибоких вен, пов'язаний зі стійкістю до дії активованого протеїну С [1]. Дослідження впливу прямих інгібіторів тромбіну – дабігатрану і аргатробану на зсідання плазми крові методом ЗГП показало, що ці сполуки пригнічують потенціал зсідання і збільшують фібринолітичний потенціал плазми крові [5]. Метод ЗГП було також застосовано для дослідження плазми крові пацієнтів з захворюваннями, які супроводжуються порушеннями системи гемостазу, зокрема за умов артеріальної та венозної тромбоемболії, захворювань

коронарної артерії, ішемічної хвороби серця, аутоімунними захворюваннями, тощо [6-12].

Проте не всі стадії турбідиметричної кривої, на оцінці якої базується метод М. Blomback, і які всебічно вивчені, застосовуються в методі. Водночас, використання цих стадій турбідиметричної кривої, может дати важливу інформацію при аналізі процесів утворення і лізису фібринового згустку в плазмі крові пацієнтів. Тому ми доповнили параметри, які визначають за методом ЗГП, аналізом параметрів стадій турбідиметричної кривої утворення і гідролізу фібринового згустку, що разом з концентрацією молекулярних маркерів дозволило більш детально описати стан системи гемостазу донорів і пацієнтів при різних захворюваннях.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційну роботу виконано відповідно до плану науково-дослідних робіт відділу структури і функції білка Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України: «Вивчення механізму формування фібринового каркасу тромбу та розробка діагностиків стану системи гемостазу при запальних процесах, серцево-судинних захворюваннях та хірургічних втручаннях» (2014-2018 рр., д.р. № 0114U003217), «Молекулярно-генетичні і біохімічні механізми регуляції клітинних та системних взаємодій за фізіологічних та патологічних станів», розділ: «Протеїн-протеїнові та протеїн-клітинні взаємодії в системі гемостазу за норми та патології: механізми, діагностика та корекція порушень» (2017-2021 рр., д.р. № 0117U002624).

Мета і завдання дослідження. Метою роботи є розробка методу аналізу стану системи гемостазу, який дозволяє визначити рівень активації, взаємодії і зв'язку компонентів системи гемостазу в процесі формування та гідролізу фібринового згустку в плазмі крові людини за деяких патологій, пов'язаних з порушенням системи гемостазу, та за дії антитромботичних агентів.

Відповідно до мети роботи поставлено такі **завдання:**

- доповнити параметри загального гемостатичного потенціалу параметрами турбідиметричної кривої, які кількісно характеризують стадії процесу утворення і руйнування фібринового згустку;

- за допомогою удосконаленого методу загального гемостатичного потенціалу визначити стан системи гемостазу в плазмі крові донорів та пацієнтів, хворих на хронічну хворобу нирок, інфаркт міокарду, інсульт, стенокардію, стеноз аорти та запалення тазостегнового суглобу;

- визначити концентрації молекулярних маркерів стану системи гемостазу – розчинного фібрину, D-димеру, протеїну С та фібриногену у плазмі крові донорів та пацієнтів за даних захворювань;

- на основі аналізу кореляційного і функціонального зв'язку між параметрами загального гемостатичного потенціалу і концентраціями молекулярних маркерів з'ясувати наявність і силу зв'язку між компонентами та напрямок змін у системі гемостазу у плазмі крові пацієнтів при хронічній хворобі нирок;

- дослідити вплив антитромботичних препаратів гепарину та калікс[4]арену С-145 на формування і гідроліз фібринового згустку у плазмі крові донорів із застосуванням удосконаленого методу загального гемостатичного потенціалу.

Об'єкт дослідження. Система гемостазу людини.

Предмет дослідження. Молекулярний механізм процесу формування та гідролізу фібринового згустку в плазмі крові людини за деяких патологій та за дії екзогенних факторів.

Методи дослідження. Турбідиметрія, імуноензимний аналіз, ензиматичний аналіз, хроматографія, електрофорез у ПААГ за присутності SDS, денситометрія, спектрофотометрія.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше показано, що кількісні параметри загального гемостатичного потенціалу та турбідиметричної кривої, яка описує процес формування та гідролізу фібринового згустку, корелюють з концентраціями молекулярних маркерів

системи гемостазу, які визначають у діагностичних тестах (фібриноген, розчинний фібрин, D-димер, протеїн С). Розроблено підходи для аналізу зв'язку між концентраціями молекулярних маркерів та параметрами загального гемостатичного потенціалу. Встановлено, що у хворих на хронічну хворобу нирок з підвищенням концентрації розчинного фібрину (понад 4 мкг/мл) зростає сила кореляційного зв'язку до сильного та дуже сильного між концентрацією протеїну С та концентрацією фібриногену (-0,73), потенціалом зсідання (-0,81) та фібринолітичним потенціалом (-0,93), що свідчить про існування чітких кореляційних зв'язків між системами зсідання крові, фібринолізу і антикоагулянтною системою протеїну С і є перспективним для розробки методів прогнозування стану системи гемостазу. Показано, що сила кореляційного зв'язку між концентрацією розчинного фібрину і D-димеру в усіх досліджуваних хворих відповідає рівню слабкої. Запропоновано гіпотезу про утворення фібринових мікрозгустків у плазмі крові як необхідного проміжного ланцюга для активації фібринолітичної системи і утворення D-димеру.

Практичне значення роботи. Проведені дослідження дозволили запропонувати придатний до використання у клінічній практиці спосіб оцінки динамічної рівноваги у системі гемостазу – метод визначення загального гемостатичного потенціалу плазми крові. Апробація методу за низки патологій, пов'язаних з загрозою внутрішньосудинного тромбоутворення, засвідчила його інформативність та дозволила виявити рівень кореляції між величинами параметрів загального гемостатичного потенціалу і рівнем основних молекулярних маркерів активації системи гемостазу (фібриноген, розчинний фібрин, D-димер, протеїн С). На сьогодні в Україні відсутній універсальний інформативний метод, який дозволяє оцінити загальний ризик утворення тромбів чи кровотечі. У світовій клінічній практиці застосовують метод тромбоеластографії, який через високу вартість обладнання та витратних матеріалів в Україні не використовують. Запропонований нами підхід не потребує дорогих реактивів

та виконується за допомогою стандартної автоматичної системи вимірів у мікропланшетах, яка входить у перелік базового лабораторного обладнання більшості діагностичних лабораторій.

Особистий внесок здобувача. Дисертанткою самостійно проведено аналіз даних літератури, виконано основний обсяг експериментальних досліджень та проведено статистичну обробку отриманих результатів. Здобувачем самостійно проведено електрофоретичні, імуноферментні, турбідиметричні та хроматографічні дослідження. Сформульовано мету, завдання, план роботи та інтерпретовано результати досліджень разом з науковим керівником гол. н. с. Макогоненком Є.М. Препарати фібриногену отримано разом з пров. інженером Гоголинською Г.К. Визначення у плазмі крові концентрації розчинного фібрину і D-димеру із застосуванням імунодіагностичних методів на основі моноклональних антитіл, отриманих в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, проводили спільно з с. н. с. Колесніковою І.М. Вміст фібриногену та протеїну С у плазмі крові хворих визначали спільно з м. н. с. Чернищенко Т.М.

Апробація результатів дисертації. Результати дисертації було повідомлено та обговорено на вітчизняних і міжнародних конференціях: VI Міжнародна науково-практична конференція “Біотехнологія: звершення та надії”. Київ, 2017; XI Український біохімічний конгрес, Київ, 2014; RECOOP 14-th bridges in life sciences and 2nd RECOOP – KFSD International student conference, Bratislava, Slovak republic, 2019; XII Український біохімічний конгрес, Тернопіль, 2019, а також доповідались на наукових семінарах Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України та відділу структури і функції білка.

Публікації. Всього за матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 6 статей у фахових виданнях та 7 тез доповідей на міжнародних і вітчизняних наукових конференціях, конгресах, з’їздах.

Структура та обсяг роботи. Дисертація складається з анотації, вступу; огляду літератури; експериментальної частини, що включає опис матеріалів

та методів досліджень, результати досліджень та їх обговорення; заключення; висновків та списку літератури, що містить 149 джерел. Дисертація містить 18 таблиць і 30 рисунків. Загальний обсяг дисертації становить 125 сторінок.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. СИСТЕМА ГЕМОСТАЗУ І ЇЇ КОМПОНЕНТИ.

Системи гемостазу забезпечує цілісність працюючої під високим тиском системи кровообігу, що необхідно для виконання кров'ю гомеостатичної функції. У разі порушення цілісності судин система гемостазу локально і короткочасно активується, закриває утворену «пробоїну» в стінці судини і пошкоджену тканину тромбом і повертається в стан спокою [13, 14].

На початковому етапі пошкоджені судини і оточуючі тканини активують тромбоцити і залучають фібриноген в формування первинної тромбоцитарної пробки, яка закупорює судини, зупиняє кровотечу і закриває пошкоджену тканину. Паралельно активується коагуляційний каскад і утворюється тромбін, який перетворює фібриноген тромбоцитарної пробки і плазми крові в мережу нерозчинних фібринових волокон, стабілізуючих тромбоцитну пробку завдяки ковалентного прошивці фактором XIIIa молекул фібрину між собою, з IIbIIIa рецепторами тромбоцитів, білками плазми крові і міжклітинної матриксу. Надалі фібриновий згусток служить компонентом тимчасового матриксу для адгезії, розпластування і проліферації ендотеліальних, гладком'язових клітин і фібробластів в процесі ангиогенезу і відновлення пошкодженої тканини. Поверхня фібринових згустків також звернена до циркулюючої крові. Нещодавно було виявлено, що фібриноген надає поверхні фібринового згустку антиадгезивні властивості [15, 16]. Було знайдено, що м'який багат шаровий матрикс з фібриногену, який утворюється на поверхні згустку завдяки слабким взаємодіям між фібриногеном і полімерним фібрином, перешкоджає подальшому поширенню згустку і сильно зменшує адгезію лейкоцитів і тромбоцитів до поверхні згустку.

Тромб виконує захисну функцію і надалі служить компонентом матриксу для регенерації пошкоджених судин і тканин. Поверхня тромбу,

звернена до кровотоку, блокована молекулами фібриногену і фібронектину, стає недоступною для компонентів фібринолітичної системи, її активації і руйнування плазміном [17]. При різних захворюваннях, починаючи з інфекційних і закінчуючи важкими серцево-судинними, онкологічними та іншими захворюваннями система гемостазу активується на час хвороби і її залучення до патологічного процесу завжди ускладнює перебіг захворювання і потребує особливої уваги лікарів [18]. Таким чином мають місце дві основні причини активації системи гемостазу крові: одна полягає в необхідності швидкої зупинки кровотечі і відновлення цілісності кровоносної системи. Друга полягає в залученні системи гемостазу в якості складової частини загальної реакції організму на патологічний процес, що виникає в ньому [19]. У першому випадку тромб виконує важливу фізіологічну функцію, у другому - тромбоутворення приєднується до патологічного процесу і ускладнює його [18, 20].

Система гемостазу складається з клітинних і гуморальних компонентів. До перших відносять ендотеліоцити внутрішнього шару судин, тромбоцити, еритроцити і деякі інші клітини крові. Гуморальна складова системи гемостазу представлена протеїнами плазми крові - факторами системи зсідання, відповідальними за утворення згустку фібрину - основи тромбу, білками фібринолітичної системи, що видаляє надлишкові фібринові відкладення з судин і плазми крові, антикоагулянтна системи протеїну С, калікреїн - кининові системи, а також протеїнами - інгібіторами цих систем, включаючи ТАФІ (карбоксіпептидазу U) і ін. білками [14].

Наявність функціонально протилежно спрямованих процесів зсідання і фібринолізу в системі гемостазу дозволило *a priori* припустити існування динамічної рівноваги у їх функціонуванні - балансу між утворенням і руйнуванням тромбів в плазмі крові. Підтримка цього балансу забезпечує прохідність судин для крові і виконання нею гомеостатичної функції, тоді як порушення призводить до небезпечних тромбозів чи кровотеч.

Функціонування системи гемостазу має свої особливості в артеріальній, венозній і мікроциркуляторній системі судин кровообігу людини, однак загальні механізми активації клітинних і гуморальних компонентів системи гемостазу, формування фібринового згустку, активації системи фібринолізу, шляхи руйнування фібринового згустку і утворення кінцевих продуктів їх гідролізу залишаються незмінними у всіх відділах кровоносної системи.

1.1.1. Система зсідання крові.

У нормі при пошкодженнях систему зсідання гемостазу активується паралельно з активацією тромбоцитів комплексом TF стінок судин і FVIIa плазми крові в місцях руйнування тканин [21]. У разі патологій система зсідання активується тим же TF, який міститься в прокоагулянтних факторах – мікрочастинках, - комплексі з FVIIa, який в активованому стані завжди знаходиться в плазмі крові завдяки наявності специфічних протеїназ, що активують FVII. Утворення мікрочастинок стимулюється запальними процесами, які супроводжують будь-яку патологію, а саме: TF мікроевезикул, утворених і вивільнених у кров моноцитами, тромбоцитами і ендотеліоцитами ; інтерлейкінами, що стимулюють вивільнення мікроевезикул [22]; продуктами некрозу клітин, що містять TF і активатори агрегації тромбоцитів; активаторами проферментів системи гемостазу, фібринолізу і протеїну С - калікреїном, металлопротеїназами та іншими ензимами. Активація системи зсідання гемостазу закінчується утворенням тромбіну - центрального ферменту системи гемостазу, який відповідальний за утворення фібринового згустку - основи тромбу, і активацію інших, пов'язаних з ним систем, а саме: системи зсідання, і опосередковано системи фібринолізу та інших компонентів системи гемостазу - системи протеїну С, ТАФІ та ін. [23]. У разі пошкоджень система гемостазу активується за участю факторів зовнішнього шляху, а при патологіях в процес активації

залучаються зовнішній і внутрішній шляхи активації системи зсідання плазми крові.

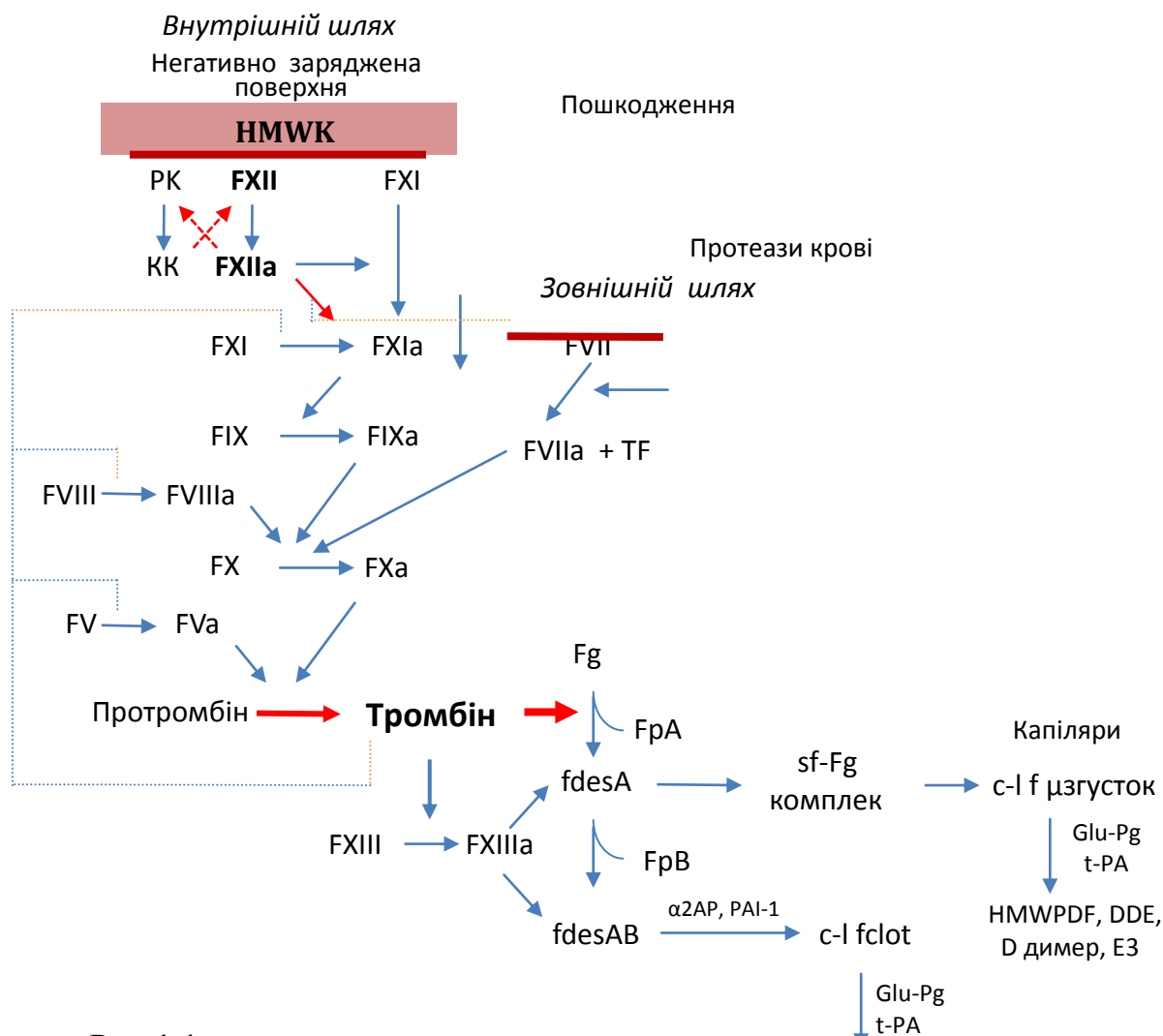


Рис.1.1. Схема молекулярних взаємодій в процесі активації гуморальної системи зсідання крові і пов'язаних з нею систем фібринолізу і калікреїн-кінінової системи. РК – прекалікреїн, КК – калікреїн, НМВК – високомолекулярний кініноген. FXIII, FXII, FXI, FX, FIX, FVIII, FVII, FV, FII (протромбін), FI (Fg) фібриноген – неактивовані фактори системи зсідання, FXIIIa, FXIIa, FXIa, FXa, FIXa, FVIIIa, FVIIa, FVa, FIIa (тромбін), FI (f) фібрин – активовані фактори зсідання. FpA – фібринопептид А, FpB - фібринопептид В, fdesA – фібрин з відщепленими обома FpA, fdesAB - фібрин з відщепленими обома FpB, fdesAB, α 2AP – α 2-антиплазмін, PAI-1 – інгібатор активатора плазміногену I типу, sf-Fg – розчинний в плазмі крові комплекс розчинного фібриногену з розчинним фібрином, c-I fclot – поперечно прошитий FXIIIa фібриновий згусток, Glu-Pg – глу-плазміноген, t-PA – тканинний активатор плазміногену, c-I f мзгусток - поперечно прошитий FXIIIa фібриновий мікрозгусток, що плаває у плазмі крові, НМВPDF – високомолекулярні продукти деградації поперечно прошитого фібрину, DDE – DDE тріада, E₃ – продукт руйнування плазміном DDE тріади.

— ця лінія вказує, що підкреслені нею реакції відбуваються на фосfolіпідній негативно зарядженій поверхні клітинних мембран чи мікрочастинок.

Механізм зсідання крові і утворення фібринового згустку являє собою каскад послідовних ферментативних реакцій, які здійснюються групою специфічних білків – факторів системи зсідання крові, Рис.1.1.

Шість з дванадцяти факторів зсідання є в активованій формі серіновими протеазами (XII, XI, X, VII і II), один (XIII)-трансглутаміназою, три (III, V, VIII) не мають ферментативної активності, але регулюють утворення багатокомпонентних комплексів, в яких відбувається активація X і II факторів. Таким чином, основним механізмом активації факторів зсідання є обмежений протеоліз. Ферментативна природа реакцій активації забезпечує можливість різкого підсилення початкового сигналу й ефективного контролю процесу зсідання крові, котрий повинен відбуватись локально в області пошкодження стінки судини.

До кінця 80-х років XX століття в активації зсідання крові відокремлювали два шляхи: зовнішній, ініціатором якого є тканинний фактор (TF), що міститься в стінці судин, і внутрішній, всі компоненти якого присутні в плазмі, а ініціатором якого є контактна активація фактора XII. Цей розподіл відповідав даним про вплив дефіциту того чи іншого фактора зсідання на швидкість утворення фібрину в одному з двох скринінгових тестів — активованому частковому тромбoplastиновому часі (АЧТЧ) або протромбіновому часі (ПЧ). Однак «каскадна» модель процесу зсідання крові, запропонована в 1964, була неспроможна пояснити зупинку кровотечі *in vivo* [24, 25]. Ця теорія не пояснює, чому активація X фактора зовнішнім шляхом через комплекс TF: VII не компенсує дефіцит VIII або IX факторів у хворих на гемофілію, а у пацієнтів з дефіцитом VII фактора за відсутності патології у внутрішньому шляху зсідання крові розвиваються тяжкі геморагічні прояви.

Пояснити це протиріччя вдалось завдяки дослідженням проведеним в 90-х роках минулого століття, результати яких призвели до значної модифікації класичної схеми реакцій активації зсідання крові. По-перше

було встановлено, що комплекс TF фактор VIIa — теназа зовнішнього шляху активує не тільки фактор X, але й фактор IX. По-друге, було доведено, що теназа внутрішнього шляху — комплекс факторів VIIa і IXa в присутності фосфоліпідів активує фактор X швидкістю в 50–100 раз більший, ніж теназа зовнішнього шляху. По-третє, було показано, що фактор XI активується під дією не фактора XIIa, як вважалось в класичній схемі реакцій, а тромбіном за участю глікопротеїна Ib тромбоцитів [26, 27]. Ці дані послужили підставою для внесення суттєвих модифікацій в схему реакцій активації зсідання крові.

В даний час встановлено, що в організмі людини "зовнішній" і "внутрішній" шляхи тісно пов'язані не тільки один з одним, а й з тромбоцитами [28, 29, 30]. Відповідно до сучасних уявлень процес зсідання крові може бути представлений у вигляді трьох взаємопов'язаних фаз: ініціювання, посилення і розповсюдження (поширення) (Рис. 2).

В першій фазі зсідання крові – ініціюванні–пошкодження судинної стінки забезпечує контакт специфічного інтегрального білка – тканинного фактора (TF) з VII фактором крові, який разом з іонами кальцію і фосфоліпідами сприяє перетворенню неактивного фактора VII в активну форму VIIa. Паралельно з цим взаємодія субендотелійних субстанцій з рецепторами тромбоцитів в фазі адгезії призводить до передачі сигналу в середину клітини і експресії на плазмолемі тромбоцита фібриногенових рецепторів – глікопротеїнів GPIIb-IIIa [31]. TF експресується в багатьох типах клітин, в тому числі гладком'язових і фібробластах, які в нормі не контактують з кров'ю. Взаємодія TF-VIIa призводить до трансформації факторів IX і X в активну форму IXa і Xa. Активовані тромбоцити, що знаходяться в безпосередній близькості, надають місця зв'язку для протромбіна в неактивному комплексі GPIIb-IIIa, що сприяє локалізації процесу і протеолізу протромбіна фактором Xa та перетворенню його в тромбін. При цьому в фізіологічних умовах утворюється невелика кількість тромбіна, яка нездатна трансформувати фібриноген в достатню для зупинки кровотечі кількість фібрину.

В другій фазі зсідання крові – підсилення коагуляції – утворені мікромольні кількості тромбіна активують V, VIII і XI фактори. Їх активація полегшується завдяки глікопротеїновому комплексу GPIIb-V-IX тромбоцитів. Збільшення активних форм V і XI факторів досягається також їх секрецією з α -гранул тромбоцитів. Зв'язки IXa і XI факторів з поверхнею тромбоцитів є вельми суттєвими для збереження неперервності і швидкості активації коагуляційного процесу, оскільки протеаза нексин-II, що виділяється активованими тромбоцитами в плазму крові, інактивує фактор IXa.

В третій фазі зсідання крові – поширення коагуляційного процесу – на поверхні тромбоцитів відбувається утворення теназного і протромбіназного комплексів з утворенням великої кількості тромбіна. В фіксації на поверхні тромбоцитів V, Va, VIII, VIIIa, IX, IXa, X, Xa, XI, XIa коагуляційних факторів протромбіну і тромбіну встановлено участь специфічних високоафінних місць зв'язку. Протромбіназний комплекс, що формується на поверхні активованих тромбоцитів, захищений від інактивації і ініціює протеоліз протромбіну з утворенням великої кількості тромбіну. Тромбін розщеплює фібриноген і активує XIII фактор, що призводить до утворення нерозчинного фібрину, необхідного для утворення гемостатично ефективного згустку [32, 33, 34]..

Паралельно з процесом зсідання крові відбувається агрегація тромбоцитів, яка пов'язана з секрецією ними факторів зсідання крові і появою коагуляційно активних амінофосфоліпідів на поверхні тромбоцитів, що супроводжується евагінаціями мембрани тромбоцитів або відокремленням від неї везикул, які мають коагуляційно активні властивості [35, 36].. Везикули концентруються в зоні пошкодження судин і сприяють утворенню тромбоцитарно-фібринової гемостатичної пробки, але швидко інактивуються при надходженні в циркуляцію в фізіологічних умовах.

Завдяки тому, що ТФ зв'язаний з судинною стінкою, коагуляційний процес в фізіологічних умовах локалізовано зоною дефекту судин. Його

локалізації сприяє антикоагуляційна система и нормально функціонуючі ендотеліоцити.

Постулований понад тридцять років тому механізм контактної активації фактора XII передбачав її участь у запуску каскаду реакції внутрішнього шляху гемокоагуляції. Було показано участь компонентів калікреїн-кінінової системи в активації фактора XII на поліаніонній поверхні і встановлено реципрокний механізм активації фактора XII і прекалікреїну. В подальшому стало відомо, що активація контактної системи плазми крові відіграє суттєву роль в процесі фібринолізу, оскільки призводить до активації плазміногену та проурокінази. Вплив протеїназ, які утворюються після ініціації контактної системи, поширюється також на комплемент. Так, під дією плазміну, фактора XIIa і калікреїна активуються r- і s-субодиниці першого компонента комплексу, які є попередниками серинових протеїназ класичного шляху активації, і фактор В, який є проформою серинової протеїнази альтернативного шляху активації комплексу. Крім того, калікреїн є одним з активаторів проренину. Таким чином, встановлено, що контактна фаза ініціює активацію не тільки системи зсідання, але й інших протеолітичних систем плазми крові (калікреїн-кінінової системи, фібринолізу, системи комплексу і ренін-ангіотензинової системи) [37].

1.1.2.Фібринолітична система.

Фібринолітична система представлена Glu-плазміногеном/плазміном, тканинним і урокіназним активаторами плазміногену (t-РА, u-РА) і їх інгібіторами PAI-I і PAI-II, які секретуються ендотеліоцитами. Зв'язування t-РА з рецепторами ендотелійних клітин перешкоджає його руйнуванню, сприяє місцевій активації фібриноліза. Активатори плазміногена і сам плазміноген мають високу спорідненість до фібрину [38].

Фібринолітична система генерує плазмін шляхом дії урокінази на неактивний фермент. Підчас I фази ензими, урокіназа, яка знаходиться в формі проактиватора переводиться в активний стан. Ця реакція здійснюється

в результаті розщеплення проактиватора і втрати низки амінокислот. II фаза — це перетворення плазміногена в плазмін. В ході III фази під впливом плазіна який розчиняє згусток фібрин і інактивується α_2 антиплазіном, відбувається розщеплення фібрин до фрагментів. За дії плазіна на фібрин і фібриноген утворюються продукти деградації фібрину і фібриногену які розподіляють на ранні фрагменти – X і Y, що мають більш високу молекулярну масу, і пізні фрагменти – D і E. D-димери утворюються в процесі гідролізу нерозчинного фібрину і далі не руйнується плазіном.

Тканинний активатор плазміногену здатний зв'язуватись з фібрином, при цьому швидкість активації плазміногену збільшується на порядки [39].

Плазмін зв'язується з фібриновою сіткою і починає відщеплювати від неї фрагменти, що призводить до поступового розчинення згустку. В системі лізису присутні інгібітори плазіну (α_2 -антиплазмін, макроглобулін), інгібітори активаторів плазміногену (ПАІ-1, ПАІ-2), а також тромбін-активованій інгібітор фібринолізу (ТАFІ), який модифікує сайти зв'язування фібрину з t-РА і плазміногеном, відщеплюючи С-кінцеві лізину від фібрину у згустку [40]. Це призводить до зменшення активації плазміногену і уповільнює лізис.

Процеси утворення і руйнування згустку досить тісно переплетені між собою. Так, тромбін стимулює вихід t-РА з ендотелію [41], що покращує лізис; тромбін активує фактор XIII – фермент, який ковалентно зшиває згусток, роблячи його більш стійким до лізису [42, 43, 44]. тромбін активує ТАFІ, гальмуючи лізис. Плазмін – неспецифічна серинова протеаза – може розщеплювати деякі фактори зсідання, призводячи до його уповільнення [45].

Продукти деградації фібрину і фібриногену мають виражену антикоагулянтну дію, а також інгібують тромбін і гальмують процес утворення протромбінази, пригнічують процес полімеризації фібрин, адгезію і агрегацію тромбоцитів, підсилюють дію брадикініна, гистаміна,

ангіотензина на судинну стінку, що сприяє вивільненню з ендотеліоцитів судин активаторів фібринолізу.

Таким чином, у фізіологічних умовах система гемостазу функціонує як єдине ціле і направлена на збереження цілісності судинного русла шляхом утворення згустку тільки в місці пошкодження судини. Утворений в результаті активації системи гемостазу тромбін діє локально, і його надлишок швидко інактивується в плазмі крові, а утворений фібрин гідролізується плазміном.

1.1.2. Антикоагулянтна система.

Антикоагулянтна система людини складається з гуморального і клітинного компонентів. Велику роль в обмеженні розповсюдження коагуляції надають інгібітору шляху тканинного фактора (tissue factor pathway inhibitor – TFPI), що продукується ендотелійними клітинами і діє в місці утворення комплексу TF-VIIa, швидко знижуючи пряму активацію X фактора на поверхні ендотеліоцитів, що і блокує весь коагуляційний каскад. Іншими найбільш значимими для системи коагуляції, що використовуються в клінічній практиці, антикоагулянтами, є антитромбін III і система протеїнів C і S.

Надлишок тромбіна в організмі людини інактивується антитромбіном III, який так само активний по відношенню до IXa, Xa, XIa, XIIa факторів. Активність антитромбіну III і TFPI значно збільшується при взаємодії з гепариноподібними глікозаміногліканами, що знаходяться на інтактних ендотелійних клітинах. На долю антитромбіна III і гепарину приходить приблизно 80% всієї антикоагулянтної активності крові.

Утриманню крові в рідкому стані сприяє ретикулоендотелійна система і гепатоцити, які специфічно видаляють активовані фактори зсідання крові без будь-якого впливу на їхніх попередників. Крім того, тромбін, зв'язаний з тромбомодуліном, що експресується ендотеліоцитами, втрачає свої коагуляційні властивості, перестає активувати тромбоцити і активує протеїн

С. Останній в комплексі зі своїм кофактором – протеїном S - розщеплює фактори Va і VIIIa, гальмуючи утворення тромбіну.

Фізіологічними антикоагулянтами є також α 2-макроглобулін, аннексин V, нексин II, β 2-гликопротеїн-I і деякі інші. Крім того, ендотелій синтезує атромбогенні речовини: простагландин (простагландин I₂), простагландин E₂, оксид азоту (NO), монооксид вуглецю, екто-АДФазу. Навпаки, адгезію і агрегацію тромбоцитів стимулює фактор активації тромбоцитів, що утворюється в ендотелії, це аденозиндифосфорна кислота (АДФ), тромбоксан A₂, фактор Віллебранда.

В нормі секреція атромбогенних речовин переважає над тромбогенними. При пошкодженні ендотелія, гіпоксії, дії ендотоксинів, цитокинів та низки інших факторів відбувається експресія TF ендотеліоцитами і зменшення вмісту на їх поверхні тромбомодуліну, тобто здійснюється трансформація антикоагулянтної поверхні в прокоагулянтну[46, 47].

Тромбін було відкрито як фермент, що утворює фібрин — структурну основу тромбу. До недавнього часу він розглядався як високоспеціалізований фермент системи зсідання крові. Подальші дослідження показали, що функції тромбіну значно ширші. Дуже важливим є те, що тромбін може виконувати протилежні по фізіологічній направленості функції. В зоні пошкодження ендотелія він стимулює своє утворення, активуючи тромбоцити і фактори зсідання крові, а також прозапальні реакції. При зв'язуванні з тромбомодуліном пошкодженого ендотелія він активує протеїн С, який не тільки перериває каскад зсідання, але й має протизапальні функції [48-50]. Крім того, комплекс «тромбін — тромбомодулін» активує прокарбоксіпептидазу В. Таке різноманіття функцій забезпечуються тим, що, окрім активного центра, тромбін має ділянки специфічного зв'язування низки модуляторів його реакцій [41, 114].

1.3. ДОСЛІДЖЕННЯ СТАНУ СИСТЕМИ ГЕМОСТАЗУ.

У здорових людей гемостатичний процес є нормальною реакцією організму, що виникає у відповідь на механічне пошкодження судин і направлене на зупинку локальної кровотечі. Однак багато патологічних станів як набутого, так і спадкового характеру можуть супроводжуватись спонтанним утворенням тромбів, що може послужити причиною тяжких порушень функцій і систем організму, і навіть призвести до раптової смерті. Зокрема такі захворювання, як атеросклероз і його ускладнення, інфаркт міокарда, порушення мозкового кровообігу, цукровий діабет, злякисні новоутворення, патологія вагітності, зокрема прееклампсія, септицемія і септичний шок, спадкова тромбофілія можуть ускладнюватись тромбозами. Тромбоз виникає і після хірургічних втручань. Кровотечі спостерігаються при тромбоцитопенії, дисфункції тромбоцитів, гемофілії (А, В, С). хворобі фон Віллебранда [51].

В цілісному організмі при відсутності яких-небудь патологічних впливів рідкий стан крові є наслідком рівноваги факторів, що обумовлюють процеси зсідання і перешкоджають їх розвитку. Існує три основних причини, здатних призвести до порушення подібного балансу і тромбоутворення. Це пошкодження судинної стінки, підвищена схильність крові до зсідання (тромбофілія) і гемодинамічні порушення [51]. Такі патогенетичні складові присутні у всіх випадках тромбозів незалежно від етіології процесу, однак величина їх питомого вкладу в кожному конкретному випадку може бути різною.

На сьогоднішній день в клінічній практиці немає єдиного універсального методу діагностики загального стану системи гемостазу. Більшість лабораторних тестів відносяться до скринінгових і надають інформацію тільки про факт порушення в окремих ланках системи гемостазу. Тому при аналізі стану системи гемостазу особливу увагу необхідно приділяти уніфікації і підвищенню точності існуючих методик, розробці

високочутливих тестів, а також інтеграції отриманих даних та розробці алгоритмів, які представляють конкретну інформацію про ступінь порушень в системі гемостазу при різних патологіях.

1.3.1. Методи дослідження плазменного коагуляційного гемостазу.

Тести, що застосовуються в клінічній практиці, умовно можна розділити на скринінгові і уточнюючі. Скринінгові тести використовують для характеристики основних компонентів коагуляційного гемостазу і виявлення порушень балансу між окремими ланками системи гемостазу. До цієї групи можна віднести перш за все функціональні (хронометричні) тести – час зсідання крові по Ли-Уайту, протромбінів час, активований частковий тромбoplastиновий час (АЧТЧ), тромбіновий час, загальна характеристика фібринолітичної активності крові (лізіс еуглобулінової фракції); агрегація тромбоцитів, визначення концентрації фібриногену в плазмі крові, а також визначення молекулярних маркерів ВЗК-синдрому - розчинного фібрину, D димеру, продуктів розщеплення фібрину.

Уточнюючі тести визначають вміст певних компонентів системи зсідання крові і фібринолізу, інгібіторів системи зсідання (антитромбіна III, протеїну C) факторів системи зсідання крові II, X, XIII, компонентів системи фібринолізу (плазміногену, α_2 -антиплазміна, тканинного активатора плазміногену, інгібітора тканинного активатора плазміногену).

Всі тести дослідження системи гемостазу мають свої обмеження, оскільки вони тільки моделюють *in vitro* процеси зсідання і фібринолізу, що відбуваються в живому організмі. Крім того, при виконанні скринінгових тестів активується і взаємодіє низка факторів різнонаправленої дії, тому визначити вміст окремих компонентів неможливо. Для визначення вмісту тих чи інших компонентів системи гемостазу застосовують імуноферментні методи, які дають інформацію про вміст окремих компонентів, але не про

їхню функціональну активність. Тому необхідно проводити комплексний аналіз.

Скринінгові тести

Загальний коагуляційний тест – час зсідання крові по Лі-Уайту.

Час зсідання крові подовжується при дефіциті факторів, що беруть участь у внутрішньому механізмі утворення протромбокінази (факторів XII, XI, IX, VIII), а також при гіпофібриногенемії. Однак тест малочутливий непридатний для виявлення гемофілії і для контролю передопераційної підготовки хворого. Нормальне значення 8-12 хв. [53].

Час рекальцифікації стабілізованої крові. Реакція полягає у визначенні часу зсідання тромбоцитарної плазми при додаванні до неї хлориду кальцію оптимальної концентрації. Нормальне значення 60-120 с.

Скорочення часу рекальцифікації указує на гіперкоагуляцію, подовження – на гіпокоагуляцію. Подовження цього часу може бути пов'язано з вродженою недостатністю плазменних факторів зсідання (крім факторів VII і XII), вмістом в крові інгібіторів зсідання крові або дефіцитом фактора III тромбоцитів при ДВЗ синдромі.

Протромбіновий час (ПЧ). Тест моделює зовнішній шлях зсідання крові. Використовується як варіант визначення часу рекальцифікації з додаванням екзогенного тканинного тромбoplastину. (Нормальне значення 15-20 с.). результати тесту виражають у вигляді протромбінового індексу (ПІ). Подовження протромбінового часу може бути пов'язано з порушенням утворення К-залежних факторів зовнішнього шляху (VII, X, II), а також при терапії антикоагулянтами непрямої дії. Скорочення ПЧ вказує на наявність антикоагулянтів в крові або патологічній активації антикоагулянтної ланки системи гемостазу [55].

Активованій частково тромбoplastиновий час (АЧТЧ). Тест є одним з найбільш інформативних і поширених тестів, який відображає зміну активності внутрішнього шляху зсідання крові та порушення рівноваги між прокоагулянтною і антикоагулянтною ланками системи гемостазу. В тесті

визначається час рекальцифікації безтромбоцитарної плазми в умовах стандартизованої контактної (коаліном) і фосфоліпідної активації зсідання крові. Нормальне значення 35-55 с.

Подовження часу зсідання в АЧТЧ тесті спостерігається при дефіциті високомолекулярного кініногену, прекаллікреїну, факторів зсідання крові XII, XI, VIII, V, X, I, а також присутності гепарину та продуктів деградації фібриногену/фібрину.

Скорочення АЧТЧ вказує на систему активації зсідання крові і зниження вмісту антикоагулянтів [53, 54, 55, 56].

Тромбіновий час, рептилазний час. Метод оснований на здатності тромбіну або тромбіноподобних ферментів зміїної отрути індукувати перетворення фібриногену у фібрин без участі інших факторів зсідання крові. Тромбіновий час характеризує процес перетворення фібриногену у фібрин за дії екзогенного тромбіну. Подовження тромбіного часу спостерігається при вродженій аномалії фібриногену та наявності інгібіторів тромбіну.

Рептилаза та інші тромбоподібні ферменти не активують фактор XIII і не активуються комплексом гепарин-антитромбін III. Рептилазний час подовжується при наявності продуктів деградації фібрину [53, 54, 55 – 58].

Уточнюючі тести

Визначення тесту ПРФ (D-димеру). Кількісне визначення D-димеру характеризує як ступінь внутрішньосудинного зсідання крові, так і процес фібринолізу. Тест оснований на здатності частинок латексу, вкритих антитілами до D-димеру, агглютинувати при змішуванні з плазмою крові, яка містить D-димер. Ступінь подовження часу формування згустку в тесті прямо пропорційний концентрації ПРФ [53, 54, 57, 59].

Визначення вмісту антитромбіну III. Антитромбін III є інгібітором тромбіну, а також XIIIa, XIa, Xa, VIIa факторів зсідання крові. Для його визначення використовують метод, в якому виявляють здатність плазми інактивувати екзогенний тромбін. По рівню зниження активності екзогенного

тромбіну у відсотках від норми оцінюють антитромбінову активність плазми крові [53, 54, 57, 61].

Визначення рівня плазміногену в плазмі крові. Принцип методу полягає в перетворенні плазміногену в плазмін в присутності стрептокінази. При додаванні стрептокінази у зразок плазми крові утворюється плазміноген-стрептокіназний комплекс, який активує плазміноген в плазмін. Останній розщеплює хромогенний субстрат S_{2251} , швидкість гідролізу якого залежить від концентрації плазміногену у зразку плазми крові. Швидкість гідролізу субстрату реєструють на спектрофотометрі при 405 нм. В нормі рівень плазміногену складає 75-115% [53, 64, 65].

Визначення рівня α_2 -антиплазміну в плазмі крові. Метод базується на визначенні здатності α_2 -антиплазміну досліджуваної плазми крові інактивувати екзогенний плазмін, що додається в плазму. Вміст залишкового плазміну визначається за ступенем гідролізу хромогенного субстрату. В нормі рівень α_2 -антиплазміну складає 80-110% [53, 59].

Визначення загальної фібринолітичної активності в плазмі крові. Вимірюється час спонтанного лізису фібринового згустку, який отримали при додаванні розчину хлориду кальцію до еуглобулінової фракції, бідної на тромбоцити. Час лізису характеризує загальну фібринолітичну активність плазми крові. В нормі час лізису складає 150-180 хв. Скорочення часу лізису вказує на підвищення потенціалу фібринолітичної системи, подовження – на зниження потенціалу системи фібринолізу [53, 55, 59].

1.3.2. Комплексна лабораторна діагностика порушень системи зсідання крові і фібринолізу.

Для сучасної діагностики і виявленню доклінічних ознак порушень в системі гемостазу необхідно проводити розгорнуте комплексне дослідження, що надає інформацію про ступінь активації системи зсідання крові і фібриноліз, накопичення вторинних інгібіторів, тощо.

При розробці комплексу діагностичних тестів особлива увага приділяється методам що застосовуються для виявлення маркерів стану системи гемостазу: визначення вмісту фібриногену, РФМК, продуктів деградації фібриногену/фібрину, функціонально неактивних форм протромбіну, визначення активності протеїну С і антитромбіну III. Для характеристики системи фібринолізу розроблені тести, що дозволяють визначати активність t-PA і ПАІ I.

Визначення вмісту фібриногену в плазмі крові. Вміст фібриногену в плазмі крові – один з важливих показників, що характеризують стан системи гемостазу. Біосинтез цього протеїну підсилюється в післяопераційний період при інфекційних хворобах, серцево-судинних захворюваннях та запальних процесів. Тому його називають «протеїн гострої фази». Гіпофібриногенемія може виникнути при ВЗК-синдромі, дилуційній коагулопатії, або при введенні коагулопатичних препаратів [52, 69, 70].

Епідеміологічні дослідження виявили високий рівень кореляції між концентрацією фібриногену в плазмі крові і розвитком двох основних тромботичних ускладнень: інсульту і інфаркту міокарда. Головним механізмом при даних ускладненнях є процес утворення тромбу, ключову роль в якому відіграє фібриноген. Розуміння зв'язку між тромбозом і вмістом фібриногену в плазмі крові дає можливість своєчасного проведення лікування для попередження тромботичних ускладнень.

Таким чином, визначення вмісту фібриногену в плазмі крові має діагностичне значення і може бути прогностичним фактором при багатьох патологічних станах, пов'язаних з порушенням системи гемостазу, що супроводжується розвитком тромботичних ускладнень.

Вміст фібриногену в плазмі крові визначають за допомогою тромбіну і тромбіноподібних ферментів. Відомо декілька методів, які найчастіше використовуються в клінічній практиці: метод Клаусса і гравіметричний метод Рутберг.

Метод Клаусса широко застосовується в зарубіжній клінічній практиці, дозволяє швидко визначити вміст фібриногену. Однак метод передбачає щоденний контроль реактивів і побудову калібрувальної кривої по референтній плазмі крові, що значно ускладнює проведення аналізу.

Метод визначення фібриногену по Рутберг найменш стандартизований. Варіація результатів визначення фібриногену гравіметричним методом в різних лабораторіях можуть досягати від 50 до 100% [51].

Метод Беліцера і Варецької для визначення вмісту фібриногену. Принцип методу полягає в тому, що під дією екзогенного тромбіну в досліджуваній плазмі крові досягається повне перетворення фібриногену у фібрин. Утворений згусток віджимають на скляній паличці і рочиняють у оцтовій кислоті. Концентрацію фібриногену визначають спектрофотометрично [59, 60].

Однак при гепаринотерапії, а також при накопиченні вторинних інгібіторів зсідання крові, визначення дійсної концентрації фібриногену за допомогою тромбіну **ускладнено** і призводить до занижених результатів. В зв'язку з цим метод модифікували, тромбін замінили на тромбіноподобний фермент – анцистрон-Н, виділений із отрути щитомордника звичайного. На відміну від тромбіну анцистрон-Н не інгібується антитромбіном III і гепарином, не активує фактор XIII, не викликає рефракцію згустків [57, 60, 70, 71]. Концентрацію розчину фібрину визначали спектрофотометрично. Розрахунки проводили за формулою:

$$\Phi = (E_{280} - E_{320}) * 255 / 15.06,$$

де Φ – концентрація фібриногену в плазмі крові, г/л; 255 – коефіцієнт для перерахунку вмісту фібриногену в об'ємі зразку на його концентрацію в плазмі; 15.06 – коефіцієнт екстинції поглинання 1% розчину фібрину в кислому середовищі при довжині хвилі 280 нм.

Дослідження, що проводились з використанням модельних систем, показали, що анцистрон-Н дозволяє визначати вміст фібриногену в плазмі крові навіть в присутності 40 од/мл гепарину [57, 60].

Вміст розчинних фібрин-мономерних комплексів РФМК. Принцип паракоагуляційних тестів, що застосовуються в клінічній практиці для виявлення фібрин-мономерних комплексів в плазмі крові, базується на тому, що після додавання в плазму крові відповідних реагентів відбувається вивільнення фібрин-мономера із комплексу, з наступною полімеризацією його з утворенням гелю.

Оскільки тести, що виконуються в клінічній практиці, мають низьку специфічність, запропоновано використання методу виявлення РФМК, розробленого В.А. Беліцером і Т.В. Варецькою, що базуються на реакції паракоагуляції в присутності фосфатних буферів. Фосфатні буфери дозволяють оптимізувати умови тесту при яких фібриноген і ПРФ осаджуються в незначних кількостях [52]. Кількість РФМК визначають по калібрувальному графіку, отриманому на модельній системі, яка складається із плазми крові донорів і певної кількості мономерного фібрину [57, 60, 66, 82].

Визначення вмісту ПРФ. ПРФ є вторинними антикоагулянтами, які гальмують утворення фібринового згустку. Тест базується на визначенні ступеню уповільнення часу полімеризації препарату мономерного фібрину в присутності дослідженої плазми крові, яка містить ПРФ. Ступінь подовження часу формування згустку в тесті прямо пропорційний концентрації ПРФ [57, 60].

Визначення вмісту фізіологічних інгібіторів зсідання крові. До основних інгібіторів зсідання крові відносяться антитромбін III і протеїн С. Антитромбін III є інгібітором тромбіна, а також XIIa, XIa, IXa, Xa, VIIa факторів в системі зсідання крові [53, 57].

Активований протеїн С вибірково розщеплює фактори зсідання Va і VIIa. Визначення вмісту функціонального активного протеїну С має важливе

значення для оцінки антикоагуляційного потенціалу крові. Активація системи зсідання крові призводить до зниження концентрації протеїну С.

Для визначення активності протеїну С використовували неспецифічні активатори – тромбін, трипсин і активатор фактора X, виділений із отрути гадюки Рассела. Однак для прискорення цього процесу необхідно наявність кофакторів, наприклад тромбомодуліну. Тому, визначення рівня протеїну С було технічно складним. В 1986р. показано, що отрута *Agkistrodon contortrix contortrix* здатна активувати протеїн С. Далі із отрути цієї змії було виділено активатор протеїну С, відомий як Protas. Аналогічні за дією ферменти активатори знайдені також в отруті змії роду *Agkistrodon* [73].

Активатори протеїну С, що містяться в отруті змії, виключають використання комплексу тромбін-тромбомодулін. Перевага нефізіологічних активаторів протеїну С, виділених із отрути змії, полягає в їх специфічності, високій швидкості активації протеїну С, відсутності в плазмі крові їх інгібіторів, а також їх резистентності до високої іонної сили, що дозволяє використовувати їх для визначення рівня протеїну С *in vitro*. На відміну від імунологічних тестів, застосування яких дозволяє знайти тільки вміст протеїну С, тести з використанням активатора протеїну С характеризують функціональну активність цього білка.

Для визначення активності протеїну С із отрути щитомордника звичайного (*Agkistrodon halys halys*) виділено фермент – активатор протеїну С. Порівняння його дії з дією фірмового препарату Protas (США) показало ідентичність впливу обох препаратів [57, 74].

Принцип методу визначення активності протеїну С в плазмі крові полягає в його здатності інактивувати фактори Va і VIIIa, що призводить до подовження часу зсідання плазми крові в тесті АЧТЧ в присутності активатора протеїну С. При дефіциті протеїну С час зсідання плазми крові скорочується [57, 62, 63, 80].

Активация системы зсідання крові супроводжується зниженням вмісту протеїна С і накопиченням маркерів тромбінемії – РФМК, функціонально неактивних форм протромбіну.

Методи визначення активності тканинного активатора плазміногену в еуглобуліновій фракції плазми крові і інгібітора активатора плазміногену першого типу в плазмі крові.

В процесі фібринолізу безпосередньо бере участь специфічний фермент крові – плазмін, який утворюється із свого неактивного попередника – плазміногена. Активацію плазміногену у фізіологічних умовах здійснює t-PA і активатор урокіназного типу. Дія ферментів фібринолізу знаходиться під контролем їх інгібіторів, основними з яких є α_2 -антиплазмін – специфічний інгібітор плазміну і інгібітор активатора плазміногена першого типу (ПАІ-1).

Для характеристики системи фібринолізу найчастіше всього застосовується тест, що дозволяє становити загальну фібринолітичну активність. Для більш детальної характеристики фібринолітичного потенціалу необхідно визначення вмісту/активності компонентів системи фібринолізу. Вміст плазміногену і α_2 -антиплазміна визначають за допомогою хромогенних субстратів [64].

Для встановлення активності t-PA в плазмі крові адаптовано метод визначення цього показника в крові хворих з різними патологіями, пов'язаними з порушеннями системи гемостазу [65-67].

Принцип метода полягає у здатності t-PA в присутності стимулятора перетворювати плазміноген в плазмін. Плазмін розщеплює хромогенний субстрат з вивільненням у розчин паранітроаніліду, зміну його оптичної щільності вимірюють при 405 нм. В нормі активність t-PA складає 2,05 МО/мл, Зниження його активності свідчить про загрозу тромботичного ускладнення, а підвищення – при схильності до геморагій [56]. Активність t-PA є важливим інформативним показником стану системи фібринолізу і характеризує фібринолітичний потенціал досліджуваної плазми [75-78, 83].

Імунохімічні методи визначення вмісту t-PA дають інформацію про кількість t-PA, але не характеризують його активність, тоді як для оцінки ефективності терапії в деяких випадках важлива саме інформація про його активність [56, 79].

Активність ПАІ-І в плазмі крові також є важливим показником стану системи фібринолізу і може пояснити причину зниження загального фібринолітичного потенціалу при підвищенні активності t-PA.

Наприклад, визначення ПАІ-І і t-PA в плазмі крові жінок після кесаревого розтину, фібринолітичний потенціал знижується, незважаючи на високу активність t-PA (9,26 МО/мл), що можна пояснити підвищенням активності його інгібітора – ПАІ-І.

Визначення загального рівня протромбіну і його неактивних форм.

Для встановлення вмісту протромбіну в плазмі крові і виявлення його функціонально неактивних форм, використовували активатор протромбіну екамулін, виділений із отрути ефі (*Echis multisquamatus*). За властивостями цей фермент подібний до екарину, виділеному із отрути ефі піщаної, який широко використовується в зарубіжній клінічній практиці [72, 73].

На відміну від тромбoplastину, екамулін здатен активувати безпосередньо протромбін, не активує весь каскад системи зсідання крові. Для активації протромбіна екамуліном не потрібно присутність іонів кальцію, фосфоліпідів та інших кофакторів.

Екамулін здатен активувати не тільки протромбін, але і його функціонально неактивні форми, наприклад претромбін, який з'являється в кровотоці під дією тромбіна і служить маркером внутрішньо судинного зсідання крові.

Фізіологічна активація протромбіну відбувається за дії протромбіназного комплексу (фактори Ха, Va) на фосфоліпідній мембрані в присутності іонів кальцію. Протромбін перетворюється в тромбін під дією фактора Ха шляхом розщеплення двох пептидних зв'язків молекули протромбіну. Це може супроводжуватись накопиченням в плазмі крові N-

кінцевої ланки молекули протромбіну, що містить фрагмент F_{1+2} . Поява цього продукту активації протромбіну розглядається як не прямий показник генерації тромбіну [52, 81,84]. В зарубіжній клінічній практиці для виявлення маркерів тромбінемії широко використовуються імуноферментні методи, за допомогою яких визначають вміст низькомолекулярних фрагментів протромбіну F_{1+2} .

Тромбін, що з'являється в результаті зсідання крові, може розщеплювати молекулу протромбіну з утворенням проміжних похідних. Одна із основних форм похідних – претромбін, який утворюється при відщепленні тромбіну Gla -домену і першого крінгла молекули протромбіну, який при цьому втрачає здатність зв'язуватись з фосфоліпідною мембраною і є фізіологічно неактивним. Виявлення таких функціонально неактивних молекул важливо для діагностики тромбофілії.

Результати теста екамуліновий час представлені у вигляді екамулінового індексу – співвідношення часу зсідання плазми крові донорів і досліджуваної плазми. При накопиченні в плазмі крові функціонально неактивних форм протромбіну екамуліновий індекс вище протромбінового. Значення екамулінового індексу відповідає загальному рівню протромбіну в плазмі крові (функціонально активних і неактивних форм).

Порівняння результатів протромбінового і екамулінового тестів дозволяє виявити функціонально неактивні форми протромбіна і визначити їх вміст. Рівень накопичення таких форм характеризує ступінь активації системи зсідання крові. Цей показник може бути інформативним при оцінці ефективності антитромботичної терапії.

Метод загального гемостатичного потенціалу.

Існує широкий спектр недавно глобальних гемостатичних тестів для виявлення коагуляції з можливістю оцінки гіперкоагуляції, наслідком якої є артеріальна і венозна тромбоемболія [85-87]..

Калібрований автоматичний тест тромбографії (КАТ) є комерційно доступним глобальним гемостатичним методом, який визначає інтеграл часу генерації тромбіна після запуску тканинним фактором [10]. Тест базується на припущенні, що генерація тромбіну в досліджуваній плазмі крові відображає суму активностей і концентрацій про- і антикоагулянтних агентів. Показано, що КАТ може бути корисним інструментом для діагностики набутих або вроджених прокоагуляційних станів, досить чутливий, дозволяє виявити деякі форми геморагічного діатезу [88,89].

На відміну від КАТ, який використовується для скринінгу генерації тромбіну в досліджуваній плазмі і, відповідно, тільки для оцінки її здатності коагуляції, метод загального гемостатичного потенціалу [90] використовується як кількісний метод для визначення рівня фібрину в плазмі крові.

Загальний гемостатичний потенціал (ЗГП) - це простий аналіз, вперше описаний M.Blomback і колегами, а потім модифікований для використання у звичайній гематологічній лабораторії [91,92]. Він дозволяє охарактеризувати функціональну активність систем зсідання і фібринолізу, зв'язок їх між собою. Принцип загального гемостатичного потенціалу полягає в ініціації процесу коагуляції і фібринолізу в плазмі крові невеликою кількістю тромбіну і хлориду кальцію за присутності t-РА, Крива із послідовних спектрофотометричних вимірювань відображає баланс між утворенням і лізисом фібринового згустку в лунках мікротитрувального планшету. Площа під кривою визначається як загальний гемостатичний потенціал. При додаванні прокоагулянтних факторів або антитромбіну ЗГП відповідно змінюється.

Попередні дослідження показали, що цей підхід може бути використано для виявлення різноманітних прокоагуляційних розладів [93–95], а також гіпокоагуляції внаслідок дефіциту прокоагулянтів [94,96]. Було показано, що ЗГП виявляє гіперкоагуляційний стан за вагітності та серцево-судинних патологій [1, 2, 91]. ЗГП може ідентифікувати гіперкоагуляцію у широкого

кола пацієнтів, з окрема з APLA. Крім того, цей метод може визначити, чим обумовлено стан гіперкоагуляції: підвищенням утворенням фібрину чи зменшенням фібринолізу, або їх комбінацією.

Було знайдено, що у хворих з тромбозом глибоких вен, пов'язаним зі стійкістю до дії активованого протеїну С, підтримується підвищена прокоагулянтна активність і спостерігається підвищений рівень загального гемостатичного потенціалу [98].

Caroline J., et al. досліджували загальний гемостатичний потенціал і генерацію тромбіну в групі пацієнтів з ішемічною хворобою серця. Також досліджували зв'язок між інгібіторами фібринлізу і фібринолітичним потенціалом у цих пацієнтів. Показано, що: у пацієнтів з ішемічною хворобою серця спостерігалось підвищене утворення фібрину і тромбіну та порушення фібринолізу (зниження фібринолітичного потенціалу, ФП і збільшення часу лізису згустку) порівняно з донорами.

Показано, що у вагітних жінок ЗГП підвищено, і значно підвищено у жінок з діагнозом преєклампсія [91] Відомо, що у таких пацієнток значно збільшено ризик венозної тромбоемболії [92], He et al. повідомили про підвищених рівнях ЗГП у пацієнтів з серцевим нападом. Вагітність, особливо у випадку ускладнення преєклампсією, супроводжується зниженням рівня протеїну S (PS) в організмі [97, 98], а також підвищенням резистентності до активованого протеїну С [99]. Ці зміни можуть бути причиною більш високого ЗГП, відміченого у вагітних та преєкламптичних жінок.

J . P. Antovic et al. визначали ЗГП і ЗП у 14 пацієнтів (шість чоловіків і вісім жінок) з низькими концентраціями FXII (0,01–0,47 U мл⁻¹); у чотирьох жінок було невиношування вагітності, у двох була легка схильність до кровотеч, один пацієнт мав тромбоз глибоких вен, у семи пацієнтів була виявлена низька концентрація FXII при дослідженні коагуляції в АЧТЧ-тесті. У трьох пацієнтів виявлено підвищений рівень ЗГП (у двох жінок з рецидивуючими абортами і одного чоловіка з тромбозом глибоких вен).

Тридцять здорових людей служили контролем. Різниця між дослідною і контрольною групами була достовірною. Рівень ЗП не відрізнявся між двома групами, тоді як ФП був значно знижено у пацієнтів з дефіцитом FXII без протромботического фенотипу порівняно з контролем. Значення ЗГП не корелювали з рівнем FXII.

Раніше автори описали чітку різницю в значеннях ЗГП і кривих агрегації фібрину між плазмами крові пацієнтів з дефіцитом FXII, FVII, I FIX і FXI та плазмами крові донорів[13]. Отримані результати можуть вказувати на те, що підвищення ЗГП і протромботична тенденція у деяких осіб з дефіцитом FXII є наслідком порушення фібринолізу [14].

Отже, ці результати свідчать про те, що визначення ЗГП може використовуватись для виявлення протромботичних станів, пов'язаних з дефіцитом FXII. Цей метод можна застосовувати як предиктор можливого тромботичного ризику.

J. P. Antovic, et al. вимірювали ЗГП у шести пацієнтів з інгібіторами фактора VIII перед ін'єкцією рекомбінантного FVIIa (rFVIIa) і через 10 і 120 хв після цього. Фібринолітичний потенціал (ФП) і час лізису згустку може використовуватись для непрямой оцінки генерації TAFI. Встановлено збільшення ФП і скорочення часу лізису згустку через 10 і 120 хв після лікування порівняно з контролем. Спостерігалась негативна кореляція між концентрацією pro-TAFI і ФП через 10 хв після ін'єкції FVIIa. Таким чином, rFVIIa нормалізує ЗГП і час лізису згустку через 10 хв після ін'єкції.

Застосовуючи метод ЗГП, досліджували вплив різних концентрацій рекомбінантного фактору VIIa на загальний гемостаз і на TAFI. Показано rFVIIa збільшував ЗГП в FV, FVIII і FIX-дефіцитних плазмах крові, але не до рівня в нормальній плазмі.

J . L . Curnov et al. висунули гіпотезу про те, що метод загального гемостатичного потенціала може показати аномальну генерацію і лізис фібрину у пацієнтів з клінічно визначеним станом гіперкоагуляції. Автори застосували метод ЗГП, як описано M. Blomback і колегами [1, 2].

Досліджено 161 пацієнт з клінічною гіперкоагуляцією: з артеріальною або венозною тромбоемболією, ускладненнями вагітності та аутоімунним захворюванням. Дев'яносто вісім зразків плазми крові нормальних донорів було протестовано для порівняння. Автори отримали три нових параметри аналізу: максимальна оптична щільність, максимальний нахил кривої і затримка початку генерації фібрину.

Виявлено, що значення ЗГП суттєво відрізнялись в групах з гіперкоагуляцією порівняно з контролем, що вказує на те, що як підвищене утворення фібрину, так і знижений фібриноліз сприяють стану гіперкоагуляції. Цей метод може допомогти адаптувати клінічне ведення до індивідуальних потреб пацієнтів.

Дослідження впливу прямих інгібіторів тромбіну дабігатрана і аргатробана на зсідання плазми методом глобального гемостазу показало, що ці інгібітори пригнічують потенціал зсідання і збільшують фібринолітичний потенціал плазми крові [5]. Метод був також застосований для дослідження плазми крові пацієнтів з різними захворюваннями, що супроводжуються порушеннями системи гемостазу, зокрема плазми крові пацієнтів з артеріальною та венозною тромбоемболією, захворюваннями коронарної артерії, ішемічною хворобою серця, аутоімунними захворюваннями, тощо [9-12, 100, 101].

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.

2.1. Матеріали та реагенти.

У роботі були використані такі реактиви та матеріали:

персульфат амонію („FisherBiotech”, США); акриламід/біс-акриламід, 4-(2-гідроксиетил)-1-піперазинетансульфоновою кислота (HEPES), NaCl, трис(гідроксиметил)амінометан, N-гідроксисукцинімідне похідне біотину, SDS, цитрат натрію, антимишачі антитіла кон'юговані з пероксидазою хрому („Sigma”, США); АЧТЧ-реагент фірми Ренам (РФ), рекомбінантний тканинний активатор плазміногену (t-РА) фірми Boehringer Ingelheim (ФРГ), нефракціонований гепарин, та низькомолекулярний гепарин (Клексан) Sanofi-Aventis (США); білків – маркерів молекулярної маси для електрофорезу („Fermentas”, ЄС); Streptavidin-HRP („Amersham Pharmacia Biothec”, Швеція); соєвий інгібітор трипсину („Reanal”, Угорщина); Sephacryl S-300, Lysine Sepharose 4B („GE Healthcare”, США), BrCN-Sepharose, Heparin Sepharose („Amersham biosciences”, Великобританія); пластикові кювети для турбідиметричного аналізу та планшети для імуноферментного аналізу („Sarstedt”, Німеччина); центрифужні фільтри Amicon Ultra для концентрування антитромбіна III („Millipore”, Німеччина).

Решта використаних реактивів вітчизняного виробництва категорії х.ч.

Моноклональні антитіла класу IgG до N-кінця γ -ланцюга D- та DD-фрагментів [102], та до ділянок B β 118-134 (монАТ I-3с) отримано [103]. Анцистрон Н виділили із отрути щитомордника *Agkistrodon halys halys* [104], тромбін методом Фентона [105]. Плазміноген виділили із свіжоотриманої цитратної плазми крові донорів за методом афінної хроматографії на лізин-сефарозі [106]. Антитромбін III виділили із плазми донорів методом афінної хроматографії на гепарин-сефарозі [107].

Зразки крові донорів надані Центром крові Головного військового клінічного госпіталю Міністерства оборони України м. Києва.

Вінницьким національним медичним університетом ім. М.І. Пирогова було надано 25 зразків плазми крові пацієнтів, хворих на інфаркт міокарду, 10 зразків плазми крові хворих на інсульт, 8 зразків плазми крові пацієнтів з захворюванням кульшового суглобу, 88 зразків плазми крові пацієнтів, які страждають на хронічну хворобу нирок, а також 52 зразка плазми крові від пацієнтів, що страждають на стеноз аорти та 36 зразків плазми хворих на стенокардію. Кров пацієнтів та донорів отримували за стандартною методикою пункцією ліктьової вени (кров змішували з 3,8 % розчином цитрату натрію у співвідношенні 9:1). Плазму крові отримували центрифугуванням цільної цитратної крові при 1000 g впродовж 20 хвилин.

Аліквоти плазми крові донорів і хворих зберігали при -20 °С.

На проведення досліджень з плазмою крові людей отримано дозвіл Комісії по етиці Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова та інформовану згоду від кожного пацієнта.

2.2. Методи дослідження

2.2.1. Визначення гемостатичного потенціалу плазми крові людини.

Гемостатичний потенціал плазми крові донорів і хворих визначали турбідиметричним методом шляхом реєстрації розсіяння світла фібриновим згустком при 405 нм на мікрорідері Multiscan EX (Thermo Fisher Scientific, Фінляндія) [108]. Згусток формували в лунках мікропланшету, в які послідовно додавали 0,05 М HEPES буфер, рН 7,4, що містив 0,15 М NaCl, 70 мкл плазми крові, t-РА до кінцевої концентрації 75 IU/мл (3 мкл) і АЧТЧ-реагент (70 мкл). Процес зсідання плазми крові ініціювали додаванням 100 мкл 25 мМ CaCl₂. Кінцевий об'єм реакційної суміші становив 300 мкл. Аналіз отриманих турбідиметричних кривих дозволяє визначити потенціал зсідання (ЗП), фібринолітичний потенціал (ФП), загальний гемостатичний потенціал (ЗГП), а також τ – лаг-період, який відповідає часу утворення протофібрил; V₁ – тангенс кута нахилу дотичної до початкової найбільш

крутої ділянки кривої світлорозсіювання, що відповідає швидкості латеральної асоціації протофібрил; H – максимальне значення світлорозсіювання фібринового згустку; L - час напівлізису згустку; V_2 - тангенс кута нахилу дотичної до низхідної найбільш крутої ділянки кривої світлорозсіювання, що відповідає швидкості лізису фібринового згустку.

2.2.2. Електрофорез в PAAG.

Електрофорез у поліакриламідному гелі (PAAGE) в присутності SDS проводили за методом Laemmli [109], в якому використовували трис-гліцинову систему на приладі Mini-PROTEAN Tetra cell (Bio-Rad Laboratories, США) для вертикального гель-електрофорезу.

Зразки для електрофорезу готували наступним чином: до розчину білка додавали буфер для зразків, що містив 25 % гліцерол, 2 % SDS та 0,01 % бромфенол в 0,065 M Tris-HCl, pH 6,8. Співвідношення розчин білку:буфер для зразків = 1 : 2. Зразки прогрівали 3 хв при 100 °C. Для відновлення дисульфідних зв'язків у білках до буферу для зразків додавали β -меркаптоетанол до 5 % концентрації.

На трек наносили до 3 мкг білка. Після закінчення розділення білків гелі відмивали від SDS у воді 3 рази по 50 мл і забарвлювали у 0,025 % розчині кумасі G-350 в суміші 5 % ізопропанолу і 10 % оцтової кислоти протягом 30 хв. Залишків барвника відмивали розчином 10 % оцтової кислоти.

Як маркери молекулярної маси використовували суміш білків з молекулярними масами 180; 130; 100; 70; 55; 45; 35; 25; 15; 10 кДа (Fermentas, EU).

2.2.3. Одержання фібриногену.

Фібриноген виділяли із плазми крові донорів шляхом фракційного висолювання сульфатом натрію [110]. Кров отримували у Центрі крові Головного військового клінічного госпіталю Міністерства оборони України,

м. Київ. У якості консерванту використовували розчин 3,8 % цитрату Na, що містив 0,02 М ϵ -АКК та 0,1 мг/мл соєвого інгібітору трипсина, у співвідношенні цільна кров: антикоагулянт 9:1. Отриману кров відразу охолоджували до +4 °С.

Плазму отримували шляхом дворазового центрифугування крові при 1400 g протягом 1 год при 6-8 °С. Протромбіновий комплекс сорбували на сульфаті барію (60 г $BaSO_4$ на 1л плазми) при постійному перемішуванні протягом 30 хв при 6-8 °С. Суспензію $BaSO_4$ видаляли центрифугуванням при 1400 g впродовж 20 хв при 6-8 °С. Супернатант відбирали і осадження сульфатом барію повторювали. Отримана плазма крові не містила протромбінового комплексу.

Потім плазму нагрівали на водяній бані до +20 °С, додавали 1 М гліциновий буфер рН 9,5, що містив 0,1 М NaCl (1/10 частину від загального об'єму плазми) і видаляли висолюванням альбумінову фракцію плазми крові, покрупельно додаючи 16 % розчин Na_2SO_4 при ретельному перемішуванні до 5,7 % насичення. Утворений осад відділяли центрифугуванням при 1400 g протягом 20 хв при +18 °С. Отриманою надосад відбирали і фракцію фібриногену висолювали додаванням 16 % Na_2SO_4 до насичення у 8,5 %. Утворений преципітат знову центрифугували при 1400 g протягом 20 хв при +18 °С. Супернатант відкидали, а осад фібриногену розчиняли при повільному перемішуванні на магнітній мішалці в 0,2 М NaCl (з розрахунку 200 мл 0,2 М NaCl на осад, отриманий з 1 л плазми).

Розчинений в 0,2 М NaCl фібриноген переосаджували рівним об'ємом 16 % Na_2SO_4 та преципітат відділяли центрифугуванням при 1400 g протягом 20 хв при +18 °С. Осад знову розчиняли в 0,2 М NaCl за такого ж розрахунку та додатково вносили 1/5 об'єму 0,5 М калій-фосфатного буферу рН 6,5. Повторно проводили переосадження. Після центрифугування осад розчиняли в 0,15 М NaCl (осад з 1 л плазми розчиняли в 75 мл 0,15 М NaCl) та визначали концентрацію білка.

Кінцевим етапом виділення фібриногену було видалення кріоформи, що містила фібрoneктин. Розчин фібриногену у 0,15 М NaCl термостатували при +4 °С впродовж 36 год, після чого центрифугували при 1400 g 20 хв при +4 °С. Відбирали супернатант і термостатували його при +22 °С, висолювали Fg рівним об'ємом 16 % Na₂SO₄. Центрифугували 20 хв при 1400 g при +22 °С. Отриманий осад розчиняли в 0,15 М NaCl до кінцевої концентрації Fg 25-30 мг/мл. Розчин Fg у аліквотах заморожували в суміші ацетону та рідкого азоту при співвідношенні 1 : 1 та зберігали при -20 °С. Перед використанням розчин Fg термостатували впродовж 20 хв на водяній бані при +37 °С. Чистоту препарату визначали за допомогою електрофорезу у PAGE.

2.2.4. Визначення концентрації білків

Концентрацію білків у розчинах визначали спектрофотометрично за різницею оптичного поглинання в області 280 нм і 320 нм. Для розрахунку концентрації використовували наступні значення коефіцієнтів молярної екстинкції ($E_{1\%}^{1\text{cm}}$): для Fg – 15,06, для фібрину desAB та desA – 14,84 [111]. Вимірювання оптичного поглинання проводили на спектрофотометрі СФ-2000 (ОКБ „Спектр”, Росія).

2.2.5. Визначення фібриногену в плазмі крові.

Загальний вміст фібриногену в плазмі крові визначали спектрофотометричним методом. У скляну пробірку додавали 0,2 мл плазми та 1,7 мл 0,1 М фосфатного буфера рН 7,0. Зсідання плазми крові ініціювали додаванням 0,1 мл тромбін-подібного ензиму анцистрону (2 НІН/мл). Після інкубації протягом 30 хв при 37°С згусток фібрину викручували на скляну паличку, промивали та розчиняли у 5 мл 1,5 % оцтової кислоти. Концентрацію протеїну визначали, вимірюючи поглинання розчину при довжині хвилі 280 та 320 нм, розраховували по формулі $C_{\text{Fg}} = (E_{280} - E_{320})/1,506$ та виражали у мг на 1 мл плазми крові.

2.2.6.. Визначення протеїну С в плазми крові.

Рівень протеїну С визначали з використанням хромогенного субстрату S2236 («GE-Healthcare», США). Для цього змішували 0,03 мл досліджуваної плазми крові, 0,035 мл 3 мМ розчину S2236 з 0,05 мл активатора протеїну С («Ренам», Росія) в 0,05 М трис-НСІ буфері, рН 7,4. Загальний об'єм реакційної суміші складав 0,25 мл. Швидкість розщеплення субстрату визначали при довжині хвилі 405 та 495 нм на рідері Multiscan EX (Фінляндія) і виражали у відсотках відносно контрольної донорської плазми крові, активність якої приймали за 100 %.

2.2.7. Дослідження впливу гепарину на формування та гідроліз фібринового згустку в системі фібриноген + тромбін.

Вплив гепарину на полімеризацію фібрину досліджували турбідиметричним методом шляхом реєстрації при 350 нм мутності фібринового згустку, що утворювався в спектрофотометричній кюветі, в яку послідовно додавали до 0,02 М HEPES буфера, рН 7,4, що містив 0,15 М NaCl і 0,1 мМ CaCl₂, антитромбін III та фібриноген в кінцевих концентраціях відповідно 0,02 та 0,25 мг/мл та гепарин в досліджуваних концентраціях. Процес полімеризації фібриногену ініціювали додаванням тромбіну до кінцевої концентрації 0,5 NIH/мл. Для руйнування згустку у реакційне середовище додавали плазміноген і t-PA до кінцевої концентрації 5 мкг/мл і 15 IU/мл відповідно. Кінцевий об'єм реакційної суміші становив 400 мкл. Зростання мутності згустку реєстрували в автоматичному режимі на спектрофотометрі СФ-2000 (ОКБ „Спектр”, Росія). На отриманій в експерименті кривій визначали τ – лаг-період - час формування протофібрил, V_1 – швидкість латеральної асоціації протофібрил, та H – максимальну мутність, що корелює з товщиною фібрил, L - час напівлізису згустку, а також ЗП, ФП та ЗГП [112].

2.2.8. Імуноферментний аналіз.

Концентрацію розчинного фібрину і D-димеру у плазмі крові визначали імуноензимним методом з застосуванням моноклональних антитіл, отриманих у відділі молекулярної імунології Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України. В цих методах фібрин-специфічні моноклональні антитіла FnI-3C та D-димер-специфічні моноклональні антитіла III-3b були використані як “catch”-антитіла для сорбції на полістирольному планшеті. Як “tag”-антитіла в обох методах використовували моноклональні антитіла II-4d мічені біотином, епітоп для яких розташований в D-доміні фібриногену.

Антигени монАТ I-3c розводили до концентрації 0,01 мг/мл 0,02 M HEPES, pH 7,4 з 0,3 M NaCl і вносили в лунки мікропланшету. Інкубували протягом 16 год при +4 °C. Для видалення антигену, що не зв'язався, лунки тричі промивали 0,01 M калій-фосфатним буфером, pH 7,4, який містив 0,14 M NaCl, 0,05 % Tween-20, 0,02 % NaN₃ (ТФБ). Блокування місць неспецифічного зв'язування білку проводили 3,5 % розчином знежиреного молока в ТФБ протягом 1 години при 37 °C. Лунки тричі відмивали ТФБ. Далі в лунки вносили 0,1 мл плазми крові в 10-кратному розведенні, інкубували впродовж 1 год при 37 °C. Лунки тричі відмивали ТФБ.

Як вторинні антитіла використовували біотинильоване монАТ II-4d, по 0,1 мл якого в концентрації 2 мкг/мл вносили у лунки мікропланшетів. Інкубували впродовж 1 год, потім тричі відмивали ТФБ та наносили стрептавідин-HRP кон'югат, розведений у 5000 ТФБ. Знову інкубували впродовж 1 год. Потім вічка мікропланшетів промивали тричі ТФБ та вносили в кожне з них по 100 мкл 0,05M калій-фосфатного буферного розчину pH 6,0 з 0,03% перекисом водню та 0,04% ортофенілендіаміном. Інкубували впродовж 30 хв до появи забарвлення. Реакцію зупиняли додаванням у вічка по 50 мкл 2 N H₂SO₄. Екстинцію в лунках мікропланшету вимірювали на рідері Thermo Multiskan EX (Thermo Electron, Німеччина) при довжині хвилі 492 нм.

2.2.9. Біотинилування антитіл.

N-оксисукцинімідний ефір біотину з концентрацією 1 мг/мл, розведений в диметилсульфоксиді (ДМСО), додавали до 1 мг/мл мОНАТ в 0,1 М карбонатному буфері, рН 9,5 в об'ємному співвідношенні 1 : 8, відповідно [113]. Обережно перемішували та інкубували протягом 4 год при температурі +22 °С. Проводили діаліз проти 0,01М калій-фосфатного буферу, рН 7,4, що містив 0,14 М NaCl з використанням концентратора „Amicon” (PM-10 membrane, Millipore, США) під тиском аргону 0,1 МПа.

2.2.10. Математична обробка.

Математичну обробку та аналіз отриманих експериментальних даних виконували за допомогою пакету програм Excel 2003, SigmaPlot та TotalLab TL100. Представлені на рисунках дані є типовими для серії повторюваних дослідів (не менше трьох у кожній серії). Визначали середнє значення величин параметрів і їх стандартне відхилення ($X \pm m$). Кореляційний аналіз параметрів гомостазу проводили, визначаючи лінійний коефіцієнт кореляції Пірсона. Достовірність різниці між середніми значеннями двох груп визначали за тестом Ст'юдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

РОЗДІЛ 3.

ДОСЛІДЖЕННЯ СИСТЕМИ ГЕМОСТАЗУ ЛЮДИНИ В НОРМІ ТА ЗА ПАТОЛОГІЧНИХ СТАНІВ.

В нормі система гемостазу відповідає за цілісність судин і організму в цілому, активуючись короткочасно для закриття їх пошкоджень шляхом утворення тромбів. При патологічних станах, коли в кров потрапляють прокоагулянтні агенти зовнішнього або внутрішнього походження, відбувається активація системи зсідання крові і у хворого може виникнути загроза тромбозів. Тривала активація системи зсідання приводить до постійного утворення тромбіну в кровотоці, що має місце при хронічних захворюваннях. Тромбін - багатофункціональний ензим [114]. З одного боку він активує тромбоцити і фібриноген з утворенням розчинного фібрину, стимулює власну активацію, активуючи FVIII, FV, FXI, а також TAFI, який відщеплює C-кінцеві лізини у фібрині, що руйнується плазміном, і гальмує фібриноліз. З іншого – активує протеїн C, який руйнує FVIIIa і FVa та разом з TFPI і АТIII+He гальмує утворення тромбіну [115]. Тривала активація коагуляції не має певної фізіологічної спрямованості, ініціює функціонально пов'язані з нею системи, призводить до споживання факторів системи зсідання, створюючи загрозу тромбозу чи ДВЗ синдрому [116]. Тому метою роботи було з'ясувати ступінь зв'язку між активністю системи коагуляції та активністю систем протеїну C і фібринолізу при серцево-судинних, хірургічних захворюваннях та хронічних захворюваннях нирок.

Дослідження проводили в двох експериментальних системах: аналізували процес формування і гідролізу фібринового згустку в плазмі крові, ініційований АЧТЧ реагентом, за методом гемостатичного потенціалу та за параметрами турбідиметричної кривої; та характеризували стан

системи гемостазу в плазмі крові за концентраціями його молекулярних маркерів - фібриногену, розчинного фібрину, протеїну С та D-димеру.

Було досліджено 239 зразків плазми крові донорів і пацієнтів за хвороб, пов'язаних з активацією системи зсідання крові: донорів (n=10), хворих на інфаркт міокарду (n=25), інсульт (n=10) за захворювань тазостегнового суглобу (n=8), хворих на стеноз аорти (n=51), стенокардію (n=47), хронічну хворобу нирок (n=88). З метою пошуку зв'язку між параметрами гемостатичного потенціалу та концентраціями молекулярних маркерів проводили парний кореляційний аналіз за методом Пірсона на прикладі хворих на хронічну хворобу нирок у групах пацієнтів зі зростаючим рівнем розчинного фібрину, яке свідчило про різний рівень активації системи зсідання.

3.1. Характеристика кривої утворення і руйнування згустку плазми крові і її параметрів.

Для характеристики системи гемостазу в плазмі крові донорів і хворих ми визначали наступні параметри кривої зсідання крові, які описують як процес зсідання в цілому, так і основні його стадії. [P]. Загальну ефективність утворення (під дією реагенту АЧТЧ) та гідролізу (під дією t-РА) фібринового згустку в плазмі крові, визначали за величиною гемостатичного потенціалу, який має три складові – ЗП (потенціал зсідання), що характеризує роботу внутрішнього шляху коагуляційного каскаду; ФП (фібринолітичний потенціал, що показує здатність фібринолітичної компоненти системи руйнувати згусток; ЗГП (загальний гемостатичний потенціал), що показує здатність системи гемостазу до підтримки балансу між утворенням і руйнуванням згустку в плазмі крові.

На Рис. 3.1. представлено типову турбідиметричну криву, що характеризує процес утворення і руйнування фібринового згустку в плазмі крові. На ній чітко визначаються три ділянки. Перша ділянка кривої включає такі складові: τ – лаг-період, що залежить від швидкості утворення тромбіну внутрішнім

каскадом коагуляції, відповідає часу утворення протофібрил фібрину і корелює з протромбіновим часом; V_1 – швидкість зростання поглинання, що відповідає швидкості латеральної асоціації протофібрил в ході формування фібринових фібрил, корелює з концентрацією фібриногену і залежить від концентрації тромбіну.

Друга ділянка кривої – плато, характеризується максимальним поглинанням згустку (Н), яке головним чином залежить від концентрації тромбіну і визначається діаметром фібрил полімерного фібрину в плазмі крові [117].

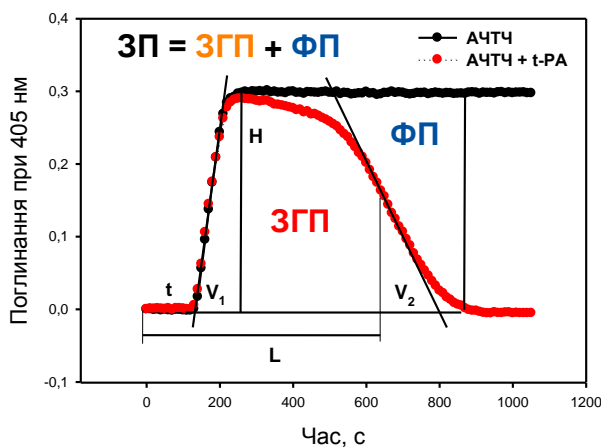


Рис. 3.1. Турбідиметричні криві, що описують зсідання плазми крові донорів, що активується АЧТЧ-реагентом. Параметри турбідиметричної кривої, що характеризують утворення і гідроліз фібринового згустку в плазмі крові ЗП – потенціал зсідання, ЗГП – загальний гемостатичний потенціал, ФП – фібринолітичний потенціал, τ – лаг-період, V_1 – швидкість латеральної асоціації протофібрил, Н – максимальна мутність згустку, L – час напівлізису згустку, V_2 – швидкість гідролізу фібринового згустку.

Третя ділянка відображає процес руйнування фібринового згустку і характеризується: а) L – часом напівлізису згустку, який залежить від діаметру фібринових фібрил згустку, концентрації плазміногену і t-РА та швидкості активації плазміногену t-РА; б) V_2 – швидкістю руйнування

фібринового згустку, яка залежить від концентрації плазміну в згустку і концентрації інгібіторів плазміну ($\alpha 2$ -антиплазміну, PAI-1) в плазмі крові.

Перша і друга ділянки кривої відображають коагуляційну активність плазми крові, в першу чергу – потенціал внутрішнього шляху системи зсідання, концентрацію фібриногену і наявність в плазмі крові інгібіторів системи зсідання. Третя ділянка кривої характеризує фібринолітичну складову системи гемостазу, а саме: швидкість активації плазміногену t-PA, швидкість руйнування структури згустку плазміном, наявність і концентрацію інгібіторів фібринолізу. Таким чином, турбідиметрична крива містить інформацію про швидкість молекулярних перетворень в процесі активації системи гемостазу, а саме: активації тромбіну, перетворення фібриногену у фібрин, формування протофібрил, фібрил і структури фібринового згустку і його здатність активувати систему фібринолізу і розчинятися під дією плазміну. Турбідиметрична крива демонструє також хід та підсумок взаємодії складових системи гемостазу, що відображається в розмірі і часі існування фібринового згустку. Основним інтегральним параметром кривої, що кількісно виражає баланс між процесами утворення і руйнування згустку є ЗГП - площа поверхні, яку крива охоплює, розмірність якої виражена в одиницях оптичної щільності за секунду (Рис. 3.1).

Криві на етапі зсідання плазми за присутності і відсутності t-PA співпадають. При цьому мутність згустку швидко досягає максимуму і за відсутності t-PA далі не змінюється, тобто формування згустку закінчується. Оскільки за присутності t-PA швидкість латеральної асоціації протофібрил і формування фібрил не змінюється, то утворення фібринолітичного ензиму плазміну, який би руйнував полімерний фібрин, на етапі виходу кривої на плато практично не відбувається (Рис.3.1.1) [118]. Відомо, що зв'язування протофібрил з фібрилою конкурує зі зв'язуванням плазміногену (Pg) і t-PA з поверхнею фібрили, тому Pg і t-PA спостерігаються тільки на поверхні фібрил сформованого згустку [119]. Після виходу кривої на плато, що

означає закінчення формування фібрил згустку, починається активація фібринолітичної системи і руйнування структури згустку. Однак мутність падає повільно, оскільки спочатку відщеплюються переважно α C-регіони фібрину [120, 121]. Після появи C-кінцевих лізінів на молекулах фібрину активація плазміногену на порядок прискорюється руйнування структури згустку переходить у швидку фазу і стрімко завершується (Рис.3.1)[122, 123].

Подібну форму мають турбідиметричні криві утворення і руйнування згустків для плазм крові при всіх досліджених нами захворюваннях з деякими відмінностями.

3.2. Характеристика процесу формування та гідролізу фібринового згустку та параметри гемостатичного потенціалу в плазмі крові в нормі та за патологічних станів

3.2.1 Параметри процесу формування та гідролізу фібринового згустку та гемостатичного потенціалу в плазмі крові донорів та пацієнтів, хворих на інфаркт міокарду, інсульт та ЗТСС.

Для характеристики системи гемостазу кожного із пацієнтів було отримано турбідиметричні криві зсідання його плазми крові, ініційованого АЧТЧ-реагентом, за відсутності і присутності t-РА. На Рис. 3.1.2 зображені типові криві, що описують зсідання плазми крові хворих на інфаркт міокарда, інсульт, та ЗТСС, активоване АЧТЧ-реагентом за присутності і відсутності t-РА.

На основі кривих зсідання плазми крові кожного пацієнта були визначені параметри: лаг-період, швидкість латеральної асоціації протофібрил, максимальна мутність згустку, час його напівлізису. Середні величини значень параметрів та їх стандартне відхилення представлені в Табл. 3.1 [124].

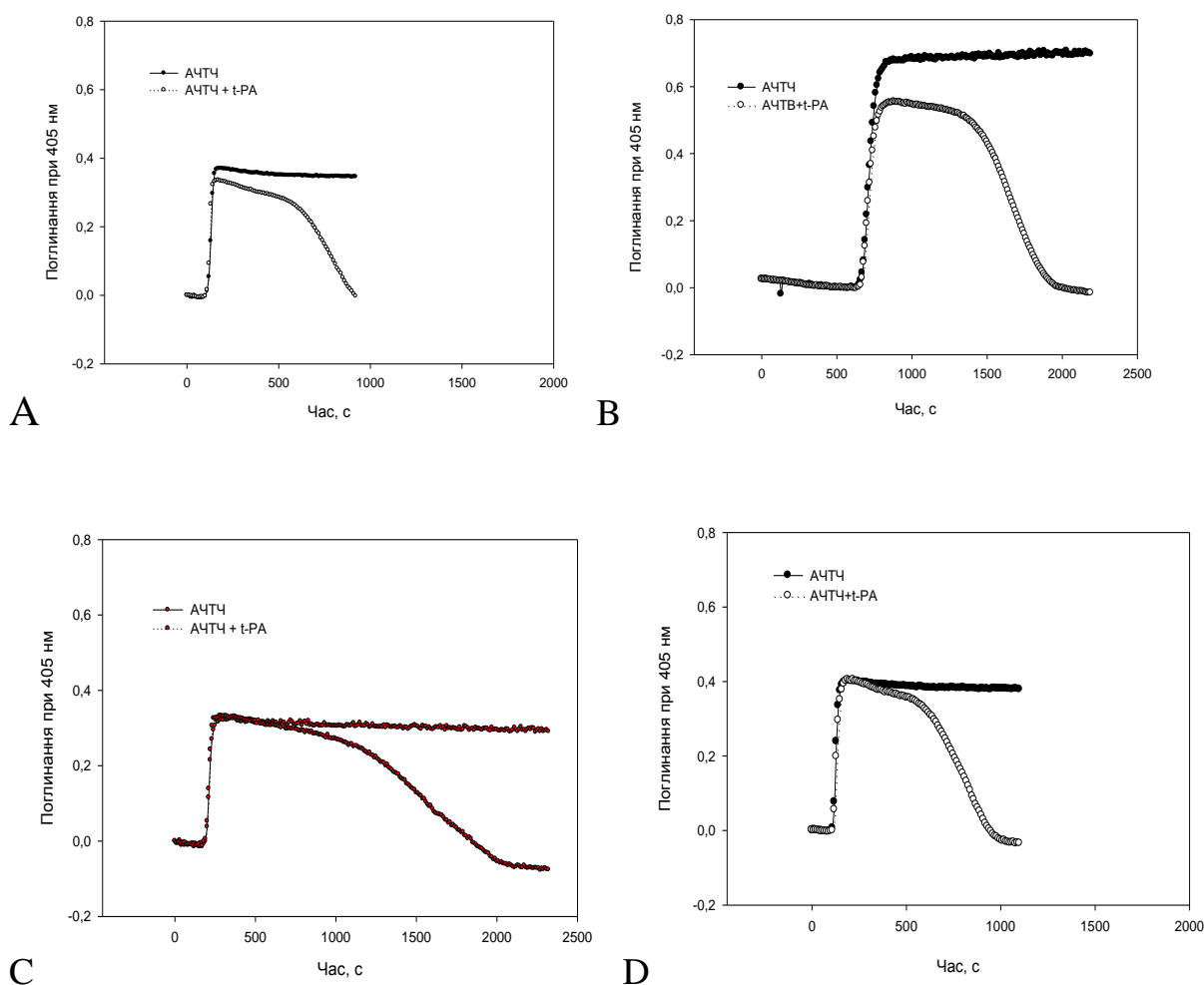


Рис. 3.2. Типові криві, що описують зсідання плазми крові, ініційоване АЧТЧ-регентом за присутності і відсутності t-PA, у пацієнтів, хворих на інфаркт міокарду (A), на інсульт (B), та з захворюваннями тазостегнових суглобів (C). D – крива зсідання плазми крові донорів.

Перш за все, криві полімеризації за інфаркту, інсульту та при захворювання тазостегнових суглобів відрізняються довжиною лаг-періоду, який збільшується при всіх наведених захворюваннях у 2,3, 7,2 і 1,5 рази відповідно (Табл. 3.1, Рис. 3.3), що вказувало на гальмування швидкості утворення тромбіну на внутрішньому шляху зсідання в умовах *in vitro*. Це може бути пов'язано як з інгібуванням полімеризації фібрину, так і з вивільненням у кровотоку гепарину і утворенням його комплексу з

антитромбіном III або присутності у кровотоці інших інгібіторів факторів коагуляційного каскаду чи фібриноутворення.

Таблиця 3.1 Параметри процесу формування та гідролізу фібринового згустку в плазмі крові донорів та пацієнтів, хворих на інфаркт міокарду, інсульт та ЗТСС.

Плазма крові	За відсутності t-PA			За присутності t-PA			
	τ , с	V_1 , о.о./с	H , о.о.	τ , с	V_2 , о.о./с	H , о.о.	L , с
Донори	140±23	0.0081±0.0003	0.39 ±0,02	145±20	-0.0038±0.0011	0.385±17	954 ± 45
Інфаркт міокарду	256±36*	0.0069±0,00046	0.34±0.04	238±27*	-0.0055±0,00044	0.256±0.08*	1004±354
інсульт	793±84*	0.0061±0,00036	0.58 ±0.08*	724±71*	-0.0051±0,00026	0.526±0,12*	1709±95*
ЗТСС	162±28	0.0057±0,0003*	0.26 ±0.032	186±27	0.0065±0,00019*	0.314±0.07	1433± 81*

* $P \leq 0,05$ відносно донорів. τ – лаг-період процесу зсідання плазми крові (с – секунди); V_1 – швидкість латеральної асоціації протофібрил (о.о./с), H – максимальне поглинання фібринового згустку (о.о. - оптичні одиниці поглинання світла при 405 нм); V_2 – швидкість гідролізу згустку; L – час напівлізису згустку.

Інший параметр, який відрізняється у пацієнтів досліджуваних груп – кінцева мутність згустку (H). Зокрема, при інсульті цей параметр зростає у 1,5 рази, порівняно з таким для донорів. Зростання мутності згустку пов'язано, очевидно, в першу чергу зі зменшенням швидкості утворення тромбіну і трансформації фібриногену у фібрин, що супроводжується формуванням згустку з фібрил більшого діаметру, а також включенням в згусток таких білків плазми як фібронектин, фактор фон Віллебранда, альбумін [125,126].. При інфаркті міокарду максимальна мутність згустку у присутності t-PA в середньому на 25 % менша такої у його відсутності і менша за таку донорської плазми. Водночас, кінцева мутність згустків у плазмі крові пацієнтів з захворюванням тазостегнового суглобу менша за норму (Табл. 3.1, Рис. 3.3). Швидкість латеральної асоціації протофібрил при ЗТСС знижена, а час напівлізису згустків у цих пацієнтів подовжений, що вказує на збільшення концентрації інгібіторів фібринолітичної системи в плазмі крові.

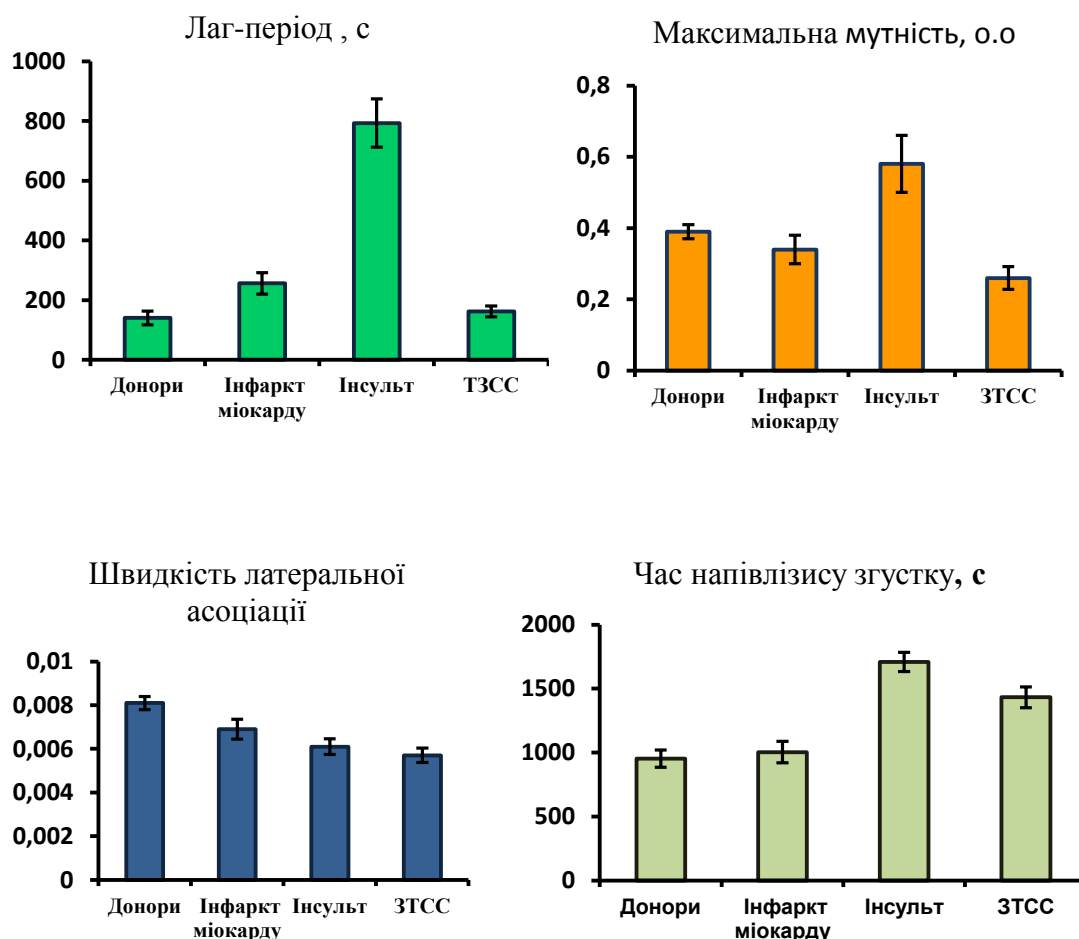


Рис. 3.3. Порівняльний аналіз основних параметрів турбідиметричних кривих - лаг-періоду формування згустку τ , максимальної мутності згустку, швидкості латеральної асоціації протофібрин та часу напівлізису згустку в плазмі крові донорів (n=10) і хворих на інфаркт міокарду (n=25), інсульт (n=10) та захворювань тазостегнового суглобу (n=8), * $P \leq 0,05$ відносно донорів.

Визначення загального показника цього процесу – гемостатичного потенціалу і його складових ЗП, ЗГП і ФП та їх співвідношення (табл.3.2, Рис.3.4) показало, що у хворих на інфаркт по відношенню до донорів ЗП і ЗГП був зменшений відповідно до 78 і 60 %, а ФП складав 123 % від норми. Співвідношення між ЗП і ФП становить $2,5 \pm 1,3$. Це означає, що у таких пацієнтів баланс між системою зсідання і фібринолізу змінюється на користь останньої.

Знайдено, що у хворих на інсульт величина ЗП і ЗГП відповідно на 57 і на 55% більша таких показників у донорів, ФП зростав на 63%. З іншого боку, аналіз співвідношення між ЗП і ФП вказує на те, що у пацієнтів баланс між системою зсідання та фібринолізу наближається до фізіологічної норми, відповідно 4,08 і 4,13.

Таблиця 3.2. Параметри гемостатичного потенціалу в плазмі крові донорів (n=10) та пацієнтів, хворих на інфаркт міокарду, (n=25), інсульт (n=10), ЗТСС (n=8),

Плазма крові	ЗП, о.о.*с	ЗГП, о. о.*с	ФП,о. о.*с	ЗП/ ЗГП	ЗП/ ФП	ЗГП/ ФП
Донори	376± 13	285± 19	91± 7	1,32±0,12	4,13±0,09	3,13±0.11
Хворі на інфаркт	281±68	170± 65	112± 22	1,65±0,23	2,51±0,32*	1,52±0,24
Хворі на інсульт	590±93*	443±77*	148±40*	1,33±0,19	4,0 ±0,33	3,0±0,23
Хворі на ЗТСС	482±53*	374±35*	113±22	1,28± 0,17	4,26±0,29	3,3±0,19

* P≤0,05 відносно донорів

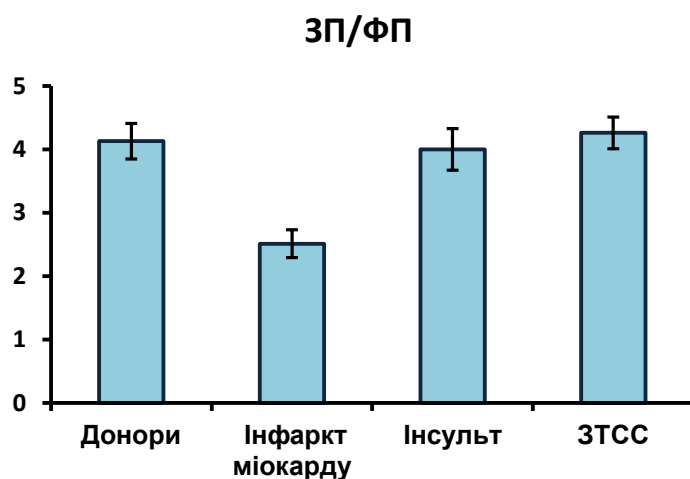


Рис. 3.4. Відношення потенціалу зсідання (ЗП) та фібринолітичного потенціалу (ФП) в плазмі крові донорів (n=10) та пацієнтів, хворих на інфаркт міокарду, (n=25), інсульт (n=10), ЗТСС (n=8), * P≤0,05 відносно донорів.

У плазмі хворих на ЗТСС величина ЗП і ЗГП на 28 і 31% перевищує норму. ФП зростає на 24 %. Проте ЗП/ФП відношення залишається в межах фізіологічної норми. Ці дані вказують на те, що попри важке фізіологічне навантаження на систему гемостазу, регуляторні механізми, залучені до підтримки балансу між системами коагуляції та фібринолізу, а також антикоагулянтною системою, працюють ефективно і достатньо для підтримки балансу цих систем *in vivo*.

При інсульті має місце парадоксальна ситуація, коли гальмування швидкості активації внутрішнього шляху системи зсідання, що супроводжується зменшенням концентрації тромбіну, призводить до збільшення швидкості утворення фібринового згустку, значного збільшення мутності згустку і часу його існування, незважаючи на збільшення ФП плазми крові (Табл. 3.1). Ця ситуація може бути пов'язана зі зростанням концентрації інгібіторів внутрішнього шляху зсідання плазми крові, що гальмує утворення тромбіну. При меншій концентрації тромбіну утворюються довші фібринові протофібрили і зменшується кількість центрів формування фібрил, завдяки чому останні набувають більшого діаметру і викликають більше розсіяння світла, яке реєструється як зростання поглинання (Н) [127],

Таким чином, виявлено порушення процесу формування та гідролізу згустку в плазмі крові пацієнтів за інфаркту, інсульту та при захворювання тазостегнового суглобу. Лаг-період зсідання плазми був подовжений, що вказувало на гальмування швидкості утворення тромбіну на внутрішньому шляху зсідання в умовах *in vitro*. Підвищення кінцевої мутності згустку та подовження часу його напівлізису за інфаркту та інсульту вказувало на загрозу внутрішньосудинного тромбоутворення, попри навіть подовження лаг-періоду формування згустку.

Для загальної характеристики системи гемостазу хворих за досліджуваних патологій було запропоновано відношення потенціалу

зсідання та фібринолітичного потенціалу (ЗП/ФП). Використання цього показника дозволило встановити, що за інсульту та ЗТСС, попри виявлені нами патологічні зміни, система гемостазу ефективно підтримує баланс між зсіданням крові та фібринолізом (ЗП/ФП = $4,0 \pm 1,9$, $4,26 \pm 1,49$ відповідно, значення в плазмі крові донорів: $4,1 \pm 0,1$). Водночас, при гострому інфаркті міокарду ця рівновага суттєво зміщується в бік фібринолізу – показник становить $2,5 \pm 1,3$.

3.2.2. Параметри процесу формування та гідролізу фібринового згустку та гемостатичного потенціалу в плазмі крові донорів та пацієнтів, хворих на стеноз аорти і стенокардію.

Загальна кількість обстежених хворих становила 96 осіб, із яких 51 пацієнт з діагнозом стеноз аорти, 45 пацієнтів – з діагнозом стенокардія. Для визначення параметрів гемостатичного потенціалу плазми крові кожного із пацієнтів було отримано турбідиметричні криві зсідання плазми крові, ініційованого АЧТЧ-реагентом, за відсутності і присутності t-РА (рис. 3.5 та 3.6). Середні величини значень параметрів та їх стандартне відхилення представлені в Табл. 3.3 та 3.4.

Таблиця 3.3. Параметри процесу формування та гідролізу фібринового згустку в плазмі крові донорів (n=10) та пацієнтів, хворих на стеноз аорти (n=51) та стенокардію (n=47).

Параметри	За відсутності t-РА			За присутності t-РА			
	t, с	α , о. о./с	H, о.о.	t, с	H, о. о.	L, с	H ₀ , о. о.
Донори	140±23	0,0085±0.0012	0,381±0,052	145±23	0,375±0,043	748±37	0,332±0,153
Стеноз	167±31	0,009±0.0022	0,378±0.105	168±31	0,380±0,44	973±253	0,471±0,226
Стенокардія	184±78*	0,0078±0,0027	0,347±0,110	194±39*	0,358±0, 72	891±248	0,534±0,218

* P<0,05 відносно донорів.

Таблиця 3.4. Параметри гемостатичного потенціалу в плазмі крові донорів (n=10), хворих на стеноз аорти (n=51), стенокардію (n=47).

Параметри	ЗП, о. о.*с	ЗГП, о. о.*с	ФП, о. о.*с	ЗП/ЗГП	ЗП/ФП	ЗГП/ФП
Донори	345±17	257,5±15	88,5±11	1,34±0,02	3,94±0,08	2,93±0,05
Стеноз аорти	423±185	320±144	104±61	1,33±0,13	4,71±0,46	3,7±0,45
Стенокардія	384±168	307±122	95±59	1,19±0,8	4,95 ± 1,2 *	3,82±1,13

* $P \leq 0,05$ відносно донорів.

Стан системи гемостазу хворих на стенокардію відрізняється від такого у випадку стенозу аорти. Зокрема, за умов стенокардії зростає величина лаг-періоду, що вказує на дещо більший рівень інгібіторів активації системи зсідання крові у хворих на стенокардію. За стенозу аорти зростання лаг-періоду не є статистично достовірним (Табл. 3.3). Максимальна мутність фібринового згустку (Н) в середньому практично не відрізнялася від контрольних значень (Табл. 3.3). Слід відмітити, що початкова мутність плазми крові хворих була більшою за таку донорів, що, ймовірно, пов'язано з присутністю в плазмі високої концентрації ліпопротеїнових частинок. Виявлено також тенденцію до подовження часу напівлізису згустку як за стенокардії, так і за стенозу аорти. Співвідношення потенціалу зсідання до фібринолітичного потенціалу – за умов стенозу аорти не відрізнялося від контрольних значень (Табл. 3.4). Водночас за стенокардії воно дещо зросло, що свідчить про зсув рівноваги в бік коагуляції (ЗП/ФП = 4,95 ± 1,2).

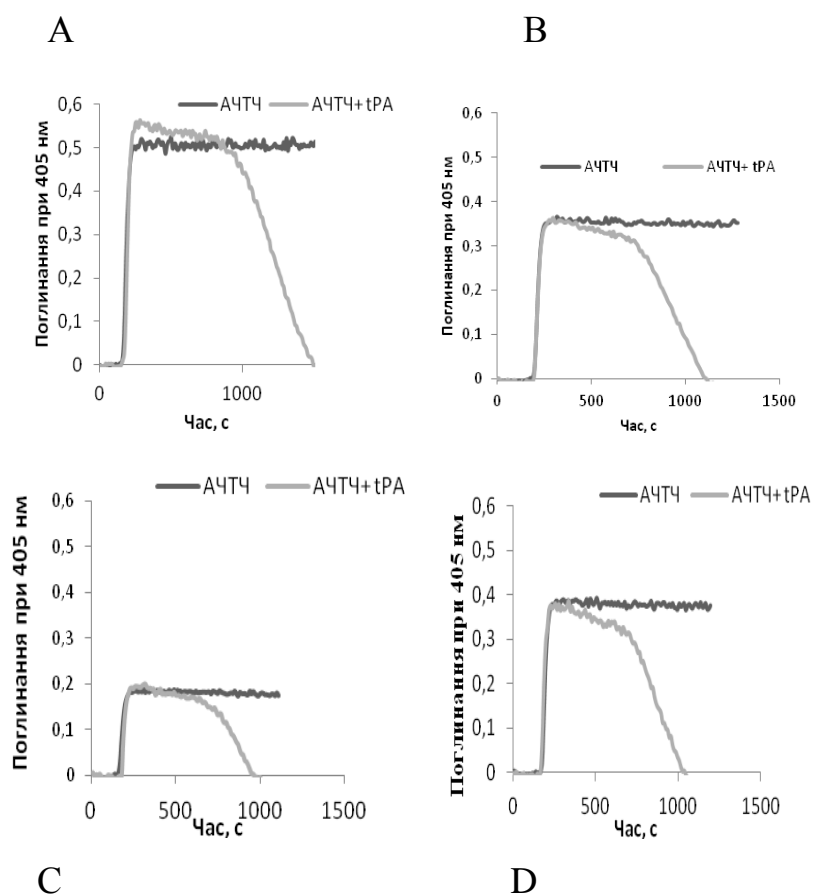
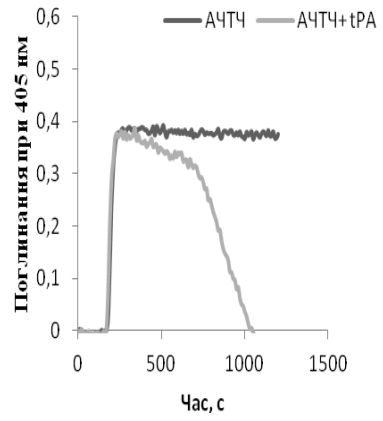
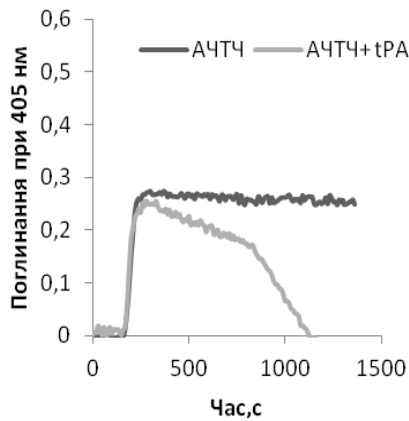
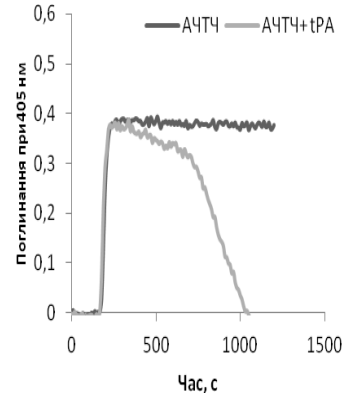
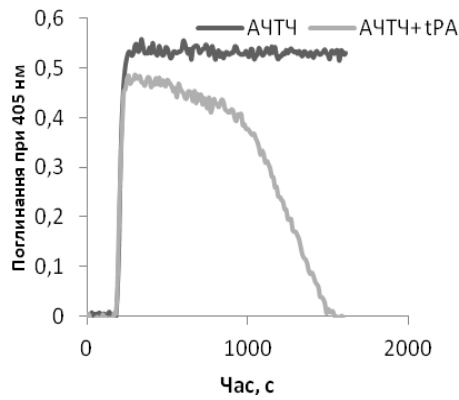


Рис. 3.5. Типові турбідиметричні криві зсідання плазми крові, активованої АЧТЧ реагентом за відсутності та присутності t-РА, пацієнтів зі стенозом аорти: А - група хворих (n=17) з підвищеним рівнем ЗГП; (В) група хворих (n=13) з рівнем ЗГП, близьким до норми; С – група хворих (n=13) зі зниженим рівнем ЗГП; D криві зсідання плазми крові донорів.

На відміну від попередніх патологій, за стенозу та стенокардії не було виявлено особливостей у формуванні та гідролізі фібринового згустку. Водночас, 30% пацієнтів зі стенозом аорти та 45 % хворих зі стенокардією мали близьку до норми величину ЗГП. У 40% пацієнтів зі стенозом і 20% зі стенокардією спостерігали достовірне збільшення значень ЗП і ЗГП, а у 30 % хворих на стеноз та 35 % хворих на стенокардію ці показники були значно нижчі за нор. Типові турбідиметричні криві формування та гідролізу фібрину в плазмі крові пацієнтів за стенозу аорти та стенокардії наведено на Рис. 3.5 і 3.6.

А

В



С

Д

Рис. 3.6. Типові криві зсідання плазми крові, активованої АЧТЧ-регентом за відсутності та присутності t-РА, пацієнтів за умов стенокардії: А - група хворих (n=10) з підвищеним рівнем ЗГП; В - група хворих (n=22) з рівнем ЗГП, близьким до норми; С – група хворих (n=17) зі зниженим рівнем ЗГП; D криві зсідання плазми крові донорів.

Представлені дані свідчать про індивідуальні особливості і значний дисбаланс у системі гемостазу пацієнтів за стенокардії та стенозу аорти, який може призводити до тяжких наслідків та вказує на необхідність контролю за станом системи зсідання крові та фібринолізу пацієнтів.

3.2.3. Параметри процесу формування та гідролізу фібринового згустку та гемостатичного потенціалу в плазмі крові донорів та пацієнтів, хворих на хронічну хворобу нирок, які регулярно проходять процедуру гемодіалізу.

Загальна кількість обстежених хворих становила 88 осіб, із яких 52 були чоловіки і 36 - жінки. Для визначення параметрів гемостатичного потенціалу плазми крові кожного із пацієнтів було отримано турбідиметричні криві процесів зсідання плазми крові, ініційованого АЧТЧ-реагентом, за відсутності і присутності t-РА. Усереднені експериментальні криві і їх стандартне відхилення для пацієнтів цих груп представлені на Рис.3.7 (А, В, С).

На основі кривих зсідання плазми крові кожного пацієнта були визначені параметри системи гемостазу плазми крові *in vitro*, і середні значення цих параметрів та їх стандартне відхилення представлені в Табл. 3.5 та 3.6.

Представлені в Табл.3.5 дані вказують на те, що величини всіх параметрів за винятком лаг-періоду та H_0 у жінок мають тенденцію бути дещо більшими, ніж у чоловіків, проте ця різниця не для усіх показників є статистично достовірною. Звертають на себе увагу однакові величини лаг-періодів зсідання плазми крові у всіх хворих. Це свідчить про однакову швидкість активації внутрішнього шляху зсідання плазми крові у чоловіків і жінок, однакову швидкість утворення тромбіну і формування протофібрил [125].

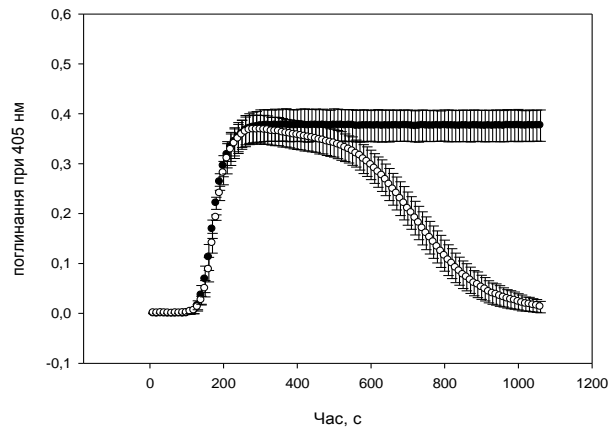
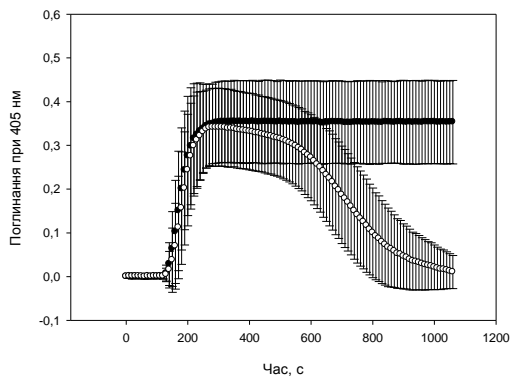
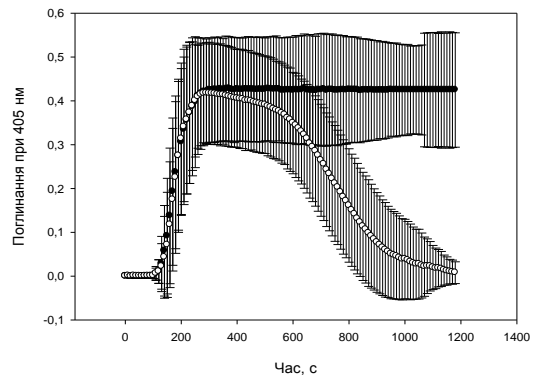
A**B****C**

Рис.3.7 Турбідиметричні криві зсідання плазми крові, активованої АЧТЧ-реагентом, за відсутності (висхідна на плато) та присутності t-РА (висхідна-спадна), пацієнтів, хворих на хронічну хворобу нирок VД стадії, що проходять процедуру гемодіалізу. А – усі пацієнти (n=88), В – чоловіки (n=52), С – жінки (n=36).

Таблиця 3.5. Параметри процесу формування та гідролізу фібринового згустку в плазмі крові донорів (n=10) та пацієнтів, хворих хронічну хворобу нирок VД стадії (гломерулонефрит), які проходять процедуру гемодіалізу (чоловіки - n=52, жінки - n=36, усі пацієнти - n=88). Дані представлені як $X \pm m$ та подано оцінка достовірності різниці між показниками параметрів у чоловіків і жінок.

Параметри	За відсутності t-PA		За присутності t-PA			
	τ , с	Н о.о.	τ , с	Н о.о	L, с	Н _о , о.о
Донори	140±23	0,381±0,052	145±23	0,375±0,043	748±37	0,332±0,153
Чоловіки	155±24	0,361±0,062	159±25	0,351±0,07	726±84	0,375±0,141
Жінки	153±33	0,422±0,08	155±31	0,416±0,064	764±70	0,349±0,153
	n.s.	P < 0,05	n.s.	P < 0,05	n.s.	n.s.
Усі пацієнти	153±28	0,386±0,07	157±28	0,377±0,083	741±107	0,365±0,145

* P≤0,05 відносно донорів. τ – лаг-період процесу зсідання плазми (с – секунди); V1 – швидкість латеральної асоціації протофібрил, Н – максимальне поглинання фібринового згустку); L – час напівлізису згустку; Н_о – початкова мутність плазми.

Таблиця 3.6. Параметри гемостатичного потенціалу в плазмі крові донорів (n=10) та хворих на хронічну хворобу нирок (чоловіки - n=52, жінки - n=36, усі пацієнти - n=88),

Параметри	ЗП, о.о.*с	ЗГП, о.о.*с	ФП, о.о.*с	ЗП/ЗГП	ЗП/ФП	ЗГП/ФП
Донори	345±17	257,5±15	88,5±11	1,34±0,02	4.12±0,08	3,13±0,05
Чоловіки	278±132*	188±83	95,4±62,1	1,47±0,57	2,9±0,47	1,94±0,37
Жінки	342±143	238±95	104±54,1*	1,43±0,61	3,3±0,52	2,3±0,41
Усі пацієнти	303±139	208±91	98,9±58,9	1,46±0,57	3,1±0,45*	2,33±0,32*

* P≤0,05 відносно донорів.

Проте кінцева мутність згустку достовірно вища у жінок, що свідчить про більшу товщину фібрил у таких згустках [128]. Такі згустки ефективніше стимулюють активацію плазміногену t-PA. ЗП, ЗГП і ФП (табл. 3.6) у жінок також мають більші значення, що вказує на більшу величину згустку у плазмі жінок і дещо відмінну структуру фібринової сітки. Оскільки концентрації фібриногену у чоловіків і жінок не відрізняються, то ці відмінності можна пояснити більшим включенням в структуру фібрил у жінок додаткових

протеїнів, в першу чергу фібрoneктину, інгібіторів фібринолізу і компонентів фібринолітичної системи - плазміногену, t-PA, PAI-1 і α 2-антиплазміну [129 131]. В цьому процесі, можливо, задіяний FXIIIa, який, як відомо, ковалентно прошиває між собою молекули розчинного фібрину по γ -ланцюгах [132], а також ковалентно приєднує до α C-доменів інгібітори фібринолізу PAI-1 і α 2-антиплазмін.

Привертає увагу тенденція до зниження потенціалу зсідання (ЗП) поруч із підвищенням фібринолітичного потенціалу (ФП). Обчислення запропонованого відношення ЗП та ФП – дозволило виявити його статистично достовірне зниження у обстежуваній групі ($3,31 \pm 0,15$), порівняно з контрольним значенням ($4,12 \pm 0,08$).

3.3. Визначення концентрації молекулярних маркерів стану системи гемостазу - розчинного фібрину, D-димеру, протеїну С та фібриногену в плазмі крові хворих на інфаркт міокарда, інсульт, стеноз аорти, стенокардію, хронічну хворобу нирок та ЗТСС.

Визначення концентрації розчинного фібрину, D-димеру, протеїну С та фібриногену в плазмі крові донорів і хворих на вказані захворювання дозволило встановити (Табл. 3.7), що за інфаркту міокарду рівень фібриногену залишався в межах норми, а концентрації розчинного фібрину і D -димеру зростали відповідно на 57 і 72 %. У плазмі крові хворих на інсульт рівень розчинного фібрину на 42 % перевищує норму, в той же час рівень D-димеру на 274% перевищує норму, що вказує на високу активність фібринолітичної системи плазми крові *in vivo*. У плазмі крові хворих на ЗТСС рівень фібриногену не перевищує норму. Проте рівень розчинного фібрину незначно (на 27%) перевищує норму, а D димеру – на 85 %, що вказує на достатню активність фібринолітичної системи для підтримки балансу цих систем.

Таблиця 3.7. Рівень молекулярних маркерів стану системи гемостазу в плазмі крові донорів та пацієнтів, хворих на інфаркт міокарду (n=25), інсульт (n=10), ЗТТС (n=8), стеноз аорти (n=51), стенокардію (n=47), хронічну хворобу нирок (n=88),

Плазма крові	Фібриноген, мг/мл	Розчинний фібрин, мкг/мл	DD, нг/мл	РС, %
Донори	2,8 ±0,36	2,6±0,67	62 ±16	100
Хворі на інфаркт	3,0±0,83	4,0± 2.3	107±77*	81,4±19,1*
Хворі на інсульт	н/в	3.7± 0.7	171±157*	85,7±20,4
Хворі на ЗТТС	3,5±1.1	4,1± 2,8	179±135	н.в
Стеноз	4,26±1,46	13,0±31,5*	49,0±51,0	93,9±18,5
Стенокардія	4,4±1,37	7,0±13,8*	60,5±130,0	93,3±16,1
Хронічна хвороба нирок				
Чоловіки	4,13±0,15	3,5±1,1	61,6±32,1	80,5±2,0
Жінки	4,20±0,21	4,0±2,5	96,0±98,7	83,4±2,9
Усі пацієнти	4,15±0,17	3,7±1,8	75,3±68,6	81,7±1,7

* P≤0,05 відносно донорів).

У плазмі крові хворих на стеноз, стенокардію і хронічну хворобу нирок знайдено фібриногену підвищений рівень фібриногену і розчинного фібрину, що вказує на наявність запалення і високий рівень активації системи зсідання крові. Підвищена концентрація фібриногену свідчить про порушення кровопостачання мозку, закупорку коронарних артерій, а також про загрозу розвитку інфаркту міокарду, ішемічної хвороби серця, тромбоемболії тощо [133-135]. Концентрація фібриногену в плазмі крові значно зростає при перебігу реакцій запалення у відповідь на підвищення рівня інтерлейкіну-6, секретованого макрофагами У хворих на інфаркт міокарду, інсульт та хронічну хворобу нирок активується антикоагуляційна система протеїну С. Слід зауважити, що хронічна хвороба нирок та регулярний гемодіаліз прямо не пов'язані з порушенням рівноваги у системі гемостазу. Відповідно ми не спостерігали значного підвищення вмісту маркерів загрози розвитку внутрішньосудинного тромбоутворення: розчинного фібрину та D-димеру.

В плазмі крові хворих на хронічну хворобу нирок рівень розчинного фібрину (sf) перевищує рівень “cut-off” – 3 мкг/мл, у плазмі крові жінок і чоловіків, і у жінок sf достовірно перевищує рівень такого у чоловіків. Концентрація D-димеру у всіх хворих не перевищує рівень “cut-off” - 90 нг/мл, проте у жінок вона в 1,5 рази перевищує таку у чоловіків. Рівень Fg знаходиться дещо вище верхньої межі ($4,15 \pm 0,17$ мг/мл, порівняно з контрольним значенням $2,8 \pm 0,36$ мг/мл). Відомо, що фібриноген є протеїном гострої фази запалення, тому підвищення його концентрації при хронічній хворобі нирок є підтвердженням розвитку запалення за даної патології. Система протеїну С у хворих також знаходиться в активованому стані, причому у жінок рівень спожитого протеїну С достовірно менше, ніж у чоловіків (Табл.3.7). Таким чином, отримані дані вказують на підвищену активність систем зсідання і фібринолізу у жінок порівняно з такою у чоловіків. У чоловіків система протеїну С активована достовірно більше, ніж і жінок. В цілому система гемостазу у всіх пацієнтів з хронічною хворобою нирок VД стадії (гломерулонефрит) має підвищену активність, що узгоджується з наявністю запального процесу у пацієнтів з хронічною хворобою нирок.

Таким чином, аналіз параметрів турбідиметричних кривих та концентрацій молекулярних маркерів за хронічної хвороби нирок дозволив виявити порушення балансу між системами зсідання крові та фібринолізу. Підвищення концентрації фібриногену та зниження вмісту протеїну С підтверджує цей висновок. Результати наших досліджень вказують на необхідність більш детального вивчення стану системи гемостазу в окремих групах пацієнтів з хронічною хворобою нирок, враховуючи параметри загального гемостатичного потенціалу, та вміст основних маркерів для виявлення ознак можливого тромбогенезу чи геморагій. Такий аналіз буде наведено у наступних розділах.

3.4. Дослідження зв'язку між величинами параметрів гемостатичного потенціалу та концентраціями молекулярних маркерів системи гемостазу у плазмі крові пацієнтів при хронічній хворобі нирок.

При запальному процесі в плазмі крові хворого в першу чергу активується система зсідання крові завдяки появі в ній мікроезистул, що містять тканинний фактор – ініціатор запуску зовнішнього шляху зсідання крові [116]. Основним молекулярним маркером її активації і продуктом є розчинний фібрин [136]. Розчинний фібрин знаходиться в плазмі крові у вигляді коротких олігомерів, в яких молекули desA фібрину і його X-фрагментів ковалентно прошиті між собою фактором XIIIa по γ_{411} -ланцюгах [136]. Олігомери desA фібрину не здатні стимулювати активацію плазміногену t-PA [118]. Вважається, що D-фрагменти утворюються в капілярах, де швидкість крові на два-три порядки падає і олігомери фібрину асоціюють в мікрозгустки, на поверхні яких формується плазміноген-t-PA активаторний комплекс з утворенням плазміну, що руйнує мікрозгустки з вивільненням D-димеру [138]. Тому D-димер є маркером активації як системи зсідання, так і системи фібринолізу в гуморальній складовій системи гемостазу крові. Слід відмітити, що відношення концентрацій розчинного фібрину та D-димеру розглядається як важливий показник загрози тромбоутворення при хірургічних втручаннях [10].

Оскільки рівень розчинного фібрину у пацієнтів коливався в значних межах, ми додатково розподілили пацієнтів у три групи за його величиною, яка відповідала рівню активації системи зсідання хворого: а) пацієнтів з концентрацією розчинного фібрину рівною або меншою за норму $sf \leq 3$ мкг/мл; б) з концентрацією, близькою до норми - $3 < sf < 4$ мкг/мл, і з підвищеним рівнем концентрації – $sf > 4$ мкг/мл, (Табл. 3.8, Рис. 3.8, 3.9, 3.10).

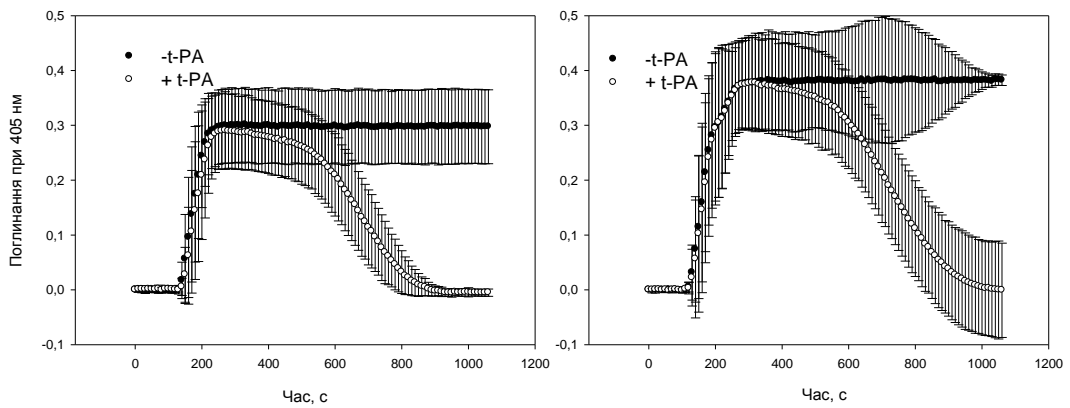


Рис. 5. Турбідиметричні криві з'єднання плазми крові чоловіків (ліворуч) та жінок (праворуч), активованої АЧТЧ-реагентом, з рівнем $sf < 3$ $\mu\text{г}/\text{мл}$ за відсутності та за присутності t-PA (15 чоловіків та 13 жінок).

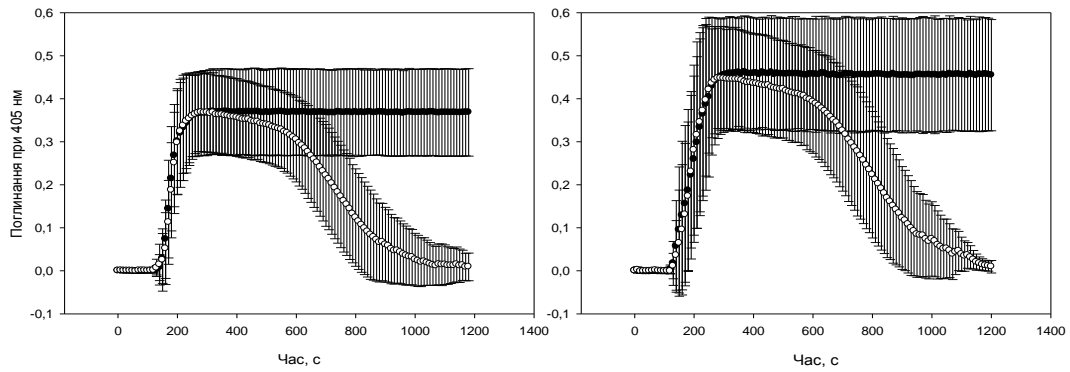


Рис. 6. Турбідиметричні криві з'єднання плазми крові чоловіків (ліворуч) та жінок (праворуч) з рівнем $3 < sf < 4$ $\mu\text{г}/\text{мл}$, активованої АЧТЧ-реагентом, за відсутності та за присутності t-PA (25 чоловіків та 13 жінок).

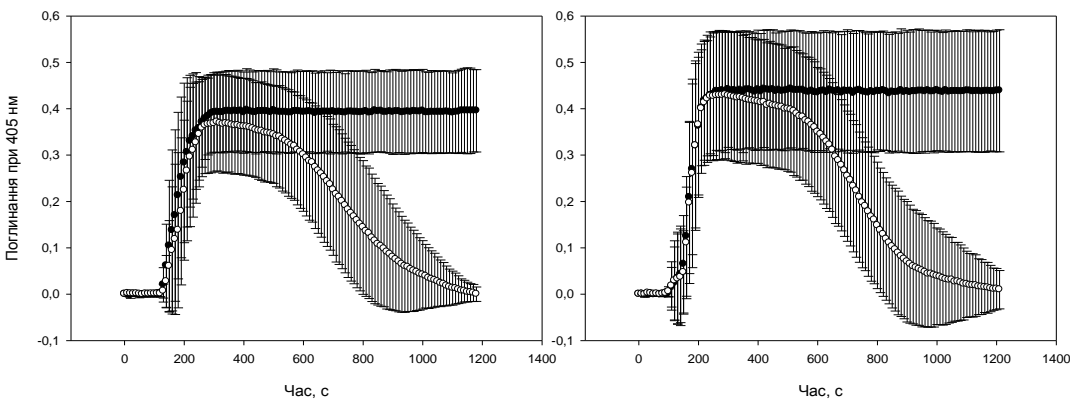


Рис. 7. Турбідиметричні криві з'єднання плазми крові чоловіків (ліворуч) та жінок (праворуч), активованої АЧТЧ-реагентом, з рівнем $sf > 4$ $\mu\text{г}/\text{мл}$ за відсутності та за присутності t-PA (12 чоловіків та 10 жінок).

Таблиця 3.8. Параметри формування та гідролізу згустку в плазмі крові донорів (n=10), пацієнтів з хронічною хворобою нирок, які проходять процедуру гемодіалізу. Кожна група пацієнтів (чоловіки - n=52, жінки - n=36, усі пацієнти - n=88) розділена на три підгрупи в залежності від концентрації розчинного фібрину в плазмі крові: 15 чоловіків та 13 жінок з концентрацією $sf < 3$ мкг/мл; 25 чоловіків та 13 жінок з концентрацією $3 < sf < 4$ мкг/мл; 12 чоловіків та 10 жінок з концентрацією $sf > 4$ мкг/мл ($X \pm m$).

Вміст sf, мкг/мл	За відсутності t-PA		За присутності t-PA			
	τ , с	H, о.о.	τ , с	H, о.о.	L, с	H ₀ , о.о.
Донори	140±23	0,381±0,052	145±23	0,375±0,043	748±37	0,332±0,153
чоловіки						
sf<3	150±25	0,339±0,088	155±27	0,333±0,09	699±68	0,374±0,144
3<sf<4	154±20	0,384±0,104	158±19	0,383±0,1	746±97	0,370±0,146
sf>4	157±37	0,397±0,090	162±37	0,367±0,11	758±138	0,362±0,099
жінки						
sf<3	153±21	0,302±0,070	160±25	0,291±0,070	763±60	0,304±0,169
3<sf<4	160±42	0,434±0,140	159±37	0,421±0,130	786±116	0,361±0,184
sf>4	148±23	0,440±0,035*	153±24	0,435±0,045*	776±144	0,339±0,158
	n.s.	P < 0,001	n.s.	P < 0,001	n.s.	n.s.

*P≤0,05 відносно донорів. τ – лаг-період процесу зсідання крові (с – секунди); H – максимальне поглинання фібринового згустку); L – час напівлізису згустку; H₀ – початкова мутність плазми; sf – розчинний фібрин.

Для системи визначення параметрів гемостатичного потенціалу плазми крові *in vitro* такий розподіл пацієнтів показав наступне: а) лаг-періоди формування згустку з ростом ступеня активації системи зсідання не змінилися; б) величина згустку (маса) за мутністю [139] у чоловіків не зростає у відсутності і присутності t-PA і у жінок достовірно зростає відповідно у 1,46 та 1,49 разів, що можна пояснити більшою активацією FXIII у жінок, ковалентним включенням інших протеїнів у згусток і підвищеним рівнем sf; в) час життя згустку у присутності t-PA *in vitro* у чоловіків не змінюється, в той час як у жінок час життя згустку достовірно

збільшується в 1,19 разів, що вказує на більшу концентрацію інгібіторів фібринолізу у згустку плазми крові жінок (можливо за рахунок α 2-антиплазміну та PAI-1); г) початкова мутність плазми у чоловіків і жінок не змінюється; д) величини ЗП та ФП у чоловіків не змінюються, а ЗГП зростає відповідно у 1,57 рази, у жінок ЗП та ЗГП зростають відповідно у 1,76, 1,82 рази, що також вказує на більшу масу згустку у плазмі жінок, порівняно з чоловіками. ФП в обох групах не змінюється.

Таблиця 3.9. Параметри гемостатичного потенціалу в плазмі крові донорів (n=10) та хворих на хронічну хворобу нирок. Кожна група пацієнтів (чоловіки - n=52, жінки - n=36, усі пацієнти - n=88) розділена на три підгрупи в залежності від концентрації розчинного фібрину в плазмі крові: 15 чоловіків та 13 жінок з концентрацією $sf < 3$ мкг/мл; 25 чоловіків та 13 жінок з концентрацією $3 < sf < 4$ мкг/мл; 12 чоловіків та 10 жінок з концентрацією $sf > 4$ мкг/мл ($X \pm m$).

	ЗП, о.о.*с	ЗГП, о.о.*с	ФП, о.о.*с	ЗП/ЗГП	ЗП/ФП	ЗГП/ФП
Донори	345±17	257,5±15	88,5±11	1,34±0,02	4.12±0,08	3,13±0,05
	чоловіки					
sf<3	243±45*	169±60*	79±39	1,44±0,14	3,1±0,25*	2,14±0,25
3<sf<4	305±81	213±78	97±62	1,43±0,17	3,14±0,34*	2,2±0,21*
sf>4	323±70	265±68	122±74	1,22±0,18	2,65±0,27*	2,17±0,2*
	n.s.	P<0,01	n.s.			
	жінки					
sf<3	203±21	138±39	74±45	1,47±0,15	2,7±0,36	1,86±0,27
3<sf<4	367±72	251±76	116±72	1,46±0,22	3,15±0,5	2,2±0,35
sf>4	358±61	241±56	107±46	1,42±0,17	3,35±0,3	2,34±0,21
	P<0,01	P<0,01	n.s.			

*P≤0,05 відносно донорів. ЗП, ЗГП, ФП – потенціал зсідання плазми крові, загальний гемостатичний, фібринолітичний потенціал плазми крові.

Таблиця 3.10. Рівень молекулярних маркерів стану системи гемостазу в плазмі крові донорів і хворих на хронічну хворобу нирок (n=88), (чоловіки - n=52, жінки - n=36, усі пацієнти - n=88) 15 чоловіків та 13 жінок з концентрацією $sf < 3$ мкг/мл; 25 чоловіків та 13 жінок з концентрацією $3 < sf < 4$ мкг/мл; 12 чоловіків та 10 жінок з концентрацією $sf > 4$ мкг/мл ($X \pm m$).

	Розчинний фібрин, мкг/мл	D-димер, нг/мл	Фібриноген, мг/мл	Протеїн С, %
Донори	2,6±0,67	62 ±16	2,8 ±0,36	100
	чоловіки			
sf < 3	2,5±0,32	45±30	3,95±1,18	82,7±15
3 < sf < 4	3,5±0,28	69±27	4,50±1,0	83,2±15
sf > 4	4,9±1,2*	77±37*	3,86±0,83	77,0±12*
	жінки			
sf < 3	2,5±0,36	38±24	3,9±1,3	78,4±15
3 < sf < 4	3,6±0,3	62±39	4,4±1,4	80,8±16
sf > 4	6,6±3,4*	190±137*	4,0±1,4	81,6±21

* P<0,05 відносно донорів.

Для молекулярних маркерів системи гемостазу плазми крові *in vivo* було знайдено, що: а) рівень розчинного фібрину і D-димеру у чоловіків зростає у 1,96 та 1,71 разів, а у жінок відповідно у 2,64 і 5 разів у групах з рівнем $sf > 4$, що демонструє більшу активність згортаючої і фібринолітичної системи у жінок порівняно з такими у чоловіків; б) відношення DD/sf у чоловіків дещо зменшується відповідно від 18 при $sf < 3$ до 15,7 при $sf > 4$, в той час як у жінок зростає від 15,2 до 28,8, що підтверджує наше припущення про більшу ефективність і збалансованість систем зсідання і фібринолізу у жінок; в) рівень фібриногену у чоловіків у групах з $sf < 3$ та $sf > 4$ знаходиться у межах норми, при $3 < sf < 4$ дещо перевищує її, а при $sf > 4$ знову дещо знижується; враховуючи те, що фібриноген є протеїном гострої фази, можна припустити, що у чоловіків при $sf < 3$ запалення слабо виражене, при $3 < sf < 4$ - має місце його початкова стадія, а при $sf > 4$ – більш активна стадія, оскільки спостерігається ефект “споживання” білків системи

гемостазу на прикладі фібриногену; г) показники системи протеїну С у чоловіків і у жінок змінюються випадково, але у обох групах можна відмітити підвищену активність системи протеїну С. Наведені дані у Табл. 3.10 дозволяють припустити, що при $sf > 4$ мкг/мл у жінок ріст концентрації фібрину контролює переважно фібринолітична система (рівень D-димеру ~ 190 мкг/мл, у чоловіків – 77 мкг/мл), а у чоловіків – система протеїну С, на що вказує вищий рівень споживання протеїну С у чоловіків, у порівнянні з жінками. Можливо, що у жінок підвищена активність плазміну в мікроциркуляції, завдяки вищій концентрації розчинного фібрину, який утворює мікрозгустки (стимулятор активації плазміногену), що може призводити до зменшення рівня тромбомодуліну на поверхні судин і меншій активації протеїну С у порівнянні з чоловіками.

Таким чином, підвищення концентрації розчинного фібрину в плазмі крові хворих, що супроводжує активацію системи зсідання пов'язаних з нею системи фібринолізу і протеїну С, супроводжується також змінами величин параметрів у системі визначення гемостатичного потенціалу і в системі молекулярних маркерів гемостазу. В цілому ці зміни направлені на підвищення здатності системи гемостазу хворих формувати у плазмі крові більший за розміром і стабільністю фібриновий згусток. З іншого боку більш тонка диференціація хворих за ступенем активації системи зсідання плазми крові може дозволити отримати більше інформації для оцінки стану системи гемостазу і прогнозування напрямку його зміни у хворих.

Отримані дані також свідчать, що параметри стану системи гемостазу у хворих на хронічну хворобу нирок, знайдені шляхом визначення величини загального гемостатичного потенціалу в плазмі крові *in vitro* і концентрацій молекулярних маркерів, характерних для стану *in vivo*, у жінок за величиною більші, ніж у чоловіків, і вказують на більшу активність системи гемостазу у жінок. На основі результатів, представлених в Табл. 3.8 і 3.10 було зроблено припущення про те, що у чоловіків рівень розчинного фібрину регулюється

за участі переважно системи протеїну С, а у жінок за участі систем фібринолізу і протеїну С.

3.5. Аналіз кореляції між величинами параметрів системи гемостазу і концентраціями маркерів стану системи гемостазу на хронічну хворобу нирок.

Розподіл пацієнтів по групам в залежності від ступеня активації системи зсідання плазми крові показав, що з підвищенням концентрації розчинного фібрину в плазмі крові хворого зростають величини інших параметрів ЗГП і концентрацій молекулярних маркерів системи гемостазу. В зв'язку з цим постало питання про наявність і силу взаємозв'язку окремих параметрів цих систем між собою усередині кожної системи, між системами і в залежності від стажу гемодіалізу. З цією метою було проведено парний кореляційний аналіз за Пірсоном зв'язку між параметрами обох систем.

Було встановлено, що стаж гемодіалізу не пов'язаний з величинами параметрів жодної із систем, оскільки значення отриманих коефіцієнтів кореляції є недостовірні, $p > 0,05$. Не виявили кореляції у парах ЗГП - sf та ЗГП – D-димер. Сильний, дуже сильний і інколи середній взаємозв'язок спостерігали для пар усередині групи параметрів, пов'язаних з визначенням ЗГП, а саме ЗГП - Н, ЗГП - L, ЗГП – Т, ЗГП – ЗП, ЗГП – ФП, ЗП – ФП, ФП – Н та ФП – L (Табл. 3.11), як і при визначенні ЗГП для хворих на інфаркт міокарду, інсульт і ЗТСС [124]. При цьому коефіцієнти у групах з різною концентрацією розчинного фібрину демонстрували той же порядок сили зв'язку, що і в групі “усі пацієнти”.

Привертають увагу результати, отримані при аналізі зв'язку між параметрами системи ЗГП та системою молекулярних маркерів. Величини коефіцієнтів кореляції для всіх пар групи “усі пацієнти” (88 пацієнтів, із них 52 чоловіки і 36 жінок) показали наявність середнього, слабкого і дуже слабкого зв'язку (Табл 3.11).

Таблиця 3.11. Коефіцієнти кореляції величин параметрів гемостатичного потенціалу, розчинного фібрину, D димеру, фібриногену та протеїну С в плазмі крові хворих на хронічну хворобу нирок VД стадії (гломерулонефрит), які проходять процедуру гемодіалізу (чоловіки - n=52, жінки - n=36, усі пацієнти - n=88). Кожна група пацієнтів розділена на три підгрупи в залежності від концентрації розчинного фібрину в плазмі крові: 15 чоловіків та 13 жінок з концентрацією $sf < 3$; 25 чоловіків та 13 жінок з концентрацією $3 < sf < 4$; 12 чоловіків та 10 жінок з концентрацією $sf > 4$.

Показники		Усі пацієнти	$sf < 3$	$3 < sf < 4$	$sf > 4$
ЗГП – фібриноген	Усі пацієнти	0,45	0,3	0,37	0,72
	Чоловіки	0,32	n.s.	n.s.	0,91*
	Жінки	0,63	0,5	0,54	0,64
ЗГП – протеїн С	Жінки	-0,51	n.s.	n.s.	-0,81*
ЗП – фібриноген	Чоловіки	n.s.	n.s.	0,49	0,78*
	Жінки	0,65	0,54	0,65	0,32
ЗП – протеїн С	Жінки	-0,25	-0,14	-0,70	-0,85*
ФП – фібриноген	Жінки	0,61	0,52	0,60	0,68
	Жінки	-0,51	-0,3	n.s.	-0,93*
фібриноген – протеїн С	Жінки	-0,42	n.s.	n.s.	-0,73*
розчинний фібрин – D-димер	Чоловіки	0,51	n.s.	n.s.	0,62
ЗГП - Н	Усі пацієнти	0,87*	0,95*	0,93*	0,89*
ЗГП - ФП	Усі пацієнти	0,68	0,58	0,74	0,65
ЗГП - L	Усі пацієнти	0,74	0,68	0,78	0,72
ЗП - ФП	Усі пацієнти	0,88	0,64	0,87*	0,83*

* $P > 0.05$, n.s. – недостовірною величиною,

Однак для тих параметрів пар у підгрупах чоловіків і жінок, де було виявлено кореляційний зв'язок, значення коефіцієнтів кореляції суттєво зростали зі зростанням концентрацій розчинного фібрину від слабкого ($< 0,5$) і середнього ($0,5-0,7$) до сильного ($> 0,7$) і дуже сильного ($> 0,9$) за винятком пар параметрів ЗГП – фібриноген, ФП – фібриноген, Н – фібриноген для жінок. Другою важливою особливістю у групах чоловіків виявилася

відсутність кореляції у парах параметрів ЗГП – протеїну С, ЗП - протеїну С, ФП - фібриноген, ФП - протеїну С і фібриноген – протеїну С. У цих парах у підгрупах жінок спостерігали середню, сильну і дуже сильну кореляцію. Важливим фактом була наявність сильної негативної кореляції у жінок між концентрацією протеїну С і такими параметрами, як ЗГП, ЗП, ФП та фібриноген (Рис. 3.11).

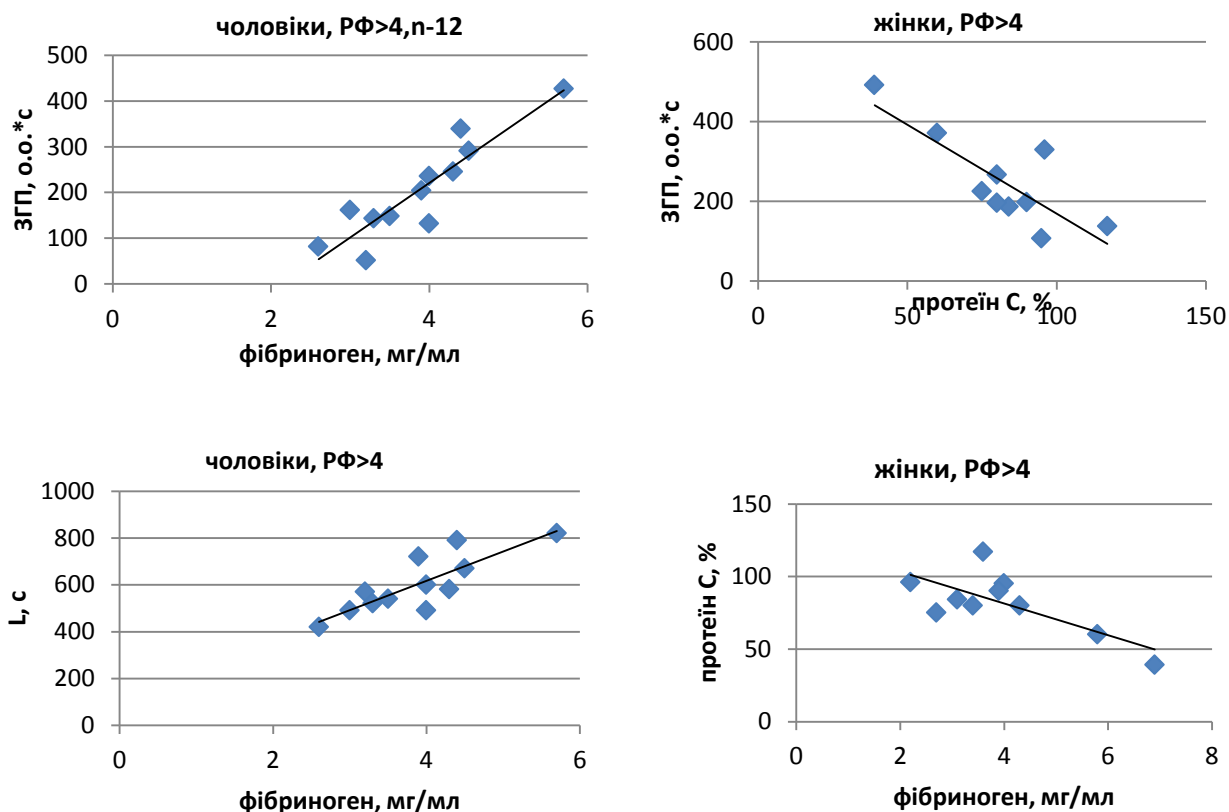


Рис. 3.11. Графіки кореляційної залежності між параметрами гемостатичного потенціалу і концентраціями молекулярних маркерів системи гемостазу плазми крові хворих на хронічну хворобу нирок: для чоловіків ЗГП – фібриноген (А) та L- фібриноген (В) і для жінок ЗГП – протеїн С (С) та протеїн С – фібриноген (D). L– час напівлізису згустку.

У чоловіків кореляцію спостерігали для пар параметрів Sf - D-димер, Н - фібриноген, ЗП - фібриноген, ЗГП - фібриноген відповідно середнього, сильного і дуже сильного ступеня зв'язку. Звертає на себе увагу те, що у цих парах параметрів не спостерігали кореляцію у групах чоловіків при перших

двох концентраціях розчинного фібрину, а саме $sf < 3$ та $3 < sf < 4$, коли запальний процес у хворих, ймовірно, знаходиться у стадії ремісії

На відміну від параметрів гемостатичного потенціалу, в системі параметрів *in vivo* знайдено сильний негативний кореляційний зв'язок тільки між концентраціями фібриноген і протеїну С, а між основними маркерами системи гемостазу Sf і D-димеру спостерігався зв'язок середньої сили. Важливо відмітити, що концентрація D-димеру не корелювала з іншими параметрами при всіх концентраціях sf. Очевидно, що рівень D-димеру регулюється рівнем мікрозгустків, які є стимулятором утворення плазміну, в системі мікроциркуляції і фактори, що впливають на їх формування, не пов'язані з досліджуваними системами (Рис. 3.12).

Таким чином, ми встановили, що кореляційний зв'язок між параметрами обох систем зі зростанням концентрації розчинного фібрину в плазмі крові також зростає. В такі пари одним із учасників у чоловіків входить фібриноген, а у жінок протеїн С. В обох випадках ступінь зв'язку збільшується до сильного або дуже сильного. При цьому у чоловіків позитивний кореляційний зв'язок зростає раптово при концентрації розчинного фібрину $sf > 4$ мкг/мл. За такої концентрації розчинного фібрину концентрація фібриногену починає знижуватися (Табл. 3.10). Проте збалансований характер взаємодії системи зсідання і фібринолізу (коефіцієнт кореляції пари ЗГП - фібриноген =0,91), ефективне видалення D-димеру із кровотоку та активність системи протеїну С підтримують рівновагу між системами зсідання, фібринолізу і протеїну С.

Подібним чином зростає негативний кореляційний зв'язок пар за участю протеїну С і параметрів гемостатичного потенціалу і фібриногену у жінок. Очевидно, що і система протеїну С і система фібринолізу сильно активуються при рівні активації системи зсідання, що відповідає зростанню концентрації $sf > 4$ мкг/мл. Проте у жінок спостерігається середній за ступенем зв'язок між ЗГП і фібриноген, що вказує на слабку регуляцію протеїну Са активації фібриногену у фібрин під дією тромбіну. Як відомо,

розчинний фібрин є транспортером тромбіну в кровотоці, що дозволяє “slow” формі тромбіну дисоціювати в мікроциркуляції і зв'язуватися з тромбомодуліном, викликаючи активацію протеїну С, який в свою чергу зв'язаний з рецептором протеїну С [140-142]. Наявність в плазмі крові жінок інгібітору протеїну С, підвищеного рівня іонів натрію перешкоджає активації протеїну С тромбіном, що призводить до ще більшого зростання концентрації sf. При таких концентраціях розчинного фібрину зростає ймовірність утворення мікрозгустків, які стимулюють активацію системи фібринолізу і своє розчинення під дією плазміну з утворенням D-димеру фрагментів, що ми спостерігаємо в Табл. 3.11. Загальна схема взаємодії системи зсідання, фібринолізу і протеїну С в системі гемостазу показана на схемі (Рис.3.12).

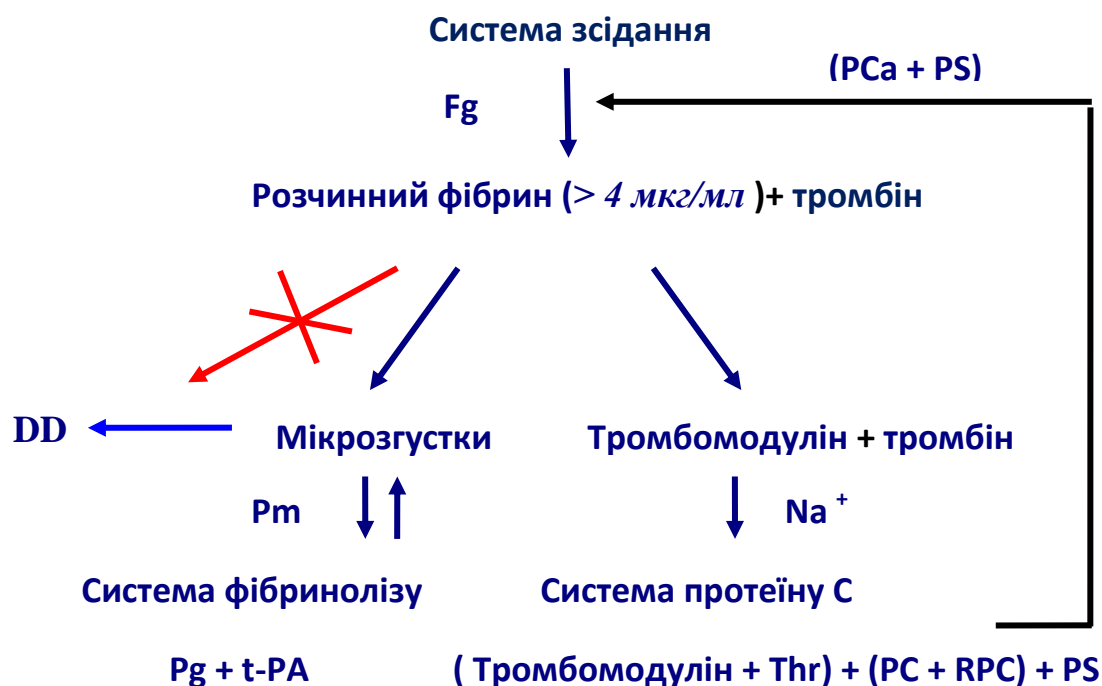


Рис. 3.12 Схема утворення і взаємозв'язків молекулярних маркерів складових гуморальної системи гемостазу плазми крові хворих на хронічну хворобу нирок Vd стадії, при концентрації розчинного фібрину > 4 мкг/мл. P_g –плазміноген, P_m – плазмін, Thr – тромбін, PS – протеїн S, RPC – ендотеліальний рецептор протеїну С; PC_a – протеїн С активований.

Таким чином, парний кореляційний аналіз за методом Пірсона між величинами параметрів гемостатичного потенціалу та концентраціями молекулярних маркерів у хворих на хронічну хворобу нирок проведений, у групах пацієнтів зі зростаючим рівнем розчинного фібрину ($sf \leq 3$, $3 \leq sf \leq 4$ і $sf \geq 4$ мкг/мл), виявив зростання сили зв'язку до сильного та дуже сильного між вмістом протеїну С та ФП (-0,93), ЗП (-0,81) у жінок, часом напівлізисугустку та вмістом фібриногену (0,73) у чоловіків (Рис. 3.11) Проте збалансований характер взаємодії системи зсідання і фібринолізу (коефіцієнт кореляції пари ЗПП - фібриноген=0,91), ефективне видалення Д-димеру із кровотоку, активність системи протеїну С підтримують рівновагу між системами зсідання, фібринолізу і протеїну С у плазмі крові хворих на хронічну хворобу нирок.

Висновки до розділу 3.

1. Аналіз турбідиметричних кривих утворення і руйнування фібринового згустку в плазмі крові при різних патологіях показав: а). виявлено подовження лаг-періоду зсідання плазми у хворих на гострий інфаркт міокарду, пацієнтів з інсультом та захворюваннями тазостегнового суглобу у 2,3, 7,2 і 1,5 рази відповідно, що вказує на гальмування швидкості утворення тромбіну на внутрішньому шляху зсідання або з накопиченням інгібіторів самоскладання протофібрил фібрину за даних патологій. Подовження лаг-періоду за інших досліджених патологій не спостерігали.

2. Для загальної характеристики системи гемостазу хворих за досліджуваних патологій було запропоновано новий параметр: відношення потенціалу зсідання та фібринолітичного потенціалу (ЗП/ФП). Використання цього параметру дозволило встановити, що за інсульту, попри виявлені нами патологічні зміни, система гемостазу ефективно підтримує баланс між зсіданням крові та фібринолізом (ЗП/ФП = $4,0 \pm 0,9$, значення в плазмі крові донорів: $4,1 \pm 0,1$). Водночас, при гострому інфаркті міокарду та хронічній

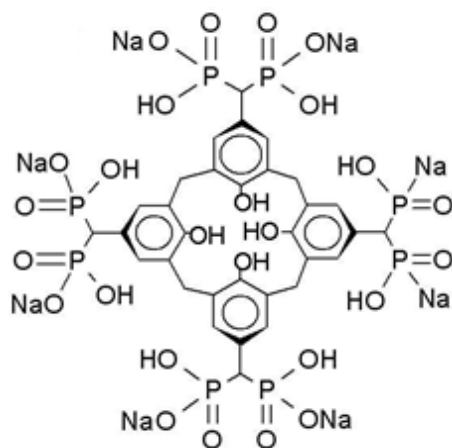
хворобі нирок ця рівновага суттєво зміщується в бік фібринолізу – показник становить $2,5 \pm 1,3$ та $3,1 \pm 0,5$ відповідно.

3. З метою пошуку зв'язку між параметрами гемостатичного потенціалу та концентраціями молекулярних маркерів у хворих на хронічну хворобу нирок проводили парний кореляційний аналіз за методом Пірсона у групі пацієнтів з накопиченням розчинного фібрину (понад 4 мкг/мл), яке свідчить про внутрішню судинну генерацію тромбіну. Виявлено зростання сили зв'язку до сильного та дуже сильного між вмістом протеїну С та фібринолітичним потенціалом (-0,93), потенціалом зсідання (-0,81), що вказує на існування чітких кореляційних зв'язків між системами зсідання крові, фібринолізу і антикоагулянтною системою протеїну С.

РОЗДІЛ 4.
ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ЕКЗОГЕННИХ ФАКТОРОІВ
(ОРГАНІЧНИХ ТА НЕОРГАНІЧНИХ РЕЧОВИН) НА ПРОЦЕС
ФОРМУВАННЯ І ГІДРОЛІЗУ ФІБРИНОВОГО ЗГУСТКУ В ПЛАЗМІ
КРОВІ.

4.1. Дія С-145 на загальний гемостатичний потенціал плазми крові *in vitro*.

Калікс[4]арен-метиленбісфосфонові кислоти – синтетичні макроциклічні сполуки, які отримують циклоконденсацією пара-заміщених фенолів та формальдегіду. Ароматичні кільця калікс[4]аренів формують ліпофільну чашу, завдяки якій вони можуть взаємодіяти з макромолекулами водневими зв'язками, гідрофобними чи електростатичними взаємодіями. Модифіковані калікс[4]арени виявляють високу специфічність і здатні впізнавати комплементарні високомолекулярні сполуки.



C-145

Рис. 4.1. Структурна формула калікс[4]арену С-145.

Дослідження дії калікс[4]арен-метиленбісфосфонових кислот на полімеризацію фібрину дозволило визначити ряд сполук калікс[4]аренового ряду, які специфічно інгібували формування тривимірної сітки полімерного фібрину – каркасу тромбу. Зокрема, було показано, що калікс[4]арен С-192 та його натрієва сіль С-145 специфічно інгібують перший етап полімеризації –

формування протофібрил. Концентрація IC_{50} для інгібування полімеризації в системі фібриноген + тромбін складає $0,52 \cdot 10^{-6}$ М, а для фібрину desAB становить $1,26 \cdot 10^{-6}$ М. IC_{50} для інгібування ПЧ та АЧТЧ в плазмі крові становить відповідно $7,1 \cdot 10^{-5}$ і $1 \cdot 10^{-5}$ М [143-145]. Подальші дослідження *in vitro* не виявили впливу цих калікс[4]аренів на клітини крові та проензими системи гемостазу людини.

Виявлені антикоагуляційні властивості калікс[4]арену С-192 та його натрієвої солі С-145 дозволили розглядати їх як перспективні сполуки для розробки нового класу антитромботичних засобів, здатних специфічно інгібувати утворення тромбів завдяки пригніченню полімеризації фібрину. Клінічні потреби в таких препаратах є досить високими, бо наявні ліки або мають недостатній антитромботичний потенціал, або не придатні для застосування протягом тривалого часу.

Оскільки метод ЗГП дозволяє оцінити взаємодію між прокоагулянтною та фібринолітичною ланками гемостазу, його було обрано для оцінки ефектів С-145 на формування та гідроліз фібрину в плазмі крові *in vitro*.

Калікс[4]арен С-145 вносили до плазми крові у діапазоні концентрацій 1-100 μ М, зсідання ініціювали АЧТЧ-реагентом. Як показано на рис. 4.2. зростання концентрації С-145 подовжує lag-період і зменшує кінцеву оптичну густину згустку. Це підтверджує раніше показані ефекти С-145 *in vitro*.

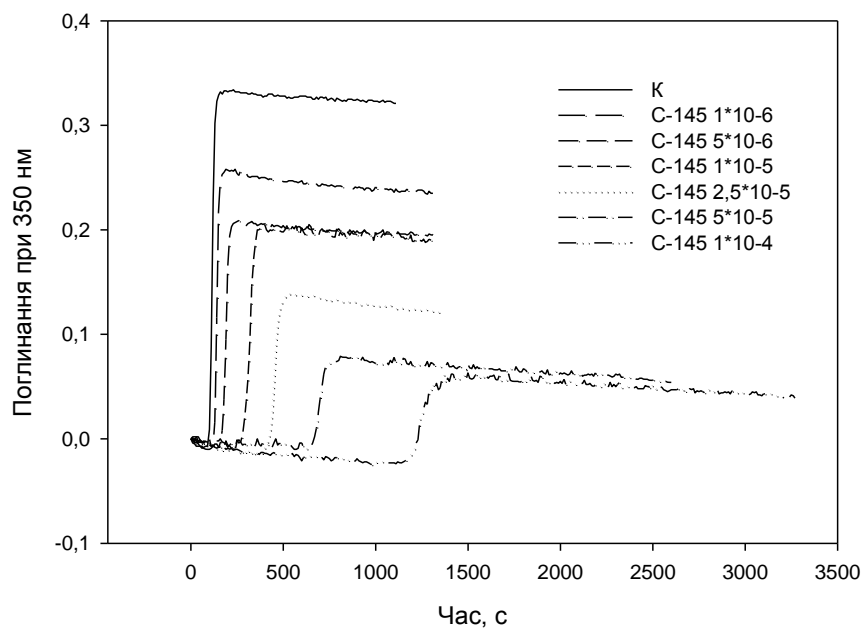


Рис. 4.2. Турбідиметричні криві впливу зростаючих концентрацій калікс[4]арену С-145 (від 1 до 100 μM) на зсідання плазми крові людини, ініційоване АЧТЧ-реагентом. Криві типового експерименту.

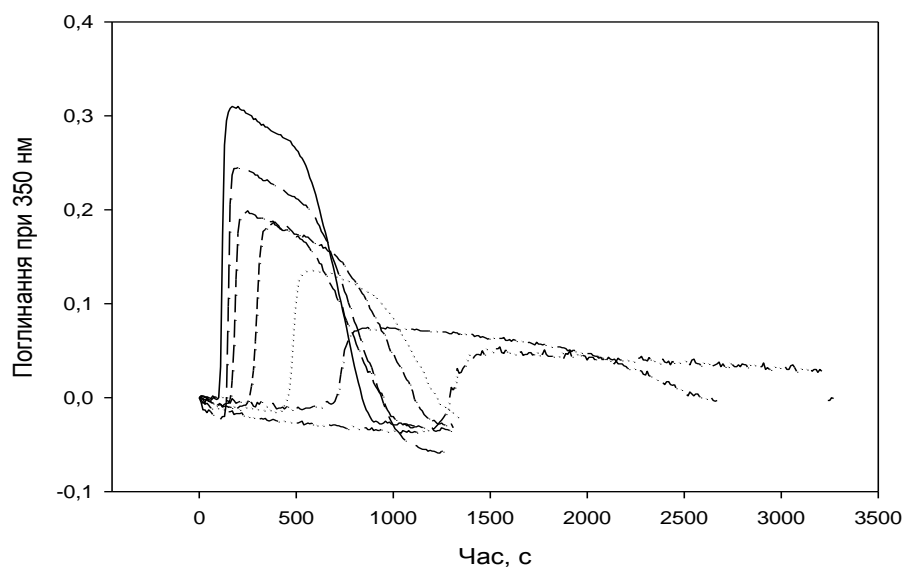


Рис. 4.3. Турбідиметричні криві впливу зростаючих концентрацій калікс[4]арену С-145 (1-100 μM) на зсідання плазми крові, ініційоване АЧТЧ-реагентом за присутності t-РА. Криві типового експерименту.

Для оцінки ефекту С-145 на фібринолітичний потенціал плазми крові до реакційної суміші вносили додатково tPA в концентрації 75 IU/мл (рис. 4.3). Було показано, що внесення С-145 (50 μ M і більше) значно подовжує час напівлізису згустку. Однак С-145 не суттєво впливав на цей параметр у концентраціях від 1 до 25 μ M. Таким чином, час напівлізису згустку значно подовжувався за присутності С-146 понад 50 μ M (Табл.4.1).

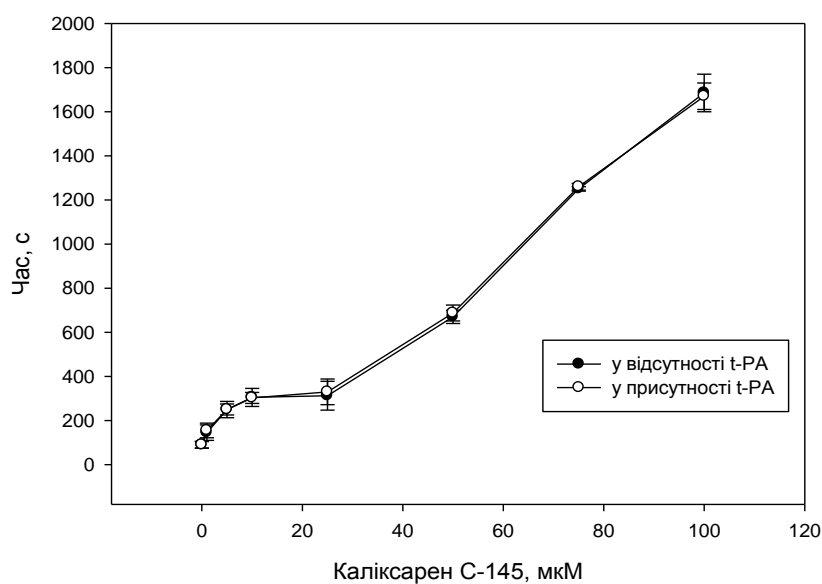


Рис. 4.4. Вплив зростаючих концентрацій калікс[4]арену С-145 від 1 до 100 μ M на швидкість утворення і латеральної асоціації протофібрил у плазмі крові, що активується АЧТЧ-реагентом *P < 0.05 порівняно з контролем, n = 3.

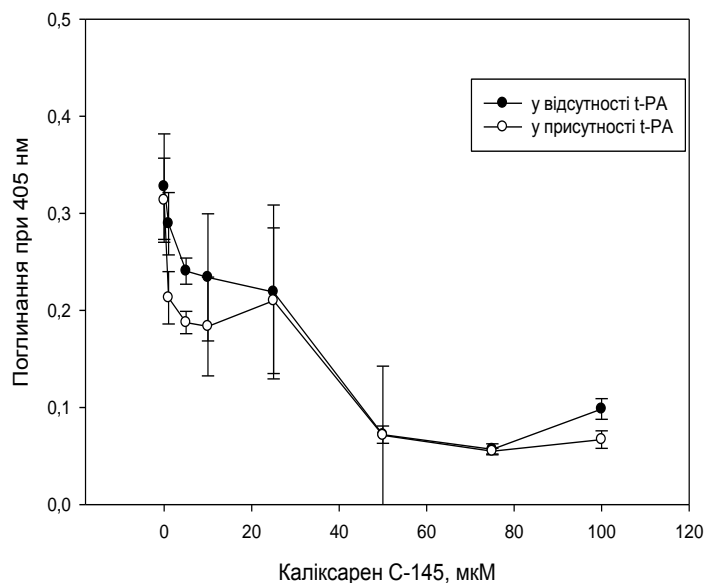


Рис. 4.5. Вплив зростаючих концентрацій калікс[4]арену С-145 (1-100 μM) на максимальну мутність згустку плазми крові, що активується АЧТЧ-регентом за присутності та за відсутності t-PA. * $P < 0.05$ порівняно з контролем, $n = 3$.

Показано, що ЗГП зменшувався за присутності 10 μM С-145 в 1.5 разів, проте ми не спостерігали збільшення інгібіторної дії С-145 зі збільшенням його концентрації (рис. 4. 5). Це вказує на те, що попри велику антикоагулянтну дію С-145, коагуляційна та фібринолітична ланки гемостазу в межах досліджених концентрацій зберігають динамічну рівновагу. Було проведено детальний аналіз величин параметрів ЗГП у плазмі крові у присутності С-145. Результати наведено у Табл. 4.1 [142-144].

Таблиця 4.1. Вплив зростаючих концентрацій каліксарену С-145 на параметри системи гемостазу плазми крові донорів за відсутності і за присутності t-РА.

А

Концентрація С-145, мМ	За відсутності t-РА		За присутності t-РА		
	τ, с	Н, о.о.	τ, с	Н, о.о.	L, с
К	90±15	0,328±0,054	90±15	0,314±0,043	725±95
0,001	145±35	0,289±0,032	155±33	0,213±0,021	815±85
0.005	250±37	0,241±0,013	250±25	0,188±0,011	815±136
0.01	305±41	0,234±0,013	302±25	0,184±0,051	1030±216
0.025	312±65	0,219±0,013	330±58	0,210±0,075	1060±242
0.05	670±30	0,072±0,014	687±36	0,071±0,071	2163±295
0.075	1250±10	0,057±0,011	1260±15	0,055±0,003	3805±460
0.1	1685±85	0,099±0,012	1670±60	0,067±0,009	н.в.

В

Концентрація С-145, мМ	ЗП	ЗГП	ФП
К	278,00±17,9	200,0±21,34	78±12,00
0.001	186,0±37,8	112,0±16,7	73,0±17,20
0.005	142,0±13,4	99,0±12,22	43,00±9,10
0.01	180,0±65	126,0±34,22	54,0±5,90*
0.025	188,0±23,7	143,0±21,12	44,0±4,60
0.05	147,0±35,5	114±25,56	33,0±5,10*
0.075	149,0±16,9	125±18,8	24,0±2,80*
0.1	143,0±23,1	123 н.в.	19,0± н.в.

Аналіз даних, представлених на Рис. 4.5 і в Табл. 4.1 дозволяє зробити такі висновки: а) С-145 гальмує швидкість утворення протофібрил, зменшує товщину фібрил за присутності і за відсутності t-РА. Характер залежності інгібування реакції самоскладання протофібрил (часу зсідання плазми) від концентрації С-145 вказує на наявність двох етапів процесу. Перший має $IC_{50} = 3,1 \pm 0,7$ мкМ. IC_{50} другого етапу потребує додаткового дослідження,

оскільки при концентрації $> 0,1$ мМ С-145 починає агрегувати; б) С-145 майже не впливає на швидкість латеральної асоціації протофібрил в обох системах, рис.1, 2; в) С-145 зменшує величину ЗП, ЗГП і ФП плазми крові відповідно в 1,9, 1,6 і 4,1 рази (Табл. 4.1), проте повністю не інгібує утворення полімерного фібрину в плазмі крові (мутності середовища реакції).

Таким чином, показано, каліксарен С-145 істотно пригнічує швидкість утворення і швидкість руйнування фібринового згустку в плазмі крові. Проте С-145 не інгібує повністю підвищення мутності в реакційному середовищі - плазмі крові. Мутність в плазмі підвищується, ймовірно, за рахунок формування мікрозгустків за участю полімерного фібрину і інших протеїнів плазми крові, які не здатні руйнуватися фібринолітичною системою, що може супроводжуватися зміною реологічних властивостей плазми крові.

4.2. Вплив гепаринів на процес зсідання крові і фібринолізу.

Гепарин є природним антикоагулянтом, що синтезується в гладких (тучних) клітинах судинної системи організму. Хімічно він являє собою полісахарид глікозаміноглікан, який складається з ділянок, утворених шістьма мономерами сульфатованих залишків N-ацетил D-глюкозаміна і D-індуранонової кислоти, які повторюються. Гепарин виділяють із легеневої тканини тварин і використовують в медицині для попередження зсідання крові при хірургічних втручаннях та при різних патологічних станах, пов'язаних з серцево-судинними захворюваннями. Механізм інгібуючої дії гепарину полягає в утворенні високоафінного комплексу з антитромбіном III плазми крові, що змінює конформацію останнього і надає АТШ здатності гальмувати дію майже усіх ензимів коагуляційного каскаду і в першу чергу тромбіну. Інгібування тромбіну гальмує утворення фібрину з фібриногену, що блокує формування фібринового згустку – основи тромбу. Нашим

завданням було з'ясувати вплив гепарину на руйнування фібринолітичною системою згустку в плазмі крові, що утворюється під дією АЧТЧ реагенту.

Вплив гепарину на зсідання плазми крові, активованої АЧТЧ реагентом. Вплив зростаючих від 0,025 до 0,1 IU/мл концентрацій гепарину на зсідання плазми крові представлено на рис.4.7. Гепарин значно збільшує час утворення протофібрил, про що свідчить зростання лаг-фази турбідиметричної кривої утворення згустку. Повне інгібування формування згустку має місце при концентрації гепарину більшої за 0,2 IU/мл, що відповідає концентрації 334 нМ, враховуючи середню ММ гепарину рівну 16000 Да і притому активність – 187 IU/мг гепарину. Швидкість латеральної асоціації протофібрил також зменшується (рис.4.8).

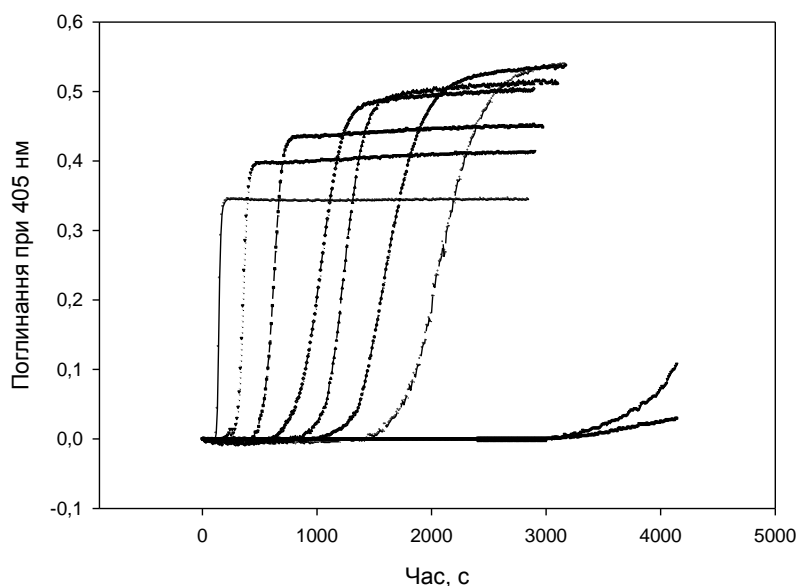


Рис. 4.7. Вплив зростаючих концентрацій гепарину від 0,025, 0,05, 0,075, 0,1, 0,125, 0,15, 0,175 до 0,2 IU/мл на формування згустку в плазмі крові, активованої АЧТЧ-реагентом. Перша зліва крива є контрольна за відсутності гепарину.

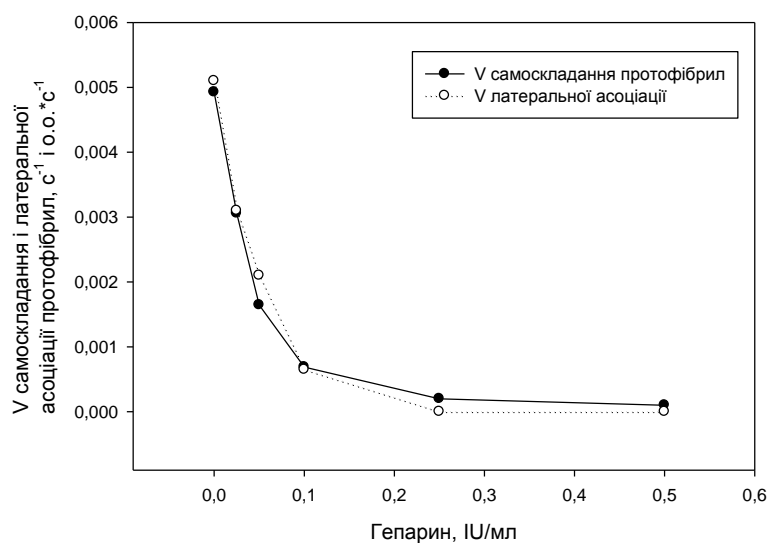


Рис. 4.8. Вплив зростаючих концентрації гепарину на швидкість утворення і латеральної асоціації протофібрил у плазмі крові, що активується АЧТЧ-реагентом. $IC_{50\%}$ для гепарину складає 6,2 нМ гепарину.

Слід звернути увагу на те, що криві інгібування швидкості утворення протофібрил і швидкості їх латеральної асоціації співпадають. Величина $IC_{50\%}$ для обох стадій процесу зсідання плазми становить 6,2 нМ гепарину. Оскільки процеси утворення протофібрил і їх латеральної асоціації різняться між собою за механізмом, то можна припустити, що гепарин впливає на іншу стадію утворення згустку, якою є активація системи гемостазу, утворення тромбіну і його дія на фібриноген. Величина максимальної мутності згустку в плазмі у присутності гепарину зростає відповідно зі зростанням концентрації гепарину (Рис. 4.9).

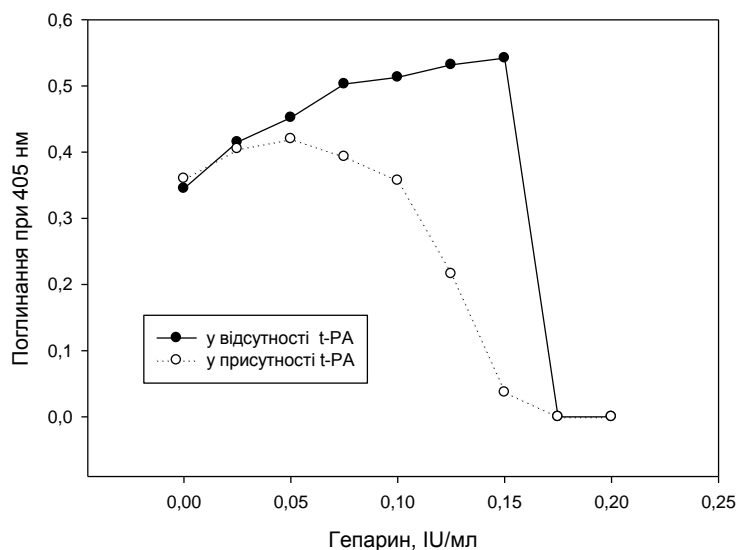


Рис. 4.9. Вплив зростаючих концентрації гепарину на максимальну мутність згустку плазми крові, що активується АЧТЧ-реагентом, за присутності і за відсутності t-РА.

Таблиця 4.2. Параметри зсідання плазми крові донорів, активованої АЧТЧ-реагентом, за присутності зростаючих концентрацій гепарину від 0,025 до 0,175 ІУ/мл: τ - лаг-період процесу зсідання плазми; α - швидкість латеральної асоціації протофібрил, H – максимальне поглинання фібринового згустку.

Гепарин, ІУ/мл	τ , с	V_1 , о.о./с	H , о.о.
К	123.3 ± 4.7	0.008183 ± 0.000879	0.352 ± 0.009
0.025	250 ± 14.1	0.004831 ± 0.001053	0.394 ± 0.029
0.05	360 ± 24.5	0.003327 ± 0.000951	0.421 ± 0.028
0.075	703.3 ± 33.0	0.001471 ± 0.000876	0.458 ± 0.038
0.1	1032.6 ± 24.5	0.001235 ± 0.000085	0.482 ± 0.024
0.125	1323.3 ± 47.1	0.000798 ± 0.000128	0.535 ± 0.020
0.15	1783.3 ± 66.0	0.000723 ± 0.000138	0.528 ± 0.009
0.175	3250 ± 45.5	0,000012 ± 0,000003	0.108 ± 0,004

Це пов'язано, очевидно, з включенням в склад згустку інших протеїнів плазми крові, в першу чергу фібронектину, який здатен зв'язуватися з гепарином і останній, можливо, посилює його афінність до фібрину. При концентрації гепарину більше 0,15 IU/мл згусток не утворюється за час спостереження ~ 4000 с. Середні значення досліджуваних параметрів, отриманих для плазми крові донорів в присутності зростаючих концентрацій гепарину, представлено у Табл. 4.2..

Вплив гепарину на зсідання плазми крові, активованої АЧТЧ-реагентом, за присутності t-РА. За присутності тканинного активатора плазміногену (t-РА) форма кривої набуває типового вигляду, відмінного від кривої утворення згустку (Рис.4.10).

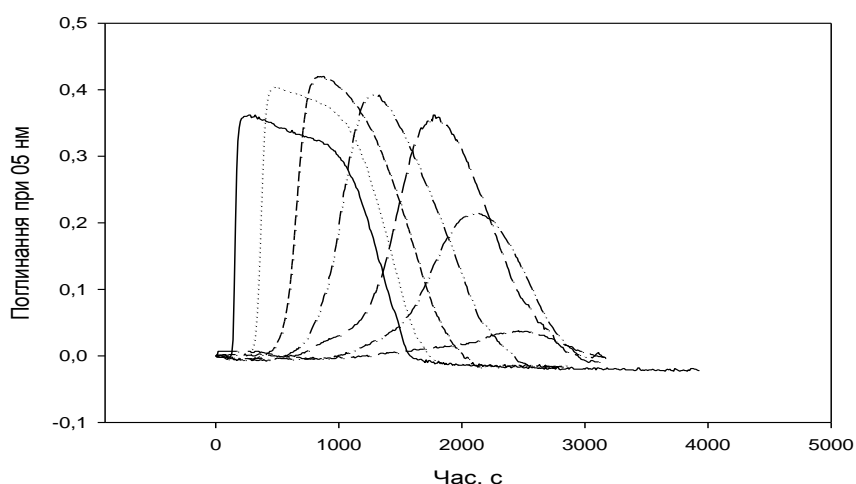


Рис. 4.10. Вплив зростаючих концентрацій гепарину від 0,025, 0,05, 0,075, 0,1, 0,125 до 0,15 на формування згустку в плазмі крові, активованої АЧТЧ-реагентом, за присутності t-РА. Перша зліва крива є контрольна. При концентраціях гепарину 0,175 і 0,2 IU/мл згустки в плазмі не утворюються.

Однак вплив гепарину на такі параметри зсідання плазми, активованої АЧТЧ-реагентом, як швидкість утворення протофібрил ($1/\tau$) і швидкість їх латеральної асоціації ($tg\alpha$), практично не відрізняється (Рис.4.11). Величини $IC_{50\%}$ для інгібування швидкості утворення протофібрил співпадають ($IC_{50\%}=6,2$ нМ). Величини $IC_{50\%}$ для величини мутності згустку

відрізняються і становлять відповідно 43 і 60 нМ, що вказує на необхідність більших концентрацій гепарину для інгібування розміру фібрил в згустках плазми крові (Табл. 4.3) або ж на посилення інгібування зсідання плазми гепарином за присутності t-PA.

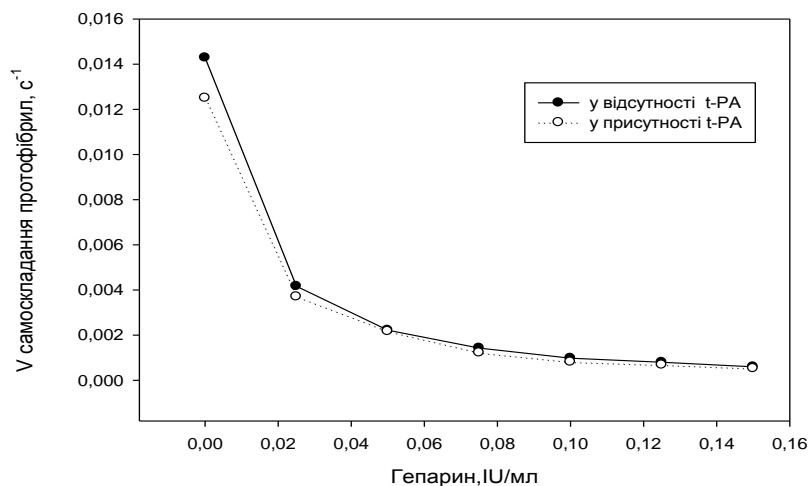


Рис. 4.11. Вплив зростаючих концентрацій гепарину на швидкість утворення протофібрил у плазмі крові, що активується АЧТЧ-реагентом за присутності і відсутності t-PA. IC50% для гепарину складає 6,2 нМ гепарину.

Таблиця 4.3. Параметри зсідання у плазмі крові донорів, активованої АЧТЧ-реагентом, за присутності зростаючих концентрацій гепарину від 0,01 до 0.15 IU/мл з t-PA:

Гепарин, IU/мл	τ , с	V_1 , о.о./с	H, о.о.	L, с
К	135 ± 8.6	0.0088 ± 0.001137	0.337 ± 0.029	1130 ± 7.1
0.025	255 ± 15	0.005056 ± 0.0014	0.375 ± 0.029	1205 ± 29.5
0.05	405 ± 17	0.003297 ± 0.00161	0.386 ± 0.031	1072 ± 69
0.075	707 ± 45	0.001427 ± 0.00116	0.393 ± 0.03	937 ± 38.9
0.1	1075 ± 32	0.000818 ± 5.17E-05	0.372 ± 0.037	840 ± 52.
0.125	1397.5 ± 16.3	0.000318 ± 8.25E-05	0.171 ± 0.043	762.5 ± 79.
0.15	1970 ± 80	7.96E-05 ± 3.52E-05	0.044 ± 0.06	647.5 ± 67.5

τ - лаг-період процесу зсідання плазми; α - швидкість латеральної асоціації протофібрил, H – максимальне поглинання фібринового згустку; L – час напівлізису згустку.

Величина згустку, що відображається формою кривої, зменшується зі зростанням концентрації гепарину (Рис. 4.10). У порівнянні з кривою у відсутності t-РА (Рис.4.7), площа під нею різко зменшується після зростання концентрації гепарину більше 0,1 IU/мл. За відсутності t-РА ця концентрація становить 0,15 IU/мл. На Рис.4.12 приведено залежності ЗП,ЗГП і ФП плазми крові донорів від концентрації доданого гепарину. Величини ЗП і ФП погоджено зростають до концентрації гепарину 0,1 IU /мл. Величина ЗГП в цьому діапазоні концентрацій не змінюється. При подальшому зростанні концентрації гепарину ЗГП зменшується майже до нуля, ЗП різко падає, а ФП не змінюється (Табл. 4.4). Ці дані свідчать про те, що гепарин зменшує ЗП і збільшує ФП плазми крові.

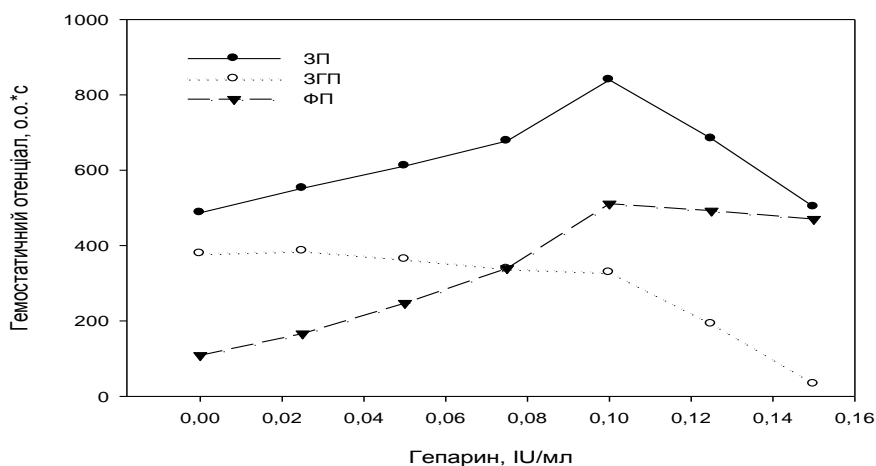


Рис. 4.12. Вплив гепарину на згуртований, загальний гемостатичний і фібринолітичний потенціал плазми крові, активованої АЧТВ реагентом.

Таблиця 4.4. ЗП, ЗГП, ФП у плазми крові донорів, активованої АЧТЧ реагентом, а присутності зростаючих концентрацій гепарину від 0,025 до, 0.15 IU/мл

Гепарин, IU/мл	ЗП	ЗГП	ФП
К	367.4 ±14,2	271.7 ± 13.5	95.7 ± 8.7
0.025	422.6 ± 16,5	298.2 ±14,2	123.8 ± 10
0.05	460.5 ± 25,2	291.3 ±26.5	169± 23,8
0.075	514.2 ± 55	263.5 ± 45	250.7 ± 35,5
0.1	679.3 ±65,5	245.65 ±60,5	433.71± 40,5
0.125	604.6 ±72,5	149.6 ±68,4	454.9 ± 30,5
0.15	433.8 ± 65,2	34.75 ±55,3	399,1± 35,5

Таким чином, отримані дані вказують, що інгібування утворення згустку в плазмі крові відбувається як під дією гепарину, який у комплексі з АТШ блокує активність ензимів каскаду зсідання крові у відсутності t-РА, так і фібринолітичною системою плазми крові у присутності t-РА. Дію останньої гепарин значно посилює.

Вплив гепарину на полімеризацію фібрину в системі фібриноген-тромбін.

Вплив гепарину на полімеризацію фібрину, утвореного з фібриногену під дією тромбіну, у присутності і відсутності t-РА. Ми дослідили вплив зростаючих концентрацій від від 0,0005 до 0,025 IU/мл концентрацій гепарину на полімеризацію фібриногену (Табл. 4.5). Гепарин значно збільшує час утворення протофібрил, про що свідчить зростання лаг-фази кривої утворення згустку. Повне інгібування формування згустку має місце при концентрації гепарину більшої 0,15 IU/мл, що відповідає концентрації 25,2 нМ, враховуючи $MW = 16000$ Да і притому активність – 182 IU/мг гепарину Швидкість латеральної асоціації протофібрил також зменшується (Рис,4.13).

Таблиця 4.5, Параметри зсідання у плазмі крові донорів, активованої АЧТЧ реагентом, в присутності зростаючих концентрацій гепарину від 0,0005 до 0,015 IU/мл: А – без t-PA; В – у присутності t-PA t-PA;

А

Гепарин, IU/мл	τ , с	V_1 , о.о./с	Н, о.о.
К	8 ± 1	0,001947 ± 6,69E-05	0,138 ± 0,006
0,0005	8 ± 2	0,001845 ± 6,45E-05	0,146 ± 0,007
0,001	10 ± 2	0,001758 ± 7,93E-06	0,158 ± 0,013
0,0025	15 ± 4	0,000889 ± 1,85E-05	0,154 ± 0,006
0,005	39 ± 4	0,000507 ± 2,74E-05	0,098 ± 0,009
0,01	76 ± 10	5,61E-05 ± 5,29E-05	0,0119 ± 0,002

В

Гепарин, IU/мл	τ , с	V_1 , о.о./с	Н, о.о.	L, с
К	8 ± 1	0,001835 ± 5,5E-05	0,136 ± 0,004	521 ± 52
0,0005	10 ± 1	0,001739 ± 3,51E-05	0,142 ± 0,003	511 ± 75
0,001	11 ± 2	0,001419 ± 3,9E-05	0,124 ± 0,007	554 ± 78
0,0025	17 ± 4	0,000427 ± 6,76E-05	0,056 ± 0,005	571 ± 63
0,005	44 ± 4	0,000186 ± 0,001354	0,0274 ± 0,006	468 ± 120
0,01	87 ± 8	2,25E-05 ± 1,5E-06	0,0083 ± 0,002	

τ - лаг-період процесу зсідання плазми; V_1 - швидкість латеральної асоціації протофібрил, Н – максимальне поглинання фібринового згустку, L – час напівлізису згустку

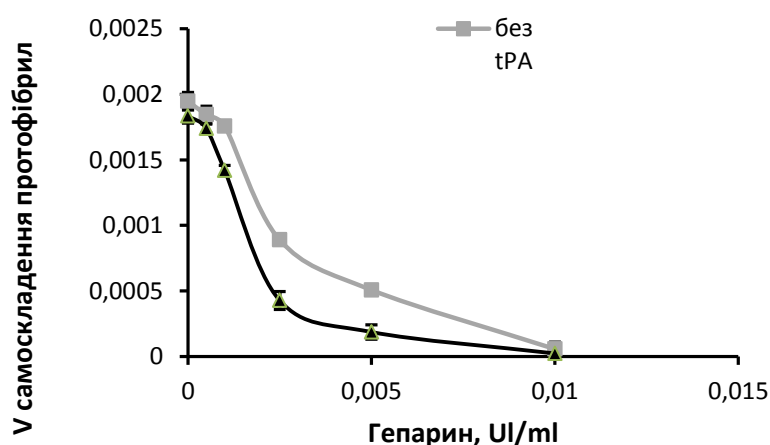


Рис. 4.13, Вплив зростаючих концентрацій гепарину на швидкість латеральної асоціації протофібрил за присутності і відсутності t-PA в модельній системі очищених білків, IC50% для гепарину складає 0,52 нМ гепарину.

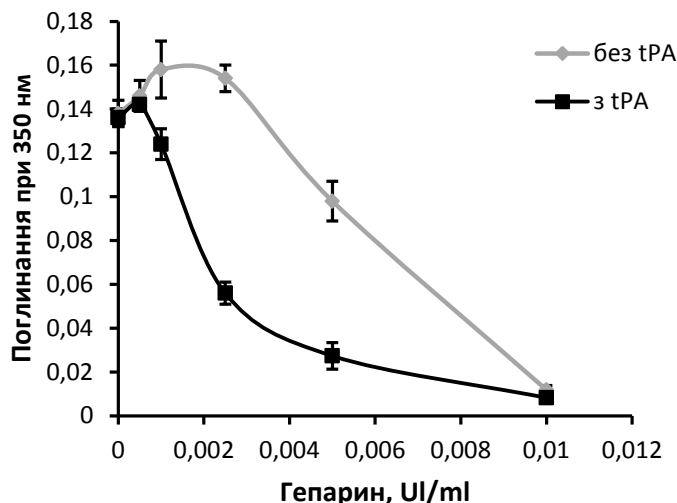
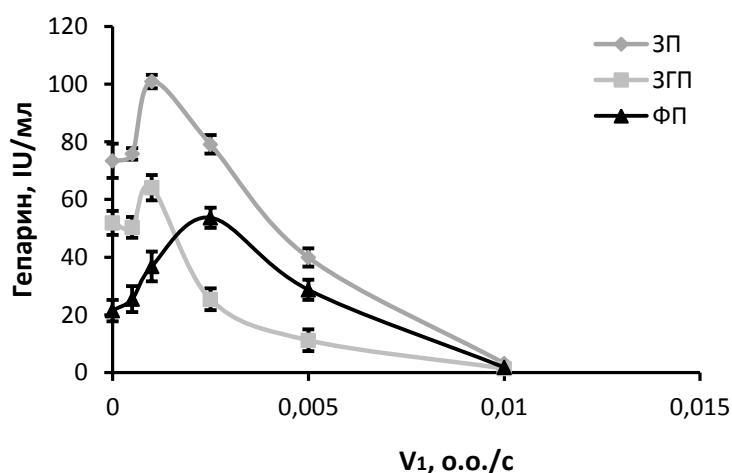


Рис. 4.14. Вплив зростаючих концентрацій гепарину на максимальну мутність згустку при полімеризації фібрину, утвореного з фібриногену під дією тромбіну за присутності і за відсутності t-PA в модельній системі із очищених білків.

Величина IC50% для обох стадій процесу зсідання плазми становить 0,52 нМ гепарину, Величина мутності згустку в плазмі у присутності гепарину зростає (Рис,4.14).

При концентрації гепарину більше 0,015 IU/мл згусток не утворюється, Середні значення досліджуваних параметрів, отриманих на модельній системі в присутності зростаючих концентрацій гепарину, представлено у Табл.. 4.5.

Вплив гепарину на ЗП, ЗГП, ФП. На Рис, 4.15 приведено залежності ЗП,ЗГП і ФП від концентрації доданого гепарину. Величини ЗП і ЗГП дещо зростають до концентрації гепарину 0,001 ME/мл. При подальшому зростанні концентрації гепарину ЗП і ЗГП зменшується майже до нуля, а ФП зростає до концентрації гепарину 0,0025 IU/мл, а потім знижується (Табл,4.6),



Рис, 4.15, Вплив гепарину на ЗП,ЗГП і ФП в модельній системі очищених протеїнів.

Таблиця 4.6, ЗП, ЗГП, ФП за присутності зростаючих концентрацій гепарину від 0,0005 до,, 0,01 ІУ/мл в модельній системі очищених протеїнів.

Гепарин, ІУ/мл	ЗП	ЗГП	ФП
К	73,4 ± 5,9	51,9 ± 4,2	21,5 ± 3,7
0,0005	75,8 ± 5,9	50,3 ± 1,6	25,5 ± 7,5
0,001	100,9 ± 2,3	64,1 ± 8,4	36,8 ± 6,2
0,0025	79,1 ± 3,2	25,4 ± 3,8	53,7 ± 0,5
0,005	39,9 ± 0,7	11,2 ± 0,2	28,7 ± 0,8
0,01	3,2 ± 0,0	1,4 ± 0,2	1,8 ± 0,2

4.3. Вплив хітозану на параметри процесу з'єднання плазми крові.

Хітозан – біосумісний вуглеводний полімер, який отримують із зовнішнього скелету морських безхребетних тварин (крабів та криля). За хімічною природою хітозан є деацильоване похідне хітіну [полі(β-(1-4)-N-ацетил-D-глюкозаміну)]. Ступінь деацильовання у хітозані менше 0,35. Він є сополімером глюкозаміну і N-ацетилглюкозаміну з молекулярною масою від 10000 до 1*10⁶

Да. Хітозан широко використовується в біотехнології як компонент композитів для розробки дво- і тривимірних матриксів - скелетів для проліферації різних типів клітин в інженерії тканин і органів.

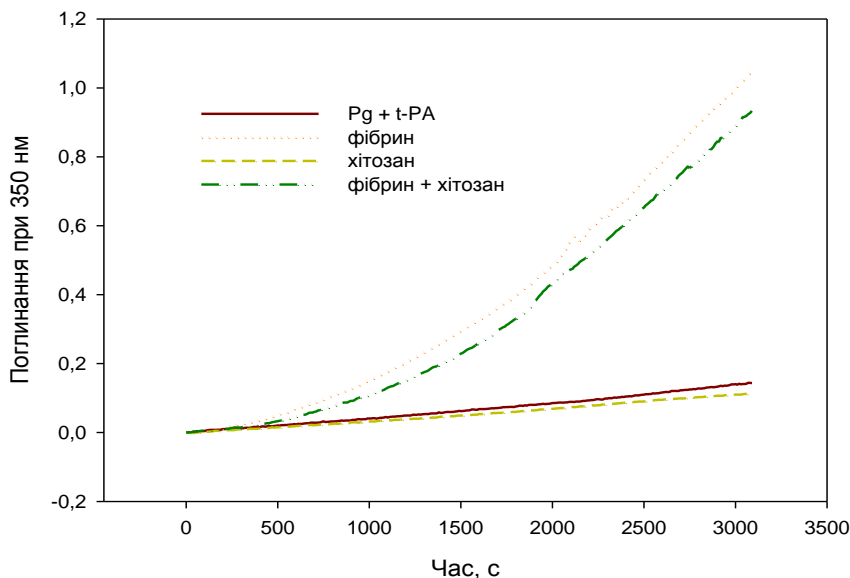
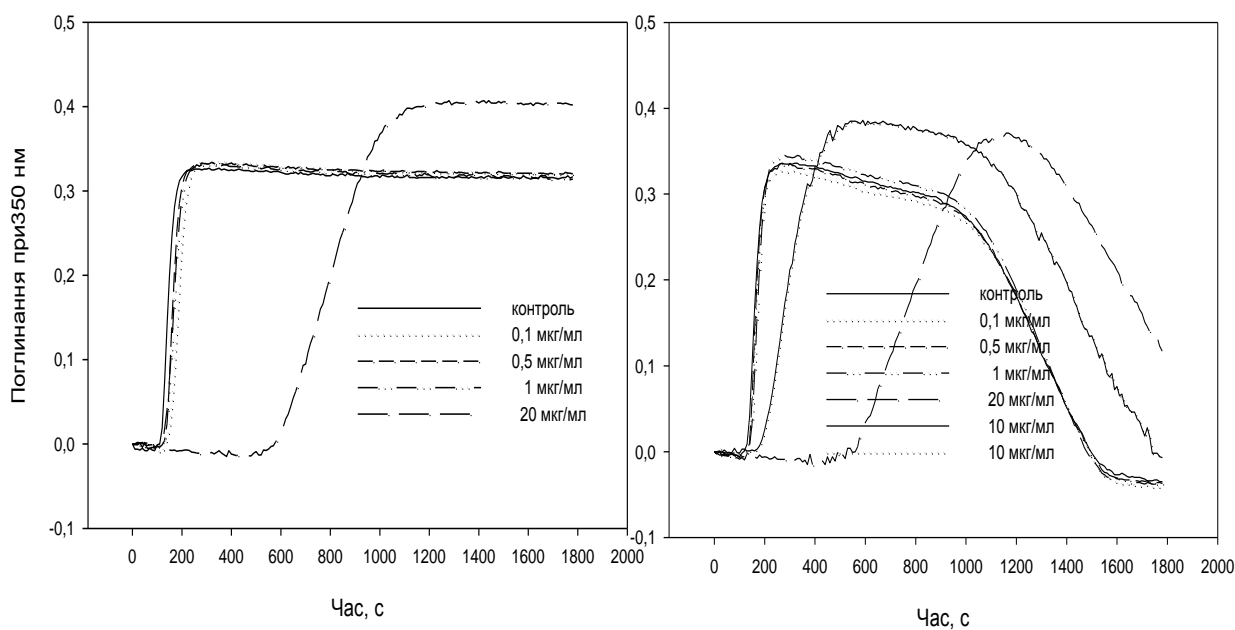


Рис.4.16. Вплив хітозану в концентрації 20 мкг/мл на активацію Pg t-PA за присутності та відсутності фібрину.

Дослідили вплив зростаючих концентрацій хітозану від 0,1 до 20 мкг/мл на гемостатичний потенціал плазми крові. Хітозан до концентрації 10 мкг/мл не впливав на величину ЗП, ЗГП і ФП плазми крові. При концентрації > 10 мкг/мл він збільшував час активації системи зсідання АЧТВ-реагентом у 5,6 рази у присутності і відсутності t-PA, майже не впливав на ЗП і ЗГП і збільшував ~ у 2 рази ФП плазми крові (Табл. 4.9).



А

В

Рис. 4.17. Вплив зростаючих концентрацій хітозану від 0,1 до 20 мкг/мл на зсідання плазми крові, що активується АЧТЧ-реагентом, за відсутності (А) та за присутності t-РА (В).

Таблиця 4.7. Вплив зростаючих концентрацій хітозану на параметри зсідання плазми крові донорів за відсутності та за присутності t-РА.

Концентрація, мкг/мл	τ , с	Н, о.о.	τ , с	Н', о.о.	L, с'	ЗП	ЗГП	ФП
	за відсутності t-РА.		за присутності t-РА.					
К	100	0,326	100	0,336	1220	431	335	95
0,1	110	0,335	115	0,328	1230	427	326	101
0,5	110	0,333	115	0,336	1220	426	331	95
1,0	120	0,33	120	0,345	1220	428	341	86
10,0	150	0,407	155	0,386	1410	599	412	187
20,0	560	0,407	570	0,366	1660	490	313	176

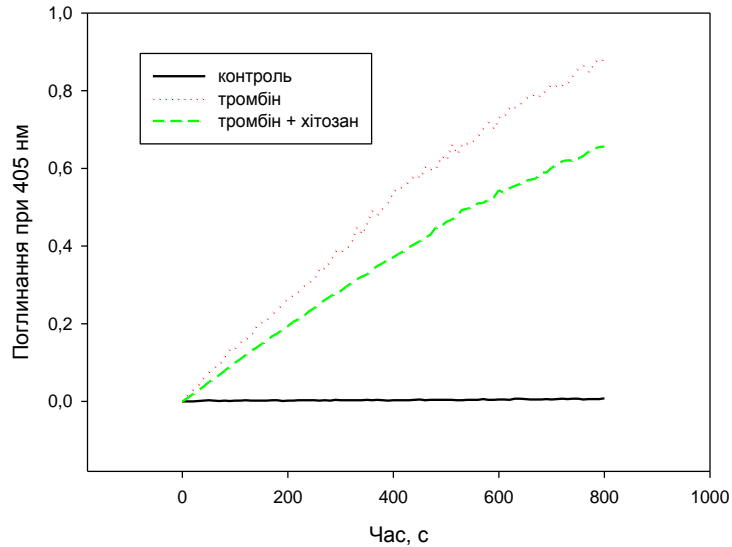


Рис.4.18. Вплив хітозану в концентрації 20 мкг/мл на амідазну активність тромбіну в концентрації 10 нМ (1 НН/мл).

Оскільки хітозан в концентрації 20 мкг/мл не впливав на активацію плазміногену t-PA (рис. 4.21), на 20% інгібував амідазну активність тромбіну (рис. 4.23), суттєво збільшував час формування протофібрил, то ми припустили,, що хітозан не впливає на фібринолітичну компоненту гемостазу, а при концентраціях > 10 мкг/мл інгібує внутрішній шлях активації тромбіну, що призводить до зменшення концентрації останнього, подовженню часу утворення протофібрил, збільшенню товщини фібрил фібринового згустку, що супроводжується зменшенням часу існування фібринового згустку і зростанням фібринолітичного потенціалу плазми крові.

Таким чином встановлено, що хітозан у концентрації до 10 мкг/мл не впливає на величину ЗП, ЗГП і ФП плазми крові і його дія на систему гемостаза при більш високих концентраціях пов'язана з інгібуванням швидкості активації внутрішнього шляху зсідання плазми крові людини.

Висновки до розділу 4.

1 Встановлено, що калікс[4]арен С-145 інгібує утворення фібринового згустку зі збереженням динамічної рівноваги між коагуляційною та фібринолітичною ланками системи гемостазу.

2. Показано, що гепарин змінює структуру фібринового згустку в плазмі крові, що прискорює дію системи фібринолізу.

3. Хітозан у концентрації до 10 мкг/мл не впливає на величину ЗП, ЗГП і ФП плазми крові. Вплив хітозану на систему гемостазу при більш високих концентраціях пов'язана з інгібуванням швидкості активації внутрішнього шляху зсідання плазми крові людини.

Узагальнення результатів роботи.

Сучасна медична діагностика має технічні, технологічні і біотехнологічні можливості найбільш детально охарактеризувати стан системи гемостазу людини, виявивши всі відхилення в його організмі починаючи з порушень в геномі і закінчуючи повною характеристикою кожного компоненту системи гемостазу, і дати рекомендації відносно деталей необхідного лікування. Не торкаючись фінансових, організаційних та етичних аспектів таких можливостей, цей підхід, як і ідея 4P медицини, поки що є питанням, можливо недалекого, але майбутнього. Сучасна медична практика потребує методів, які б достатньо швидко, надійно і повно давали б оцінку стану системи гемостазу хворих. Одним із таких методів є метод Лі і Уайта [53]. Це найпростіша модель оцінки стану системи гемостазу хворого. Її простота і наглядність, можливість візуально оцінити процес зсідання крові відносять цю модель до класу так званих visual assay, які дослівно дають можливість спостерігати процес аналізу в реальному часі.

Використаний нами як основа для модифікації метод гемостатичного потенціалу М. Blomback [93] ґрунтується на турбідиметричній кривій

утворення і гідролізу згустку плазми крові, ініціацію якого викликає АЧТЧ реагент. Привабливість цього методу полягає в простоті, візуальності і аналізі стану системи гемостазу в реальному часі. Існує багато модифікацій цього методу. Переваги методу в тому, що він дає числову інформацію про здатність плазми крові окремого хворого утворювати (гемостатичний потенціал), гідролізувати (фібринолітичний потенціал) та підтримувати гемостатичний баланс (загальний гемостатичний баланс) між ними; вказує на порушення зсідання плазми крові в каскаді внутрішнього шляху для подальшого виявлення фактору зсідання, що викликає це порушення.

Модифікація методу, яка полягала у введенні додаткових параметрів, що характеризують турбідиметричну криву формування і гідролізу згустку плазми крові пацієнтів, дозволила отримати ряд важливих і нових фактів. Так введення параметру - лаг-період, - часу від моменту додавання Ca^{2+} до початку зростання світлорозсіяння згустку, який пов'язаний зі швидкістю активації системи згортання крові і концентрацією утвореного тромбіну, яка викликає полімеризацію фібрину, дозволив встановити, що цей параметр зростає у 7,2 рази у хворих на інсульт. При інсульті також збільшується параметр Н. Показано, що важливим параметром являється відношення ЗП/ФП. Знайдено, що його величина не змінюється у хворих на інсульт, проте зростає при стенозі і стенокардії, що вказує на активацію тромбоутворення у цих хворих. У хворих на інфаркт міокарду цей параметр зменшується, що свідчить про активацію у них фібринолітичної компоненти системи гемостазу.

Важливі результати були отримані при аналізі параметрів системи гемостазу хворих з хронічною хворобою нирок. Було показано, що зростання концентрації розчинного фібрину, яке є ознакою наявності тромбіну в плазмі крові цих хворих, призводить до зростання сили кореляційного зв'язку між системами зсідання, фібринолізу і протеїну С. Інший важливий факт - це виявлена відсутність сильного кореляційного зв'язку між концентраціями

головних молекулярних маркерів стану системи гемостазу у хворих - розчинним фібрином і D-димером [136]. Обидва факти надзвичайно важливі і потребують подальшого дослідження, можливо, у відповідності з запропонованою нами гіпотезою про опосередковану роль утворення фібринових мікрозгустків у плазмі крові у мікроциркуляторній системі кровообігу пацієнтів.

Треба відмітити, що модифікація методу шляхом введення додаткових параметрів турбідиметричної кривої відкриває перспективи для отримання нової додаткової інформації про молекулярні перетворення, які відбуваються в процесі утворення і гідролізу фібринового згустку. Так параметр – лаг-період- дає можливість розробити метод розрахунку концентрації тромбіну, що утворюється в плазмі крові на момент початку підйому турбідиметричної кривої. Параметр H , що характеризує максимальне світлорозсіяння згустком, вказує на товщину фібринових фібрил, що утворюють мережу фібринового згустку. Важливим параметром є час напівлізису згустку [123]. Раніше цей параметр було використано для вивчення кінетики активації різних форм плазміногену під дією тканинного активатора плазміногену. Величина, обернена L ($1/L$) характеризує швидкість утворення плазміну і його рівень в момент напівлізису згустку. Інший параметр – V_2 - дає інформацію про активність фібринолітичної системи і рівень інгібіторів в плазмі крові хворих. Таким чином запропонований нами метод дозволяє отримати важливу інформацію про стан системи гемостазу у хворих з дослідженими захворюваннями і відкриває перспективи для отримання більшої інформації про молекулярні перетворення в процесі формування і гідролізу згустку в плазмі крові хворих.

ВИСНОВКИ

В роботі представлено результати використання моделі формування і гідролізу фібринового згустку, що лежить в основі методу визначення загального гемостатичного потенціалу, для характеристики стану системи гемостазу, балансу, активності і ступеня взаємозв'язку систем зсідання крові, фібринолізу і протеїну С в плазмі крові людини в нормі та за різних патологій, а також за дії лікарських та екзогенних агентів. Параметри гемостатичного потенціалу, що характеризують стан і баланс систем зсідання і фібринолізу, доповнені параметрами турбідиметричної кривої утворення і гідролізу фібринового згустку, що разом з концентрацією молекулярних маркерів – фібриногену, розчинного фібрину, D-димеру і протеїну С – дозволяють більш детально описати стан, процеси активації і рівень активності системи гемостазу плазми крові в цілому в умовах *in vitro* і прогнозувати їх перебіг в умовах *in vivo*.

1. Модифіковано метод визначення загального гемостатичного потенціалу, шляхом використання активації внутрішнього шляху системи зсідання крові стабільним АЧТЧ-реагентом за відсутності та за присутності t-РА, та включенням кількісних параметрів турбідиметричної кривої, які характеризують стадії формування та лізису фібринового згустку на молекулярному рівні.

2. Знайдено, що відношення потенціалу зсідання до фібринолітичного потенціалу (ЗП/ФП) вказує на рівень балансу між про- та антикоагулянтною ланками гемостазу. Так, у донорів і хворих на інсульт воно становить $4,1 \pm 0,1$ та $4,0 \pm 0,9$ відповідно, що свідчить про збереження балансу між зсіданням плазми крові та фібринолізом за цієї патології. При гострому інфаркті міокарду та хронічній хворобі нирок рівновага зміщується у бік фібринолізу – $2,5 \pm 1,3$ та $3,1 \pm 0,5$ відповідно. У пацієнтів зі стенокардією та стенозом рівновага не порушується (ЗП/ФП $\sim 4,1$).

3. У хворих на хронічну хворобу нирок зі зростанням рівня розчинного фібрину зростає сила кореляційного зв'язку (за Пірсоном) до сильного та дуже сильного між вмістом протеїну С та фібринолітичним потенціалом (-0,93), потенціалом зсідання (-0,81) та вмістом фібриногену (-0,73), що вказує на залежність активності систем фібринолізу та протеїну С від рівня активації системи зсідання крові.

4. Виявлено слабкий кореляційний зв'язок між концентрацією розчинного фібрину і іншими параметрами системи гемостазу, включаючи і концентрацію D-димеру, у хворих на хронічну хворобу нирок. Припускається, що D-димер утворюється не з розчинного фібрину, а з мікрозгустків, які формуються із розчинного фібрину в системі мікроциркуляції.

5. Показано, що калікс[4]арен С-145 інгібує утворення фібринового згустку зі збереженням динамічної рівноваги між коагуляційною та фібринолітичною ланками системи гемостазу.

6. Показано, що гепарин змінює структуру фібринового згустку в плазмі крові, що прискорює дію системи фібринолізу.

СПИСОК ВИКОРСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Antovic J. P., Antovic A. Does recombinant factor VIIa, apart from overall hemostasis, regulate TAFI dependent fibrinolysis? In vitro analysis using overall hemostasis potential (OHP) assay. *Thromb. Haemost.* 2003;90;620–627.
2. Antovic J. P., Antovic A., He S, Tengborn L, Blombäck M. 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. *Haemophilia.* 2002;8 (6); 781–786.
3. Antovic J. P., Antovic A., Sten-Linder M., Wramsby, M., Blomback M. Overall hemostatic potential (OHP) assay - a possible tool for determination of prothrombotic pattern in FXII deficiency. *Thromb. Haemost.* 2004; 2; 2058–2060.
4. Antovic A., Blomback M., Bremme K., Van Roijen M., He,S . Increased hemostasis potential persists in women with previous thromboembolism with or without APC resistance. *J. Thromb. Haemost.* 2003; 1; 2531–2535.
5. He S, Wallèn H, Bark N, Blombäck M In vitro studies using a global hemostasis assay to examine the anticoagulation effects in plasma by the direct thrombin inhibitors: dabigatran and argatroban. *Tromb Thrombolysis.* 2013; 35 (2); 131-139.
6. Goldenberg N. A., Hathaway W. E., Jacobson L., Manco-Johnson M. J. A new global assay of coagulation and fibrinolysis. *Thromb. Res.* 2005; 116(4); 345–356.
7. Antovic A. The overall hemostasis potential: a laboratory tool for the investigation of global haemostasis. *Semin. Thromb Hemost.* 2010; 36(7);772-779.
8. Mackman N., Taubman M. Tissue factor: past, present, and future. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*2009;29(2);1986–1988.
9. Hedner U. General haemostatic agents--fact or fiction? *Pathophysiol. Haemost. Thromb* 2002;32(1);33–36.
10. Чернуха Л.М., Каширова Е.В., Луговской Э.В., Комисаренко С.В., Колесникова И.Н., Макогоненко Е.М., Платонова Т.Н., Пирогова Л.В., Горницкая О.В. Характеристика системы гемостаза при артерио-

венозных формах врожденных сосудистых мальформаций. *Новости хирургии*. 2014; 22(2);191-1980.

11. Rijken D.C. Fibrinolytic properties of one-chain and two-chain human extrinsic (tissue-type) plasminogen activator. *J Biol Chem*. 1982; 257(6):2920–2925.

Bajzar L., Manuel R., Nesheim M.E. Purification and characterization of TAFI, a thrombin-activable fibrinolysis inhibitor. *J Biol Chem*. 1995;270(24):14477–14484

12. Curnow J.L., Morel-Kopp M.C., Roddie C, Aboud M, Ward C.M. Reduced fibrinolysis and increased fibrin generation can be detected in hypercoagulable patients using the overall hemostatic potential assay. *J. Thromb. Haemost.* 2007; 5; 528–534

13. Chan A.K. . Paredes N. The coagulation system in human. *Methods in Molecular Biology*. –2013.(992);3-12.

14. Furie B, Furie BC. In vivo thrombus formation. *J Thromb Haemost* 2007; 5 (Suppl. 1):12–17.

15. I. S. Yermolenko, O. V. Gorkun, A. Fuhrmann, N. P. Podolnikova, Valeryi K. Lishko, Stanislav P. Oshkadyerov, Susan T. Lord, Robert Ros, T. P. Ugarova. The Assembly of Nonadhesive Fibrinogen Matrices Depends on the α C Regions of the Fibrinogen Molecule *J Biol Chem*. 2012 Dec 7; 287(50):41979–41990.

16. Lishko VK, Burke T, Ugarova TP. Anti-adhesive effect of fibrinogen: a safeguard for thrombus stability. *Blood*. 2007;109:1541–1549.

17. Lishko VK, Yermolenko IS, Ugarova TP. Plasminogen on the surface of fibrin clot prevents adhesion of leukocytes and platelets *J Thromb Haemost*. 2010;8799–807.

18. S. Margetic Inflammation and haemostasis. *Biochemia Medica*. 2012;22(1):49–62.

19. Levi M, van der Poll T. Inflammation and coagulation. *Crit Care Med*. 2010;38:S26-S34.

20. Esmon CT. Inflammation and thrombosis// *J Thromb Haemost*. 2003;1:1343-8.

21. N. Mackman, R. E. Tilley, N. S. Key. Role of the Extrinsic Pathway of Blood Coagulation in Hemostasis and Thrombosis. *Arterioscler Thromb* 2009.;29(2) 1693-1698..
22. A. Phillip Owens III and Nigel Mackman Microparticles in Hemostasis and Thrombosis. *Circ Res*. 2011; 108 ;(10): 1284–1297.
23. Crawley JTB, Zanardelli S, Chion CKNK, Lane DA. The central role of thrombin in hemostasis. *J Thromb Haemost*.2007;5(1): 95–101.
- 24.. Berckmans, R.J. Cell-derived microparticles circulate in healthy human and support low grade thrombin generation .*Thromb. Haemost*. 2001;85; 639–646.
25. MacFarlane, R.G. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism and its function as biochemical amplifier /R.G. MacFarlane // *Nature*. 1964;202; 498–499.
26. .Ahmad, S.S. et al The assembly of the X-activation complex on activated human platelets. *J. Thromb. Haemost*. 2003; 1;48–59.
27. Vanschoonbeek, K. Initiating and potentiating role of platelets in tissue factor-induced thrombin generation in the presence of plasma: subject-dependent variation in thrombogram characteristics . *J Thromb. Haemost*.2004; 2; 476–484.
28. Engelmann, B. Intravascular tissue factor pathway – a model for rapid initiation of coagulation within the blood vessel. *J Thromb. Haemost*. 2003;89; 3–8.
29. Freyssinet, J-M. Cellular microparticules: what are they bad or good for. *J Thromb. Haemost*. 2003;1;1655–1662.
30. Walsh, P.N. Roles of platelets and factor XI in the initiation of blood coagulation by thrombin / P.N. Walsh. *Thromb. Haemost*. 2001;86;75–82.
31. Furman, M.I. GPIIb-IIIa antagonist-induced reduction in platelet surface factor V/Va binding and phosphatidylserine expression in whole blood. *Thromb. Haemost*. 2000; 84;492–498.
32. Naski M.C., Shafer J.A. A kinetic model for the α -thrombin-catalyzed conversion of plasma levels of fibrinogen to fibrin in the presence of antithrombin. *Journal Biological Chemistry*. 1991;266(20);13003-13010.

33. Hofsteenge J., Taguchi H, Stone S.R. Effect of thrombomodulin on the kinetics of the interaction of thrombin with substrates and inhibitors. *Biochemical Journal*. 1986;237,(1); 243-251.
34. Wu J.R., Zhou C., Majumder R., Powers D.D., Weinreb G., Lentz B.R. Role of procoagulant lipids in human prothrombin activation. 1. Prothrombin activation by factor X(a) in the absence of factor V(a) and in the absence and presence of membranes. *Biochemistry*.2002;41(3):935–949.
35. van Dieijen G., Tans G., Rosing J., HemkerH.C. The role of phospholipid and factor VIIIa in the activation of bovine factor X. *J Biol Chem*. 1981;256(7):3433–3442.
36. Heemskerk, J.W.M. Platelet activation and blood coagulation. *Thromb. Haemost.* 2002;88;186–193.
37. Яровая Г.А., Блохина Т.Б., Нешкова Е.А. Контактная активация протеолитических систем плазмы крови. Новые концепции о механизмах активации и биорегулирующих функциях. *Лабораторная медицина*. 2008.;9;. 19–27.
38. Nicoloso G., Hauert J., Kruithof E.K., van Melle G., Bachmann F. Fibrinolysis in normal subjects – comparison between plasminogen activator inhibitor and other components of the fibrinolytic system. *Thromb Haemost.* 1988;59(2):299–303.
39. Rijken D.C. Fibrinolytic properties of one-chain and two-chain human extrinsic (tissue-type) plasminogen activator. *J Biol Chem*. 1982; 257(6):2920–2925.
40. Bajzar L., Manuel R., Nesheim M.E. Purification and characterization of TAFI, a thrombin-activable fibrinolysis inhibitor. *J Biol Chem*. 1995;270(24):14477–4484.
41. Levin E.G., Marzec U., Anderson J., HarkerL.A. Thrombin stimulates tissue plasminogen activator release from cultured human endothelial cells. *J Clin Invest*. 1984;74(6):1988–1995
42. Sidelmann J.J., Gram J., Jespersen J., Kluft C. Fibrin clot formation and lysis: basic mechanisms. *Semin Thromb Hemost*.2000;26(6):605–618.

43. Muszbek L., Berczky Z., Bagoly Z., Komaromi I., Katona E. Factor XIII: a coagulation factor with multiple plasmatic and cellular functions. *Physiol Rev.* 2011;91(3): 931–972.
44. van Hinsbergh V.W., Kooistra T., Emeis J.J., Koolwijk P. Regulation of plasminogen activator production by endothelial cells: role in fibrinolysis and local proteolysis. *Int J Radiat Biol.* 1991;60(1-2):261–272.
45. Samis J.A., Ramsey G.D., Walker J.B., Nesheim M.E., Giles A.R. Proteolytic processing of human coagulation factor IX by plasmin. *Blood.* 2000;95(3). :943–951.
46. Perera L, Foley C, Darden T. Modeling zymogen protein C. *Biophysical Journal.* 2000;79:2925-2943.
47. Mosnier L, Meijers J, Bouma B. Regulation of fibrinolysis in plasma by TAFI and protein C is dependent on the concentration of thrombomodulin. *Thromb Haemost.* 2001;85(1):5-11.
48. Munnix I, Gilio K, Siljander P. et al. Collagen-mimetic peptides mediate flow-dependent thrombus formation by high- or low-affinity binding of integrin alpha2beta1 and glycoprotein VI. *J Thromb Haemost.* 2008;6:2132-2142.
49. Stearns-Kurosawa D. The endothelial cell protein C receptor augments protein C activation by the thrombin-thrombomodulin complex. *Natl. Acad.Sci. U.S.A.* 1996;19:10212-10216.
50. Váradi K. Activation and inactivation of human protein C by plasmin. *Thromb. Haemost.* 1994;71(5):615-621
51. Момот А.П. Принципы, методы и средства лабораторной диагностики патологии гемостаза на современном этапе. *Лаб. диагностика.* 2004;2;52 – 70.
52. Hoffman R., Benz E.J., Shatti S.J. et al. Hematology: Basic Principles and Practice. – 2nd end. – New York: Churchill Livingston, 1995. – 2369 p.
53. Баркаган З.С., Момот А.П. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза. 2-е изд., доп. – М.: Ньюдиамед-АО, 2001. – 296 с.

54. Назаренко Г.И., Кишкун А.А. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований. – М.: Медицина, 2000. – 451 с.
55. Меньшиков В.В. Лабораторные методы исследования в клинике. – М.: Медицина, 1987. – 221 с.
56. Иванов Е.П. Диагностика нарушений гемостаза. – Минск: Беларусь, 1983. – 221 с.
57. Токар. А.В., Макагоненко Е.М., Платонова Т.М. та ін. Сучасні методи лабораторної діагностики внутрішньосудинного мікрозсідання крові: Метод. рекомендації. – К., 1994. – 22 с.
58. Платонова Т.М., Чернищенко Т.М., Горницька О.В. та ін. Лабораторна діагностика стану системи гемостазу. *Укр. біохім. журн.* 2000;(72); 6;67 – 73.
59. Братчик А.М. Клинические проблемы фибринолиза. – Киев: Здоровья, 1993. – 344 с.
60. Соколовська А.С., Платонова Т.М., Гриненко Т.В. та ін. Порівняльна характеристика методів визначення вмісту фібриногену в плазмі крові // *Експерим. та клін. фізіологія і біохімія.* 2002; 3;82–86.
61. Белицер В.А., Мусялковская А.А., Платонова Т.Н., Ена Я.М. Определение активности антитромбина III в плазме крови. *Лаб. дело.* 1987; 4; 241 – 320.
62. Горницкая О.В., Платонова Т.М., Волков Г.Л. Ферменты змеиных ядов. *Укр. биохим. журн.* 2003(75); 5;22-32.
63. Платонова Т.М., Горницька О.В., Мороз Є.Д. Застосування активатора протеїну С з отрути щитомордника (*Agkistrodon halys halys*) для визначення активності протеїну С в плазмі крові за різних патологій. *Лаб. Діагностика.* 2001;3; 28-31.
64. Методы исследования фибринолитической системы крови / Под ред. Г.В. Андреевко – М.: Изд-во Моск. ун-та., 1981. – 131 с.
65. Савчук О.М., Краснобрига Є.М., Макогоненко Є.М. Визначення активності тканинного активатора плазміногену у хворих на гострий інфаркт міокарда. *Експерим. та клін. фізіологія і біохімія.* 2002; 3; 87–92.

66. Платонова Т.М., Чернишенко Т.М., Савчук О.М., др. Определение активности тканевого активатора плазминогена и содержания растворимого фибрина в плазме больных с различной патологией. *Лаб. Диагностика*. 2000;2; 15-18.
67. Савчук О.М., Платонова Т.М., Волков Г.Л. та ін.. Комплексна лабораторна діагностика порушень системи гемостазу при дисемінованому внутрішньо судинному зсіданні крові. Матеріали II міжнар.наук. конф «Мікроциркуляція та її вікові зміни» 2002. К.2002;268-270.
68. Yee K.O., Schwazzer S.M. Why atherosclerosis vessels narrow: the fibrin hypothesis. *Thromb Haemost* 1999;82(2);762-771.
69. Galvani V., Ferrini d., Ottani F. Early risk stratification of unstable angina/non-Q myocardial infarction: biochemical markers of coronary thrombosis. *Int.J Cardiol*. 1999(68);1; 55-61.
70. Соловьев Д.А., Угарова Т.П. Выделение и характеристика альфа-специфических тромбиноподобных ферментов из ядов щитомордника обыкновенного (*Agkistrodon halys halys*) и щитомордника восточного (*Agkistrodon halys blomhoffii*). *Биохимия*. 1993(58); 8;1221-1233.
71. Платонова Т.М., Соловйов Д.А., Єна Я.Н. Визначення вмісту фібриногену в плазмі крові людини за допомогою тромбіноподібного ферменту анцистрону-Н та аналіз стану гемостазу при наявності інгібіторів зсідання крові. *Фізіол.журн*. 1993;1;15-19.
72. Соловьев Д.А., Платонова Т.М., Угарова Т.П. Выделение и характеристика экамулина – активатора тромбина из яда эфы многочешуйчатой. *Биохимия*. 1996(61);6;1094-1105.
73. Karnali.F. Use of ecarin in diagnosis of coagulant disorders. *Haemost and animal venoms in haematology*. 1985;7;603-610.
74. Горницкая О.В., Платонова Т.М. Выделение и свойства протеина С из яда щитомордника обыкновенного (*Agkistrodon halys halys*). *Вопр. мед.химии*. 2001;2;65-71.

75. Smith F.B., Lee A.J., Rumley A. Tissue plasminogen activator inhibitor and risk of peripheral arterial disease. *Thromb Haemost* 1995;73(5);835-840/
76. Stirling Y., Woolf I., North V.R. Haemostasis in normal pregnancy. *Ibid.* 1984;52(2);176-182.
77. Eriksson B., Eriksson E., Gyzander E. et al. Thrombosis after hip replacement. Relationship to the fibrinolytic system. *Acta Orthop. Scand.* 1989;60;159-163.
78. Wilson L., Francis G.E. Differential-linked secretion of urokinase and tissue plasminogen activator by normal human hemopoietic cells. *J. Exp. Med.* 1987;165;1609-1623.
79. Chan H., Jia H., Song H. Changes of plasma levels of tissue plasminogen activator and its inhibitors in acute myocardial infarction patients. *Clin. Med. J.* 1990;103(7);541-545.
80. Исследование системы крови в клинической практике. Под ред. Козинца Г.И., Макарова В.А. М.: - Триада-Х. 1997.-480 с.
81. Wilkes H.S., Meade T.W. et al. Gemfibrozil reduced plasma prothrombin fragment F concentration, a marker of coagulability, in patients with coronary heart disease. *Thromb Haemost* 1992;67(5);503-506.
82. Голота В.Я., Гамісонія М.Ш., Платонова Т.М., Макогоненко Є.М. Діагностика предтромбічного стану за допомогою сучасних коагулологічних тестів в акушерській практиці. *Лаб. діагностика.* 1998;3;15 – 17.
83. Платонова Т.М., Чернищенко Т.М., Горницька О.В. та ін. Лабораторна діагностика стану системи гемостазу. *Укр. біохім. журн.* 2000.;72(6); 67 – 73.
84. Голота В.Я., Гамісонія М.Ш., Платонова Т.М., Макогоненко Є.М. Рання діагностика і профілактика тромботичних ускладнень після операції кесарського розтину. *Педіатрія, акушерство і гінекологія.* 2000.; 3;104–107.
85. Longstaff C, Kolev K. Basic mechanisms and regulation of fibrinolysis. *J. Thromb and Haemost.* 2015;13(1):98-105.
86. Lipets E, Ataulakhanov F. Global assays of hemostasis in the diagnostics of hypercoagulation and evaluation of thrombosis risk. *Thromb J.* 2015;13(1).

87. Lancé M. A general review of major global coagulation assays: thrombelastography, thrombin generation test and clot waveform analysis. *Thromb J*. 2015;13(1).
88. Hemker HC, Al Dieri R, De Smedt E, Beguin S. Thrombin generation, a function test of the haemostatic-thrombotic system. *Thromb Haemost* 2006;96:553–61.
89. Wielders S, Mukherjee M, Michiels J, Rijkers DT, Cambus JP, Knebel RW, et al. The routine determination of the endogenous thrombin potential, first results in different forms of hyper- and hypocoagulability. *Thromb Haemost* 1997;77:629–311.
90. He S., Hemker HC, Giesen P, Al Dieri R, Regnault V, de Smedt E, Wagenvoort R, et al. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2003;33:4–15.
91. He S, Bremme K, Blombäck M. A laboratory method for determination of overall haemostatic potential in plasma: I. Method design and preliminary results. *Thromb Res* 1999;96:145–56.
92. He S, Antovic A, Blombäck M. A laboratory method for determination of overall haemostatic potential in plasma: II. Modifications for routine use. *Thromb Res* 2001;103:355–61.
93. Antovic JP, Antovic A, He S, Tengborn L, Blombäck M. 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. *Haemophilia*. 2002;8:781-786.
- 94 Adams M, Ward C, Thom J, Bianchi A, Perrin E, Coghlan D, et al. Emerging technologies in hemostasis diagnostics: a report from the Australasian Society of Thrombosis and Haemostasis Emerging Technologies Group. *Semin Thromb Hemost* 2007;33:226–34.

95. Antovic A, Blomback M, Sten-Linder M, Petrini P, Holmstrom M, He S. Identifying hypocoagulable states with a modified global assay of overall haemostasis potential in plasma. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2005;16:585–96.
96. Bremme K, Osterlund E, Almqvist I, Heinonen K, Blombäck M. Enhanced thrombin generation and fibrinolytic activity in normal pregnancy and the puerperium. *Obstet Gynecol* 1992;80:132–7.
97. Faught W, Garner P, Jones G, Ivery B. Changes in protein C and protein S levels in normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1995;172:147–50.
98. Lindoff C, Ingemarssen I, Martinsson G, Segelmark M, Thysell H, Astedt B. Preeclampsia is associated with a reduced response to activated protein C. *Am J Obstet Gynecol* 1997;176:457–462.
99. Antovic A., Blombäck M., Bremme K., He S. The assay of overall haemostasis potential used to monitor the low molecular mass (weight) heparin, dalteparin, treatment in pregnant women with previous thromboembolism. *Blood Coagul. Fibrinolysis*. 2002; 13 (3); 181–186.
100. Antovic JP, Antovic A. Does recombinant factor VIIa apart from overall hemostasis regulate TAFI dependent fibrinolysis—in vitro analysis using overall hemostasis potential (OHP) assay. *Thromb Haemost* 2003; 90:620–8.
101. Levi M, Hack CE, de Boer JP, Brandjes DP, Buller HR, ten Cate JW. Reduction of contact activation related fibrinolytic activity in factor XII deficient patients. Further evidence for the role of contact system in fibrinolysis in vivo. *J Clin Invest* 1991; 88: 1155–60
102. Lugovskoy E.V., Kolesnikova I.N., Gritsenko P.G. et al. A neoantigenic determinant in the D-dimer fragment of fibrin. *Thromb. Res.* 2002. (107); 3-4; 151-156.
103. Lugovskoy E.V., Gritsenko P.G., Kolesnikova I.N. et al. A neoantigenic determinant in coiled coil region of human fibrin X-chain. *Thromb. Res.* 2009;(123);5; 765-770.
104. Solov'ev D.A, Ugarova T.P. Isolation and characteristics of alpha-specific thrombin-like enzymes from venoms of the common pit viper (*Agkistrodon halys*

halys) and the eastern pit viper (the central Asian subspecies *Agkistrodon halys blomhoffii*). *Biochemistry*.1993(58),8;.1221-1233(In Russian).

105. Fenton JW II, Fasco MJ, Stackrow AB, et al. Human thrombins. Production, evaluation, and properties of alpha-thrombin. *J Biol Chem* 1977; 252: 3587–3598.

106. Deutsch D.G., Mertz E.T. Plasminogen purification from human plasma by affinity chromatography. *Science*. 1970. (170), 3962.; 1095-1096.

107. Whyte C, Mitchell J, Mutch N. Platelet-mediated modulation of fibrinolysis. *Semin Thromb Hemost*. 2017;43(2):115-128.

108. S. He, A. Antovic and M. Blombačck A Simple and Rapid Laboratory Method for Determination of Haemostasis Potential in Plasma II. Modifications for Use in Routine Laboratories and Research Work // *Thrombosis Research*.- 2001.- 103; 355–361.

109. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227,5259; 680-685.

110. Варецька Т.В. Мікрогетерогенність фібриногену. Кріо-фібриноген. *Укр. Біохім. Журн*. 1960(32);;13-24.

111. Варецькая Т.В. Строеие и свойства фибриногена и фибрина. Самосборка волокон фибрина. Дисс. ...доктора биол. Наук. - Киев. - 1977.- С.357.

112. Rublenko A. M., Urvant L.P., Makogonenko Y.M., Platonova T.N., Chernyshenko T.M., Kolesnikova I.M, Fishchenko V.O., Lugovskoi E.V. Effect of protein C activator on overall haemostasis potentialin donor and hip arthroplastypatient plasma. *Ukr..Biokhim. Zhurn.*. 2011;85(3);32-39. (In Ukrainian).

113. Harlow E. A laboratory manual. Antibodies. / E. Harlow, D. Lane. – New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. – 726 p.

114. Di Cera E. Thrombin. *Mol. Aspects Med*. 2008; 29: 203-254.

115. Esmon C.T. The protein C pathway. *Chest*. 2003.; 124, Suppl. 3: 26S–32S.

116. Tanaka, K.A., Key, N.S., Levy J.S. Blood coagulation: hemostasis and thrombin regulation. *Anest. Analg*. 2009.;108:1433 – 1446.

117. Carr M.E. Jr., Hermans J. Size and density of fibrin fibers from turbidity. *Macromolecules*. 1978; 11 (1); 46-50.
118. Suenson E., Petersen L.C Fibrin and plasminogen structures essential to stimulation of plasmin formation by tissue-type plasminogen activator. *Biochim. Biophys. Acta*. 1986; 870 (3); 510-519.
119. Sakharov D.V. and Rijken D.C. Superficial accumulation of plasminogen during clot lysis. *Fibrinolysis*. 1994; 8 (1); 83.
120. Marder V.J., Francis Ch.W., Ann. N.Y Plasmin degradation of cross-linked fibrin. *Acad. Sci.* 1983; 408; 389-406.
121. Mihalyi E., Ann. N.Y Kinetics and molecular mechanism of the proteolytic fragmentation of fibrinogen. *Acad. Sci.* 1983; 408; 60-70.
122. Suenson E., Bjerrum D., Holm A., Lind B., Meldal M., Selmer J., Petersen L. The role of fragment X polymers in the fibrin enhancement of tissue plasminogen activator-catalyzed plasmin formation. *J. Biol. Chem.* 1990; 265 (36); 22228-22238/
123. Макогоненко Е.М., Кирпа С.А., Луговской Э.В., Назаренко Н.А., Кудинов С.А. Кинетика активации Глу- и Лиз-фибриногена тканевым активатором в фибриновом сгустке. *Биохимия*. 1987; 52 (10); 1746-1752.
124. Pyrogoва L.V., Chernyshenko T.M., Kolesnikova I.N., Platonova T.N., Bereznitsky G.K., Makogonenko Y.M., Lugovskoy E.V. Level of overall hemostasis potential in donor and patient plasma in pathology. *Ukr. Biochem. J.* 2016; 88(2):56-75.
125. Makogonenko E., Tzurupa G., Ingham K., Medved L. Interaction of fibrin(ogen) with fibronectin: further characterization and localization of the fibronectin-binding site. *Biochemistry*. 2002;41;7907-7913.
126. Lenting P.J., Casari C., Christophe O.D., Denis C.V. Von Willebrand factor: the old, the new and the unknown. *J. Thromb. Haemost.* 2012;10;2428–2437.
127. Hantgan R.R, Hermans J. Assembly of fibrin. A light scattering study. *J. Biol. Chem.* 1979; 254:11272-11281.

128. Carr M.E., Jr., Hermans J. Size and density of fibrin fibers from turbidity. *Macromolecules*. 1978; 11:46-50.
129. Makogonenko Y., Tzurupa G., Ingham K., Medved L. Interaction of fibrin(ogen) with fibronectin: further characterization and localization of the fibronectin-binding site. *Biochemistry*. 2002; 41:7907-7913.
130. Sakharov D.V., Nagelkerke J.F., Rijken D.C. Rearrangements of the fibrin network and spatial distribution of fibrinolytic components during plasma clot lysis. *J. Biol. Chem.* 1996; 271:2133-2138.
131. Arians R.A., Lai T.S., Weisel J.W., Greenberg C.S., Grant P.J. Role of factor XIII in fibrin clot formation and effects of genetic polymorphisms. *Blood*. 2002; 100:743–754.
132. Levi M., van der Poll T. Inflammation and coagulation. *Crit. Care Med.* 2010; 38: 26-34.
133. Schultz D.R. Arnold P.I. Properties of four acute phase proteins: C-reactive protein, serum amyloid A protein, alpha 1-acid glycoprotein, and fibrinogen. . Schultz, *Seminars Arthritis Rheumatism*. 1990;20(3);129-47.
134. Undas A.]et al. Altered fibrin clot structure/function in patients with idiopathic venous thromboembolism and in their relatives. *Blood*. 2009;114, (19). 4272–4278.
135. Lugovskoy E.V., Gritzenko P.G., Lugovskaya N.E., Kolesnikova I.N., Komisarenko S.V. Soluble fibrin: molecular structure and quantification. *Lab. Diagnostica*. 2006; 3(37): 11-17.
136. Lugovskoy E.V., Gritzenko P.G., Lugovskaya N.E., Kolesnikova I.N., Komisarenko S.V. Soluble fibrin: molecular structure and quantification. *Lab. Diagnostica*. 2006; 3(37): 11-17.
137. Suenson E., Petersen L.C. Fibrin and plasminogen structures essential to stimulation of plasmin formation by tissue-type plasminogen activator. *Biochim. Biophys. Acta*. 1986; 870: 510-519.

138. Луговской Э.В, Макогоненко Е.М, Комисаренко С.В. Молекулярные механизмы образования и разрушения фибрина. К.: Наукова думка, 2013. с.158-163.
139. Carr M.E. Jr, Shen L.L., Hermans J. Mass-length ratio of fibrin fibers from gel permeation and light scattering. *Biopolymers*. 1977;16: 1-15.
140. Meh D.A., Siebenlist K.R., Mosesson M.W. Identification and characterization of the thrombin binding sites on fibrin. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 23121-23125.
141. Meh D.A., Siebenlist K.R., Brennan S.O. The amino acid sequence in fibrin responsible for high affinity thrombin binding. *Thromb. Haemost.* 2001; 85: 470-474.
142. Di Cera E.J. Thrombin as procoagulant and anticoagulant. *Thromb. Haemost.* 2007; .5: 196-202.
143. .Lugovskoy EV, Gritsenko PG, Koshel TA (2011) Calix[4]arene methylenebisphosphonic acids as inhibitors of fibrin polymerization. *FEBS Journal* 278: P.1244-1251.
144. Cherenok SO, Yuschenko OO, Gritsenko PG, Lugovskoy EV, Koshel TA, et al. (2010) Synthesis of calixarene-methylenbisphosphonic acids and their influence on fibrin polymerization. 18th International Conference on Phosphorus Chemistry. Wroclaw 72.
145. Komisarenko SV, Kosterin SO, Lugovskoy EV, Kalchenko VI (2013) Calixarene methylene bisphosphonic acids as promising effectors of biochemical processes. *Ukr Biokhim Zh* 85: 32-39.
146. V.O. Chernyshenko, L.V. Pirogova, S.V. Cherenok, V.E. Dosenko, D.O. Pashevin, V.I. Kalchenko, E.M. Makogonenko E.V. Lugovskoy Effects of Calix[4]arene C-145 on overall haemostatic potential of blood plasma in vitro and in vivo. *J. Int. Res. in Med. Pharm. Sci.* 2016;10(3):146-151.
147. В.О. Чернищенко, О.В. Савчук, С.О. Черенок, О.М. Силенко, А.О. Негеля, Л.О. Касаткіна, Л.В. Пирогова, В.А. Дідківський, О.І. Юсова, В.І. Кальченко, Л.В. Гарманчук, Т.В. Гриненко, Е. В. Луговської, С.В.

Комісаренко Дія калікс[4]арен-метиленбісфосфонової кислоти C-145 та її сірковмісного аналога на гемостаз. *Укр. біох. журн.* 2018(90);6;21-30.

148. Chernyshenko VO, Korolova DS, Dosenko VE, Pashevin DO, Kalchenko VI, Pirogova LV, Chernyshenko TM, Lugovska OE, Kravchenko NA, Makogonenko YM, Lugovskoy EV and Komisarenko SV. Calix[4]arene C-145 Effects on Plasma Haemostasis . *Pharmaceutica Analytica Acta* 2015. 6(8);1-5.

ДОДАТОК 1.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Чернуха Л.М., Каширова Е.В., Луговской Э.В., Комисаренко С.В., Колесникова И.Н., Макогоненко Е.М., Платонова Т.Н., Пирогова Л.В., Горницкая О.В. Характеристика состояния системы гемостаза при артериовенозных формах врожденных сосудистых мальформаций // Новости хирургии. – 2014. – Т. 22, №2 – С. 191-198.
2. Chernyshenko VO, Korolova DS, Dosenko VE, Pashevin DO, Kalchenko VI, Pirogova LV, Chernyshenko TM, Lugovska OE, Kravchenko NA, Makogonenko YM, Lugovskoy EV and Komisarenko SV. Calix[4]arene C-145 Effects on Plasma Haemostasis // Pharmaceutica Analytica Acta – 2015. – 6(8) – 1-5.
3. Пирогова Л.В., Чернищенко Т.М., Колеснікова І.М., Платонова Т.М., Березницький Г.К., Макогоненко Є.М., Луговської Е.В. Рівень загального гемостатичного, згортаючого і фібринолітичного потенціалу у плазмі крові донорів і хворих при різних захворюваннях // Укр. біох. журн. 2016 –Т.88. –№2.– С56-65.
4. V.O. Chernyshenko, L.V. Pirogova, S.V. Cherenok, V.E. Dosenko, D.O. Pashevin, V.I. Kalchenko, E.M. Makogonenko E.V. Lugovskoy Effects of Calix[4]arene C-145 on overall haemostatic potential of blood plasma in vitro and in vivo // J. Int. Res. in Med. Pharm. Sci. 2016;10(3):146-151.
5. В.О. Чернищенко, О.В. Савчук, С.О. Черенок, О.М. Силенко, А.О. Негеля, Л.О. Касаткіна, Л.В. Пирогова, В.А. Дідківський, О.І. Юсова, В.І. Кальченко, Л.В. Гарманчук, Т.В. Гриненко, Е. В. Луговської, С.В. Комісаренко Дія калікс[4]арен-метиленбісфосфонової кислоти С-145 та її сірковмісного аналога на гемостаз. Укр. біох. журн. 2018 –Т.90. –№6.– С21-30.
6. Б.Г. Сторожук, Л.В. Пирогова, Т.М. Чернищенко, О.П. Костюченко, І.М. Колеснікова, Т.М. Платонова, О.Б. Сторожук, Л.О. Сторожук, Г.К. Березницький, П.Ю. Цап, О.О. Масенко, Є.М. Макогоненко,

Е.В. Луговської Загальний гемостатичний потенціал плазми крові і його зв'язок із деякими молекулярними маркерами системи гемостазу у хворих на хронічні захворювання нирок VD стадії Укр. біох. журн