

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ім. О.В. ПАЛЛАДІНА**

На правах рукопису

**РЕВКА ОЛЬГА ВОЛОДИМИРІВНА**

УДК 577.151.6:612.115

**КООРДИНУВАННЯ ПРОЦЕСІВ ТРОМБОУТВОРЕННЯ ТА  
ФІБРИНОЛІЗУ ЗА УЧАСТІ КЛІТИН КРОВІ**

03.00.04 – біохімія

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

\_\_\_\_\_ Ревка О.В.

Науковий керівник:  
доктор біологічних наук  
Гриненко Тетяна Вікторівна

**КИЇВ – 2020**

## АНОТАЦІЯ

Ревка О.В. – “Координування процесів тромбоутворення та фібринолізу за участі клітин крові.”

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.04 “Біохімія”. – Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ, 2020.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню ролі клітин крові – моноцитів, нейтрофілів та тромбоцитів у координуванні процесів тромбоутворення та фібринолізу.

Система гемостазу забезпечує збереження крові у рідкому стані, а в разі необхідності – зупинку кровотечі. До її складу входять протилежно спрямовані взаємопов’язані системи згортання крові та фібринолізу, а також система протеїну С, яка бере участь у підтримці балансу між ними. Надмірна активація системи згортання крові призводить до патологічного тромбоутворення, що супроводжується розвитком серцево-судинних захворювань – однієї з основних причин смертності у світі, тоді як надмірна активація системи фібринолізу пов’язана з ризиком розвитку геморагій. Таким чином, дослідження біохімічних механізмів, які забезпечують гемостатичний баланс, є необхідним для розуміння патогенезу захворювань, і, відповідно, розробки нових ефективних методів діагностики та стратегії лікування.

На сьогоднішній день основні біохімічні механізми утворення фібринових згустків та їх розчинення фібринолітичною системою є встановленими. Разом з тим, поряд із плазмовою ланкою, не менш важливу роль у функціонуванні системи гемостазу відіграє його клітинна ланка: тромбоцити, моноцити, нейтрофіли, які активно залучаються до процесів тромбоутворення та тромболізису.

Отже, взаємозв’язок плазмової та клітинної ланок гемостазу є беззаперечним, проте механізми координування та узгодження різноспрямованих процесів формування та лізису фібринових згустків

клітинами крові залишаються нез'ясованими. Дослідження цього питання стане важливим кроком на шляху кращого розуміння регулювання системи гемостазу, відкриття нових можливостей для корекції її функціональних порушень, розробки нових та вдосконалення існуючих методів діагностики.

Метою даної дисертаційної роботи є з'ясування молекулярних механізмів координування процесів тромбоутворення та фібринолізу за участі клітин крові.

В роботі використано наступні методи: методи препаративної біохімії, методи виділення клітин крові, фізико-хімічні (спектрофотометрія, турбідиметрія, електрофорез), хроматографічні, імунохімічні, методи конфокальної мікроскопії та проточної цитометрії, визначення активності ензимів за хромогенним субстратом та статистичні методи.

В результаті проведених досліджень вперше показано, що моноцити безпосередньо впливають на формування фібринового згустку, зміщуючи гемостатичний баланс процесів утворення та лізису фібринових згустків в бік тромбоутворення. Нейтрофіли з однаковою ефективністю прискорюють утворення та лізис фібринових згустків, зменшуючи загальний час існування фібринового згустку вдвічі.

Вперше з використанням методу конфокальної мікроскопії в реальному часі показано, що тромбоцити виступають центрами полімеризації фібрину та просторової організації структури фібринового згустку, що сприяє прискоренню та координуванню у просторі та часі процесів тромбоутворення і фібринолізу та обмежує розмір тромбу та час його існування.

За визначенням ензиматичної активності та методом протокової цитометрії показано, що циркулюючі в кровотоці тромбоцити не несуть на своїй поверхні Glu-плазміноген, проте здатні зв'язувати його після активації. Методами конфокальної мікроскопії та спектрофлуориметрії вперше продемонстровано, що нативні тромбоцити здатні зв'язувати тканинний активатор плазміногену, і показано, що взаємодія тканинного активатора

плазміногену з тромбоцитами здійснюється за фібрин залежним та фібрин-незалежним шляхом.

Встановлено кількість плазміну, що генерується з сорбованого на поверхні активованих тромбоцитів плазміногену за дії ендогенних (тканинного активатора і урокінази) та екзогенних (стрептокінази) активаторів.

Вперше визначено нові молекулярні механізми, за якими клітини крові координують утворення та лізис фібринових згустків. До цих механізмів відносяться:

- ендотелій-незалежний шлях активації протеїну С, за якого активація протеїну С відбувається безпосередньо на поверхні тромбоцитів, моноцитів та нейтрофілів;

- стимуляція активації плазміногену тканинним активатором плазміногену компонентами протромбінового комплексу в присутності активованих тромбоцитів, і, відповідно, підсилення генерування плазміну;

- структуризація тромбоцитами фібринового згустку, акумуляція на їх поверхні фібрину, де можуть в свою чергу зв'язуватись плазміноген і тканинний активатор плазміногену та формувати центри ініціації лізису;

- здатність тромбоцитів прискорювати фібриноліз.

Для виявлення порушень гемостатичного балансу у хворих з резистентною артеріальною гіпертензією запропоновано визначати кількісні параметри кривої оптичного поглинання утворення та лізису фібрину у безтромбоцитарній плазмі та плазмі, збагаченій тромбоцитами.

Результати щодо високого рівня плазміну, що утворюється на поверхні тромбоцитів при активації плазміногену стрептокіназою, можуть бути корисними при виборі стратегії лікування пацієнтів, інфікованих  $\beta$ -гемолітичними стрептококами, та проведенні тромболітичної терапії стрептокіназою.

Отримані результати є важливими для розуміння ролі клітин крові у координуванні утворення та розчинення тромбу, що в подальшому може бути використаним для розробки нових та вдосконалення існуючих методів

діагностики та лікування патологічних станів, пов'язаних з розвитком серцево-судинних захворювань.

**Ключові слова:** тромбоутворення, фібриноліз, тромбоцити, моноцити, нейтрофіли, плазміноген/плазмінова система, тканинний активатор плазміногену, протеїн С

## SUMMARY

Revka O.V. "Coordination of thrombus formation and fibrinolysis by blood cells" – Manuscript.

Thesis for a candidate degree in biological sciences (Doctor of Philosophy), specialty 03.00.04 "Biochemistry" – O. V. Palladin Institute of Biochemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2020.

Present PhD thesis highlights the investigation of the role of blood cells - monocytes, neutrophils, and platelets - in coordination of thrombus formation and thrombolysis.

The role of the hemostasis system in the body is to seal a ruptured blood vessel to prevent further bleeding and to dissolve blood clots that have fulfilled their function to prevent pathologic thrombus formation. Hemostasis is provided by opposite but interconnected systems of coagulation and fibrinolysis, as well as a protein C system which is involved in maintaining a balance between them. The consistent functioning of these systems ensures physiological formation and subsequent dissolution of the blood clot. Violation of the hemostatic balance causes the development of pathological conditions caused by excessive thrombosis (which lead to cardiovascular diseases - one of the leading causes of mortality in the world) or hemorrhages. Thus, investigation of the biochemical mechanisms that provide hemostasis is necessary to understand the pathogenesis of the disease and, accordingly, to develop new effective diagnostic methods and treatment strategies.

To date, the basic biochemical mechanisms of fibrin clots formation and dissolution have been established. At the same time, along with the plasma components of hemostasis, cellular component of hemostasis - platelets, monocytes and neutrophils, which make a significant contribution to the processes of thrombosis and thrombolysis - plays a significant role in its functioning.

Therefore, further study of the biochemical mechanisms of coordination of thrombus formation and thrombolysis by blood cells is crucial. Solving of these issues will be an important step towards a better understanding of the regulation of

the hemostasis system, opening new opportunities for correction of its functional disorders, improving existing diagnostic methods, and developing new ones.

Investigation of the molecular mechanisms of coordination of thrombus formation and thrombolysis by blood cells is a purpose of the present paper.

The following methods are used in the work: methods of preparative biochemistry, methods of isolation of blood cells, spectrophotometry, turbidimetry, electrophoresis, chromatographic, immunochemical methods, methods of confocal microscopy and flow cytometry, determination of enzyme activity by chromogenic substrates cleavage and statistical methods.

For the first time it has been shown that monocytes have a direct impact on the formation of a fibrin clot, shifting the hemostatic balance of the coagulation/lysis process towards thrombus formation. Neutrophils equally accelerate the formation and lysis of fibrin clots, reducing the overall lifetime of the fibrin clot by half.

Using the method of real-time confocal microscopy, it has been shown for the first time that platelets act as centers of fibrin polymerization and organization of the fibrin clot structure, which promotes the acceleration and spatiotemporal coordination of coagulation and fibrinolysis and limits the size and lifetime of thrombus.

By using flow cytometry and enzymatic activity determination methods it has been shown that platelets circulating in the bloodstream do not carry Glu-plasminogen on their surface but are able to bind it after activation. Confocal microscopy and spectrofluorimetry have demonstrated for the first time that native platelets are able to bind tissue plasminogen activator, and it has been shown that the interaction of tissue plasminogen activator with platelets is possible through fibrin-dependent and fibrin-independent mechanisms.

The amount of plasmin generated on the surface of activated platelets by the action of endogenous (tissue plasminogen activator and urokinase) and exogenous (streptokinase) activators has been established.

For the first time new molecular mechanisms by which blood cells coordinate the formation and lysis of fibrin clots have been identified. These mechanisms include:

- endothelium-independent pathway of protein C activation, in which protein C activation occurs directly on the surface of platelets, monocytes and neutrophils;
- stimulation of plasminogen activation by tissue plasminogen activator by components of the prothrombin complex in the presence of activated platelets, and, accordingly, enhancement of plasmin generation;
- structuring of fibrin clot by platelets, and accumulation of fibrin on their surface, where plasminogen and tissue plasminogen activator can be bound to form centers of lysis initiation;
- the ability of platelets to accelerate fibrinolysis.

For the evaluation of the complex effects of different platelet activities, a new method has been proposed, using platelet-rich plasma in clot waveform analysis. Investigation on platelet-rich plasma samples from patients with arterial hypertension have shown the suitability of such an approach for more realistic evaluation of the balance between procoagulant and anticoagulant processes in the plasma (including platelet-mediated) and, as a consequence, for more reliable differentiation of healthy donors and hypertension patients which should improve therapeutic approaches.

The results regarding the high level of plasmin produced on the platelet surface by streptokinase may be useful in selecting a strategy for the treatment of patients infected with  $\beta$ -hemolytic streptococci and conducting thrombolytic therapy with streptokinase.

The obtained results are important for understanding the role of blood cells in coordination of thrombus formation and dissolution, which can be used to improve existing and develop new methods for the diagnosis and treatment of pathological conditions associated with the development of cardiovascular diseases.

**Key words:** thrombus formation, fibrinolysis, platelets, monocytes, neutrophils, plasminogen/plasmin system, tissue plasminogen activator, protein C



## СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Patalakh I., Talanov S.A., **Revka O.V.**, Drobotko T.F. Activation of protein C in the in vitro thrombolysis, *Fiziol Zh.*, 2015, Vol. 61(4), pp. 78-84. *(Дисертантка брала участь у дослідженні активації протеїну C в процесі тромболізу згустків, отриманих з цільної крові, аналізі експериментальних даних, написанні та оформленні статті).*
2. Patalakh I., **Revka O.**, Drobotko T. Endothelium-independent activation of protein C in whole blood. *International journal of physiology and pathophysiology*, 2016, Vol. 7(3), pp. 1-9. *(Дисертантка брала участь у дослідженні ендотелій-незалежного шляху активації протеїну C, аналізі експериментальних даних, написанні та оформленні статті).*
3. **Revka O. V.**, Drobotko T. F., Patalakh I. I. Participation of monocytes and neutrophils in regulation of hemostatic balance. "Current problems in biochemistry": Book of articles/ NAS of Belarus, 2016, 286 p. *(Дисертантка брала участь у дослідженні впливу моноцитів та нейтрофілів на процес утворення та лізису фібринового згустку з використанням методу аналізу форми кривої згортання/лізису, отриманої для згустку плазми, аналізувала експериментальні дані, брала участь у написанні та оформленні статті).*
4. Patalakh I., **Revka O.**, Kuchmenko O., Matova O., Drobotko T., Grinenko T. Clot formation and lysis in platelet rich plasma of healthy donors and patients with resistant hypertension. *Ukr. Biochem. J.*, 2018, Vol. 90, №2, p. 67-75. *(Дисертантка брала участь у вивченні особливостей згортання збагаченої тромбоцитами плазми хворих на резистентну артеріальну гіпертензію, аналізі експериментальних даних, у написанні та оформленні статті).*
5. T. Grinenko, O. Yusova, **Revka O.**, I. Patalakh, T. Yatsenko Fibrinolysis regulation by platelets retaining plasminogen and tissue-type plasminogen activator on their surface, *Ukr.Biochem.J.*, 2019; Volume 91, Issue 6, pp. 38-48. *(Дисертантка приймала участь в отриманні тромбоцитів, Glu -*

*плазміногену та desAB-фібрину з крові людини, вивченні впливу тромбоцитів на процес лізису фібринового згустка, утвореного з desAB-фібрину, у статистичній обробці та аналізі експериментальних даних, та у написанні і оформленні статті).*

6. **Revka O.**, Goncharuk M.N. Structural and functional interaction between protein C and ceruloplasmin. “Biology: from molecule to biosphere”, Proc. Of the VIII international conference of young scientists (December 3-6, 2013, Kharkiv, Ukraine), 2013, p. 334.

7. Patalakh I., **Revka O.**, Drobotko T. Protein C activation in cell-associated fibrin clots promotes fibrinolysis. Ukr. Biochem. J., 2014, Vol. 86, № 5 (suppl.1)

8. **Revka O.** Influence of blood cells on coagulation and fibrinolysis of fibrin clot. Role of protein C in this processes // Actual problems of biochemistry and biotechnology – 2016. Book of abstracts // Kyiv, 2016, 72 p.

9. **Revka O.**, Patalakh I., Grinenko T. Platelets influence coagulation and fibrin lysis thereby regulating hemostatic balance. Visnyk of the Lviv university. Series biology., 2016, Vol. 73., p. 257.

10. **Revka O.**, Patalakh I., Kuchmenko O., Matova O., Drobotko T., Grinenko T. Clot formation and lysis in platelet rich plasma of healthy donors and patients with resistant hypertension. Book of abstracts RECOOP 13th annual scientific conference/ Zagreb, Croatia, 2018, p.56.

11. **Revka O.** Biochemical mechanisms of fibrin clot formation and subsequent lysis regulation by platelets. Ukr. Biochem. J., 2018, Vol. 90, №3, p.130.

12. **Revka O.**, Patalakh I., Grinenko T. Platelets in coordination of coagulation and fibrinolysis. Ukr. Biochem. J., 2018., Vol. 90, special issue, p. 159.

13. **Revka O.**, I. Patalakh, T. Misztal, N. Marcińczyk, A. Gołaszewska, T. Grinenko Interplay of platelet procoagulant and profibrinolytic activity in thrombus formation and lysis. Proceedings of Young scientists’ conference “Modern aspects of Biochemistry and Biotechnology – 2019”, Ukr. Biochem. J., 2019, Vol. 91, №2, P. 77-78.

14. **Revka O.**, I. Patalakh, T. Misztal, N. Marcińczyk, A. Gołaszewska, T. Grinenko Platelets as coordination centers of fibrin formation, structuring of fibrin network and initiation of fibrinolysis. “Youth and Progress of Biology”: XV International scientific conference for students and PhD students, dedicated to the 135th anniversary of J. Parnas (Lviv, April 9–11, 2019): abstracts. – Lviv, 2019. – P. 47.

15. Patalakh I., **Revka O.**, Drobotko T., Grinenko T. Platelets provide spatiotemporal coordination between coagulation and fibrinolysis in a developing fibrin clot. *Medical and Clinical Chemistry* (2019), Vol. 21, 3(80), P. 122-123 (Proceedings of the XII Ukrainian Biochemical Congress, Ternopil, Ukraine).

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	14
ВСТУП.....	15
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	22
1.1. Система згортання крові.....	22
1.2. Система фібринолізу.....	25
1.2.1. Загальна характеристика системи фібринолізу, молекулярний механізм фібринолізу.....	25
1.2.2. Плазміноген/плазмін, його структура та функції.....	29
1.2.3 Активатори плазміногену.....	32
1.3. Спільні ланки систем згортання крові та фібринолізу.....	35
1.4. Система протеїну С.....	36
1.5. Клітинна ланка гемостазу.....	43
1.5.1 Роль лейкоцитів у системі гемостазу.....	43
1.5.2. Тромбоцити та їх роль у системі гемостазу.....	48
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	63
2.1. Реактиви та матеріали.....	63
2.2. Виділення протеїнів.....	63
2.3. Методи електрофорезу в поліакриламідному гелі.....	64
2.3.1. Електрофорез в поліакриламідному гелі за присутності додецилсульфату натрію.....	64
2.3.2. Електрофорез в поліакриламідному гелі за низьких значень рН.....	65
2.4. Виділення клітин крові.....	65
2.5. Визначення активності протеїну С.....	67
2.6. Тромболізіс кров'яного згустку.....	68
2.7. Дослідження впливу клітин на процеси фібриноутворення і фібринолізу....	69
2.8. Вивчення впливу тромбоцитів на процес лізису desAB-фібрину.....	71

2.9. Вивчення активації Glu-плазміногену в присутності інтактних та тромбін-активованих тромбоцитів .....	72
2.10. Вплив протейнів протромбінового комплексу на процес активації Glu-плазміногену в присутності тромбоцитів .....	72
2.11. Вивчення зв'язування FITC-кон'югованого Glu-плазміногену з тромбоцитами.....	73
2.12. Дослідження зв'язування t-РА з тромбоцитами.....	73
2.13. Вивчення зв'язування стрептокінази з тромбоцитами.....	74
2.14 Дослідження участі тромбоцитів в формуванні та лізисі фібринового згустку з використанням конфокальної мікроскопії.....	74
2.15. Аналіз параметрів кривої оптичного поглинання процесу утворення та лізису фібрину безтромбоцитарної і збагаченої тромбоцитами плазми у хворих з резистентною артеріальною гіпертензією .....	76
<b>РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ .....</b>	<b>78</b>
3.1. Модифікуючий вплив моноцитів, нейтрофілів та тромбоцитів на швидкість процесів утворення та лізису фібринового згустку <i>in vitro</i> .....	78
3.2 Ендотелій-незалежна активація протейну С як один з механізмів регуляції процесів тромбоутворення та фібринолізу клітинами крові .....	87
3.3 Дослідження участі тромбоцитів в формуванні та лізисі фібринового згустку з використанням конфокальної мікроскопії.....	100
3.4 Дослідження молекулярних механізмів координування тромбоцитами процесів утворення та лізису фібринового згустку .....	113
3.5 Аналіз параметрів кривої оптичного поглинання процесу утворення та лізису фібрину безтромбоцитарної і збагаченої тромбоцитами плазми у хворих з резистентною артеріальною гіпертензією .....	127
<b>УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ.....</b>	<b>136</b>
<b>ВИСНОВКИ .....</b>	<b>138</b>
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....</b>	<b>140</b>

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ**

TF	тканинний фактор
TFPI	інгібітор шляху тканинного фактору
t-PA	тканинний активатор плазміногену
u-PA	активатор плазміногену урокіназного типу
PAI-1	інгібітор активатора плазміногену
TAFI	інгібітор фібринолізу, що активується тромбіном
TM	тромбомодулін
PC	протеїн С
APC	активований протеїн С
EPSCR	ендотеліальний рецептор протеїну С
DAMPs	молекулярні фрагменти, пов'язані з пошкодженнями
NETs	нейтрофільні позаклітинні пастки
PAR	рецептор, що активується протеазою
PRP	плазма, збагачена тромбоцитами
PFP	плазма, вільна від тромбоцитів
TRAP	пептид, що активує рецептор тромбіну
DON	6-діазо-5-оксо-L-норлейцин
AUC	площа під кривою
ACD	acid citrate dextrose
FITC	fluorescein isothiocyanate

## ВСТУП

**Актуальність теми дослідження.** Система гемостазу забезпечує збереження крові у рідкому стані, а в разі необхідності – зупинку кровотечі. До її складу входять протилежно спрямовані взаємопов'язані системи згортання крові та фібринолізу, а також система протеїну С (РС), яка бере участь у підтримці балансу між ними [Луговской, 2013; Versteeg, 2015]. Надмірна активація системи згортання крові призводить до патологічного тромбоутворення, що супроводжується розвитком серцево-судинних захворювань – однієї з основних причин смертності у світі, тоді як надмірна активація системи фібринолізу пов'язана з ризиком розвитку геморагій.

Процес утворення та лізису фібринових згустків контролюється численними взаємодіями плазмових компонентів систем згортання крові та фібринолізу. Каскад послідовних реакцій активації факторів згортання крові спрямований на генерування тромбіну і перетворення розчинного фібриногену на нерозчинний полімерний фібрин, який формує каркас тромбу [Palta, 2014; O'Donnell, 2019]. Фібринолітична система відповідає за розчинення фібринових згустків. Фібрин є субстратом ключового ензиму системи фібринолізу плазміну та одночасно кофактором реакції активації плазміногену тканинним активатором плазміногену (t-PA) [Hudson, 2017].

На сьогоднішній день основні молекулярні механізми утворення фібринових згустків та їх деградації фібринолітичною системою встановлено. Разом з тим, не менш важливу роль у функціонуванні системи гемостазу відіграє його клітинна ланка, зокрема, тромбоцити, моноцити і нейтрофіли, які активно залучаються до процесів тромбоутворення та тромболізису.

Так, активація тромбоцитів призводить до утворення тромбоцитарних агрегатів за участі фібриногену. На поверхні активованих тромбоцитів акумулюються теназний та протромбіназний комплекси, які відповідають за генерування тромбіну [Podopletova, 2016; Agbani, 2015]. Разом з тим, тромбоцити, що експонують фосфатидилсерин, здатні зв'язувати на

плазматичній мембрані плазміноген [Whyte, 2015] та сприяти активації одноланцюгової урокінази та плазміногену [Baeten, 2010]; ретракція згустку, яка забезпечується тромбоцитами, також впливає на процес фібринолізу [Whyte, 2017]. Таким чином, тромбоцити є безпосередніми учасниками гемостазу.

Лейкоцити також залучаються до регуляції тромбоутворення та тромболізу [Swystun, 2016]. Моноцити та нейтрофіли секретують тканинний фактор, який запускає зовнішній каскад згортання крові [Chen, 2013; Nakamura, 2004]. Еластаза нейтрофілів підсилює їх прокоагулянтну дію, пригнічуючи інгібітор шляху тканинного фактору та антикоагулянти антитромбін і активований протеїн С [Toshiaki, 2014]. Нейтрофіли здатні вивільнювати та утримувати на своїй поверхні маркери, асоційовані з ядерним пошкодженням (до яких відносять гістони, зовнішньоклітинні пастки нейтрофілів та ін.) [Chow, 2010], які концентрують на собі прокоагулянтні ефектори та активують контактний шлях згортання крові. Моноцити і нейтрофіли регулюють активність тромбоцитів та ендотеліальних клітин [Bruhl, 2012; Darbousset, 2012]. Водночас лейкоцити експресують урокіназу, її рецептор uPAR та рецептори плазміногену, тобто здатні модулювати фібриноліз [Kunigal, 2003; Das, 2010].

Отже, взаємозв'язок плазмової та клітинної ланок гемостазу є беззаперечним, проте механізми координування та узгодження різноспрямованих процесів формування та лізису фібринових згустків клітинами крові залишаються нез'ясованими. Тому дослідження цього питання має бути важливим кроком на шляху кращого розуміння регулювання системи гемостазу, відкриття нових можливостей для корекції її функціональних порушень, розробки нових та вдосконалення існуючих методів діагностики.

**Об'єкт дослідження.** Об'єктом дослідження є клітини крові (тромбоцити, моноцити та нейтрофіли) і протеїни систем згортання крові та фібринолізу.



**Предмет дослідження.** Предметом дослідження є процеси утворення та лізису фібринового згустку за участі тромбоцитів, моноцитів та нейтрофілів.

**Методи дослідження.** Методи препаративної біохімії, методи виділення клітин крові, фізико-хімічні (спектрофотометрія, турбідиметрія, електрофорез), хроматографічні, імунохімічні, методи конфокальної мікроскопії та проточної цитометрії, визначення активності ензимів за хромогенним субстратом та статистичні методи.

**Мета та задачі дослідження.** З'ясувати молекулярні механізми координування процесів тромбоутворення та фібринолізу за участі клітин крові.

Відповідно до мети було поставлено наступні завдання:

1. Дослідити модифікуючий вплив клітин крові (тромбоцитів, моноцитів, нейтрофілів) на швидкість процесів тромбоутворення та фібринолізу в плазмі.
2. Вивчити можливість активації протеїну С на поверхні клітин крові та роль утвореного активного протеїну С в регуляції процесів утворення і лізису фібринових згустків.
3. Визначити участь тромбоцитів в утворенні та лізисі фібринових згустків з використанням конфокальної мікроскопії.
4. Дослідити взаємодію плазміногену та тканинного активатора плазміногену з нативними і агоніст-індукованими тромбоцитами, вивчити кінетику активації плазміногену різними активаторами на їх поверхні та визначити вплив тромбоцитів на швидкість гідролізу фібрину.
5. Вивчити модифікуючий вплив протромбінового комплексу на швидкість активації плазміногену тканинним активатором на поверхні тромбоцитів.
6. Проаналізувати зміни параметрів кривої оптичного поглинання процесу утворення та лізису фібринового згустку в безтромбоцитній та збагаченій тромбоцитами плазмі у хворих з резистентною артеріальною гіпертензією.

**Наукова новизна одержаних результатів.** В досліджах *in vitro* вперше показано, що моноцити збільшують швидкість формування фібринового згустку, зміщуючи гемостатичний баланс процесів згортання/лізису фібринових згустків в бік тромбоутворення. Нейтрофіли з однаковою ефективністю прискорюють утворення та лізис фібринових згустків, зменшуючи загальний час існування фібринового згустку вдвічі.

Вперше з використанням методу конфокальної мікроскопії в реальному часі показано, що тромбоцити виступають центрами полімеризації фібрину та просторової організації структури фібринового згустку, що сприяє прискоренню та координуванню у просторі та часі процесів утворення фібрину і фібринолізу та обмежує розмір тромбу та час його існування.

Методами конфокальної мікроскопії та спектрофлуориметрії показано, що нативні тромбоцити здатні зв'язувати тканинний активатор плазміногену. Вперше встановлено, що взаємодія тканинного активатора плазміногену з тромбоцитами здійснюється фібрин-залежним та фібрин-незалежним шляхом.

Встановлено кількість плазміну, що генерується з сорбованого на поверхні активованих тромбоцитів плазміногену за дії ендогенних (тканинного активатора і урокінази) та екзогенних (стрептокінази) активаторів.

Вперше визначено окремі молекулярні механізми, за якими клітини крові координують утворення та лізис фібринових згустків, а саме:

- ендотелій-незалежний шлях активації протеїну С, за якого активація протеїну С відбувається безпосередньо на поверхні тромбоцитів, моноцитів та нейтрофілів;

- ефекторна дія компонентів протромбінового комплексу на активацію плазміногену тканинним активатором в присутності активованих тромбоцитів;

- організація структури фібринового згустку шляхом утворення агрегатів тромбоцитів, вбудованих у фібриновий каркас; акумулювання на їх поверхні фібрину та фібрин-асоційованих плазміногену і тканинного активатора плазміногену, з формуванням центрів ініціації фібринолізу.

**Практичне значення роботи.** Визначення кількісних параметрів кривої оптичного поглинання процесу утворення та лізису фібрину в плазмі, збагаченій тромбоцитами, у порівнянні з безклітинною плазмою дає змогу оцінити баланс між прокоагулянтною та антикоагулянтною дією тромбоцитів і може бути інформативним для скринінгової оцінки гемостатичних порушень у хворих з резистентною артеріальною гіпертензією.

Отримані результати щодо високого рівня плазміну, що утворюється на поверхні тромбоцитів при активації плазміногену стрептокіназою, можуть бути корисними при виборі стратегії лікування пацієнтів, інфікованих  $\beta$ -гемолітичними стрептококами, та проведенні тромболітичної терапії стрептокіназою.

**Особистий внесок здобувача.** Представлена робота є завершеним дослідженням, що виконане автором відповідно до індивідуального навчального плану аспіранта протягом 2015-2019 років. Здобувачем самостійно отримано необхідні для дослідження протеїнові препарати, зокрема, плазміноген та desAB-фібрин. Основна частина досліджень проведена разом з с.н.с. відділу хімії та біохімії ферментів к.б.н. Паталах І. І. Дослідження кінетики активації та зв'язування компонентів фібринолізу на поверхні тромбоцитів проведено разом з с.н.с. відділу хімії та біохімії ферментів к.б.н. Юсовою О.І.. Дослідження з використанням методу конфокальної мікроскопії проведено на базі відділу фізичної хімії Медичного університету Білостоку, м. Білосток, Польща, в рамках гранту FEBS Collaborative Developmental Scholarship. Постановка наукових задач, аналіз та обговорення отриманих результатів проведено спільно з с.н.с. відділу хімії та біохімії ферментів к.б.н. Паталах І. І. та науковим керівником завідуючим відділом хімії та біохімії ферментів д.б.н. Гриненко Т. В.. Друковані праці підготовлено за безпосередньої участі автора.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертація відповідає основному плану науково-дослідних робіт відділу хімії та біохімії ферментів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України: тема

«Механізми регуляції плазміноген/плазміном міжмолекулярних та міжклітинних взаємодій в системі гемостазу за норми та патології» (ДР№ 0113U003203, 01.01.2013 – 31.12.2017); тема «Механізми регуляції внутрішньоклітинних сигнальних мереж, міжклітинних та міжмолекулярних взаємодій» (ДР№ 0112U002624, 01.01.2012 – 31.12.2016); тема «Молекулярні та клітинні механізми реалізації дії плазміноген/плазмінової системи за норми та патології» (ДР№0118U000377, 01.01.2018 – 31.12.2022); тема «Біохімічні механізми контролю системних міжклітинних взаємодій, регулювання сигнальних мереж та клітинних функцій за умов норми та патологічних станів» (ДР№ 0117U004344, 01.01.2017 – 31.12.2021). Частина роботи було виконано в рамках гранту FEBS Collaborative Developmental Scholarship.

**Апробація результатів дисертації.** Матеріали дисертації були представлені на VIII Міжнародній конференції молодих вчених «Від молекули до біосфери» (Харків, Україна, 2013), Конференції-конкурсі молодих учених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології» (Київ, Україна, 2016), Міжнародній конференції «Актуальні проблеми сучасної біохімії» (Львів, Україна, 2016, відмічено премією), Bridges in Life Sciences, RECOOP 13th Annual Scientific Conference (Загреб, Хорватія, 2018), Конференції-конкурсі молодих учених «Modern aspects of Biochemistry and Biotechnology» (Київ, Україна, у 2018 та 2019 роках, відмічено премією), FEBS 3+ Meeting – XIth Parnas Conference – Young Scientist Forum «Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine» (Київ, Україна, 2018), «Youth and progress of biology», XV International scientific conference for students and PhD students, dedicated to the 135th anniversary of J. Parnas (Львів, Україна, 2019, відмічено премією), XII Українському біохімічному конгресі (Тернопіль, Україна, 2019), а також доповідались на наукових семінарах Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України та відділу хімії і біохімії ферментів.

**Публікації.** За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 5 статей в українських та закордонних фахових виданнях, 10 тез доповідей у збірках наукових конференцій.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертаційна робота складається з анотації, переліку опублікованих робіт за темою дисертаційної роботи, вступу, огляду літератури (1 розділ), експериментальної частини (2 розділи), заключення, висновків та списку джерел літератури (162). Робота представлена на 157 сторінках, містить 39 рисунків та 1 таблицю.

## РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1. Система згортання крові.

#### 1.1.1. Фази згортання крові

Відповідно до сучасних уявлень, у процесі згортання крові можна виділити три окремі фази: 1) фаза ініціації, під час якої генеруються низькі концентрації активних факторів згортання крові; 2) фаза ампліфікації, яка характеризується стрімким підвищенням концентрації факторів згортання крові; та 3) фаза пропагації (поширення), за якої відбувається зв'язування факторів згортання крові з високопрокоагулянтними мембранами активованих тромбоцитів та формування фібринового згустку (рис 1.1). Разом з тим, хоча дана клітинна модель згортання крові набуває все більшої популярності, не втрачає актуальності і класичний поділ на зовнішній та внутрішній шляхи згортання крові [Versteeg, 2013].

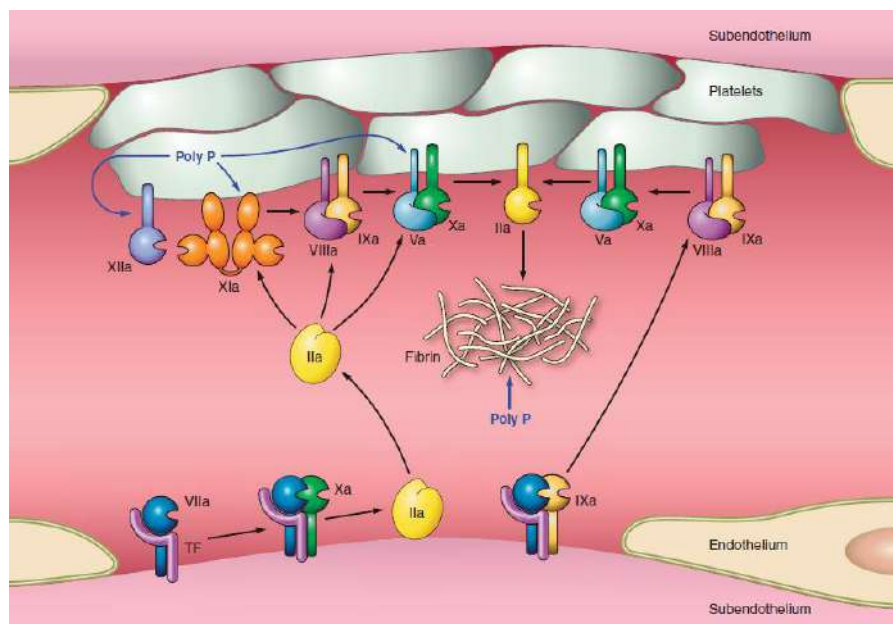


Рисунок 1.1. Схема каскаду згортання крові [Versteeg, 2013]

**Фаза ініціації.** Фаза ініціації, що відповідає зовнішньому шляху згортання крові, запускається під час порушення цілісності судинної стінки, коли з кровотоком контактують такі субендотеліальні структури як колаген, гладеньком'язові клітини, фібробласти тощо [Монгоє, 2006]. Внаслідок цього

також експонується ключовий ініціатор каскаду згортання крові - тканинний фактор (TF), який, в свою чергу, зв'язує фактор згортання крові VII. В ролі кофактора для фактора згортання крові VII, TF сприяє його протеолізу та активації. В той же час за фізіологічних концентрацій активований фактор згортання крові VII без TF має незначну активність, через наявність унікальної послідовності, яка зберігає його у конформації, подібній до зимогену. Таким чином, за фізіологічних умов активність фактора згортання крові VII значно залежить від TF [Petrovan, 2001].

Надалі, комплекс TF та активованого фактора згортання крові VII активує наступні в каскаді фактори згортання крові IX та X. Це дозволяє активованому фактору згортання крові X асоціювати з його кофактором, активованим фактором V, та сформувати так званий протромбіназний комплекс, який перетворює протромбін (фактор згортання крові II) на тромбін – кінцевий фактор каскаду згортання крові. Окрім того, активований фактор згортання крові X може дисоціювати від TF-експресуючих клітин та утворювати протромбіназний комплекс на клітинних мембранах сусідніх клітин. Разом з тим, наявність у плазмі інгібіторів протеаз, зокрема, інгібітора шляху тканинного фактору (TFPI) типу Кунітца та антитромбіну – обмежує подібну дифузію. В той же час активований фактор згортання крові IX не є мішенню TFPI і, таким чином, може дифундувати більш легко до інших клітинних поверхонь та брати участь у фазі пропагації [Versteeg, 2013].

*Фаза ампліфікації.* На цьому етапі повільно зростає концентрація тромбіну та активуються тромбоцити, які адгезували до сайту пошкодження судини. Одночасно відбувається активація тромбіном фактора згортання крові V, що сприяє підвищенню активності протромбіназного комплексу, та перетворення тромбіном фактора згортання крові VIII на його активну форму, який в свою чергу виступає кофактором для активованого фактора згортання крові IX на поверхні активованих тромбоцитів для генерування активованого фактора згортання крові X. Окрім того, тромбін також активує фактор згортання крові XI.

*Фаза пропagaції.* В той час як, згідно сучасних уявлень, фаза ініціації запускається на поверхнях, які несуть на собі тканинний фактор, фаза пропagaції підтримується на поверхнях, що містять прокоагулянтні фосфоліпіди. Зокрема, значну роль у цьому відіграють активовані тромбоцити.

Активований фактор XI перетворює фактор IX на його активну форму, що в свою чергу асоціює з активованим тромбіном фактором VIII. Нестача факторів VIII та IX призводить до серйозних порушень, зокрема, гемофілії A та B відповідно, що підкреслює важливе значення даних факторів для нормального функціонування системи гемостазу. На фосфатидилсерин-експонуючих поверхнях клітин теназний комплекс, який складається з факторів IXa/VIIIa, каталізує перетворення фактору X на його активну форму Xa, після чого той в комплексі к кофактором Va продукує у значній кількості тромбін для утворення фібрил фібрину.

Фінальним етапом каскаду згортання крові є перетворення фібриногену на фібрин, необхідне для утворення тромбу та зупинки кровотечі. Воно відбувається у дві стадії: ензиматичну та неензиматичну. Процес полімеризації фібрину запускається, коли на ензиматичній стадії спочатку відбувається каталізоване тромбіном відщеплення двох фібринопептидів A від N-кінцевих частин A $\alpha$ -ланцюгів фібриногену з утворенням так званого desA-фібрину. Така трансформація викликає структурні зміни у молекулі та експонування нових A-сайтів полімеризації. Одночасно від N-кінцевих частин B $\beta$ -ланцюгів фібриногену відбувається відщеплення фібринопептидів B та експонування B-сайтів полімеризації, що прискорює швидкість полімеризації та галуження фібрил. Під час неензиматичної стадії, відбувається спонтанне збирання утвореного мономерного фібрину з формуванням олігомерів фібрину, які в свою чергу формують дволанцюгові протофібрили. Надалі, при агрегації протофібрил відбувається галуження фібрил та утворення тривимірної структури згустку [Weisel, 2017].

Нарешті, останнім кроком є каталіз фактором XIIIa, що є тромбін-активованою трансглутамінозою, формування поперечних ковалентних зв'язків



між суміжними фібрилами, в результаті чого відбувається формування прошитого, еластичного фібринового згустку [Tanaka, 2009].

## 1.2. Система фібринолізу

### 1.2.1. Загальна характеристика системи фібринолізу, молекулярний механізм фібринолізу.

Головною фізіологічною функцією фібринолітичної системи є розщеплення утвореного нерозчинного фібрину та підтримка гемостатичного балансу крові.

Одним з головних компонентів системи фібринолізу є протеаза плазмін (ЕС 3.4.21.7), яка виконує функцію розщеплення фібрину. Плазмін специфічно розщеплює у протеїнах пептидні зв'язки, сформовані карбоксильними групами L-лізину та L-аргініну. Окрім фібрину, активний плазмін також здатен розщеплювати фактори згортання крові V, VIII та X, активувати деякі зимогени (включаючи активатори плазміногену), а також матриксні металопротеїнази. Зв'язування плазміногену з фібрином та клітинними рецепторами через лізин-зв'язуючі сайти у його кринглових доменах підсилює активацію плазміногену до плазміну, а також захищає утворений зв'язаний плазмін від інактивації  $\alpha_2$ -антиплазміном. Оскільки плазміноген локалізується на поверхні клітин, що виконують різноманітні біологічні функції, плазмін володіє широким спектром дії протеолітичної активності. Таким чином, плазміноген/плазмінова система залучена до численних фізіологічних та патологічних процесів, включаючи тромболізис, деградацію екстрацелюлярного матриксу, ембріогенез, міграцію клітин, ремоделювання тканин, загоєння ран, ангіогенез, процеси запалення, онкогенез та процеси метастазування [Longstaff, 2015].

Фібрин не лише відіграє роль субстрату для плазміну. Так, при зв'язуванні з фібрином плазміноген здатен набувати більш відкритої конформації, яка є більш придатною для активації, і саме фібрин захищає утворений плазмін від інгібування. Формування фібрину ініціює активацію

плазміногену його активаторами: тканинним активатором плазміногену (t-PA) (ЕС 3.4.21.68) та урокіназою (u-PA) (3.4.21.73), що забезпечує ефективне генерування плазміну та селективне розщеплення фібринового згустку на розчинні фрагменти. Найбільше ефект фібрину виявляється за активації плазміногену t-PA, який, подібно до плазміногену, має високу афінність до фібрину. При їх колокалізації на поверхні фібрину швидкість активації плазміногену підвищується як мінімум на 3 порядки. Окрім того, утворений плазмін в процесі лізису фібрину утворює все більшу кількість С-кінцевих лізинів, які можуть ставати новими сайтами зв'язування для плазміногену та t-PA, що призводить до значного зростання їх концентрації на фібрині. В той же час, активація плазміногену урокіназою є незалежною від фібрину та радше відбувається на поверхні клітин.

Протеїнази фібринолітичної системи контролюються інгібіторами, зокрема, інгібіторами активаторів плазміногену PAI-1 та PAI-2, що впливають на активність t-PA та урокінази;  $\alpha$ 2-антиплазміном та  $\alpha$ 2-макроглобуліном, які регулюють активність плазміну; а також інгібітором фібринолізу, що активується тромбіном (TAFI), що регулює швидкість профібринолітичного процесу, будучи однією із ланок, що пов'язують тромбоутворення та фібриноліз.

Процес взаємодії плазміногену та тканинного активатора плазміногену з полімерним фібрином та ініціація його лізису є послідовним та чітко регульованим процесом, і роль фібрину як матриці для зв'язування і субстрату, відображає два ключові етапи фібринолізу: генерування плазміну та наступну деградацію фібрину.

Молекула фібриногену є димером, в якому кожна субодиниця складається з трьох поліпептидних ланцюгів, які формують окремі структурні регіони: центральний E-домен, що складається з N-кінцевих ділянок ланцюгів, та два симетричні дистальні D-домени (рис. 1.2). Кожний поліпептидний ланцюг фібриногену містить 104 залишки лізину, але інтактний фібрин не має С-кінцевих лізинів [Medved, 2003]. Така структура має лише слабку афінність

до Glu-плазміногену, з  $K_d$  в діапазоні приблизно  $10^{-5}$  [Hoylaerts, 1982; Lucas, 1983; Longstaff, 2008].

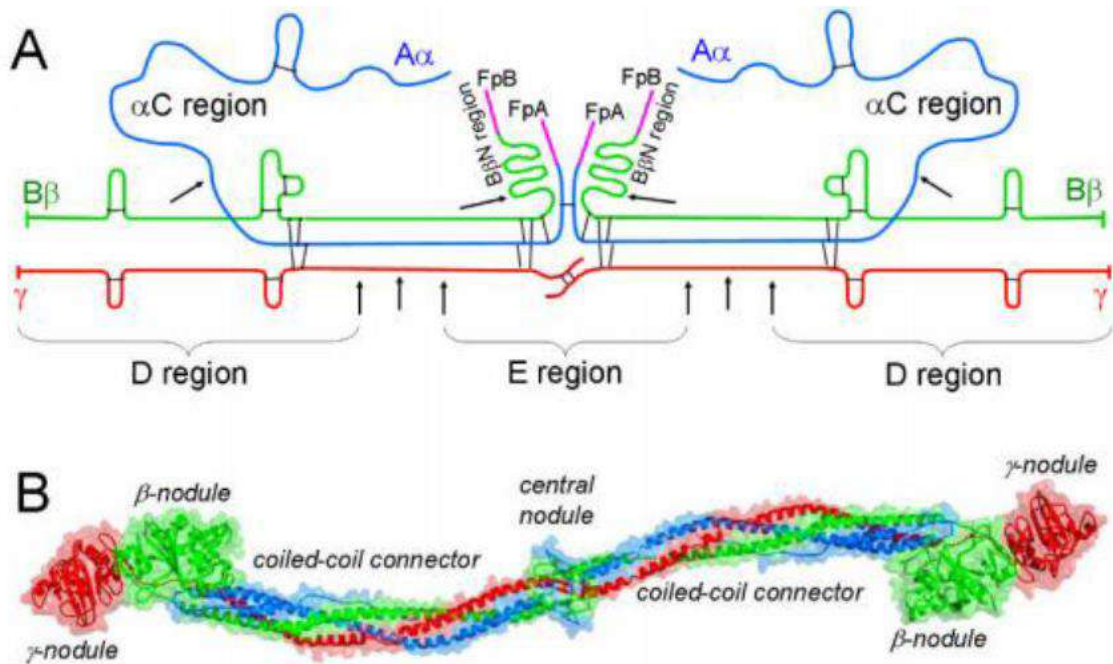


Рисунок 1.2. Модель структури молекули фібриногену. А. Доменна організація: FpA, FpB – N-кінцеві фібринопептиди;  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  – поліпептидні ланцюги. В. Просторова модель молекули фібриногену, побудована на основі результатів рентгеноструктурного аналізу [Doolittle, 2003].

Важливими є послідовності  $\alpha$ 148-160 (крингл-залежний зв'язуючий сайт для плазміногену), та  $\gamma$ 312-324 (як зв'язуючий сайт для фінгер-домену тканинного активатора плазміногену).  $\alpha$ C-домен також включає в себе лізин-залежні (проте різні) сайти зв'язування для t-PA та плазміногену, що мають досить високу афінність ( $K_d \sim 16-33$  нМ), хоча цей регіон відщеплюється плазміном на ранніх етапах фібринолізу. Окрім того, існують також дані про зв'язування t-PA з продуктами деградації фібрину, DDE-комплексами, що містять 8 C-кінцевих лізинів [Stewart, 2000]. Також t-PA та плазміноген здатні зв'язуватись з іншими протеїновими агрегатами [Maas, 2007; Gebbink, 2011].

Як вже зазначалось, при деградації фібрину плазміном його  $\alpha$ C-домени є першими, котрі відщеплюються, після чого відщеплюється N-кінцевий пептид

$\beta$ -ланцюга (в основному через сайт Arg42), що далі супроводжується розщепленням спірального конектора E- та D-доменів ( $\alpha$ Lys81- $\beta$ Lys122- $\gamma$ Lys59 або  $\alpha$ Arg104- $\beta$ Lys133- $\gamma$ Lys63). Дослідження свідчать, що ефективне розчинення фібринової сітки потребує розщеплення лише приблизно 25% E-D-зв'язків, а 50% фібрин-мономерів залишається інтактними. Всі три поліпептидні ланцюги потрійної спіральної структури фібрин-мономеру повинні бути розщеплені через той самий перетин обох дотичних мономерів у межах однієї протофібрили та у всіх суміжних протофібрилах всередині волокна фібрину [Kirschbaum, 1990; Walker 1999].

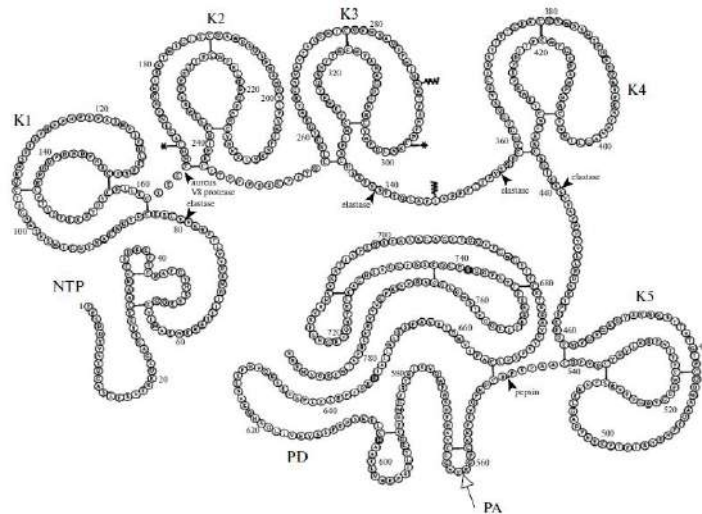
Низький відсоток розщеплених E-D зв'язків при розчиненні дозволяє припустити, що розщеплення фібринових волокон скоріш відбувається саме за рахунок кластерування молекул плазміну у певних точках фібрину. Свідченням переважно поперечного розщеплення фібрил є також отримані за допомогою атомно-силового мікроскопу зображення фібрину в процесі лізису [Blinc, 2000]. Кластеризація ензиму оптимізує процес лізису, але при занадто високій концентрації чинить негативний вплив на кінетику дії ензиму, що підтверджується спостереженнями, згідно яких низькі концентрації аналога лізину –  $\epsilon$ -амінокапронової кислоти - можуть пришвидшити розщеплення фібрину плазміном за рахунок деякого зменшення кластеризації [Varju, 2014].

Формування високих концентрацій плазміну в плазмі за умови дефіциту інгібіторів фібринолізу також може призводити до деградації фібриногену, факторів згортання крові V, VIII, та X, призводячи таким чином до серйозних дефектів системи згортання крові та неконтрольованих кровотеч. І навпаки, у випадку недостатньої експресії активаторів плазміногену чи високого рівня їх інгібіторів може виникати дефіцит плазміну, внаслідок чого збільшується ризик оклюзії судини тромбом, та, як наслідок, інфаркту, інсульту, та інших тромбоемболічних патологій.

### 1.2.2. Плазміноген/плазмін, його структура та функції.

Як вже зазначалось, центральним компонентом системи фібринолізу є серинова протеаза плазмін, попередником якої є плазміноген. Плазмін являє собою трипсин-подібний ензим з широкою специфічністю, який розщеплює пептидні зв'язки з С-кінця амінокислотних залишків лізину та аргініну. Плазміноген являє собою одноланцюговий протеїн з 791 амінокислот (рис. 1.3); його концентрація у крові складає приблизно 2 мкМ. Структурні особливості плазміногену регулюють його зв'язування, активацію та ензиматичну активність [Hudson, 2017].

За ступенем глікозилювання виділяють дві форми плазміногену. Форма I містить N-глікозильний залишок у положенні N289 та O-зв'язаний олігосахарид у положенні T346, і складає приблизно 40% усього циркулюючого плазміногену. Форма II має лише O-зв'язаний олігосахарид у положенні T346 та складає, відповідно, 60% усього плазміногену. Наявність другого глікозильного залишку змінює розташування K3, внаслідок чого зменшується спорідненість форми I до фібрину, антиплазміну та клітинних рецепторів, і водночас полегшується її активація до плазміну фізіологічними активаторами. Подальші дослідження дозволили припустити, що частина плазміногену форми II також може містити другий O-глікозильний залишок у положенні S248 чи S339. Глікозилювання відіграє вирішальну роль у регуляції зв'язування плазмін(оген)у до певних типів клітин, та меншу роль – у активації плазміногену на фібрині [Takada, 1985].



*Рисунок 1.3. Структура молекули Glu-плазміногену. PD, протеазний домен плазміну (залишки Val562-Asn791); K1-K5, кринглові домени; NTP, N-кінцевий пептид (залишки 1-77); W – сайти глікозилування; великою стрілкою позначено зв'язок Arg561-Val562, який розщеплюється активаторами плазміногену; \* - залишки цистеїну, що утворюють дисульфідний зв'язок між K2 та K3; чорним позначено амінокислотні залишки, які формують активний сайт ензиму: H603, D646, S741 [Aisina, 2014]*

Структурно у Glu-плазміногені виділяють N-кінцевий Pap – домен (залишки 1-77), 5 кринглових доменів (залишки 78-542), а також серин-протеїназний домен (залишки 562-791). Кринглові домени 1, 2, 4 та 5 містять DXD/E мотив для зв'язування C-кінцевих залишків лізину [Castellino, 2005; Płow, 2012]. У кринглі 3, мотив мутував до DXK, і зв'язування з лізиновими залишками нівелювалось [Burgin, 1999]. У закритій конформації для зв'язування є доступним лише перший крингл, що дозволяє припустити, що саме цей домен бере участь в ініціації зв'язування Glu-плазміногену з його лігандами [Law, 2012].

N-кінцевий домен відіграє важливу роль у регуляції активації та активності плазміну. Так звана Glu-форма плазміногену має закрити конформацію, де домени упаковано у формі правозакрученої спіралі, у якій N-кінцевий домен зв'язаний з кринглом 5; така компактна конформація має

розміри 9 нм x 6 нм, радіус гірації 3.1-3.9 нм. В той же час, плазміноген здатен набувати і так званої відкритої конформації U-подібної форми, з розмірами 14 нм на 7 нм, та радіусом гірації 5.0-5.6 нм. Нативно між двома конформаціями існує певний стан рівноваги, але відкрита конформація може бути стабілізована або через відщеплення N-кінцевого домену плазміном у залишку Lys77 (так званий Lys-плазміноген), або через зв'язування лізинових залишків чи його аналогів з крингловими доменами 4/5. Цікаво, що Lys77 у закритій конформації є екранованим та недоступним для плазміну, тож до відщеплення N-кінцевого домену також мають відбутись певні конформаційні перебудови [Hudson, 2017; Law, 2012].

Активатори плазміногену розщеплюють пептидний зв'язок між Arg560 та Val561 у C-кінцевому регіоні плазміногену, внаслідок чого формується каталітична тріада His603, Asp646, та Ser741 у серин-протеазному домені. Кринглові домени з'єднані з серин-протеїназним доменом послідовністю, що містить активаційну петлю з дев'яти амінокислотних залишків. В проензимі нативна конформація забезпечує недоступність активаційної петлі. Розкооперація внутрішньомолекулярних взаємодій призводить до експонування даної структури [Law, 2012]. Активаційна петля має шпилькоподібну структуру, яка підтримується двома дисульфідними зв'язками, що робить її стерично оптимальним субстратом для фізіологічних активаторів плазміногену. Внаслідок активації плазміногену формується дволанцюгова молекула плазміну, чия структура стабілізована дисульфідними зв'язками [Saksela, 1985]. Легкий ланцюг плазміну (25 кДА) містить каталітичний сайт, в той час як важкий ланцюг (60 кДА) містить кринглові домени. Зв'язок R560-V561 екранований від протеолізу конектором між кринглами 3 та 4, і T346 O-зв'язаним олігосахаридом у закритій конформації плазміногену [Law, 2012]. Відкрита конформація має в 3-50 разів більшу швидкість активації, що дає змогу припустити, що екранування зв'язку Arg560-Val561 в цій конформації значно зменшене [Markus, 1996]. Тобто наявний прямиий зв'язок між

конформацією, в якій перебуває плазміноген, та його здатності бути активованим до плазміну.

Каталітична тріада плазміну розміщена всередині негативно зарядженої щілини між циліндричними структурами домену, яка оточена позитивно зарядженими полями – екзосайтами. При розщепленні субстрату плазміном кисень серину атакує карбонільний вуглецевий атом субстрату, виступаючи як нуклеофіл. Імідазольне кільце гістидину переміщує протон від гідроксильної групи серину до атома азоту субстрату. Аспарагінова кислота підтримує таутомерну форму гістидину.

### 1.2.3 Активатори плазміногену

Основними фізіологічними активаторами плазміногену є серинові протеази активатор плазміногену урокіназного типу (урокіназа, u-PA) та тканинний активатор плазміногену (t-PA). t-PA синтезується ендотеліальними клітинами та ооцитами, а урокіназа – лейкоцитами, макрофагами, фібробластами, а також клітинами пухлин.

Усі три протеїнази – плазмін, t-PA та u-PA є трипсин-подібними ензимами, але, на відміну від трипсину, окрім протеїназного домену містять структури, розташовані у важкому ланцюзі молекул, з вираженою структурною та функціональною автономією.

Різниця у активації плазміногену t-PA та урокіназою визначається структурними відмінностями їх важких ланцюгів [Vassalli, 1991]. Молекула тканинного активатора зв'язується з фібрином через фінгер-подібний домен чи крингл 2, а EGF-подібний домен залучений до зв'язування t-PA з клітинними рецепторами. Подібно до плазміногену, t-PA має високу афінність до фібрину. Відповідно, швидкість активації плазміногену t-PA у розчині є дуже низькою, але значно зростає в присутності фібрину як матриці. Натомість, молекула урокінази не містить фінгер-домену, а її єдиний крингл, на відміну від кринглів тканинного активатора плазміногену, не має афінності до фібрину; при цьому



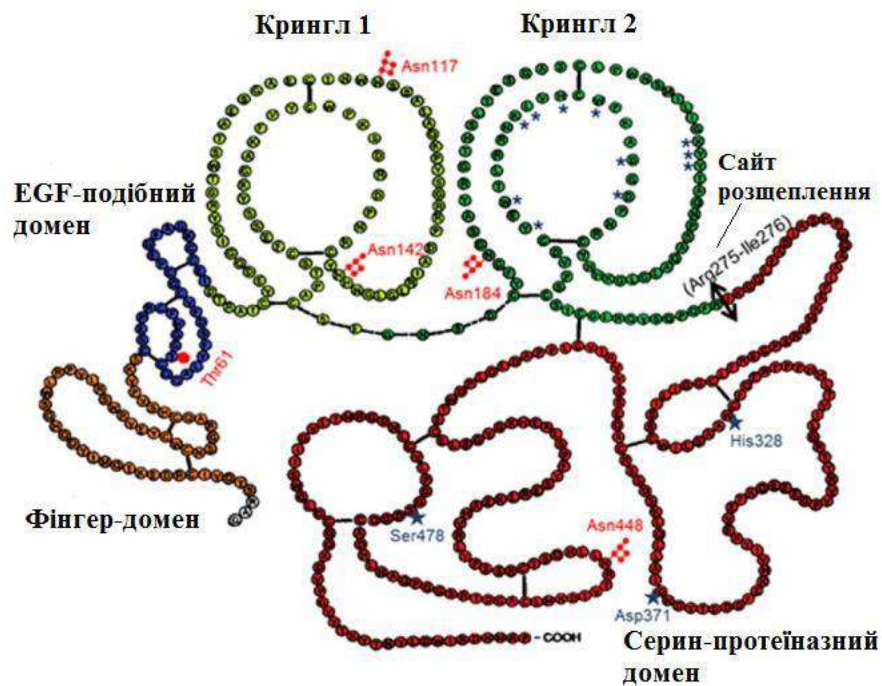
EGF-подібний домен також залучений до зв'язування з клітинними рецепторами [Aisina, 2014].

*Урокіназа (u-PA).* Урокіназа секретується у вигляді одноланцюгового, 411-амінокислотного протеїну, що має дуже низьку каталітичну активність у плазмі. Активації урокінази відбувається при розщепленні зв'язку Leu158-  
Pe159, внаслідок чого одноланцюгова молекула перетворюється на дволанцюгову, з відкритим серин-протеазним активним сайтом. Дволанцюгова урокіназа також має низькомолекулярну форму (що утворюється внаслідок розщеплення плазміном зв'язку між Leu-135 та Leu-136), яка циркулює у плазмі, проте разом з одноланцюговою урокіназою, виводиться з плазми протягом декількох хвилин [Cesarman, 2005].

u-PA складається з трьох структурних регіонів, С-кінцевого серин-протеазного домену (159-411), кринглого домену (50-132) та EGF-подібного домену (10-43) [Huaí, 2006]. Як вже зазначалось, на відміну від кринглів тканинного активатора плазміногену, крингл урокінази не має сайту зв'язування для фібрину, внаслідок чого u-PA має досить низьку афінність до нього. При цьому урокіназа ефективно зв'язується зі своїм рецептором (uPAR) на поверхні клітин, через EGF-домен, хоча вона також здатна активувати плазміноген і на поверхні тромбоцитів незалежно від рецептора, шляхом реципрокної активації одноланцюгової урокінази та асоційованого з поверхнею тромбоцитів плазміногену [Vassalli, 1985; Baeten, 2010]. Цікаво, що активність одноланцюгової u-PA збільшується в сотні разів на поверхні клітин, в той час як активність дволанцюгової урокінази не підвищується при зв'язуванні з клітинами.

Отже, u-PA в основному активує плазміноген, зв'язаний на поверхні клітин, хоча, на відміну від тканинного активатора, здатен його активувати і у розчині. В свою чергу, згенерований на поверхні клітин плазмін відіграє важливу роль, зокрема, у розщепленні міжклітинного матриксу та активації ростових факторів (Carriero, 2009).

*Тканинний активатор плазміногену (t-PA).* Тканинний активатор плазміногену синтезується та секретується клітинами ендотелію як одноланцюговий, 527-амінокислотний глікопротеїн (рис. 1.4). Концентрація t-PA у плазмі складає 70 пкМ, з часом напівжиття у 4 хвилини, тобто є чітко регульованою [Hansen, 1994]. На відміну від урокінази та плазміну, одноланцюгова форма тканинного активатора має відповідну каталітичну активність та може активувати плазміноген [Madison, 1994]. Розщеплення зв'язку між Arg275 та Ile276 плазміном та перетворення одноланцюгового t-PA на дволанцюгову форму підвищує швидкість активації плазміногену до 10 разів за відсутності фібрину, та в 1000 разів – в присутності фібрину; в присутності ж фібриногену активність t-PA не підвищується. Підсилення активації плазміногену відбувається через формування так званого тричленного комплексу між фібрином, плазміногеном, та t-PA [Vries, 1991].



*Рисунок 1.4. Структура тканинного активатора плазміногену. Червоним кольором позначено сайти глікозилювання, синім – амінокислоти активного центру, синіми зірочками – амінокислоти, які входять до складу лізин-зв'язуючого центру [Chevilley et al., 2015].*

Стимуляція фібрином активації плазміногену його тканинним активатором відбувається у два етапи. На першій стадії відбувається перетворення фібриногену на фібрин та експонування на ньому зв'язуючих сайтів для плазміногену та t-PA. На наступній стадії внаслідок дії плазміну з'являється все більше С-кінцевих лізинів при розщепленні фібрину, і, відповідно, більше сайтів зв'язування для плазміногену та його тканинного активатора, що створює механізм позитивного зворотнього зв'язку. Таким чином, тканинний активатор плазміногену вважається основним активатором під час процесу фібринолізу [Normann, 1995].

Структурно t-PA складається з 5 доменів: фінгер-подібний домен, EGF-подібний домен, два кринглових домени, а також каталітичний домен (Lamba, 1996). Як вже згадувалось, саме фінгер-домен та кринг 2 виступають як головні сайти зв'язування з фібрином. Кригл 2 відіграє роль у зв'язуванні з С-кінцевими лізинами, в той час як фінгер-подібний домен може зв'язуватись з регіоном у  $\gamma$ -ланцюзі фібрину за лізин-незалежним механізмом, або до амілоїдоподібних  $\beta$ -структурах, що можуть формуватись у полімерах фібрину. Доведено, що саме фінгер-домен відіграє основну роль у зв'язуванні з фібрином під час фібринолізу [Longstaff, 2011].

Таким чином, фібрин відіграє роль як кофактора, матриці, так і субстрату для плазміногену та t-PA, тим самим забезпечуючи механізм власної деградації. Внаслідок цього за фізіологічних умов фібринова сітка не існує довше, ніж це необхідно для зупинки кровотечі, загоєння рани та відновлення цілісності стінки судини.

### **1.3. Спільні ланки систем згортання крові та фібринолізу.**

Дані *in vitro* свідчать, що плазмін може інактивувати фактор Va, розщеплюючи як його важкий, так і легкий ланцюги. Аналогічно, плазмін може інактивувати фактор VIIa, який структурно є подібним до фактора Va.

Тромбоцитарні глікопротеїни ІІb/ІІІa та Іb, рецептори клітинної поверхні для фібриногену та фактора фон Віллебранда, також є субстратами для плазміну, що свідчить про можливу участь плазміну вже на етапі утворення тромбу.

Тромбомодулін (ТМ) - це трансмембранний білок ендотеліальних клітин, який був широко вивчений щодо його ролі в перетворенні протеїну С в його активовану антикоагулянтну форму. На відміну від вільного тромбіну, тромбін, пов'язаний з ТМ, не здатний розщеплювати фібриноген, активувати тромбоцити, модифікувати фактори Va та VІІІa або взаємодіяти з PAR-рецепторами. Натомість тромбін, пов'язаний з ТМ, набуває антикоагулянтну роль за допомогою двох механізмів: по-перше, продукуючи активований білок С, який може інактивувати прокоагулянтні кофактори Va і VІІІa, і по-друге, обмежуючи деградацію фібрину шляхом активації ТАFІ. Зв'язаний з ТМ тромбін також може каталізувати інактивацію про-урокинази, тим самим пригнічуючи фібриноліз та відновлення пошкоджених тканин. Таким чином, антикоагулянтні, антифібринолітичні та протизапальні дії тромбіну, зв'язаного з ТМ також повинні розглядатися в контексті більш широко визнаних протромботичних ефектів вільного тромбіну [Charina, 2015].

#### 1.4. Система протеїну С.

Протеїн С (РС) – попередник вітамін К–залежної серинової протеїнази, активованого протеїну С (АРС), що регулює згортання крові шляхом інактивації кофакторів Va та VІІІa у присутності йонів кальцію на фосфоліпідній поверхні. Протеїн С синтезується переважно в клітинах печінки та ендотелію судин у вигляді одноланцюгового прекурсору, що складається з 461 амінокислотного залишку, та під час секреції розщеплюється на легкий (155 амінокислотних залишків) та важкий (262 амінокислотних залишків) ланцюги, які поєднані дисульфідним зв'язком (рис. 1.5) [Perrera, 2000].

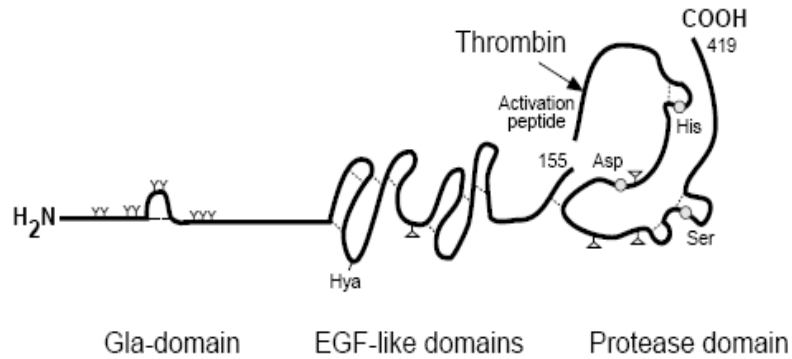


Рисунок 1.5. Доменна структура РС: Y – Гла-залишки, Hya – еритро- $\beta$ -гідроксіаспарагінова кислота, O-каталітичні залишки,  $\Delta$  – сайти глікозилювання [Perera, 2000]

Концентрація РС у плазмі складає 40-80 нМ (2-5 мкг/мл). Молекулярна маса протеїну становить 62 кДа (легкого та важкого ланцюгів - 21 та 41 кДа, відповідно). РС є глікопротеїном, на 1 молекулу якого припадає 14 залишків галактози, 21 залишок манози, 23 залишки глюкозаміну та 12 залишків сіалової кислоти. Ізоелектрична точка цього білка лежить в області рН 4,4 - 4,8 [Grinnel, 1991].

Активація протеїну С відбувається в основному на мембрані ендотеліальних клітин. В основі активації - реакція відщеплення активаційного пептиду тромбіном в комплексі з трансмембранним білком-рецептором тромбомодуліном [Bouwens, 2013].

АРС розщеплює активовані фактор V та фактор VIII. Важливими кофакторами у цьому процесі є протеїн S та фактор V. Фактор Va може бути розщеплений у трьох позиціях – 306, 506, 679. В першу чергу розщеплення відбувається саме у позиції 506; розщеплення ж у позиції 306 є залежним від протеїну S. АРС взаємодіє як з вільним фактором V, так і зі зв'язаним (коли той перебуває у протромбіназному комплексі). Інактивація фактору VIIIа відбувається в аналогічних позиціях А-домену, 336 та 562. Афіність АРС є більшою до фактору Va, аніж до фактору VIIIа [Bouwens, 2013].

Дана функція APC є життєво необхідною для нормального гемостазу. При зменшених рівнях PC зростає ризик венозних та артеріальних тромбозів. Навіть при антикоагулянтній терапії, дефіцит PC, зумовлений гомозиготною мутацією, може призвести до фатального результату.

*Ендотелій - залежна активація протеїну С.* Протеїн С циркулює в крові переважно у формі профензиму. Перетворення проензиму в серинову протеїназу APC відбувається внаслідок розщеплення тромбіном одного пептидного зв'язку Arg169 - Leu170 у важкому ланцюзі і вивільнення зарядженого 12-членного пептиду активації (Lys158-Arg169) [Perera, 2010].

На поверхні ендотелію судин тромбін, що утворюється на стадії ініціації згортання крові в низькій (нМ) концентрації, зв'язується зі своїм високоафінним рецептором тромбомодуліном. Тромбін в комплексі з ТМ активує розщеплення PC, зв'язаного зі своїм специфічним рецептором – EPCR (ендотеліальним рецептором протеїну С), здійснюючи його конверсію до APC [Stearns-Kurosawa, 1996].

Тромбомодулін є першою мішенню для тромбіну на ендотелії. При зв'язуванні з ТМ в присутності іонів кальцію змінюється конформація тромбіну і підвищується спорідненість ферменту до субстрату – протеїну С. Зв'язування тромбіну через аніонзв'язуючий сайт 1 молекули з рецептором ТМ прискорює активацію протеїну С в 100 разів. Тромбін в комплексі з тромбомодуліном втрачає свої прокоагулянтні властивості: здатність взаємодіяти з PAR1 рецепторами клітин та індукувати агрегацію тромбоцитів, активацію клітин ендотелію та інших клітин, а також здатність активувати фактори V і VIII, що стимулюють розвиток згортання крові. Модифікований тромбомодуліном тромбін набуває антикоагулянтних властивостей, швидко перетворюючи протеїн С в активну форму APC.

В структурі тромбомодуліну виділяють N-кінцевий домен, подібний лектину; шість доменів, подібних епідермальному фактору росту (EGF); домен, що зв'язує сульфат хондроїтину; трансмембранний домен і короткий

цитоплазматичний хвіст. Ділянка зв'язування тромбіну, що необхідна для активації РС, локалізована в 5-6 EGF доменах ТМ.

За зв'язування та активацію РС тромбіном відповідає четвертий EGF домен ТМ. При активації позитивно заряджені ділянки РС взаємодіють з тромбіном і ТМ. Відразу над мембраною знаходиться регіон, модифікований О-зв'язаними сахарами та часто модифікований хондроїтин сульфатом. При модифікації хондроїтин сульфатом, тромбомодулін зв'язує тромбін у 10 разів ефективніше та прискорює інактивацію зв'язаного тромбіну антитромбіном та інгібітором протеїну С.

Особливість системи протеїну С полягає у здатності цієї системи відповідати на присутність тромбіну [Christopher, 2008]. При зростанні концентрацій тромбіну, більшість тромбіну зв'язується з тромбомодуліном, в основному на поверхні клітин ендотелію, що призводить до активації протеїну С. Активація протеїну С зростає приблизно у 20 разів *in vivo*, коли протеїн С зв'язується з ендотеліальним рецептором протеїну С (EPCR), що знаходиться в нормі на непошкодженій поверхні ендотелію судин і зв'язує протеїн С, який активується комплексом тромбіну з ТМ. Порівняно з вільним тромбіном, тромбін, зв'язаний з тромбомодуліном інактивується швидше, антитромбіном або інгібітором протеїну С. Таким чином, як тільки генерування тромбіну припиняється, активаційний комплекс протеїну С припиняє генерувати активований протеїн С (APC).

Протеїн С та APC зв'язуються з ендотеліальним рецептором протеїну С з однаковою афінністю. Комплекс APC – рецептор може інактивуватись інгібіторами протеаз плазми ( $\alpha_1$  – інгібітором протеїназ чи інгібітором протеїну С) приблизно з такою ж швидкістю, як і вільний APC (час напівжиття приблизно 15 хв). Така повільна інактивація дає час комплексу APC – EPCR запустити сигнальні каскади клітин. Розщеплення активованого рецептору PAR-1 комплексом APC-EPCR розглядається як один з механізмів запуску сигналіngu.

Співвідношення ендотеліальних клітин до об'єму крові зростає у сотні разів коли кров потрапляє з великих судин до капілярів. Виходячи з концентрації 100000 молекул тромбомодуліну на ендотеліальну клітину, загальна концентрація тромбомодуліну у капілярах складає 100-500 нмоль/л. Тромбомодулін зв'язується з тромбіном з  $K_d$  приблизно 1-10 нмоль/л, в залежності від присутності хондроїтин-сульфату. Таким чином, при проходженні тромбіну через мікроваскулярну систему, високі концентрації тромбомодуліну зв'язують тромбін, що зумовлює блокування антикоагулянтних функцій тромбіну та різкої активації PC. Це підтверджується і тим, що порушення функціонування системи PC призводять до мікроваскулярних тромбозів, особливо шкіри (*purpura fulminans*). У випадку недостатності протеїну C виразки, які виникають при цьому, можуть бути попереджені чи вилікувані додаванням PC.

Як тромбомодулін, так і EPCR можуть бути регульовані на транскрипційному рівні прозапальними цитокінами, наприклад IL-1 $\beta$  та TNF- $\alpha$ . Окрім цього, активність тромбомодуліну може знижуватись при дії оксидантів, що вивільняються з лейкоцитів. Також еластаза лейкоцитів вивільняє розчинну форму тромбомодуліну, що має меншу активність, ніж клітинна, так як не має хондроїтину для зв'язування тромбіну [Mohan, 2014].

Загальний ефект цього спрямований на зменшення активації PC та синтезу тромбомодуліну. Це було досліджено на підгрупі пацієнтів з менінгококциемією, а прямими вимірами рівня APC у пацієнтів з важким сепсисом показано значу дисфункцію активації PC. Тромбін та IL-1 $\beta$  можуть призводити до вивільнення розчинного EPCR, таким чином зменшуючи потенціал активації PC. Клітинні протеїни також можуть інгібувати активацію протеїну C. Так, основний білок еозинофілів є потенціальним інгібітором тромбомодулін-залежної активації протеїну C, спричинюючи тромбоз при гіпереозинофільній серцевій хворобі.

В процесі активації PC суттєва роль належить йонам кальцію і мембранним фосфоліпідам. Наявність іонів Ca<sup>2+</sup> є важливим регулюючим



фактором в функціонуванні РС, так як вони не лише стимулюють активацію зимогену тромбіном в присутності тромбомодуліну, а й інгібують активацію за його відсутності. За наявності  $\text{Ca}^{2+}$  і фосфоліпідів прискорюється інактивація факторів VIIIa і Va активованим протеїном С.

*Ендотелій-незалежні шляхи активації протеїну С.* Тромбомодулін вважається в основному ендотеліальним протеїном, що відіграє роль у шляху активації РС, також його було знайдено на поверхнях інших клітин. Припускають, що тромбомодулін може також брати участь у ендотелій-незалежній активації РС.

Плазма вміщує ТМ у розчинній формі у концентрації  $21,9 \pm 8,8$  нг/мл плазми, який локалізовано на мікрочастках. На відміну від клітинної форми, у розчинного ТМ молекулярна маса є меншою ( $M_r=63000$  проти  $78000$  для клітинного ТМ) та більшу у 3-4 рази  $K_d$ .

Ще у дослідях Suzuki зі співавт. [Suzuki, 1988] було встановлено, що тромбоцити вміщують функціонально активний тромбомодулін у кількості  $0,78 \pm 0,24$  нг/ $10^8$  клітин, що складає 11-19% від рівня ТМ в плазмі. Як рецептор для тромбіну ТМ експонований на плазматичній поверхні тромбоцитів у кількості  $60 \pm 18$  молекул на 1 клітину.

Показано як синтез мРНК, так і наявність самого тромбомодуліну у моноцитах, де він може відігравати важливу роль у попередженні згортання крові. Моноцити беруть участь як у процесах запалення, так і у процесі тромбоутворення. Перебіг запальних процесів (особливо імунологічно зумовлених, наприклад, гіперчутливості чи сепсисі) супроводжується підвищеним формуванням фібрину. Моноцити продукують значну кількість факторів, здатних регулювати як утворення, так і розщеплення фібрину (зокрема, тканинний фактор, протромбіназний комплекс, фактор XIII, урокіназа). Вони прискорюють інактивацію тромбіна антитромбіном, та підтримують генерування активованого протеїну С. Таким чином, ТМ моноцитів може функціонувати як інгібітор їх прокоагулянтної активності саме тому, що він є компонентом системи активації протеїну С.

Слід зазначити, що ТМ також регулює активність TAFI. Активований TAFI пригнічує фібриноліз, відщеплюючи карбоксильні групи у залишках лізину, які є сайтами з'язування плазміногену та тканинного активатора плазміногену на поверхні фібрину. Активований протеїн С, стримуючи продукцію тромбіну, знижує кількість TAFIa, завдяки чому прискорює фібриноліз. Встановлено, що ТМ стимулює активацію TAFI у низьких концентраціях та, навпаки, загальмовує – при високих. Отже, в діапазоні низьких концентрацій ТМ регулює активацію TAFI, а додатковий синтез ТМ перемикає його функції на обслуговування системи активації протеїну С. При цьому за низьких концентрацій ТМ час лізису фібринових згустків збільшується, за високих – скорочується [Mosnier, 2001].

Цікаво, що саме для моноцитів було встановлено, що вони підсилюють експресію ТМ внаслідок стимуляції такими агентами запалення, як ліпополісахарид LPS та фактор некрозу пухлин-альфа, на відміну від ендотеліоцитів, які в умовах запалення обмежують синтез ТМ та його експонування на плазматичну мембрану.

Методами імуногістохімії та протокової цитофлуориметрії показано, що високий рівень синтезу ТМ властивий периферійним моноцитам та нейтрофілам крові, натомість лімфоцити не синтезують цей білок. Доведено, що ТМ моноцитів здатен повноцінно активувати протеїн С, тоді як у нейтрофілів він виявився функціонально неактивним [Conway, 1992; Jenkins, 1995].

Зміна кількості тромбомодуліну внаслідок різних патологічних процесів може викликати зниження рівня APC, розвиток запалення та інші ускладнення. Експресія тромбомодуліну в моноцитах та його концентрація в плазмі в даному випадку може бути діагностичним показником. Так, підвищенна експресія тромбомодуліну в моноцитах корелювала з кращими прогнозами щодо пацієнтів після операції коронарного шунтування [Tsai, 2010]. Терапевтичне значення тромбомодулін може мати й при інших запальних процесах, наприклад, ревматоїдному артриті, гломерулонефриті, системній червоній

вовчанці як молекула, що інгібує реакції запалення на додачу до антикоагулянтної дії.

Існують дані про можливість активації протеїну С плазміном [Varadi, 1994].

## **1.5. Клітинна ланка гемостазу**

### **1.5.1 Роль лейкоцитів у системі гемостазу.**

В останні роки традиційне уявлення про гемостатичну систему як регульовану каскадом факторів згортання, в поєднанні з активацією тромбоцитів, все більше доповнюється даними про те, що активація імунної системи також значно впливає на згортання крові та патологічне тромбоутворення. Лейкоцити внаслідок активації можуть експресувати тканинний фактор, а також вивільнювати прозапальні і прокоагулянтні медіатори, зокрема, гранулярні ензими, цитокіни, та асоційовані з пошкодженнями молекулярні структури. Ці медіатори можуть впливати на всі аспекти формування тромбу, включаючи активацію та адгезію тромбоцитів, а також активацію внутрішніх та зовнішніх шляхів згортання. Прокоагулянтні медіатори, що вивільняються лейкоцитами, підвищують системну тромбогенність, а лейкоцити активно рекрутуються до місця утворення тромбу за допомогою взаємодії з тромбоцитами та молекулами адгезії на ендотеліальних клітин. Окрім того, фагоцитарні лейкоцити залучаються до фібринолізу та розчинення тромбу і можуть регулювати кліренс тромбоцитів та факторів згортання. Таким чином, дисрегульована активація лейкоцитів відіграє роль у патологічному утворенні тромбів. Модуляція взаємодії між лейкоцитами або похідними від лейкоцитів прокоагулянтами та традиційною гемостатичною системою є перспективною ціллю для розробки нових антитромботичних стратегій.

За нормальних фізіологічних обставин лейкоцити сприяють підтримці рідкого стану та потоку крові. Зокрема, циркулюючі моноцити експресують ендотеліальний рецептор протеїну С, тромбомодулін та інгібітор шляху

тканинного фактора [Calligan, 2001; McCachren, 1991; McGee, 1994]. За прозапальних або апоптотичних умов лейкоцити можуть швидко проходити фенотипічну трансформацію, синтезуючи та секретиючи прокоагулянтні фактори або агенти, які активують згортання. Окрім того, поверхня лейкоцитарних клітин може слугувати матрицею для збірки та активації факторів згортання.

*Тканинний фактор.* Моноцити є найбільшим інтраваскулярним джерелом тканинного фактору [Shantsila, 2009]. Хоча низькі рівні TF виявляються і на нативних моноцитах, вплив прозапальних та проапоптотичних агентів (включаючи хіміотерапію, ліпополісахариди, гіпоксію та ін.) значно підвищує активність моноцитарного TF та/або опосередковане TF генерування тромбіну [Tolti, 2008]. Активність тканинного фактора моноцитів регулюється процесами, що збільшують його експресію, індукують його вивільнення і модулюють баланс між ним та TFPI [Chen, 2013]. Активовані моноцити також продукують мікрочастинки, які несуть TF, фосфатидилсерин та інші регулятори згортання [Aleman, 2011; Angelillo-Scherrer, 2012]. Експресія TF іншими лейкоцитарними підтипами є більш суперечливою. Однак, хоча нативні нейтрофіли, ймовірно, не експресують TF, вони можуть експресувати його у менших кількостях при стимуляції [Maugeri, 2006]. Це частково може бути результатом отримання нейтрофілами тканинного фактора з моноцитів, потенційно через опосередковану мікрочастинками передачу [Egorina, 2008].

*Протеїни гранулоцитів.* Нейтрофіли, меншою мірою моноцити та базофіли, у відповідь на стимуляцію вивільняють з цитоплазматичних гранул матриксні металопротеїнази та серинові протеази, такі як катепсин G та еластаза [Pham, 2006]. Ці ферменти сприяють згортанню крові через численні механізми, що включають безпосередньо активацію кофакторів V, VIII, а також фактору X. Вони також можуть деградувати антикоагулянтні фактори, такі як антитромбін та/або TFPI.

*Молекулярні структури, пов'язані з ядерними пошкодженнями (DAMP).* DAMP-и, включаючи ДНК та гістони, вивільняються з ядер активованих або

апоптотичних лейкоцитів і сприяють активації згортання. Вивільнення нейтрофільного хроматину як нейтрофільних позаклітинних пасток (NETs) може бути спровоковано впливом мікроорганізмів, активованих тромбоцитів, запальних цитокінів та ін. [Kaplan, 2012]. Окрім того, є дані, що NETs також вивільняються моноцитами/макрофагами та тучними клітинами [Chow, 2010].

Інтактні NETs виступають як матриця, на якій концентруються тромбоцити, еритроцити, фактор фон Віллебранда, TF, катепсин G, еластаза, фібрин(оген) та фібронектин. Позаклітинна ДНК також запускає активацію контактного шляху через фактори згортання крові XI та FXII [Fuchs, 2012]. DAMPs також можуть інгібувати антикоагулянтні шляхи, захищаючи тромбін від інактивації антитромбіном та зменшуючи активацію протеїну C тромбіном-тромбомодуліном [Ammollo, 2011].

*Участь лейкоцитів у фібринолізі.* Окрім регулювання тромбоутворення та рівня активованих факторів згортання в циркуляції, лейкоцити за рахунок експресії та активації фібринолітичних медіаторів модулюють фібриноліз, а також регулюють розчинення тромбу та кліренс факторів згортання через фагоцитоз [Swystun, 2016].

Як моноцити, так і нейтрофіли можуть модулювати активність фібринолітичної системи та сприйнятливість фібрину до фібринолізу. Фібриноліз *in vitro* прискорюється за наявності ізольованих нативних нейтрофілів та моноцитів, а також мікрочастинок моноцитів, за допомогою декількох механізмів. Лейкоцити експресують u-PA та його рецептор uPAR, а дефіцит урокінази асоціюється з погіршенням розчинення тромбу *in vivo* [Singh, 2003]. Окрім того, лейкоцити також експресують рецептори плазміногену, включаючи енолазу, анексин II та гістон H2B, які локалізують плазміноген на поверхні лейкоцитів, тим самим посилюючи його активацію t-PA та/або u-PA [Das, 2010]. Показано також, що еластаза інактивує інгібітор активатора плазміногену та здатна розщеплювати плазмін [Wu, 1995].

Однак за патологічних обставин активовані лейкоцити можуть послаблювати ендogenousні фібринолітичні механізми. Моноцити, стимульовані

ліпополісахаридами, інгібують фібриноліз за рахунок посилення активації TAFI [Tutwiler, 2016]. NETозис може також впливати на фібриноліз та стабільність тромбу, оскільки додавання ДНК та гістонів при згортанні плазми призводить до утворення більш товстих волокон з більшою механічною стійкістю [Longstaff, 2013]. У пацієнтів із сепсисом та підвищеним рівнем ДНК час лізису згустків подовжений порівняно з контролем. Цей ефект можна змоделювати додаванням комплексу гістон-ДНК або у присутності нейтрофілів з NETs [Gould, 2015]. Показано, що наявність ДНК у згустку погіршує активацію плазміногену за допомогою t-PA, а також послаблює зв'язування плазміну з фібрином [Komissarov, 2011].

*Фагоцитоз.* На додачу до модуляції фібринолізу фагоцитарні лейкоцити відіграють важливу роль у регулюванні наявності активних факторів згортання та утворених тромбів усередині судини. Рівень плазмових факторів згортання значно впливає на схильність до формування патологічного тромбу, і регуляція плазмових рівнів факторів згортання передбачає динамічний баланс між їх біосинтезом, секрецією та кліренсом. Моноцити та/або макрофаги експресують скавенджер-рецептори, включаючи сімейство рецепторів ліпопротеїдів низької щільності, імуноглобулін-подібні рецептори, що зв'язують сіалову кислоту, та інтегрин  $\alpha\text{M}\beta\text{2}$ , який регулює ендоцитоз факторів згортання крові (фактора фон Віллебранда і фактора згортання VIII), активованих тромбоцитів, фібрин(огену), та NETs. Наприклад, виснаження пулу макрофагів *in vivo* пов'язане з підвищеним рівнем комплексу фактора фон Віллебранда з фактором згортання VIII у плазмі, що є фактором ризику для венозного та артеріального тромбозу. Нейтрофіли також можуть сприяти кліренсу активованих тромбоцитів за рахунок взаємодій, опосередкованих зв'язуванням P-селектину тромбоцитів з експресованим нейтрофілами PSGL-1. Ця взаємодія стабілізується за допомогою експресованих нейтрофілами  $\beta\text{2}$  інтегринів, і вимагає експонування фосфатидилсерину на поверхні тромбоцитів для ендоцитозу активного тромбоцита [Swysun, 2016].

Лейкоцити, окрім того, що опосередковують розчинення тромбу, можуть також впливати на ангиогенез та ремоделювання судинної стінки. Циркуючі лейкоцити рекрутуються до сайту тромбоутворення внаслідок вивільнення прозапальних цитокінів та хемокінів, регуляції молекул адгезії на ендотелії, зв'язування плазміногену з рецепторами та утворення фібрину. Інфільтрація лейкоцитами загалом регулюється нейтрофілами на ранніх стадіях, і моноцитами та макрофагами на пізніх стадіях. Порушення рекрутування моноцитами пов'язане зі збільшеним розміром тромбу [Wakefield, 1995].

Нейтрофіли також можуть сприяти процесу розчинення тромбу шляхом фагоциткування апоптотичних клітин та кінцевих продуктів тромболізу. Моноцити ж регулюють тромболізіс, продукуючи фактори росту, матриксні металопротеїнази та u-PA, що в результаті, окрім активації плазміногену опосередковує міграцію клітин та репарацію тканин. Важливо, що різні моноцити можуть виконувати гетерогенні ролі при тромболізісі. Так, моноцити LубС+, які вважаються прозапальними, рекрутуються до сайту пошкодження на ранній стадії, і відіграють роль у фагоцитозі апоптотичних клітин та продуктів розщеплення тромбу. І навпаки, LубС-моноцити беруть участь на більш пізніх стадіях, та залучаються до процесу відновлення тканини [Swystun, 2016].

Як активація лейкоцитів може модулювати згортання крові, так само і активні фактори згортання та тромбоцити також можуть регулювати прозапальну активність лейкоцитів. В процесі тромбоутворення, цей реципрокний взаємозв'язок активації може служити для рекрутування лейкоцитів до тромбу, що утворюється. І моноцити, і макрофаги експресують рецептор, що активується протеазою-1 (PAR-1), рецептор, пов'язаний з G-білком, що активується протеазами згортання крові. Тромбін може індукувати хемотаксис як нейтрофілів, так і моноцитів. APC, навпаки, пригнічує хемотаксис лейкоцитів через розщеплення PAR, і взаємодія з  $\beta 1$  та  $\beta 3$  інтегринами. Активовані фактори згортання крові також можуть модулювати вивільнення прокоагулянтів та прозапальних агентів лейкоцитами. Так, тромбін може регулювати продукцію прозапальних цитокінів, включаючи інтерлейкін-6

та фактор некрозу пухлини- $\alpha$  моноцитами через сигналінг PAR [Bar-Shavit, 1983]. Фібрин та продукти його розпаду можуть стимулювати вивільнення прозапальних цитокінів з моноцитів та макрофагів шляхом сигналінгу через TLR4. Розчинний фібриноген є потужним індуктором дегрануляції нейтрофілів за допомогою взаємодії з інтегрином  $\alpha$ M $\beta$ 2 і може підвищувати фагоцитарну активність при затримці апоптозу нейтрофілів. Окрім того, активовані тромбоцити можуть взаємодіяти з нейтрофілами для індукції дегрануляції та утворення NETs [Maugeri, 2009]. Таким чином, позитивний зворотний зв'язок між прокоагулянтними та прозапальними шляхами в межах тромбу, що утворюється, може посилювати прокоагулянтну дію лейкоцитів, асоційованих з тромбом, та посилювати розвиток патологічного тромбозу.

Отже, наразі залишається нез'ясованим, якою саме, за яких умов та за рахунок яких саме механізмів, може бути результируюча дія лейкоцитів на процес утворення та подальшого розчинення тромбу.

### **1.5.2. Тромбоцити та їх роль у системі гемостазу.**

Тромбоцити виступають ключовим елементом клітинної ланки гемостазу, запобігаючи кровотечі та сприяючи відновленню пошкоджених тканин при загоєнні ран. Їх важлива роль підтверджується тим, що при трасфузії тромбоцитів значно поліпшується гемостаз та стан пацієнтів при клінічних кровотечах. Взаємодія тромбоцитів з експонованими після порушення цілісності судини субендотеліальними структурами призводить до формування початкової «латки» для запобігання втраті крові. При зв'язуванні з матриксиними протеїнами тромбоцити активуються, серед іншого вивільнюючи фактори згортання крові в оточення. На додаток, змінюється як їх форма, так і склад мембрани для забезпечення прямої взаємодії з факторами згортання крові. Тромбоцити є сайтами, які забезпечують генерування тромбіну, що, в свою чергу, призводить до утворення нерозчинного фібрину, та є своєрідними «якорями» для згустку, що формується. У клінічній практиці



застосовуються антитромботичні агенти для обмеження здатності тромбоцитів до участі у неконтрольованому тромбоутворенні. Проте, на додачу до своєї фундаментальної функції у формуванні згустку, тромбоцити також містять численні фібринолітичні протеїни, що регулюють процес фібринолізу. Донедавна роль тромбоцитів вважалася в основному антифібринолітичною, оскільки вони є основним джерелом інгібіторів фібринолізу. Однак в останні роки з'являється інформація про додаткові профібринолітичні функції тромбоцитів, тобто вони здатні модулювати процес фібринолізу так само як і процес фібриноутворення. Тому роль тромбоцитів у системі гемостазу, а також підходи до застосування антитромботичних агентів мають бути переглянуті [Whyte, 2017].

*Субпопуляції тромбоцитів.* Активація тромбоцитів призводить до формування кількох фенотипічно різних субпопуляцій, що виконують різні функції у мікрооточенні тромбу (рис. 1.6). Прокоагулянтні тромбоцити експонують фосфатидилсерин, завдяки якому відбувається зв'язування факторів згортання крові на поверхні клітин з подальшим підсиленням генерування тромбіну та формування фібрину. Агрегуючі тромбоцити, в свою чергу, експонують активний рецептор  $\alpha IIb\beta 3$ , зв'язують фібриноген та інші тромбоцити, тим самим укріплюючи тромб та запобігаючи його передчасній деградації.

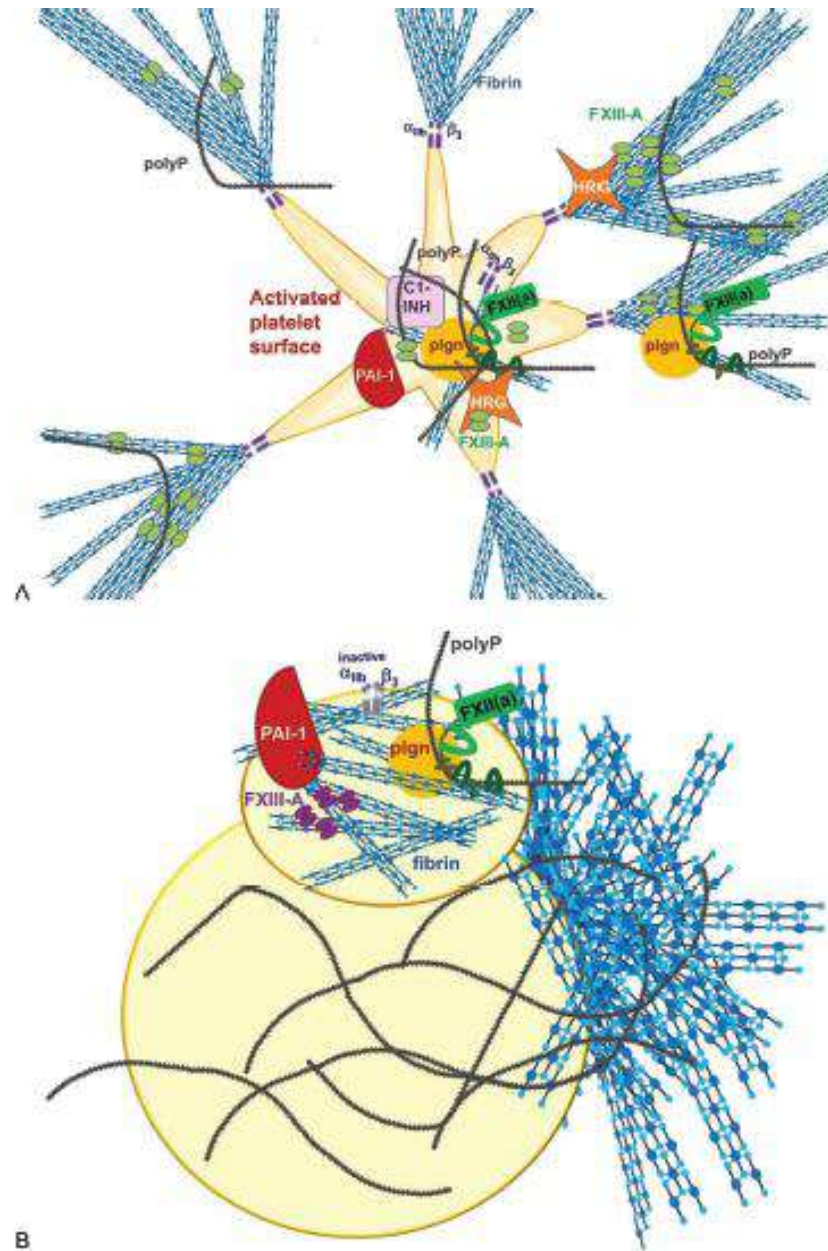


Рисунок 1.6. Схематичне зображення різних популяцій тромбоцитів. Позначено профібринолітичні (плазміноген, FXIIIa) та антифібринолітичні фактори (FXIII; PAI-1) зв'язані з активованими розпластаними агрегуючими (A) та фосфатидилсерин-експонуючими (B) тромбоцитами, а також зв'язаний з тромбоцитами фібрин та поліфосфати [Whyte, 2017]

*Агрегуючі тромбоцити.* Ця субпопуляція тромбоцитів має характерну «розпластану» морфологію та не експонує фосфатидилсерин. Вони здатні зв'язувати фібриноген через активований  $\alpha IIb\beta 3$  та накопичувати фібрин на своїй поверхні. Окрім того, агрегуючі тромбоцити експонують фактор

згортання крові XIII, а також плазміноген та PAI-1, які локалізовані централізовано, на грануломері. Зв'язування плазміногену послаблюється при блокуванні  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 тирофібаном; проте воно не залежить від активної конформації інтегрину, про що свідчить той факт, що накопичення плазміногену на агрегуючих тромбоцитах відбувається до зв'язування PAC-1 антитіл, які взаємодіють з активною формою інтегрину. Значимість даної субпопуляції тромбоцитів, а також зв'язаних на їх поверхні протеїнів, у структуризації тромбу та його стабілізації підтверджується ще й тим фактом, що при додаванні антагоністу  $\alpha$ IIb $\beta$ 3, абсімікабу, процес лізису значно прискорюється через порушення взаємодії фібрин(оген)у та тромбоцитів.

*Фосфатидилсерин-експонуючі тромбоцити.* При активації колагеном або при дії лігандів глікопротеїну VI тромбоцити здатні формувати «псевдоніжки» (ламели), після чого їх морфологія набуває характерної сферичної форми (“balloon shape”) внаслідок значного збільшення прокоагулянтної поверхні з експонованим фосфатидилсерином. Такі прокоагулянтні тромбоцити мають пролонговане підвищення рівня цитозольного кальцію та забезпечують зв'язування протромбінового комплексу. Після формування агрегуючих тромбоцитів, що здатні акумулювати фібриноген, тромбоцити, що рекрутуються далі, здатні формувати популяцію фосфатидилсерин-позитивних клітин. Такі клітини дозволяють формувати «зіркоподібну» структуру фібринової сітки, яка формується від тромбоцитів (зокрема, при низькій швидкості потоку). Цей процес залежить як від фактору згортання крові XIIIa, так і від рецептору  $\alpha$ IIb $\beta$ 3, оскільки за їх відсутності фібрили орієнтовані у напрямку потоку. Тобто прокоагулянтні тромбоцити беруть участь у формуванні динамічної структури фібринової сітки, забезпечуючи полімеризацію фібрину у різних напрямках, що в подальшому також може мати значення для модулювання ними фібринолізу.

Порушення експонування фосфатидилсерину, в свою чергу, порушує процес формування активованого фактора згортання X та генерування тромбіну

теназним та протромбіназними комплексами. Такі тромби більш сприйнятливі до емболізації, мають знижену стабільність та більш доступні для лізису.

«Укутані (*coated*)» тромбоцити. Ця популяція тромбоцитів формується при дії одразу двох сильних агоністів. «Укутані» тромбоцити мають на поверхні своєрідну оболонку, що складається зі зв'язаних протеїнів з  $\alpha$ -гранул, яка формується вторинно після експонування фосфатидилсерину. До протеїнів що утворюють оболонку таких тромбоцитів належить фактор згортання крові V, фактор фон Віллебрандта, фібриноген та ін., які зв'язані з поверхнею клітин за допомогою фактора згортання XIIIa; присутність протеїнів системи фібринолізу, таких як PAI-1 та плазміноген на поверхні клітин також можлива, хоча і менш вивчена. Вважається, що укутані тромбоцити потенціально можуть складати близько 15-53% пулу тромбоцитів; їх фізіологічна роль наразі є не до кінця зрозумілою.

Важливою структурою тромбоцитів, що експонують фосфатидилсерин, є виступаючий так званий «ковпачок» (*protruding cap*), на якому акумулюється фібриноген, а також тромбоспондин. Останні дослідження свідчать також про акумуляцію на даній структурі фактору зсідання XIII, а також факторів зсідання IXa, X, Va та VII, плазміногену, а також PAI-1. Фібрин може слугувати своєрідною матрицею для закріплення цих протеїнів, а також може сприяти трансферу протеїнів, секретованих тромбоцитів, до оточуючої фібринової сітки, що формується. При цьому, незважаючи на присутність фібрин(оген)у, рецептор  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 залишається в неактивній конформації. Тромбоцити, стимульовані двома агоністами, виявляють вторинну інактивацію інтегрину після зв'язування з лігандом, зокрема, фібриногеном. Блокування рецептору  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 або полімеризації фібрину знижує зв'язування плазміногену з фосфатидилсерин-експонуючими тромбоцитами.

Залежно від того, які протеїни наявні у тромбоцитарних «ковпачках», ці структури можуть слугувати як додаткові механізми для інкорпорації фібринолітичних протеїнів всередині тромбу [Whyte, 2017].

*Рецептори, агоністи, та сигнальні каскади тромбоцитів.* За фізіологічних умов,  $1 \times 10^{12}$  тромбоцитів безперервно проходять над васкулярною поверхнею площею  $1000 \text{ м}^2$  з мінімальною адгезією чи агрегацією. При порушенні цілісності стінки судини, або ж у сайтах активації чи пошкодження ендотелію, відбуваються складні взаємодії між ендотеліальними клітинами, компонентами екстрацелюлярного матриксу, тромбоцитами та протеїнами системи зсідання [Versteeg, 2013].

Неактивовані тромбоцити мають дискоїдну форму та є неадгезивними завдяки активності ендотеліальних клітин, які, з однієї сторони, продукують речовини, здатні інгібувати тромбоцити – такі як простагландин I<sub>2</sub> та оксид азоту, а з іншої сторони, метаболізують агоністи тромбоцитів, АДФ та тромбін, до неактивних похідних. При дисфункції чи активації ендотелію, тромбоцити активуються: змінюється їх морфологія, збільшується адгезивність, набувається прокоагулянтна поверхня тощо. Підвищенна адгезивність тромбоцитів забезпечується низкою механізмів: збиранням та кластеризацією рецепторів, формуванням неопітопів завдяки конформаційним змінам рецепторів, експресією рецепторів при формуванні псевдоподій та секреції, а також доступністю агоністів. Цікаво, що трансформації тромбоцитів при активації можуть бути подібні до швидких міжклітинних взаємодій у термінальних синапсах нейронів, зокрема регуляцією активністю іонних каналів та вивільненням розчинних аутокринних та паракринних агентів.

Як дослідження *in vivo* на тваринних моделях, в яких вивчалась адгезія тромбоцитів при ураженні судини, так і дослідження у протоковій камері зі спостереженням за адгезією тромбоцитів на субстратах судинної стінки, виявили нову інформацію щодо процесу активації тромбоцитів, ролі їх рецепторів, та складні внутрішньоклітинні сигнальні каскади, залучені до утворення тромбу за фізіологічних умов в потоці крові. Узагальнена модель виглядає наступним чином.

Дископодібні тромбоцити через рецептори адгезії взаємодіють з компонентами екстрацелюлярного матриксу фактором фон Віллебранда та

колагеном, що призводить до стабільної адгезії. Адгезовані тромбоцити активуються, змінюють форму на округлу, формують псевдоподії, експресують активовані інтегрини, та секретують аутокринні агенти. Численні тромбоцити з потоку в подальшому адгезують через фібриногенові мостики та утворюють тромб за допомогою активації тромбіну, і, нарешті, зумовлюють ретракцію для формування щільної структури тромбу. Прокоагулянтні тромбоцити генерують фосфатидилсерин-експонуючу мембранну поверхню [Munnix, 2007], яка значно сприяє формуванню теназного та протромбіназного комплексів активованих факторів згортання крові, що призводить до масової продукції тромбіну. Фосфатидилсерин, таким чином, пов'язує процес активації тромбоцитів з генеруванням тромбіну. В свою чергу, тромбін відіграє центральну роль у активації факторів згортання – так само, як і тромбоцити. Дослідження вказують на градієнтну активацію тромбоцитів: слабо агреговані, дискоїдної форми тромбоцити знаходяться на поверхні тромбу, в той час як всередині тромбу рівень активації є вищим, і між тромбоцитами формуються міцні контакти.

Взаємодія рецептору GPIb-V-IX з фактором фон Віллебранда є одним з перших стадій адгезії тромбоцитів. Фактор фон Віллебранда знаходиться в ендотеліальних клітинах, а також всередині альфа-гранул тромбоцитів, але також циркулює в плазмі крові. При вивільненні з ендотеліальних клітин він адгезується до клітинних мембран як мультимер, з формуванням характерних продольних структур.

Трансмембранний комплекс GPIb-V-IX складається з двох пар субодиниць: GPIb-альфа та GPIb-бета, GPIX (які усі є глікопротеїнами з лейцин-збагаченими повторами), а також субодиниці GPV. На поверхні тромбоцитів представлено близько 25000 копій даного комплексу. Зв'язок між GPIb-V-IX та цитоскелетом є важливим при продукуванні тромбоцитів.

Внаслідок взаємодії GPIb-V-IX з фактором фон Віллебранда відбувається реструктуризація актинового цитоскелету [Jackson, 2000]. Ліганд-зв'язаний GPIb-альфа також індукує слабкий внутрішньоклітинний сигналінг через

активацію Src-протеїнкіназ, фосфоінозитид-3-кіназ, а також малих ГТФаз. Це викликає зміни рівня  $Ca^{2+}$ , а також активацію  $\alpha IIb\beta 3$  та розпластування тромбоцитів. GPIb-залежна активація тромбоцитів також призводить до активації фосфоліпази D1 та продукції фосфатидної кислоти, яка в свою чергу залучається до активації інтегринів [Jackson, 2003].

Згідно сучасних уявлень, роль комплексу GPIb-V-IX не обмежується лише взаємодією з фактором фон Віллебранда. Він також залучається до взаємодії тромбоцитів з ендотеліальними клітинами, опосередкованої P-селектином [Romo, 1999], і, окрім того, зв'язується з інтегриновим рецептором нейтрофілів Mac-1, контролюючи міжклітинну взаємодію тромбоцитів та нейтрофілів [Simon, 2000]. Більш того, GPIb-V-IX з високою афінністю зв'язується з тромбіном, що може стимулювати тромбін-індуковану активацію рецепторів PAR1 та PAR4. Окрім того, GPIb здатен зв'язувати фактори згортання XI, XII та високомолекулярний кініноген, а також функціонувати як рецептор для активованих факторів згортання VII та XI [Weeterings, 2008].

Таким чином, GPIb-V-IX стимулює прокоагулянтну активність тромбоцитів, і генерування тромбіну та фібрину [Beguín, 1999].

GPVI, головний сигнальний рецептор колагену на тромбоцитах, належить до родини імуноглобулінів. Його дефіцит призводить до порушення колаген-індукованої адгезії та агрегації тромбоцитів, і, відповідно, асоційований з патологічними кровотечами. Експресія GPVI потребує фосфориляції тирозину у так званих ITAM-мотивах для передачі сигналу. Зв'язування колагену та димеризація GPVI опосередковує активацію тирозин-кінази, що призводить до фосфорилування ITAM-мотивів. Це, в свою чергу, призводить до зв'язування тирозин кінази Syk та утворення великого сигнального комплексу (сигналосоми), основним ефекторним протеїном якого є фосфоліпаза  $Cy2$  [Watson, 2010].

GPVI є ключовим рецептором у колаген-залежному формуванні тромбу. Він є низькоафінним колагеновим рецептором і підсилення його взаємодії відбувається за трьома механізмами: 1) коадгезія з інтегрином  $\alpha 2\beta 1$ ; 2)

зв'язування GPIIb-V-IX зі зв'язаним на колагені фактором фон Віллебранда, який також підсилює активацію GPVI; 3) димеризація рецептора. Цікаво, що експресія GPVI та його розщеплення можуть регулюватися фактором Ха, що є одним з прикладів наявності негативного зворотнього зв'язку між каскадом згортання крові та сигнальним шляхом активації тромбоцитів [Al-Tamimi, 2011].

*Інтегрини тромбоцитів.* Інтегрини забезпечують стабільну адгезію тромбоцитів до судинної стінки або ж до тромба, що формується. Вони являють собою нековалентно зв'язані гетеродимерні комплекси трансмембранних  $\alpha$  та  $\beta$ -ланцюгів, обидва з яких в основному є екстрацелюлярними та мають коротку цитоплазматичну частину [Nemler, 1990]. Вважається, що інтегрини мають знаходитись у активній конформації, яка досягається вигинанням екстрацелюлярних доменів, задля забезпечення високоафінного зв'язування лігандів. Інтегрини тромбоцитів після активації взаємодіють з численними протеїнами адгезії екстрацелюлярного матриксу (колагени, еластин, ламінін, вітронектин), а також з протеїнами плазми (фактор фон Віллебранда, фібриноген, фібронектин).

Інтегрин  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 (GPIIb/IIIa) є найбільш поширеним глікопротеїном, який експресується на тромбоцитах більш ніж у 80000 копіях на клітину, з додатковими 40000 копіями у  $\alpha$ -гранулах. У активній, відкритій конформації,  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 зв'язується з декількома бівалентними лігандами, зокрема, з фібриногеном, фактором фон Віллебранда, фібронектином, ламініном тощо; він є найбільш значимим рецептором адгезії для агрегації тромбоцитів. Активація  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 забезпечується більшістю агоністів тромбоцитів та призводить до ряду реакцій внутрішньоклітинного сигналіngu, так званого inside-out сигналіngu. До агентів, що активують  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 належать розчинні агоністи АДФ, епінефрин, тромбоксан A2 та тромбін, а також ліганди адгезивних рецепторів, наприклад, колаген. У відповідь на дію АДФ та низькі концентрації більшості агоністів активація інтегрину є зворотнім процесом, і для забезпечення стабільної активної конформації необхідне подовження сигналіngu. Порушення



функціонування  $\alpha\text{IIb}\beta_3$  призводить до серйозних патологічних кровотеч. Відповідно до своєї важливої ролі,  $\alpha\text{IIb}\beta_3$  часто є мішенню для антитромботичних препаратів (абсіксимаб, ептіфібатид, тірофібан).

Активований  $\alpha\text{IIb}\beta_3$  також відповідає за так званий outside-in сигналінг при активації тромбоцитів [Broze, 1998]. Цей процес залежить від кластеризації комплексів інтегринів з їх рецепторами. При цьому відбувається збирання великих сигнальних комплексів, які складаються з адапторних протеїнів, протеїнів цитоскелету (талін, скелемін), і численних протеїнфосфатаз та кіназ. Зокрема, інтегрин-асоційовані тирозинкінази Src та Syk регулюють подальший низхідний сигналінг. Outside-in сигналінг, опосередкований інтегринами, регулює розпластуння тромбоцитів на поверхні фібриногену та тромбоцит-залежну ретракцію згустку, тобто відповідає за адгезію тромбоцитів до поверхні.

Інтегрин  $\alpha_2\beta_1$  (GPIa/IIa) є менш поширеним інтегрином тромбоцитів (1500-4000 копій на клітину). У активній конформації він з підвищеною афіністю зв'язується з колагенами [Emsley, 2000]. Частково за набуття ним активної конформації відповідає  $\alpha\text{IIb}\beta_3$ -залежний сигналінг. В основному,  $\alpha_2\beta_1$  залучається до процесу адгезії тромбоцитів на колагені та формування тромбу в потоці крові. Вважається, що в цілому даний інтегрин слугує для підсилення взаємодії тромбоцитів через інший рецептор колагену, GPVI [Munnix, 2008].

Інтегрини  $\alpha\text{V}\beta_3$  (відповідає за зв'язування вітронектину та фібриногену),  $\alpha_5\beta_1$  (зв'язування фібронектину) та інтегрин  $\alpha\text{b}\beta_1$  (зв'язування ламініну) менше представлені на тромбоцитах (приблизно 1000 копій на клітину), і залучаються до формування тромбу в основному в поєднанні з основними функціональними інтегринами,  $\alpha\text{IIb}\beta_3$  та  $\alpha_2\beta_1$ .

*Рецептори тромбоцитів для розчинних агоністів.* Активація тромбоцитів протеїнами екстрацелюлярного матриксу призводить до продукції ряду розчинних вторинних медіаторів, які можуть активувати та залучати сусідні тромбоцити. Прикладами таких агентів є нуклеотиди АДФ та АТФ, що вивільнюються зі щільних гранул тромбоцитів, серотонін (з того ж пулу

гранул), тромбоксан А2 (що продукується циклооксигеназа/тромбоксан-синтазним комплексом тромбоцитів), а також тромбін, що продукується на поверхні тромбоцитів.

Сигнальна відповідь тромбоцитів на розчинні агенти забезпечується в основному через G-протеїни. Після зв'язування з лігандами ці рецептори регулюють різні гетеродимерні G протеїни, активність яких залежить від того, чи зв'язала  $\alpha$ -субодиниця G протеїну ГТФ замість ГДФ. Протеїни-регулятори G-протеїн сигналінгу (RGS-протеїни) сприяють гідролізу ГТФ, і, відповідно, скорочують час активації G-протеїну і, як наслідок, час сигналінгу. Різноманітні G-протеїни на тромбоцитах забезпечують інгібування формування цАМФ аденілатциклазою (зокрема, адренергічний рецептор для епінефрину, рецептор для простагландину E2 та рецептор для АДФ – всі зв'язані з  $G_i$ -субодиницею). Вважалось, що активація  $G_i$  та інгібування аденілатциклази призводить зменшення активації протеїн-кінази А, яка, в свою чергу призводить до загального пригнічення відповіді тромбоцитів. Наразі, також вважається, що важливою роллю  $G_i$  є стимулювання фосфатидил-інозитол-3-кінази.

Рецептор для АДФ, P2Y<sub>12</sub> є добре встановленою мішенню для пригнічення функціонування тромбоцитів при серцево-судинних хворобах та для запобігання вторинного тромбозу [Cattaneo, 2011]. Успішне використання такої терапії свідчить про важливу роль аутокринної секреції АДФ та забезпечення активації інтегринів через P2Y<sub>12</sub> у процесі формування тромбу.

Тромбоцити мають два G-протеїн зв'язаних рецептори, PAR1 та PAR4. Стимуляція цих тромбінових рецепторів призводить до стрімкої активації тромбоцитів, в основному опосередкованої зв'язуванням PAR1/4 з G<sub>q</sub> протеїном та активацією фосфоліпази C. Висока здатність тромбіну активувати тромбоцити в основному залежить від PAR1, але також підсилюється PAR4, який розщеплюється при більш високих концентраціях тромбіну [Andersen, 1999]. Ізоформи PAR зв'язуються не лише з G<sub>q</sub>, але також і з G<sub>13</sub> протеїнами, що модулюють активацію протеїну RhoA [Moers, 2003]. RhoA не тільки

залучається до процесу секреції тромбоцитів, але і контролює активність RhoA кінази. Остання інгібує фосфатазу легкого ланцюга міозину, і, відповідно, підсилює фосфорилювання ланцюга міозину, що є необхідним для зміни форми тромбоцита.

Другий тромбоцитарний рецептор для АДФ, P2Y<sub>1</sub>, зв'язаний з G<sub>q</sub>, відіграє більшу роль на початкових етапах відповіді тромбоцитів, на відміну від P2Y<sub>12</sub>, який активніший на більш пізніх стадіях.

*Загальні сигнальні відповіді тромбоцитів.* Стимуляція більшості тромбоцитарних рецепторів призводить до активації інтегрину  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 та агрегації тромбоцитів. Активація інтегринів є відповіддю тромбоцитів і при слабкій активації, та має місце навіть за низьких концентрацій кальцію у цитозолі. З іншої сторони, лише за комбінації сильних агоністів (колаген, тромбін), відбувається індукція прокоагулянтної відповіді тромбоцитів, яка значно залежить від підвищеного рівня цитозольного кальцію.

Основні сигнальні шляхи, що запускаються активацією інтегрину  $\alpha$ IIb $\beta$ 3, включають активацію PI3K, а також, паралельно, активацію CalDAG-GEF1, регулятора G-протеїнів. Обидва шляхи призводять до активації G-протеїну Rap1b, який, в свою чергу, зв'язується зі своїм молекулярним ефектором RIAM. Останній, через цитоскелет-зв'язаний білок талін, а також кіндлін, призводить до зміни конформації  $\alpha$  та  $\beta$  ланцюгів інтегринів [Nieswandt, 2011]. Сигнальні шляхи, що включають протеїн кіназу C, а також фосфоліпазу C, теж запускають активацію інтегринів, залучаючи Rap1b та секрецію АДФ.

Підвищення внутрішньоцитозольного рівня кальцію є ключовим сигналом, оскільки короткочасне або продовжене підвищення його рівня регулюють різні типи відповідей тромбоцитів. Спільним стимулом підвищення рівня кальцію є активація ізоформ фосфоліпази C, чи через тирозинкіназу Src, чи через G<sub>q</sub> протеїн. Обидві ізоформи фосфоліпази індукують вторинний месенджер інозитол 1,4,5-трифосфат, та 1,2-ацилгліцерол [Heemskerk, 2002]. Інозитол 1,4,5-трифосфат сприяє вивільненню кальцію через свої рецептори у мембрані ендоплазматичного ретикулуму, в той час як 1,2-ацилгліцерол

активує ізоформи протеїнкази С. Початкове вивільнення кальцію з ендоплазматичного ретикулуму виступає в якості тригера для подальшого підвищення його рівня – процес, що контролюється мембранними протеїнами та кальцієвими каналами.

Реакцією тромбоцитів на короткочасне підвищення рівня кальцію є зміна форми та секреція гранул. Це також потребує залежного від протеїнкази С фосфорилування. Слабкі агоністи тромбоцитів (епінефрин, простагландин Е2, серотонін, АТФ) викликають мінімальні зміни концентрації кальцію, з відсутністю процесу секреції (якщо тільки не діють в комбінації з іншими агоністами) [Siess, 1989]. Агоністи середньої сили (АДФ, тромбоксан А2) викликають циклічні підвищення рівня кальцію з обмеженою секрецією [Heemskerk, 1992]. І нарешті, прокоагулянтна відповідь тромбоцитів (експонування фосфатидилсерину) залежить від пролонгованого підвищення рівня кальцію, яке викликається лише комбінацією сильних агоністів, таких як тромбін та колаген [Heemskerk, 2002]. Ключову роль в цьому процесі відіграє кальцій-залежна скармблаза, яка і відповідає за екстерналізацію фосфатидилсерину та тромбоцит-залежне генерування тромбіну [Zwaal, 1997].

У тромбоцитах кальцій здатен впливати на численні ефекторні молекули, серед яких актин цитоскелету, протеїнказа С, кальмодулінкіназа, кальцій-регульована протеаза кальпаїн та інші. Цікаво, що роль двох ізоформ протеїнкази С,  $\alpha$  та  $\beta$ , стимульованих діацилгліцеролом, полягає не тільки в участі у активації інтегринів та секреції, але також підтримці високої концентрації кальцію; натомість дві інші ізоформи,  $\delta$ - та  $\theta$ - , мають протилежні функції та пригнічують колаген-залежну активацію тромбоцитів та їх прокоагулянтну активність. Негативна регуляція кальцієвого сигналіngu здійснюється шляхом його зворотнього «закачування» у ендоплазматичний ретикулум через кальцієві АТФази.

Секретовані з тромбоцитарних гранул протеїни є тригерами для додаткових відповідей та петель зворотнього позитивного зв'язку, необхідних для стабільних та цільних тромбоцитарних взаємодій. Наприклад, активовані

тромбоцити експресують на своїй поверхні Gas6-рецептори, які підтримують активацію інтегринів та формування тромбу [Cosemans, 2010]. Щільні інтрацелюлярні контакти тромбоцитів у тромбі забезпечуються чисельними сигнальними взаємодіями: 1) EphA4рецептор-кінази з ефриномВ1, 2) рецептора семафорина

4D (CD100) з плексином [Brass, 2011], 3) Р-селектину (CD62P) з його лігандом PSGL-1 [Theoret, 2011] та 4) TNF – подібного рецептора CD40 з CD40L [Lievens, 2010]. Утворення тромбу надалі підтримується іншими продуктами секреції з тромбоцитарних  $\alpha$ -гранул (тромбоспондин-1, фактор фон Віллебранда, фібриноген, FV) і з щільних гранул (АТФ, АДФ, поліфосфати). З іншого боку, деякі рецептор-лігандні взаємодії забезпечують негативний зворотний зв'язок при активації тромбоцитів і тромбоутворенні. До них належить сімейство рецепторів CTX, ESAM і JAM-A, що функціонують шляхом формування гомофільних взаємодій [Brass, 2011]; та взаємодія Wnt3a з рецептором Wnt frizzled-6 [Steele, 2009]. Деякі з вищезазначених рецепторів можуть підлягати злущуванню з мембрани активованих тромбоцитів, утворюючи розчинні продукти розщеплення, наприклад, семафорин 4D, Р-селектин та CD40L [Andrews, 2007]. Такий механізм може слугувати ще одним механізмом негативного зворотнього зв'язку, який контролює та обмежує утворення тромбу.

Таким чином, в процесі адгезії, активації тромбоцитів та формуванні тромбу задіяні чисельні сигнальні шляхи, що ускладнюється ще є тим, що тромбоцити у «активуючому» оточенні можуть підлягати дії декількох агоністів, що означає, що декілька сигнальних шляхів будуть функціонувати синергійно (рис. 1.7).

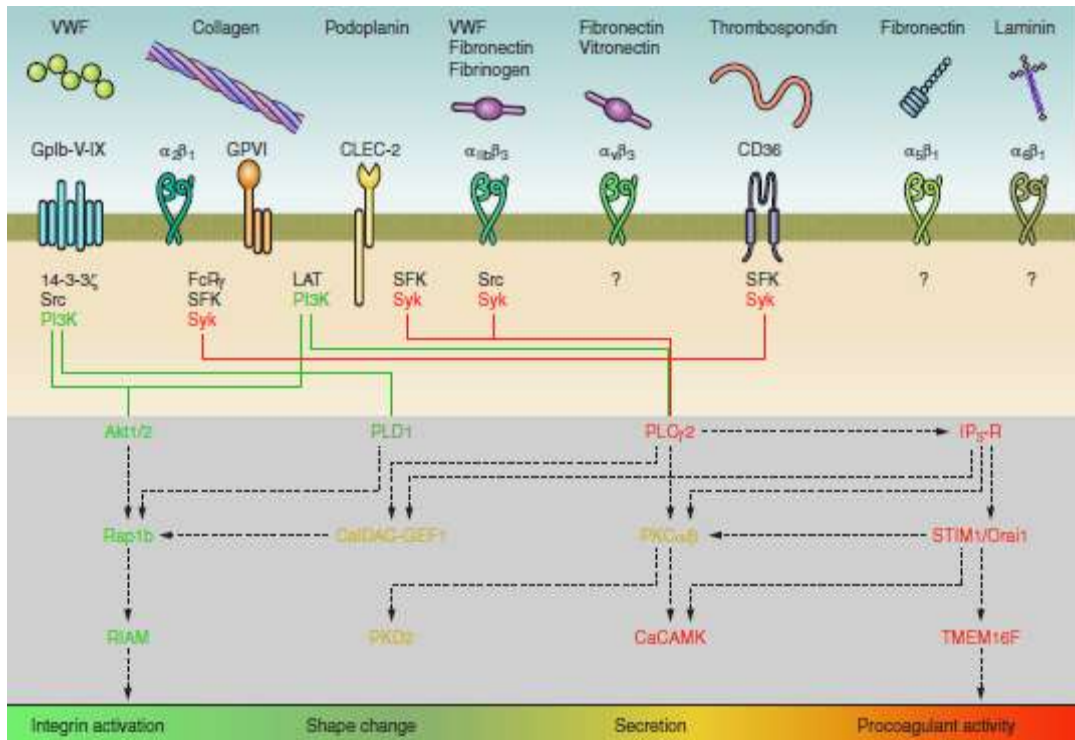


Рисунок 1.7. Ліганди та основні сигнальні шляхи адгезивних рецепторів тромбоцитів. Сигнальні протеїни, асоційовані з рецепторами, розміщено поряд з позначеннями відповідних рецепторів. Сірим кольором позначено спільні сигнальні відповіді [Versteeg, 2013]

Наступним завданням має стати формування комплексної сітки реакцій усіх лігандів, рецепторів, внутрішньоклітинних сигнальних протеїнів та всіх сигнальних шляхів, що контролюються цими рецепторами, беручи підвищення рівня кальцію як основний параметр активації. Це, в свою чергу, дало б можливість розуміння, які саме тромбоцитарні взаємодії і як саме визначають їх активацію, і які саме умови та сигнальні відповіді тромбоцитів призводить до їх гіперфункції, і, відповідно, тромбозу.

## РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

### 2.1. Реактиви та матеріали

Тромбін («Технологія-стандарт»), Human protein C (Sigma), пулована плазма донорів, набір реагентів «Реахром Протеин С» (Ренам, Росія), акриламід (Sigma), метилен-бис-акриламід (Sigma), ТЕМЕД (Reanal), амонію персульфат (Merck), SDS (Sigma), бичачий сироватковий альбумін (Sigma), кумасі R-250 (AppliChem GmbH), урокіназа, стрептокіназа (Pharmacia), тканинний активатор плазміногену (ТМ «Actylise», Boehringer Ingelheim), специфічний хромогенний субстрат плазміну S-2251, специфічний хромогенний субстрат протеїну С S-2366 (Chromogenix, Швеція), маркери молекулярної маси PAGE Ruler (Thermo Fisher Scientific), трис(гідроксиметил)амінометан, гліцин, лізин-сефароза, мічений Alexa Fluor 488 та Alexa Fluor 647 анексин V, мічений Alexa Fluor 488 фібрин (Thermo Fisher Scientific), препарат t-PA Actylise (Boehringer Ingelheim), мічений Alexa Fluor 647 Glu-плазміноген (Enzyme Research), набір для мічення протеїнів Protein labeling kit (Thermo Fisher Scientific), мічені Alexa Fluor 488 антитіла до фактора згортання X (Bioss) та інші реактиви відповідної чистоти та якості: чда.

### 2.2. Виділення протеїнів

#### 2.2.1. Одержання Glu-плазміногену

Glu-плазміноген людини виділяли із щойно отриманої цитратної плазми крові донорів в присутності інгібітору протеїназ контрикалу методом афінної хроматографії на лізин-сефарозі [Deutsch & Mertz, 1970] на холоді. Glu-плазміноген елюювали 0,1 М  $\epsilon$ -амінокапроною кислотою в 0,05 М натрій-фосфатному буфері рН 7,4, осаджували розчином сульфату аммонію (0,33 г/мл) на льоду. Осад відділяли центрифугуванням і розчиняли в 0,01 М трис-НСІ буфері, рН 9,1, що містив 0,01 М лізин. Для інгібування можливої спонтанної активності залишків плазміну до розчину Glu-плазміногену додавали 0,01 М

диізопропілфторфосфат і витримували протягом 2 год при кімнатній температурі з наступним діалізом проти 0,05 М трис-НСІ буфера з 0,15 М NaCl, рН 7,4.

Одержані препарати Glu-плазміногену мали потенційну казеїнолітичну активність 15-25 к.о. на 1 мг протеїна і були електрофоретично гомогенні в 11,5% ПААГ з оцтовою кислотою і сечовиною при рН 3,2 (рис. 2.1) та в 10% ПААГ с DS-Na. Glu-плазміноген зберігали при -20 °С.

### **2.2.2. Отримання des АВ фібрину.**

Фібриноген одержували з плазми крові людини шляхом висолювання сульфатом натрію [Варецкая, 1960].

Фібрин desAB одержували з фібриногену (2,5 мг/мл) під дією тромбіну (1 NIH/1 мг фібриногену) в 0,05 М натрій-фосфатному буфері (рН 7,4) протягом 4 год. при 37 °С [Bouvier, Veretta-Piccoli, & Giacometti, 1975]. Для інактивації фактору XIIIa фібрин утворювали в присутності п-хлормеркурійбензоату натрію (0,35 мг/мл реакційної суміші). Для видалення домішок плазміногену в реакційне середовище вносили 0,05 М  $\epsilon$ -АСА. Утворений згусток вимотували і п'ятиразово промивали в 0,15 М NaCl. Далі фібрин розчиняли в 0,125 % оцтовій кислоті до концентрації 1,5 – 2 % і зберігали при 4 °С.

## **2.3. Методи електрофорезу в поліакриламідному гелі**

### **2.3.1. Електрофорез в поліакриламідному гелі за присутності додецилсульфату натрію**

Гомогенність всіх одержаних препаратів контролювали, а продукти гідролізу фібриногену визначали за допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі за присутності 0,1 % додецилсульфату натрію. Електрофорез проводили за методом Лемлі [Laemmli, 1970]. Набір протеїнів PAGE Ruler з лінійкою молекулярних мас 10-170 кДа було використано в якості маркерів молекулярної маси протеїнів, які аналізували.



Електрофорез проводили в апараті для вертикального гель-електрофорезу фірми BioRad, США в пластинах з 1 мм спейсером протягом 2-5 год. Сила струму складала 30 мА, напруга – 120 В. Візуалізацію поліпептидних зон проводили забарвленням у розчині 0,01 % кумасі G-250 в 25 % ізопропанолі та 10 % оцтовій кислоті протягом 30 хв з наступним видаленням барвника 5 % розчином оцтової кислоти.

### **2.3.2. Електрофорез в поліакриламідному гелі за низьких значень рН**

Для ідентифікації плазміну та Glu-форми плазміногену застосовували електрофорез за низьких значень рН, в основі якого лежить поділ протеїнів за різницею зарядів [Panyim & Chalkley, 1969].

Електрофорез проводили в 11,5 % ПААГ з 6,25 М сечовиною та оцтовою кислотою, рН 3,2. У якості електродного буферу використовували 0,9 М оцтову кислоту. Зразки протеїнів розчиняли в 10 М сечовині з 1,8 М оцтовою кислотою з додаванням піроніну для спостереження за фронтом просування зразків у ході електрофорезу. Умови проведення електрофорезу аналогічні викладеним у розділі 2.3.1.

## **2.4. Виділення клітин крові.**

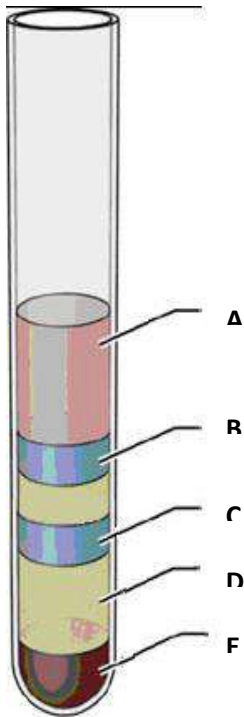
### **2.4.1. Виділення тромбоцитів.**

Тромбоцити виділяли із цільної крові умовно здорових донорів, яка містила антикоагулянт (0,1 М цитрат натрію, 0,08 М лимонна кислота, 0,11 М глюкоза) у співвідношенні 9:1, методом диференціального центрифугування та гель-фільтрації на Сефарозі 2В. Кількість клітин у фракціях і їх життєздатність оцінювали за допомогою агрегометра «SOLAR AT-02», Білорусь. Суспензію нативних тромбоцитів зберігали на водяній бані при 37 °С протягом 3 годин.

### **2.4.2. Виділення моноцитів та нейтрофілів.**

Виділення моноцитів та нейтрофілів здійснювали згідно зі стандартним протоколом з деякими модифікаціями. З пробірки крові відбирали 2мл надосаду та розводили його 2 мл PBS, 37°C. Осаджували лейкоцити із

залишками еритроцитів центрифугуванням протягом 15 хв за 200 g, при кімнатній температурі. Декантували надосад, вносили 2 мл середовища 199 та ресуспендували клітини. Обережно нашаровували суспензію клітин на поверхню градієнтного розчину фікол-урографіну у співвідношенні 1:2. Центрифугували на бакет-роторі протягом 30 хв за умов 2000 об/хв (900 g), 37°C.



*Рисунок 2.1. Схема виділення мононуклеарів та нейтрофілів з однієї порції крові (A – шар плазми, B – мононуклеари, C – нейтрофіли, D – фікол, E – еритроцити) [Fuss, 2013]*

За допомогою піпетки з широким нижнім кінцем переносили шар B з мононуклеарами в іншу мікроцентрифужну пробірку. Потім видаляли прошарок між B та C та обережно збирали шар C, в якому концентруються нейтрофіли та інші гранулоцити. Після додавання трикратного об'єму середовища 199 в пробірку з моноцитами, відмивали клітини центрифугуванням протягом 10 хв при 400 – 600 g за температури 18 – 20 °C. Видаляли супернатант, обережно ресуспендували осад клітин в подвійному

об'ємі середовища 199 та повторювали процедуру відмивання. Таким чином здійснювали також відмивання нейтрофілів.

Після відмивки клітини ресуспендували в потрібному об'ємі культурального середовища. Кількість моноцитів та нейтрофілів в суспензії контролювали підрахунком в камері Горяєва.

## 2.5. Визначення активності протеїну С.

Визначення концентрації вільного РС проводили після п'ятихвилинної інкубації зразка з нефізіологічним активатором з отрути змії *A. contortrix contortrix*, що дає можливість в подальшому реєструвати кількість РС, переведеного в активований стан. Для цього застосовували загальноприйнятий метод оцінки амідолітичної активності APC за його здатністю специфічно гідролізувати хромогенний субстрат S-2366 (pGlu-Pro-Arg-pNA) [Takahashi, 1988]. Для аналізу використовували набір реагентів «Реахром Протеин С» (Ренам, Росія), які було використано для мікрометоду (планшетний варіант). Деякі інші протеази плазми крові також можуть розщеплювати S-2366, забезпечуючи так звану фонову амідолітичну активність зразків. Крім того, зростання фонові амідолітичної активності може бути індикатором накопичення APC в результаті фізіологічної активації проензиму РС. Тому кожний зразок досліджували, паралельно оцінюючи його фонову та РС-залежну амідолітичну активність, індуковану нефізіологічним активатором. Згідно з методикою реєстрували зміни оптичної густини на довжині хвилі 405 нм для розчину *n*-нітроаніліну, який вивільнювався протягом 5 хв в об'ємі реакційного середовища 130 мкл. Отже, кількість вільного РС визначали за різницею швидкістей гідролізу хромогенного субстрату за наявності активатора в зразку та без нього.

Окрема модифікація методу - активація препарату протеїну С тромбіном в трис-буфері з додаванням моноцитів та нейтрофілів та хромогенного субстрату S-2366. Контролем була аналогічна система без додавання протеїну

С. Кінцеві концентрації РС і тромбіну складали 0,4 мкг/мл та 0,15 НІН од/мл, кінцева концентрація моноцитів та нейтрофілів ~ 1,5 млн/мл, тромбоцитів – 300 млн/мл, кінцева концентрація хромогенного субстрату 6 мМ.

## **2.6. Тромболісис кров'яного згустку.**

В пробірку або лунку планшета вносили розчин t-РА та РС у кінцевій концентрації 1,68 од./мл та 0,268 мкг/мл, відповідно. Доводили загальний об'єм 0,05 М трис-фосфатним буфером (рН 7,2) так, щоб з урахуванням всіх доданих розчинів він дорівнював 80 мкл. Тромбін вносили в кінцевій концентрації 1 НІН од/мл. Венозну кров людини (без антикоагулянтів) якомога швидше після забору додавали по 0,42 мл в кожен лунку планшета (або пробірку) та струшували декілька разів до утворення згустку. Контролем щодо дії тромбіну слугували згустки, утворені з аналогічно підготовлених зразків крові шляхом спонтанного зсідання, тобто без додавання тромбіну.

В усіх варіантах дослідів візуально фіксували час утворення повноцінного згустку після ущільнення зразка крові та час початку лізису згустку за появою рідкої фази.

Лізис згустків спостерігали протягом доби, після чого переносили згустки, які залишились, на 5 хв на фільтрувальний папір для зневоднення, а потім зважували.

В момент накопичення 100 мкл рідини відбирали проби для визначення фонові та індукованої амідолітичної активності РС в лізатах. Лізати піддавали центрифугуванню, супернатанти зберігали протягом кількох днів за температури -20°C.

## 2.7. Дослідження впливу клітин на процеси фібриноутворення і фібринолізу.

Дослідження параметрів зсідання/лізису проводили із застосуванням турбідиметричного методу визначення кінетичних кривих зсідання/лізису фібринових згустків, детектуючи зміни мутності зразка плазми на довжині хвилі 405 нм. Шляхом аналізу отриманих кривих визначали ряд параметрів: максимальну мутність фібринового згустку за максимальним значенням поглинання, лаг-період – за часом, необхідним для початку полімеризації, швидкість утворення згустку – за тангенсом кута нахилу дотичної до висхідної ділянки кінетичної кривої, швидкість лізису згустку – за тангенсом кута нахилу дотичної до низхідної ділянки кривої. Проміжок часу від початку полімеризації до моменту зменшення максимальної мутності наполовину визначали як час напівлізису згустку. Проміжок часу від ініціації полімеризації до повного розчинення згустку – як час існування згустку.

Для вивчення впливу клітин до 50 мкл цитратної плазми або плазми із додаванням екзогенного t-PA додавали 50 мкл суспензії відмитих моноцитів чи нейтрофілів у кінцевій концентрації 1 млн клітин/мл. Ініціювали зсідання внесенням 50 мкл  $\text{CaCl}_2$  (кінцева концентрація 8 мМ) або тромбіну (кінцева концентрація 0,33 NIH од./мл). У контрольні проби замість суспензії клітин додавали відповідний об'єм середовища RPMI. Застосування різних ініціаторів зсідання та їх комбінації дозволило моделювати кальцій-залежні та незалежні стадії продукції тромбіну та активації PC:  $\text{CaCl}_2$  ініціює внутрішній каскад зсідання із залученням теназного і протромбіназного комплексів, що продукує невелику кількість ендogenous тромбіну, недостатню для активації PC;  $\text{CaCl}_2$  разом з екзогенним тромбіном обумовлюють найпотужнішу продукцію ендogenous тромбіну та APC, здатного за механізмом зворотного зв'язку блокувати тромбіноутворення; екзогенний тромбін на фоні низьких концентрацій  $\text{Ca}^{2+}$  забезпечує несуттєве залучення факторів згортання (а отже й приросту рівня ендogenous тромбіну) та продукує APC, який за низького рівня

іонів кальцію не здатний ефективно блокувати тромбіноутворення. Таким чином, варіанти, в яких тромбін вносили у рекальцифіковану плазму, дозволяли вивчати як антикоагулянтну, так і профібринолітичну дію APC; варіанти, в яких тромбін вносили в цитратну плазму – лише прояви профібринолітичної активності APC.

Вплив тромбоцитів на процеси згортання та лізису плазми проводився з використанням плазми, збагаченої тромбоцитами.

До свіжоотриманої крові додавали розчин ACD (acid citrate dextrose, 85 мМ цитрату натрія, 65 мМ лимонної кислоти, та 100 мМ D-глюкози) у співвідношенні крові до антикоагулянту 6:1. Після додавання антикоагулянту, кров центригували при 180g 20 хвилин, після чого відбирали супернатант (плазму, збагачену тромбоцитами, PRP) та центрифугували його при 1000 g протягом 15 хвилин. Другий супернатант (безтромбоцитну плазму, PFP) декантували, після чого в суспензії тромбоцитів, що залишалась, вимірювалася концентрація клітин. Збіднена тромбоцитами плазма, в свою чергу, центрифугувалась при 12000g 7 хвилин для отримання безтромбоцитної плазми. Плазма, збагачена тромбоцитами з концентрацією тромбоцитів 300 млн клітин/мл отримувалася розведенням суспензії тромбоцитів до потрібної концентрації плазмою.

Перевірка життєздатності тромбоцитів проводилася через 3 години після забору крові за їх агрегаційною здатністю при додаванні 1 NIH од./мл тромбіну; зразки, що демонстрували слабку відповідь та підвищену спонтанну агрегацію, виключалися з експерименту.

Згортання плазми ініціювалося хлоридом кальцію (кінцева концентрація 8 мМ) у системі з рівним співвідношенням трис-НСІ буферу (0.05 М, рН 7,4) плазми, збагаченої тромбоцитами (в якості джерела клітин), та хлориду кальцію. У контрольних зразках, відповідно, використовувалась безтромбоцитна плазма.

Лізис було стимульовано попереднім додаванням в складі буфера рекомбінантного тканинного активатора плазміногену у кінцевих

концентраціях 15 та 40 од./мл. Концентрація t-РА, яка б забезпечувала повний лізис згустку протягом не довше 3 годин, розраховувалась виходячи із середнього вмісту PAI-1 у безтромбоцитній плазмі та плазмі, збагаченій тромбоцитами.

Процес згортання та лізису у плазмі оцінювався за змінами оптичної густини плазми на довжині хвилі 405 нм з використанням мікропланшетного рідера Multiscan 2000 (Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finland) до повного лізису згустку (або не більше ніж протягом 3 годин).

## **2.8. Вивчення впливу тромбоцитів на процес лізису desAB-фібрину**

Вплив тромбоцитів на процес лізису desAB-фібрину досліджували за зміною у часі мутності згустку при довжині хвилі 350 нм з використанням спектрофотометра (СФ-26, Ломо) з термостатованою кюветою. В кювету з 50 мМ трис-НСІ буфером рН 7,4 з 1 мМ СаСІ<sub>2</sub> вносили Glu-плазміноген (у кінцевій концентрації 15 мкг/мл), t-РА (кінцева концентрація 5 од./мл), суспензію тромбоцитів, у кінцевій концентрації 50 млн клітин/мл, а також тромбін у кінцевій концентрації 1 NIH од./мл, та інкубували робочу суміш впродовж 5 хвилин при 37° для активації тромбоцитів, після чого додавали desAB-фібрин (кінцева концентрація 200 мкг/мл), одразу починаючи реєструвати його полімеризацію. Кінцевий об'єм реакційного середовища складав 1 мл. Отримані кінетичні криві зміни мутності оцінювали за параметрами загального часу існування згустку, часу початку лізису та часу напівлізису, максимальної швидкості лізису та площі під кривою. Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програмного забезпечення MS Office Excel 2016.

## **2.9. Вивчення активації Glu-плазміногену в присутності інтактних та тромбін-активованих тромбоцитів**

Кінетику активації Glu-плазміногену в присутності інтактних та тромбін-активованих тромбоцитів досліджували за швидкістю розщеплення хромогенного субстрату S-2251 плазміном, що утворювався протягом реакції активації. Реакцію проводили в мікротитрувальних планшетах (Greiner, Німеччина). Для активації клітин (40 млн клітин/мл) використовували 1 NIH од./мл тромбіну. Реакційне середовище містило 23 мкг/мл Glu-плазміногену, 20 од./мл тканинного активатора та 3 мМ S-2251. Реакцію проводили при 37°C в 0,05 М Трис-НСl буфері, що містив, 0,15 М NaCl і 0,001 М CaCl<sub>2</sub>. Зміну поглинання реакційної суміші реєстрували за довжин хвиль 405 та 492 нм на мікрорідері Multiscan Titertek. На графіках наведено типові криві для n дослідів, n≥3. Статистична обробка результатів виконувалась з використанням пакету програм MS Office Excel 2016. Розрахунок кінетичних параметрів реакції проводився з використанням програми Prizm GraphPad 8.

## **2.10. Вплив протеїнів протромбінового комплексу на процес активації Glu-плазміногену в присутності тромбоцитів**

Вплив протеїнів протромбінового комплексу на процес активації Glu-плазміногену на нативних та тромбін-активованих тромбоцитах визначали за описаних вище умов, однак з попередньою інкубацією клітин з 100 мкг/мл протромбінового комплексу протягом 5 хв.

Модулюючий вплив тромбоцитів на активацію Glu-плазміногену різними активаторами досліджували відповідно до описаного методу за 1,25 нМ концентрації тканинного активатора, урокінази або стрептокінази (молярне співвідношення до проензиму 1:200).



### **2.11. Вивчення зв'язування FITC-кон'югованого Glu-плазміногену з тромбоцитами**

Взаємодію FITC-кон'югованого Glu-плазміногену з тромбоцитами визначали на протоковому цитофлуориметрі COULTER EPICS XL. Використовували суспензію клітин (100 млн клітин/мл). Активацію тромбоцитів здійснювали тромбіном (2 NIH од./мл) протягом 5 хв при 37°C. За вказаних умов кількість активованих клітин складало ~90%. Після активації клітини відмивали двічі в HEPES-буфері та ресуспендували в 0,05 М Na-фосфатному буфері, 0,15 М NaCl, рН 7,4 з 1% БСА (робочий буфер). Інтактні клітини піддавали аналогічним процедурам без активації тромбіном. Відмиті нативні та активовані клітини інкубували з FITC-плазміногеном (1 мкМ) 30 хв при 37°C у темряві та двічі відмивали робочим буфером. Для аналізу взаємодії міченого плазміногену використано по 10 тис. клітин кожного зразка. Довжина хвилі збудження флуорофору – 488 нм. Інтенсивність флуоресценції клітин реєстрували за каналом FL1 (515–535 нм). Рівень флуоресценції контрольної групи клітин (нативні тромбоцити, не інкубовані з FITC-міченим плазміногеном) був обраний за 100%. Обробку результатів проводили з використанням пакету програм “FCS Express V3” (De Novo Software, США).

### **2.12. Дослідження зв'язування t-PA з тромбоцитами**

Взаємодію t-PA з тромбоцитами досліджували методом флуоресцентної спектроскопії з використанням одержаних антитіл проти t-PA та вторинних FITC-кон'югованих антитіл проти IgG кроля (Sigma-Aldrich, США). Антитіла проти t-PA були люб'язно надані с.н.с. відділу хімії та біохімії ферментів Юсовою О.І. Вимірювання проводили на флуоресцентному спектрофотометрі QuantaMaster TM 40 (PTI Inc., Канада) в термостатичній кюветі (37 °C) при постійному перемішуванні суспензії клітин. Спектри флуоресценції FITC реєстрували з кроком в 1нм в діапазоні 500 – 600 нм при довжині хвилі

збудження 490 нм. Відмиті нативні тромбоцити (100 млн клітин) інкубували з первинними IgG проти t-PA (10 мкг) 60 хв при 37 °С в HEPES-буфері (20 мМ HEPES, 137 мМ NaCl, 4 мМ KCl, 0,2 мМ MgCl<sub>2</sub> pH 7,4), в об'ємі 0,3 мл. Об'єм доводили HEPES буфером до 1 мл та двічі відмивали центрифугуванням по 15 хв при 200 g. Далі клітини ресуспендували в HEPES буфері (0,3 мл) та інкубували з вторинними антикролячими IgG, кон'югованими з FITC 40 хв при 37 °С в темноті. Після двох відмивань клітини ресуспендували в 1 мл 50 мМ трис-HCl буферу з 130 мМ NaCl, pH 7,4 та аналізували. Обробка результатів виконувалась з використанням пакету програм Origin Lab 9.

### **2.13. Вивчення зв'язування стрептокінази з тромбоцитами**

Взаємодію FITC-кон'югованої стрептокінази з тромбоцитами досліджували за аналогічною методикою для FITC-плазміногену. Інкубація нативних та тромбін-активованих клітин з FITC-стрептокіназою проводилась в присутності та у відсутності 1 мкМ Glu-плазміногену.

### **2.14 Дослідження участі тромбоцитів в формуванні та лізисі фібринового згустку з використанням конфокальної мікроскопії**

Для дослідження ролі тромбоцитів у процесах тромбоутворення та тромболізису в реальному часі використовували модельну систему з протоковою камерою, що відтворює умови потоку крові (5 мл/год). Джерелом тромбоцитів була свіжа цитратна кров донорів, в яку безпосередньо перед проходженням через камеру додавали хлорид кальцію (0,75 мМ) та хлорид магнію (3 мМ). Для візуалізації утворення полімерного фібрину та зв'язування плазміногену та фібрин-тромбоцитарних агрегатах використовували мічений фібриноген Alexa Fluor 488 (16 мкг/мл), мічений Pg Alexa Fluor 647 (120 нМ), мічений аннексин V, мічений Alexa Fluor-488 або Alexa Fluor-647 (1:100). За допомогою конфокального мікроскопу Zeiss Axio Examiner Z.1 (Carl Zeiss

Microscopy GmbH, Німеччина) в реальному часі вивчали динаміку стимульованого колагеном формування полімерного фібрину та зв'язування плазміногену.

Для вивчення динаміки процесу тромбоутворення та наступного тромболізу, у кров, окрім міченого фібриногену, попередньо додавали t-PA (10 нМ).

Дослідження зв'язування t-PA з тромбоцит-фібриновими агрегатами проводили в тій же системі, що відтворює умови потоку крові. Утворені тромбоцит-фібринові агрегати, промивали буфером, що містив t-PA (140 нМ), а також буфером, що в залежності від експерименту містив TRAP (30 мкМ); іономіцин (10 мкМ),  $\epsilon$ -амінокапронова кислота (2 мМ); тірофібан (5 нг/мл); DON (300 мкМ), Alexa Fluor 488 мічені антитіла до фактора згортання крові X (1:50), після чого вивчали за допомогою конфокального мікроскопу.

Для вивчення зв'язування t-PA відмитими тромбоцитами, суспензію відмитих тромбоцитів наносили на предметне скло, після чого залишали адгезувати на 20 хв. Після відмивки фізіологічним розчином, на адгезовані на склі тромбоцити наносили буфер з Alexa-Fluor 647 міченим t-PA (140 нМ) (в експерименті з нативними тромбоцитами), або ж попередньо додавали іономіцин (10 мкМ) та FITC-мічені антитіла до фібриногену (1:200) та інкубували протягом 5 хвилин.

Дослідження участі тромбоцитів в утворенні фібринового згустку у статичних умовах проводили з використанням камери Ibidi  $\mu$ -Slide VI, в яку у рівних співвідношеннях вносили: трис-НСІ буфер (0.05 М, рН 7,4), плазму, збагачену тромбоцитами (до якої попередньо було додано мічений Alexa Fluor 488 фібриноген (16 мкг/мл)), та суміш хлориду кальцію (8 мМ) і тромбіну (0,17 нМ), якою ініціювали згортання. У контрольних зразках, відповідно, використовувалась безтромбоцитна плазма. Конфокальні зображення структури згустку отримували через 15 та через 60 хвилин після ініціації згортання.

## **2.15. Аналіз параметрів кривої оптичного поглинання процесу утворення та лізису фібрину безтромбоцитарної і збагаченої тромбоцитами плазми у хворих з резистентною артеріальною гіпертензією**

Дослідження включало зразки плазми від 16 пацієнтів з резистентною артеріальною гіпертензією (середній вік  $51.4 \pm 2.6$  років), що проходили лікування у Національному Науковому Центрі «Інститут кардіології ім. М. Д. Стражеска» НАМН України. Тривалість хвороби складала в середньому  $13.4 \pm 2.0$  роки. В якості контрольної групи було залучено 7 умовно здорових донорів (середній вік  $49.2 \pm 2.1$  років). Резистентну артеріальну гіпертензію було діагностовано відповідно до рекомендації Європейської Товариства Гіпертензії та Європейського Кардіологічного Товариства за наступними критеріями: тиск при візиті до лікаря становив більше ніж 140/90 mm, включаючи пацієнтів, що приймали три чи більше препаратів проти гіпертензії в оптимальних дозах, причому один з них – діуретик.

Критеріями виключення було лікування нестероїдними протизапальними засобами, симпатоміметиками (ліки для зниження ваги та ін.), вживання стимулянтів, оральних контрацептивів, та деяких медичинських речовин рослинного походження (*Glycyrrhiza*).

Згортання плазми ініціювали хлоридом кальцію (кінцева концентрація 8 мМ) в поєднанні з низькою концентрацією екзогенного тромбіну (кінцева концентрація 0,017 NIH од./мл) у системі зі співвідношенням 1:1:1 для буферу (0.05 М трис-НСІ, рН 7,4), плазми, збагаченої тромбоцитами (в якості джерела клітин), та суміші хлориду кальцію з тромбіном. У контрольних зразках, відповідно, використовували безтромбоцитну плазму.

Лізис було стимульовано попереднім додаванням в складі буфера рекомбінантного тканинного активатора плазміногену у кінцевих концентраціях 15 та 40 од./мл.

Процес утворення та лізису фібринового згустку оцінювався за змінами оптичної густини плазми на довжині хвилі 405 нм з використанням

мікропланшетного рідера Multiscan 2000 (Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finland) до повного лізису згустку (або не більше ніж протягом 3 годин).

Ефект тромбоцитів на згортання та лізис оцінювався при порівнянні відповідних параметрів безклітинної плазми та аналогічної плазми, збагаченої тромбоцитами за допомогою t-критерія Ст'юдента. Різниця між групою донорів та пацієнтів аналізувалася з використанням U-критерія Манна-Уїтні на відповідному  $\alpha$ -рівні (0,05 або 0,01). Дані у таблиці представлено у вигляді медіани та її абсолютного відхилення. Усі розрахунки проводилися з використанням програмного забезпечення Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, U.S.).

## РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

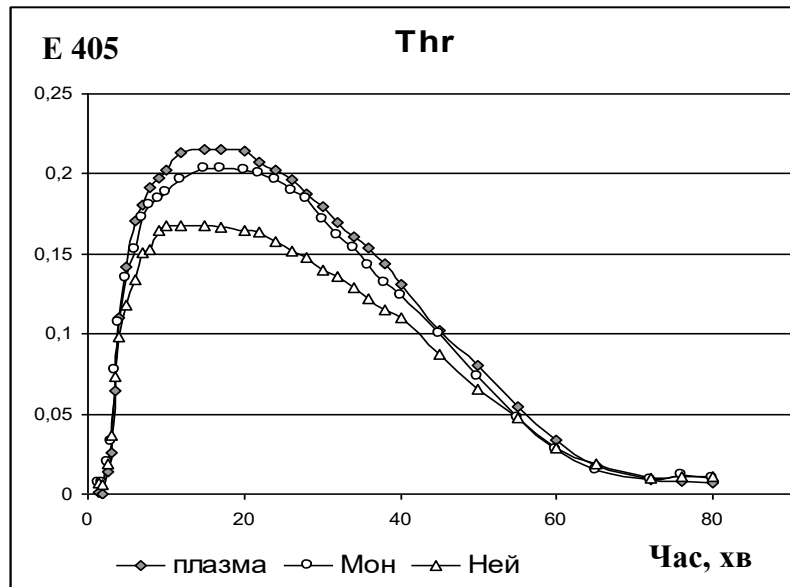
### 3.1. Модифікуючий вплив моноцитів, нейтрофілів та тромбоцитів на швидкість процесів утворення та лізису фібринового згустку *in vitro*

Як компоненти клітинної ланки гемостазу, моноцити і нейтрофіли можуть впливати на функціонування протеїнів системи гемостазу, активно регулюючи їх взаємодію. Дана регуляція може здійснюватися за кількома механізмами: експресією на плазматичній мембрані сайтів зв'язування, що забезпечують збирання протеїнових комплексів; модулюванням активності протеаз; продукуванням клітинами певних протеїнів (тканинного фактора, що запускає зовнішній шлях згортання, або еластази, здатної розщеплювати TFPI), генеруванням активних продуктів розпаду клітин, що впливають на процеси гемостазу, таких як мікрочастинки або NETs [Semeraro, 2009; Ruf, 2010; Bouchard, 2003; Gillis, 1997].

Однак наразі залишається невизначеним, як клітини крові координують взаємодію наведених вище механізмів, задіяних у підтримці гемостатичного балансу, та отже, як присутність клітин впливає на утворення фібринового згустку, його розміри, ефективність розчинення та час існування. Таким чином, для з'ясування впливу моноцитів та нейтрофілів на гемостатичний баланс, в умовах *in vitro* було досліджено їх дію на процеси полімеризації і деградації фібрину в плазмі крові.

Для дослідження впливу клітин на процес згортання використовували два підходи. За допомогою  $\text{CaCl}_2$  активували каскад кальцій-залежних стадій внутрішнього шляху згортання крові, а внесенням в цитратну плазму тромбіну ініціювали лише останню стадію каскаду, яка включає реакції безпосередньо утворення фібрин-мономеру і його полімеризації в фібрин.

Виявилось, що моноцити не впливають на процес фібриноутворення, оскільки форма відповідної кривої згортання/лізису не відрізнялася від контролю (рис. 3.1.). Нейтрофіли дещо знижували максимум поглинання, що може свідчити про зміни структури згустку в їх присутності.



*Рисунок. 3.1. Динаміка утворення та лізису фібринових згустків плазми крові в присутності моноцитів та нейтрофілів (1 млн/мл). Згортання ініціювали тромбіном (0,33 NIH од./мл) у цитратній плазмі, що містила попередньо доданий t-PA (20 од./мл). Контроль – безклітинна плазма крові. Представлено дані одного із серії експериментів*

При ініціюванні згортання кальцієм клітини значно скорочували лаг-період, і збільшували кут нахилу висхідної частини кривої згортання/лізису (рис. 3.2.). Зазначені зміни параметрів кривої свідчать про здатність моноцитів і нейтрофілів посилювати тромбіноутворення, стимулювати процес утворення протофібрил та їх латеральну асоціацію.

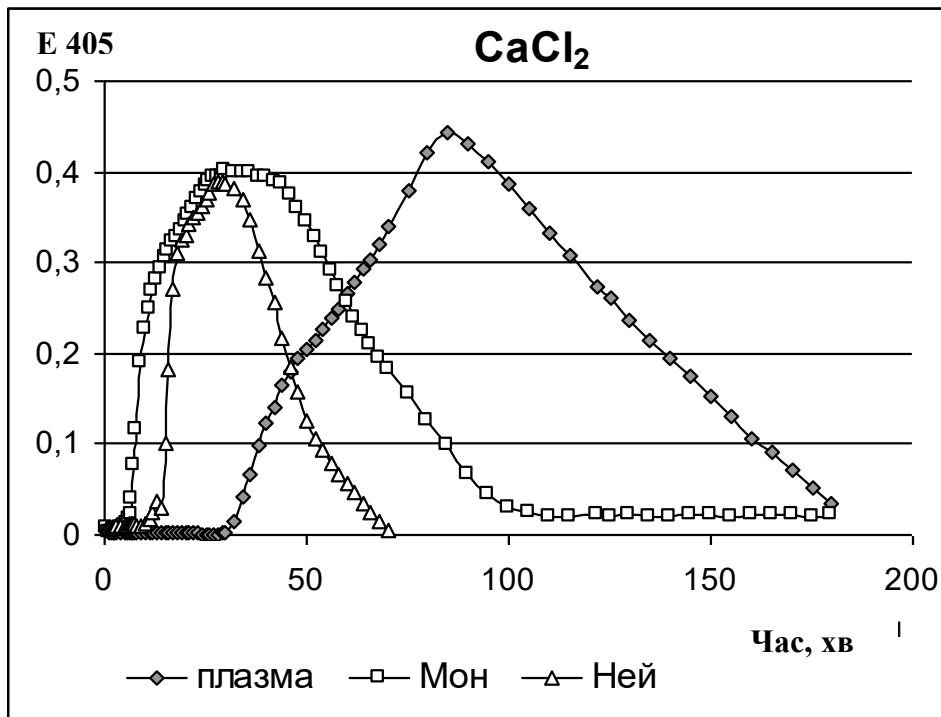


Рисунок. 3.2. Динаміка утворення та лізису фібринових згустків плазми крові в присутності моноцитів та нейтрофілів (1 млн/мл). Згортання ініціювали тромбіном  $\text{CaCl}_2$  (8 мМ) у цитратній плазмі, що містила попередньо доданий *t*-РА (20 од./мл). Контроль – безклітинна плазма крові. Представлено дані одного із серії експериментів

Вплив клітин на деградацію фібринових згустків оцінювали за зміною кута нахилу низхідної гілки кривих згортання/лізису. Встановлено, що моноцити і нейтрофіли несуттєво впливають на швидкість лізису згустків, утворених тромбіном (рис. 3.1.), проте значно прискорюють лізис фібринових згустків, сформованих шляхом рекальцифікації плазми (рис. 3.2.).

Порівняльний аналіз параметрів згортання і лізису для згустків, утворених в різних моделях, свідчить про різний модифікуючий вплив моноцитів і нейтрофілів (рис. 3.3.) на гемостатичний баланс.



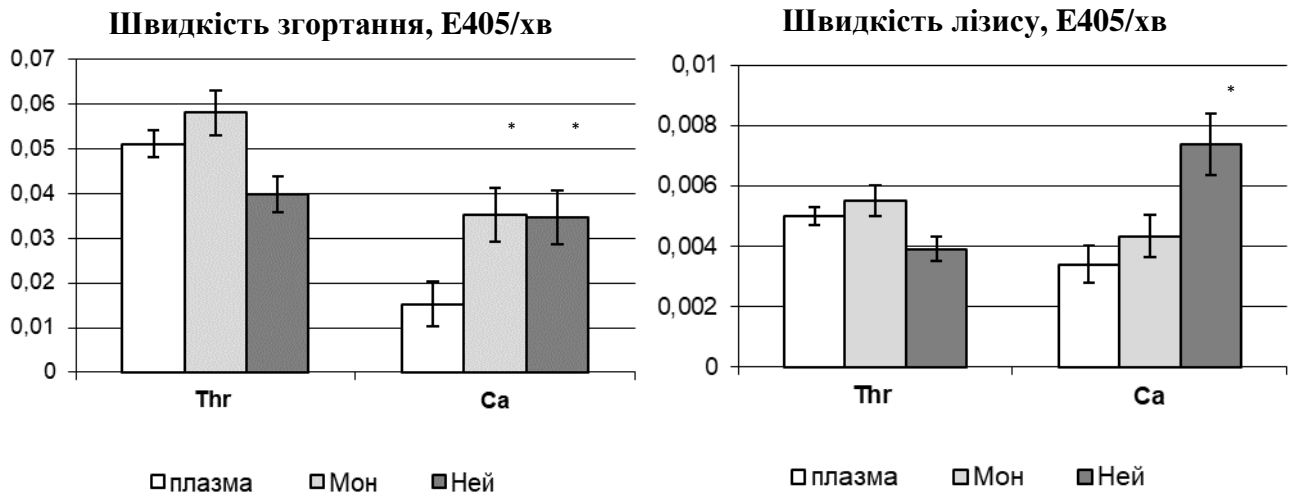


Рисунок 3.3. Вплив моноцитів та нейтрофілів на швидкість утворення та деградації фібринових згустків. Формування фібринових згустків ініціювали тромбіном (Thr) або хлоридом кальцію (Ca) у цитратній плазмі, що містила попередньо доданий t-PA. Дані представлені у вигляді M+SD. \* -  $p \leq 0,05$  ( $n > 3$ )

Моноцити, не впливаючи на стадію полімеризації фібрину екзогенним тромбіном, не змінюють і процес його подальшої деградації. Однак, перебуваючи в складі згустків, які формуються з рекальцифікованої плазми, моноцити збільшують швидкість згорання на 130% і швидкість лізису - на 26%, зміщуючи гемостатический баланс на користь прокоагулянтних процесів.

Вплив нейтрофілів на процеси згорання і лізису залежав від способу, яким ініціювали фібринуутворення. Для згустків, утворених тромбіном, в присутності нейтрофілів спостерігалось однакове зниження швидкостей згорання і лізису (приблизно на 20%). У складі згустків з рекальцифікованої плазми нейтрофіли викликали значне і майже рівноцінне підвищення швидкостей згорання і лізису (на 130% і 118%, відповідно). Це означає, що нейтрофіли не здатні коригувати гемостатичний баланс процесів згорання/лізису фібринових згустків, але можуть ефективно прискорювати їх, тим самим, скорочуючи загальний час існування тромбу.

Підсумовуючи, моноцити і нейтрофіли здатні посилювати продукцію ендogenousного тромбіну, тим самим скорочуючи час, необхідний для ініціації фібринуутворення. При цьому моноцити не впливають, а нейтрофіли незначно

змінюють щільність фібринового згустку, сформованого екзогенним тромбіном. Вперше показано, що моноцити чинять безпосередній вплив на формування фібринового згустку, зміщуючи гемостатичний баланс процесів згортання/лізису фібринових згустків на користь прокоагулянтних механізмів. Нейтрофіли, незначно впливаючи на гемостатичний баланс, з однаковою ефективністю прискорюють фібриноутворення і фібриноліз, що може скорочувати час існування тромбу в кров'яному руслі.

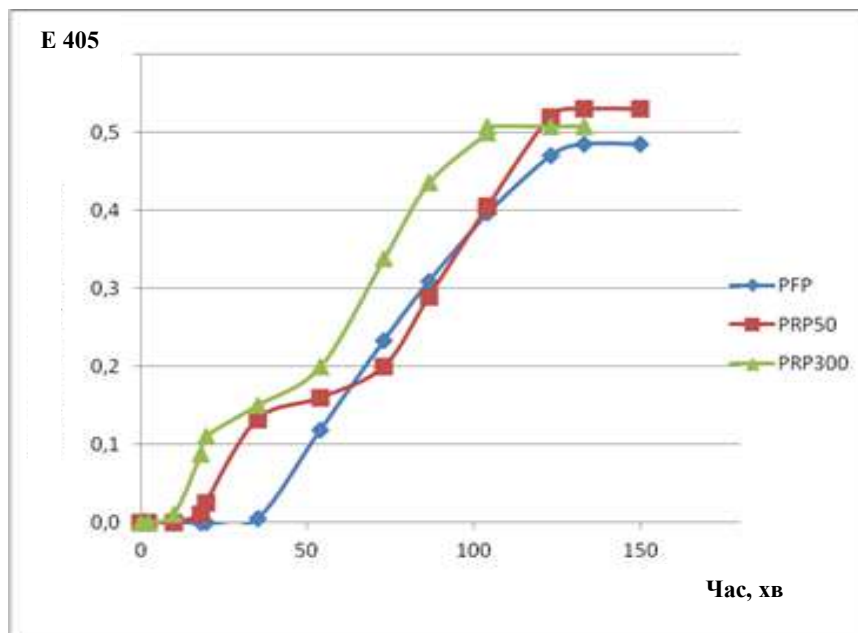
Ключовими компонентами клітинної ланки гемостазу є тромбоцити, здатні безпосередньо регулювати динамічний баланс між шляхами згортання крові та фібринолізу. Зокрема, вони забезпечують поверхню, на якій ініціюються, розвиваються та лімітуються генерування тромбіну, утворення фібрину та деградація тромбу. Специфічна взаємодія між поверхнею тромбоцитів та зимогенами факторів та кофакторів згортання крові забезпечує генерування тромбіну в концентраціях, необхідних для ефективної полімеризації фібрину. У той же час тромбін у високій концентрації здатен взаємодіяти з тромбомодуліном на поверхні тромбоцитів та здійснювати перетворення зимогену протеїну С на його активну форму - основний антикоагулянтний фермент, відповідальний за обмеження стадії пропагації у процесі згортання крові. В результаті залежне від тромбіну утворення фібрину, а також його полімеризація, теж обмежується. Окрім того, тромбоцити здатні регулювати фібриноліз, як сприяючи генерації плазміну, так і інгібуючи його, вивільняючи інгібітор активатора плазміногену PAI-1.

Таким чином, у системі гемостазу тромбоцити здатні проявляти різноспрямовані, плейотропні ефекти. Однак на даний час мало або взагалі немає інформації про внесок тромбоцитів у загальний гемостатичний баланс. Прокоагулянтна активність тромбоцитів та залежна від них стійкість фібринових згустків до фібринолізу добре встановлені для зовнішніх (терапевтичних) моделей лізису. Набагато ж менше відомо про участь тромбоцитів у регуляції утворення згустку та подальшому його розчиненні під час внутрішнього (фізіологічного) лізису.

Тож на наступному етапі досліджень з використанням турбідиметричного методу вивчали вплив тромбоцитів на параметри утворення та лізису фібринового згустку.

В якості джерела тромбоцитів використовували збагачену тромбоцитами плазму (PRP), оскільки при цьому стан як тромбоцитів, так і плазмових компонентів систем згортання крові та фібринолізу є мінімально зміненим.

Для дослідження впливу тромбоцитів на внутрішній шлях згортання, тромбоутворення ініціювали додаванням  $\text{CaCl}_2$  (кінцева концентрація 8 мМ) (рис. 3.4). Контролем слугувала свіжа плазма, вільна від тромбоцитів (PFP), отримана з аутологічної PRP.



*Рисунок 3.4. Динаміка утворення та лізису фібринових згустків плазми крові в присутності тромбоцитів, 50 млн/мл (PRP50) та 300 млн/мл (PRP300). Згортання ініціювали  $\text{CaCl}_2$  (8 мМ) у цитратній плазмі. Контроль – безклітинна плазма крові (PFP). Представлено дані одного із серії експериментів*

Полімеризація фібрину в рекальцифікованій плазмі, яка не містить клітин, спостерігалася після тривалої затримки та прогресувала досить повільно. Тривалість лаг-фази становила  $34,3 \pm 9,8$  хв, після чого фіксувалося повільне зростання оптичної густини зі швидкістю  $3,5 \pm 1,0$  мОД (оптичних

одиниць)/хв. Час досягнення максимального поглинання становив  $143,6 \pm 31,8$  хв, стабільний вихід на плато свідчив про повне згортання плазми.

Виявилось, що вплив тромбоцитів на згортання свіжої плазми значно залежав від їх концентрації. Полімеризація фібрину швидше ініціювалася у PRP з концентрацією 300 тис. клітин/мкл (PRP300), аніж у PRP з концентрацією 50 тис. клітин/мкл (PRP50), які, в свою чергу, ініціювали швидше згортання порівняно з контрольною PFP. Як прокоагулянти, тромбоцити скорочували лаг-фазу до  $20,0 \pm 5,0$  хв для PRP50 та  $10,0 \pm 2,9$  хв для PRP300 із середнім скороченням часу на 14 та 24 хв, відповідно, порівняно з PFP. Різниця у часі досягнення максимального поглинання становила в середньому 20 і 42 хв ( $123,3 \pm 20,8$  хв для PRP50 і  $104 \pm 23$  хв для PRP300 порівняно з  $143,6,4 \pm 31,8$  хв для PFP). Початкова швидкість збільшувалась у 2 рази та в 2,9 рази для PRP50 та PRP300, відповідно, порівняно з PFP. Таким чином, у PRP, вочевидь, після рекальцифікації посилювалось генерування ендogenous тромбіну.

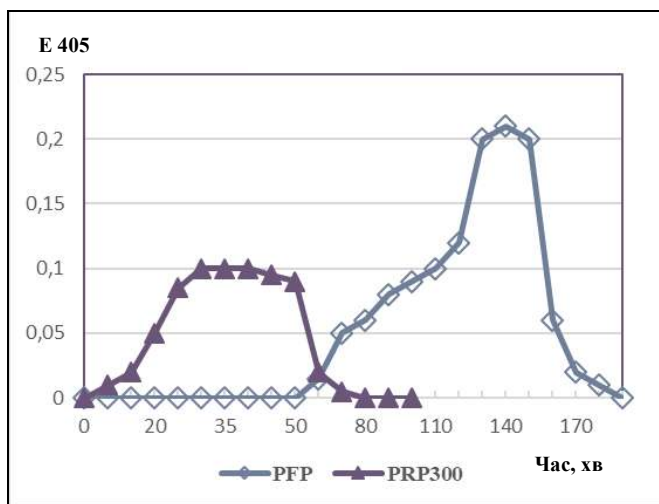
На наступному етапі для визначення впливу тромбоцитів на полімеризацію фібрину з його подальшим фібринолізом до плазми перед згортанням додавали екзогенний t-PA в об'ємі буферу. Концентрацію t-PA підбирали таким чином, щоб мінізувати дію PAI-1 у PFP та PRP (15 од./мл та 40 од./мл t-PA відповідно), що забезпечувало повний фібриноліз протягом не більше 3 годин.

При додаванні 15 од./мл екзогенного t-PA максимальне поглинання PFP знизилось в 2,2 рази (з  $0,508 \pm 0,093$  без t-PA до  $0,230 \pm 0,044$  після додавання t-PA), а час досягнення максимуму скоротився в 4,3 рази (з  $112,9 \pm 26,4$  без t-PA до  $22,0 \pm 2,9$  після додавання t-PA). Збільшення концентрації t-PA у PFP призвело до зміщення загального гемостатичного балансу у бік фібринолізу, що додатково підтверджувалося пропорційним зниженням значень площі під кривою до 25% та 14% нелізованого згустку після додавання 15 од./мл та 40 од./мл t-PA, відповідно ( $15,7 \pm 3,5$  та  $9,5 \pm 5,5$  порівняно з  $65,2 \pm 8,9$ ).

Застосування PRP замість PFP показало, що тромбоцити у концентрації 50 тис. клітин/мкл мало змінили форму кривої поглинання. Натомість після

додавання 15 од./мл t-PA для згустків, утворених з PRP300, в 2,1 рази збільшувався максимум поглинання та в 1,5 рази - площа під кривою згортання та лізису згустку порівняно із згустком, отриманим з PFP. Ці зміни свідчать про зміщення гемостатичного балансу в бік згортання, тобто за даних умов тромбоцити діють переважно як прокоагулянти. Вочевидь, тромбоцити, окрім прямого впливу на систему згортання крові, пригнічують активацію плазміногену, вивільняючи в процесі згортання/лізису інгібітор PAI-1 у кількості, співставній с кількістю екзогенного t-PA (15 од./мл), що заважає реалізації їх профібринолітичного потенціалу.

При додаванні 40 од./мл t-PA час існування згустків, та площа під кривою для згустків, утворених з PRP300, зменшувалися більш ніж у два рази порівняно з контролем з PFP (рис. 3.5). Очевидно, що t-PA у концентрації 40 од./мл здатен нейтралізувати активність PAI-1, секретованого активованими тромбоцитами під час згортання, та відновлювати їх фібринолітичну функцію. Таким чином, тромбоцити у фізіологічній концентрації можуть оптимізувати паралельні процеси згортання та фібринолізу, скорочуючи загальний час існування згустку.



*Рисунок 3.5. Динаміка утворення та лізису фібринових згустків плазми крові в присутності тромбоцитів, 300 млн/мл (PRP300). Згортання ініціювали  $\text{CaCl}_2$  (8 мМ) у цитратній плазмі, що містила попередньо доданий t-PA (40 од./мл). Контроль – безклітинна плазма крові (PFP). Представлено дані одного із серії експериментів*

Підсумовуючи, повільне згортання свіжої рекальцифікованої плазми дозволило виявити значну різницю в тривалості фази ініціації для згустків з різною концентрацією тромбоцитів та згустків, отриманих з PFP; початок полімеризації фібрину було прискорено у PRP50 та PRP300 у 1,7 та 3,4 рази відповідно порівняно з PFP. Скорочення часу досягнення максимуму та збільшення початкової та максимальної швидкості згортання також були прямопропорційними концентрації тромбоцитів. Ці дані узгоджуються з уявленнями про вирішальну роль тромбоцитів у підтримці внутрішнього шляху згортання крові.

Водночас, при оцінці ефекту тромбоцитів з використанням інтегрального параметру площі під кривою, виявилось, що тромбоцити в кількості 300 тис. клітин/мкл сприяли полімеризації фібрину не так ефективно, як 50 тис. клітин/мкл. А саме, значення величини площі під кривою для згустків, отриманих з PRP50, було вищим порівняно з згустками, отриманими PFP ( $71,6 \pm 15,3$  МОД\*хв порівняно з  $65,2 \pm 8,9$  МОД\*хв відповідно), тоді як значення площі під кривою для PRP300, навпаки, зменшувалось ( $31,4 \pm 10,1$  МОД\*хв).

На перший погляд ці результати здаються парадоксальними: вони свідчать, що зменшення кількості тромбоцитів змінює гемостатичний баланс в бік зсідання, в той час як тромбоцити у фізіологічній кількості, навпаки, зміщують його у бік фібринолізу.

Це явище можна пояснити неоднозначною роллю тромбоцитів у тромбоутворенні та фібринолізі. Внаслідок забезпечення колокалізації протеїнів з протилежними функціями (прокоагулянтними, антикоагулянтними та профібринолітичними) тромбоцити здатні проявляти різноспрямовані ефекти, виступаючи і як прокоагулянти, і як профібринолітики та регулюючи таким чином локальний гемостатичний баланс.

Фізіологічна концентрація t-PA в межах згустку в судинній системі може бути досить високою, оскільки він синтезується, секретується і утримується ендотеліальними клітинами судин, поблизу яких утворюється згусток. Окрім

того, показано, що тромбін *in vivo* може викликати швидке вивільнення великої кількості t-PA, яка значно перевищує і його звичайний рівень, і рівень інгібітора PAI-1 [Urano, 2012]. В наведеній експериментальній моделі з тромбоцитами, ми реконструювали подібні умови і показали, що високі фізіологічні концентрації t-PA можуть виробляти достатню кількість плазміну, здатного гідролізувати фібрин.

З огляду на наші дані, можна припустити, що тромбоцити у фізіологічній концентрації та за наявності відповідної концентрації t-PA можуть ефективно підсилювати як згортання, так і фібриноліз, обмежуючи час існування та розмір фібринового згустку.

### **3.2 Ендотелій-незалежна активація протеїну С як один з механізмів регуляції процесів тромбоутворення та фібринолізу клітинами крові**

Метою подальших досліджень стало з'ясування молекулярних механізмів, за якими тромбоцити, моноцити та нейтрофіли здатні регулювати процеси тромбоцтворення та фібринолізу. Як відомо, однією з систем, що підтримує рівновагу між процесами утворення та розчинення фібринового згустку, є система протеїну С.

Дуалістична природа тромбіну зумовлює його можливість регулювати як прокоагулянтні шляхи, спрямовані на утворення фібринових згустків, так і антикоагулянтні, які стримують надмірну продукцію фібрину [Di Cera, 2007]. Коли тромбін функціонує як антикоагулянт, його головною мішенню є неактивний профермент протеїн С, який він обмеженим протеолізом перетворює на активований протеїн С. Окрім тромбіну, РС може бути активований фактором згортання крові Ха: позитивним регулятором цієї реакції є кофактор Va. Для активації РС важливе значення мають також мембранні фосфоліпіди та інші від'ємно заряджені сполуки [Rezaie, 1998]. За певних умов конвертація РС в APC може здійснюватися плазміном чи безпосередньо самим APC за механізмом автоактивації [Varadi, 1994; Nassouna, 2002].

У судинному руслі утворення APC тромбіном відбувається переважно на поверхні ендотеліальних клітин, де локалізовані інші ключові кофактори системи активації PC - тромбомодулін та ендотеліальний рецептор протеїну C. Проте тромбомодулін було виявлено й на поверхні клітин крові, зокрема, моноцитів та тромбоцитів. Ці клітини затримуються у сітці фібрину при формуванні повноцінного тромбу та контактують з тромбіном і PC, інкорпорованими в об'ємі фібринового згустку. Отже, тромбоутворення створює передумови для запуску механізму активації PC *in situ*. Однак, нині існування та ефективність цього механізму не досліджені.

Фібрин, що утворюється тромбіном під час формування кров'яного згустку, ініціює роботу системи фібринолізу, виступаючи кофактором так званого тричленного активаторного комплексу. Подібне комплексоутворення забезпечує високоспецифічну активацію проензиму плазміногену тканинним активатором плазміногену на поверхні фібрину. При цьому утворюється протеолітичний ензим плазмін, фізіологічним субстратом якого є саме фібрин. Розщеплюючи його, плазмін забезпечує протеолітичну деградацію фібринових згустків і кров'яних тромбів, зокрема. У дослідах з розчинами очищених білків було показано здатність плазміну активувати PC через обмежений протеоліз. Проте, чи має ця властивість плазміну певне значення для активації PC в об'ємі тромбу, наразі невідомо.

Для дослідження молекулярних механізмів, за якими клітини крові здатні регулювати згортання крові та фібриноліз, вивчали можливість активації PC на клітинах крові за ендотелій-незалежним механізмом. Для цього на першому етапі дослідження було використано модель тромбоутворення та наступного лізису згустків, отриманих *in vitro* з цільної крові.

Як відомо, тромбін здійснює пряму ініціацію каскаду згортання крові із залученням загальної ланки внутрішнього та зовнішнього шляхів згортання крові. У наших дослідах екзогенний тромбін з активністю 1 NIH од./мл забезпечував швидке (протягом 1-ї хвилини) згортання цільної крові та утворення міцних згустків. Зразки крові без додавання тромбіну також



утворювали згусток, але протягом 5-10 хв. Як відомо, спонтанне згортання крові здійснюється завдяки уповільненому фібриноутворенню, яке регулюється поступовим накопиченням ендогенного тромбіну. За його продукцію відповідає каскадна система білків внутрішнього шляху згортання, початкові стадії якої чутливі до контактної активації аніонною поверхнею. В цій системі є дві мішені, на які спрямована антикоагулянтна активність АРС: теназний і протромбіназний комплекси. Натомість, тромбоутворення, спричинене екзогенним тромбіном, не підпадає під антикоагулянтну дію АРС.

Під час дослідів було виявлено здатність всіх штучно утворених згустків крові до лізису, як спонтанного (рис. 3.6, варіанти 1, 3, 5 і 7), так і стимульованого екзогенним тканинним активатором плазміногену (рис. 3.6, варіанти 2, 4, 6 і 8). Тканинний активатор плазміногену більш ефективно прискорював лізис згустків, утворених тромбіном, ніж сформованих контактною активацією: маса згустків у варіанті 6 зменшувалась на 24-ту годину лізису відносно варіанта 5 на 54 %, а у варіанті 2 відносно варіанта 1 - лише на 24 % .

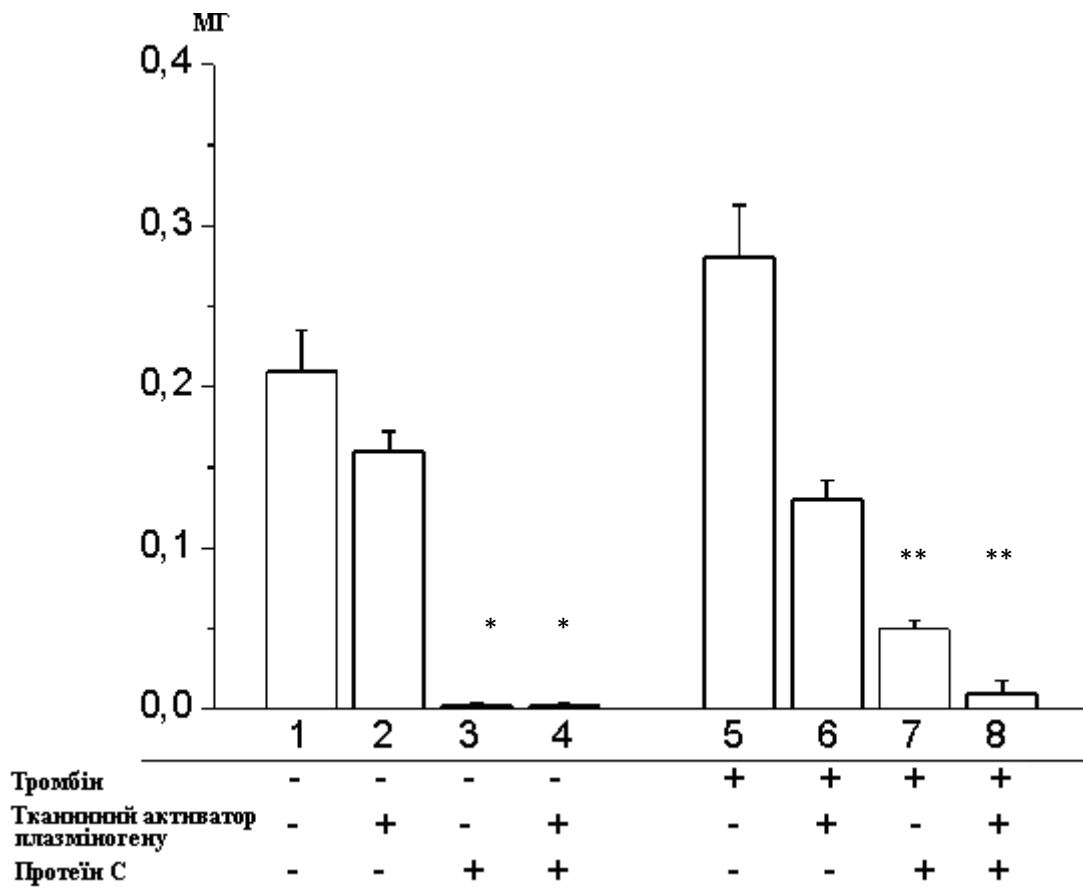


Рисунок 3.6. Маса згустків, утворених з цільної крові в присутності тканинного активатора плазміногену (1,68 од./мл) та протеїну С (0,268 мкг/мл) через 24 год від ініціації зсідання. А – спонтанно утворені згустки, Б – згустки, утворені екзогенним тромбіном (1 NIH од./мл). \* $P < 0,05$  – відносно варіанту 1; \*\*  $P < 0,05$  – відносно варіанту 5 ( $n=5$ )

Візуальні спостереження за динамікою тромболізу та кінцева маса згустків на 24-ту годину лізису свідчили про значне прискорення деградації згустків екзогенним РС. Його додавання як окремо, так і в поєднанні з тканинним активатором плазміногену призводило до значної деградації згустків, утворених тромбіном: остаточної маса згустку у варіанті 7 становила лише 18 % відносно варіанту 5, де РС не додавали. Поєднання РС і тканинного активатора плазміногену зумовило майже повний лізис, в результаті маса деградованих згустків у варіанті 8 зменшувалась приблизно до 5 % від варіанту 5. Ще суттєвішим був стимулюючий вплив РС на швидкість лізису згустків, сформованих спонтанно, що призводило до повної їх деградації (варіанти 3 і 4).

Слід зазначити, що PC не виявляє будь-якої самостійної протеолітичної активності, оскільки є неактивним попередником ферменту APC. Перевірка спонтанної амідолітичної активності препарату протеїну С, який було використано у досліджах, показала повну відсутність слідів APC. Отже, виявлене нами прискорення тромболізису, спричинене додаванням PC, може бути функціональним тестом, який вказує на утворення APC в реакції його активації із зимогену, яка відбувається в процесі тромбоутворення чи тромболізису. Новоутворений APC здатен стимулювати тромболізис як антикоагулянт, змінюючи структуру фібринового згустку в процесі тромбоутворення або як профібринолітик, знижуючи активність інгібіторів фібринолізу, що прискорює тромболізис [Gruber, 1994]. Ймовірно, тромболітичний ефект PC відносно згустків, утворених спонтанно, обумовлений поєднанням його профібринолітичної та антикоагулянтної дії. Натомість, застосування екзогенного тромбіну для згортання крові значно обмежує антикоагулянтну функцію PC внаслідок швидкого утворення згустків та сприяє його профібринолітичій дії.

Виявлення функціональної активності, притаманної для APC, в зразках з екзогенним PC є непрямим доказом його активації в процесі тромбоутворення та тромболізису. Прямим доказом конверсії PC в APC, вочевидь, має бути зменшення кількості проензиму в об'ємі зразка з одночасним наростанням кількості його ензимної форми, про що свідчать зміни амідолітичної активності APC у лізатах.

Представлені результати визначення індукованої та фонові амідолітичної активності у лізатах (рис. 3.7) свідчать, що на початку лізису в усіх контрольних і дослідних варіантах фонові активності були несуттєвими (навіть у варіантах із додаванням тромбіну).

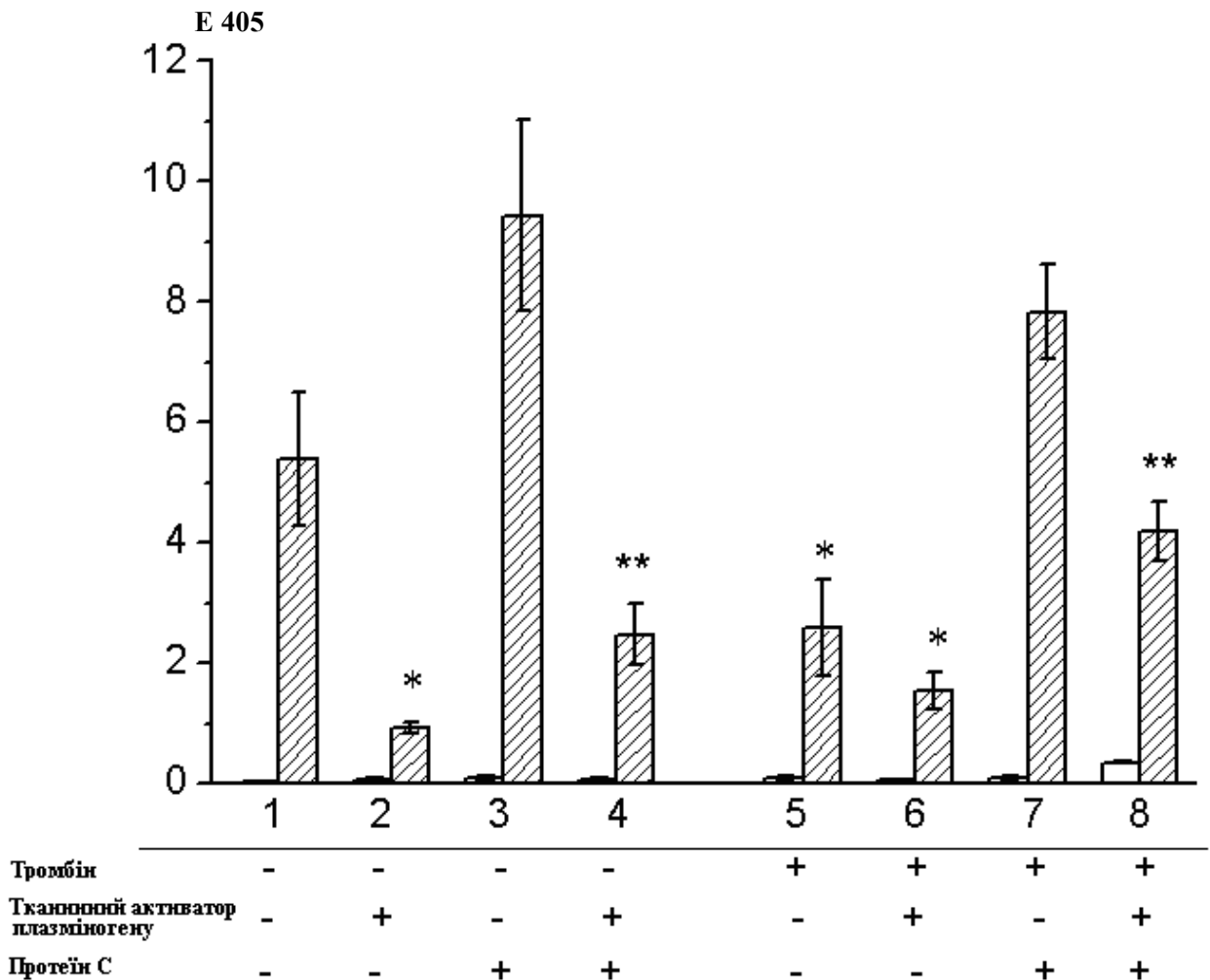


Рисунок 3.7. Фонова (білі стовпці) та індукована (смугасті стовпці) амідолітична активність у лізатах на початку лізису ( $n=5$ ). Варіанти 1-4 – спонтанно утворені згустки, варіанти 5-8 – згустки, утворені екзогенним тромбіном. \* -  $p<0,05$  – відносно варіанту 1, \*\* -  $p<0,05$  – відносно варіанту 3

Індукована активність, яка відображує кількість вільного РС, знижувалась відносно відповідних контрольних значень (варіанти 1 та 3) в усіх варіантах з додаванням тканинного активатора плазміногену і тромбіну. А саме, інкорпорування екзогенного тканинного активатора плазміногену до згустків, утворених спонтанно, призводило до зникнення 83 % індукованої активності ендogenous РС у варіанті 2 відносно варіанту 1 та 74 % сумарного РС (ендогенний та екзогенний) у варіанті 4 відносно варіанту 3. Якщо до плазми додавали лише тромбін і не вносили інших білків (варіант 5), також спостерігали зниження кількості ендogenous РС: вона зменшувалась на 53 %

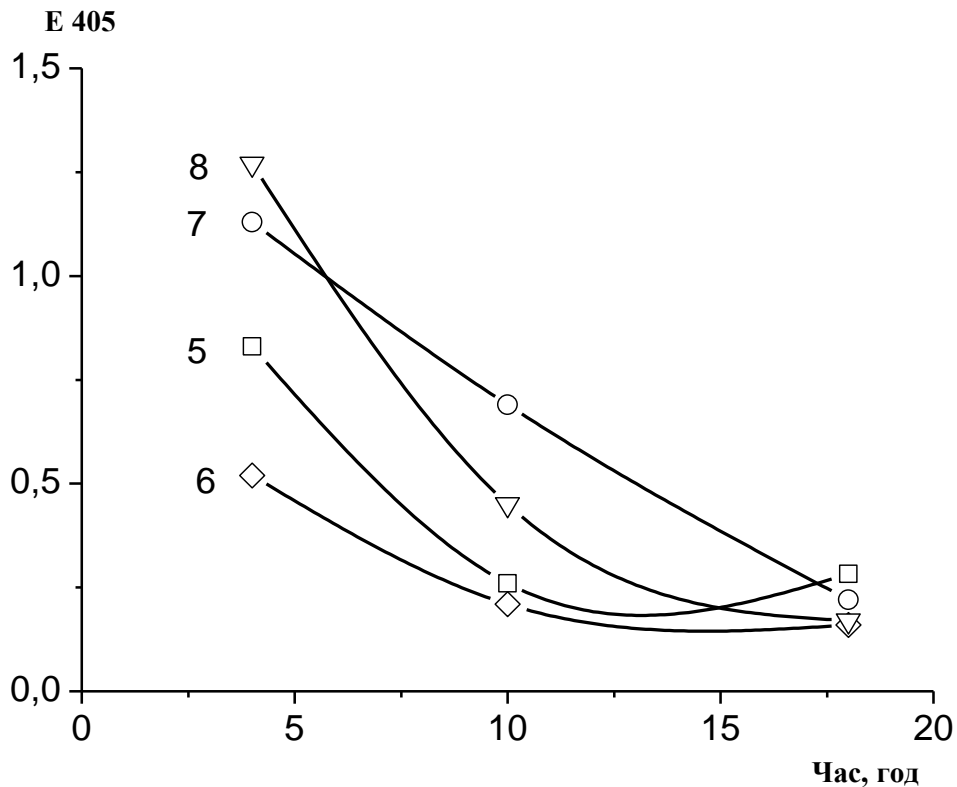
відносно контрольного варіанту 1. Екзогенний тканинний активатор плазміногену у варіанті 6 підсилював ефект зниження кількості ендogenous РС тромбіном ще на 19 %, а загальне зниження становило 72 %.

Треба відмітити, що внесення екзогенного РС у варіанті 3 в кількості, що дорівнювала 6,5 % від його концентрації в плазмі, призвело до додаткового збільшення індукованої амідолітичної активності у лізатах на 75 % відносно варіанту 1. В лізатах згустків, утворених тромбіном, у варіанті 7 кількість сумарного РС знижувалась лише на 17 % порівняно з варіантом 3, в якому тромбін не додавався; втім після інкорпорування в згусток тканинного активатора плазміногену (варіант 8) в лізатах залишалось всього 44 % РС від його кількості у варіанті 3.

Як уже відмічалось, зростання фонові амідолітичної активності як індикатора накопичення APC наразі було незначним у порівнянні з індукованою активністю. Ймовірно, новоутворений APC швидко інактивується потужним інгібіторним потенціалом крові. Зокрема, APC можуть нейтралізувати такі інгібітори тромбоцитарного походження, як PAI-1 та нексин 1. У нативній плазмі крові APC зв'язується також з  $\alpha 2$ -макроглобуліном та  $\alpha 2$ -антиплазміном. Як відомо, саме здатність APC незворотно зв'язувати інгібітори фібринолізу зумовлює його профібринолітичну дію [Wonher, 2008; Heeb, 1991].

Виявлені в процесі тромболізу зміни кількості РС у лізатах свідчать про більш суттєве витрачання проферменту за стимуляції системи фібринолізу екзогенним тканинним активатором плазміногену, що зумовлює більш потужну продукцію плазміну. За даними літератури, тромбін, внесений у плазму чи незмінену кров повністю інактивується інгібіторами плазми протягом 20 - 30 хв [Nemker, 2000]. Тому максимальна здатність екзогенного тромбіну до активації РС має обмежуватися часом утворення і стабілізації тромбу. В нашому експерименті лізис утворених тромбіном згустків крові починався не раніше ніж через 2 год від моменту згортання. Отже, активаторна дія тромбіну під час тромбоутворення мала призводити до зниження вмісту РС в лізатах лише на

початковій стадії лізису, надалі не впливаючи на його кількість. Втім, як свідчать результати, представлені на рис. 3.8., протягом наступних 10 год руйнації згустків вміст РС в лізатах поступово знижувався, що вказує на певний взаємозв'язок між системами плазміноген/плазміну та активації РС.



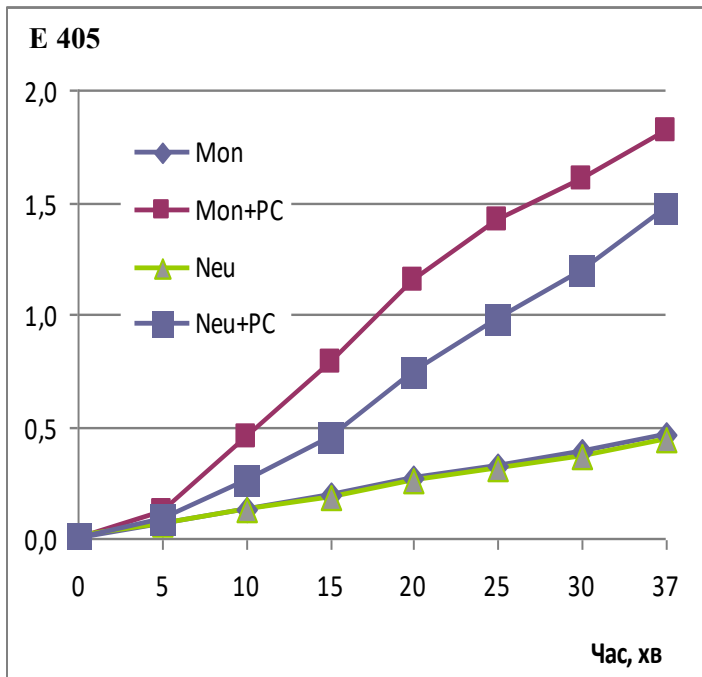
*Рисунок 3.8. Зміни індукованої амідолітичної активності в процесі деградації згустків, утворених тромбіном з крові: 5 – без внесення інших білків; 6 – внесення тканинного активатора плазміногену; 7 – внесення протеїну С; 8 – внесення тканинного активатора плазміногену разом із протеїном С*

Отже, зміни вмісту РС в об'ємі ізольованого згустку мають контролюватись тромбіном на стадії тромбоутворення та системою фібринолізу на стадії тромболізису.

На підставі отриманих результатів нами сформульовано гіпотезу про існування ендотелій-незалежного шляху активації протеїну С у плазмі крові, ефективність якого підвищується в процесі тромболізису. Біохімічний механізм подібного способу активації РС залишається нез'ясованим, що спонукало на продовження наукового пошуку.

Наступний етап досліджень був спрямований на з'ясування конкретних структур й процесів, які мають бути залучені до активації РС в ізолюваному об'ємі тромбу. З даних літератури відомо, що на поверхні тромбоцитів виявляють до 50 тис. молекул тромбомодуліну, на поверхні нейтрофілів – до 5 тис., на поверхні моноцитів - від 10 до 20 тис. [Suzuki, 1988; Conway, 1992]. Отже, в умовах накопичення тромбіну в локальному оточенні цих клітин існує реальна можливість утворення середовища для активації протеїну С. Оцінка рівня APC, що утворюється за участі клітин крові, ускладнюється завдяки їх здатності продукувати спектр інгібіторів, які блокують вторинні сайти зв'язування ензиму (зокрема,  $\alpha$ 2-макроглобулін) чи активний центр ферменту (РСІ або PAI-1). Отже, клітини з потужним інгібіторним потенціалом можуть бути недооцінені з точки зору їх ролі в постачанні функціонально активного APC для регуляції тромбоутворення та тромболілізу. Тому найбільш доцільним, на наш погляд, є методичний підхід, спрямований на виявлення новоутвореного APC за його функціональною активністю в умовах, в яких він синтезується, залучається до взаємодії з білками-партнерами та досить швидко інактивується. Перевагою такого підходу є те, що незважаючи на інгібування певної кількості APC, система РС відновлює його рівень за рахунок безперервної конверсії нових молекул РС до APC за участі комплексу тромбін-тромбомодулін на поверхні клітин крові. Аналогічно, на клітинній поверхні можуть збиратися теназний і протромбіназний комплекси для підтримки рівня тромбіну, необхідного, окрім іншого, й для активації РС.

Для перевірки можливості активації РС на поверхні клітин крові спочатку було здійснено активацію препарату протеїну С тромбіном з додаванням моноцитів та нейтрофілів та специфічного хромогенного субстрату S-2366. І дійсно, вже на 10 хвилині в присутності клітин відбувалося перетворення протеїну С на його активовану форму (рис. 3.9)

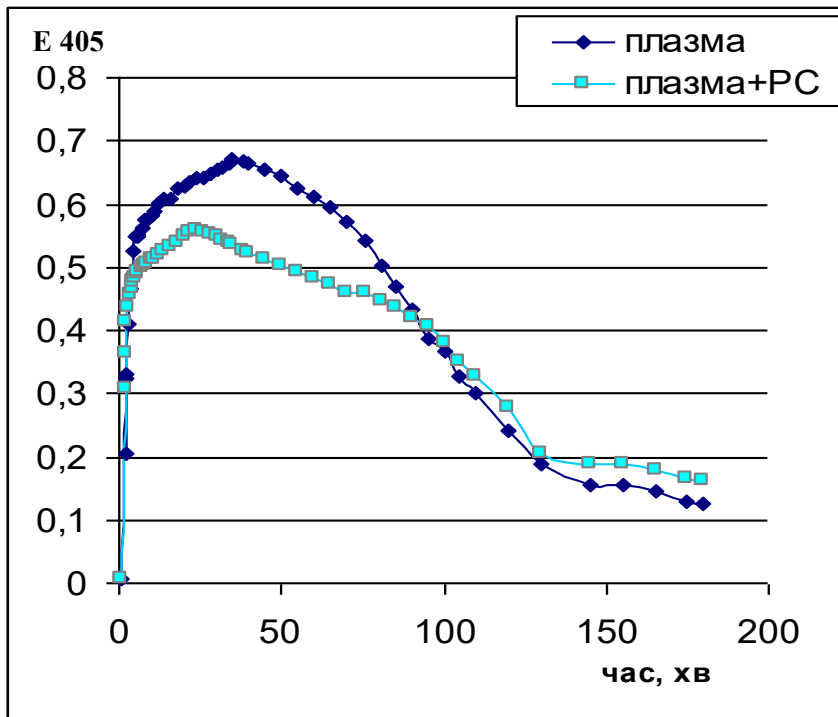


*Рисунок 3.9. Генерування активованого протеїну С в реакційному середовищі, яке містить проензим РС (0,4 мкг/мл), тромбін (0,15 NIH од./мл), специфічний для протеїну С хромогенний субстрат S-2366 в присутності моноцитів (Mon) та нейтрофілів (Neu)*

Як відомо, РС презентується на комплекс тромбін-тромбомодулін лише після зв'язування його Gla-домену з поверхнею плазматичної мембрани кількома кальцієвими містками. Додавання в систему іонів кальцію сприяє концентруванню РС на поверхні клітин, а також стимулює продукцію ендогенного тромбіну – другого активного компоненту системи активації протеїну С. Отже, на наступному етапі досліджували вплив моноцитів й нейтрофілів на систему активації РС в процесі формування та лізису фібринових згустків, утворених екзогенним тромбіном з рекальцифікованої плазми.

Було встановлено, що додавання проензиму РС в безклітинну рекальцифіковану плазму у кількості, що складає 5% від його плазматичного пулу, викликало зниження рівня утвореного фібрину та призводило до скорочення часу початку його деградації на 14 хв (рис. 3.10).

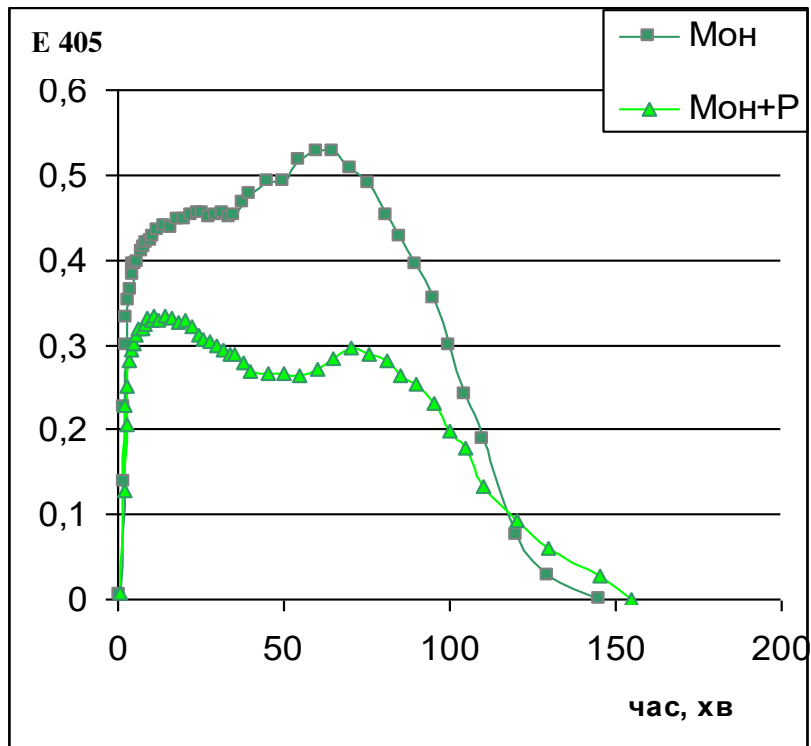




*Рисунок 3.10. Вплив протеїну C (0,4 мкг) на кінетику утворення та лізису фібринових згустків. Згортання ініціювали тромбіном у рекальцифікованій плазмі*

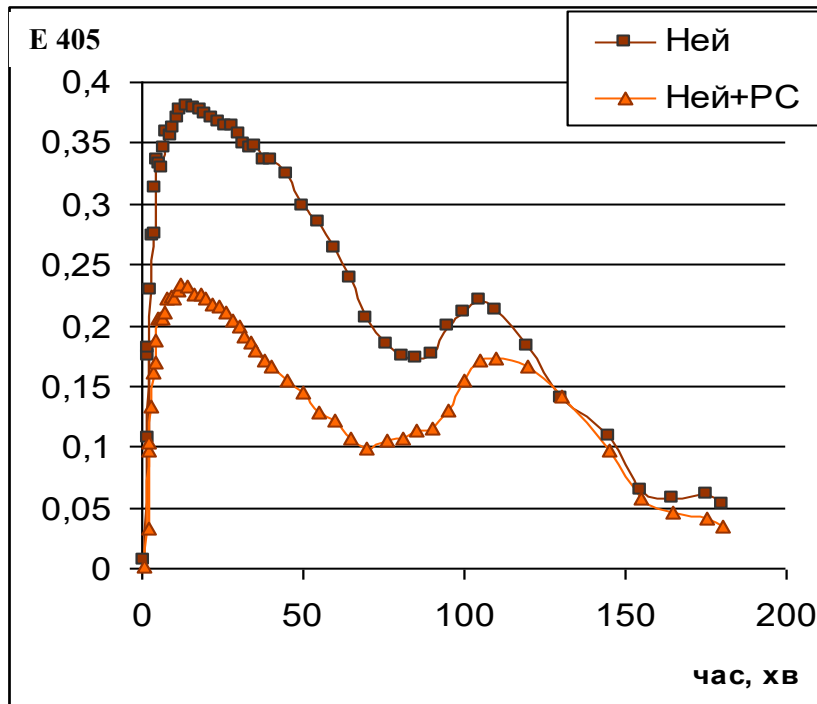
При цьому швидкість лізису у порівнянні з контролем дещо зменшувалась. Це може свідчити про певну здатність рекальцифікованої плазми підтримувати активацію PC та частково інгібувати новоутворений APC. За даними літератури, активація PC в плазмі може здійснюватись із залученням так званого «розчинного» тромбомодуліну, який знаходиться на поверхні фосфоліпідних мембран мікрочасток, що утворюються внаслідок загибелі частини клітин та везикуляції фрагментів зруйнованих плазматичних мембран.

В присутності моноцитів додавання екзогенного PC призводило до зниження максимальної концентрації утвореного фібрину на 40-45% та скорочення часу початку лізису на 43 хв (рис. 3.11). Втім, друга хвиля фібриноутворення зберігалась, швидкість лізису після цього зменшувалась и в результаті повний лізис фібринового згустку закінчувався одночасно з контрольним.



*Рисунок 3.11. Вплив протеїну С (0,4 мкг) на кінетику утворення та лізису фібринових згустків в присутності моноцитів. Згортання ініціювали тромбіном у рекальцифікованій плазмі*

В присутності нейтрофілів екзогенний РС ніяк не впливав на форму кінетичної кривої, не призводив до скорочення часу початку лізису, проте також значно знижував продукцію фібрину: на 40% для першої хвили фібриноутворення та на 23% - для другої (рис. 3.12).



*Рисунок 3.12. Вплив протеїну С (0,4 мкг) на кінетику утворення та лізису фібринових згустків в присутності нейтрофілів. Згортання ініціювали тромбіном у рекальцифікованій плазмі*

Слід відмітити, що згустки, що містили нейтрофіли, починали деградувати вже на 12-й хв, тобто значно раніше за контрольні. Через годину від ініціації фібриноутворення кількість фібрину в цих згустках була найменшою, складаючи 25% і 44% від його кількості в контрольних і моноцит-вмісних згустках, відповідно. Отже, нейтрофіли забезпечують найбільш ефективний взаємозв'язок між системами активації РС та плазміноген/плазміну. Активованій протеїн С, який з'являється при цьому в плазмі, стимулює процес деполімеризації фібрину на перших етапах деградації фібринового згустку. Напевно, в об'ємі згустка цей пул АРС швидко виснажується потужною інгібіторною активністю нейтрофілів, про що свідчить зменшення кута нахилу правої гілки кінетичної кривої, а також поява другої хвилі фібриноутворення (рис. 3.12).

Таким чином, можна стверджувати, що взаємодія систем активації РС і плазміноген/плазміну, опосередкована нейтрофілами, призводить до стимуляції

гідролітичного розщеплення фібрину протягом початкового часу лізису, а моноцитами – на більш пізніх етапах.

Отже, в присутності клітин крові відбувається утворення функціонально активного протеїну С, що здатен чинити як антикоагулянтну, так і профібринолітичну дію. Таким чином, ми вперше показали існування ендотелій-незалежного шляху активації протеїну С.

### **3.3 Дослідження участі тромбоцитів в формуванні та лізисі фібринового згустку з використанням конфокальної мікроскопії**

На сьогоднішній день вже розкрито достатньо багато молекулярних механізмів, які забезпечують складний та елегантний процес згортання та лізису фібринового згустку. Однак, оскільки до процесів тромбоутворення та фібринолізу залучаються не тільки компоненти плазми, але також і клітини крові, залишається все ще багато питань щодо ролі клітинної ланки гемостазу, зокрема тромбоцитів, у цих процесах.

Тож на наступному етапі вивчення координування тромбоутворення та фібринолізу за участі клітин крові було продовжено дослідженням механізмів, за якими до нього залучаються тромбоцити.

Сучасні дослідження надають все більше доказів того, що тромбоутворення та тромболізис, незважаючи на антагонізм, водночас є взаємодоповнюючими та спорідненими процесами, які підтримують динамічний гемостатичний баланс. Вони є взаємопов'язаними, починаючи з найбільш ранніх стадій утворення тромбу. Так, сам фібрин здатен модулювати фібриноліз, будучи водночас субстратом для плазміну та матрицею для зв'язування плазміногену і t-РА, активації плазміногену до плазміну, та захисту плазміну від  $\alpha 2$ -антиплазміну.

Тромбоцити значно ускладнюють цю картину. З одного боку, вони здатні регулювати реакції згортання, створюючи прокоагулянтну поверхню, експонуючи фосфатидилсерин, зв'язуючи фактори згортання через глікопротеїни та інтегрини, завдяки PAR-рецептор-залежному сигналінгу, а

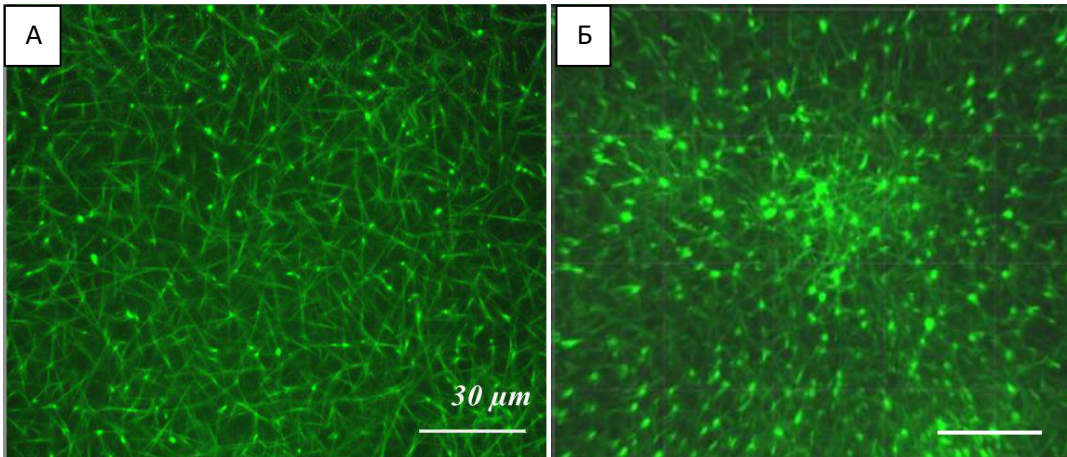
також «використовуючи» поліфосфати; з іншого боку, є свідчення про важливу роль тромбоцитів у процесі фібринолізу. Зокрема, якщо донедавна вважалось, що тромбоцити в основному інгібують фібриноліз за допомогою секреції PAI-1 та  $\alpha 2$ -антиплазміну, то наразі доведена роль фосфатидилсерин-експонуючих тромбоцитів у зв'язування плазміногену, і таким чином, їх значення у підсиленні фібринолізу [Whyte, 2017].

Роль тромбоцитів виглядає ще більш неоднозначною, якщо враховувати свідчення, що різні популяції тромбоцитів мають різне регуляторне значення в процесі формування тромбу.

Нарешті, швидкість потоку крові також має значення у процесі формування тромбу та його подальшого лізису, впливаючи на швидкість транспортування протеїнів зсідання та фібринолізу, їх накопичення та елімінацію, таким чином регулюючи генерування тромбіну та фібрину, ініціацію тромбоутворення, формування його гетерогенної структури та швидкість розчинення.

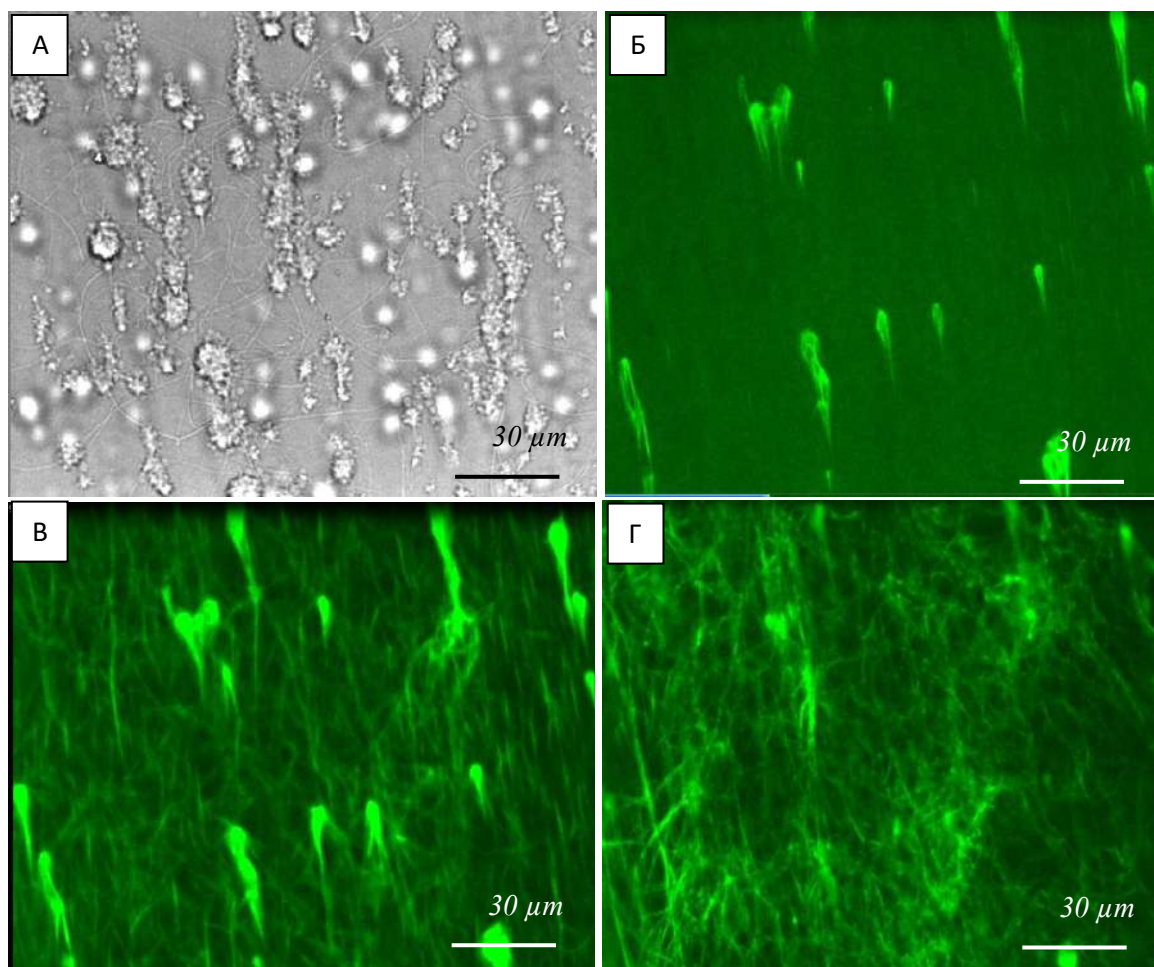
Тому наступним завданням нашої роботи було візуалізувати взаємодію фібринової сітки та агрегатів тромбоцитів, їх роль у t-PA-залежній активації фібринолізу в плазмі людини, а також вплив тромбоцитів на формування та лізис тромбів у режимі реального часу, що мало б допомогти виявити основні регуляторні ланки, на яких тромбоцити здатні координувати процеси згортання та лізису.

На першому етапі методом конфокальної мікроскопії досліджували вплив тромбоцитів у складі плазми на структуру згустку в статичних умовах. Для візуалізації фібрину використовувався Alexa Fluor 488-мічений фібриноген. З'ясувалось, що тромбоцити виступали своєрідними «центрами організації» архітектуру згустку, в процесі його дозрівання формуючи його гетерогенну структуру, з більш щільним пакуванням на агрегатах тромбоцитів (можливо, внаслідок більшої концентрації генерованого тромбіну) та менш щільним розташуванням фібрил на відстані від агрегатів тромбоцитів (Рис. 3.13.)



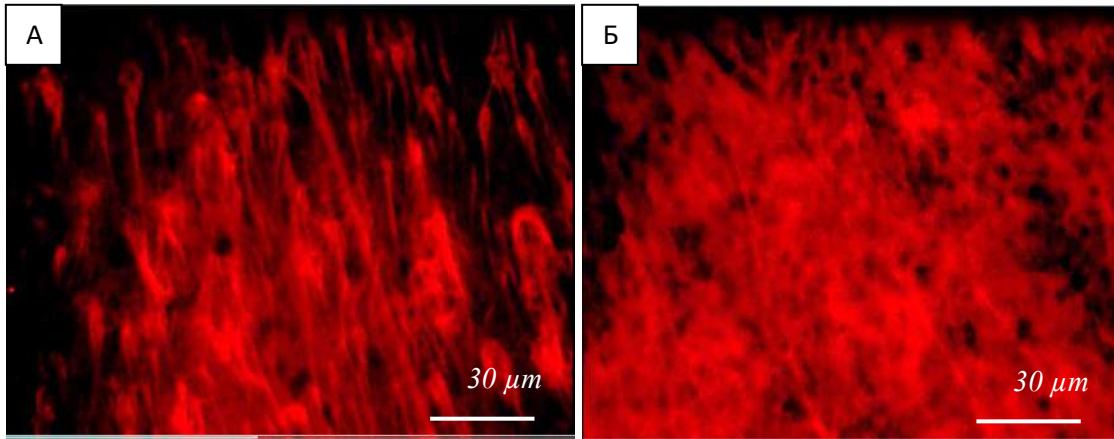
*Рисунок 3.13. Дані конфокальної мікроскопії структури тромбоцит-вмісних фібринових згустків з додаванням Alexa Fluor-488-міченого фібриногену (зелений колір) в статичних умовах. А – структура згустку, сформованого у безклітинній плазмі, Б – структура згустку, сформованого у плазмі, збагаченій тромбоцитами, на 60 хвилину після ініціації згортання хлоридом кальцію (8 мМ)*

Наступним етапом було дослідження процесу формування фібринової сітки за умов фізіологічного току крові. За таких умов тромбоцити спочатку утворювали мікроагрегати на колагені протягом перших 3 хвилин контакту крові з колагеном (Рис 3.14, світлопольне зображення). Ініціація генерування фібрину починалася саме зі сформованих мікроагрегатів тромбоцитів, пізніше продовжуючись у просторі між ними, що в результаті призводило до ретракції, стягування фібринової сітки та формування її архітектури (рис. 3.14, Б, В, Г).



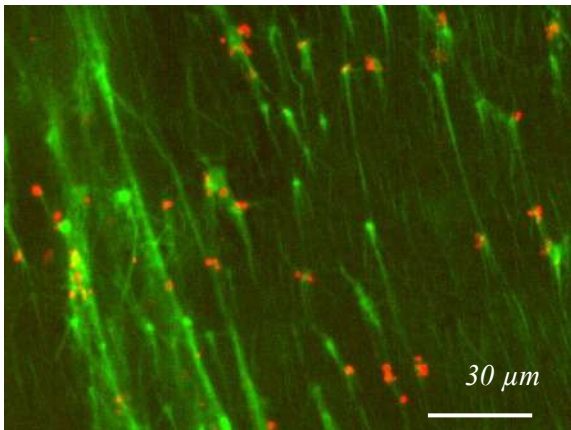
*Рисунок 3.14. Дані конфокальної мікроскопії формування полімерного фібрину в цільній крові з додаванням Alexa Fluor-488-міченого фібриногену (зелений колір): А – мікроагрегати тромбоцитів на колагені у видимому світлі; утворення полімерного фібрину на мікроагрегатах стимульованих колагеном тромбоцитів через 0 сек (Б), 60 сек (В) та 150 сек (Г)*

Для дослідження динаміки сполучених процесів згортання та початку лізису також проводили експерименти з додаванням Alexa Fluor 647 - міченого плазміногену. Було встановлено, що акумуляція плазміногену спостерігалася з незначним зсувом після утворення перших фібринових волокон (приблизно у 30 секунд). Більша частина плазміногену колокалізувалась з фібрином на мікроагрегатах тромбоцитів, а в подальшому - з фібрином у просторі між ними.



*Рисунок 3.15. Дані конфокальної мікроскопії міченого Alexa Fluor-647 плазміногену (червоний колір), зв'язаного з фібрином через 90 сек (А), 180 сек (Б) після утворення мікроагрегатів стимульованих колагеном тромбоцитів*

Для вивчення ролі субпопуляцій тромбоцитів у процесах тромбоутворення було візуалізовано фосфатидилсерин-експонуючі тромбоцити у структурі сформованих мікроагрегатів шляхом додавання міченого анексину V (Alexa Fluor 488-міченого в експериментах з плазміногеном, Alexa Fluor 647-міченого в експериментах з фібриногеном).



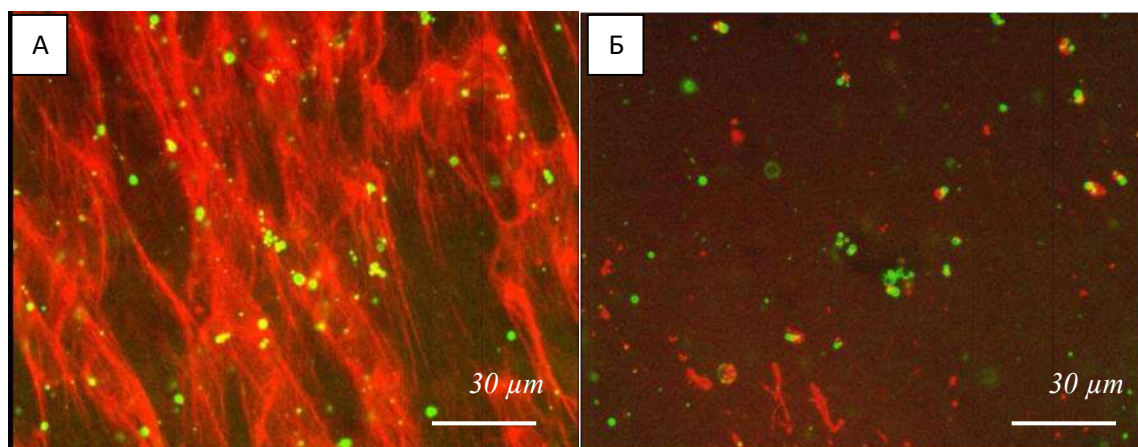
*Рисунок 3.16. Дані конфокальної мікроскопії утворення полімерного фібрину на мікроагрегатах тромбоцитів через 180 сек після стимуляції колагеном. Фосфатидилсерин-експонуючі тромбоцити виявляли анексином V, міченим Alexa Fluor-647 (червоний колір). Фібриноген мітили Alexa Fluor-488 (зелений колір).*

Поява фосфатидилсерин-експонуючих тромбоцитів також спостерігалась вже на досить ранніх стадіях формування фібринових волокон (протягом



перших 3 хвилин); згодом, в процесі формування тромбоцитарних мікроагрегатів, утворення фібрину та посилення активації тромбоцитів, кількість аннексин V-позитивних клітин зростала. В наших умовах ця субпопуляція тромбоцитів здебільшого акумулювалася на периферії мікроагрегатів (рис. 3.16.).

Для наступного дослідження ролі тромбоцитів у подальшому лізисі в реальному часі ми використовували модель з додаванням міченого плазміногену та попередньо доданого t-PA. За цих умов процес лізису візуалізувався через 16 хвилин після початку утворення мікроагрегатів, а повний лізис зразків відбувався протягом 30-40 хв. Більш того, процес лізису був найбільш інтенсивним навколо ділянок скупчення тромбоцитів, які експонували фосфатидилсерин. Ці результати можуть свідчити, що більш активовані тромбоцити, слугуючи осередками ініціації утворення фібрину, також відіграють ключову роль в ініціюванні подальшого лізису (рис. 3.17).



*Рисунок 3.17. Дані конфокальної мікроскопії лізису полімерного фібрину в цільній крові з попередньо внесеним тканинним активатором плазміногену, з додаванням міченого Alexa Fluor-647 плазміногену (червоний колір) і міченого Alexa Fluor-488 аннексину V (зелений колір) через 16 хв (А) та через 30 хв (Б) після утворення мікроагрегатів стимульованих колагеном тромбоцитів*

Не тільки зв'язування плазміногену, але і зв'язування t-PA як його активатора на поверхні тромбоцитів і фібрину матиме значний вплив на кінетику фібринолізу. Тому ми продовжили дослідження вивченням зв'язування

t-PA з тромбоцитарними мікроагрегатами, утвореними в умовах потоку цільної крові, а також з адгезованими на склі тромбоцитами, та можливих механізмів цього зв'язування. Задля візуалізації зв'язування, до зразків додавали Alexa Fluor-мічений t-PA після активації тромбоцитів різними агоністами (рис 3.18).

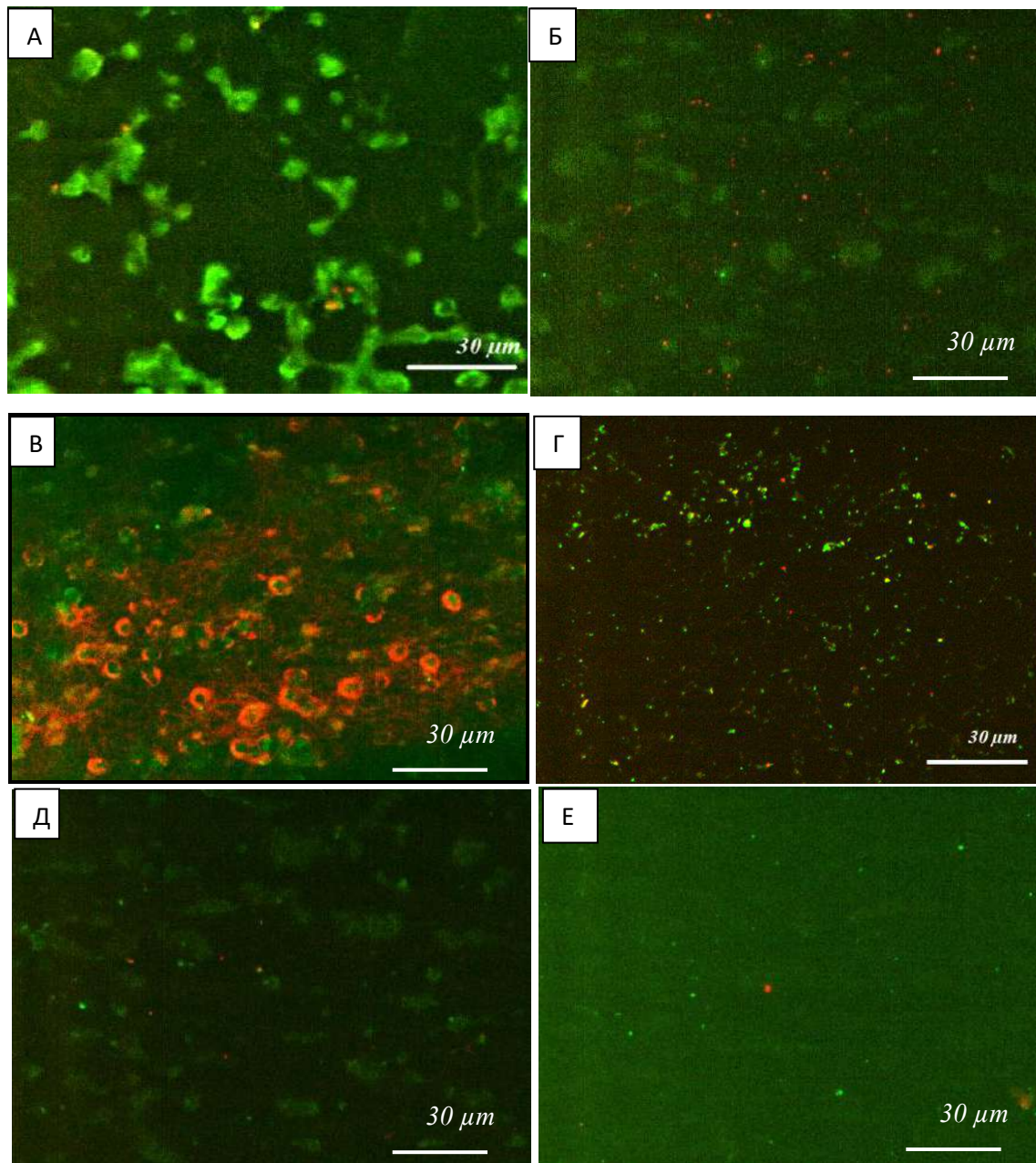
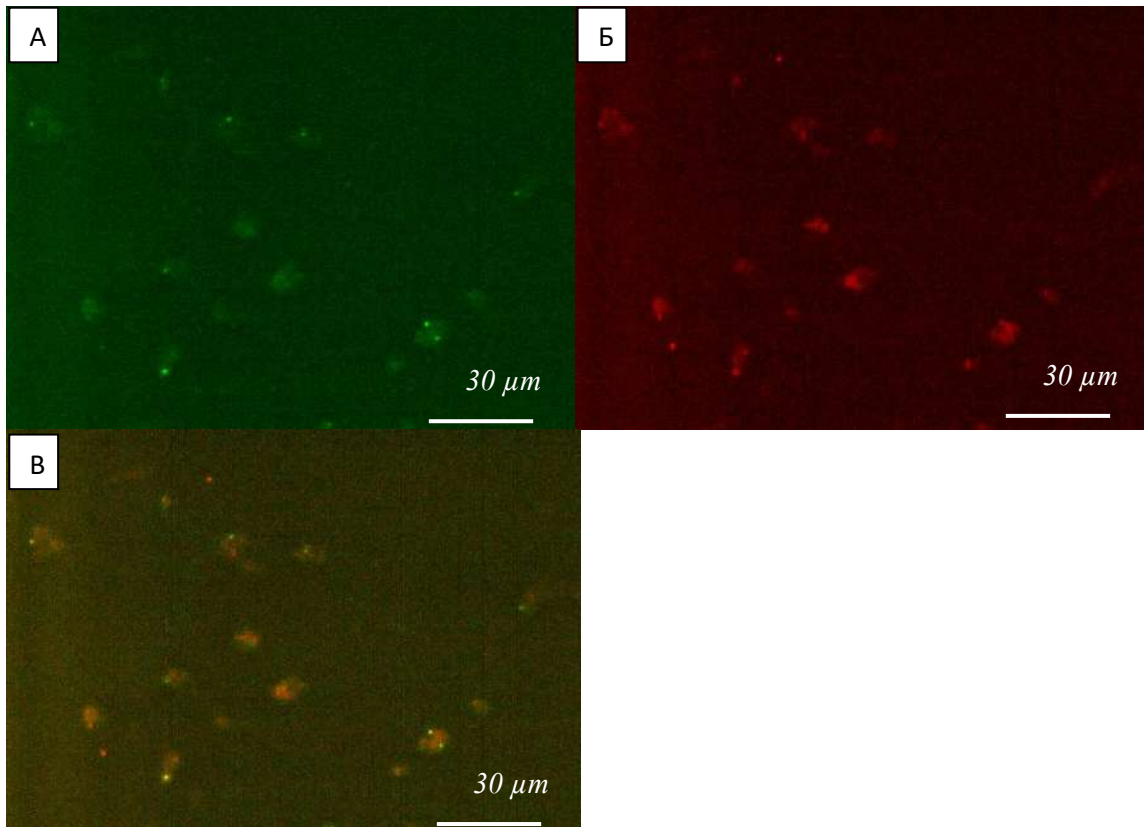


Рисунок 3.18. Дані конфокальної мікроскопії зв'язування міченого Alexa Fluor-647 тканинного активатора плазміногену (червоний колір) на поверхні мікроагрегатів стимульованих колагеном тромбоцитів: А - контроль; Б - в присутності TRAP (30 мкМ); В - в присутності іоніміцину (10 мкМ); Г – в присутності тірофібану (5 нг/мл); Д – в присутності  $\epsilon$ -амінокапронової кислоти (2 мМ); Е - в присутності DON (300 мкМ)

Було встановлено, що t-PA зв'язується на мікроагрегатах тромбоцитів, утворених на колагені без додаткових агоністів. Тим не менш, при додатковій активації такими агоністами, як TRAP (для моделювання активації тромбіном) та іономіцин (зادля стимуляції секреції тромбоцитів) у поєднанні з колагеном призводило до посилення зв'язування t-PA на тромбоцитах, з чого випливає, що більше t-PA зв'язується з більш активованими клітинами.

У той же час зв'язування t-PA також зберігалось після додавання  $\epsilon$ -амінокапронової кислоти, 6-діазо-5-оксо-L-норлейцину (DON) (інгібітор фактора згортання крові XIII) і, окрім того, після додавання тірофібану (інгібітор глікопротеїну IIb/IIIa). У цьому випадку зв'язування t-PA зменшувалося, але не повністю елімінувалось, що дозволяє припустити, що, незважаючи на те, що фібрин є основним сайтом зв'язування t-PA на тромбоцитах, наявні і інші, незалежні від лізин-зв'язуючих сайтів механізми зв'язування t-PA. Тим не менш, слід зазначити, що інгібування зв'язування t-PA було найсильнішим у присутності  $\epsilon$ -амінокапронової кислоти та DON.

Для виявлення додаткових сайтів зв'язування t-PA на тромбоцитах, ми перевірили припущення, чи можлива роль протромбіназного комплексу в цьому, оскільки є докази того, що фактор згортання крові X може служити рецептором для зв'язування плазміногену на тромбоцитах. Дійсно, з використанням мічених AF-488 антитіл до фактора згортання крові X, можна було побачити колокалізацію з міченим t-PA на тромбоцитарних мікроагрегатами, утвореними на колагені та активованими генерацією тромбіну *in situ* (рис. 3.19.)

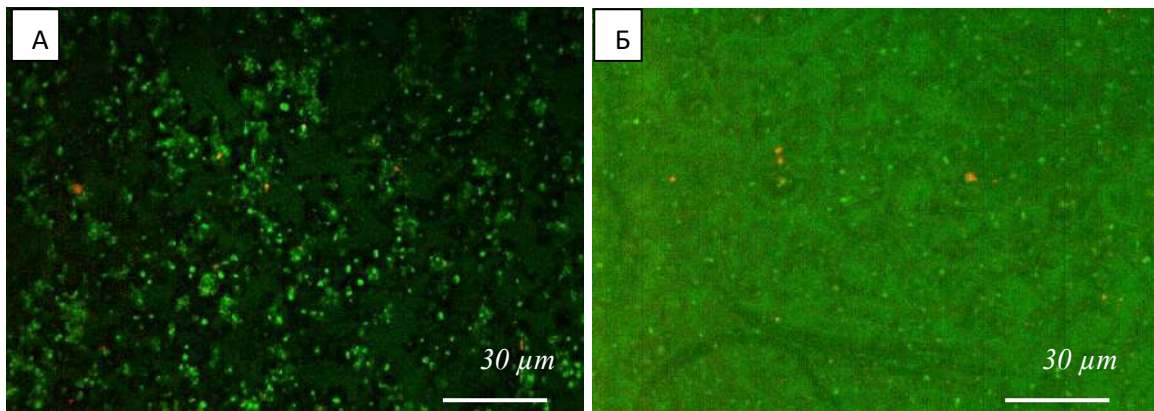


*Рисунок 3.19. Дані конфокальної мікроскопії зв'язаного на тромбоцитарних мікроагрегатах t-PA (Alexa Fluor-647, червоний колір) з антитілами до фактору згортання крові X (FITC, зелений колір): А – зелений канал, Б – червоний канал, В – накладання флуоресценції по зеленому та червоному каналах (жовтий колір)*

З метою дослідити, чи буде відрізнятися зв'язування t-PA з окремими тромбоцитами в статичних умовах, на наступному етапі проведено експерименти з використанням суспензії відмитих тромбоцитів. За таких умов ми спостерігали наявність зв'язування t-PA навіть на тромбоцитах, адгезованих на склі, без додаткових активаторів. Це дозволяє припустити, що у фізіологічних умовах і нативні тромбоцити крові здатні зв'язувати деяку кількість тканинного активатора плазміногену.

У випадку відмитих тромбоцитів ефект найсильніших активаторів (наприклад, іономіцину) був не настільки значним, як у випадку мікроагрегатів тромбоцитів, утворених з цільної крові в умовах потоку. Тим не менш, за допомогою антитіл до фібрину було також виявлено, що до процесу зв'язування

t-PA може долучатись також внутрішній пул фібрину з тромбоцитів, процес екскреції якого значно посилювався при активації (рис. 3.20).



*Рисунок 3.20. Дані конфокальної мікроскопії зв'язування міченого Alexa Fluor-647 тканинного активатора плазміногену (червоний колір): А - на поверхні нативних тромбоцитів, адгезованих на склі (мічені D10C6, зелений колір); Б – на поверхні адгезованих на склі тромбоцитів, активованих іономіцином (10 мкМ), з додавання FITC-мічених (зелений колір) антитіл до фібриногену (1:200)*

Отже, у нашій експериментальній моделі, яка дозволяє відтворити умови фізіологічного згортання крові, ініційованого контактом крові з субендотеліальними структурами та спостерігати утворення тромбоцитарно-фібринових мікроагрегатів на колагені в умовах потоку крові, а також їх наступний лізис, ми досліджували роль тромбоцитів в даних процесах. Тромбоцити виявилися активними складовими просторової структури тромбів, об'єднуючись у мікроагрегати, які стають своєрідними центрами ініціації та подальшого впорядкування та структуризації фібринової сітки. Така гетерогенність архітектури тромбу може відігравати ключову роль у регуляції гемостазу, оскільки тромбоцити, підпадаючи під сигнал активації різної інтенсивності та тривалості, що забезпечується різними агоністами, ймовірно, формують різні субпопуляції з різним функціональним призначенням. Акумуляція фосфатидилсерин-експонуючих тромбоцитів переважно на периферії утворених мікроагрегатів в наших експериментах може слугувати підтвердженням такої гіпотези.

Нами також було висунуте припущення, що ініціація процесу фібринолізу розпочинається не після завершення утворення тромбу, а ще в процесі формування його структури. Дійсно, в нашій експериментальній моделі накопичення плазміногену на тромбоцитарно-фібринових мікроагрегатах, а також на фібрині в просторі між ними, розпочиналося майже одночасно з утворенням фібринової сітки і продовжувалось до завершення її остаточного формування. Якщо в кров до контакту з колагеном вносили t-РА, фібриноліз розпочинався раніше в областях мікроагрегатів, багатих фосфатидилсерин-експонуючими тромбоцитами, з подальшим лізисом фібринових волокон між мікроагрегатами. Ці результати вказують на залучення тромбоцитів до модуляції взаємодії між процесами утворення фібринового згустку та його лізисом: спочатку вони акумулюють фібрин на своїй поверхні та слугують центрами організації фібринової сітки, таким чином запобігаючи передчасному лізису; в той же час, вже на ранніх стадіях тромбоутворення найбільш активовані тромбоцити та утворений фібрин створюють відповідну матрицю для концентрування протеїнів системи фібринолізу, перешкоджаючи надмірному тромбоутворенню та оклюзії судин.

Отримані нами результати щодо ролі фосфатидилсерин-експонуючих тромбоцитів узгоджуються з даними [Podopletova, 2016], [Agbani, 2015], [Whyte, 2015], щодо здатності тромбоцитів, які експонують фосфатидилсерин, створювати прокоагулянтну поверхню (в процесі ballooning), та накопичувати в своїх сар-структурах прокоагулянтні фактори та плазміноген. Цікаво, що фактор VIII був виявлений і на поверхні агрегаторних тромбоцитів, на відміну від фактора V, який зв'язувався лише з фосфатидилсерин-експонуючими тромбоцитами [Podopletova, 2016]. Ймовірно, це відповідає значимій ролі агрегаторних тромбоцитів на більш ранніх стадіях каскаду згортання крові через акумуляцію теназного комплексу.

Подальше вивчення механізмів участі тромбоцитів у t-РА-залежній активації плазміногену є актуальним, оскільки тканинний активатор плазміногену є одним зі схвалених засобів для профібринолітичного лікування,

але його використання має багато обмежень та пов'язане з високим ризиком геморагічних ускладнень [Liu, 2018]. Як приклад, відоме явище уповільнення тромболізу під час використання більш високих концентрацій t-PA, зокрема, через інтерференцією t-PA з дією плазміну на фібрин за декількома можливими механізмами [Wu, 1995]. Тромбоцити, які, як вже зазначалося, є центрами акумуляції фібрину та організації фібринової сітки, а також основним джерелом PAI-1, можуть додатково модулювати цю картину.

Таким чином, наступним кроком було дослідження зв'язування t-PA на поверхнях мікроагрегатів тромбоцитів, а також на поверхні відмитих тромбоцитів. Ми виявили, що навіть мінімально активовані відмиті тромбоцити здатні зв'язувати t-PA. Це може свідчити про те, що наявність t-PA на поверхні нативних тромбоцитів у крові може також відігравати роль у фізіологічній гемостатичній відповіді.

Зв'язування t-PA посилювалося на поверхні тромбоцитарних мікроагрегатів, утворених на колагені з цільної крові в умовах потоку, отже, швидкість потоку крові може мати окремий вплив на акумуляцію активатора в центрах потенційного лізису [Hudson, 2017]. Якщо тромбоцити на додачу до колагену стимулювали агоністом TRAP чи стимулятором секреції альфа-гранул іономіцином, кількість t-PA на поверхні тромбоцитів, відповідно, зростала. Це може свідчити про важливість процесу секреції у зв'язуванні тканинного активатора плазміногену на тромбоцитарних агрегатах. У той же час активація відмитих тромбоцитів, адгезованих на склі, була не такою значною.

Важливо, що певне зв'язування t-PA з мікроагрегатами тромбоцитів було наявне навіть за дії таких інгібіторів, як тірофібан (інгібітор глікопротеїну Пб/Ша),  $\epsilon$ -амінокапронова кислота (блокатор лізин-зв'язуючих сайтів) та DON (інгібітор фактора згортання крові XIII). Інгібування зв'язування t-PA у присутності інгібітора фактора згортання крові XIII є також цікавим результатом, оскільки, як вважалось, він має лише антифібринолітичний вплив на гемостаз за рахунок стабілізації тромбів та зшивання  $\alpha$ 2-антиплазміну з

фібрином. Такі результати можуть вказувати на альтернативні механізми зв'язування t-PA, незалежні від фібрину та лізин-зв'язуючих сайтів.

Згідно даних літератури, протромбіназний комплекс та, зокрема, фактор згортання крові Ха здатен відігравати роль своєрідного кофактора плазміноген/плазмінової системи, оскільки опосередковане плазміном розщеплення фактора згортання крові Ха експонує додаткові сайти зв'язування плазміногену (за рахунок відкривання додаткових локальних С-кінцевих залишків лізинів) у присутності фосфатидилсерину та  $Ca^{2+}$ . Окрім того, комплекс фактора згортання крові Ха з антитромбіном здатний прискорити t-PA-залежне генерування плазміну в 7 разів [Pryzdial, 1995; Pryzdial, 1996; Talbot, 2010; Talbot, 2011]. Використовуючи мічені антитіла до фактора згортання крові X, ми підтвердили його колокалізацію зі зв'язаним t-PA. Можна припустити, що фактор згортання крові X також є додатковим сайтом зв'язування для t-PA, виконуючи таким чином не тільки прокоагулянтну, але й профібринолітичну функцію.

Підсумовуючи, можна стверджувати, що існують певні спільні регулятори згортання крові та фібринолізу, за допомогою яких тромбоцити можуть координувати обидва процеси у просторі та часі.

По-перше, це фібрин, оскільки, за його участі тромбоцити формують каркас тромбу з ділянками різної щільності, що робить згусток більш компактним і стабільним, та одночасно забезпечує ефективну дифузію та зв'язування фібринолітичних факторів.

Іншим регулятором можуть бути протеїни протромбіназного комплексу, який збирається на поверхні тромбоцитів як система генерування тромбіну, після чого в подальшому може функціонувати і як своєрідний рецептор для t-PA та плазміногену.

Отже, координаційна роль тромбоцитів забезпечується тим, що вони здатні впливати на обидві складові локального гемостатичного балансу. З одного боку, вони концентрують фібрин і структурують фібринову мережу на перших стадіях утворення тромбу, коли це необхідно для запобігання



кровотечі. З іншого боку, в процесі дозрівання тромбу вони обмежують власну протромботичну активність, “перемикаючи” гемостатичний баланс в бік фібринолізу, посилюючи активацію плазміногену на найбільш активованих тромбоцитах, і таким чином обмежують розмір і час існування фібринового згустку.

### **3.4 Дослідження молекулярних механізмів координування тромбоцитами процесів утворення та лізису фібринового згустку**

Наступним етапом дослідження стало вивчення можливих молекулярних механізмів, за якими тромбоцити здатні регулювати процеси тромбоутворення та лізису. Логічно, що такими можливими механізмами є їх взаємодія як з профібринолітичними, так і з антикоагулянтними протеїнами.

Тромбоцити презентують на плазматичній мембрані ділянки зв'язування для фібринолітичних протеїнів. Плазміноген зв'язується з тромбоцитами за двома механізмами: залежним та незалежним від  $\alpha\text{IIb}\beta_3$  і фібрину [Miles, 1986]. Останній полягає у взаємодії плазміногену з мембрано-асоційованими протеїнами, що експонуються під час активації, такими як актин, тромбоспондин та тими, що мають С-кінцеві залишки лізину [Horne, 2005]. Зв'язування t-PA з поверхнею неактивованих тромбоцитів є оборотнім, залежним від концентрації, опосередковується одним класом низькоафінних ділянок, посилюється за стимуляції тромбіном і частково заміщується плазміногеном [Vaughan, 1989]; single-chain urokinase-type plasminogen activator (scu-PA) виявляється на мембранах нестимульованих тромбоцитів у невеликій кількості (1,3 нг на  $10^9$  тромбоцитів) [Park, 1989]. Незважаючи на існуючі докази стосовно асоціації t-PA та scu-PA з мембранами нативних та активованих тромбоцитів, рецептори, що відповідають за зв'язування цих активаторів, залишаються невідомими. Здатність тромбоцитів акумулювати на своїй поверхні протеїни системи активації плазміногену вказує на можливу участь цих клітин в локалізації та регуляції фібринолітичного процесу.

Такими чином, наступним завданням було дослідити взаємодію плазміногену та тканинного активатора з нативними та активованими тромбоцитами, визначити кількість плазміну, що генерується за активації плазміногену різними активаторами в присутності тромбоцитів.

Раніше було показано, що радіактивно мічений плазміноген ( $^{125}\text{I}$ -Glu-плазміноген) специфічно зв'язується з відмитими тромбоцитами людини. К<sub>d</sub> для тромбін стимульованих тромбоцитів складає  $2,6 \pm 1,3$  мкМ, а кількість зв'язаного плазміногену досягає  $190000 \pm 44000$  молекули на клітину, тоді як нестимульовані тромбоцити зв'язують  $37000 \pm 15000$  молекул на клітину з К<sub>d</sub>  $1,9 \pm 0,15$  мкМ [Miles, 1985]. Нашим завданням було встановити рівень плазміногену/плазміну, асоційованого з поверхнею неактивованих та активованих тромбіном тромбоцитів, методами проточної цитофлуориметрії та визначення ензиматичної активності.

Здатність тромбоцитів зв'язувати та активувати плазміноген на своїй поверхні оцінювали за рівнем амідолітичної активності плазміну в інкубаційному середовищі, що містить відмиті або активовані *in vitro* тромбіном тромбоцити без додавання та за присутності тканинного активатора плазміногену або Glu-плазміногену та тканинного активатора плазміногену (рис. 3.21.). Активацію тромбоцитів проводили безпосередньо в інкубаційному середовищі, додаючи 1 НН од. тромбіну. Активація плазміногену тканинним активатором у розчині не відбувається – в пробах, які містили зимоген та його активатор за відсутності тромбоцитів, амідолітична активність була відсутня протягом всього часу експерименту. У середовищі, що містило як інтактні, так і активовані тромбоцити, у відсутності плазміногену та тканинного активатора плазміногену через 60 хв інкубації виявляли амідолітичну активність плазміну у залишковій кількості, що ймовірно, є результатом активації ендogenous активаторами плазміногену, адсорбованого на поверхні циркулюючих в кровотоці тромбоцитів. Цікавим виявилось те, що при додаванні тканинного активатора плазміногену спостерігали незначне збільшення поглинання *n*-нітроаніліну в реакційному середовищі, величина якого була однаковою в

присутності інтактних або активованих тромбоцитів. Отриманий результат свідчить про те, що тромбоцити, одержані шляхом центрифугування, містять на своїй поверхні незначну кількість плазміногену. Отже, циркулюючи в кровотоці в неактивованому стані, тромбоцити зв'язують дуже малу кількість плазміногену плазми. Однаковий рівень активності вказує на те, що тромбоцити, активовані в реакційному середовищі тромбіном, не секретують додаткову кількість плазміногену. Амідолітична активність різко зростає при додаванні до інтактних та активованих клітин одночасно плазміногену та тканинного активатора плазміногену. При цьому рівень активності за використання тромбін-індукованих тромбоцитів, майже в 2 рази вище такого інтактних клітин, що вказує про експонування на їх поверхні додаткових плазміноген-зв'язувальних сайтів за агоніст-індукованої активації. Підвищення амідолітичної активності інтактних тромбоцитів в присутності плазміногену і тканинного активатора плазміногену можна пояснити частковою активацією тромбоцитів під час процедури відмивок.

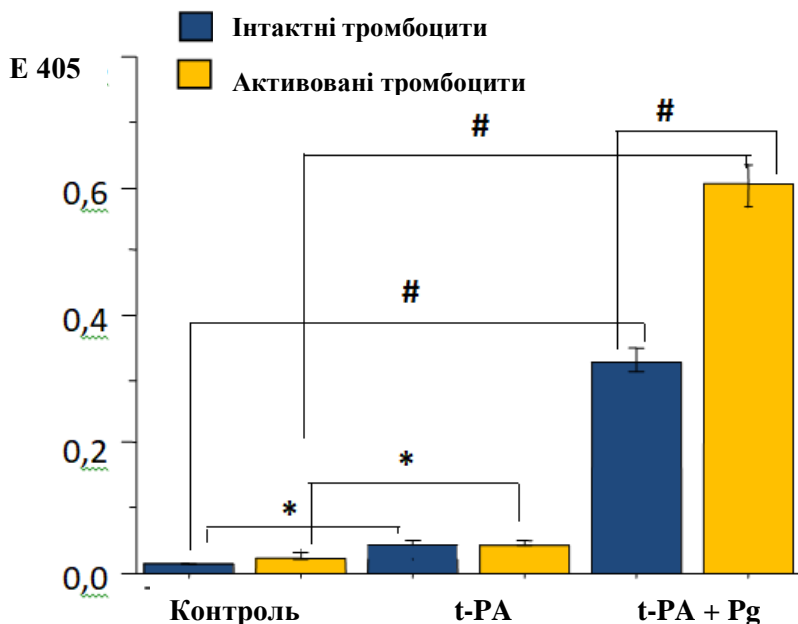


Рисунок 3.21. Амідолітична активність плазміноген/плазміну, асоційованого з поверхнею інтактних та тромбін-стимульованих тромбоцитів ( $4 \times 10^6$  клітин/мл) без (контроль) та за присутності тканинного активатора плазміногену (1 од./мл) або тканинного активатора і плазміногену (23 мкг/мл).

\* -  $p \leq 0,05$ ; # -  $p \leq 0,01$  ( $n \geq 3$ )

Зв'язування плазміногену з тромбоцитами, оцінене за зміною амідолітичної активності в середовищі активації за різних концентрацій проензиму, є дозозалежним процесом (рис. 3.22). При збільшенні кількості проензиму в середовищі реакції насичення сайтів зв'язування плазміногену на плазматичній мембрані нативних і тромбін-активованих клітин має місце за 0,5 та 0,1 мкМ концентрації, відповідно.

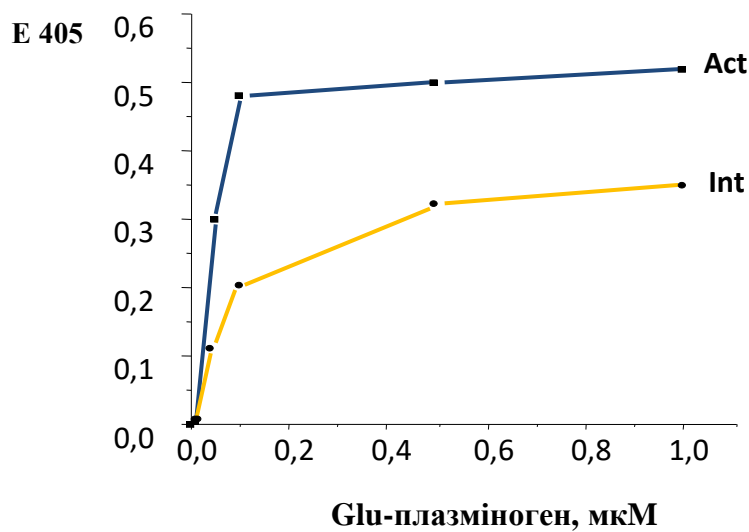


Рисунок 3.22. З'язування Glu-плазміногену з інтактними (Int) та активованими (Act) тромбоцитами в залежності від концентрації проензиму

На рисунку 3.23 наведені дані з визначення рівня FITC-плазміногену, зв'язаного з поверхнею інтактних та активованих тромбоцитів, методом протокової цитофлуориметрії. За інтенсивністю флуоресценції в контрольній групі клітин (інтактні тромбоцити, не інкубовані з Glu-плазміногеном), визначили поріг, що відокремлює умовно нефлуоресціюючі клітини (Рис. 3.25 А). Інкубація неактивованих клітин із FITC-плазміногеном призводила до збільшення кількості подій з флуоресцентним сигналом на 67%. При цьому інтенсивність флуоресценції збільшується на 300%, що свідчить про сорбцію FITC-міченого плазміногену на поверхні інтактних клітин (рис. 3.25, Б). У групі тромбін-активованих клітин фіксували значно вище (на 75%) збільшення

кількості FITC-плазміноген-позитивних клітин, тоді як інтенсивність флуоресценції зростала на 650% (рис. 3.23, В).

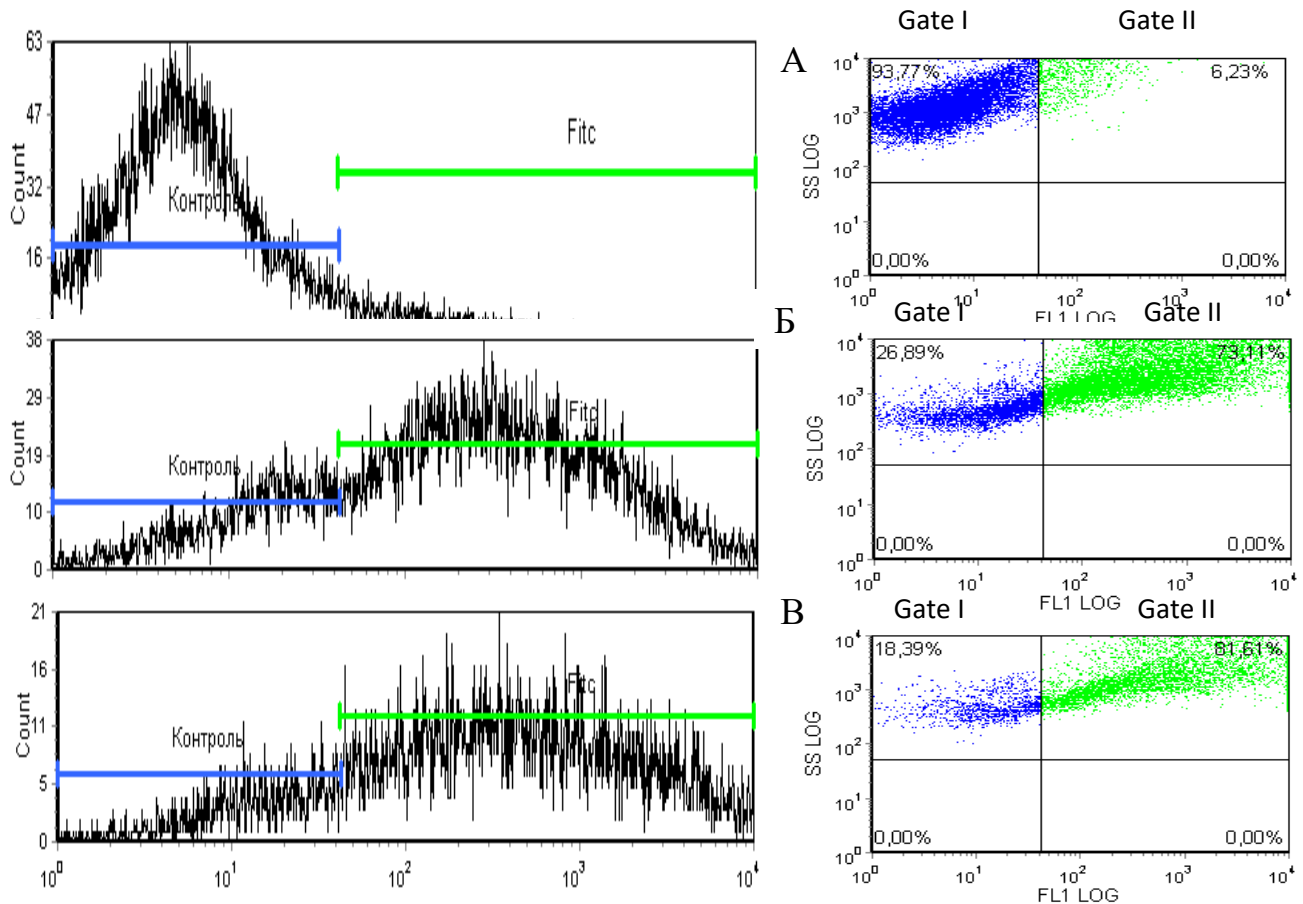
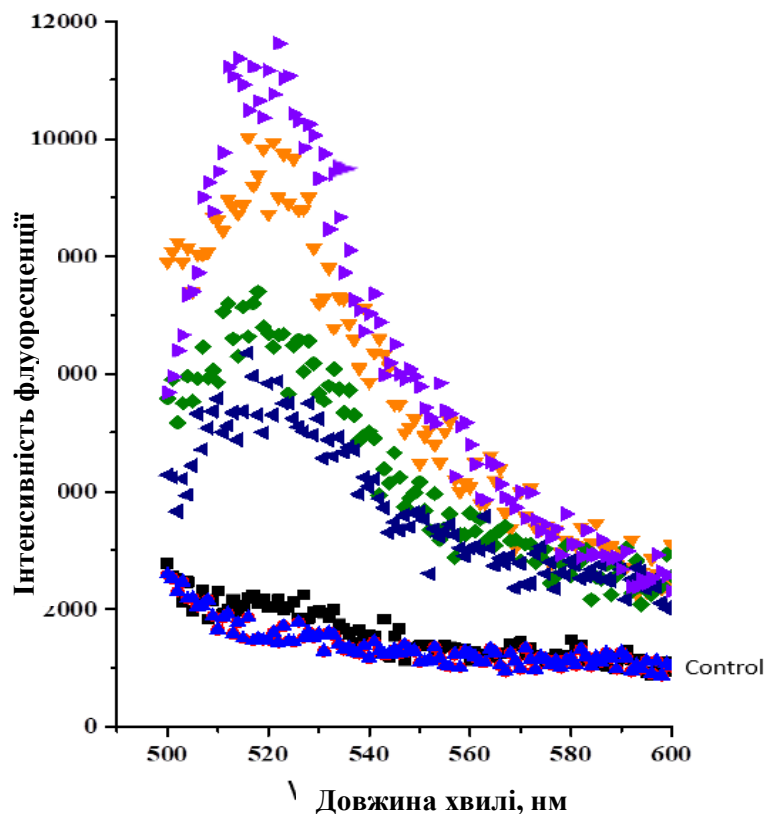


Рисунок 3.23. Гістограми флуоресценції та крапкові діаграми розподілу тромбоцитів: інтактних (А), інтактних за взаємодії з FITC-плазміногеном (Б); тромбін-активованих за взаємодії з FITC-плазміногеном (В)

Отже, методом протокової цитометрії та визначення ензиматичної активності встановлено, що з поверхнею ізольованих активованих тромбоцитів зв'язується вдвічі більше плазміногену у порівнянні з неактивованими клітинами. Показано, що циркулюючі в крові інтактні тромбоцити несуть на своїй поверхні незначну кількість плазміногену, тоді як тромбін-індукована активація веде до експонування плазміноген-зв'язувальних сайтів на їх плазматичній мембрані.

Згідно даних літератури, радіоактивно мічений (<sup>125</sup>I) рекомбінантний тканинний активатор плазміногену взаємодіє з неактивованими і тромбін-стимульованими тромбоцитами, Kd 340±25 нМ, та 800±60 нМ, відповідно

[Vaughan, 1989]. Нашим наступним завданням було з'ясувати наявність тканинного активатора плазміногену на поверхні тромбоцитів, ізольованих з донорської крові. Детекцію тканинного активатора плазміногену проводили методом спектрофлуориметрії з використанням антитіл до тканинного активатора та вторинних антитіл, кон'югованих з FITC. Дослідження проводили на тромбоцитах, одержаних із зразків крові чотирьох різних донорів. Одержані результати представлені на рис. 3.24.



*Рисунок 3.24. Детекція тканинного активатора плазміногену на поверхні інтактних тромбоцитів з використанням кролячих антитіл до тканинного активатора та вторинних FITC-мічених антикролячих антитіл. В якості контролю (control) наведено спектр флуоресценції клітин без антитіл до тканинного активатора плазміногену. В досліді використано тромбоцити чотирьох донорів*

Контролем слугували тромбоцити, які інкубували з вторинними антитілами. Інтенсивність флуоресценції в аналізованих та контрольних пробах відрізняється в 5-12 разів, що свідчить про зв'язування антитіл до t-PA зі своїм антигеном, сорбованим на поверхні клітин. Різниця в інтенсивності сигналу в

окремих зразках пояснюється індивідуальними особливостями донорів. Таким чином, за допомогою антитіл проти t-PA на плазматичній мембрані ізольованих неактивованих тромбоцитів виявлено тканинний активатор, що свідчить про наявність на поверхні циркулюючих в кровотоці тромбоцитів специфічних сайтів зв'язування для цього протеїну.

Для ефективної активації зв'язаного з рецепторами плазміногену необхідним є локалізація активатора на тій же клітинній поверхні. Дані літератури стосовно стимулюючих властивостей тромбоцитів при активації плазміногену різними активаторами, а саме тканинним активатором, урокіназою та стрептокіназою, є суперечливими. За даними електрофорезу, плазмін виявляється на мембранах тромбоцитів при дії всіх типів активаторів [Miles, 1985]. З використанням хромогенного субстрату показано ефект тромбоцитів на утворення плазміну при дії тканинного активатора, але не урокінази або стрептокінази [Gao, 1990], тоді як в роботах інших авторів асоційована з тромбоцитами урокіназа активує сорбований на цих клітинах плазміногену [Baeten, 2010].

Модулюючий вплив тромбоцитів на активацію Glu-плазміногену тканинним активатором, урокіназою та стрептокіназою досліджували за 250 нМ концентрації Glu-плазміногену, за якої має місце насичення сайтів зв'язування зимогену на плазматичній мембрані тромбоцитів. Для порівняння ефективності дії різних активаторів реакцію проводили за однакового молярного співвідношення кожного з активаторів до проензиму (1:200). Кінетичні криві реакції активації плазміногену усіма типами активаторів без та за присутності активованих тромбоцитів представлені на рис. 3.25 А, Б.

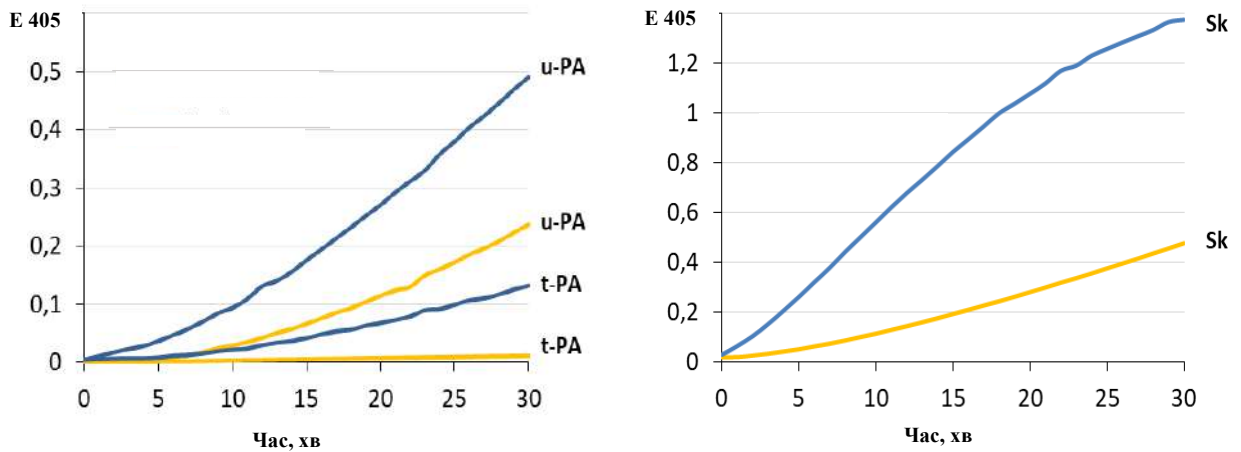


Рисунок 3.25. Кінетика активації *Glu*-плазміногену (250 нМ) тканинним активатором (*t PA*), урокіназою (*u-PA*) та стрептокіназою (*Sk*) за молярного співвідношення активатора до зимогену 1:200 без (жовтий колір) та в присутності (синій колір) тромбін-стимульованих тромбоцитів (400 млн/мл)

Активовані тромбоцити найбільш ефективно стимулюють реакцію активації плазміногену стрептокіназою і проявляють більш слабкий, майже однаковий ефект при дії урокінази та тканинного активатора. Виходячи з отриманих кінетичних кривих була розрахована кількість плазміну, що утворюється в реакційному середовищі без та в присутності клітин (Рис. 3.26). Кількість ензиму визначали за зміною оптичної густини реакційного середовища на лінійній ділянці кінетичної кривої і розраховували за формулою  $(\Delta E_{405}:\Delta t)/0,002$ , де 0,002 – встановлена експериментально величина поглинання *n*-нітроаніліну, що вивільняється за гідролізу хромогенного субстрату 1 нМ плазміном за 1 хв. Дані, представлені на рисунку 3.26 свідчать, що в присутності тромбоцитів (40 млн клітин/мл) за активації плазміногену (250 нМ) стрептокіназою, урокіназою та тканинним активатором за 30 хвилин утворюється 25,8 нМ, 8,3 нМ та 5,4 нМ плазміну, відповідно.



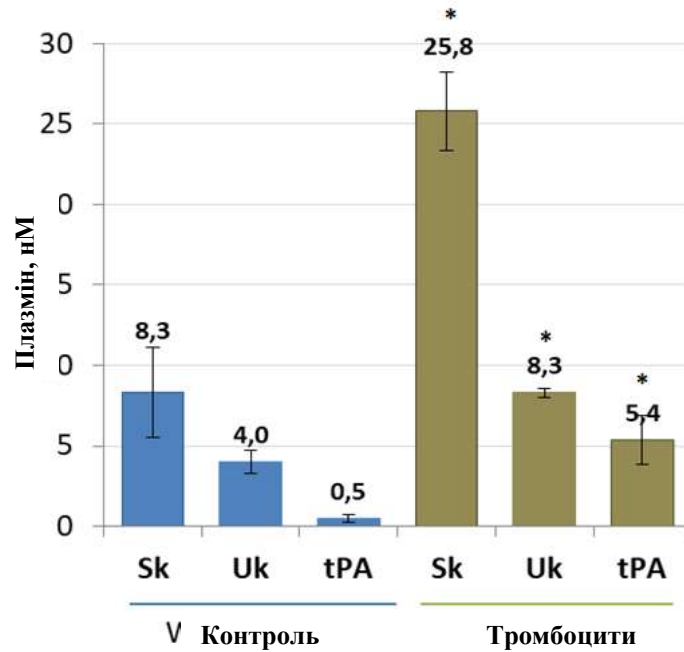


Рисунок 3.26. Кількість плазміну, що утворився в реакційному середовищі при активації 250 нМ Glu-плазміногену стрептокіназою, урокіназою і тканинним активатором за молярного співвідношення активатора до зимогену 1:200 без (контроль) та в присутності тромбоцитів. \* -  $p \leq 0,05$

Стимулюючий ефект тромбоцитів можна пояснити підвищенням локальної концентрації плазміногену та активаторів на поверхні клітин і переходом зв'язаного з рецепторами Glu-плазміногену у відкриту витягнуту конформацію. Відомості про взаємодію стрептокінази з тромбоцитами відсутні, тому нами досліджено залежне та незалежне від плазміногену зв'язування стрептокінази з інтактними та активованими клітинами. Дослідження проводили методом проточної цитофлуориметрії з використанням FITC-міченої стрептокінази. На рис. 3.27 представлені типові графіки інтенсивності флуоресценції тромбоцитів, інкубованих з стрептокіназою та додатково з Glu-плазміногеном. За 100 % приймали інтенсивність флуоресценції інтактних і тромбін-активованих тромбоцитів. В присутності стрептокінази інтенсивність сигналу інтактних клітин підвищувалась у 3, тоді як активованих – в 26 разів. Передінкубація клітин з Glu-плазміногеном призводила до значного збільшення сигналу флуоресценції інтактних і активованих тромбоцитів – в 26 і 40 разів відповідно.

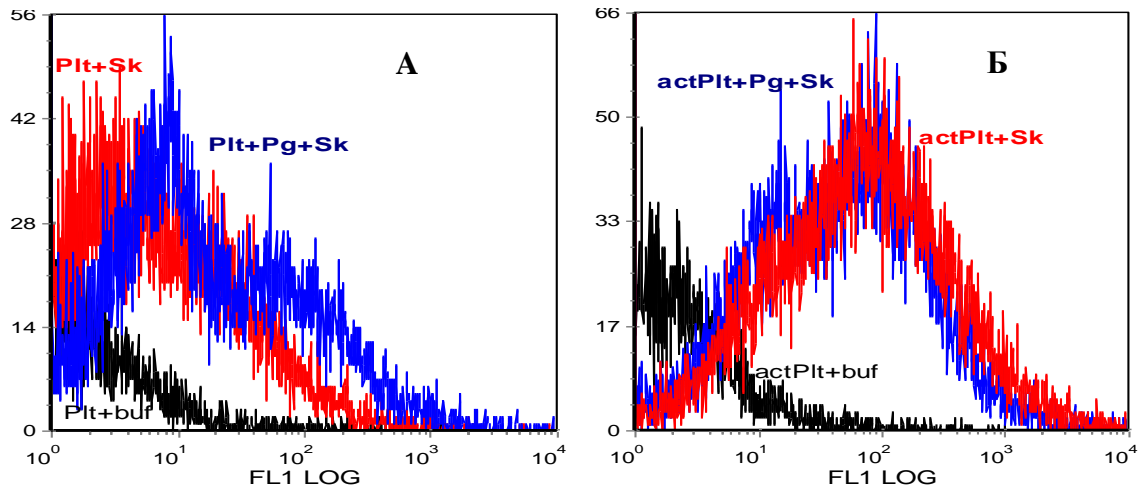


Рисунок 3.27. Флуоресценція інтактних (А) і агоніст-активованих (Б) тромбоцитів при взаємодії з FITC-стрептокіназою у відсутності та в присутності Glu-плазміногену

Отримані результати свідчать, що екзогенний активатор плазміногену стрептокіназа адсорбується на плазматичній мембрані інтактних і тромбін-активованих тромбоцитів залежним та незалежним від плазміногену шляхом. Зважаючи на досить високий рівень плазміну, що утворюється на поверхні тромбоцитів при активації стрептокіназою, отримані результати можуть бути корисними при виборі стратегії лікування пацієнтів, інфікованих  $\beta$ -гемолітичними стрептококами, та проведенні тромболітичної терапії стрептокіназою.

Згідно з сучасними уявленнями плазміноген переважно зв'язується з фосфатидил-експонованими прокоагулянтними тромбоцитами [Whyte, 2015], на поверхні яких збираються теназний та протромбіназний комплекси, що відповідають за утворення фактора згортання крові Ха та тромбіна, відповідно. Особливий інтерес становлять дані про те, що протеїни згортання крові, а саме фактор згортання крові Ха, може виконувати роль плазміногенового рецептора. Показано, що автопротеоліз або плазміновий процесінг фактора згортання крові Ха експонує С-кінцеві залишки лізину, внаслідок чого прокоагулянтний ензим набуває здатності виконувати кофакторну функцію при активації плазміногену

тканинним активатором [Pryzdial, 1995; Pryzdial, 1996] та прискорювати фібриноліз [Pryzdial, 2016].

Тому нами було досліджено здатність протеїнів протромбінового комплексу впливати на генерування плазміну на поверхні тромбоцитів. З даних представлених на рис. 3.28, видно, що протромбіновий комплекс не впливає на процес активації плазміногену на поверхні інтактних тромбоцитів і більш ніж вдвічі підвищує рівень активації в присутності тромбін-стимульованих тромбоцитів. Отримані дані вказують на те, що компоненти протромбінового комплексу, які зв'язуються з поверхнею активованих тромбоцитів, можуть залучатись до взаємодії протеїнів системи активації плазміногену з тромбоцитами.

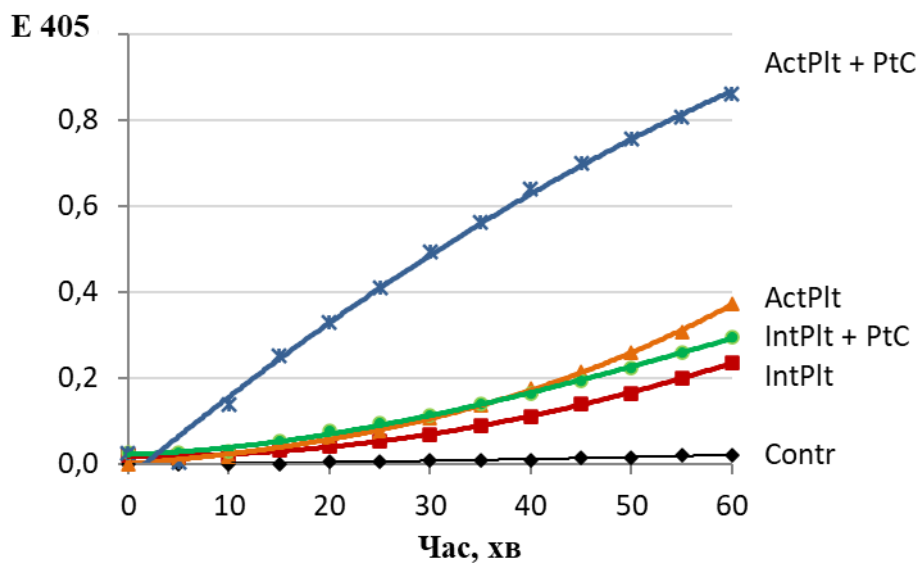
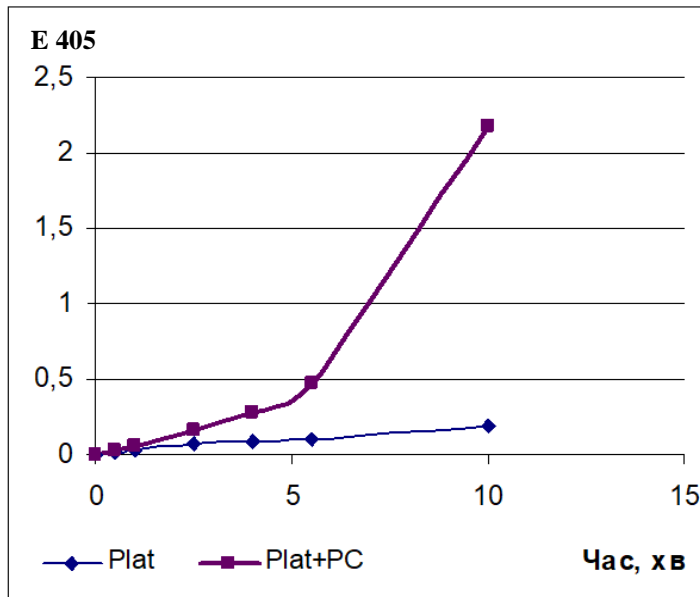


Рисунок 3.28. Кінетика активації Glu-плазміногену (23 мкг/мл) тканинним активатором (5 од.) на інтактних (IntPlat) і тромбін-індукованих (ActPlat) тромбоцитах без та в присутності протромбінового комплексу (PtC) (100 мкг/мл). В якості контролю наведена крива активації Glu-плазміногену тканинним активатором в безклітинному середовищі

Враховуючи, що тромбоцити, подібно до моноцитів та нейтрофілів, також здатні експресувати функціонально активний тромбомодулін [Suzuki, 1988], було висунуто гіпотезу про те, що активація тромбоцитами протеїну С на їх

поверхні є ще одним механізмом, за яким тромбоцити модулюють процеси згортання та лізису.

Дійсно, було показано, що в присутності тромбоцитів, кальцію та тромбіну відбувається генерування активного протеїну С на поверхні клітин (рис. 3.29) вже з п'ятої хвилини.

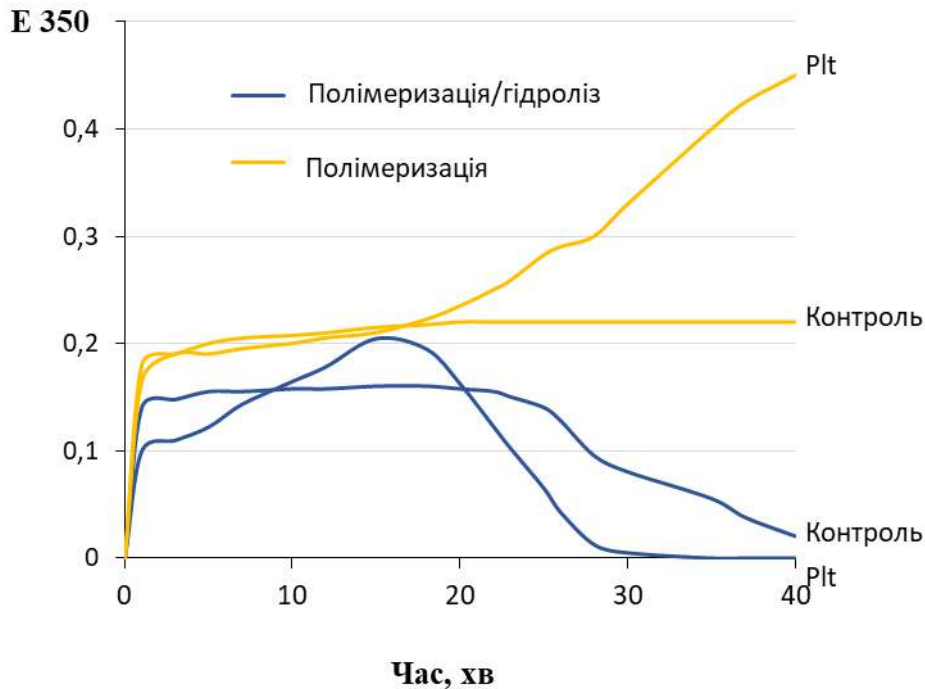


*Рисунок 3.29. Генерування активованого протеїну С (PC) в реакційному середовищі, яке містить проензим PC (0,4 мкг/мл), тромбін (0,15 NIH од./мл), специфічний для протеїну С хромогенний субстрат S-2366 в присутності тромбоцитів (Plat)*

Отримані результати свідчать, що активація протеїну С на поверхні активованих тромбоцитів може виступати ще одним механізмом, який обмежує їх прокоагулянтні властивості та перешкоджає надмірній генерації тромбіну та тромбоутворенню.

Модельна система з використанням desAB-фібрину дає можливість перевірити дію тромбоцитів безпосередньо на процес фібринолізу окремо від каскаду згортання крові. Нами було використано фізіологічне співвідношення концентрацій тромбоцитів, desAB-фібрину та плазіногену, а також концентрацію t-PA, яка дозволила б оцінити вплив тромбоцитів на процес

фібринолізу. На рисунку 3.30 наведено типові криві утворення та гідролізу desAB-фібрину за вказаних умов експерименту.



*Рисунок 3.30. Полімеризація та гідроліз desAB-фібрину (200 мкг/мл) Glu-плазміногеном (15 мкг/мл), активованим t-PA (5 од./мл) в присутності активованих тромбіном (1 NIH од./мл) тромбоцитів (Plt) (50 млн/мл). Криві полімеризації і гідролізу desAB-фібрину в безклітинному середовищі наведені в якості контролю*

Порівняння кривих проводили за наступними параметрами: загальний час існування згустку (час, за який відбувається повний лізис полімерного фібрину); час початку лізису; час напівлізису (час, за який поглинання згустку зменшується на половину від максимального); максимальна швидкість лізису (що визначається як тангенс кута дотичної до кривої); площа під кривою (розрахована як визначений інтеграл). Показано, що тромбоцити суттєво зменшували час напівлізису (з  $30,33 \pm 4,7$  до  $23,33 \pm 0,47$  хв) і загальний час існування згустку (з  $38,33 \pm 2,36$  до  $31,6 \pm 2,36$  хв) з відповідним зменшенням площі під кривою згортання/лізису в середньому на 17 % ( $4,25 \pm 0,75$  ОД/хв в присутності тромбоцитів порівняно з  $5,02 \pm 0,7$  для контролю), що разом свідчить про стимуляцію тромбоцитами процесу фібринолізу. Слід зазначити,

що в присутності тромбоцитів полімеризація фібрину супроводжувалась додатковим збільшенням оптичної густини згустку (порівняно з контролем без клітин), обумовленим його ретракцією (Рис. 3.30, контрольні криві). Отже, безклітинні та тромбоцит-вмісні згустки розрізнялися за структурою та щільністю полімерної сітки, що створювало різні «стартові умови» для лізису. Щоб врахувати цю різницю, порівнювали співвідношення площі під кривою гідролізу desAB-фібрину до площі під кривою його полімеризації. Воно складало 0,64 для контрольних згустків та 0,49 для згустків, що містили тромбоцити. Отже, за умов даного дослідження ефективність розчинення фібринового згустку підвищувалась на 30 %, коли в його складі знаходились тромбоцити. Можна припустити, що прискорення гідролізу desAB-фібрину в присутності тромбоцитів було зумовлене, передусім, їх переважним впливом на реакцію активації плазміногену тканинним активатором плазміногену. Про це свідчить, зокрема, спричинене тромбоцитами скорочення часу початку лізису в середньому на 10 хв ( $13,3 \pm 3,4$  хв в присутності клітин порівняно з  $23,0 \pm 4,2$  хв у контролі) та збільшення максимальної швидкості лізису (від  $24 \pm 5$  до  $29 \pm 9$  МОД/хв).

Дані щодо зв'язування на поверхні активованих тромбоцитів плазміногену і тканинного активатора плазміногену, а також дані щодо здатності тромбоцитів прискорювати активацію плазміногену та забезпечувати більш ефективний гідроліз фібрину дозволяють запропонувати наступний механізм профібринолітичної дії тромбоцитів.

Плазмін, генерований на поверхні тромбоцитів, асоційованих з полімерною сіткою фібрину, забезпечує утворення примембранного шару частково гідролізованого фібрину з презентованими С-кінцевими залишками лізину, що є сайтами зв'язування плазміногену і тканинного активатора. В такий спосіб у мікрооточенні тромбоцитів має місце підвищення локальної концентрації плазміногену і тканинного активатора з наступним утворенням плазміну, що обумовлює швидкий лізис фібринових згустків навколо тромбоцитарних мікроагрегатів.

Таким чином, найбільш значимими механізмами дії тромбоцитів при залученні до регуляції процесів утворення та лізису фібринового згустку є, по перше, активація протеїну С на їх поверхні (як антикоагулянтної протеїнази), і, по друге, зв'язування на поверхні тромбоцитів плазміногену та його активаторів, прискорення процесу його активації і більш ефективного утворення плазміну. Це сприяє прискоренню початку процесу лізису та зменшення загального часу існування згустку, що є важливим для регуляції фізіологічного гемостатичного балансу та запобігання патологічного тромбоутворення.

### **3.5 Аналіз параметрів кривої оптичного поглинання процесу утворення та лізису фібрину безтромбоцитарної і збагаченої тромбоцитами плазми у хворих з резистентною артеріальною гіпертензією**

Згортання крові, розміри та стабільність утвореного згустку, час його існування та розчинення в процесі фібринолізу є факторами, що відповідають за репарацію пошкодженого ендотелію та відновлення кровотоку. Стимульовані ендотеліальні клітини у відповідь на різні активатори здатні вивільнювати широкий спектр протеїнів згортання та фібринолізу і сприяти активації тромбоцитів. Зокрема, посилення активності фактора згортання крові VIII, а також антиген фактора фон Віллебранда та t-PA виявляються після внутрішньовенного введення епінефрину [Kanel, 2000]. Підвищення у плазмі рівня PAI-1, t-PA, фібриногену і тромбомодуліну пов'язане з тенденцією до гіперкоагуляції та ураження ендотелію [Tabak, 2009].

Натомість, активовані тромбоцити здатні ускладнювати дану картину. Як основне джерело PAI-1 в крові, вони можуть інгібувати фібриноліз і водночас виконувати ефекторну функцію, посилюючи активацію плазміногену t-PA. Таким чином, динамічні зміни співвідношення активаторів та інгібіторів, що продукуються тромбоцитами, можуть суттєво змінити загальний гемостатичний баланс. Оцінка ж таких численних змін в кровотоці, які можуть посилити або нейтралізувати одне одного, вимагає нових комплексних підходів. Наразі пропонуються загальні методики, спрямовані на імітацію

основних фізіологічних аспектів процесу гемостазу *in vitro* [Lipets, 2015; Lance, 2015; Kremers, 2015], особливо такі, що одночасно відтворюють як згортання, так і фібриноліз [Tripodi, 2014; Geffen, 2011; Antovic, 2010].

Загальні методики можуть бути хорошою альтернативою традиційним тестам на згортання, таким як протромбіновий час або активований частковий тромбoplastиновий час, які нечутливі до гіперкоагуляції та не дають змоги оцінити невідповідність між згортанням та фібринолізом у певних патологічних станах, що пов'язані з тромбоцитами та ендотелієм, наприклад, при есенціальній гіпертензії. У пацієнтів з гіпертонічною хворобою спостерігається порушення системи фібринолізу внаслідок підвищення активності PAI-1 та рівня його антигену, а також значного зниження активності t-PA [Lip, 2008]. Складні взаємодії між цими фібринолітичними маркерами та їх непередбачуваний загальний вплив на згортання та фібриноліз можуть зробити їх менш придатними для контролю розвитку гіпертонії.

Отже, за мету наступної серії експериментів було поставлено дослідити особливості утворення та лізису фібринових згустків в плазмі, збагаченій на тромбоцити, у хворих на гіпертензію та визначити параметри кривої згортання/лізису, придатні для контролю гемостатичного потенціалу крові за даної патології.

В попередніх дослідженнях було вивчено процес утворення та лізису фібрину у плазмі, збагаченій тромбоцитами, при стимуляції систем згортання крові та фібринолізу екзогенним тромбіном та рекомбінантним t-PA, відповідно. Для цих цілей було використано модифікований турбідиметричний метод оцінки утворення фібрину в рекальцифікованій плазмі, який дає можливість оцінювати динаміку утворення згустку та лізису в режимі реального часу.

На цьому етапі роботи, ми проаналізували можливості такої методики для диференціації параметрів кривої згортання/лізису PRP здорових донорів та пацієнтів з есенціальною гіпертензією.



В якості контролю було використано плазми умовно здорових донорів у моделі, описаній раніше. Основним параметром, що дозволяє охарактеризувати загальний гемостатичний баланс, було обрано площу під кривою згортання/лізису (AUC), розраховану як інтеграл.

За значеннями цього показника для PFP та PRP донорів було розраховано контрольне співвідношення  $AUC_{PRP}/AUC_{PFP}$ . Збільшення значення AUC для тромбоцитвмісного згустку, порівняно із згустком, отриманим з PFP, оцінювали як перехід локального гемостатичного балансу до прокоагулянтного стану. Відповідно, зниження величини AUC для PRP розглядалося як зсув гемостатичного балансу у більш профібринолітичний стан.

У донорів, за наявності 15 од./мл t-PA співвідношення  $AUC_{PRP}/AUC_{PFP}$  становило 1,33, що може вказувати на прокоагулянтний ефект тромбоцитів. На відміну від цього, при додаванні 40 од./мл t-PA, співвідношення  $AUC_{PRP}/AUC_{PFP} = 0,42$  вказувало на максимальний прояв профібринолітичних властивостей тромбоцитів.

Контрольні параметри згортання/лізису донорських PFP та PRP порівнювали з аналогічними параметрами, які оцінювали для пацієнтів з артеріальною гіпертензією. Статистично значуще збільшення значень майже всіх параметрів згортання плазми крові (як для PFP, так і для PRP) у пацієнтів порівняно з донорами (табл. 1) свідчить про розвиток гіперкоагуляційних симптомів при гіпертонії. Проте, тромбоцити хворих знижували площу під кривою згустку, отриманого з PRP, відносно згустку, отриманого з PFP ( $124,5 \pm 40,2$  та  $143,8 \pm 31,9$  відповідно) (табл. 1). Відповідно, отримане співвідношення  $AUC_{PRP}/AUC_{PFP} = 0,86$  вказує на певний профібринолітичний зсув гемостатичного балансу у PRP пацієнтів.

Таблиця 1. Параметри кривої згортання/лізису, отриманої для зразків плазм донорів та пацієнтів (значення представлені у вигляді медіани та її абсолютного відхилення)

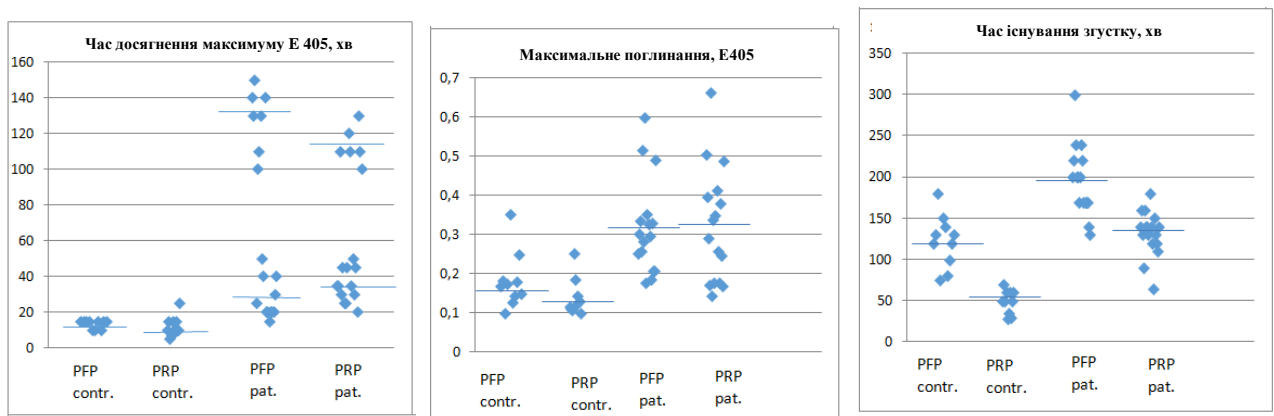
Параметр	Донори (n=7)	Пацієнти (n=16)	$\alpha$ -рівень
<b>Безклітинна плазма (PFP)</b>			
<i>згортання</i>			
E <sub>max</sub>	0.486 ± 0.051	0.582 ± 0.157	
time to peak	105.0 ± 15.0	145.0 ± 30.0*	$\alpha = 0.01$
AUC	68.4 ± 3.9	143.8 ± 31.9*	$\alpha = 0.01$
<i>згортання/лізис, 15 IU/мл t-PA</i>			
E <sub>max</sub>	0.253 ± 0.044	0.436 ± 0.131	
time to peak	22.5 ± 2.5 <sup>z</sup>	115.0 ± 35.0*	$\alpha = 0.05$
AUC	18.2 ± 5.3	83.7 ± 22.5*	$\alpha = 0.05$
clot lifetime	155.0 ± 20.0	> 300 хв	
<i>згортання/лізис, 40 IU/мл t-PA</i>			
E <sub>max</sub>	0.170 ± 0.025	0.301 ± 0.040*	$\alpha = 0.01$
time to peak	15.0 ± 0.0	35.0 ± 15.0*	$\alpha = 0.01$
AUC	9.1 ± 4.2	21.0 ± 8.0*	$\alpha = 0.01$
clot lifetime	140.0 ± 60.0	185.0 ± 25.0*	$\alpha = 0.05$
<b>Плазма, збагачена тромбоцитами (PRP)</b>			
<i>згортання</i>			
E <sub>max</sub>	0.418 ± 0.064	0.691 ± 0.129*	$\alpha = 0.01$
time to peak	80.0 ± 10.0	123.7 ± 26.3*	$\alpha = 0.01$
AUC	32.4 ± 10.1	124.5 ± 40.2*	$\alpha = 0.01$
<i>згортання/лізис, 15 IU/мл t-PA</i>			
E <sub>max</sub>	0.365 ± 0.172	0.533 ± 0.153	
time to peak	72.5 ± 15.0	95.0 ± 32.5	
AUC	24.3 ± 10.1	52.3 ± 29.5	
clot lifetime	110.0 ± 17.5	130.0 ± 35.0	
<i>згортання/лізис, 40 IU/мл t-PA</i>			
E <sub>max</sub>	0.116 ± 0.007	0.315 ± 0.118*	$\alpha = 0.01$
time to peak	10.0 ± 3.0	40.0 ± 10.0*	$\alpha = 0.01$
AUC	4.3 ± 2.1	25.1 ± 2.5*	$\alpha = 0.01$
clot lifetime	50.0 ± 20.0	140.0 ± 20.0*	$\alpha = 0.01$

Для згустків, отриманих з PFP, максимум поглинання залишався вищим порівняно з контролем у 1,7 - 1,8 рази також після додавання t-PA (табл. 1).

Застосування 15 од./мл t-PA для розчинення згустків, утворених з PFP, не призводило до їх розчинення у жодного хворого навіть на 50% протягом 3 годин спостереження. Час існування згустку був середньому на 45 хв довшим порівняно зі згустками контрольного PFP навіть при застосуванні концентрації 40 од./мл t-PA PRP пацієнтів характеризувалась підвищеним максимумом поглинання порівняно з PFP, незалежно від додавання t-PA (табл. 1). У той же час у хворих тромбоцити дещо сприяли лізису, стимульованому 15 МО/мл t-PA.

Водночас, на відміну від донорів, гемостатичний баланс у плазмі пацієнтів, при додаванні 40 од./мл t-PA, зміщувався бік згортання, що підтверджується співвідношенням  $AUC_{PRP}/AUC_{PFP} = 1,2$  ( $AUC_{PRP} = 25,1 \pm 2,5$  та  $AUC_{PFP} = 21,0 \pm 8,0$ ).

При додаванні в PRP 40 од./мл t-PA зміни параметрів згортання/лізису між донорами та пацієнтами були найбільш значущими. Отже, можна вважати, що саме ці параметри та такі умови тестування є найбільш показовими для індивідуального моніторингу гемостатичної системи пацієнтів із резистентною гіпертензією.



*Рисунок 3.31. Індивідуальні параметри згортання/лізису безтромбоцитної плазми (PFP) та плазми, збагаченої тромбоцитами (PRP) донорів (control) та пацієнтів з артеріальною гіпертензією (pat.). Горизонтальні маркери позначають середнє значення параметру*

Слід також зазначити, що значні індивідуальні відмінності свідчать про високу варіативність деяких оціночних параметрів всередині групи пацієнтів,

що може співвідноситися зі ступенем прояву захворювання та бути корисною для персоналізованого прогнозу перебігу захворювання (рис. 3.31).

Підсумовуючи, доступний інтегральний метод аналізу форми кривої згустку, використаний у нашому дослідженні, дозволив оцінити результуючий вплив тромбоцитів на процес згортання та подальший фібриноліз. Отримані дані дещо не відповідають традиційному погляду на тромбоцити як на виключно прокоагулянтні клітини, що відповідають за генерування тромбіну та полімеризацію фібрину. Фактично, прискорення часу досягнення максимуму в їх присутності свідчило про прояв прокоагулянтних властивостей тромбоцитів; але їх профібринолітичний ефект був більш вираженим, про що свідчило зниження AUC для згустків, отриманих з PRP, порівняно з PFP.

Для групи донорів, після додавання 15 од./мл t-PA у PFP та PRP, відмінності в параметрах згортання та лізису для них були незначними. Це може пояснюватись тим, що активовані тромбоцити посилюють згортання за рахунок додаткової генерації тромбіну і, в той же час, інгібують фібриноліз за рахунок секреції PAI-1 в плазму згортання. Співвідношення  $AUC_{PRP}/AUC_{PFP} = 1,33$  свідчить, що тромбоцити в плазмі, при додаванні невеликої кількості екзогенного t-PA, виступають скоріше як прокоагулянти. Натомість, коли деградація згустку супроводжувалась додаванням 40 од./мл t-PA, тромбоцити відновлювали свої профібринолітичні властивості.

Для пацієнтів з гіпертонічною хворобою тромбоцити виявляли слабшу здатність стимулювати фібриноліз. Зокрема, PRP та PFP пацієнтів були значно менш чутливі до t-PA.

Ці результати зниження стимулюючого впливу тромбоцитів на t-PA-залежний лізис плазми у пацієнтів порівняно з донорами підтверджуються літературними даними, де виявляли зниження фібринолітичного стану при гіпертонії, де більша частина t-PA знаходилась у комплексі з PAI-1, і була неактивною [Nordenhem, 1998]. Це може пояснити, чому в нашому дослідженні екзогенний t-PA доданий у плазму у збільшеній кількості, не допомагає

адекватно прискорити фібриноліз у пацієнтів. Очевидно, що ця кількість t-PA була недостатньою порівняно з рівнем PAI-1 у плазмі пацієнтів.

Таким чином, у нашому дослідженні ми підтвердили прокоагулянтну дію тромбоцитів на свіжу донорську плазму, де концентрація ендogenous t-PA є недостатньою для перевищення інгібіторного ефекту загального PAI-1 з плазми та тромбоцитів: саме тому стимуляція фібринолізу повільна і має незначний ефект на згортання. З іншого боку, ми показали, що під час утворення та лізису згустку тромбоцити можуть ефективно сприяти фібринолізу, незважаючи на PAI-1, який вони виділяють, за умови, якщо кількість t-PA в середовищі є достатньою для нейтралізації інгібітора. Це може бути важливим для формування тромбу в крові, оскільки в судинах рівень t-PA в плазмі крові може збільшуватись в кілька разів через локальну активацію ендотелію.

Наше дослідження обмежується невеликою кількістю пацієнтів; тим не менш, воно демонструє корисність аналізу форми кривої згустку для оцінки комплексних ефектів різних активностей тромбоцитів. Ми пропонуємо для тестування використовувати PRP замість PFP, яка традиційно використовуваного у звичайних аналізах згортання крові. Це може дозволити контролювати баланс між прокоагулянтними та антикоагулянтними явищами у плазмі, в тому числі, опосередкованими тромбоцитами.

Отже, використання плазми, збагаченої тромбоцитами у інтегральному методі аналізу форми кривої згортання/лізису, є інформативним для скринінгової оцінки стану хворих з резистентною артеріальною гіпертензією. Ми вважаємо, що інтегральний параметр площі під кривою, а також співвідношення площі під кривою, отриманої для плазми, збагаченої тромбоцитами, до площі під кривою для безклітинної плазми при додаванні 40 од./мл t-PA є таким, що дає змогу оцінити вплив тромбоцитів на локальний гемостатичний баланс, диференціювати групу здорових донорів та пацієнтів, і, відповідно, покращити терапевтичні підходи до лікування захворювання.

**Основні наукові результати розділу опубліковано в роботах:**

1. Patalakh I., Talanov S.A., **Revka O.V.**, Drobotko T.F. Activation of protein C in the *in vitro* thrombolysis, *Fiziol Zh.*, 2015, Vol. 61(4), pp. 78-84.
2. Patalakh I., **Revka O.**, Drobotko T. Endothelium-independent activation of protein C in whole blood. *International journal of physiology and pathophysiology*, 2016, Vol. 7(3), pp. 1-9.
3. **Revka O. V.**, Drobotko T. F., Patalakh I. I. Participation of monocytes and neutrophils in regulation of hemostatic balance. "Current problems in biochemistry": Book of articles/ NAS of Belarus, 2016, 286 p.
4. Patalakh I., **Revka O.**, Kuchmenko O., Matova O., Drobotko T., Grinenko T. Clot formation and lysis in platelet rich plasma of healthy donors and patients with resistant hypertension. *Ukr. Biochem. J.*, 2018, Vol. 90, №2, p. 67-75.
5. T. Grinenko, O. Yusova, **Revka O.**, I. Patalakh, T. Yatsenko Fibrinolysis regulation by platelets retaining plasminogen and tissue-type plasminogen activator on their surface, *Ukr.Biochem.J.*, 2019; Volume 91, Issue 6, pp. 38-48.
6. Patalakh I., **Revka O.**, Drobotko T. Protein C activation in cell-associated fibrin clots promotes fibrinolysis. *Ukr. Biochem. J.*, 2014, Vol. 86, № 5 (suppl.1)
7. **Revka O.** Influence of blood cells on coagulation and fibrinolysis of fibrin clot. Role of protein C in this processes // Actual problems of biochemistry and biotechnology – 2016. Book of abstracts // Kyiv, 2016, 72 p.
8. **Revka O.**, Patalakh I., Grinenko T. Platelets influence coagulation and fibrin lysis thereby regulating hemostatic balance. *Visnyk of the Lviv university. Series biology.*, 2016, Vol. 73., p. 257.
9. **Revka O.**, Patalakh I., Kuchmenko O., Matova O., Drobotko T., Grinenko T. Clot formation and lysis in platelet rich plasma of healthy donors and patients with resistant hypertension. Book of abstracts RECOOP 13th annual scientific conference/ Zagreb, Croatia, 2018, p.56.

10. **Revka O.** Biochemical mechanisms of fibrin clot formation and subsequent lysis regulation by platelets. *Ukr. Biochem. J.*, 2018, Vol. 90, №3, p.130.
11. **Revka O.**, Patalakh I., Grinenko T. Platelets in coordination of coagulation and fibrinolysis. *Ukr. Biochem. J.*, 2018., Vol. 90, special issue, p. 159.
12. **Revka O.**, I. Patalakh, T. Misztal, N. Marcińczyk, A. Gołaszewska, T. Grinenko Interplay of platelet procoagulant and profibrinolytic activity in thrombus formation and lysis. Proceedings of Young scientists' conference "Modern aspects of Biochemistry and Biotechnology – 2019", *Ukr. Biochem. J.*, 2019, Vol. 91, №2, P. 77-78.
13. **Revka O.**, I. Patalakh, T. Misztal, N. Marcińczyk, A. Gołaszewska, T. Grinenko Platelets as coordination centers of fibrin formation, structuring of fibrin network and initiation of fibrinolysis. "Youth and Progress of Biology": XV International scientific conference for students and PhD students, dedicated to the 135th anniversary of J. Parnas (Lviv, April 9–11, 2019): abstracts. – Lviv, 2019. – P. 47.
14. Patalakh I., **Revka O.**, Drobotko T., Grinenko T. Platelets provide spatiotemporal coordination between coagulation and fibrinolysis in a developing fibrin clot. *Medical and Clinical Chemistry* (2019), Vol. 21, 3(80), P. 122-123 (Proceedings of the XII Ukrainian Biochemical Congress, Ternopil, Ukraine).

## УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

В результаті проведених досліджень встановлено залучення клітин крові, зокрема, моноцитів, нейтрофілів та тромбоцитів як компонентів клітинної ланки гемостазу, до координування процесів тромбоутворення та фібринолізу, а також визначено спільні ланки та можливі молекулярні механізми, за якими здійснюється ефекторний вплив клітин.

Вперше показано, що моноцити та нейтрофіли здатні регулювати гемостатичний баланс, зокрема, моноцити здатні зміщувати гемостатичний баланс утворення та лізису фібринових згустків в бік прокоагулянтних процесів, натомість, нейтрофіли, незначно впливаючи на гемостатичний баланс, з однаковою ефективністю прискорюють фібриноутворення і фібриноліз, що може мати значення для фізіологічного утворення та розчинення тромбу і обмеження часу його існування.

З використанням методів конфокальної мікроскопії та моделі фібриноутворення в умовах потоку крові у реальному часі доведено, що тромбоцити, регулюючи як зсідання, так і фібриноліз, є також активними учасниками формування структури тромбу. Існують спільні ланки процесів тромбоутворення та фібринолізу, за допомогою яких тромбоцити можуть регулювати обидва процеси у просторі та часі. За рахунок фібрину, акумулюючи його на своїй поверхні і створюючи ділянки фібринової сітки з різними характеристиками всередині тромбу, тромбоцити роблять згусток більш компактним і стабільним. Протромбіназний комплекс, який збирається на поверхні тромбоцитів як система генерування тромбіну, після може функціонувати і як своєрідний рецептор для t-РА та плазміногену. Таким чином, з одного боку, тромбоцити концентрують фібрин і структурують фібринову мережу на перших стадіях утворення тромбів, коли це необхідно для запобігання кровотечі, а, з іншого боку, по мірі прогресування утворення тромбів, вони обмежують власну протромботичну активність, “перемикають” гемостатичний баланс в бік фібринолізу, посилюючи активацію плазміногену



на найбільш активованих тромбоцитах і таким чином обмежують розмір і час існування фібринового згустку.

При подальшому дослідженні механізмів участі тромбоцитів у процесі фібринолізу показано, що циркулюючі в крові інтактні тромбоцити несуть на своїй поверхні незначну кількість плазміногену, тоді як тромбін-індукована активація веде до експонування плазміноген-зв'язувальних сайтів на їх плазматичній мембрані. Активовані тромбоцити найбільш ефективно стимулюють реакцію активації плазміногену стрептокіназою і проявляють більш слабкий ефект за дії урокінази та тканинного активатора. У модельній системі з використанням desAB-фібрину продемонстровано здатність тромбоцитів стимулювати фібриноліз. Отримані результати дозволяють зробити висновок про те, що найбільш значимим ефектом тромбоцитів є зв'язування на їх поверхні плазміногену та його активаторів, прискорення процесу його активації та більш ефективного утворення плазміну і, відповідно, прискорення початку процесу лізису та зменшення загального часу існування згустку, що є важливим для регуляції фізіологічного гемостатичного балансу та запобігання патологічного тромбоутворення.

Доведено, що існує ендотелій-незалежний механізм активації системи протеїну С на поверхні тромбоцитів, моноцитів та нейтрофілів. Даний механізм працюючи в об'ємі тромбу, здатен ефективно стимулювати залежні від тканинного активатора плазміногену стадії лізису фібринового згустку, і є одним з інструментів впливу клітин крові на гемостатичний баланс.

Встановлено, що визначення кількісних параметрів кривої оптичного поглинання в процесі утворення та лізису фібрину в плазмі, збагаченій тромбоцитами, у порівнянні з безклітинною плазмою дає змогу оцінити баланс між прокоагулянтною та антикоагулянтною дією тромбоцитів і може бути інформативним для скринінгової оцінки гемостатичних порушень у хворих з резистентною артеріальною гіпертензією.

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі досліджено регуляцію процесів утворення та лізису фібринових згустків за участі клітин крові: моноцитів, нейтрофілів та тромбоцитів. Визначено окремі молекулярні механізми, за якими клітини крові забезпечують узгоджений перебіг протилежно спрямованих процесів тромбоутворення та фібринолізу. Отримані результати є важливими для розуміння ролі клітин крові у координуванні утворення та розчинення тромбів, що може бути використано для розробки нових та вдосконалення існуючих методів діагностики та лікування патологічних станів, пов'язаних з розвитком серцево-судинних захворювань.

1. Встановлено, що разом з прокоагулянтною функцією, клітини крові (моноцити, нейтрофіли та тромбоцити) здатні впливати й на процес лізису, виконуючи кофакторну функцію в реакції t-PA-залежної активації плазміногену та продукування плазміну.

2. Показано, що активація протеїну С в об'ємі згустку, утвореного з цільної крові, сприяє t-PA-індукованому лізису полімерного фібрину та скорочує час існування згустку. Вперше доведено існування ендотелій-незалежного шляху активації протеїну С клітинами крові в присутності кальцію та тромбіну завдяки наявному на їх поверхні тромбомодуліну.

3. Вперше в умовах потоку крові за допомогою конфокальної мікроскопії встановлено, що тромбоцити безпосередньо беруть участь в полімеризації фібрину, як структурні центри формування фібринового згустку. Активовані тромбоцити зв'язують плазміноген та t-PA на своїй поверхні фібрин-залежним та фібрин-незалежним шляхом, в такий спосіб виступаючи осередками ініціації процесу лізису навколо тромбоцитарних мікроагрегатів.

4. Показано, що ізольовані тромбоцити практично не несуть на своїй поверхні плазміноген, проте зв'язують тканинний активатор плазміногену; агоніст-індукована активація веде до експонування плазміноген-зв'язувальних

сайтів та збільшення сайтів зв'язування тканинного активатора плазміногену на їх плазматичній мембрані. Виявлено, що тромбоцити стимулюють реакцію активації плазміногену t-РА, урокіназою та стрептокіназою та збільшують швидкість гідролізу des-АВ-фібрину.

5. Запропоновано наступний механізм залучення тромбоцитів до процесів утворення та лізису фібринового згустку. Плазмін, генерований на поверхні тромбоцитів, асоційованих з полімерною сіткою фібрину, забезпечує утворення примембранного шару частково гідролізованого фібрину з презентованими С-кінцевими залишками лізину, які є сайтами зв'язування плазміногену і t-РА. В такий спосіб відбувається додаткове утворення плазміну, що обумовлює швидкий лізис фібринових згустків навколо тромбоцитарних мікроагрегатів.

6. Вперше виявлено, що протеїни протромбінового комплексу, зв'язані на поверхні тромбоцитів, які експонують фосфатидилсерин, збільшують швидкість активації плазміногену тканинним активатором. Рівароксабан частково пригнічує ефект протеїнів протромбінового комплексу, що вказує на залучення фактора згортання Ха до взаємодії з протеїнами системи активації плазміногену.

7. Для виявлення порушень гемостатичного балансу у хворих з резистентною артеріальною гіпертензією запропоновано визначати кількісні параметри кривої оптичного поглинання утворення та лізису фібрину у безтромбоцитарній плазмі та плазмі, збагаченій тромбоцитами.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Agbani E. Coordinated Membrane Ballooning and Procoagulant Spreading in Human Platelets. *Circulation*. 2015;132:1414-1424.
2. Aisina R, Mukhametova L. Structure and function of plasminogen/plasmin system. *Russ J Bioorg Chem*. 2014;40:590-605.
3. Aleman M, Gardiner C, Harrison P, Wolberg A. Differential contributions of monocyte- and platelet-derived microparticles towards thrombin generation and fibrin formation and stability. *J Thromb Haemost*. 2011;9(11):2251-2261.
4. Al-Tamimi M, Grigoriadis G, Tran H. et al. Coagulation-induced shedding of platelet glycoprotein VI mediated by factor Xa. *Blood*. 2011;117: 3912-3920.
5. Ammollo C, Semeraro F, Xu J. et al. Extracellular histones increase plasma thrombin generation by impairing thrombomodulin-dependent protein C activation. *J Thromb Haemost*. 2011;9(9):1795-1803.
6. Andersen H, Greenberg D, Fujikawa K. et al. Protease activated receptor 1 is the primary mediator of thrombin-stimulated platelet procoagulant activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96:11189-11193.
7. Andrews R, Karunakaran D, Gardiner E. et al. Platelet receptor proteolysis: a mechanism for downregulating platelet reactivity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:1511-1520.
8. Angelillo-Scherrer A. Leukocyte-derived microparticles in vascular homeostasis. *Circ Res*. 2012;110(2):356-369.
9. Antovic A. The overall hemostasis potential: a laboratory tool for the investigation of global hemostasis. *Semin Thromb Hemost*. 2010;36(7):772-779.
10. Baeten K, Richard M, Kanse S. Activation of single-chain urokinase-type plasminogen activator by platelet-associated plasminogen: a mechanism for

- stimulation of fibrinolysis by platelets. *J Thromb Haemost.* 2010;8(6):1313-1322.
11. Bar-Shavit R, Kahn A, Fenton J, Wilner G. Chemotactic response of monocytes to thrombin. *J Cell Biol.* 1983;96(1):282-285.
  12. Beguin S, Kumar R, Keularts I. Fibrin-dependent platelet procoagulant activity requires GPIb receptors and von Willebrand factor. *Blood.* 1999;93:564-570.
  13. Blinc A, Magdic J, Fric J. et al. Atomic force microscopy of fibrin networks and plasma clots during fibrinolysis. *Fibrinolysis and Proteolysis.* 2000;14(5):288-299.
  14. Bouchard B, Tracy P. The participation of leukocytes in coagulant reactions. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2003;1(3):464-469.
  15. Bouwens E, Stavenuiter F, Mosnier L. Mechanisms of anticoagulant and cytoprotective actions of the protein C pathway. *J Thromb Haemost.* 2013;11:1242-1253.
  16. Brass L, Wannemacher M, Ma P. et al. Regulating thrombus growth and stability to achieve an optimal response to injury. *J Thromb Haemost.* 2011;9(Suppl 1): 66-75.
  17. Broze G, Warren L, Novotny W. et al. The lipoprotein-associated coagulation inhibitor that inhibits the factor VII-tissue factor complex also inhibits factor Xa: insight into its possible mechanism of action. *Blood.* 1988;71:335-343.
  18. Bruhl M, Stark K, Steinhart A et al. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice *in vivo*. *J Exp Med.* 2012;209(4):819-835.
  19. Burgin J, Schaller J. Expression, isolation and characterization of a mutated human plasminogen kringle 3 with a functional lysine binding site. *Cell Mol Life Sci.* 1999;55(1):135-141.

20. Burnier L, Mosnier L. Novel mechanisms for activated protein C cytoprotective activities involving noncanonical activation of protease-activated receptor 3. *Blood*. 2013;122(5):807-816.
21. Carriero M, Franco P, Vocca I. et al. Structure, function and antagonists of urokinase-type plasminogen activator. *Frontiers in Bioscience*. 2009;14(10):3782-3794.
22. Carroll R, Gerrard J, Gilliam J. Clot retraction facilitates clot lysis. *Blood*. 1981;57(1):44-48.
23. Castellino F, Ploplis V. Structure and function of the plasminogen/plasmin system. *Thrombosis and Haemostasis*. 2005;93(4):647-654.
24. Cattaneo M. Bleeding manifestations of congenital and drug-induced defects of the platelet P2Y12 receptor for adenosine diphosphate. *Thromb Haemost*. 2011;105(Suppl 1):67-74.
25. Cesarman-Maus G, Hajjar K. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Br. J. Haematol*. 2005;129:307-321.
26. Chapina J, Hajjar K. Fibrinolysis and the control of blood coagulation. *Blood*. 2015;29(1):17-24.
27. Chen VM, Hogg PJ. Encryption and decryption of tissue factor. *J Thromb Haemost*. 2013;11:277-284.
28. Chow O, von Kockritz-Blickwede M, Bright AT et al. Statins enhance formation of phagocyte extracellular traps. *Cell Host Microbe*. 2010;8(5):445-454.
29. Christopher J, Meilang X. Activated protein C - an anticoagulant that does more than stop clots. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2008;40:2692-2697.
30. Conway E, Nowakowski B, Steiner Mosonyi M. Human neutrophils synthesize thrombomodulin that does not promote thrombin-dependent protein C activation. *Blood*. 1992;80(5):1254-1263.

31. Cosemans J, Van Kruchten R, Olieslagers S. et al. Potentiating role of Gas6 and Tyro3, Axl and Mer (TAM) receptors in human and murine platelet activation and thrombus stabilization. *J Thromb Haemost.* 2010;8:1797-1808.
32. Dahlbäck B, Villoutreix B. The anticoagulant protein C pathway. *FEBS Lett.* 2005;579:3310-3316.
33. Danese S, Vetrano S. The protein C pathway in tissue inflammation and injury: pathogenic role and therapeutic implications. *Blood.* 2010;115:1121-1130.
34. Darbousset R, Thomas GM, Mezouar S et al. Tissue factor-positive neutrophils bind to injured endothelial wall and initiate thrombus formation. *Blood.* 2012;120(10):2133-2143.
35. Das R, Pluskota E, Plow E. Plasminogen and its receptors as regulators of cardiovascular inflammatory responses. *Trends Cardiovasc Med.* 2010;20(4):120-124.
36. Di Cera E. Thrombin as procoagulant and anticoagulant. *J Thromb Haemost* 2007;5(Suppl. 1):196-202.
37. Doolittle R. X-ray crystallographic studies on fibrinogen and fibrin. *Journal of thrombosis and haemostasis.* 2003;1:1559-1565.
38. Egorina E, Sovershaev M, Olsen J, Østerud B. Granulocytes do not express but acquire monocyte-derived tissue factor in whole blood: evidence for a direct transfer. *Blood.* 2008;111(3):1208-1216.
39. Emsley J, Knight C, Farndale R. et al. Structural basis of collagen recognition by integrin alpha2beta1. *Cell.* 2000;101:47-56.
40. Fuchs T, Brill A, Wagner D. Neutrophil extracellular trap (NET) impact on deep vein thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32(8):1777-1783.
41. Fuss I. Isolation of whole mononuclear cells from peripheral blood and cord blood . *Current Protocols in Immunology.* 2013.—Wiley Online Library.

42. Galligan L, Livingstone W, Volkov Y. et al. Characterization of protein C receptor expression in monocytes. *Br J Haematol.* 2001;115(2):408-414.
43. Gao S, Morser J, McLean K. et al. Differential effect of platelets on plasminogen activation by tissue plasminogen activator, urokinase and streptokinase. *Thromb. Res.* 1990;58(4):421-433.
44. Gebbink M. Tissue-type plasminogen activator-mediated plasminogen activation and contact activation, implications in and beyond haemostasis. *J Thromb Haemost.* 2011;9:174-181.
45. Geddings JE, Mackman N. Recently Identified factors that regulate hemostasis and thrombosis. *Thrombosis and Haemostasis.* 2014;111(4):570-574.
46. Geffen M, Loof A, Lap P. et al. A novel hemostasis assay for the simultaneous measurement of coagulation and fibrinolysis. *Hematology.* 2011;16(6):327-336.
47. Gillis S, Furie BC, Furie B. Interactions of neutrophils and coagulation proteins. *Semin Hematol.* 1997;34(4):336-42.
48. Gould T, Vu T, Stafford A. et al. Cell-free DNA modulates clot structure and impairs fibrinolysis in sepsis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35(12):2544-2553.
49. Grinnell B, Walls J, Gerlitz B. Glycosylation of human protein C affects its secretion, processing, functional activities, and activation by thrombin. *J. Biol. Chem.* 1991;266:9778-9785.
50. Gruber A, Mori E, del Zoppo G, Waxman L, Griffin J. Alteration of fibrin network by activated protein C. *Blood.* 1994;83(9):2541-2548.
51. Hansen J, Svensson B, Zhang C. et al. Basal plasma concentration of tissue plasminogen activator (t-PA) and the adaption to strenuous exercise in familial hypercholesterolaemia (FH). *Blood Coagulation and Fibrinolysis.* 1994;5(5):781-787.



52. Hassouna H, Quinn C. Proteolysis of protein C in pooled normal plasma and purified protein C by activated protein C (APC). *Biophys Chem.* 2002;95(2):109-124.
53. Heeb M, Gruber A, Griffin J. Identification of divalent metal ion-dependent inhibition of activated protein C by alpha 2-macroglobulin and alpha 2-antiplasmin in blood and comparisons to inhibition of factor Xa, thrombin, and plasmin. *J Bio. Chem.* 1991;266(26):17606-17612.
54. Heemskerk J, Bevers E, Lindhout T. Platelet activation and blood coagulation. *Thromb Haemost.* 2002;88:186-193.
55. Heemskerk J, Hoyland J, Mason W. et al. Spiking in cytosolic calcium concentration in single fibrinogen-bound fura-2-loaded human platelets. *Biochem J.* 1992;283:379-383.
56. Hemker H, Al Dieri R, De Smedt E. et al. Thrombin generation, a function test of the haemostatic-thrombotic system. *Thromb Haemost.* 2006;96:553-561.
57. Hemker H, Giesen P, Ramjee M, Wagenvoord R, Beguin S. The Thrombogram: monitoring thrombin generation in platelet rich Plasma. *Thromb Haemost.* 2000;83:589-91.
58. Hemler M. VLA proteins in the integrin family: structures, functions, and their role on leukocytes. *Annu Rev Immunol.* 1990;8:365-400.
59. Horne M, Merryman P, Cullinane A. Plasminogen interaction with platelets: the importance of carboxyterminal lysines. *Thromb. Res.* 2005;116(6):499-507.
60. Hoylaerts M, Rijken D, Lijnen H, Collen D. Kinetics of the activation of plasminogen by human tissue plasminogen activator. Role of fibrin. *J Biol Chem.* 1982;257:2912-2919.
61. Huai Q, Mazar A, Kuo A. et al. Structure of human urokinase plasminogen activator in complex with its receptor. *Science.* 2006;311(5761):656-659.

62. Hudson N. Biophysical mechanisms mediating fibrin fiber lysis. *Biomed Res Int.* 2017;2017:2748340.
63. Iba T, Miki T, Hashiguchi N. et al. Is the neutrophil a 'prima donna' in the procoagulant process during sepsis? *Crit Care.* 2014;18:230.
64. Jackson S, Mistry N, Yuan Y. Platelets and the injured vessel wall "rolling into action": focus on glycoprotein Ib/V/IX and the platelet cytoskeleton. *Trends Cardiovasc Med.* 2000;10:192-197.
65. Jackson S, Nesbitt W, Kulkarni S. Signaling events underlying thrombus formation. *J Thromb Haemost.* 2003;1:1602-1612.
66. Jenkins A, Howells G, Scott E. The response to thrombin of human neutrophils: evidence for two novel receptors. *Journal of Cell Science.* 1995;8:3059-3066.
67. Kanel R, Dimsdale J. Effects of sympathetic activation by adrenergic infusions on hemostasis *in vivo*. *Eur J Haematol.* 2000;65:357-369.
68. Kaplan M, Radic M. Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity. *J Immunol.* 2012;189(6):2689-2695.
69. Kirschbaum N, Budzynski A. A unique proteolytic fragment of human fibrinogen containing the alpha COOH-terminal domain of the native molecule. *J Biol Chem.* 1990;265:13669-13676.
70. Komissarov A, Florova G, Idell S. Effects of extracellular DNA on plasminogen activation and fibrinolysis. *J Biol Chem.* 2011;286(49):41949-41962.
71. Kremers R, Peters T, Wagenvoort R. et al. The balance of pro- and anticoagulant processes underlying thrombin generation. *J Thromb Haemost* 2015;13:437-447.
72. Kunigal S, Kusch A, Tkachuk N et al. Monocyte-expressed urokinase inhibits vascular smooth muscle cell growth by activating Stat1. *Blood.* 2003;102(13):4377-4383.

73. Lamba D, Bauer M, Huber R. et al. The 2.3 °A crystal structure of the catalytic domain of recombinant two-chain human tissue-type plasminogen activator. *Journal of Molecular Biology*. 1996;258(1):117-135.
74. Lancé M. A general review of major global coagulation assays: thrombelastography, thrombin generation test and clot waveform analysis. *Thromb J*. 2015;13(1).
75. Law R., Caradoc-Davies T., Cowieson N. et al. The X-ray crystal structure of full-length human plasminogen. *Cell Reports*. 2012;1(3):185-190.
76. Lievens D, Zerneck A, Seijkens T. et al. Platelet CD40L mediates thrombotic and inflammatory processes in atherosclerosis. *Blood*. 2010;116:4317-4327.
77. Lip G, Blann A. Endothelium and fibrinolysis in hypertension: important facets of a prothrombotic state? *Hypertension*. 2008;52:218-219.
78. Lipets E, Ataullakhanov F. Global assays of hemostasis in the diagnostics of hypercoagulation and evaluation of thrombosis risk. *Thromb J*. 2015;13(1).
79. Liu S. Tissue plasminogen activator-based nanothrombolysis for ischemic stroke. *Expert Opin Drug Deliv*. 2018;15(2):173-184.
80. Longstaff C, Kolev K. Basic mechanisms and regulation of fibrinolysis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2015;13(Suppl. 1):98-105.
81. Longstaff C, Thelwell C, Williams S. et al. The interplay between tissue plasminogen activator domains and fibrin structures in the regulation of fibrinolysis: kinetic and microscopic studies. *Blood*. 2011;117(2):661-668.
82. Longstaff C, Varjui, Sotonyi P. et al. Mechanical stability and fibrinolytic resistance of clots containing fibrin, DNA, and histones. *J Biol Chem*. 2013;288(10):6946-6956.
83. Longstaff C, Williams S, Thelwell C. Fibrin binding and the regulation of plasminogen activators during thrombolytic therapy. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*. 2008;6:212-223.

84. Lucas M, Fretto L, McKee P. The binding of human plasminogen to fibrin and fibrinogen. *J Biol Chem.* 1983;258:4249-4256.
85. Maas C, Hermeling S, Bouma B et al. A role for protein misfolding in I immunogenicity of biopharmaceuticals. *J Biol Chem.* 2007;282:2229-2236.
86. Madison E. Probing structure-function relationships of tissue-type plasminogen activator by site-specific mutagenesis. *Fibrinolysis and Proteolysis.* 1994;8(1):221-236.
87. Markus G. Conformational changes in plasminogen, their effect on activation, and the agents that modulate activation rates - a review. *Fibrinolysis.* 1996;10(2):75-85.
88. Maugeri N, Brambilla M, Camera M. et al. Human polymorphonuclear leukocytes produce and express functional tissue factor upon stimulation. *J Thromb Haemost.* 2006;4(6):1323-1330.
89. Maugeri N, Rovere-Querini P, Evangelista V. et al. Neutrophils phagocytose activated platelets in vivo: a phosphatidylserine, P-selectin, and beta2 integrin-dependent cell clearance program. *Blood.* 2009;113(21):5254-5265.
90. McCachren S, Diggs J, Weinberg J. et al. Thrombomodulin expression by human blood monocytes and by human synovial tissue lining macrophages. *Blood.* 1991;78(12):3128-3132.
91. McGee M, Foster S, Wang X. Simultaneous expression of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor by human monocytes. A potential mechanism for localized control of blood coagulation. *J Exp Med.* 1994;179(6):1847-1854.
92. Medved L, Nieuwenhuizen W. Molecular mechanisms of initiation of fibrinolysis by fibrin. *Thromb Haemost* 2003;89:409-419.
93. Miles L, Ginsberg M, White J, Plow E. Plasminogen interacts with human platelets through two distinct mechanisms. *J. Clin. Invest.* 1986;77(6):2001-2009.

94. Miles L, Plow E. Binding and activation of plasminogen on the platelet surface. *J. Biol. Chem.* 1985;260(7):4303-4311.
95. Moers A, Nieswandt B, Massberg S. et al. G13 is an essential mediator of platelet activation in hemostasis and thrombosis. *Nat Med.* 2003;9:1418-1422.
96. Mohan R, Esmon C. Endothelial cell protein C receptor: a multiliganded and multifunctional receptor. *Blood.* 2014;124:1553-1562.
97. Monroe D, Hoffman M. What does it take to make the perfect clot? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:41-48.
98. 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.
99. Mosnier L, Meijers J, Bouma B. Regulation of fibrinolysis in plasma by TAFI and protein C is dependent on the concentration of thrombomodulin. *Haemost.* 2001;85(1):5-11.
100. 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.
101. Munnix I, Kuijpers M, Auger J. et al. Segregation of platelet aggregatory and procoagulant microdomains in thrombus formation: regulation by transient integrin activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:2484-2490.
102. Nakamura S, Imamura T, Okamoto K. Tissue factor in neutrophils: yes. *J Thromb Haemost.* 2004;2(2):214-217.
103. Nieswandt B, Pleines I, Bender M. Platelet adhesion and activation mechanisms in arterial thrombosis and ischaemic stroke. *J Thromb Haemost.* 2011;9(Suppl 1):92-104.

104. Nordenhem A, Wiman B. Tissue plasminogen activator (t-PA) antigen in plasma: correlation with different tPA/inhibitor complexes. *Scand J Clin Lab Invest.* 1998;58(6):475-483.
105. Norrman B, Wallen P., Ranby M. Fibrinolysis mediated by tissue plasminogen activator: disclosure of a kinetic transition. *European Journal of Biochemistry.* 1985;149(1):193-200.
106. O'Donnell J, O'Sullivan J, Preston R. Advances in understanding the molecular mechanisms that maintain normal haemostasis. *Br J Haematol.* 2019;186(1):24-36.
107. Palta S, Saroa R, Palta A. Overview of the coagulation system. *Indian J Anaesth.* 2014;58(5):515–523.
108. Park S, Harker L, Marzec U. et al. Demonstration of single chain urokinase-type plasminogen activator on human platelet membrane. *Blood.* 1989;73(6):1421-1425.
109. Perera L, Foley C, Darden T. Modeling zymogen protein C. *Biophysical Journal.* 2000;79:2925-2943.
110. Petrovan R, Ruf W. Residue Met(156) contributes to the labile enzyme conformation of coagulation factor VIIa. *J Biol Chem.* 2001;276:6616-6620.
111. Pham C. Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(7):541-550.
112. Plow E, Dœuvre L, Das R. So many plasminogen receptors: why? *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:141806.
113. Podoplelova N, Sveshnikova A, Kotova Y. Coagulation factors bound to procoagulant platelets concentrate in cap structures to promote clotting. *Blood.* 2016;128(13):1745-1755.
114. Pryzdial E, Bajzár L, Nesheim M. Prothrombinase components can accelerate tissue plasminogen activator-catalyzed plasminogen activation. *J. Biol. Chem.* 1995;270(30):17871-17877.

115. Pryzdial E, Kessler G. Autoproteolysis or plasmin-mediated cleavage of factor Xa alpha exposes a plasminogen binding site and inhibits coagulation. *J. Biol. Chem.* 1996;27(28):16614-16620.
116. Pryzdial E, Meixner S, Talbot K. et al. Thrombolysis by chemically modified coagulation factor Xa. *J. Thromb. Haemost.* 2016;14:1844-1854.
117. Rezaie A.R. Rapid activation of Protein C by factor Xa and thrombin in the presence of polyanionic compounds. *Blood.* 1998;91(12):4572-4580.
118. Romo G, Dong J, Schade A. et al. The glycoprotein Ib-IX-V complex is a platelet counterreceptor for P-selectin. *J Exp Med.* 1999;190:803-814.
119. Ruf W, Ruggeri Z. Neutrophils release brakes of coagulation. *Nature Medicine.* 2010;16:851-852.
120. Saksela O. Plasminogen activation and regulation of pericellular proteolysis. *BBA-Reviews on Cancer.* 1985;823(1):35-65.
121. Semeraro F, Ammollo T, Semeraro N, Colucci M. Tissue factor-expressing monocytes inhibit fibrinolysis through a TAFI-mediated mechanism and make clots resistant to heparins. *Haematologica.* 2009;94(6):819-826.
122. Shantsila E, Lip G. The role of monocytes in thrombotic disorders. Insights from tissue factor, monocyte-platelet aggregates and novel mechanisms. *Thromb Haemost.* 2009;102(5):916-924.
123. Siess W. Molecular mechanisms of platelet activation. *Physiol Rev.* 1989;69:158-178.
124. Simon D, Chen Z, Xu H. et al. Platelet glycoprotein is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *J Exp Med.* 2000;192:193-204.
125. Singh I, Burnand K, Collins M et al. Failure of thrombus to resolve in urokinase-type plasminogen activator gene-knockout mice: rescue by normal bone marrow-derived cells. *Circulation.* 2003;107(6):869-875.

126. 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.
127. Steele B, Harper M, Macaulay I. et al. Canonical Wnt signaling negatively regulates platelet function. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106:19836-19841.
128. Stewart R, Fredenburgh J, Rischke J et al. Thrombin-activable fibrinolysis inhibitor attenuates (DD)E-mediated stimulation of plasminogen activation by reducing the affinity of (DD)E for tissue plasminogen activator. A potential mechanism for enhancing the fibrin specificity of tissue plasminogen activator. *J Biol Chem.* 2000;275:36612-36620.
129. Suzuki K. Functionally active thrombomodulin is present in human platelets. *J. Biochem.* 1988;104:628-632.
130. Swystun L, Liaw P. The role of leukocytes in thrombosis. *Blood.* 2016;128(6):753-762.
131. Tabak O, Gelisgen R, Uzun H. et al. Hypertension and hemostatic/fibrinolytic balance disorders. *Clin Invest Med.* 2009;32(6):285-292.
132. Takada Y, Makino Y, Takada A. Glu-plasminogen I and II: their activation by urokinase and streptokinase in the presence of fibrin and fibrinogen. *Thrombosis Research.* 1985;39(3):289-296.
133. Talbot K, Meixner S, Pryzdial E. Enhanced fibrinolysis by proteolysed coagulation factor Xa. *Biochim. Biophys. Acta.* 2010;1804(4):723-730.
134. Talbot K, Meixner S, Pryzdial E. Factor Xa-Antithrombin complex enhances tissue plasminogen activator-mediated clot lysis. *Blood.* 2011;118(21):1180.
135. Tanaka K, Key N, Levy J. Blood coagulation: hemostasis and thrombin regulation. *Anesth Analg.* 2009;108(5):1433-1446.



136. Theoret J, Yacoub D, Hachem A. et al. P-selectin ligation induces platelet activation and enhances microaggregate and thrombus formation. *Thromb Res.* 2011;128:243-250.
137. Tótl L, Beaudin S, Liaw P. Activate protein C up-regulates IL-10 and inhibits tissue factor in blood monocytes. *J Immunol.* 2008;181(3):2165-2173.
138. Tripodi A. A(nother) test meant to fill the gap between *in vivo* and *ex vivo* hemostasis. *Clinical Chemistry.* 2014;60(9):1137-1140.
139. Tsai C.-S. Expression of thrombomodulin on monocytes is associated with early outcomes in patients with coronary artery bypass graft surgery. *Shock.* 2010;34(1):31-39.
140. Tutwiler V, Madeeva D, Ahn H. et al. Platelet transactivation by monocytes promotes thrombosis in heparin-induced thrombocytopenia. *Blood.* 2016;127(4):464-472.
141. Urano T, Suzuki Y. Accelerated fibrinolysis and its propagation on vascular endothelial cells by secreted and retained t-PA. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:208108.
142. Váradi K. Activation and inactivation of human protein C by plasmin. *Thromb. Haemost.* 1994;71(5):615-621.
143. Varju I, Tenekedjiev K, Keresztes Z et al. Fractal kinetic behavior of plasmin on the surface of fibrin meshwork. *Biochemistry.* 2014;53:6348-6356.
144. Vassalli J, Baccino D, Belin D. A cellular binding site for the Mr 55,000 form of the human plasminogen activator, urokinase. *The Journal of Cell Biology.* 1985;100(1):86-92.
145. Vassalli J, Sappino P., Belin D. The plasminogen activator/plasmin system. *Journal of Clinical Investigation.* 1991;88(4):1067-1072.
146. Vaughan D, Mendelsohn M, Declerck P. et al. Characterization of the binding of human tissue type plasminogen activator to platelets. *J. Biol. Chem.* 1989;264(27):15869-15874.

147. Vaughan D, Mendelsohn M, Declerck P. et al. Characterization of the binding of human tissue type plasminogen activator to platelets. *J. Biol. Chem.* 1989;264(27):15869-15874.
148. Versteeg H, Heemskerk JWM, Levi M et al. New fundamentals in hemostasis. *Physiol Rev.* 2013;93:327-358.
149. Vries C, Veerman H, Nesheim M. et al. Kinetic characterization of tissue-type plasminogen activator (t-PA) and t-PA deletion mutants. *Thrombosis and Haemostasis.* 1991;65(3):280-285.
150. Wakefield T, Strieter R, Wilke C. et al. Venous thrombosis-associated inflammation and attenuation with neutralizing antibodies to cytokines and adhesion molecules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15(2):258-268.
151. Walker J, Nesheim M. The molecular weights, mass distribution, chain composition, and structure of soluble fibrin degradation products released from a fibrin clot perfused with plasmin. *J Biol Chem.* 1999;274:5201-5212.
152. Watson S, Herbert J, Pollitt A. GPVI and CLEC-2 in hemostasis and vascular integrity. *J Thromb Haemost.* 2010;8:1456-1467.
153. Weeterings C, de Groot P, Adelmeijer J. The glycoprotein Ib-IX-V complex contributes to tissue factor-independent thrombin generation by recombinant factor VIIa on the activated platelet surface. *Blood.* 2008;112:3227-3233.
154. Weisel J, Litvinov R. Fibrin formation, structure and properties. *Subcell Biochem.* 2017;82:405-456.
155. Whyte C, Mitchell J, Mutch N. Platelet-mediated modulation of fibrinolysis. *Semin Thromb Hemost.* 2017;43(2):115-128.
156. Whyte C, Swieringa F, Mastenbroek T. et al. Plasminogen associates with phosphatidylserine-exposing platelets and contributes to thrombus lysis under flow. *Blood.* 2015;125(16):2568-2578.
157. Wohner N. Role of cellular elements in thrombus formation and dissolution. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem.* 2008;6(3):224-228.

158. Wu H, Diamond S. Tissue plasminogen activator (t-PA) inhibits plasmin degradation of fibrin. A mechanism that slows t-PA-mediated fibrinolysis but does not require alpha 2-antiplasmin or leakage of intrinsic plasminogen. *J Clin Invest.* 1995; 95(6):2483-2490.
159. Wu K, Urano T, Ihara H. et al. The cleavage and inactivation of plasminogen activator inhibitor type 1 by neutrophil elastase: the evaluation of its physiologic relevance in fibrinolysis. *Blood.* 1995;86(3):1056-1061.
160. Zwaal R, Schroit A. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood.* 1997;89:1121-1132.
161. Гриненко, Т. В. (2007). Регуляція фібринолізу некаталітичними ділянками молекул плазміногену/плазміну. Дисертація на здобуття ступеня доктора біологічних наук. Інститут біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України.
162. Луговской, Э. В., Макогоненко, Е. М., & Комиссаренко, С. В. (2013). Молекулярные механизмы образования и разрушения фибрина. Киев: Наукова Думка.

## ДОДАТОК 1

### СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Patalakh I., Talanov S.A., **Revka O.V.**, Drobotko T.F. Activation of protein C in the *in vitro* thrombolysis, *Fiziol Zh.*, 2015, Vol. 61(4), pp. 78-84.
2. Patalakh I., **Revka O.**, Drobotko T. Endothelium-independent activation of protein C in whole blood. *International journal of physiology and pathophysiology*, 2016, Vol. 7(3), pp. 1-9.
3. **Revka O. V.**, Drobotko T. F., Patalakh I. I. Participation of monocytes and neutrophils in regulation of hemostatic balance. "Current problems in biochemistry": Book of articles/ NAS of Belarus, 2016, 286 p.
4. Patalakh I., **Revka O.**, Kuchmenko O., Matova O., Drobotko T., Grinenko T. Clot formation and lysis in platelet rich plasma of healthy donors and patients with resistant hypertension. *Ukr. Biochem. J.*, 2018, Vol. 90, №2, p. 67-75.
5. T. Grinenko, O. Yusova, **Revka O.**, I. Patalakh, T. Yatsenko Fibrinolysis regulation by platelets retaining plasminogen and tissue-type plasminogen activator on their surface, *Ukr.Biochem.J.*, 2019; Volume 91, Issue 6, pp. 38-48.

### ВІДОМОСТІ ПРО АПРОБАЦІЮ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Revka O.**, Goncharuk M.N. Structural and functional interaction between protein C and ceruloplasmin. "Biology: from molecule to biosphere", Proc. Of the VIII international conference of young scientists (December 3-6, 2013, Kharkiv, Ukraine), 2013, p. 334.
2. Patalakh I., **Revka O.**, Drobotko T. Protein C activation in cell-associated fibrin clots promotes fibrinolysis. *Ukr. Biochem. J.*, 2014, Vol. 86, № 5 (suppl.1)
3. **Revka O.** Influence of blood cells on coagulation and fibrinolysis of fibrin clot. Role of protein C in this processes // Actual problems of biochemistry and biotechnology – 2016. Book of abstracts // Kyiv, 2016, 72 p.

4. **Revka O.**, Patalakh I., Grinenko T. Platelets influence coagulation and fibrin lysis thereby regulating hemostatic balance. *Visnyk of the Lviv university. Series biology.*, 2016, Vol. 73., p. 257.
5. **Revka O.**, Patalakh I., Kuchmenko O., Matova O., Drobotko T., Grinenko T. Clot formation and lysis in platelet rich plasma of healthy donors and patients with resistant hypertension. *Book of abstracts RECOOP 13th annual scientific conference/ Zagreb, Croatia, 2018*, p.56.
6. **Revka O.** Biochemical mechanisms of fibrin clot formation and subsequent lysis regulation by platelets. *Ukr. Biochem. J.*, 2018, Vol. 90, №3, p.130.
7. **Revka O.**, Patalakh I., Grinenko T. Platelets in coordination of coagulation and fibrinolysis. *Ukr. Biochem. J.*, 2018., Vol. 90, special issue, p. 159.
8. **Revka O.**, I. Patalakh, T. Misztal, N. Marcińczyk, A. Gołaszewska, T. Grinenko Interplay of platelet procoagulant and profibrinolytic activity in thrombus formation and lysis. *Proceedings of Young scientists' conference "Modern aspects of Biochemistry and Biotechnology – 2019"*, *Ukr. Biochem. J.*, 2019, Vol. 91, №2, P. 77-78.
9. **Revka O.**, I. Patalakh, T. Misztal, N. Marcińczyk, A. Gołaszewska, T. Grinenko Platelets as coordination centers of fibrin formation, structuring of fibrin network and initiation of fibrinolysis. "Youth and Progress of Biology": XV International scientific conference for students and PhD students, dedicated to the 135th anniversary of J. Parnas (Lviv, April 9–11, 2019): abstracts. – Lviv, 2019. – P. 47.
10. Patalakh I., **Revka O.**, Drobotko T., Grinenko T. Platelets provide spatiotemporal coordination between coagulation and fibrinolysis in a developing fibrin clot. *Medical and Clinical Chemistry (2019)*, Vol. 21, 3(80), P. 122-123 (Proceedings of the XII Ukrainian Biochemical Congress, Ternopil, Ukraine).