

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ІМ. О.В. ПАЛЛАДІНА НАН УКРАЇНИ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

КОРОЛЬОВА ДАР'Я СЕРГІЇВНА

УДК 577.151.042.5: 612.115

ДИСЕРТАЦІЯ

**РЕГУЛЮВАННЯ АКТИВНОСТІ ТРОМБІНУ
В НОРМІ ТА ЗА ПАТОЛОГІЧНИХ СТАНІВ**

Том 1.

03.00.04. – біохімія
03.00.20. – біотехнологія
(09 – біологічні науки).

Подається на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело. Всі частини тексту дисертації, під час написання яких використовувалися технології штучного інтелекту, перевірені та відредаговані авторкою особисто.

 _____, Д.С. Корольова

Науковий консультант: Комісаренко Сергій Васильович, академік НАН України,
доктор біологічних наук, професор

Київ - 2025

АНОТАЦІЯ

***Корольова Д.С.* Регулювання активності тромбіну в нормі та за патологічних станів. - Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія та 03.00.20. – біотехнологія (09 – біологічні науки). – Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, м. Київ, 2025.

Тромбоутворення як ключова подія зупинки кровотечі при пораненнях або ж при патологічному внутрішньосудинному тромбоутворенні регулюється активністю тромбіну – ензиму, що генерується під час активації протромбіну внаслідок роботи каскаду зсідання крові. Водночас, тромбін є ключовим ензимом системи гемостазу та регулює всі її ланки, здійснюючи як прокоагулянту, так і антикоагулянту функції, регулює клітинний гемостаз, опосередковано регулює фібриноліз, тощо. Крім того, тромбін є одним з ензимів, що опосередковує взаємодію системи гемостазу та імунної системи. Насамперед, тромбін стимулює клітини імунної системи шляхом активації PAR-1 та PAR-4. З іншого боку, експресія моноцитами тканинного фактора запускає каскад зсідання крові та утворення тромбіну.

Попередник тромбіну – протромбін, є домінантним проензимом зсідання крові, його концентрація в плазмі крові складає 100 мкг/мл, а отже його активація може призвести до швидкої та ефективної зупинки кровотечі, але і до небажаного внутрішньосудинного тромбоутворення. Отже, регуляція активності тромбіну (інгібування або ж стимулювання його активності, вибір про- чи антикоагулянтного способу дії), дає змогу посилити екстрасудинне тромбоутворення, або ж запобігти внутрішньосудинному формуванню фібрину. Водночас, виявлення ензиматичної активності тромбіну в кровотоці слугуватиме надійною ознакою загрози внутрішньосудинного тромбоутворення.

Саме тому, дисертацію присвячено пошуку шляхів регуляції активності тромбіну в нормі та за патологічних станів. Запропоновано низькомолекулярні специфічні інгібітори тромбіну для пригнічення прокоагулянтного потенціалу

системи гемостазу, а також активатор протромбіну, який надає біоматеріалам прокоагулянтних властивостей для створення високоефективних кровоспинних засобів. Крім того, запропоновано методи, що дають змогу детектувати появу тромбіну в кровотоці: визначення появи розчинного фібрину та претромбіну-1, детекцію зниження вмісту протеїну С. Запропоновані методи лабораторної діагностики було апробовано за низки патологій, асоційованих з порушенням роботи системи зсідання крові.

Проведений автором аналіз особливостей патологій, за яких спостерігається внутрішньосудинна продукція тромбіну (відповідно до стану ендотелію судин, зниження чи підвищення концентрації компонентів системи зсідання крові) дозволив зробити припущення про причини перенаправлення ензиматичної активності тромбіну щодо його домінантних субстратів за патологічних станів.

Розглянемо основні результати роботи детальніше.

Методами *in silico* створено фокусну бібліотеку низькомолекулярних сполук – потенційних інгібіторів тромбіну. Синтезовано їх та апробовано у модельних системах *in vitro*, обрано найефективніші сполуки-кандидати, здатні селективно та специфічно інгібувати активність тромбіну. Показано, що механізм інгібування тромбіну є конкурентним, тобто обрані сполуки взаємодіють з активним центром тромбіну та за допомогою молекулярної динаміки продемонстровано природу цієї взаємодії. В модельній системі *in vivo* показано, що досліджувані сполуки забезпечують зниження потенціалу системи зсідання крові та інгібують утворення фібриново-тромбоцитарного тромбу за рахунок пригнічення тромбінової активності при внутрішньовенному введенні тваринам. Тож, отримані інгібітори тромбіну можуть слугувати основою для створення антитромботичних засобів.

Запропоновано активатор протромбіну з отрути *Echis multisquamatus* – екамулін – як універсальну основу для надання біоматеріалам кровоспинних властивостей за рахунок ефективної екstrasудинної генерації ендогенного тромбіну. В модельних системах *in vitro* (на збагаченій тромбоцитами плазмі

крові) та *in vivo* (на моделі печінкової кровотечі у щурів) показано, що нековалентна модифікація екамуліном біоінертних, біоактивних та біорозкладних матеріалів надає їм кровоспинних властивостей. Створено рекомбінантний аналог активатора протромбіну, застосування якого може суттєво здешевити технологію.

Шляхом поєднання кровоспинних властивостей активатора протромбіну та сорбційних властивостей активованих карбонових волокон було створено універсальний засіб для зупинки кровотеч – «Карбогемостат». Проведено доклінічні дослідження «Карбогемостату», які продемонстрували його безпечність. За погодження Державної служби України з лікарських засобів та контролю за наркотиками проведено на базі КНП «Київський міський клінічний ендокринологічний центр» клінічні випробування ефективності та безпечності «Карбогемостату» для зупинки кровотечі на пацієнтах які мають зовнішню свіжу чи інфіковану рану кінцівок, що супроводжується артеріальною та профузною кровотечею і потребують зовнішнього застосування перев'язувального матеріалу з кровоспинною активністю. Клінічне дослідження засвідчило безпечність та ефективність «Карбогемостату» навіть на фоні антикоагулянтної терапії.

Поєднання колагенових матриць та активатора протромбіну дозволило створити кровоспинний засіб, що поєднує кровоспинну дію активатора з ранозагоювальними властивостями колагену та є здатним до біодеградації. Проведено доклінічні дослідження, які підтвердили безпечність та нетоксичність виробу, розпочато підготовку до клінічних випробувань. Показано можливість внесення додаткових антибактеріальних компонентів в склад модифікованої колагенової матриці та впроваджено в ветеринарну практику модифіковані активатором протромбіну колагенові матриці з додаванням повідон-йоду та цефтіофуру.

Застосування активатора протромбіну дозволило розробити комплект для одержання аутологічного фібринового гелю, який володіє регенеративними та ранозагоювальними властивостями. Проведено доклінічні дослідження, які

підтвердили безпечність та нетоксичність виробу. Проведено успішні клінічні дослідження, на базі ТОВ «Мед Сервіс Консалтинг». Підлоскутне введення аутологічного фібринового гелю пацієнтам, яким проводилась тотальна циркулярна гемороїдектомія з лоскутною анопластиком, засвідчило високий ранозагоювальний потенціал та безпечність виробу.

Запропоновано претромбін-1 як молекулярний маркер генерації активного тромбіну та розроблено спосіб його кількісного визначення в плазмі крові. В основу методу покладено, з одного боку, здатність екамуліну активувати як інтактний протромбін, та і претромбін-1, та з іншого боку, здатність детектувати лише інтактний протромбін в тромбопластиновому тесті. Спосіб визначення претромбіну-1 успішно впроваджено в лабораторну практику.

Отримано моноклональні антитіла до протеїну С, що дало змогу створити імунодіагностичну тест-систему для його кількісного визначення у плазмі крові. Зниження рівню протеїну С, яке відбувається за рахунок його гідролізу тромбіном, запропоновано як маркер появи тромбіну в кровотоці.

Удосконалено спосіб кількісного імунодіагностичного методу визначення концентрації розчинного фібрину в плазмі крові. Зокрема, розроблено умови для диференціації «ранніх» форм розчинного фібрину, тобто розчинного фібрину, що не піддавався гідролізу плазміногеном.

На модельних системах LPS-індукованого запалення на мишах, інсуліно-резистентності та запалення спричиненого радіаційним опроміненням на щурах показано накопичення зазначених маркерів появи тромбіну в кровотоці за умов запалення. Показано діагностичну ефективність кількісного визначення претромбіну-1, протеїну С та розчинного фібрину для виявлення ризику тромбоутворення та зв'язок клінічних проявів з появою цих маркерів внутрішньосудинного утворення тромбіну за ішемічної хвороби серця, ускладненої вагітності, системного червоного вовчаку, операцій з приводу аневризми черевної аорти та ендопротезування кульшового суглобу, опікової травми, морбідного ожиріння, після перенесеного COVID-19. Обґрунтовано парадигму перемикання ензиматичної активності тромбіну між субстратами

(протромбіном, фібриногеном, протеїном С) відповідно до стану ендотелію судин та зміни концентрації протромбіну та фібриногену.

Роботу виконано в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України.

Ключові слова: тромбін, система гемостазу, претромбін-1, протеїн С, розчинний фібрин, кровоспинні засоби, біоматеріали, тромбоутворення, кровотеча, тромбоз, ензими, фібрин.

SUMMARY

Korolova D.S. Regulation of thrombin activity in normal and pathological conditions. – Qualification scientific work with the manuscript copyright.

Thesis for the Degree of Doctor of Biological Sciences, Speciality 03.00.04 – “Biochemistry” & 03.00.20. – “Biotechnology” (09 – biological sciences). – Palladin Institute of biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2025.

Thrombin generation, as a key event in stopping bleeding during injuries or in pathological intravascular thrombosis, is regulated by the activity of thrombin – an enzyme generated during the activation of prothrombin as a result of the functioning of the blood coagulation cascade. At the same time, thrombin is the key enzyme of the hemostatic system and regulates all of its components, performing both procoagulant and anticoagulant functions, acting on cellular hemostasis, indirectly influencing fibrinolysis, and so forth. In addition, thrombin is one of the enzymes mediating the interaction between the hemostatic and immune systems. Primarily, thrombin stimulates immune cells via activation of PAR-1 and PAR-4, while tissue factor expression by monocytes initiates the coagulation cascade and thrombin generation.

The precursor of thrombin – prothrombin – is the dominant proenzyme of the blood coagulation system, its plasma concentration being 100 µg/mL, and therefore its activation may lead not only to rapid and effective hemostasis but also to undesirable intravascular thrombosis. Thus, regulation of thrombin activity (inhibition or stimulation of its activity, choice of pro- or anticoagulant mode of action) makes it possible to enhance extravascular thrombin generation or to prevent intravascular fibrin formation. At the same time, detection of thrombin enzymatic activity in the bloodstream serves as a reliable marker of the threat of intravascular thrombosis.

Therefore, the thesis is devoted to the search for ways to regulate thrombin activity under normal and pathological conditions. Low-molecular-weight specific inhibitors of thrombin are proposed to suppress the procoagulant potential of the hemostatic system, as well as a prothrombin activator that confers procoagulant properties on biomaterials for the creation of highly effective hemostatic agents. In

addition, methods for detecting thrombin generation in the bloodstream are proposed: determination of soluble fibrin and prethrombin-1, detection of reduced protein C level. The proposed laboratory diagnostic methods were tested in a number of pathologies associated with impaired functioning of the blood coagulation system.

The author's analysis of pathological conditions in which intravascular thrombin generation is observed (depending on endothelial state, decreased or increased concentrations of coagulation components) allowed us to make assumptions about the reasons for the redirection of thrombin enzymatic activity toward its dominant substrates under pathological conditions.

Let us now consider the main results of the work in more detail.

Using *in silico* methods, a focused library of low-molecular-weight compounds – potential thrombin inhibitors – was created. The compounds were synthesized and tested in model *in vitro* systems; the most effective candidate compounds, capable of selectively and specifically inhibiting thrombin activity, were chosen. It was shown that the mechanism of thrombin inhibition is competitive, that is, the selected compounds interact with the thrombin active site, and molecular dynamics demonstrated the nature of this interaction. In an *in vivo* model system, it was shown that the investigated compounds reduce the potential of the blood coagulation system and inhibit fibrin-platelet thrombus formation through suppression of thrombin activity upon intravenous administration to animals. Thus, the obtained thrombin inhibitors may serve as a basis for the development of antithrombotic agents.

A prothrombin activator from the venom of *Echis multisquamatus* – ecamulin – was proposed as a universal basis for providing hemostatic properties to biomaterials through effective extravascular generation of endogenous thrombin. In *in vitro* model systems (platelet-rich plasma) and *in vivo* (rat liver bleeding model), it was shown that non-covalent modification of bioinert, bioactive, and biodegradable materials with ecamulin gives them hemostatic properties. A recombinant analog of the prothrombin activator was created, the use of which may significantly reduce production costs.

By combining the hemostatic properties of the prothrombin activator with the sorption properties of activated carbon fibers, a universal agent for stop bleeding – “Carbohemostat” – was developed. Preclinical studies of Carbohemostat demonstrated its safety. With the approval of the State Service of Ukraine on Medicines and Drugs Control, clinical trials of «Carbohemostat» efficacy and safety were conducted at the Kyiv City Clinical Endocrinology Center in patients with external fresh or infected limb wounds, accompanied by arterial and profuse bleeding and requiring external application of a dressing material with hemostatic activity. The clinical study confirmed the safety and efficacy of «Carbohemostat» even under anticoagulant therapy.

The combination of collagen matrices and the prothrombin activator made it possible to create a hemostatic agent that combines the hemostatic effect of the activator with the wound-healing properties of collagen and is biodegradable. Preclinical studies confirmed the safety and non-toxicity of the product, and preparations for clinical trials have begun. The possibility of incorporating additional antibacterial components into the modified collagen matrix was demonstrated, and collagen matrices modified with the prothrombin activator and supplemented with povidone-iodine and ceftiofur were introduced into veterinary practice.

The application of the prothrombin activator allowed the development of a kit for obtaining autologous fibrin gel with regenerative properties. Preclinical studies confirmed the safety and non-toxicity of the product. Successful clinical studies were carried out at the «Med Service Consulting» LLC. Subflap administration of autologous fibrin gel to patients undergoing total circular hemorrhoidectomy with flap anoplasty demonstrated high wound-healing potential and safety of product.

Prethrombin-1 was proposed as a molecular marker of active thrombin generation, and a method for its quantitative determination in blood plasma was developed. The method is based on the ability of ecamulin to activate both intact prothrombin and prethrombin-1, and on the ability of the thromboplastin test to detect only intact prothrombin. The method for determining prethrombin-1 was successfully implemented in laboratory practice.

Monoclonal antibodies against protein C were obtained, that allowed the development of an immunodiagnostic test system for its quantitative determination in blood plasma. The decrease in protein C level, which occurs as a result of its hydrolysis by thrombin, was proposed as a marker of thrombin generation in the bloodstream.

The method for quantitative immunodiagnostic determination of soluble fibrin concentration in plasma was improved. In particular, conditions were developed to differentiate «early» forms of soluble fibrin, namely, soluble fibrin not yet hydrolyzed by plasminogen.

In LPS-induced inflammation models in mice, insulin resistance, and radiation-induced inflammation in rats, accumulation of the mentioned markers of thrombin generation in the bloodstream was demonstrated under inflammation. The diagnostic effectiveness of quantitative determination of prethrombin-1, protein C, and soluble fibrin for detecting thrombosis risk was shown. Associations were identified between clinical manifestations and the appearance of these intravascular thrombin generation markers in ischemic heart disease, complicated pregnancy, systemic lupus erythematosus, abdominal aortic aneurysm surgery and hip replacement surgery, burn injury, morbid obesity, and post-COVID-19 condition. The paradigm of thrombin enzymatic activity switching between substrates (prothrombin, fibrinogen, protein C), depending on endothelial state and changes in prothrombin and fibrinogen concentrations, was substantiated.

The study was performed at the Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv.

Key words: thrombin, hemostasis system, prethrombin-1, protein C, soluble fibrin, hemostatic agents, biomaterials, thrombus formation, bleeding, thrombosis, enzymes, fibrin.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ

Статті у наукових виданнях, індексованих міжнародними наукометричними базами даних Scopus та Web of Science, SCImago Journal

1. **Korolova DS**, Platonova TM, Gornytska OV, Chernyshenko V, Korchynskiy O, Komisarenko SV. Diagnostic Value of Protein C Depletion in Pathologies Associated with the Activation of the Blood Coagulation System. *International Journal of Molecular Sciences*. 2025; 26(13):6122. doi:10.3390/ijms26136122. (Q1). *Внесок здобувача: визначення концентрації розчинного фібрину в плазмі крові пацієнтів, статистичний аналіз стану системи гемостазу пацієнтів.*
2. Platonova TM, Hrabovskyi OO, Chernyshenko VO, Stohnii YM, Kucheryavui YP, **Korolova DS**, Komisarenko SV. Alternative role of B:knob-hole interactions in the fibrin assembly. *Biochemistry*. 2025; 64(4): 791-800. doi: 10.1021/acs.biochem.4c00695. (Q1). *Внесок здобувача: аналіз отриманих даних, підготовка матеріалів до друку.*
3. Azizova L, Chernyshenko V, **Korolova D**, Allan IU, Mikhalovsky S, Mikhalovska L. Argatroban-and copper-modified polymers with improved thromboresistance and antimicrobial properties. *Journal of Materials Research*. 2024; 39(16): 2332-2347. doi:10.1557/s43578-024-01389-3. (Q2). *Внесок здобувача: дослідження процесу інгібування тромбіну аргатрабаном в модельних системах in vitro, аналіз результатів.*
4. Udovenko A, Makogonenko Y, **Korolova D**, Chernyshenko V, Komisarenko S. Formation and elimination of soluble fibrin and D-dimer in the bloodstream. *Croatian Medical Journal*. 2023; 64(6): 421-429. doi:10.3325/cmj.2023.64.421. (Q3). *Внесок здобувача: графічне узагальнення представленого матеріалу*
5. **Korolova D**, Gryshchenko V, Chernyshenko T, Platonov O, Hornytska, O, Chernyshenko V, Klymenko P, Reshetnik Y, Platonova T. Blood coagulation factors and platelet response to drug-induced hepatitis and hepatosis in rats. *Animal models and experimental medicine*. 2023; 6(1): 66–73. doi: 10.1002/ame2.12301 (Q1). *Внесок*

здобувача: визначення протромбіну-1 в плазмі крові тварин, аналіз стану системи гемостазу тварин.

6. **Korolova DS**, Platonova TM, Hornytska OV, Druzhyna NM, Chernyshenko VO. Decrease of prothrombin level thrombolysis in acute myocardium infarction. Acta Biochimica Polonica, 2023; 70(4): 991-995. doi: 10.18388/abp.2020_6962 (Q3).
Внесок здобувача: аналіз параметрів системи гемостазу, статистична обробка даних.

7. Vari SG, Shevchuk O, Boychuk A, Kramar S, Nebesna Z, Yakymchuk Y, Kobylinska L, Chernyshenko V, **Korolova D**, Gaspar-Suranyi A, Altorjay T, Gaspar R. Common mechanisms of placental dysfunction in preeclampsia, gestational diabetes, and COVID-19 in pregnant women. Ukr. Biochem. J. 2023; 95(3): 5-11. doi: 10.15407/ubj95.03.005 (Q4).
Внесок здобувача: визначення концентрацій розчинного фібрину та D-димеру в плазмі крові пацієнтів, аналіз стану системи гемостазу пацієнтів.

8. **Korolova DS**, Pavlenko AO, Altorjay A, Zhuk SI, Us IV, Tsaryk Y, Suranyi A, Chernyshenko VO. Validation of the diagnostics algorithm to monitor coagulation parameters in pregnant women. Ukr. Biochem. J. 2023; 95(3): 33-41. doi:10.15407/ubj95.03.033 (Q4).
Внесок здобувача: визначення концентрацій розчинного фібрину та D-димеру в плазмі крові пацієнтів, аналіз стану системи гемостазу пацієнтів.

9. **Korolova DS**, Hornytska OV, Lavrik AS, Druzhyna NM, Platonova TM. Characterization of blood coagulation system of morbidly obese patients. Ukr. Biochem. J. 2023; 95(4): 3-9. doi: 10.15407/ubj95.04.003 (Q4).
Внесок здобувача: визначення концентрацій розчинного фібрину та D-димеру в плазмі крові пацієнтів, аналіз стану системи гемостазу пацієнтів.

10. Vari SG, Shevchuk O, Boychuk A, Kramar S, Nebesna Z, Yakymchuk Y, Kobylinska L, Chernyshenko V, **Korolova D**, Gaspar-Suranyi A, Altorjay T, Gaspar R. Common mechanisms of placental dysfunction in preeclampsia, gestational diabetes, and COVID -19 in pregnant women. Ukr. Biochem. J. 2023; 95 (3): 5-11.

doi:10.15407/ubj95.03.005 (Q4). *Внесок здобувача: аналіз параметрів системи гемостазу, статистична обробка даних.*

11. Us IV, Zhuk SI, **Korolova DS**, Platonov OM, Tsaryk YO. Platelet hemostasis in the implementation of placental dysfunction. *Reproductive Health of Woman*. 2022; 6: 6-12. doi:10.30841/2708-8731.6.2022.267676 (Q4). *Внесок здобувача: планування, аналіз параметрів системи гемостазу, статистична обробка даних.*

12. Kozynets GP, Tsyhankov VP, **Korolova DS**, Gornytska OV, Savchuk OM, Chernyshenko VO, Chernyshenko TM, Platonova TM. The rise of factor X level in blood plasma of patients at severe burn injuries. *Journal of Burn Care & Research*. 2022; 43 (4): 965-970. doi: 10.1093/jbcr/irab235. (Q2). *Внесок здобувача: аналіз параметрів системи гемостазу, статистична обробка даних.*

13. **Korolova DS**, Stohnii YM, Gryshchuk VI, Zhuk SI, Us IV, Chernyshenko TM, Kostyuchenko OP, Klymenko KP, Platonov OM, Ivashchenko OI, Chernyshenko VO. Thromboelastographic study of fibrin clot and molecular basis of maximum clot firmness. *Ukr. Biochem. J*. 2021; 93(2): 56-63. doi:10.15407/ubj93.02.062 (Q4). *Внесок здобувача: планування, визначення параметрів системи гемостазу, кореляційний аналіз даних.*

14. Chernyshenko V, Shteinberg K, Lugovska N, Ryzhykova M, Platonova T, **Korolova D**, Lugovskoy E. Preparation of highly-concentrated autologous platelet-rich plasma for biomedical use. *Ukr. Biochem. J*. 2019; 91(2): 19-27. doi:10.15407/ubj91.02.019 (Q4). *Внесок здобувача: цитометрія зразків збагаченої тромбоцитами плазми крові, розрахунки та графічне представлення умов для отримання збагаченої тромбоцитами плазми крові з підвищеною концентрацією тромбоцитів.*

15. Chernyshenko V, Petruk N, **Korolova D**, Kasatkina L, Gornytska O, Platonova T, Chernyshenko T, Rebriev A, Dzhus O, Garmanchuk L, Lugovskoy E. Antiplatelet and antiproliferative action of disintegrin from *Echis multisquamatis* snake venom. *Croatian Medical Journal*. 2017; 58(2): 118-127. doi: 10.3325/cmj.2017.58.118 (Q2). *Внесок здобувача: розробка умов очистки*

цільового ензиму, цитометрія збагаченої тромбоцитами плазми крові та тромбоцитів.

16. Chernyshenko VO, Chernyshenko TM, **Korolova DS**, Volynets GP, Kolesnikova IN, Platonova TM, Lugovskoy EV. Non-enzymatic activation of prothrombin induced by interaction with fibrin β 26-42 region. Acta Biochimica Polonica. 2015; 62(3): 517-522. doi: 10.18388/abp.2014_896 (Q3). *Внесок здобувача: розробка умов визначення тромбінової активності, аналіз даних.*

Статті у фахових виданнях

17. Baidakova KB, Kucheryavui YP, **Korolova DS**. Collagen matrix with increased hemostatic properties: comparative analysis of hemostatic efficacy. Biotechnologia Acta. 2025; 18(2): 14–16. doi:10.15407/biotech18.02.014. *Внесок здобувача: планування, роботи, стандартизація препарату активатора протромбіну, статистична обробка результатів.*

18. Baidakova KV, Kostuchenko OP, Klymenko KP, Gryshchuk OO, **Korolova DS**. The restoration of hybridoma cells lines after unsuitable storage. Biotechnologia Acta. 2024; 17(2): 14-17. doi:10.15407/biotech17.02.014. *Внесок здобувача: планування, робота з гібридомами.*

19. **Korolova D**, Syrko M, Stohnii Ye, Druzhyna N, Chernyshenko T, Gogolinska G. Standardization of the protein calibrators isolation methodology for thrombophilia markers detecting immunodiagnostic test systems. Biotechnologia Acta, 2022; 15(6): 61-69. doi:10.15407/biotech15.06.061. *Внесок здобувача: напрацювання моноклональних антитіл та їх використання в тест системах.*

20. Chernyshenko V, **Korolova D**, Verevka S. Allosteric regulation of the blood clotting cascade. Grail of Science. 2022; 18-19: 106-111. doi:10.36074/grail-of-science.26.08.2022.17. *Внесок здобувача: аналіз та узагальнення даних літератури.*

21. **Korolova DS**, Hornytska OV, Deyev VA, Gryshchuk VI, Chernyshenko TM, Platonova TM, Chernyshenko VO. Optimization of the evaluation method of the performance of therapy using indirect action anticoagulants. Biotechnologia Acta.

2022; 15(3): 52-57. doi:10.15407/biotech15.03.052. *Внесок здобувача: розробка методу визначення концентрації протромбіну-1, аналіз та статистична обробка даних.*

22. **Korolova D**, Shevchuk O, Kostiuchenko O, Chernyshenko T, Klymenko K, Platonova T, Ivankiv Ya, Paliy S, Pak A, Chernyshenko V, Korda M, Komisarenko S, Vari S. Hematological Findings in Post-COVID-19 Recovery Period: Three-Month Follow-Up Study. Available at SSRN: <https://ssrn.com/abstract=4234239>. doi: 10.2139/ssrn.4234239. *Внесок здобувача: концентрацій розчинного фібрину та D-димеру в плазмі крові пацієнтів, аналіз стану системи гемостазу пацієнтів.*

23. **Korolova D**. Regulation and Dysregulation of Thrombin Activity. Southeastern European Medical Journal: SEEMEDJ. 2021; 5(1): 47-64. doi:10.26332/seemedj.v5i1.194. *Внесок здобувача: аналіз та узагальнення даних літератури, графічне представлення узагальнених даних.*

24. **Korolova D**, Chernyshenko V, Platonova T, Chernyshenko T, Lugovskoy E. Detection of prethrombin 1 in human blood plasma. International blood research and reviews. 2016; 5(2): 1-7. doi:10.9734/IBRR/2016/24683. *Внесок здобувача: планування, розробка умов визначення протромбіну-1 в плазмі крові, модифікація інгібіторно-кореляційної проби для диференціювання декарбоксильованого протромбіну та протромбіну-1, аналіз даних.*

25. **Korolova DS**, Chernyshenko TM, Gornytska OV, Chernyshenko VO, Platonova TN. Meizothrombin preparation and its role in fibrin formation and platelet aggregation. Advances in Bioscience and Biotechnology. 2014; 5: 588-595. doi:10.4236/abb.2014.57069. *Внесок здобувача: розробка умов отримання мезотромбіну, агрегатометрія, аналіз даних.*

Методичні рекомендації.

26. Комісаренко СВ, Дєєв ВА, Луговської ЕВ, Колеснікова ІМ, Платонова ТМ, Луговська НЕ, Костюченко ОП, Чернишенко ВО, **Корольова ДС**, Чернишенко ТМ, Ліксунов ОВ, Каширова ОВ, Романова ЕЕ. Застосування

імуноензимних методів для лабораторної діагностики загрози внутрішньосудинного тромбоутворення. К.: Видавець Бихун В.Ю., 2019. 36с. ISBN 978-617-7699-02-5. *Внесок здобувача: визначення концентрацій розчинного фібрину та D-димеру в плазмі крові пацієнтів, аналіз стану системи гемостазу пацієнтів, графічне узагальнення результатів.*

27. Комісаренко СВ, Корда ММ, Варі ШГ, Платонова ТМ, **Корольова ДС**, Чернишенко ВО, Шевчук ОО, Войтович АІ, Яценко ТА, Романюк СІ. Визначення загрози внутрішньосудинного тромбоутворення у пацієнтів, які перехворіли на COVID-19: методичні рекомендації. Тернопіль: ТНМУ, 2024. 40с. *Внесок здобувача: планування, визначення концентрацій розчинного фібрину та D-димеру в плазмі крові пацієнтів, аналіз стану системи гемостазу пацієнтів, графічне узагальнення результатів.*

Опубліковані праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

28. **Корольова ДС**, Платонова ТМ, Чернишенко ТМ, Томчук ВА, Грищенко ВА, Литвиненко ОМ. Визначення функціонально неактивних форм протромбіну за умов медикаментозного гепатиту. У: Матеріали Х Українського біохімічного з'їзду; 2010 вересень 13-17; Одеса, Україна. Укр. біохім. журн. 2010. 4 (додаток 2). 2010. С. 30.

29. **Корольова ДС**, Платонова ТМ, Горницька ОВ. Роль похідних протромбіну в формуванні тромбоцитарного та фібринового тромбу. У: Матеріали Х Українського біохімічного з'їзду; 2010 вересень 13-17; Одеса, Україна. Укр. біохім. журн. 2010. 4 (додаток 2). 2010. С. 30.

30. **Korolova DS**, Chernyshenko TM, Gornitskaia OV, Platonova TN. The role of meizothrombin and prethrombin-1 in fibrin formation and platelet aggregation. In: 38th The FEBS Congress; 2013 July 6-11; Saint Petersburg, russia; FEBS Journal. 280 (Suppl. 1); 2013. p. 487-488.

31. **Корольова ДС**, Чернишенко ВО, Чернишенко ТМ, Платонова ТМ, Чернишенко ВО. Виявлення претромбіну 1 in vivo та його роль у процесі зсідання крові. У: Конференція-конкурс молодих вчених «Актуальні проблеми

біохімії та біотехнології–2014»; 2014 квітень 25; Київ, Україна; Укр. біохім. журн. 2014. 5 (додаток 1). 2014. p. 59.

32. Platonova TM, **Korolova DS**, Chernyshenko VO, Chernyshenko TM, Parkhomenko O. Dramatic decrease of prothrombin level during thrombolysis in acute myocardium infarction. In: 16th Annual NATA Symposium. 2015 April 16-17; Prague, Czech Republic. 2015. P. 98.

33. **Korolova DS**, Kostiuchenko OP, Shevchuk OO, Chernyshenko TM, Klymenko KP, Platonova TM, Ivankiv YaI, Paliy SM, Pak AI, Chernyshenko VO, Korda MM, Vari SG. Blood coagulation parameters in patients after COVID-19. In: 16th RECOOP Bridges in Life Sciences Video Conference. 2021 April 16. 2021. p.21-22.

34. Tsaryk Y, Shevchuk O, **Korolova D**, Chernyshenko T, Kostiuchenko O, Klymenko K, Chernyshenko V, Platonova T. Rational diagnostics of thrombophilia in risk groups during immunization by AstraZeneca anti SARS-CoV-2 vaccine. In: The Biochemistry Global Summit, 25th IUBMB Congress, 46th FEBS Congress, 15th PABMB Congress, 2022 July 9–14; Lisbon, Portugal. 2022. FEBS Open Bio. 2022. 12. p. 146.

35. **Korolova DS**, Snezhkova EA, Shevchuk OO, Chernyshenko VO, Korda MM, Vari SG. Prethrombin-1 formation in blood plasma as a common mechanism in pathogenesis of diseases associated with prethrombotic state. In: 18th RECOOP Bridges in Life Sciences Conference. 2023 April 20-21; Budapest, Hungary. 2023. P. 58.

36. **Korolova DS**, Platonova TM, Gornytska OV, Chernyshenko VO. Clinical value of protein C determination in pathologies associated with the activation of blood coagulation system. In: 19th RECOOP Bridges in Life Sciences. 2024 April 11-12; Bratislava, Slovak Republic. 2024. p. 21-22.

37. **Korolova DS**, Baidakova KV, Komisarenko SV. Catalog of monoclonal antibodies for the study of fibrin(ogen) structure and functions. In: The 27th IFRS workshop. 2024 June 2-6; Esbjerg, Denmark. 2024. p. 33-34.

38. **Korolova, DS**, Kostiuchenko OP, Platonova TM, Chernyshenko VO. Monoclonal antibodies for protein c detection in blood plasma. In: 20th RECOOP Bridges in Life Sciences. 2025 April 1-3; Prague, Czech Republic. 2025. p. 73.

39. Pavlenko A, Suranyi A, Altorjay A, **Korolova D**, Chernyshenko V, Zhuk S, Us I, Varbiro Sz, Vari SG. Obesity and thrombotic risk in pregnant women. In: 20th RECOOP Bridges in Life Sciences. 2025 April 1-3; Prague, Czech Republic. 2025. p.43.

40. **Korolova D**, Demchynska R, Chernyshenko T, Kostiuchenko O, Chernyshenko V. Impact of war-related acoustic and thermal trauma on the blood coagulation system. In: 24th Annual Symposium on Patient Blood Management, Haemostasis and Thrombosis. 2025 April 24-26; Munich, Germany. 2025. p.24-25.

Патенти

41. **Корольова Д.С.**, Чернишенко Т.М., Платонова Т.М., Волков Г.Л., Деев В.А., Куповська С.І. Тест-система та спосіб контролю ефективності лікування та профілактики тромбозів антикоагулянтами непрямої дії: пат. 86856 України: МПК G01N 33/50 A61B 5/00. № а200708173; заявл. 18.07.2007; опубл. 25.05.2009, Бюл. №10. 5 с.

42. Платонова Т.М., **Корольова Д.С.**, Чернишенко Т.М., Горницька О.В., Грищук В.І., Чернишенко В.О., Луговської Е.В., Комісаренко С.В. Спосіб отримання тромбіну: пат. 90935 України: МПК C12N 9/74. № u201401076; заявл. 05.02.2014; опубл. 10.06.2014, Бюл. №11. 7 с.

43. Комісаренко С.В., Луговської Е.В., Рубленко М.В., Андрієць В.Г., **Корольова Д.С.**, Чернишенко В.О., Чернишенко Т.М., Горницька О.В., Платонова Т.М., Макогоненко Є.М. Спосіб одержання аутологічного фібринового гелю для стимуляції регенерації кісткових та м'яких тканин і зниження інтенсивності запальних процесів: пат. 113094 України: МПК A61P19/00, A61P31/00, A61K35/14, A61K35/16. № а201501207; заявл. 13.02.2015; опубл. 25.08.2016, Бюл. № 16. 11 с.

44. Комісаренко С.В., Луговської Е.В., Ніколаєв В.Г., Платонова Т.М., Досенко В.Є., Сахно Л.О., Снежкова Є.О., Чернишенко Т.М., **Корольова Д.С.**, Чернишенко В.О., Горницька О.В., Коротич В.Г. Гемостатичний комбінований засіб для припинення масивних кровотеч, у тому числі за гемофілії: пат. 114356 України: А61F13/00, А61K38/43, А61P7/04. № u201608441; заявл. 01.08.2016; опубл. 10.03.2017, Бюл. №5. 12 с.

45. Комісаренко С.В., Луговської Е.В., Ніколаєв В.Г., Платонова Т.М., Досенко В.Є., Сахно Л.О., Снежкова Є.О., Чернишенко Т.М., **Корольова Д.С.**, Чернишенко В.О., Горницька О.В., Коротич В.Г. Гемостатичний комбінований засіб для припинення масивних кровотеч, у тому числі за гемофілії: пат. 117852 України: А61F13/00, А61K38/43, А61P7/04. № a201608443; заявл. 01.08.2016; опубл. 10.10.2018, Бюл.№ 19. 11 с.

46. Луговської Е.В., Чернишенко В.О., **Корольова Д.С.**, Штайнберг К.М. Спосіб одержання аутологічної, збагаченої тромбоцитами, плазми крові людини з вмістом тромбоцитів понад 1 млн/мкл для медичного застосування: пат. 123108 України: А61K35/19, А61P7/00. № a201810476; заявл. 24.10.2018; опубл. 27.04.2020, бюл. № 8. 9 с.

47. Комісаренко С.В., Платонова Т.М., Чернишенко В.О., **Корольова Д.С.**, Чернишенко Т.М., Горницька О.В., Луговська Н.Е., Ніколаєв В.Г., Сахно Л.О., Снежкова Є.О., Васюта О.Е., Гаврецький А.І., Жмінько П.Г. Спосіб надання біоматеріалам прокоагулянтних властивостей шляхом модифікації їхньої поверхні екзогенним активатором протромбіну екамуліном: пат. 149443 України: А61K38/36, А61P7/04, А61L15/32. № u202103676; заявл. 25.06.2021; опубл. 18.11.2021, бюл. № 46. 14 с.

48. Komisarenko S.V., Nikolaev V.H., Platonova T.M., Dosenko V.Ye., Sakhno L.O., Snezhkova E.O., Chernyshenko T.M., **Korolova D.S.**, Chernyshenko V.O., Hornytska O.V., Korotych V.H. The method of production of a haemostatic agent and a haemostatic agent for major bleeding control: Patent WO-2021194461-A1 WIPO (PCT): A61F 13/01008, A61F 2013/00463, A61K 38/4806, A61L 15/44, A61L 2300/40, A61L 2300/418, A61L 2400/04, A61P 7/04. №. PCT/UA2021/000031; int.

filing date 29.03.2021; publ. date 30.09.2021,
<https://patents.google.com/patent/WO2021194461A1>. 38 p.

49. Комісаренко С.В., Платонова Т.М., Чернишенко В.О., **Корольова Д.С.**, Чернишенко Т.М., Горницька О.В., Луговська Н.Е., Ніколаєв В.Г., Сахно Л.О., Снежкова Є.О., Васюта О.С., Гаврецький А.І., Жмінько П.Г. Спосіб надання біоматеріалам прокоагулянтних властивостей шляхом модифікації їхньої поверхні екзогенним активатором протромбіну екамуліном: пат. 128188 України: А61L15/32, А61K38/36, А61P7/04. № а202100475; заявл. 08.02.2021; опубл. 01.05.2024, бюл. № 18. 13 с.

50. Комісаренко С.В., Ніколаєв В.Г., Платонова Т.М., Досенко В.Є., Сахно Л.О., Снежкова Л.О., Чернишенко Т.М., **Корольова Д.С.**, Чернишенко В.О., Горницька О.В., Коротич В.Г. Спосіб виготовлення гемостатичного засобу і гемостатичний засіб для припинення масивних кровотеч: пат. 128691 України: А61F13/02, А61K38/43, А61L15/38, А61P7/04. № а202003758; заявл. 22.06.2020; опубл. 02.10.2024, бюл. № 40. 17 с.

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ	2
Перелік умовних позначень	23
ВСТУП	25
РОЗДІЛ 1. ОСНОВИ ФУНКЦІОНУВАННЯ ТРОМБІНУ	33
1.1 Функціональні сайти тромбіну.....	35
1.2. Участь тромбіну в тромбоутворенні: з чого почати та чому надати перевагу?	42
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	49
2.1 Матеріали	49
2.2. Моделі на тваринах	54
2.3. Пацієнти.....	60
2.4 Методи	72
РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	94
РОЗДІЛ 3. РОЗРОБКА НОВИХ СПОСОБІВ ІНГІБУВАННЯ АКТИВНОСТІ ТРОМБІНУ З МЕТОЮ СТВОРЕННЯ АНТИТРОМБОТИЧНИХ ПРЕПАРАТІВ	94
3.1. Пошук інгібіторів тромбіну <i>in silico</i>	95
3.2. Апробація інгібіторів тромбіну <i>in vitro</i>	96
3.3 Молекулярна динаміка зв'язування тромбіну з інгібіторами	101
3.4. Оптимізація застосування та апробація інгібіторів тромбіну <i>in vivo</i> .	106
РОЗДІЛ 4. ЗАСТОСУВАННЯ АКТИВАТОРУ ПРОТРОМБІНУ У МЕДИЦИНІ	114
4.1 Кровоспинні засоби	115
4.2. Клінічні випробування модифікованого екамуліном карбонового сорбенту	123
4.3 Колагенова матриця (КМ).....	130
4.4. Фібриновий гель	139

4.5. Створення та апробація рекомбінантного активатора протромбіну ..	154
РОЗДІЛ 5. ВИЯВЛЕННЯ ПАТОЛОГІЧНОЇ ВНУТРІШНЬОСУДИННОЇ ГЕНЕРАЦІЇ ТРОМБІНУ	188
5.1. Розробка діагностичних підходів для виявлення патологічної внутрішньосудинної активації тромбіну	189
5.2. Визначення рівню претромбіну-1 в плазмі крові, розробка методу....	192
5.3. Визначення рівню протеїну С в плазмі крові, розробка методу	200
5.3. Розчинний фібрин: удосконалення та оптимізація методу визначення	225
РОЗДІЛ 6. ВИЗНАЧЕННЯ ОЗНАК ВНУТРІШНЬОСУДИННОЇ ГЕНЕРАЦІЇ ТРОМБІНУ ЗА МОДЕЛЮВАННЯ ПАТОЛОГІЧНИХ СТАНІВ У ТВАРИН.....	238
6.1. Модель променевої хвороби.....	239
6.2. Модель гострого запалення	241
6.3. Модель інсулінорезистентності з врахуванням вікового параметру..	243
РОЗДІЛ 7. РАЦІОНАЛЬНА МОЛЕКУЛЯРНА ДІАГНОСТИКА ПАТОЛОГІЧНИХ СТАНІВ, ПОВ'ЯЗАНИХ З ВНУТРІШНЬОСУДИННОЮ ГЕНЕРАЦІЄЮ ТРОМБІНУ	246
7.1. Діагностика системи гемостазу за COVID-19	246
7.2. Діагностика системи гемостазу за ускладненої вагітності.....	255
7.3. Діагностика системи гемостазу за серцевосудинних захворюваннях.	261
7.4. Діагностика системи гемостазу за інших патологій.	267
7.5. Можливі механізми менеджменту тромбіну при патологіях	278
РОЗДІЛ 8. ЗАКЛЮЧЕННЯ.....	284
<i>ВИСНОВКИ</i>	<i>291</i>
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	293

Перелік умовних позначень

АПС – активований протеїн С

АТ – антитіло

АЧА – аневризма черевної аорти

АЧТЧ – активований частковий тромбопластиновий час

БСА – бичачий сировотковий альбумін

ГІМ – гострий інфаркт міокарда

ГНР – група з низьким ризиком ускладнень

ГВР – група з високим ризиком ускладнень

ЕІ – екамуліновий індекс

ЗТПК – збагачена тромбоцитами плазма крові

ІР – інсулінорезистентність

КМ – колагенова матриця

LPS – ліпополісахариди

МД – молекулярна динаміка

МЕКМ – модифікована екамуліном колагенова матриця

МСК – мезинхімальні стовбурові клітини

НСС – нестабільна стенокардія

ПІ – протромбіновий індекс

пС – протеїн С

РГ – референтна група

РФМК – розчинні фібрин-мономерні комплекси

СС – стабільна стенокардія

ТМВ – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин

COVID-19 – коронавірусна хвороба 2019

F 1+2 – фрагмент протромбіну 1+2

GLP – належна лабораторна практика

KLH – гемоціанін равлика

НИН – міжнародні одиниці тромбінової активності за стандартом Національного інституту охорони здоров'я

PAR – рецептор, що активується протеїназою

RMSD – середньоквадратичне відхилення

RMSF – середньоквадратична флуктуація

TLR – toll-подібні рецептори

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Тромбоутворення як ключова подія зупинки кровотечі при пораненнях або ж при патологічному внутрішньосудинному тромбоутворенні, регулюється активністю тромбіну – ензиму, що генерується під час активації протромбіну внаслідок активації каскаду зсідання крові. Водночас, тромбін є ключовим ензимом системи гемостазу та регулює всі її ланки, здійснюючи як прокоагулянту, так і антикоагулянту функції, регулює клітинний гемостаз, опосередковано регулює фібриноліз, тощо. Протромбін є домінантним проензимом зсідання крові, його концентрація в плазмі крові складає 100 мкг/мл, а отже потенційно його активація може призвести до швидкої та ефективної зупинки кровотечі і водночас до небажаного внутрішньосудинного тромбоутворення. Тому управління системою гемостазу передбачає регуляцію активності тромбіну, інгібування або ж стимулювання його активності, вибір про- чи антикоагулянтного способу дії, а відтак – стимулювання екstrasудинного тромбоутворення чи запобігання внутрішньосудинному формуванню фібрину.

Саме тому дисертаційну роботу було спрямовано на узагальнення ролі тромбіну в регуляції системи гемостазу та формування уявлення про тромбін, як головний ензим екstrasудинного та внутрішньосудинного тромбоутворення, маркер загрози розвитку тромбозів, а також мішень антитромботичної терапії та ключовий інструмент надання біоматеріалам прокоагулянтних властивостей.

Зв'язок роботи з науковими темами. Дисертаційну роботу виконано на базі Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України в рамках проєктів НДР: № 0112U002624 «Механізми регуляції внутрішньоклітинних сигнальних мереж, міжклітинних та міжмолекулярних взаємодій», розділ: «Моделювання системних біологічних процесів та розробка молекулярно-динамічних схем регуляції метаболічних шляхів та міжмолекулярних взаємодій», підрозділ: «Протеом системи гемостазу у перебігу опосередкованих процесів утворення та елімінації згустку» (2012-2016); № 0114U003217 «Вивчення механізму

формування фібринового каркасу тромбу та розробка діагностикумів стану системи гемостазу при запальних процесах, серцево-судинних захворюваннях та хірургічних втручаннях» (2014-2018); № 0115U005241 «Створення комбінованого перев'язувального засобу для зупинки кровотеч та прискорення загоювання ран» (2015-2016); № 0117U002808 «Впровадження у виробництво гемостатичних губок на основі колагенової матриці та активатора зсідання крові» (2017); № 0117U000453 «Розробка новітніх інгібіторів зсідання крові на основі фармакологічних агентів, що інгібують ензиматичну активність тромбіну та фактору Ха» (2017), № 0118U000453 «Розробка новітніх інгібіторів зсідання крові на основі фармакологічних агентів, що інгібують ензиматичну активність тромбіну та фактору Ха» (2018); № 0117U003558 «Розробка, доклінічні та клінічні дослідження універсального гемостатичного засобу на основі активатора системи зсідання крові та волокнистих вуглецевих сорбентів» (2017-2021); №0117U004344 «Молекулярно-генетичні і біохімічні механізми регуляції клітинних та системних взаємодій за фізіологічних та патологічних станів», розділ «Дослідження системних біологічних процесів за різних патологічних станів, як основа персоніфікованої та регенеративної медицини», підрозділ «Протеїнпротеїнові та протеїн-клітинні взаємодії в системі гемостазу за норми та патології: механізми. Діагностика та корекція порушень» (2017-2021); 0118U002373 «Розроблення тест-системи для одночасного визначення трьох молекулярних маркерів внутрішньосудинного тромбоутворення» (2018-2019); № 0119U000661 «Клінічна апробація та впровадження методу концентрування тромбоцитів аутологічної плазми крові для клітинної терапії» (2019); №0119U001795 «Підготовка та проведення клінічних випробувань композиту адсорбційного гемостатичного аплікаційного «Карбогемостат» (2019); №0122U002158 «Розробка, доклінічні та клінічні випробування аутологічного фібринового гелю для застосування у хірургії» (2022); № 0119U002512 «Взаємодії компонентів системи гемостазу на клітинному та молекулярному рівні в процесі формування та елімінації тромбу» (2019-2023); №0123U102770 «Вплив природної і штучної імунізації антигенами SARS-CoV-2 на стан системи

гемостазу» (2023-2024); № 0120U103183 «Створення бібліотеки моноклональних антитіл до альфаС-регіону фібриногену з метою вивчення його ролі в полімеризації фібрину та для розробки імунодіагностикумів» (2020-2024); ALLEA grant EFDS-FL2-02 provided to the Institution within the framework of Funding Line 2 of the «European Fund for Displaced Scientists» (EFDS), 2022-2023; № 0123U103409 «Створення тест-системи для кількісного визначення протеїну С з метою діагностики загрози внутрішньосудинного тромбоутворення» (2023-2025); № 0124U000251 «Дослідження та пошук способів регуляції молекулярних механізмів внутрішньосудинного та екстрасудинного тромбоутворення» (2024-2028).

Мета і завдання. Пошук шляхів регулювання ензиматичної активності тромбіну та виявлення результатів його внутрішньосудинної появи.

Відповідно до мети були поставлені такі завдання:

1. Створити бібліотеку низькомолекулярних сполук – потенційних інгібіторів тромбіну – та апробувати їх у модельних системах *in vitro* та *in vivo*.
2. Розробити умови використання активатора протромбіну з отрути *Echis multisquamatus*, як основи для надання біоматеріалам кровоспинних властивостей за рахунок ефективної генерації ендogenous тромбіну, та створити його рекомбінантний аналог.
3. Провести клінічні дослідження біоматеріалів, модифікованих активатором протромбіну з отрути *Echis multisquamatus*.
4. Визначити умови використання ензимного активатора протромбіну з отрути *Echis multisquamatus* як основи для створення комплекту для одержання аутологічного фібринового гелю та провести його клінічних досліджень.
5. Розробити спосіб кількісного визначення в плазмі крові претромбіну-1 як молекулярного маркера генерації активного тромбіну.
6. Отримати моноклональні антитіла до протеїну С та розробити спосіб його кількісного визначення в плазмі крові як молекулярного маркера генерації активного тромбіну.

7. Удосконалити спосіб кількісного імунодіагностичного визначення концентрації розчинного фібрину в плазмі крові.

8. Дослідити генерацію протромбіну-1, накопичення розчинного фібрину та зниження вмісту протеїну С як ознаки внутрішньосудинної генерації активного тромбіну за умов запалення у лабораторних тварин.

9. З'ясувати діагностичну ефективність кількісного визначення протромбіну-1, протеїну С та розчинного фібрину за патологій, пов'язаних з ризиком внутрішньосудинного тромбоутворення.

Методи дослідження. У роботі використано хроматографічні та електрофоретичні методи, агрегатометрію, спектрофотометрію, цитометрію, імуноензимний аналіз, низку тестів для характеристики стану системи гемостазу (коагуляційні тести, визначення активності окремих факторів зсідання крові, визначення концентрації розчинного фібрину, D-димеру та фібриногену, тощо), турбідиметрію, цитологічні та гістологічні методи, ПЛР-аналіз, методи комп'ютерного моделювання (молекулярний докінг, молекулярна динаміка), низку моделей на тваринних (модель кровотечі за умов резекції печінки щурів; модель місцевої переносимості на кролях; модель LPS-індукованого запалення на мишах; модель запалення, спричиненого опроміненням, на щурах; модель інсулінорезистентності на щурах), а також статистичні та математичні методи аналізу.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше запропоновано способи вибору між коагуляцією та антикоагуляцією шляхом прямої дії на (про)тромбін молекулярними ефекторами: інгібіторами активності тромбіну та активаторами протромбіну. Вперше застосовано кровоспинні засоби на основі активатора протромбіну, принцип дії яких є інноваційним, порівняно з існуючими неспецифічними гемостатичними засобами. Запропоновано парадигму перемикання активності тромбіну за тромбофілії, згідно з якою ензим надає перевагу субстратам (фібриноген, протромбін, протеїн С), відповідно до стану ендотелію судин та концентрації субстрату. Застосування цього принципу

дозволило пояснити патогенез змін у системі гемостазу за таких патологій, як COVID-19, системний червоний вовчак, ішемічна хвороба серця, тощо.

Практичне значення отриманих результатів. У ході роботи створено низькомолекулярний специфічний ефективний інгібітор тромбіну, який може стати основою для розробки антитромботичного засобу.

Було проведено успішні доклінічні та клінічні дослідження кровоспинного засобу «Карбогемостат» та комплекту для одержання аутологічного фібринового гелю на основі активатора протромбіну. «Карбогемостат» було впроваджено в хірургічну практику на базі КНП «Київський міський клінічний ендокринологічний центр». Комплект для одержання аутологічного фібринового гелю було впроваджено у хірургічну практику на базі ТОВ «Мед Сервіс Консалтинг» та впроваджено у виробництво на базі аптеки №2 «ХЕМОТЕКА» ПП «Інфузія». А також розроблено та проведено успішні доклінічні дослідження кровоспинного засобу, здатного до біодеградації, створеного на основі колагену та активатора протромбіну. Модифіковані екамуліном колагенові матриці були впроваджені в ветеринарну практику на базі Білоцерківського національного аграрного університету.

Аналіз маркерів появи в кровотоці активного тромбіну за різних патологій дав змогу сформулювати рекомендації щодо клінічної діагностики ризику тромбозів, що стало основою для відповідних методичних рекомендацій. Метод кількісного визначення претромбіну-1 в плазмі крові було впроваджено у лабораторну діагностику на базі лабораторії біохімії ДУ «Інститут отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка НАМН України». Удосконалену тест-систему для кількісного визначення розчинного фібрину в плазмі крові було впроваджено у лабораторну діагностику на базі ДУ «Національний інститут хірургії та трансплантології ім. О.О. Шалімова» НАМН України та ДУ «Інститут гематології та трансфузіології НАМН України».

За матеріалами дисертації оформлено патенти: «Тест-система та спосіб контролю ефективності лікування та профілактики тромбозів антикоагулянтами

непрямої дії» (UA Патент на винахід № 86856), «Спосіб отримання тромбіну» (UA Патент на корисну модель № 90935), «Спосіб одержання аутологічного фібринового гелю для стимуляції регенерації кісткових та м'яких тканин і зниження інтенсивності запальних процесів» (UA Патент № 113094), «Гемостатичний комбінований засіб для припинення масивних кровотеч, у тому числі за гемофілії» (UA Патент на корисну модель №114356), «Гемостатичний комбінований засіб для припинення масивних кровотеч, у тому числі за гемофілії» (UA Патент на винахід № 117852), «Спосіб одержання аутологічної, збагаченої тромбоцитами, плазми крові людини з вмістом тромбоцитів понад 1млн/мкл для медичного застосування», (UA Патент на винахід № 123108), «Спосіб надання біоматеріалам прокоагулянтних властивостей шляхом модифікації їхньої поверхні екзогенним активатором протромбіну екамуліном» (UA Патент на корисну модель № 149443), «The method of production of a haemostatic agent and a haemostatic agent for major bleeding control», (WIPO (PCT) Patent WO-2021194461-A1), «Спосіб надання біоматеріалам прокоагулянтних властивостей шляхом модифікації їхньої поверхні екзогенним активатором протромбіну екамуліном» (UA Патент на винахід № 128188), «Спосіб виготовлення гемостатичного засобу і гемостатичний засіб для припинення масивних кровотеч» (UA Патент на винахід № 128691).

Особистий внесок здобувача є визначальним на всіх етапах досліджень. Вся експериментальна робота проводилась дисертанткою особисто, або за її безпосереднього керівництва та участі в проведенні експериментів. Роботу сплановано здобувачкою спільно з науковим консультантом академіком НАН України С.В. Комісаренком. Формування стратегії досліджень здійснювались спільно з завідувачем відділу структури та функції білка (з 2019 року) д.б.н. В.О. Чернишенком та провідною науковою співробітницею відділу, проф. Т.М. Платоною. Створення та характеристика гібридом, розробка імуноензимної тест-системи для визначення концентрації протеїну С та модернізація імуноензимної тест-системи для визначення концентрації розчинного фібрину проводилась спільно з молодшою науковою співробітницею

відділу О.П. Костюченко. Створення та випробування рекомбінантних протеїнів проводилось спільно зі старшим науковим співробітником відділу молекулярної імунології к.б.н. О.Г. Корчинським. Дослідження *in silico* здійснювались у співпраці зі старшим науковим співробітником Інституту молекулярної біології та генетики НАН України, к.б.н. М.О. Платоновим. Аналіз параметрів стану системи гемостазу пацієнтів проводився спільно з молодшою науковою співробітницею відділу Т.М. Чернишенко. Роботу, присвячену дослідженням експериментальної кровотечі, виконано спільно з інженером I категорії відділу Є.П. Кучерявим. N-кінцевий аналіз проводили у співпраці з BioCentrum Sp. (Краків, Польща). Мас-спектрометрію проводили у співпраці з науковим співробітником відділу сигнальних механізмів клітин к.б.н. А.В. Ребрівим. Дослідження кровоспинної та ранозагоювальної дії колагенових матриць проводилось в співпраці з Білоцерківським національним аграрним університетом під керівництвом академіка НААН України М.В. Рубленка. Клінічні дослідження «Карбогемостату» проводились у співпраці зі співробітниками КНП «Київський міський клінічний ендокринологічний центр» під керівництвом лікаря ортопеда-травматолога вищої кваліфікаційної категорії, к.мед.н. А.І. Гаврецького. Клінічні дослідження комплекту для одержання фібринового гелю проводились у співпраці зі співробітниками ТОВ «Мед Сервіс Консалтинг» під керівництвом зав. відділення хірургії та проктології, к.мед.н. О.П. Косенка. Доклінічні дослідження проводились в співпраці з ДП «Науковий центр превентивної токсикології, харчової та хімічної безпеки імені академіка Л.І. Медведя Міністерства охорони здоров'я України».

Апробація матеріалів дисертації. Результати досліджень було представлено на фахових конференціях: X Український біохімічний з'їзд; 2010 вересень 13-17; Одеса, Україна; 38th The FEBS Congress; 2013 July 6-11; Saint Petersburg, Russian; Конференція-конкурс молодих вчених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології–2014»; 2014 квітень 25; Київ, Україна; 16th Annual NATA Symposium. 2015 April 16-17; Prague, Czech Republic; 16th RECOOP Bridges in Life Sciences Video Conference. 2021, April 16; The Biochemistry Global

Summit, 25th IUBMB Congress, 46th FEBS Congress, 15th PABMB Congress, 2022, July 9–14; Lisbon, Portugal; 18th RECOOP Bridges in Life Sciences Conference. 2023, April 20-21; Budapest, Hungary; 19th RECOOP Bridges in Life Sciences. 2024, April 11-12; Bratislava, Slovak Republic; The 27th IFRS workshop. 2024, June 2-6; Esbjerg, Denmark; 20th RECOOP Bridges in Life Sciences. 2025, April 1-3; Prague, Czech Republic; 24th Annual Symposium on Patient Blood Management, Haemostasis and Thrombosis. 2025, April 24-26; Munich, Germany.

Публікації. Матеріали дисертації опубліковано у 25 наукових статтях у фахових виданнях (13 – у закордонних та 12 – у вітчизняних виданнях) в тому числі 16 статей у наукових виданнях, індексованих міжнародними наукометричними базами даних Scopus та Web of Science, SCImago Journal: Q1 – 3 статті, Q2 – 3 статті, Q3 – 3 статті, Q4 – 7 статей), 2 методичних рекомендаціях, в 13 тезах доповідей на наукових конференціях, отримано 9 патентів України на корисні моделі та винаходи та 1 РСТ-заявку.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація викладена в двох томах. Перший том включає основну частину, об'ємом 313 сторінок комп'ютерного тексту, яка має традиційну структуру, містить вступ, анотацію, огляд літератури, розділ Матеріали і методи досліджень, п'ять розділів власних досліджень, Заключення, Висновки. Містить посилання на джерела літератури (203 джерел). Робота ілюстрована 32 таблицями і 109 рисунками.

В другому томі (299 сторінок) подано Додатки А – О, зокрема власні роботи авторки (50 джерел).

РОЗДІЛ 1. ОСНОВИ ФУНКЦІОНУВАННЯ ТРОМБІНУ

Тромбоцитарний гемостаз, система зсідання крові та антикоагулянтна ланка гемостазу мають тісний взаємозв'язок, що включає як позитивні, так і негативні шляхи регуляції, а також формування ензиматичних комплексів на поверхні клітин. Одним з основних ензимів, що забезпечують координацію та функціонування основних компонентів системи гемостазу, є тромбін. Утворення тромбіну є пусковою точкою фібриноутворення, однак його функції не обмежуються перетворенням фібриногену на фібрин [1].

Основними функціями тромбіну є:

- Перетворення розчинного фібриногену у фібрин, що формує тривимірний каркас – основу тромбу.
- Активація тромбоцитів, індукція їх агрегації.
- Підсилення утворення тромбіну, шляхом активації факторів зсідання крові V, VII, VIII та XI.
- Інгібування каскаду зсідання крові: в комплексі із тромбомодулином тромбін активує протеїн C, який, у свою чергу, інактивує фактори Va та VIIIa.

Слід зауважити, що функції тромбіну не обмежуються лише зсіданням крові. Він також відіграє важливу роль у функціонуванні судин [2], запаленні та регенерації тканин [3]. Через PAR, тромбін стимулює активність моноцитів, Т-лімфоцитів, лейкоцитів, ендотеліальних клітин, фібробластів, тканинних макрофагів, нейтрофілів та мастоцитів [4, 5, 6]. Таким чином, тромбін забезпечує взаємозв'язок між системою зсідання крові та адаптивним імунітетом у місцях пошкодження судин.

Тромбін також стимулює проліферацію ендотеліальних клітин, епітелію, фібробластів, гладеньких м'язових і нервових клітин [3, 4]; стимулює неспецифічний імунітет активуючи лімфоцити [5, 6, 7]; бере участь у розвитку злоякісних пухлин, стимулюючи зокрема адгезію та метастатичний потенціал пухлинних клітин, а також активуючи ангиогенез у пухлинній зоні [3, 8, 9];

регулює розвиток та апоптоз нервових клітин у період ембріогенезу та після народження; контролює виживання міобластів, розвиток плаценти та ембріона в цілому [2].

Таким чином, тромбін, без перебільшення, можна назвати центральним ензимом гемостазу, завдяки великій кількості субстратів, на які він діє, та різноспрямованості його функцій. Присутність тромбіну у кровотоці за патологічних умов безпосередньо спричиняє внутрішньосудинний тромбоз і водночас – є маркером цього процесу. Саме тому розуміння молекулярних механізмів регуляції тромбіну є важливим для лабораторної діагностики та корекції порушень гемостазу.

Парадоксально, що хоча утворення активного тромбіну і є головним фактором внутрішньосудинного зсідання крові, тести для визначення його активності або детекції продуктів активації протромбіну не використовуються як рутинні методи лабораторної діагностики.

Крім того, тромбін на сьогодні є основною мішенню антикоагулянтної терапії, хоча може чинити як прокоагулянтну, так і антикоагулянтну дію. Лише декілька наукових груп у світі займаються пошуком способів модифікації активності тромбіну, спрямовуючи її в антикоагулянтний бік. Це перспективний напрямок у розробці принципово нових методів лікування порушень гемостазу.

Нарешті, хоча тромбін і є відповідальним за перетворення фібриногену на фібрин, жоден з існуючих кровоспинних засобів не спрямовано на безпосередню активацію протромбіну – попередника тромбіну.

Гемостатичні матеріали поділяють на три типи, залежно від механізму їх дії, і жоден з них не є специфічним активатором протромбіну [10].

Прокоагулянти, такі як хітозан, опосередковано стимулюють агрегацію тромбоцитів і активують фактори зсідання крові завдяки своїй негативно зарядженій поверхні [11, 12].

Концентратори факторів, зокрема целюлоза та гіалуронова кислота, зупиняють кровотечу фізично, швидко поглинаючи воду та концентруючи компоненти крові у місці ушкодження [11, 13]. Мукоадгезивні агенти, до

прикладу альгінат, забезпечують фізичний бар'єр для кровотоку, зв'язуючи компоненти крові [10], а також проявляють хемотаксичну активність. Крім того, за рахунок абсорбції, вони можуть підвищувати концентрацію тромбоцитів, факторів зсідання крові та локальну концентрацію йонів Ca^{2+} [11].

На звання специфічного активатора можуть претендувати лише колагеновмісні засоби, оскільки вони індукують агрегацію тромбоцитів, однак цього не достатньо для формування щільного фібриново-тромбоцитарного тромбу, тому кровоспинні препарати на основі колагену також виконують свою функцію насамперед завдяки абсорбуючим властивостям [14].

Очевидно, що за інгібування чи недостатності будь-якого з компонентів системи зсідання крові, зазначені кровоспинні матеріали не зможуть забезпечити повну зупинку кровотечі (варто лише згадати проблему крововтрати за гемофілії чи гепаринотерапії). Крім того, швидкість зупинки кровотечі засобами, що працюють завдяки сорбції та концентруванню, буде залежати від гематокриту, щільності прилягання гемостатику до рани, швидкості кровотечі.

Натомість, можливість активувати протромбін плазми крові, незалежно від його функціонального стану та в обхід каскаду зсідання крові, дозволить стимулювати інтенсивне екстрасудинне утворення тромбіну, здатне забезпечити як стимуляцію фібриноутворення, так і активацію тромбоцитів. Отже, гемостатик, що базується на такому принципі дії, забезпечуватиме швидке та ефективне тромбоутворення, не зважаючи на функціональний стан системи гемостазу.

Розгляньмо визначальні властивості тромбіну, які роблять управління його активністю ключовим, як для зупинки кровотечі, так і для попередження тромботичних ускладнень чи ранньої діагностики тромбофілії.

1.1 Функціональні сайти тромбіну.

Тромбін є багатфункціональною сериною протеїназою системи гемостазу, що розщеплює понад 10 субстратів, але залишається високоспецифічною до кожного з них (таблиця 1.1).

Субстрати тромбіну. АЦ – активний центр, ТМ - тромбомодулін

Ліганд	Сайт зв'язування	Кінетичні параметри без кофактора	Кофактор	Кінетичні параметри з кофактором
Фібриноген [15]	екзосайт I екзосайт II АЦ	$K_d = 7 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ $k_{cat}/K_m = 13,9 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (вивільнення FpA) $k_{cat}/K_m = 4,0 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (вивільнення FpB)	-	-
Фактор V [16]	екзосайт I екзосайт II АЦ	$k_{cat}/K_m = 6,3 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	-	-
Фактор VIII [17]	екзосайт I екзосайт II АЦ	$K_m = 12,6 \times 10^{-9} \text{ M}$	-	-
Фактор XIII [18]	АЦ	$k_{cat}/K_m = 1,4 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	фібрин	$k_{cat}/K_m = 1,2 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
GR1b [19]	екзосайт II	$K_d = 5 \times 10^{-7} - 10^{-8} \text{ M}$	-	-
PAR-1 [19, 20]	екзосайт I АЦ	$k_{cat}/K_m = 3 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	GP1b	$k_{cat}/K_m = 1,5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ $K_d = 10^{-9} - 10^{-10} \text{ M}$
Протеїн С [21, 22]	АЦ	$k_{cat}/K_m = 5,6 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	ТМ	$k_{cat}/K_m = 5,9 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
ТАFI [23, 24]	АЦ	$k_{cat}/K_m = 0,96 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	ТМ	$k_{cat}/K_m = 1,2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ $K_d = 6,6 \times 10^{-9} \text{ M}$
антитромбін III [25]	АЦ	$k_{cat}/K_m = 6,8 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	гепарин	$k_{cat}/K_m = 1,2 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
Гепариновий кофактор II [26]	АЦ	-	гепарин,	$K_d = 4 \times 10^{-8} \text{ M}$
			дерматан сульфат	$K_d = 1,9 \times 10^{-6} \text{ M}$

Функціональною пластичністю тромбін завдячує ефекторним ділянкам (екзосайтам I та II), які разом з активним центром беруть участь у розпізнаванні та зв'язуванні субстрату, а також із модуляцією напряму ензиматичної дії, завдяки координації з іонами Na^+ (рис. 1.1). Значна конформаційна рухливість і пластичність молекули тромбіну є однією з причин широкого спектру його функцій [27, 28].

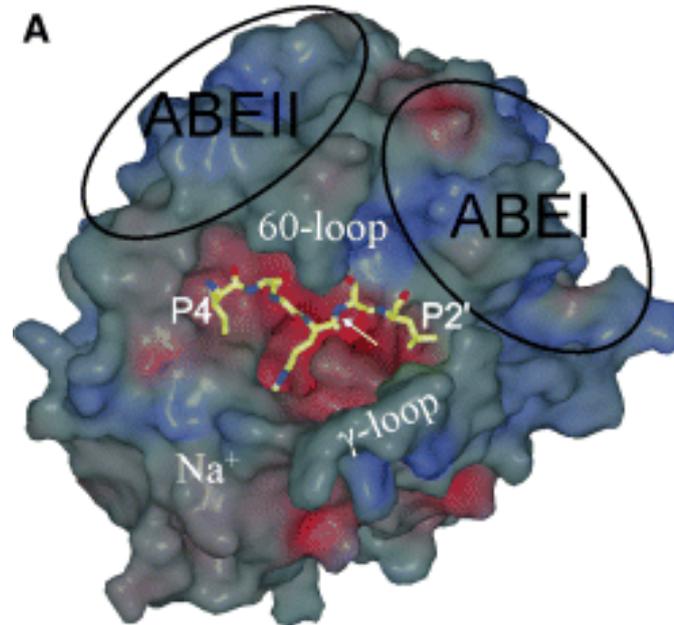


Рис. 1.1. Структура тромбіну [2]. ABEI та ABEII – аніонзв'язуючі екзосайти I та II; Na^+ – Na^+ -зв'язуючий сайт; 60-loop та γ -loop – петлі, що оточують щілину активного центру тромбіну. Жовтим показано ділянку субстрату, що взаємодіє активним центром тромбіну, стрілка вказує на місце гідролізу. P4 – четвертий амінокислотний залишок з N-кінця від місця розщеплення; P2' – другий амінокислотний залишок з C-кінця від місця розщеплення.

Важливо зазначити, що тромбін існує у двох основних формах, що також визначають його ензиматичну спрямованість: вільний тромбін, що циркулює в плазмі крові; тромбін, зв'язаний із мембраною, який взаємодіє з клітинними рецепторами.

Активний центр тромбіну має структуру, характерну для серинових протеїназ родини хемотрипсину. Субстрати тромбіну містять позитивно

заряджений амінокислотний залишок (зазвичай аргінін) на N-кінці розщеплюваного зв'язку [29] (рис. 1.2).

Активний центр тромбіну, розміщений у глибокій «щілині», значно відрізняється за будовою від активних центрів серинових протеїназ [30]. Зокрема, послідовність кишені первинного зв'язування тромбіну сприяє специфічному впізнаванню бічного радикала лише аргінінового амінокислотного залишку субстрату. «Щілина» активного центру тромбіну оточена двома петлями, які довші ніж такі петлі в хемотрипсині. Петля, що отримала назву 60-loop, є гідрофобною і жорсткою, вона утворює «шапку» над активним центром і забезпечує взаємодію з гідрофобними амінокислотними залишками субстрату з N-кінця від місця розщеплення. Натомість, γ -петля є більш гідрофільною та гнучкою. Вона прилягає до активного центру щілини тромбіну та може контактувати із амінокислотними залишками субстрату на C-кінці від місця щеплення (рис. 1.1).

Функціональний аналіз молекули тромбіну демонструє зв'язок між положенням γ -петлі каталітичного центру і структурою екзосайтів: γ -петля може блокувати доступ до «щілини» активного сайту за відповідних змін конформації екзосайтів.

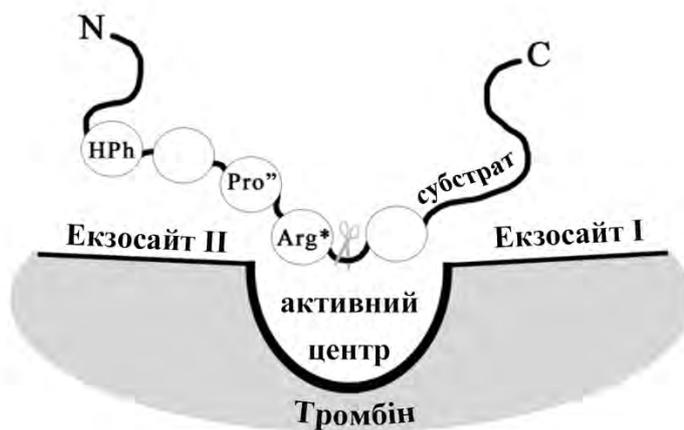


Рис. 1.2. Схема розпізнавання субстрату в активному центрі тромбіну.

Показано, що хоча екзосайти розташовані поза активним центром тромбіну, опосередкована ними взаємодія тромбіну з субстратом або кофактором прискорює утворення або стабілізацію тромбін-субстратного

комплексу (таблиця 1.1). У той же час, немає зв'язку між структурами екзосайтів I і II. Екзосайт I, також відомий як фібриноген-розпізнавальний екзосайт, утворений Lys36, His71, Arg73, Arg75, Tyr76, Arg77, Lys109 і Lys110, взаємодіє з С-кінцем субстрату (рис. 1.2). Для розпізнавання ліганду екзосайтом I найважливішими є аполярні взаємодії. Екзосайт II (або гепарин-зв'язуючий екзосайт) складається з Arg93, Lys236, Lys240, Arg101 та Arg233 [17], і розпізнає N-кінець субстрату або кофактора тромбіну. Саме екзосайт II є аніонзв'язуючим, тому зв'язування лігандів з ним призводить до витіснення йонів із цих ділянок [31, 32].

Роль екзосайтів у розпізнаванні субстрату може бути нееквівалентною. Зокрема, у розпізнаванні фібриногену домінує зв'язування з екзосайту I, а екзосайт II відіграє другорядну роль у цьому процесі [33].

Наявність двох екзозитів на молекулі тромбіну викликає кілька питань. Чи функціонують екзозити незалежно; чи взаємодіють вони; чи співпрацюють вони? Зв'язування фрагмента протромбіну 2 з екзозитом II знижує активність тромбіну, але неясно, чи це пов'язано з впливом на активний центр, чи зі зв'язуванням субстрату в екзозиті I. Аналогічно, фрагмент 2 пригнічує активацію протеїну С у присутності ТМ [34].

Дослідження J. C. Fredenburgh та співавторів [35] пропонують три основні спостереження стосовно ролі екзосайту II. По-перше, екзозит II служить алостеричним модулятором структури та функції тромбіну. Це підкреслює його схожість з екзозитом I, де існує значна підтримка алостеричного зв'язку між екзозитом I та активним центром. Друге спостереження полягає в тому, що ліганди екзозитів I та II мають різний вплив на активний центр тромбіну, що підтверджується як флуоресцентними, так і функціональними дослідженнями. Це свідчить про те, що два екзозити відіграють різні регуляторні ролі, можливо, викликаючи унікальні конформаційні зміни. Третє спостереження полягає в тому, що між двома екзозитами існує прямий алостеричний зв'язок. Конформаційний зв'язок між двома екзозитами та між екзозитами та активним

центром може бути використаний тромбіном для забезпечення ліганд-специфічних реакцій.

Спостереження, що ліганд екзозиту II може впливати на взаємодію тромбіну з фібрином, також відкриває новий шлях модуляції активності тромбіну [36]. Таким чином, можна використовувати ліганди, спрямовані на екзозит II, для витіснення тромбіну, зв'язаного з фібрином, відкриваючи ензим для природніх інгібіторів, зокрема антитромбіну III. Ліганди, спрямовані на екзозит II, також мають потенціал для послаблення активації тромбоцитів шляхом зменшення зв'язування тромбіну з GP1b та PAR-1. Водночас гемостатичні реакції тромбіну, такі як згортання фібриногену, яке опосередковується екзозитом II, будуть лише незначно порушені. Отже, антитромботичні препарати – ліганди екзозиту II – матимуть профіль співвідношення користі та ризику, що перевищує профіль антикоагулянтів, таких як аргатробан, який націлений на активний центр тромбіну, або гірудин та бівалірудин, які націлені на екзозит I та активний центр.

Таким чином, існує декілька способів якими тромбін взаємодіє з лігандами:

1. Лише через активний центр – характерно для низькомолекулярних субстратів.
2. Через активний центр та один із екзосайтів – наприклад, зв'язування з PAR.
3. Через активний центр та обидва екзосайти – наприклад, тромбомодулін зв'язується з екзосайтом I через свій EGF-домен, та з екзосайтом II – через хондроїтинсульфатний мотив, і це забезпечує розпізнавання протеїну C a активному центрі.

Різноманіття взаємодій та комбінування різних сайтів для розпізнавання ліганду забезпечують специфічне розпізнавання великої кількості субстратів і визначають унікальну специфічність тромбіну.

Цікавим прикладом регуляторної ролі екзосайтів тромбіну є зв'язування з фібриногеном γ' . Фібриноген γ' є продуктом альтернативного сплайсингу. Він

має альтернативний ланцюг – заміни 20 амінокислотних залишків з високою часткою негативно заряджених залишків із С-кінця молекули. Фібриноген γ' має середню концентрацію в плазмі від 8 % до 15 %. Карбоксильний кінець γ' -ланцюга фібриногену міцно зв'язується з екзосайтом II тромбіну і тромбін не вивільнюється після перетворення фібриноген γ' на фібрин [37]. Це кардинально змінює доступність тромбіну до інгібування антитромбіном III, обмежує можливість взаємодії з іншими субстратами та утруднює фібриноліз згустку. Як бачимо, навіть зміна сили зв'язування екзосайту тромбіну з фібриногеном, призводить до суттєвих змін щільності та міцності фібринової мережі.

Слід також згадати про конкуренцію лігандів тромбіну за зв'язування з тим чи іншим екзосайтом. До прикладу, тромбомодулін (ТМ) і фібрин конкурують за зв'язування з екзосайтом I тромбіну. Однак тромбін має в 1000 разів більшу спорідненість до тромбомодуліну (див. таблицю 1.1), порівняно з фібрином, тому завжди надає перевагу зв'язуванню з тромбомодуліном [19]. Таким чином, зв'язування тромбіну з тромбомодуліном перешкоджає реалізації його прокоагулянтних функцій. [2]. За екзосайт I також конкурують пептиди гірудину та фібриноген [21], але знову таки фібриноген програє гірудину в спорідненості до тромбіну.

За зв'язування із екзосайтом II конкурують глікопротеїн Ib (GpIb) і гепарин. Обидва ліганди мають майже однакову спорідненість, але тромбін надає перевагу гепарину, оскільки його концентрація на інтактному ендотелії судин значно перевищує щільність GpIb на інтактних тромбоцитах [19]. Цей баланс може змінюватися при пошкодженні судини, дисфункції ендотелію, запаленні або активації тромбоцитів.

Відсутність доменів важкого ланцюга в тромбіні та широкий спектр субстратів, лігандів та інгібіторів підкреслюють важливу роль екзозитів у регуляції активності тромбіну. Екзозити безперечно відіграють вирішальну роль в орієнтації та компарменталізації субстрату та інгібітора шляхом зв'язування. Було запропоновано, що екзозити служать для стабілізації субстрату в активному

центрі, наприклад, зв'язування ТМ з екзозитом I для розщеплення PC, і що алостерія обмежується впливом йонів Na^+ [34].

Іншим регуляторним сайтом тромбіну є Na^+ -зв'язуючий сайт. Йони Na^+ октаедрично координуються з трьома молекулами води та трьома атомами кисню карбоксильних груп тромбіну [20, 38]. Сайт зв'язування з йонами Na^+ розташований біля активного центру тромбіну [16] і є алостеричним: зв'язування йонів Na^+ різко змінює субстратну специфічність тромбіну за рахунок конформаційних змін, але з субстратом йони Na^+ не взаємодіють [39]. «Швидка» Na^+ -зв'язана форма тромбіну активно розщеплює фібриноген, фактори зсідання крові V і VIII, PAR – тобто має прокоагулянтну функцію. «Повільна» Na^+ -вільна форма тромбіну має високу спорідненість до протеїну C, тобто виконує антикоагулянтну функцію. У фізіологічних умовах концентрація йонів Na^+ становить 140 мМ; константа дисоціації йонів Na^+ з тромбіном становить 110 мМ. Тому, майже половина молекул тромбіну, які утворюються *in vivo*, знаходяться у вільній від Na^+ , «повільній» формі [38].

Припускають, що Na^+ -зв'язуюча тромбінова петля бере безпосередню участь у взаємодії з протеїном C [2, 20]. Крім того, зв'язування йонів Na^+ відіграє важливу роль у відщепленні фібринопептиду A тромбіном, оскільки $\text{A}\alpha$ -ланцюг фібриногену тісніше взаємодіє з тромбіном у перехідному стані та, стабілізуючи Na^+ -зв'язану форму тромбіну, робить каталіз більш ефективним [38].

Гіпернатріємія (концентрація Na^+ в плазмі > 145 мМ) або гіпонатріємія (концентрація Na^+ в плазмі < 135 мМ), які є найпоширенішими електролітними розладами, часто пов'язані з тромбозом або кровотечею. Навіть у фізіологічних умовах концентрація Na^+ у крові знижується на периферії згустку, що дозволяє «погасити» хвилю зсідання крові та локалізувати її [38].

1.2. Участь тромбіну в тромбоутворенні: з чого почати та чому надати перевагу?

Константи дисоціації та константи специфічності для різних партнерів тромбіну різняться на порядки (таблиця 1.1). Доступність партнерів теж може

варіювати, тому послідовність і швидкість розщеплення тромбіном того чи іншого субстрату залежать від динамічної рівноваги між такими формами тромбіну: вільною; зв'язаною із тромбомодуліном; зв'язаною з тромбоцитами; у комплексі з антитромбіном III, тощо. Саме цим визначається спрямованість тромбінової ензиматичної активності на різних етапах активації системи зсідання крові (рис 1.3) [40].

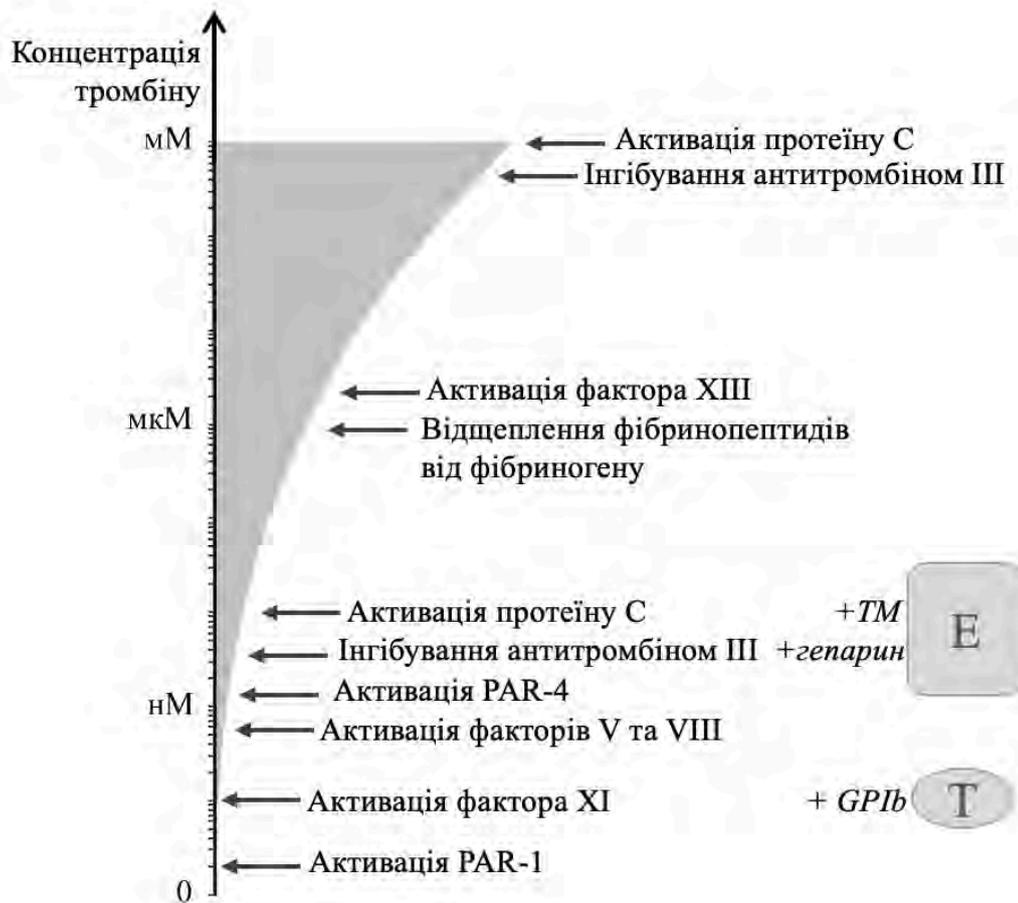


Рис. 1.3. Схема почергового залучення субстратів до взаємодії з тромбіном, залежно від зростання його концентрації, в процесі активації системи зсідання крові.

Е – ендотеліюцити – є носіями кофакторів тромбіну (гепарину та тромбомодуліну), які суттєво збільшують спорідненість тромбіну до антитромбіну III та протеїну С; Т – тромбоцити – є носіями глікопротеїну GPIb, який є кофактором для взаємодії тромбіну з фактором XI.

На початковій стадії активації зсідання крові навіть субнанолярні концентрації тромбіну активують фактори V та VIII [19, 41]. Тромбін зв'язується з цими факторами завдяки обом екзосайтам, що і визначає високу стабільність цих ензим-субстратних комплексів. На цьому етапі також відбувається активація фактора XI [42, 43]. Глікопротеїн Ib (GPIb) на поверхні тромбоцитів та фактор Va слугують в цьому процесі кофакторами тромбіну хоча досі відсутнє чітке розуміння, чи вони працюють разом, чи конкурують між собою. Активація факторів V, VIII та XI посилює утворення протромбіназного комплексу, що призводить до швидкого зростання рівню тромбіну на першому етапі індукції зсідання крові.

При підвищенні концентрацій тромбіну до нанолярних, реалізується взаємодія тромбіну з компонентами мембран: гепарином і тромбомодуліном – на ендотеліюцитах; GPIb, PAR-1 та PAR-4 – на тромбоцитах.

Концентрації тромбіну понад 1 нМ (рис 1.3) достатньо для активації тромбоцитів [44]. Тромбоцити забезпечують негативно заряджену поверхню для утворення комплексів факторів зсідання крові. Зокрема, протромбіназний комплекс (фактор $Xa+Va$), за присутності йонів Ca^{2+} , збирається на поверхні активованих тромбоцитів, тому активація тромбоцитів тромбіном стимулює утворення нових молекул тромбіну.

GPIb мембрани тромбоцитів взаємодіє негативно зарядженим регіоном з екзосайтом II тромбіну. Деякі експериментальні дані [45] вказують на те, що у цій взаємодії також може бути задіяний і екзосайт I. Слід зазначити, що лише незначна частина GPIb, яка експонується на поверхні тромбоцитів, може зв'язувати тромбін, а більшість цих рецепторів специфічно зв'язується тільки з фактором фон Вілебранда [46, 47].

Формування комплексу тромбіну з GPIb може посилювати розщеплення GrV, що призводить до гіперактивації тромбоцитів [46, 47, 48], а також в шість-сім разів прискорювати активацію PAR-1 тромбіном, завдяки наближенню екзосайту I до PAR-1 в комплексі GPIb-тромбін-PAR-1 [17, 19, 50, 51].

Саме PAR належить основна роль в активації тромбоцитів тромбіном. Тромбін зв'язується з PAR-1 та PAR-4 тромбоцитів через екзосайт I та активний центр. PAR-1 є основним рецептором тромбіну на тромбоцитах і, за деякими даними, може активуватись навіть за пікромольних концентрацій тромбіну. Однак це не призводить до незворотньої активації тромбоцитів, натомість забезпечує швидку, але короткочасну відповідь тромбоцитів [52, 53]. З іншого боку, PAR-4 активується за вищих концентрацій тромбіну (від $\sim 0,4$ нМ до $\sim 0,8$ нМ) і сприяє незворотній агрегації тромбоцитів [45, 54].

Ймовірно, що повна відповідь тромбоцитів людини вимагає формування пари рецепторів PAR-1 і PAR-4, оскільки PAR-4 не має послідовності, комплементарної до екзосайтів тромбіну [55].

Крім того, тромбін може посилювати адгезію тромбоцитів через розщеплення ADAMTS13 – протеїнази, відповідальної за процесинг фактора фон Віллебранда. Оскільки фактор фон Віллебранда є ключовим глікопротеїном адгезії тромбоцитів, інактивуючи ADAMTS13, тромбін сприяє залученню тромбоцитів до місця ушкодження [56].

Зростання концентрації тромбіну до 10 нМ (рис. 1.3) відкриває можливість його взаємодії з гепарином та тромбомодуліном, які експоновані на інтактному ендотелії [29, 32]. Гепарин виступає кофактором при зв'язуванні та інгібуванні тромбіну антитромбіном III, а тромбомодулін – кофактором для розпізнавання та активації протеїном C. Таким чином, на етапі накопичення тромбіну в наномольній концентрації, необхідність активації зсідання крові проходить додаткову верифікацію: якщо ендотелій неушкоджений – тромбін інгібується антитромбіном III та запускає антикоагулянтну ланку гемостазу шляхом активації протеїну C. Тож функціональний стан ендотелію відіграє ключову роль в зупинці небажаного внутрішньосудинного зсідання крові.

Зміна ензиматичної активності тромбіну внаслідок зв'язування з тромбомодуліном є найяскравішим прикладом його алостеричної регуляції. Тромбін залучає ексайти I та II для розпізнавання п'ятого та шостого EGF-подібного домену тромбомодуліну та його глікозильованого

муциноподібного фрагменту [57, 58]. Процес розпізнавання супроводжується конформаційними змінами тромбіну в «повільну» форму, крім того, це забезпечує екранування полярних амінокислотних залишків протеїну С поблизу аполярної ділянки «щілини» активного центру тромбіну [59].

У результаті, тромбомодулін суттєво знижує енергетичний бар'єр і підвищує швидкість утворення комплексу тромбін-протеїн С, збільшуючи ефективність активації протеїну С тромбіном у 10 000 разів [2, 60]. В умовах *in vivo* реакція додатково посилюється приблизно в десять разів, завдяки ендотеліальному рецептору протеїну С, який зв'язує і локалізує протеїн С на ендотеліоцитах поблизу тромбомодуліну [61]

Тромбомодулін присутній у кількості приблизно 100 000 копій на одну ендотеліальну клітину. Концентрація вільного тромбомодуліну у великих судинах становить приблизно 0,1-0,2 нМ і, після взаємодії з тромбіном, його локальна концентрація підвищується до 10 нМ. Варто зазначити, що в мікросудинах концентрація тромбомодуліну досягає 500 нМ. Це яскравий приклад того, як густина сайтів зв'язування тромбіну може спрямовувати гемостаз в антикоагулянтне русло, підвищуючи вірогідність активації протеїну С у мікроциркуляторній системі [59].

Тромбомодулін, за аналогічним механізмом, стимулює активацію тромбіном карбоксипептидази TAFI (тромбін-активованого інгібітора фібринолізу). Активований TAFI здатний відщеплювати на молекулі фібрину С-кінцеві залишки лізину, які зазвичай утворюють сайти зв'язування з плазміном, захищаючи фібриновий згусток від передчасного лізису [62, 63].

Підвищення концентрації тромбіну до мікромолярної концентрації переводить систему зсідання крові на наступний етап – формування фібринового згустку (рис. 1.3).

Тромбін розщеплює чотири зв'язки фібриногену, відщеплюючи два фібринопептиди А ($A\alpha 1-16$) та два фібринопептиди В ($B\beta 1-14$) [64]. Під час відщеплення фібринопептиду А, тромбін безпосередньо зв'язується з $A\alpha$ -ланцюгом фібриногену через екзосайт I та активний центр. Вивільнення

фібринопептиду А та утворення фібрину $desA$ є достатнім для полімеризації. Коли ж відщеплюється фібринопептид В, утворюється фібрин $desAB$, і починається латеральна асоціація протофібрил. Однак видалення лише фібринопептидів В, неможливе у фізіологічних умовах, не викликає полімеризації фібрину [2, 64, 65]. Варто зазначити, що концентрація тромбіну (тобто швидкість та повнота відщеплення фібринопептидів) визначає характеристики фібринового згустку, до прикладу його просторову організацію чи стійкість до дії фібринолітичної системи [66, 67, 68].

Тромбін зв'язується з фібрином лише через один екзосайт і це дозволяє фібрину легко вивільнитися з активного центру для формування згустку. Тромбін взаємодіє з N-кінцевим E-регіоном фібрину в процесі вивільнення фібринопептидів, ймовірно, порушуючи взаємодію α C-кінця з E-регіоном фібрину та експонуючи таким чином центри полімеризації «А» та «В» у E-регіоні. Ці центри полімеризації зв'язуються з комплементарними центрами полімеризації «а» та «b» у D-регіоні іншої молекули фібрину, що призводить до утворення протофібрил [37].

Цікаво, що тромбін не лише перетворює фібриноген на фібрин, здатний до полімеризації, але й використовує полімерний фібрин як кофактор для розпізнавання та активації фактора XIII. Фактор XIII зв'язується з C-кінцевим D-регіоном однієї молекули фібрину, а тромбін – з E-регіоном іншої [69]. В процесі полімеризації молекули фібрину зближуються, забезпечуючи контакт тромбіну та фактора XIII. Фібрин прискорює активацію фактора XIII тромбіном 80-кратно [25]. Активованій фактор XIIIа зшиває сусідні молекули фібрину ковалентними міжмолекулярними зв'язками [19, 70]. Такий механізм просторової колокалізації тромбіну з фактором XIII гарантує, що фактор XIIIа утворюється саме тоді і саме там, де він потрібен, тобто на поверхні зрілого фібринового згустку.

Нарешті, якщо внутрішньосудинна концентрація тромбіну досягає мілімолярної концентрації, то це сигнал про надпотужний ризик тромбоутворення, який загрожує здоров'ю організму і зсідання крові має бути

припинене. Саме тому, при досягненні мілімолярних концентрацій, тромбін інгібується антитромбіном III без участі гепарину, та активує протеїн C, незалежно від тромбомодуліну (рис. 1.2), тобто не зважаючи на те чи пошкоджено ендотелій [29, 32].

Висновки до розділу I

Визначення напрямку дослідження

Центральна регуляторна роль тромбіну в регуляції гемостазу забезпечується за рахунок широкого спектру його субстратів та його здатності до компарменталізації в різних місцях. Це досягається на кількох рівнях, кожен з яких залежить від екзосайтів I та II й Na^+ -зв'язуючого сайту. Таким чином, взаємодія з субстратом, зв'язування інгібітора та колокалізація з лігандами та рецепторами опосередковуються екзосайтом I та/або II за рахунок комбінування точок взаємодії тромбіну з партнерами дозволяє тромбіну специфічно розпізнавати велику кількість субстратів. Ензиматична активність тромбіну спрямована на формування фібриново-тромбоцитарного згустку, активацію та, водночас, інгібування каскаду зсідання крові, для реалізацію ендотелієм антикоагулянтної функції. З іншого боку, дисбаланс різних ланок гемостазу відображається на активності та спрямованості тромбіну. Тому тромбін, без перебільшення, є центральним регуляторним ензимом гемостазу, а отже для регуляції функціонування системи гемостазу та діагностики її стану перш за все слід навчитися скеровувати та контролювати його активність.

Узагальнення уявлення про принципи регуляції активності тромбіну представлені в публікаціях [16, 20, 23, 25, 29] **Додатку А.**

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Матеріали

2.1.1 Реагенти

В роботі було використано: хромогенні субстрати S2238 H-D-Phe-Pip-Arg-pNA, 2765 Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA, S2302 D-Pro – Phe – Arg – pNA·2 HCl та S2236 p-Glu-Pro-Arg-pNa (Diapharma, West Chester Township, OH, USA), суміш протеїнів – маркерів молекулярної маси для електрофорезу («Fermentas», Європейський союз), диметилсульфоксид (SDS) («Bio-Rad Laboratories», США), PD-10 (Amersham biosciences, Швеція), ADP, холо-трансферин бичачий, 2-дезоксипіримідин («Merck», Німеччина), Трис, ЕДТА («Serva», США), тромбoplastин, АЧТЧ тест-набір, активатор протеїну С, ліофілізована плазма крові донорів (Siemens, Erlangen, Germany), анти протеїн С афінна матриця («Roche», Німеччина), протеїн G Sepharose («Cytiva», Швеція), Ni²⁺-NTA агароза (ThermoFisher, США), Q-Sepharose («Pharmacia», Швеція), Twin-20 («Ferak», Німеччина), середовище для культури *E. coli* LB Broth, канаміцин, ізопропіл-β-D-1-тіогалактопіранозид (ІПТГ), акриламід, культуральне середовище RPMI-1640, стрептозотонин, ліпополісахариди, кролячі антикозячі антитіла, кролячі антимішачі антитіла, кон'югат стрептавідин-пероксидази, ембріональної сироватки великої рогатої худоби, поліетиленгліколь, тетраметилбензамін (ТМБ), сольовий розчин Хенкса, («Sigma-Aldrich», США), N-гідроксисукцинімідне похідне біотину, тромбін, акриламід, біс-акриламід, натрію піруват, інсулін, повний та неповний ад'ювант Фрейнда, амфотерицин В, буфер для лізису еритроцитів («Sigma», США), 2-меркаптоетанол («Roanal», Угорщина), HEPES («USB», США), гентаміцин («Gibco», ВБ), набір антисироваток кози до ізотипів імуноглобулінів миші (“Clinical Credential; ICN Immunobiologicals”, США), клітини мієломи X63-Ag8.6.5.3 («Flow Laboratories», Англія), Taq DNA Pol, набір для виділення ДНК фрагменту GeneJet Gel Extraction Kit (Thermo, США); 96-коміркові планшети для імуноензимного аналізу («Nunc», Thermo fisher, Данія), 24-коміркові планшети для культури клітин, флакон для суспензійних клітин («Sarstedt», США).

Решта використаних реактивів – вітчизняного виробництва категорії х.ч.

2.1.2. Біоматеріали

Колаген. Колагеновий препарат отримували зі шкіри телят шляхом хімічної епіляції з одночасним дифузійним видаленням неколагенових протеїнів і подальшим кислотним гідролізом у середовищі HCl (pH 3,0). За даними електрофорезу, протеїнова фракція препарату представлена колагеном понад 300 kDa.

Желатин. Використовували стерильну желатинову губку тваринного походження Cutanplast® (Mascia Brunelli, Італія).

Целюлозне волокно. Використовували целюлозне неткане волокно Spunlace (Etto, Україна). В хірургії Spunlace є одним з видів неактивних пов'язок.

Гідроксиапатит. Використовували гідроксиапатит з β -трикальційфосфатом Біомін® (ТОВ «Центр науково-технічних послуг РАПД», Україна). Біомін® – остеоопорний матеріал на основі синтетичного гідроксиапатиту для лікування кісткової патології.

Вуглецевий сорбент. Волокнистий матеріал активованого вугілля АУВМ «Дніпро»-МН (розроблений в Інституті експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, Україна) є ентеро- та гемосорбентним, аплікаційним матеріалом. Питома адсорбційна поверхня складала не менш 1800 г/см² (Броварський завод порошкової металургії, Україна). Використовується в хірургії як пов'язка для поверхневих ран, у тому числі гнійних.

Діоксид кремнію. Використовували порошок діоксиду кремнію Атоксіл® (ТОВ «Орісил-Фарм», Україна). Атоксіл® — високодисперсний діоксид кремнію, який використовується, зокрема, зовнішньо для лікування гнійних ран, трофічних виразок та опіків.

2.1.3. Ентеросорбент

В якості ентеросорбенту, який вводили опроміненим щурам для зменшення запального процесу використовували активоване вугілля виготовлене в Інституті експериментальної патології, онкології та радіобіології

імені Кавецького НАН України. Він володів наступними властивостями: гранули діаметром $< 0,25$ нм; високоактивованій з об'ємною щільністю – $0,12$ г/см³, BET поверхня (за методом Брунером, Емметом та Теллером) – 2918 м²/г і об'єм пор (за методом Барретта Джойнера Халенди) $4,5$ см³/г (виміряно за допомогою азотної порозиметрії).

2.1.4. Фібриноген.

Фібриноген людини виділяли з плазми крові фракційним осадженням сульфатом натрію (Na₂SO₄) [71]. До безпротромбінової плазми додавали 1 М гліциновий буфер (рН $9,5$) з $0,1$ М NaCl (у співвідношенні $1:9$) і перемішували при 20 – 22 °С на водяній бані. При постійному перемішуванні до плазми по краплях додавали 16% розчин Na₂SO₄ (520 – 680 мл 16% Na₂SO₄ на 1 л плазми) до появи дрібного осаду. Останній видаляли центрифугуванням при 1400 г протягом 15 хв з подальшим осадженням фібриногену з супернатанту шляхом додавання по краплях 16% Na₂SO₄ до його кінцевої концентрації $8,5\%$ і центрифугуванням при 1200 г протягом 15 хв. Потім осад розчиняли в $0,2$ М NaCl (осад з 1 л вихідної плазми в 200 мл $0,2$ М NaCl) і знову по краплях додавали рівний об'єм 16% Na₂SO₄ і центрифугували при 1200 г протягом 20 хв. Осад розчиняли в $0,2$ М NaCl (осад з 1 л плазми в 200 мл $0,2$ М NaCl). До отриманого розчину додавали $1/5$ об'єму $0,5$ М калій-фосфатного буфера (рН $6,5$). Фібриноген знову висолювали, додаючи рівний об'єм 16% Na₂SO₄ і центрифугують при 1200 г протягом 20 хв.

Осад розчиняли в $0,15$ М NaCl. Концентрацію фібриногену доводили до 1% $0,15$ М NaCl і залишали на 16 год при 4 °С. Потім розчин центрифугували при 1400 г протягом 15 хвилин, при цьому в осаді залишався кріофібриноген. До супернатанту додавали рівний об'єм 16% Na₂SO₄ і центрифугували при 1200 г протягом 15 хв. Осад розчиняли в $0,15$ М NaCl до кінцевої концентрації фібриногену 25 – 30 мг/мл. Розчин фібриногену зберігали при -20 °С.

2.1.5. Фібрин desAB.

desAB фібрин отримували шляхом ензиматичної дії тромбіну на фібриноген [71]. До $0,25\%$ розчину фібриногену в $0,15$ М NaCl додавали тромбін

(0,15–0,3 NH на 1 мг фібриногену) та інкубували 1–1,5 год при 37 °С. Після інкубації згусток видаляли і двічі промивали 0,15 М NaCl. Отриманий фібриновий згусток розчиняли в 0,125% оцтової кислоти при 4 °С. Розчин фібрину центрифугували 10–15 хв. при 900 г при 5 °С. Цей цикл полімеризації та розчинення повторювали двічі. Отриманий 1,2–1,5 % розчин desAB фібрину в 0,125 % М оцтової кислоти зберігали при 4 °С.

2.1.6. Екамулін

Активатор протромбіну з отрути *Echis multisquamatis* (екамулін) очищали від кристалічної отрути за допомогою іонообмінної хроматографії на Q-Sepharose [72, 73]. Буфер 0,025 М Tris-HCl, рН 8,9, використовували як буфер для нанесення, а 0,025 М буфер Tris-HCl, рН 8,9 з 0,2 М NaCl, використовували як буфер для елюації (рис. 2.1 А). Чистоту активаторів протромбіну контролювали електрофорезом у ПАА-гелі (рис. 2.1. Б).

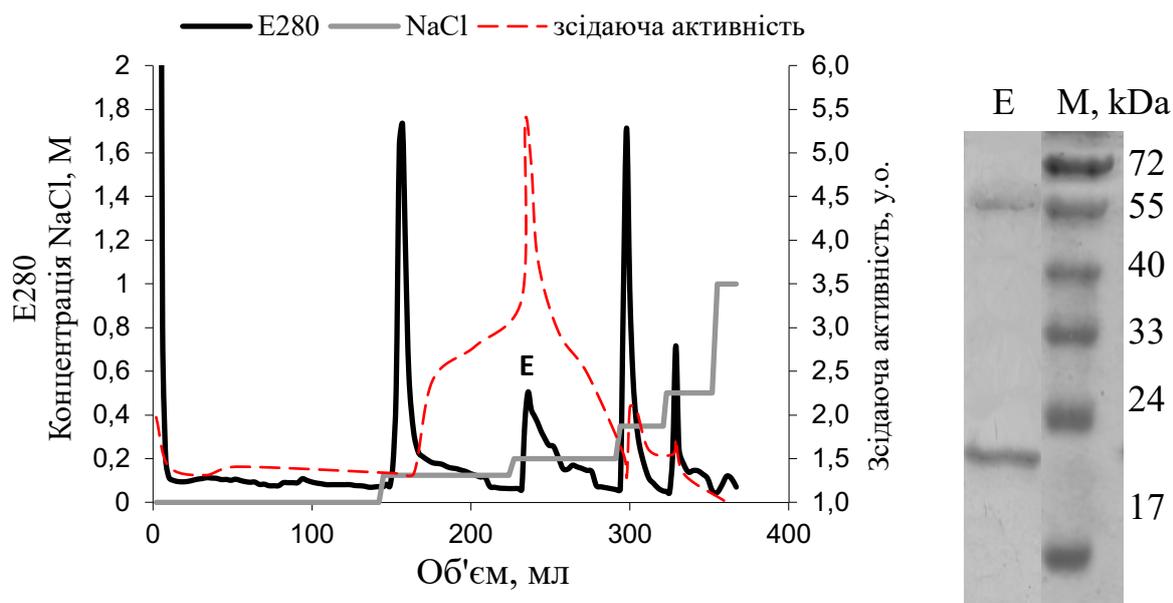


Рис. 2.1. Профіль елюції отрути *Echis multisquamatis* з Q-сефарози (А). Електрофорез активатора протромбіну (Б). Е – активатор протромбіну, екамулін. М – молекулярні маркери.

Зсідаючу активність екамуліну визначали як час утворення тромбу в 100 мкл цитратної плазми крові з додаванням 100 мкл 0,025 М розчину CaCl₂ під дією 5 мкг протеїну. На рис. 2.2 показана зсідаюча активність як відношення часу

зсідання рекальцинованої плазми крові (300 с) до часу зсідання плазми крові в присутності фракцій, отриманих під час хроматографії.

2.1.7. Претромбін-1

Претромбін-1 людини отримували гідролізом протромбіну людини тромбіном, взятих у ваговому співвідношенні 1:1 у 0,05 М трис-НСІ буфері, рН 7,4 з 0,13 М NaCl, що супроводжується відщепленням фрагменту 1 [74]. При 1,5-годинному гідролізі протромбіну тромбіном при температурі 37°C відбувалось розщеплення всього протромбіну з утворенням претромбіну 1. Тромбін інгібували диізопропілфторфосфатом у кінцевій концентрації 1 мМ.

На наступному етапі суміш претромбіну-1 та тромбіну розділяли на Q-Sepharose (2,5 x 11,8 см), зрівноваженій 0,02 М трис-НСІ буфером, рН 7,4. Сорбовані протеїни елюювали ступінчастим градієнтом іонної сили 0,4 М та 1М NaCl в буфері за швидкості 3 мл/хв; претромбін-1, що має молекулярну масу 50 kDa, елюювали за іонної сили 0,4 моль/л (рис. 2.2, А).

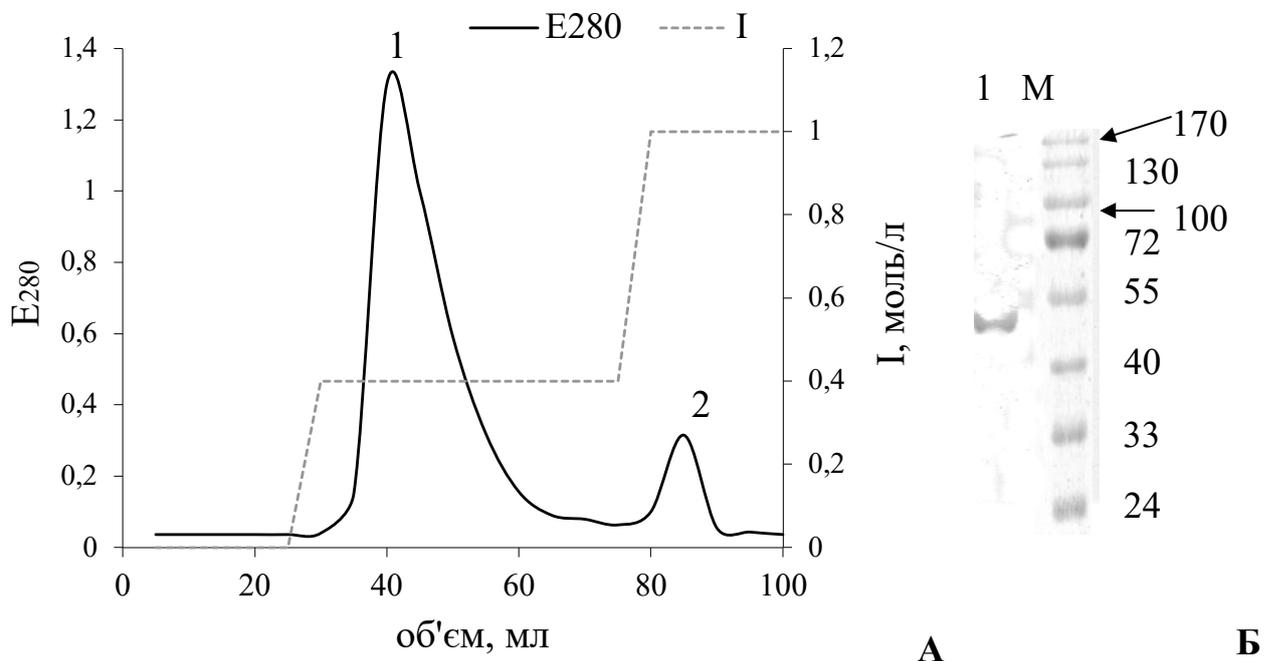


Рис. 2.2. Виділення претромбіну-1.

А – профіль елюції претромбіну-1 (1) та тромбіну (2) з колонки Q-Sepharose 0,02 М трис-НСІ буфером, рН 7,4 ступінчастим градієнтом іонної сили.

Б – електрофореграма очищеного претромбіну-1 (1). М – маркери молекулярної маси.

Чистоту препарату перевіряли електрофоретично (рис. 2.2, Б).
Заморожений матеріал зберігали при температурі -20°C .

2.2. Моделі на тваринах

Всі тварини, використані для створення модельних систем утримувались у стандартних клітках із вільним доступом до їжі та води відповідно до «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (Україна, 2001), які відповідають положенням «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, 1986).

Протягом експериментів тварини отримували збалансований гранульований корм та незаражену фільтровану воду. В приміщенні, де утримувались тварини була забезпечена вентиляція; температура повітря коливалась від 19 до 20°C , вологість – від 56 до 60% .

2.2.1 Оцінка гемостатичної дії модифікованих біоматеріалів на моделі паренхіматозної кровотечі у щурів.

Для експериментальної оцінки ефекту гемостатичної дії модифікованих біоматеріалів використовували модель паренхіматозної кровотечі у щурів [75] білої лінії Wistar (200 ± 20 г, $n = 40$) з віварію Інституту біохімії ім. В. Палладіна НАН України. Це дослідження було проведено за схвалення Комітету з догляду та використання тварин Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України.

Операції проводили під загальним наркозом (рауш наркоз хлороформом) виконували верхньосерединну лапаротомію: видаляли ліву бічну частку печінки та виконували крайову клиноподібну резекцію частки розміром ($1 \times 0,1$) см, масою 18 ± 6 мг.

Модифіковані біоматеріали наносили на утворену кровоточиву рану та притискали на 3 хв.

Операція супроводжувалася паренхіматозною кровотечею, інтенсивність якої оцінювали за масою крововтрати (що оцінювалась за зміною маси біоматеріалу до використання та після аплікації) та часом кровотечі (що

визначали візуально засікаючи час від моменту резекції печінки до моменту зупинки кровотечі).

2.2.2. Оцінка місцевої переносимості колагенової матриці модифікованої специфічним активатором зсідання крові.

Для оцінки місцевої переносимості колагенової матриці модифікованої специфічним активатором зсідання крові використовували щурів-самців альбіносів лінії Wistar Han (n=15) масою тіла 200 - 220 г, які утримувались в SPF віварії дрібних лабораторних тварин ДП «Науковий центр превентивної токсикології, харчової та хімічної безпеки імені академіка Л.І. Медведя Міністерства охорони здоров'я України» [76].

Перед дослідженням тварини були оглянуті на предмет відповідності вимогам до біологічних моделей у токсикологічному експерименті і придатності для даного дослідження відповідальним ветеринарним лікарем ЦПРТ при надходженні. У період акліматизації тварини були здорові, ознак порушень клінічного стану не виявлено.

Для оцінки місцевої переносимості колагенової матриці модифікованої специфічним активатором зсідання крові за 1 день до імплантації шерсть у зоні хірургічного втручання вистригали без пошкодження шкіри. На 0 день проводили хірургічне втручання у всіх тварин в асептичних умовах. Тварин піддавали рауш наркозу диетиловим ефіром. На шкірі в місці імплантації (у передній зоні спини зліва) проводили розріз 1,2 см. Тест-зразки змочували стерильним фізіологічним розчином і імплантували під шкіру. Накладали шви, місце імплантації змащували 5 % спиртовим розчином йоду, після чого була накладена асептична пов'язка. Знеболення проводили упродовж двох днів за допомогою перорального введення суспензії анальгетика Мелоксивету (д.р. Мелоксикам) в дозі 0,1 мл/кг, що відповідало 0,1 мл Мелоксикаму на 1 кг маси тіла, 1 раз на добу. Період спостережень 21 доба. Маркування підтримувалось до моменту взяття зразків тканин на гістологічні дослідження.

2.2.3. Дослідження кровоспинної та ранозагоювальної дії *in vivo* модифікованої екамуліном колагенової матриці.

Дослідження кровоспинної та ранозагоювальної дії *in vivo* кровоспинного засобу, здатного до біодеградації проводилися на кролях тримісячного віку, Каліфорнійської породи, з масою тіла близько 1,5 кг. Тварин утримували у віварії Білоцерківського НАУ, в індивідуальних клітках з комбінованим освітленням і щоденним прибиранням. Годівля забезпечувалася збалансованим гранульованим комбікормом із розрахунку 200 г на голову на добу та необмеженим доступом до води.

Початковий забір крові (0): Перед початком експерименту кролів фіксували у боковому положенні, вистригали місце відбору крові, відбирали кров з антикоагулянтом (3,8 % цитратом натрію) із зовнішньої яремної вени для одержання 0.5 мл цитратної плазми крові у кожного кроля, маркуючи зразки: Ia0, Ib0.. і т.д. Pa0, Pb0... і т.д. ..Sha0, Pb0. і т.д. та зберігали у замороженому вигляді при -20 °С.

Оперативне втручання виконували з дотриманням вимог асептики та антисептики. Анестезіологічне забезпечення включало: внутрішньом'язово 2 % розчин ацепромазину (0,5–1,0 мг/кг), внутрішньовенно тіопенат (5–8 мг/кг) та місцево інфільтраційну анестезію 0,5 % розчином лідокаїну (3–4 мг/кг).

Виконували лапаротомію та стандартне ушкодження печінки. Оцінювали час кровотечі (в секундах) за стандартного ушкодження печінки за умов використання стандартного методу (група I) (n=5), зупинки кровотечі колагеновою матрицею (група II) та зупинки кровотечі колагеновою матрицею, вдосконаленою активатором (група III).

Рани м'яких тканин кролів усіх груп зашивали безперервним швом, на шкіру накладали вузлові шви, які двічі на день протягом п'яти днів обробляли йодіцирином. Для попередження розгризання швів одягали попони. У післяопераційний період за тваринами вели клінічні спостереження. Шви знімали на сьому добу.

Кролів після відбору крові, виводили з досліду на 14-ту добу шляхом внутрішньовенного введення тіопенату в дозі 50 мг/кг. Проводили фотофіксацію макроскопічної картини печінки кроля через 14 діб після операції, оцінку спайкоутворення та приготування препаратів ушкодженої та загоєної ділянки печінки для гістологічного аналізу у забуференому формаліні.

2.2.4. Оцінка місцевої переносимості лікарського засобу на основі активатора зсідання крові у вигляді аутологічного фібринового гелю на кролях.

Для доклінічних досліджень місцевої переносимості [76] лікарського засобу на основі активатора зсідання крові у вигляді аутологічного фібринового гелю використовували молодих статевозрілих віргільних самок кролів (вид *Oryctolagus cuniculus*), Білої Новозеландської породи масою тіла 2390 – 2503 г (n=6).

Тварини пройшли карантин тривалістю 21 день. У період карантину тварини були здорові, ознак порушень клінічного стану не виявлено.

Тварини утримувалися в SPF віварії ДП «Науковий центр превентивної токсикології, харчової та хімічної безпеки імені академіка Л.І. Медведя Міністерства охорони здоров'я України».

Екамулін у вигляді аутологічного фібринового гелю вводили кролям під шкіру спини. Фібриновий гель виготовляли безпосередньо перед кожним уведенням, забираючи до шприця з екамулином аутологічну плазму кожної тварини до об'єму 0,6 мл. В якості контрольної речовини використовували аутологічну плазму, яку забирали в стерильні шприци з референтною речовиною (0,1 мл 0,9 % розчин NaCl) до об'єму 0,6 мл безпосередньо перед введенням тварині.

День проведення першої ін'єкції рахували як 0-й. Введення гелю здійснювали в зоні лівої лопатки на 0-й та 5-й день у фіксованій дозі 0,6 мл. Це дозволяло оцінити місцеву переносимість досліджуваної речовини в динаміці – впродовж 48 годин (після останньої ін'єкції) та впродовж семи днів (після першої ін'єкції). Ін'єкції досліджуваної речовини проводили кожному кролику на лівій стороні спини в окремі марковані ділянки шкіри (1x1 см). У якості контролю

слугувало місце ін'єкції на правій стороні спини. В попередньо марковану ділянку вводили контрольну речовину у 0-й день дослідження.

У ході дослідження оцінювали загальний клінічний стан кролів (0-7 дні), динаміку їх маси тіла (0 та 7 день). Спостереження за реакцією шкіри в місці ін'єкції проводили щоденно. У дні введення додатково реєстрували реакцію тварин на процедуру уведення та місцеву реакцію шкіри через 4 години після ін'єкції. Після закінчення періоду спостереження (на сьомий день) проведено евтаназію всіх піддослідних тварин, розтин та макроскопічний огляд тканин, що прилягають до місця введення (згідно маркування), а також органів черевної та грудної порожнин. Відібрано зразки тканин у місці усіх проведених ін'єкцій. Гістопатологічне дослідження тканин у місці введення дослідженої речовини проведено для першої та другої ін'єкцій, що відповідає сьомій та другій добі після введення. В якості контролю використовували тканини в місці ін'єкції контрольної речовини (7 діб після введення).

2.2.5. LPS-індуковане запалення у мишей

Самок 3-місячних мишей C57BL/6J поміщали в тиху кімнату з контрольованою температурою (22–23°C) у тваринницькому приміщенні Інституту біохімії Палладіна, їм досхочу давали воду та сухий корм. Усі процедури цього дослідження були схвалені Комітетом з догляду та використання тварин Інституту біохімії імені Палладіна (№ 7, 04.10.2019).

Мишей розділили на дві групи по 12 тварин у кожній. Мишам 1-ї групи (досліджувані тварини) внутрішньоочеревинно вводили LPS (30 мкг/мишу в 0,9 % розчині NaCl). Мишам другої групи (контрольні тварини) внутрішньоочеревинно вводили еквівалентний об'єм 0,9 % розчину NaCl. Зразки крові мишей відбирали на другий день після ін'єкції [77].

2.2.6. Модель запалення, спричиненого опроміненням на щурах.

Щурів-самців білої лінії Wistar (200 ± 20 г, $n = 40$) з віварію Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології за два тижні до експерименту для адаптації розділили на три групи по 10 тварин у кожній: 1-ша група – щури піддавались зовнішньому рентгенівському опроміненню в дозі 6 Гр;

2 група – щури з опроміненням 6 Гр , яким перорально вводили ентеросорбент (п.п. 2.1.2), 3 група – здорові щури як інтактний контроль. 1-ша група та 3-тя група щурів отримували лише їжу (овес) і воду, а 2-га група щурів отримували 2 мл ентеросорбенту з їжею (овес) на кожного щура та воду. 2-га група щурів починала приймати ентеросорбент, змішаний з їжею, в день опромінення та після опромінення (для пом'якшення радіоактивного впливу та лікування) протягом одного дня. Тварин умертвляли під хлороформним наркозом на першу добу після опромінення. Іонізуюче випромінювання подавалося за допомогою рентгенівського випромінювання від каліброваного опромінювача РУМ-17 (Дніпропетровськ, УРСР) з робочим струмом 10,5 мА, системою фільтрів Сu 0,5 мм; потужність дози – 63 Р/хв, час – 11 хв [78].

Тварин утримували у стандартних клітках із вільним доступом до їжі та води відповідно до «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (Україна, 2001 р.), які узгоджуються з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інші наукові цілі» (Страсбург, 1986). Дослідження виконано за погодженням з Комітетом з догляду та використання тварин ДУ «Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології імені Р. Є. Кавецького НАН України» (протокол № 4 від 16.04.2015).

2.2.7. Модель інсулінорезистентності на щурах.

Дослідження проводили на безпородних щурах-самцях з масою тіла 200 – 220 г. Тварини утримувались в віварії Інституту біохімії НАНУ. Експерименти проводили у відповідності до правил комісії з питань біоетики Інституту біохімії НАН України.

Протягом першого тижня тварини отримували стандартний гранульований корм та воду *ad libitum*. Інсулінорезистентний стан (ІР-стан) у щурів індукували довготривалим навантаженням жирною дієтою (відсоток жиру в загальному раціоні складав 58%) протягом шести місяців у комбінації з одноразовою ін'єкцією на 22-му тижні експерименту розчину стрептозотоцину із розрахунку 15 мг/кг маси тіла [79]. Відсоток жиру в раціоні тварин збільшували додаванням

до стандартного раціону суміші свинячого та яловичого вісцерального жиру, жирнокислотний аналіз яких показав, що в середньому співвідношення насичених : ненасичених жирних кислот складало 55% : 45% відповідно. Контрольна група щурів утримувалась на стандартному раціоні віварію (відсоток жиру в загальному раціоні складав 4%), де співвідношення насичених до ненасичених жирних кислот – 38% : 62% відповідно. Щомісяця фіксували масу тіла всіх тварин та визначали вміст глюкози в крові, використовуючи портативний глюкометр Optium Omega (виробництво Abbott diabetes care Ltd., Alameda, США). Через 24 тижні було проведено тест на толерантність до глюкози: тваринам всіх груп перорально вводили 1 мл 50%-го розчину глюкози та вимірювали її рівень у плазмі крові через 45, 90 та 150 хв [80]. В дослід було відібрано щурів із порушеною толерантністю до глюкози (в яких рівень глюкози через 150 хв після навантаження залишався на високому рівні (> 5 ммоль/л)).

2.3. Пацієнти

2.3.1. Відкрите, одноцентрове, проспективне, рандомізоване, контрольоване паралельне дослідження ефективності та безпеки застосування виробу медичного – композиту адсорбційного гемостатичного аплікаційного «Карбогемостат» для зупинки артеріальних кровотеч, зокрема за антитромботичної терапії.

Проведення клінічного дослідження «Відкрите, одноцентрове, проспективне, рандомізоване, контрольоване паралельне дослідження ефективності та безпеки застосування виробу медичного – композиту адсорбційного гемостатичного аплікаційного «Карбогемостат» для зупинки артеріальних кровотеч, зокрема за антитромботичної терапії.» було погоджено комісією з питань етики при Київському міському клінічному ендокринологічному центрі (протокол № 3, від 19 квітня 2021 року)

До випробувань було залучено пацієнтів, з діагнозом синдром діабетичної стопи, що проходять курс антикоагулянтної терапії та пацієнтів з таким же діагнозом, що не приймають антикоагулянти. Перед проведенням клінічних

досліджень пацієнтам в доступній формі пояснювали суть досліджень, ризику та вигоди, пов'язані з участю в клінічних дослідженнях. До клінічних досліджень долучались пацієнти лише після підписання поінформованої згоди. Клінічні дослідження були проведені без участі представників вразливих груп населення.

Для долучення суб'єктів дослідження буде використано наступні критерії:

- особи у віці від 18 до 79 років, чоловічої або жіночої статі;
- наявність ранової поверхні, що потребує зовнішнього застосування перев'язувального матеріалу з кровоспинною активністю;

- відсутність анафілактичних реакцій в анамнезі;

- підписання поінформованої згоди на участь у випробуваннях.

Для вилучення суб'єктів дослідження буде використано наступні критерії:

- гострі запальні захворювання;
- вагітність, годування груддю;
- тромбофілія в анамнезі чи лікування препаратами, що стимулюють зсідання крові;

- невиношування вагітності в анамнезі;

- показником МНВ > 1,4;

- порушення синтетичної функції печінки;

- артеріальна гіпертензія;

- хвороба Віллебранда;

- мутація генів FGB-фібриноген та/чи F2-протромбін;

- внутрішня кровотеча або менструація під час дослідження;

- недієздатність або неможливість отримати поінформовану згоду.

Для відсіювання пацієнтів буде проведено:

- вимірювання температури тіла (підвищення температури тіла вище 37,2 °С свідчить про гострий запальний процес);

- вимірювання артеріального тиску (підвищення артеріального тиску систолічного — до 140 мм. рт. ст. і вище, діастолічного — до 90 мм рт. ст. і вище свідчить про артеріальну гіпертензію);

-опитування щодо захворювань в анамнезі, загального фізіологічного стану та супутньої терапії, яку надається пацієнту;

-визначення параметрів системи зсідання крові (значні відхилення від референтних значень свідчать на користь тромбофілічної загрози чи ризику неконтрольованої кровотечі).

Пацієнти, які відповідають критеріям долучення та вилучення, були розділені на групи відповідно до того, чи проводилась їм антикоагулянтна терапія. В середині кожної групи пацієнтів розділяли на підгрупу досліджуваних та підгрупу порівняння відповідно до рандомізаційного списку, що було надано відповідальному досліднику спонсором. З групи пацієнтів, що не приймали антикоагулянти, та з групи пацієнтів, що приймали антикоагулянти, половині пацієнтів проводилась зупинка кровотечі «Карбогемостатом», а іншій половині – стандартною процедурою з використанням тиснучої пов'язки.

Кожному пацієнту було надано код пацієнта.

Загальна кількість пацієнтів, що взяла участь в дослідженні, становила 36 осіб, з них 19 не отримували антикоагулянти, а 17 – отримували антикоагулянтну терапію. В кожній групі, відповідно до рандомізаційних списків було обрано досліджувану групу пацієнтів, яким зупинка кровотечі була проведена з використанням досліджуваного виробу або з використанням тиснучої пов'язки (таблиця 2.1).

Таблиця 2.1

Розподіл пацієнтів на групи

спосіб зупинки терапія кровотечі антикоагулянтами	Тиснуча пов'язка, I група	«Карбогемостат», II група
відсутня	Підгрупа I N n = 10 пацієнтів	Підгрупа II N n = 9 пацієнтів
наявна	Підгрупа I A n = 7 пацієнтів	Підгрупа II A n = 10 пацієнтів

Вік пацієнтів становив від 50 до 80 років, в середньому складав 66 років (таблиця 2.2).

Таблиця 2.2

Вікова характеристика пацієнтів

спосіб зупинки терапія кровотечі антикоагулянтами	Тиснуча пов'язка, І група	«Карбогемостат», ІІ група
відсутня	53-77 років	55-73 роки
наявна	50-80 років	60-76 років

Пацієнти були жіночої (39%) та чоловічої (61%) статі (таблиця 2.3).

Таблиця 2.3

Розподіл жінок та чоловіків по групах пацієнтів

спосіб зупинки терапія кровотечі антикоагулянтами	Тиснуча пов'язка, І група	«Карбогемостат», ІІ група
відсутня	6 чоловіків, 4 жінок	6 чоловіків, 3 жінок
наявна	5 чоловіків, 2 жінок	5 чоловіків, 5 жінок

Всі пацієнти, що взяли участь в клінічному дослідженні, мали діагноз: синдром діабетичної стопи. Десять з них мали нейропатичну форму діабетичної стопи (за результатами рандомізації 5 потрапили до досліджуваної групи, 5 – до групи порівняння), двадцять п'ять з пацієнтів, що взяли участь у дослідженні, мали нейроішемічну форму діабетичної стопи (за результатами рандомізації 13 потрапили до досліджуваної групи, 12 – до групи порівняння), один пацієнт мав критичну ішемію нижньої кінцівки (за результатами рандомізації – потрапив до досліджуваної групи). Таким чином, групи пацієнтів були однорідними відносно анамнезу.

2.3.2. Рандомізоване, відкрите, контрольоване, паралельне, одноцентрове, проспективне клінічне дослідження безпечності та ефективності комплексу для одержання аутологічного фібринового гелю для стимуляції загоєння ран первинним натягом

Проведення клінічного дослідження «Рандомізоване, відкрите, контрольоване, паралельне, одноцентрове, проспективне клінічне дослідження безпечності та ефективності комплексу для одержання аутологічного фібринового гелю для стимуляції загоєння ран первинним натягом» було погоджено комісією з питань етики при ТОВ «Мед Сервіс Консалтинг» (протокол № 011221-1, від 01 грудня 2021 року).

До випробувань були залучені пацієнти, що страждають на гострі та хронічні форми комбінованого геморою та потребують проведення тотальної циркулярної гемороїдектомії з лоскутною анопластиком. Дослідній групі пацієнтів після накладання швів проводили аплікацію фібринового гелю, отриманого за допомогою досліджуваного комплексу, в підлоскутний простір. Контрольній групі пацієнтів комплект для одержання аутологічного фібринового гелю застосовано не було. Клінічні дослідження були проведені без участі представників вразливих груп населення.

Для долучення суб'єктів дослідження було використано такі критерії:

- особи у віці від 18 до 85 років, чоловічої та жіночої статі
- наявність гострих та хронічних форм комбінованого геморою, що потребує хірургічного втручання;
- відсутність анафілактичних реакцій в анамнезі;
- підписання поінформованої згоди на участь у випробуваннях.

Для вилучення суб'єктів дослідження буде використано наступні критерії:

- вагітність, годування груддю;
- інфікування ВІЛ та гепатитами В, С;
- мутація генів FGB-фібриноген та/чи F2-протромбін;
- важка ендокринна чи обмінна патологія, в тому числі цукровий діабет;
- лімфопроліферативні захворювання крові;

- суттєві відхилення від показників коагулограми;
- недієздатність або неможливість отримати поінформовану згоду.

Для відсіювання пацієнтів було проведено:

- загальний аналіз крові, загальний аналіз сечі, коагулограму, біохімічний аналіз крові, експрес тест на інфекції (ВІЛ, гепатити В, С);
- опитування щодо захворювань в анамнезі, загального фізіологічного стану та супутньої терапії, яка надається пацієнту.

Пацієнти, які відповідають критеріям долучення та вилучення, були рандомізовані. Кожному пацієнту було надано код пацієнта.

Загальна кількість пацієнтів, які взяли участь в дослідженні, становила 30 осіб. Відповідно до рандомізаційних списків, було обрано досліджувану групу пацієнтів, яким лоскутну анопластику проводили з використанням досліджуваного виробу, та пацієнтів, які увійшли в групу порівняння, яким лоскутну анопластику проводили без використання досліджуваного виробу (таблиця 2.4). Вік пацієнтів становив від 21 до 72 років, в середньому складав 40,5 років (таблиця 2.4). Пацієнти були жіночої (37%) та чоловічої (63%) статі (таблиця 2.4).

Всі пацієнти, що взяли участь в клінічному дослідженні мали діагноз: хронічний геморой 2, 3 та 4 ступеня по 4-ступ. класифікації (таблиця 2.4). Пацієнти, як в дослідній групі так і в групі порівняння, мали такі ускладнення: аноректальний тромбоз (у двох та трьох пацієнтів відповідно); ректоцеле (у 3 та 1 пацієнта відповідно); хронічна анальна тріщина (у 6 та 4 пацієнтів відповідно). Таким чином, групи пацієнтів були однорідними відносно анамнезу.

Характеристика пацієнтів

Параметри пацієнтів		Групи	Досліджувана група	Група порівняння
Використання комплекту для одержання аутологічного фібринового гелю			ТАК	НІ
Кількість			15 пацієнтів	15 пацієнтів
Вік	Мінімальний та максимальний		22-72 років	21-59 років
	В середньому		39 років	42 роки
Стать	Жіноча		7 пацієнтів	4 пацієнти
	Чоловіча		8 пацієнтів	11 пацієнтів
Діагноз	хронічний геморої 2 ступеню		4 пацієнти	1 пацієнт
	хронічний геморої 3 ступеню		8 пацієнтів	9 пацієнтів
	хронічний геморої 4 ступеню		3 пацієнти	5 пацієнтів
Тип анопластики	2-лоскутна анопластика		2 пацієнти	2 пацієнти
	3-лоскутна анопластика		7 пацієнтів	11 пацієнтів
	4-лоскутна анопластика		1 пацієнт	-
	Гемородіктомія по Фергюсону		5 пацієнтів	2 пацієнти

2.3.3. Характеристика пацієнтів для розробки методу визначення претромбіну-1 в плазмі крові

Досліджено плазму крові 72 пацієнтів з різними патологіями, що супроводжуються порушеннями зсідання крові: аневризми черевної аорти, ендопротезування кульшового суглоба після перелому та інсульту. Для узагальненої групи пацієнтів із ендопротезування кульшового суглоба після перелому та аневризми аорти рівні розчинний фібрин та D-димеру в плазмі крові коливалися від 2 до 83 мкг/мл та 0,16 до 0,9 мкг/мл відповідно; для пацієнтів з інсультом рівень розчинний фібрин досягав 7-10 мкг/мл, а D-димер коливався від 0,05 до 0,150 мкг/мл. Активність протеїну С у плазмі крові всіх пацієнтів коливалася від 110 до 60 %. Для подальших досліджень було відібрано 12 пацієнтів з накопиченням розчинного фібрину вище 30 мкг/мл. У більшості з них була також знижена активність протеїну С. Контрольні зразки плазми отримували з крові здорових донорів (n = 20). Волонтери перед забором крові підписували інформовану згоду згідно з Гельсінською декларацією. Це дослідження було схвалено Комітетом з етики Інституту біохімії ім О.В. Палладіна НАН України (Протокол №6, від 23 серпня 2015 р.).

2.3.4. Пацієнти, що перенесли коронавірусну хворобу (COVID-19)

Пацієнти, що перенесли COVID-19 (58 чоловіків і 133 жінки) підписали форму інформованої згоди та взяли участь у дослідженні. На момент забору крові пацієнти одужали від захворювання на COVID і були серопозитивними та ПЛР-негативними.

Лабораторне підтвердження інфекції SARS-CoV-2 проведено в КП «Монастирська міська лікарня»; Комунальне некомерційне підприємство «Гусятинська комунальна районна лікарня»; Комунальне некомерційне підприємство «Шумська міська лікарня»; Комунальне некомерційне підприємство «Тернопільська комунальна міська лікарня №2». До аналізу були включені лише лабораторно підтверджені випадки.

Пацієнти, що перенесли COVID-19, були обстежені за шкалою часу відновлення 1-30; 31-60 днів і більше двох місяців. Пацієнти були розподілені на

групи з низьким ризиком ускладнень (ГНР) $n = 28$; та група високого ризику ускладнень (ГВР) $n = 163$. Пацієнти з ГВР мали принаймні один із перерахованих факторів ризику (рис. 2.3): вік старше 65 років ($n = 38$), ожиріння з ІМТ > 25 ($n = 132$), цукровий діабет ($n = 19$), серцево-судинні захворювання ($n = 83$), включаючи тромбоз глибоких вен, варикозне розширення вен, атеросклероз, серцеву недостатність, аритмію, вроджені вади серця, ішемічну хворобу серця, кардіоміопатію, розсіяний склероз, стенокардію), захворювання органів дихання ($n = 18$), включаючи хронічний бронхіт, бронхіальну астму, дифузний пневмофіброз, хронічне обструктивне захворювання легень), ревматоїдний артрит ($n = 11$) та високий артеріальний тиск ($n = 81$).

У ГВР параметри коагуляції порівнювали окремо на різних стадіях захворювання COVID за класифікацією ВООЗ [81]: легка, середня, важка та критична. Здорові добровольці, серонегативна контрольна група (референтна група, $n = 19$) були використані як контрольна група



Рис 2.3. Схема поділу пацієнтів, що перенесли COVID-19 на групи.

2.3.5. Пацієнти з дисфункцією плаценти

У дослідження були залучені жінки 18–42 років зі плацентарною дисфункцією впродовж спонтанної вагітності, які не отримували специфічної антитромботичної терапії ($n = 70$; 12.2021-03.2023). Плазма крові вагітних була надана КНП «Перинатальний центр м. Києва». Дане дослідження схвалено Етичною комісією Київського перинатального центру (протокол № 3 від 05.05.2020).

Критерії включення: вік пацієнок 18–40 років, одноплідна вагітність, що виникла природним шляхом, без важких ускладнень вагітності та важкої екстрагенітальної патології. Критерії виключення: вік до 18 і більше 40 років, багатоплідна вагітність, вагітність внаслідок ЕКЗ, прийом антиагрегантів під час вагітності, важка екстрагенітальна патологія, хромосомна патологія та вади розвитку плода.

Усі жінки надали усну та письмову інформовану згоду на включення їх у дослідження.

2.3.6. Пацієнти з вагітністю, ускладненою ожирінням

У дослідження були залучені жінки впродовж спонтанної вагітності, які не отримували специфічної антитромботичної терапії ($n = 69$; 12.2018-03.2022). Індекс маси жінок до вагітності становив від 21 до 42. Плазма крові вагітних була надано відділом аушерства та гінекології Університету міста Сегед (Угорщина). Дане дослідження схвалено Етичною комісією університету міста Сегед (Угорщина) (протокол № 3 від 01.02.2014).

Критерії виключення: вік менше 18 або більше 40 років, багатоплідна вагітність, вагітність внаслідок ЕКЗ, прийом антиагрегантних препаратів під час вагітності, важка екстрагенітальна патологія, хромосомна патологія та вроджені вади розвитку плода.

Усі жінки надали усну та письмову інформовану згоду на участь у дослідженні.

2.3.7. Пацієнти з ішемічною хворобою серця (ІХС)

У дослідженні взяли участь 67 пацієнтів віком до 70 років з діагнозом великовогнищева та трансмуральна ішемічна хвороба серця (ІХС) без ознак кардіогенного шоку. Пацієнти проходили лікування у Національному Науковому центрі "Інститут кардіології ім. М.Д. Стражеска МАН України", Київ.

2.3.8. Пацієнти з аневризмою черевної аорти (АЧА)

Зразки плазми крові 23 пацієнтів з АЧА (всі чоловіки, віком у середньому 62 роки) були надані ДУ «Національний інститут хірургії та трансплантології імені Шалімова НАМН України». У двох хворих відзначено супраренальну локалізацію аневризми, у двох юкстаренальну, у двох розрив аневризми, у 17 інфраренальну. Під час операції всім хворим проводили інфузію розчину гепарину в дозі 0,5 – 1 мл (2500 – 5000 МО); після операції призначали клексан у дозі 0,2 – 0,4 мл протягом п'яти діб. Для попередження післяопераційної кровотечі використовували амінокапронову кислоту та антифібринолітичні препарати.

2.3.9. Пацієнти з системним червоним вовчаком (СЧВ)

Зразки плазми крові пацієнтів (n = 190) з діагнозом СЧВ, віком від 15 до 76 років були надані Вінницькою обласною клінічною лікарнею ім. М.І. Пирогова. Діагноз СЧВ встановлювали на основі критеріїв ACR (1997) і формулювали згідно класифікації, рекомендованої Асоціацією ревматологів України (2002). Активність СЧВ оцінювали за індексом SLEDAI [82].

Для визначення індексом ушкодження ендотелію судин використовували ехолокацію високої роздільної здатності та доплерографію плечової артерії, яку виконували як описано Selertmajer та співавторами [83]. Ендотелійзалежну вазодилатацію оцінювали за зміною діаметру плечової артерії, який вимірювали до та після тимчасової оклюзії судини манжеткою тонометру (реактивна гіперемія). Локація плечової артерії асоціювалась з візуалізацією її внутрішнього діаметру та здійснювалась в середній третині плеча. Запис ехограм в В-режимі ехолокації та спектру потоків крові в режимі імпульсного доплеровського сканування виконували на ультразвуковому сканері "Sonoline 6000 C"

(Medisson, Південна Корея) на 30, 60 та 90 секунди після декомпресії манжетки манометру. Критерієм адекватної ендотеліальної відповіді на ішемію вважали дилатацію плечової артерії більше 8% від вихідного діаметру судини через 30 секунд після декомпресії. Всі вимірювання ендотеліальної релаксації виконували з 8 до 10 години ранку.

2.3.10. Пацієнти з операцією з приводу ендопротезування кульшового суглобу

Оперативне втручання з ендопротезування кульшового суглоба виконували під субдуральною анестезією бупівакаїном. Фармакологічну тромбопрофілактику проводили з використанням низькомолекулярного гепарину. Перше введення антикоагулянтів проводили за 12 годин до операції, друге – через 10-12 годин після. Антикоагулянти призначали протягом 10-14 днів до виписки зі стаціонару. Зразки плазми крові відбирали до операції, на 1 добу після операції. Забір крові проводили перед призначенням антикоагулянтів з метою мінімізації впливу на результати проведених аналізів. Це дослідження схвалено Етичним комітетом Національного медичного меморіалу імені Пирогова університету (Протокол № 14, 23.05.2015).

2.3.11. Пацієнти з морбідним ожирінням

Всього в дослідження було включено 24 пацієнта з патологічним ожирінням. Хворі перебували на лікуванні в ДУ «Національний інститут хірургії та трансплантології імені Шалімова НАМН України», м. Київ. Середній вік хворих 46 ± 4 років. Обстежена група складалася з 19 жінок і 5 чоловіків. Середній індекс маси тіла (ІМТ) був ≥ 35 . 12 пацієнтів були курцями. У 19 хворих виникла артеріальна гіпертензія, у 26 хворих цукровий діабет 2 типу, у 8 – прояви тромбозу.

2.3.12. Пацієнти з опіковою травмою

Всього в дослідження було включено п'ять пацієнтів віком 25-66 років з опіковою травмою II-III ступеню, площею опіку 2-20%. Хворі перебували на лікуванні в КНП "Київська міська клінічна лікарня №2".

2.4 Методи

2.4.1 Забір крові

Цитратну плазму крові донорів або піддослідних тварин отримували згідно [84]. Кров донорів брали з вени гострою сухою голкою з великим діаметром, без шприца (для запобігання гемолізу). При заборі крові перші 5–6 крапель відкидали. У поліетиленову пробірку дозатором вносили 3,8% розчин цитрату натрію та змішували з кров'ю у співвідношення 1:9. Пробірку з сумішшю щільно закривали і повільними рухами обережно декілька разів перемішували. Кров дослідних тварин забирали пункцією серця.

2.4.2. Отримання плазми крові

Осадження формених елементів крові проводили центрифугуванням протягом 10 хв при 1200-1400 g. Плазму крові (супернатант) переносили у поліетиленову пробірку. Зберігали плазму крові при температурі -20 °С [84].

2.4.3. Отримання збагаченої тромбоцитами плазми крові людини

Збагачену тромбоцитами плазму крові людини (ЗТПК) одержували із цільної крові, яка містила 3,8%-ий цитрат натрію у співвідношенні 9:1, центрифугуванням за 160 g впродовж 20 хв при температурі 20 °С [84]. Під час центрифугування пробірки не закривали, щоб не обмежувати доступ кисню до тромбоцитів.

2.4.4. Визначення концентрації протеїнів.

Концентрацію протеїнів у розчинах визначали спектрофотометрично, вимірюючи оптичне поглинання в області 280 нм і віднімаючи значення поглинання за 320 нм. Для розрахунку концентрації використовували наступні значення коефіцієнтів молярної екстинкції: фібриногену – 1,506 мл·о.о.·мг⁻¹ (рН 7,5) [85]; протромбіну – 1,40 мл·о.о.·мг⁻¹; претромбіну 1 – 1,78 мл·о.о.·мг⁻¹ [86]; екамуліну – 1,03 мл·о.о.·мг⁻¹ [87].

2.4.5. Електрофорез протеїнів у ПААГ.

Електрофорез у поліакриламідному гелі (ПААГ) в присутності SDS проводили за методом Лемлі [88], в якому використовували трис-гліцинову

систему на приладі для вертикального гель-електрофорезу у пластинках 10% ПААГ.

Зразки для електрофорезу готували наступним чином: до розчину протеїну з концентрацією 1 мг/мл додавали буфер для зразків, що містив 5% сахарозу або гліцерин, 2% SDS та бромфенол до появи забарвлення. Зразки нагрівали до кипіння. Для відновлення дисульфідних зв'язків зразки попередньо обробляли 5% β -меркаптоетанолом протягом 10 хв.

Розділення проводили при електричному струмі 19 мА для концентруючого гелю і 36 мА для розподільного.

Проявлення гелю для виявлення ділянок, що містять протеїни, проводили забарвленням у фарбуючому розчині (0,125% Кумасі G-250 в 25% ізопропанолі та 10% оцтової кислоти) протягом 10 хвилин. Для видалення залишків барвника використовували 2–8% розчин оцтової кислоти.

Роздільна здатність методу 1 мкг протеїну.

Для встановлення молекулярної маси протеїнів використовували суміш протеїнів з відомими молекулярними масами (Fermentas, Європейський союз): № SM0671 (170; 130; 100; 72; 55; 40; 33; 24; 17 kDa) та № SM0431 (116; 66,2; 45; 35; 25; 18,4; 14,4 kDa)

Для якісної та кількісної оцінки протеїнового складу зразків проводили денситометрію ПААГ з використанням пакету TotalLab v2.01.

2.4.6. Визначення амідолітичної активності ензимів.

Амідолітичну активність ензимів (активність по відношенню до трипептидних субстратів) визначали, використовуючи хромогенні субстрати [89] тромбіну (S2238), активованого протеїну С (S2366), фактору Ха зсідання крові (S2765), екамуліну (S2302) в 0,05 М трис-НСІ буфері, рН 7,4 з 0,13 М NaCl при температурі 37°C. Для цього в лунку планшета для культури клітин вносили 25 мкл 2 мМ хромогенного субстрату, 10 мкл 0,025 М CaCl₂, досліджуваний ензим з розрахунку 1 мкг на лунку та 0,05 М трис-НСІ буфер, рН 7,4 з 0,13 М NaCl (загальний об'єм інкубаційного середовища – 250 мкл).

Швидкість вивільнення *p*-нітроаніліну (pNA) під дією ензиму визначали спектрофотометрично, вимірюючи оптичне поглинання в області 405 нм і віднімаючи значення поглинання за 492 нм. Для розрахунку концентрації pNA використовували коефіцієнт молярної екстинкції: $\epsilon=1,06 \cdot 10^{-4} \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [89].

2.4.7. Визначення інгібіторної дії низькомолекулярних сполук на тромбін за допомогою хромогенного субстрату

Для визначення інгібіторної дії низькомолекулярних сполук на тромбін в лунку планшета для культури клітин вносили 25 мкл 2 мМ хромогенного субстрату S2238 (H-D-Phe-Pip-Arg-pNA), 10 мкл 0,025 М CaCl₂, 8 мкл тромбіну 10 NIH/мл, 2 мкл інгібітора та 0,05 М трис-НСІ буфер, рН 7,4 з 0,13 М NaCl (загальний об'єм інкубаційного середовища – 250 мкл). Низькомолекулярні сполуки, що досліджуються, додавали у концентрації 80 мкг/мл. Попередньо робили стоковий розчин інгібіторів в DMSO – 10 мг/мл. У контрольну пробу додавали відповідний об'єм DMSO (2 мкл).

Реакційну суміш інкубували в термостаті при температурі 37 °С протягом 10 хв. Кількість розщепленого субстрату визначали спектрофотометрично при 405-492 нм на мікропланшетному спектрофотометрі Multiskan EX Thermo.

2.4.8. Вивчення кінетики інгібування тромбіну.

Для визначення природи інгібування тромбіну проводили визначення амідолітичної активності тромбіну як описано в п. 2.2.5. з такими змінами хромогенний субстрат використовували в кінцевій конентрації 3,570 та 0,357 мМ для визначення початкової швидкості реакції за присутності інгібітора в кінцевій концентрації 80 мкг/мл (160 мкМ), а потім за таких же умов визначали початкову швидкості реакції за присутності інгібітора в кінцевій концентрації 40 мкг/мл (80 мкМ). Контроль без додавання інгібітора з використанням хромогенного субстрату в кінцевій конентрації 3,570 та 0,357 мМ вважали як дослід з нульовою концентрацією інгібітора. Початкову швидкість реакції визначали як зростання екстинції продукта реакції (*p*-нітроаніліну) на лінійному проміжку кінетичної кривої від початку реакції і виражали в о.о./хв.

За результатами будували серію з трьох лінійних графіків для різних концентрацій інгібітора (0; 40; 80 мкг/мл) в обернених координатах залежності початкової швидкості реакції від початкової концентрації субстрату [90]:

Перетин трьох лінійних графіків на осі ординат свідчила про конкурентне інгібування, а перетин їх на осі абсцис – про неконкурентне інгібування.

2.4.9. Визначення інгібіторної дії низькомолекулярних сполук на фактор Ха зсідання крові за допомогою хромогенного субстрату

Визначення інгібіторної дії низькомолекулярних сполук на фактор Ха проводили у 0,05 М трис HCl буфері рН 7,45, який містив 0,15 М NaCl, та $1 \cdot 10^{-3}$ М CaCl₂. Кінцева концентрація субстрату S2765 (Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA 2HCl) становила 0,16 мМ, 40 мкл референтної плазми крові та активатор фактора X з отрути гадюки Russelli (RVV) – 0,02 мг. Низькомолекулярні сполуки, що досліджуються, додавали у концентрації 80 мкг/мл. Попередньо робили стоковий розчин інгібіторів в DMSO – 10 мг/мл. У контрольну пробу додавали відповідний об'єм DMSO (2 мкл)

Аналіз проводили у комірках мікропланшетів, загальний об'єм реакційної суміші становив 250 мкл. Реакційну суміш інкубували в термостаті при температурі 37 °С протягом 5 – 20 хв. Кількість розщепленого субстрату визначали спектрофотометрично при 405-492 нм на мікропланшетному спектрофотометрі Multiskan EX Thermo.

2.4.10. Дослідження процесу агрегації тромбоцитів

Агрегацію тромбоцитів вивчали в збагаченій тромбоцитами плазмі крові (ЗТПК) (200-300 тис. тромбоцитів/мкл). Перед дослідженням проводили скринінгову оцінку агрегації тромбоцитів донорів, і при виявленні гіпоагрегації ЗТПК не використовували. Агрегатометрію виконували в перші три години після забору крові на фотооптичному агрегометрі “SOLAR AP2110” за методом Born [91, 92].

В кювету для агрегометра вносили 430 мкл ЗТПК і 20 мкл 0,025 М CaCl₂ та інкубували *ex tempore* 5 хв при температурі 37 °С. Агрегацію тромбоцитів ініціювали внесенням одного з індукторів агрегації тромбоцитів: ADP (у

концентрації 12,5 та 10 мкМ). Процес агрегації реєстрували протягом 10 хв в режимі роботи без нормування результатів вимірів за початковим рівнем світлопропускання.

Аналіз даних агрегатометрії виконували за допомогою пакету Солар 2.01. Оцінювали ступінь агрегації – максимальний рівень світлопропускання ЗТПК після внесення індуктора агрегації; швидкість агрегації – швидкість зміни світлопропускання ЗТПК після внесення індуктора агрегації за перші 30 с; час агрегації – час досягнення максимального ступеню агрегації.

2.4.11. Дослідження процесу активації тромбоцитів

Активацію тромбоцитів вивчали методом цитометрії на протоковому цитофлуориметрі COULTER EPICS XL Flow Cytometer, який є системою для якісного і кількісного визначення біологічних та фізичних властивостей клітин. В ході експерименту реєстрували два типи світлорозсіювання: пряме, яке характеризує розмір клітин, та бічне, яке характеризує щільність цитоплазми клітини, тобто, гранулярність тромбоцитів [92, 93].

В пробірку для протокового цитофлуориметра вносили 1 мл відмитих тромбоцитів і 3 мкл 0,5 М CaCl_2 . Активацію тромбоцитів ініціювали внесенням 0,5 мл розчину одного з похідних протромбіну в 0,05 М трис-НСІ буфері, рН 7,4 з 0,13 М NaCl. Тромбоцити з активатором інкубували при температурі 25°C впродовж 5, 10, 20, 30, 60, 90, 120 хв. Параметри активації тромбоцитів (зміну розміру та гранулярності тромбоцитів) фіксували за зміною прямого та бічного світлорозсіювання.

2.4.12. Модифікація біоматеріалів

Біоматеріали модифікували розчином екамуліну в 0,05 М Трис-НСІ буфері, рН 7,4 з 0,13 М NaCl. Екамулін додавали до біоматеріалу в кількості 30 мкг на 1 мг біоматеріалу. Зв'язування екамуліну з біоматеріалами було нековалентним і забезпечувалося сорбційними властивостями біоматеріалів.

2.4.13. Вимивання екамуліну з модифікованих біоматеріалів.

15 мг модифікованого біоматеріалу поміщали в 400 мкл фізіологічного розчину та інкубували 30 хв при температурі 23°C. Біоматеріал осаджували

центрифугуванням при 1500 g протягом 20 хв. Супернатант відбирали для визначення амідолітичної активності. У кювету мікропланшетного спектрофотометра додавали 225 мкл супернатанту та 25 мкл хромогенного субстрату S2302. Розщеплення субстрату з утворенням *n*-нітроаніліну реєстрували спектрофотометрично при довжині хвилі 405 нм. У разі вимивання екамуліну з модифікованих біоматеріалів фізіологічним розчином він розщеплював хромогенний субстрат, на що вказувало посилення екстинкції.

2.4.14. Вимивання екамуліну із згустку.

15 мг модифікованого біоматеріалу поміщали в 400 мкл плазми крові та 10 мкл 0,025 М CaCl₂ та інкубували 30 хв при температурі 23 °С. Під час інкубації утворюється фібриновий згусток. Згусток з біоматеріалом осаджували центрифугуванням при 1500 g протягом 10 хв. Відбирали супернатант та інкубували згусток з 400 мкл фізіологічного розчину протягом 30 хв. Згусток з біоматеріалом осаджували центрифугуванням при 1500 g протягом 20 хв. Супернатант відбирали для визначення амідолітичної активності як описано в п. 2.2.2.

2.4.15. Визначення рівня протромбіну в екамуліновому тесті за рівнем розщеплення хромогенного субстрату.

Для визначення активації протромбіну плазми крові екамуліном за розщепленням хромогенного субстрату 10 мкл плазми крові донорів вносили в інкубаційне середовище загальним об'ємом 250 мкл. Інкубаційне середовище містило 10 мкл 0,025 М CaCl₂, 25 мкл 2 мМ хромогенного субстрату S2238, 10 мкл екамуліну, 195 мкл 0,05 М трис-НСl буферу, рН 7,4 з 0,13 М NaCl. Інкубацію проводили при температурі 37°C впродовж 10 хв. Кількість розщепленого субстрату визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 405 нм на мікропланшетному спектрофотометрі Thermo Multiskan EX [74].

Результати представляли як екамуліновий індекс - EI (формула 2.1)

$$EI = \frac{A_n}{A_p}, \quad (2.1)$$

де EI – екамуліновий індекс;

A_n – активність тромбіну в плазмі крові здорового донора в екамуліновому тесті;

A_p – активність тромбіну в плазмі крові пацієнта в екамуліновому тесті.

2.4.16. Визначення рівня протромбіну в тромбoplastиновому тесті за рівнем розщеплення хромогенного субстрату.

Для визначення активації протромбіну плазми крові тромбoplastином за розщепленням хромогенного субстрату 10 мкл плазми крові донорів вносили в інкубаційне середовище загальним об'ємом 250 мкл. Інкубаційне середовище містило 25 мкл 2 мМ хромогенного субстрату S2238, 20 мкл тромбoplastину, 195 мкл 0,05 М трис-НСl буферу, рН 7,4 з 0,13 М NaCl. Інкубацію проводили при температурі 37°C впродовж 5 хв. Кількість розщепленого субстрату визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 405 нм на мікропланшетному спектрофотометрі Thermo Multiskan EX [74].

Результати представляли як протромбіновий індекс - PI (формула 2.2)

$$PI = \frac{A_n}{A_p}, \quad (2.2)$$

де PI – протромбіновий індекс;

A_n – активність тромбіну в плазмі крові здорового донора в тромбoplastиновому тесті;

A_p – активність тромбіну в плазмі крові пацієнта в тромбoplastиновому тесті.

2.4.17. Утворення тромбіну, індуковане реагентом АЧТЧ

Утворення тромбіну, індуковане реагентом АЧТЧ [94], також вимірювали за допомогою аналізу з використанням хромогенного субстрату [89] з використанням тромбін-специфічного S2238. Така модифікація АЧТЧ-тесту дозволила уникнути впливу інгібіторів зсідання фібрину на результати тесту та

визначити утворення тромбіну безпосередньо замість оцінки часу зсідання фібрину.

Результати були представлені як коефіцієнт АЧТЧ, розрахований за формулою 2.3

$$\text{коефіцієнт АЧТЧ} = \frac{\text{АЧТЧ}_p}{\text{АЧТЧ}_n} \times 100\% \quad (2.3)$$

де АРТТр – активність тромбіну плазми крові хворого;

АЧТН - активність тромбіну плазми крові донора.

АЧТЧ-тест також проводили з додаванням екзогенного протромбіну. Коефіцієнт АЧТЧ у присутності екзогенного протромбіну розраховували за наведеною вище формулою.

2.4.18. Визначення вмісту розчинних фібрин-мономерних комплексів.

Для визначення вмісту розчинних фібрин-мономерних комплексів (РФМК) [95] у конічну пробірку з 0,25 мл цитратної плазми, що досліджується, вносили 0,25 мл 0,1 М KH_2PO_4 - NaOH буферу, рН 7,5 із 0,065 М хлоридом натрію, 0,2% ϵ -амінокапроною кислотою, 0,1% цитратом натрію і перемішували. Після цього додавали 0,4 мл 1 М KH_2PO_4 - NaOH буферу, рН 7,5, перемішували і витримували 30 хв при температурі 22°C.

Результати оцінювали візуально. Для кількісної оцінки використовували наступну шкалу наведену в таблиці 2.6.

Таблиці 2.6

Кількісна оцінка результатів тесту РФМК

Візуальна оцінка	Оцінка	Рівень РФМК, мкг/мл
відсутність видимого помутніння	–	0
чітке помутніння	+	35
нитки	++	70
пластівці	+++	90
гелеподібний осад	++++	150

2.2.19. Імуноензимний аналіз (ELISA)

В роботі використані методи непрямого твердофазного та бісайтового імуноензимного аналізу, які проводили за стандартними протоколами [96].

2.2.19.1. Непрямий твердофазний імуноензимний аналіз

Антиген до лунок планшета вносили у концентрації 5-10 мкг/мл у 0,02 М карбонатному буфері рН 9,5 або в 0,05М Трис-НСІ буфері, рН 7,4 чи в 0,01М фосфатному буфері, рН 7,4 в об'ємі 110 мкл на одну лунку та інкубували протягом ночі при 4° С (далі всі розчини послідовно інкубували у лунках планшета протягом 1 год при 37° С). Потім лунки 6 разів промивали 0,01 М КН₂РO₄ буфером рН 7,2 з 0,14 М NaCl та 0,05% твін-20 (ТФБ) та вносили по 110 мкл ТФБ, інкубували 30 хв при кімнатній температурі. Після інкубації вносили сироватку миші або надосадову культуральну рідину, на якій вирощували гібридоми, у відповідному розведенні в ТФБ та інкубували протягом 1 год при 37° С. Далі лунки промивали та додавали до них антитіла проти імуноглобулінів миші, кон'юговані з пероксидазою хрому в ТФБ у розведенні 1:3000.

Для детекції вносили в лунки по 100 мкл субстрату (0,1 мг/мл тетраметилбензидин). Для приготування субстрату 1 мг тетраметилбензидин розчиняли в 1 мл диметилсульфоксиді, а потім безпосередньо перед використанням розводили в 0,05М фосфатно-цитратному буфері, рН 5,0 у співвідношенні 1:9 та додавали 2мкл 30% перекису водню

Планшет інкубували при температурі (18-25)°С в темному місці протягом 15 хв, а потім вносили в лунки по 100 мкл стоп-реагенту (2н Н₂SO₄) для зупинки кольорової реакції (в тій же послідовності внесення, що і субстрат).

Не більше ніж через 5 хвилин після зупинення кольорової реакції вимірювали оптичну густину в лунках у двохвильовому режимі (450 нм відносно 630 нм) на мікроспектрофотометрі RT- 2100.

2.2.19.2. Бісайтовий імуноензимний аналіз

МонАТ до протеїну С (пС) в концентрації 10 мкг/мл у PBS додавали до лунок планшета (Nunc, Maxisorb) в об'ємі 110 мкл. Інкубували планшет протягом

ночі при 4° С, потім промивали лунки планшету 0,01 М КН₂РО₄ буфером рН 7,2 з 0,14 М NaCl та 0,05% твін-20 (ТФБ), 5 разів і залишали з ТФБ на 30 хвилин при кімнатній температурі, струшували буфер і до лунок додавали по 100 мкл розчину пС в різних концентраціях (або досліджуваного зразку плазми крові). Планшет інкубували протягом 1 год при 37° С, промивали ТФБ, додавали біотинильовані монАТ до пС (“tag”-антитіла). Планшет інкубували протягом 1 год при 37° С, промивали ТФБ і додавали кон’югат стрептавідин-пероксидази (у розведенні 1:6000), інкубували 30 хвилин при 37° С, промивали і додавали субстратну суміш, як описано вище. Детекцію проводили таким шляхом, як описано в п.п. 2.2.23.1.

2.2.20. Визначення концентрації розчинного фібрину

Визначення концентрації розчинного фібрину проводили методом сендвіч ELISA як описано в п.п. 2.4.19.2

В якості catch антитіл використовували моноклональні антитілами специфічними до фібрину desAB (I-3C). В лунки першого і другого ряду крім першої лунки А1, А2 вносили по 100 мкл 0,01 М КН₂РО₄ буфером рН 7,2 з 0,14 М NaCl та 0,05% твін-20 з 5% знежиреним молоком та 4,3% цитратом натрію (ТФБ+молоко).

Безпосередньо перед використанням ліофілізований калібратор (фібрин desAB) розчиняли в 200 мкл 0,15% оцтової кислоти і акуратно перемішували до повного розчинення; після додавали 1800 мкл ТФБ+молоко. Робоче розведення калібратора розчинного фібрину становило 6,4 мкг/мл.

Розчин калібратора вносили в об’ємі 100 мкл в лунки А1, В1 і А2, В2. Потім титрували його 2-х кратно, послідовно переносячи по 100 мкл з лунки В1 в лунку С1, з лунки С1 в лунку D1 і т.д. в першому ряду, а також з лунки В2 в лунку С2, з лунки С2 в лунку D2 і т.д. у другому ряду до передостанніх лунок G1 і G2, в яких залишали по 100 мкл розчину калібратора, а по 100 мкл видаляли. У калібрувальних рядах останні лунки Н1 і Н2 залишали заповненими буфером (нульова точка калібрування).

В лунки (крім двох калібрувальних рядів), заповнені 90 мкл ТФБ+молоко,

вносили по 10 мкл досліджуваних зразків плазми крові. Кожен досліджуваний зразок вносився в двох повторах.

В якості tag-антитіл використовували біотинільовані моноклональні антитіла II-4d.

Для отримання кількісного результату в мкг/мл будували калібровану криву, визнали концентрацію розчинного фібрину для кожного досліджуваного зразка, згідно з отриманим значенням оптичного поглинання і розраховували вихідну концентрацію за формулою

$$Z = K \times 10, \text{ де}$$

Z – концентрація розчинного фібрину в досліджуваному зразку плазми крові,

K – концентрація розчинного фібрину, що відповідає оптичному поглинанню досліджуваної проби

2.4.21. Визначення активності протеїну С.

Рівень активності протеїну С в плазмі крові визначали активуючи протеїн С плазми крові активатором протеїну С з отрути щитомордника звичайного (*Agkistrodon halys halys*) [97]. Для цього 30 мкл плазми крові, 100 мкл активатору протеїну С, 35 мкл 2 мМ хромогенного субстрату S2236 та 85 мкл 0,05 М трис-НСІ буферу, рН 7,4 з 0,13 М NaCl інкубували впродовж 15 хв при температурі 37°C. Кількість розщепленого хромогенного субстрату визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 405 нм на мікропланшетному спектрофотометрі Thermo Multiskan EX.

2.4.22. Вестерн-блот

Вестерн-блот використовували для прямої ідентифікації похідних протромбіну в плазмі крові. Електрофоретично розділені протеїни плазми крові далі переносили на PVDF-мембрану для визначення смуг методом імунозондування [98]. Місця зв'язування блокували 5% знежиреним молоком у PBS протягом години, після інкубували з кролячими поліклональними антипротромбіновими антитілами ще протягом години, а потім з вторинним кон'югованим з пероксидазою хрому козячим антикролячим антитілом. Смуги

візуалізували за допомогою 0,001 М розчину 4-хлор-1-нафтолу в 0,5 М Трис рН 7,5 і 0,03% H₂O₂.

2.4.23. Очистка протеїну С

Протеїн С людини отримували в два етапи. На першому етапі одержували концентрат вітамін К-залежних протеїнів. Для цього 15 г фракції IV-1 суспендували у фізіологічному розчині за присутності 1мМ бензамідину, додавали (NH₄)₂SO₄ до 40% насичення та інкубували 12 год при 4°C. Суспензію центрифугували протягом 40 хв. за 6000 г. центрифугою Ependorf, Німеччина. До супернатанту додавали (NH₄)₂SO₄ до 70% насичення, інкубували протягом 1 год при 4°C і потім центрифугували 40 хв. за 6000 г. Осад розчиняли в 0,02 М трис-фосфатному буфері рН 6,0, з вмістом 2 мМ бензамідину та центрифугували суспензію протягом 40 хв за 6000 г. Супернатант знесолювали на G-25. Одержану суміш протеїнів використовували для одержання протеїну С.

Для одержання протеїну С (вміст протеїну в крові складає 3–5 мг/л) нами було використано активовану BrCN-сефарозу з іммобілізованими на ній моноклональними антитілами 7D7B10 до протеїну С (колонка 1x10 см). Сорбент врівноважували 0,05 М трис-НСl буфером рН 7,4, що містив 0,15 М NaCl, 1 мМ ЕДТА, наносили плазму крові (150 мл), яку попередньо було діалізовано проти того самого буферу. Швидкість нанесення матеріалу та швидкість елюції складала 0,65 мл/хв. Елюцію протеїну С здійснювали 0,05 М трис-НСl буфером рН 7,4, що містив 0,15 М NaCl та 10 мМ CaCl₂. Гомогенність одержаного протеїну перевіряли методом електрофорезу.

2.4.24. Одержання гібридоми до протеїну С

Гібридома була одержані за методом, описаним Kochler G., Milstein S., з модифікаціями [99] та з врахуванням стандартного протоколу EuroMAbnet [100].

У дослідах використовували мишей ліній Balb/c. Це були миші 3-місячного віку та жіночої статі. Тварини отримували стандартну дієту у вигляді гранульованого корму з періодичним додаванням вітамінних та протеїнових концентратів. Роботи з тваринами регламентувались правилами проведення експериментальних робіт з піддослідними тваринами, які було затверджено

біоетичною комісією Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України (30.09.2019 р., №9).

2.4.24.1 Імунізація мишей

Мишам лінії BALB/c вводили в черевну порожнину по 50 мкг пС людини в 0,05М Трис-НСІ буфері з 0,13 М NaCl, рН 7,4 перший раз з повним, а через три тижні з неповним ад'ювантом Фрейнда. Через 14 днів після другої імунізації визначали наявність специфічних антитіл до пС в сироватці крові імунізованих мишей за допомогою методу ELISA. Якщо титр антитіл становив 1:1000 та більше, проводили реімунізацію: через 4-6 тижнів після останньої ін'єкції та за чотири дні до проведення гібридизації мишам вводили по 50 мкг пС в 0,05 М Трис-НСІ буфері з 0,13 М NaCl, рН 7,4. Якщо відповідь на реімунізацію була слабкою, то проводили повторну реімунізацію, вводячи 50 мкг пС з неповним ад'ювантом Фрейнда.

2.4.24.2. Отримання клітин селезінки імунізованих мишей

Шляхом препарування імунізованої тварини, попередньо декапітованої, було вилучено селезінку. Селезінку ретельно промивали у розчині Хенкса, розділяли на дві частини, видаляли капсулу, подрібнювали селезінку в холодному розчині Хенкса, суспендували спленоцити в 35 мл розчину Хенкса. Центрифугували 15 хв при 1000 об/хв, ресуспендували в розчині Хенкса та підраховували кількість клітин з додаванням буферу для лізису еритроцитів: в камеру Горяєва вносили суміш суспензії спленоцитів та буферу для лізису еритроцитів у співвідношенні 1:1.

2.4.24.3. Гібридизація

Гібридоми були одержані за стандартним протоколом [100], з модифікаціями [101]. Для цього використовували клітини селезінки імунізованих мишей та клітини міеломи Х63-Ag8.6.5.3 фірми «Flow Laboratories» (Англія).

Гібридизацію проводили за описаною методикою. Для цього використовували клітини селезінки імунізованих мишей та клітини міеломи Х63-Ag8.6.5.3. співвідношення клітин міеломи та спленоцитів становило 1:10. До

осаду клітин поступово впродовж 1 хв додавали 1 мл 50 %-го розчину поліетиленгліколю з молекулярною масою 1450 kDa в розчині Хенкса з рН 8,0. Потім поступово вносили розчин Хенкса: через 30 сек додавали по краплях 1 мл, ще через 30 сек – 2 мл, ще через 30 сек – 5 мл, ще через 30 сек – доводили об'єм до 40 мл та центрифугували при 1000 об/хв. Час від додавання розчину поліетиленгліколю до зупинки центрифуги становив 9 хв. Осад суспендували в поживному селективному середовищі (НАТ), яке містило гіпоксантин, аміноптерин, тимідин та 20 %-ий розчин ембріональної сироватки великої рогатої худоби, після чого їх розсіювали в 24-коміркові планшети. На 4-й і 7-й день замінювали середовище на $\frac{1}{2}$ НАТ. Через 10 днів середовище замінювали на НТ, що містило гіпоксантин та тимідин. По мірі появи великих колоній, проводили скринінг середовища на наявність специфічних антитіл методом ELISA (як описано в п.п. 2.2.23.1), використовуючи як антиген пС людини та його рекомбінантний аналог, який адсорбували у фосфатному буфері, в концентрації 5 мкг/мл по 110 мкл в кожен лунку.

2.4.24.4 Клонування

Клітини з «позитивних» лунок клонували методом кінцевих розведень. Якщо в лунці було видно дві колонії, віддалені одна від іншої, розсаджували їх в різні лунки, а потім розсівали в 96-лунковий планшет з різною концентрацією (від 1 до 1000 кл в лунку). Клітини з лунок, що містили одну колонію та мали позитивну реакцію переносили в 24-лунковий планшет, а потім у флакони. Для клонування в якості фідера використовували спленоцити неімунізованої миші лінії Balb/c та кондиційне середовище, що містило 30% середовища на якому 48-72 години росли клітини мієломи.

2.4.25. Афінна хроматографія на протеїн G сефарозі

Із середовища, в якому росли гібридами, моноклональні антитіла виділяли методом афінної хроматографії відповідно до протоколу рекомендованого виробником. Для цього на колонку з протеїн G-сефарозою, врівноважену PBS, наносили культуральні середовища, які містили потрібні моноклональні антитіла. Моноклональні антитіла, що зв'язалися з протеїн-G-сефарозою,

елюювали 0,1 М гліцин-НСІ буфером (рН 3,0), після чого фракції негайно нейтралізували за допомогою розчину 1 М K_2HPO_4 до рН 7,2. Одержані розчини моноклональних антитіл концентрували та одночасно переводили в PBS за допомогою приладу для ультрафільтрації фірми "Amicon" з мембраною РМ-30.

2.4.26. Визначення ізотипу моноклональних антитіл

Ізотип моноклональних антитіл визначали із застосуванням антисироваток кози до ізотипів імуноглобулінів миші. На 96-лункові полістирольні планшети з підвищеною адсорбційною здатністю адсорбували антиген, до якого були отримані моноклональні антитіла в концентрації 10 мкг/мл у 2 М ацетатному буфері (рН 8,5), що містив 3 М сечовини. Далі проводили інкубацію планшету при температурі 4 °С протягом 18 год, після чого відмивали шість разів проточною водою та вносили в лунки TPBS й залишали на 30 хв при кімнатній температурі. Після цього плашку струшували для видалення вологи і вносили в кожен лунку по 100 мкл розчину досліджуваних антитіл у TPBS з концентрацією 5 мкг/мл. Плашку інкубували при температурі 37 °С протягом 1 год та після інкубації повторювали процедуру відмивання. У лунки планшету вносили по 100 мкл розчинів антисироваток до різних класів та субкласів (IgG1, IgG2a, IgG2b і IgG3) в TPBS (розведені у співвідношенні 1:1000). Після інкубації протягом 1 год при температурі 37 °С лунки відмивали. Далі в кожен лунку вносили по 100 мкл розчину кон'югату пероксидази з кролячими антивидовими антитілами в TPBS, що не містив NaN_3 , в розведенні 1:5000. Після інкубації протягом 1 год при температурі 37 °С лунки відмивали. Детекцію також проводили таким шляхом, як описано в п.п. 2.2.23.1.

За наявністю інтенсивного забарвлення в лунках із певними антисироватками визначали ізотип досліджуваних антитіл.

2.4.27. Біотинилування антитіл

Для біотинилування моноклональних антитіл спочатку проводили заміну фосфатного буферу [102], в якому антитіла зберігаються після виділення, на карбонатний (0,1 М $NaHCO_3$, рН 9,5) за допомогою приладу для ультрафільтрації фірми "Amicon" з мембраною РМ-10 та отримували розчин моноклональних

антитіл із концентрацією 1 мг/мл. Розчиняли N-гідроксисукцинімідне похідне біотину в диметилсульфоксиді до концентрації 1 мг/мл. Змішували два даних розчини в об'ємному співвідношенні 1 : 8 (активований біотин : протеїн) і інкубували при кімнатній температурі протягом 4-х год. Після цього проводили діаліз проти PBS (рН 7,2) під тиском аргону за допомогою ультрафільтрації на концентраторі фірми "Amicon" (США).

2.4.28. Проведення ПЛР-аналізу отриманих генетичних послідовностей

Для ПЛР-ампліфікації досліджуваних послідовностей використовували ДНК-полімеразу *Thermus thermophilus*, Taq DNA Pol та наступну загальну схему режиму ПЛР [103]: 1) 5 хв ініціаторної денатурації за 95°C; 2) 25 циклів за схемою: денатурація – 30 с при 94° С, відпал праймерів – 30 – 45 с при 55-64°C, елонгація синтезу ДНК – 1 – 5 хв. при 72° С; і врешті – 3) фінальна добудова не комплементарних кінців протягом 7 хв за 72° С.

На 50 мкл реакційної суміші брали 5 мкл 10х буферу для полімерази, суміш дезоксирибонуклеотидів до кінцевої концентрації 0,2 мМ, по 10 пмоль відповідних смислового і антисмислового праймеру, 5 одиниць Taq DNA Pol, як матрицю використовували безпосередньо препарат ДНК або бактерії з плазмідами, загальний об'єм кожного зразка суміші доводили до 50 мкл водою, вільною від нуклеаз.

2.4.29. Виділення ДНК-фрагментів із агарозного гелю

Фрагменти ДНК розділяли в 1% агарозному гелі, використовуючи буферну систему ТАЕ (40 мМ трисоксиметиламінометан, 1 мМ ЕДТА, рН 7,6). Необхідний фрагмент вирізали з гелю та виділяли за допомогою набору GeneJet Gel Extraction Kit. Виділення та очищення проводили згідно рекомендацій виробника.

2.4.30. Приготування компетентних клітин *E. coli*

Готували нічну культуру *E.coli*: інокулювати 1 мл середовища LB штамом BL21 та інкубували 12-16 годин (37 °С, 200 обертів).

Отримували компетентні клітини [103]: додавали 1 мл нічної культури до 99 мл свіжого середовища LB без антибіотику (розведення 1:100). Інкубували на

шейкері за 37 °С та 200 об/хв 3 – 4 години поки оптична густина не досягне 0,4 о.о. За температури 0...4 °С переносили культуру бактерій у центрифужні пробірки, інкубували 20 хв на льоду, центрифугували за 4 °С на 4000 об/хв, 10 хв, осад залишали й ресуспендували у 20 мл 0,1 М CaCl₂, охолодженого до 0...4 °С. Інкубували 20 хв, далі центрифугувати за 4 °С на 4000 об/хв, 10 хв. Знову видаляли супернатант і ресуспендувати осад у 5 мл 0,1 М CaCl₂ з 15 % гліцерином. Використовували такі клітини для трансформації одразу або зберігати при -80 °С.

2.4.31. Трансформація компетентних клітин

Розморожували компетентні клітини на льодяній бані, додавали 1 – 5 мкл (10 пг – 100 нг) плазмід (не більше 5 мкл для аліквоти клітин у 50 мкл), інкубували на льоду 30 хв. Поміщали компетентні клітини з плазмідом у теплу баню 42 °С на 2 хвилини. Далі додавали 1 мл попередньо нагрітого до 37 °С середовища LB (без антибіотика), поміщали у інкубатор на 1 годину для росту бактерій: 37 °С, 200 обертів за хвилину.

Далі клітини висівали клітин на чашку Петрі та інкубували. Робили розведення 1:10 та 1:100 культури, що була вирощена у п. 2.7 у середовищі без антибіотика. На чашці 8 см діаметром висівали до 100 – 200 мкл середовища із бактеріями, та так само — середовища з розведеннями 1:10 та 1:100 культури, розтирали рівномірно, інкубували чашки середовищем догори в інкубаторі за температури 37 °С протягом 12-16 годин.

По завершенню часу інкубації інспектували чашки на предмет росту бактерій на селективному середовищі. Ставили позитивний контроль (з плазмідом без вставки) та негативний контроль (компетентні клітини без плазмід). Перевагу надавали чашкам, де можна відібрати окремі колонії з вектором зі вставкою [103, 104].

Обирали по одній колонії з чашки з агаром для трансформації, відколювали її у рідке середовище LB (5 мл) для створення мастер-банку та в 5 мл середовища LB. Обидва середовища містили антибіотики, відповідно до конструкції вектора та клітин-господарів для експрес скринінгу. Інкубували культуру при

температурі 37 ° C протягом ночі (14 – 16 год) при 180 об/хв при постійному помішуванні, як стартові культури. Клітини, для мастер-банку центрифугували центрифугувати за 4 °C на 4000 об/хв, 10 хвилин, видаляли супернатант. Ресуспендували кожен осад у 5 мл охолодженого на льодяній бані до 0...4 °C LB без антибіотика, інкубували 20 хв. Центрифугували за 4 °C на 4000 об/хв, 10 хв. Видаляли супернатант та ресуспендувати осад у 5х 1мл LB з 15 % гліцерином, що має температуру 0...4 °C та не містить антибіотика. Клітини заморожували на -70 °C.

Далі брали шість флаконів із культурами: контроль (неіндукований) та п'ять дослідних. Інокулювали шість флаконів (кожен з яких містить 5 мл середовища LB з відповідними антибіотиками) 20 мкл вирощених за ніч культур і вирощували при температурі 37 °C протягом декількох годин (приблизно 3 – 4 години) при інтенсивному струшуванні, поки OD₆₀₀ не досягне 0,5 – 0,6.

Вирощували культури протягом додаткових 4-5 год при температурі 37 °C при постійному перемішуванні 200 об/хв. Збирали по 1 мл клітин з кожного флакона з культурою центрифугуванням протягом 1 хв при 12000 об/хв, видаляли супернатант.

Повторно суспендували клітини в 60 мкл буфера (TRIS або PBS, pH-8,0), 20 мкл 10 % SDS та 20 мкл 5X SDS барвника для завантаження у гель, та лізували шляхом змішування або піпетування. Проварювали зразки при температурі 100 °C протягом 5-10 хв. Завантажували зразки у поліакриламідний гель з додецилсульфатом натрію та аналізували.

2.4.32. Інокуляція культури та культивування.

Вирощували нічну культуру продуцента [103]. Інокулювали 0,5 л LB з канаміцином або з однієї окремої колонії, або з банку клітин продуцента. Вирощували культуру при температурі 37° C протягом ночі (14-16 год) при 180 об/хв при постійному помішуванні. Центрифугували за 4 °C на 4000 об/хв, 15 хвилин. Видаляли супернатант та ресуспендували осад у 8 л LB з антибіотиком (50 - 100 мкг/мл). Інкубувати за 37 °C до OD=0,6 (1-2 години). Індукували IPTG (0,5 мМ) або лактозою і продовжували вирощування за 30 °C

4 - 6 годин. Збирали клітини шляхом центрифугування за 4 °С на 4000 об/хв, 15 хв. Отримані клітини з протеїном можна заморожували за -70 °С, додавши 4 мл середовища на кожен 1 г осаду. Розморожували такі клітини у льоді протягом 15 хв.

Далі додавали лізоцим 1 мг/мл, інкубували 30 хв на льоду за 0 °С. Після чого проводили сонікацію ультразвуком на льоду, з перервами між імпульсами (6 разів 200 – 300 Вт, 0,5 - 1 хв). Відбирали 0,1 мл (контроль перед центрифугуванням), центрифугували 10000 об/хв за 0 °С, 30 хвилин, забрати супернатант, відібрали пробу для контролю (0,5 мл), супернатант зберігали при -70 °С.

Оскільки рекомбінантний пС виявивсь відносно токсичним для бактерійних клітин та акумулювався в тільцях включення, у випадку виділення рекомбінантного пС, лізис клітин проводили в денатуруючому 50 мМ Na-фосфатному буфері (рН 8,0) із додаванням 8М сечовини та 10 мМ β-меркаптоетанолу. Після чого проводили сонікацію ультразвуком на льоду, з перервами між імпульсами (шість разів 200 – 300 Вт, 0,5 – 1 хв). Відбирали 0,1 мл (контроль перед центрифугуванням), центрифугували 10000 об/хв за 0 °С, 30 хв, забрати супернатант, відібрали пробу для контролю (0,5 мл), супернатант зберігали при -70 °С.

2.4.33. Отримання та очистка рекомбінантних протеїнів

Отриманий об'єм протеїну з 8 літрів культури інкубували з 4 мл нікель-вмісного сорбенту (Qiagen) близько 2 годин (0,5 сорбенту на 1 л культури). Промивали нікель-вмісний сорбент обережно тричі близько 20 об'ємів колонки 50 мМ Na₃PO₄ (рН6.0), 8М сечовини, 10 мМ імідазолу, 10мМ β-меркаптоетанолу (без інгібіторів протеїназ). Елюцію проводили буфером: 50 мМ Трис-НСl (рН 7,8), 300 мМ NaCl, 200 мМ імідазол, 1мМ β-меркаптоетанол (без інгібітора протеїназ). Знесолювали позитивну на цільовий протеїн фракцію на Pd10 у буфері 50 мМ Tris (рН8.0), 50 мМ NaCl. Інкубували отриманий знесолений протеїн із відповідною протеїназою для відщеплення послідовності тагу (200 мкл протеїнази, інкубація 16 годин, 4 °С, слабо помішуючи).

Чистоту отриманих проб фрагменту препропептиду протеїну С аналізували методом електрофорезу. Концентрацію цільового протеїну визначали порівнюючи інтенсивність відповідних смуг на сканованих зображеннях отриманих електрофореграмах цільових проб і проб БСА стандартних концентрацій, використовуючи програмне забезпечення ImageJ.

2.4.34. Гемоліз

Гемоліз вивчали, використовуючи суспензію відмитих еритроцитів отриманих зі свіжої цитратної крові донорів [105], яку розводили 10 мМ HEPES буфері, рН 7,4 з 0,15 М NaCl, 5 мМ KCl, 1 мМ MgSO₄, 10 мМ сахарозою у співвідношенні 1:8. До 50 мкл суспензії еритроцитів додавали гемолітичний агент (загальний об'єм – 1 мл), перемішували та інкубували 30 хв при температурі 37 °С.

Після інкубації еритроцити осаджували центрифугуванням 10 хв при 1000 g і визначали поглинання супернатанту при довжині хвилі 543 нм проти робочого буферу. За 100% гемолізу приймали гемоліз, викликаний 50 мкл 1% Triton-X100.

2.4.35. Турбідиметричний аналіз.

Здатність фібрину до полімеризації перевіряли шляхом вимірювання зміни каламутності при 350 нм за допомогою спектрофотометра POP (Optizen, Daejeon, Korea) [71]. Експерименти проводили при 37 °С в 0,05 М Трис-HCl буфері, що містить 0,13 М NaCl і 1 мМ CaCl₂ при кінцевій концентрації desAB фібрину 0,1 мг/мл.

2.4.36. Пастеризація

Пастеризацію колагену проводили трикратним нагрівом розчину колагену до 95 °С на водяній бані з подальшим охолодженням та інкубацією при кімнатній температурі впродовж доби для проростання спор [106].

2.4.37. Перевірка стерильності.

Стерильність препаратів визначали за результатами бактеріального посіву в поживні середовища, як описано [107].

2.4.38. Молекулярний докінг

Вибір структури моделі та методології. В якості модельної структури було обрано кристалічну структуру з ідентифікатором запису 1H8D з Protein Data Bank (PDB) [108]. Розрахунки проводили за допомогою пакета програм Schrödinger [109].

Вибір і підготовка ліганду. Сполуки були протоновані і їх енергія була мінімізована за допомогою модуля LigPrep під силовим полем OPLS4 з усіма іншими параметрами, встановленими як усталено. Для попередньої обробки структури протеїну використовувалися стандартні налаштування в модулі Protein Preparation Wizard. Структури були попередньо оброблені для видалення молекул води (оскільки досліджувані сполуки більші та мають різну хімічну структуру) та йонів Ca^{2+} , оскільки вони не брали участі в реакції та могли заважати точним розрахункам. Атоми водню були оптимізовані, мінімізація енергії була безпосередньо виконана.

2.4.39. Молекулярна динаміка

Розрахунки проводилися за допомогою програмного пакета Schrödinger [109, 110]. Комплекси, отримані після молекулярного докінгу, були використані для моделювання молекулярної динаміки. Кожна система була поміщена в центр періодичної орторомбічної коробки, яка потім була заповнена молекулами води TIP3P. Мінімальна відстань 1 нм підтримувалася між найближчим атомом комплексу та краєм симуляційної коробки, щоб комплекс міг повністю зануритися у воду і вільно обертатися. Далі, для нейтралізації системи та імітації клітинного середовища ($\text{pH} = 7$), були додані іони Na^+ і Cl^- , щоб довести іонну концентрацію до 150 мМ. При цьому молекули розчинника заміщувалися моноатомними іонами випадковим чином. Потім отриманий комплекс було піддано енергетичній мінімізації, що також усувало стеричні перешкоди. Для кожного комплексу проводилося моделювання молекулярної динаміки у водному середовищі протягом 100 нс із використанням ансамблю NPT, силового поля OPLS4 при температурі 298 К.

4.4.40. Математична обробка результатів.

Математичну обробку та аналіз отриманих експериментальних даних, кореляційний аналіз та визначення параметрів функцій виконували за допомогою пакету програм Excel 2007, Агрегометр 2.01 та TotalLab v2.01. Для оцінки та порівняння відмінностей між двома незалежними групами використовувався критерій Манна-Уїтні (<https://www.socscistatistics.com/tests/mannwhitney/default2.aspx>). Цей критерій широко використовується для порівнянь малих груп за рівнем будь-якої якісно вимірної ознаки та дозволяє виявити відмінності у значенні параметра [111].

До роботи включені результати експериментів, допустима похибка яких не перевищувала 5% ($p < 0,05$). Представлені на агрегатограмах дані, дані цитометрії та турбідиметрії є типовими для серії повторюваних дослідів (не менше трьох у кожній серії).

Матеріали розділу представлені в публікаціях [14, 15, 42, 46] **Додатку А.**

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

РОЗДІЛ 3. РОЗРОБКА НОВИХ СПОСОБІВ ІНГІБУВАННЯ АКТИВНОСТІ ТРОМБІНУ З МЕТОЮ СТВОРЕННЯ АНТИТРОМБОТИЧНИХ ПРЕПАРАТІВ

Згідно статистики ВОЗ у світі 17 мільйонів людей щорічно помирають від тромбоемболічних ускладнень. В Україні загалом 60,1% населення мали 1–2 фактори ризику виникнення серцево-судинних захворювань, а одна третина населення (32,8%) – 3-5 факторів ризику [112]. Тому профілактика та лікування тромбозів набули широкомасштабного застосування.

За механізмом дії антитромботичні препарати в основному поділяють на антикоагулянти, антитромбоцитарні агенти та тромболітичні препарати прямої дії [113]. Зокрема, антикоагулянти, такі як антагоністи вітаміну К, нефракціонований гепарин і низькомолекулярні гепарини, стали основною терапією для більшості пацієнтів з венозною тромбоемболією для запобігання розвитку тромботичних ускладнень чи емболізації та рецидиву тромбозу [114-116].

Нові пероральні антикоагулянти включають селективні прямі інгібітори тромбіну, такі як дабігатран етексилат і селективні прямі інгібітори фактора Ха, такі як ривароксабан, апіксабан або еноксабан. Всі ці препарати мають фіксовані дози і не потребують лабораторного моніторингу. Позитивні результати перших завершених клінічних досліджень свідчать про початок нової ери у контролі тромбозів. Завдяки цим властивостям та пероральному введенню зазначені сполуки є більш зручними, ніж антагоністи вітаміну К і низькомолекулярний гепарин, і тому є більш кращими для довгострокової вторинної профілактики тромбозів.

За останнє десятиліття досягнуто значного прогресу в розвитку антитромботичних агентів, які проявляють антитромбоцитарну активність або впливають на активність і генерацію тромбіну [117-119]. Незважаючи на зусилля

дослідників і отриману в результаті вражаючу кількість високоафінних інгібіторів тромбіну, клінічне застосування деяких доступних парентеральних препаратів обмежено [120]. Значна кількість розроблених на сьогодні інгібіторів тромбіну має погану селективність, їм властива токсичність, зв'язування з протеїнами плазми крові; вони метаболічно нестабільні, швидко елімінуються, мають низьку антикоагулянтну активність або погану біодоступність.

Водноас, синтетичні низькомолекулярні інгібітори тромбіну потенційно мають низьку переваг перед антикоагулянтами, які використовують в клініці: це швидкість дії, висока ефективність, передбачувана фармакокінетика, відсутність необхідності постійного моніторингу стану гемостазу [121 - 123].

Оскільки тромбін є центральним ензимом гемостазу, що стимулює як плазмену так і клітинну ланки системи зсідання крові, та зважаючи на переваги інгібіторів тромбіну перед класичними антитромботичними препаратами, ми вирішили зосередитись на пошуку низькомолекулярних високоспецифічних інгібіторів тромбіну.

3.1. Пошук інгібіторів тромбіну *in silico*

За допомогою молекулярного докінгу з використанням пакету QXP [124] та наступної перевірки за допомогою молекулярної динаміки в GROMACS нами було відібрано 14 низькомолекулярних сполук в якості потенційних інгібіторів тромбіну (рис 3.1).

Всі запропоновані сполуки було синтезовано та апробовано *in vitro* та *in vivo*.

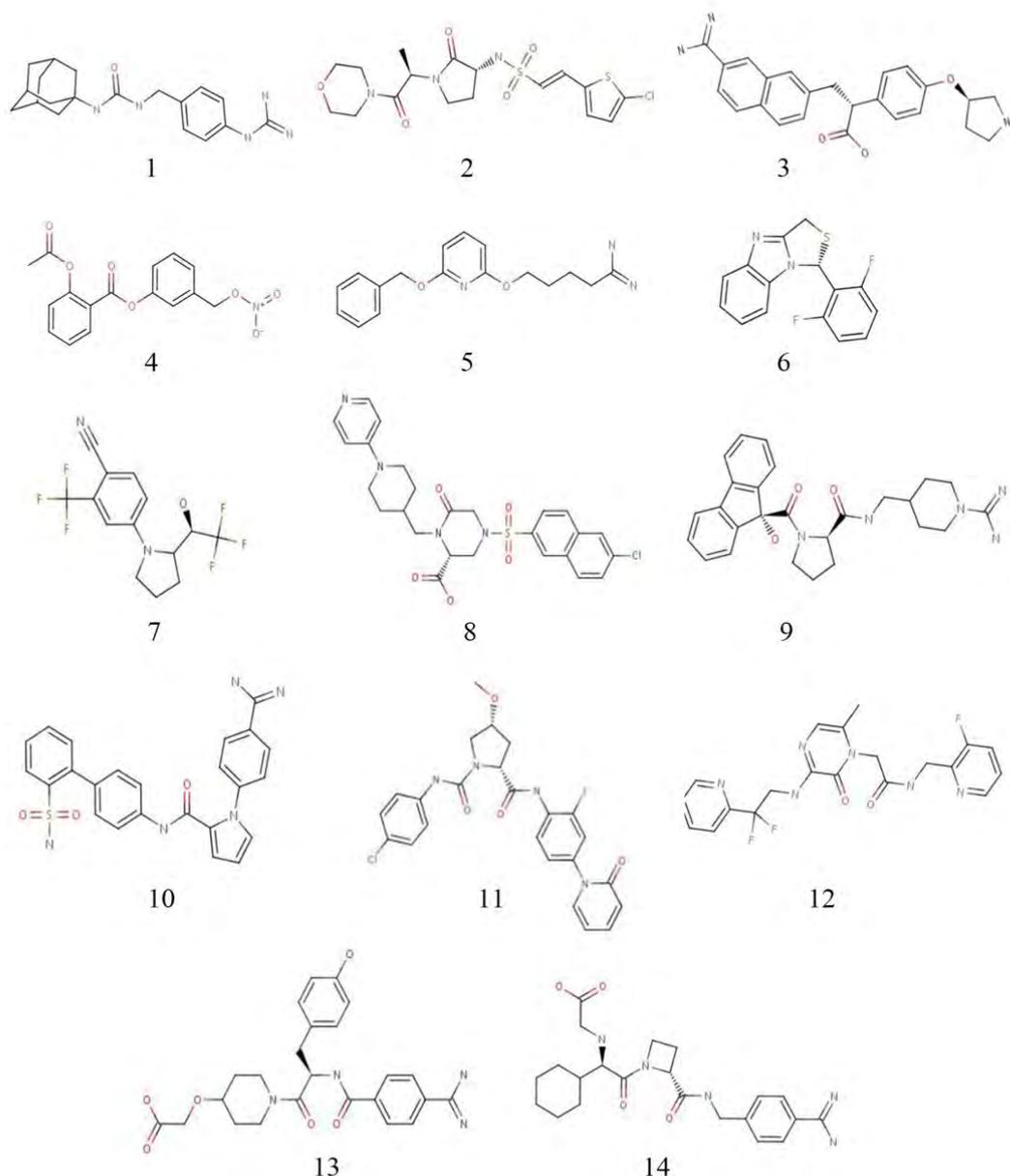


Рис. 3.1. Центроїди (ієрархічна кластеризація структури), отримані в результаті кластеризації 987 інгібіторів серинових протеїназ в пакеті ICM.

3.2. Апробація інгібіторів тромбіну *in vitro*

Відповідно до результатів докінгу та молекулярної динаміки було відібрано серію сполук, які є потенційними інгібіторами тромбіну. Здатність зазначених речовин до інгібування тромбіну визначали в двох розроблених нами модельних системах.

Інгібіторну дію низькомолекулярних сполук на активність тромбіну виявляли в модельній системі *in vitro*, що включала в себе тромбін 0,32 НН/мл;

інгібітор (80 мкг/мл) та тромбін-специфічний хромогенний субстрат S2238 (200 мкМ). Ефективність інгібіторної дії низькомолекулярних сполук визначали за швидкістю появи в розчині *n*-нітроаніліну, який відщеплюється від хромогенного субстрату S2238 тромбіном.

Близькою за структурою до тромбіну є серинова протеїназа – фактор Ха зсідання крові. Для підтвердження селективності тестованих інгібіторів визначали також їх вплив на активність фактора Ха зсідання крові. Для цього в плазмі крові (40 мкл) активували фактор X зсідання активатором з отрути гадюки Russelli (RVV, 80 мкг/мл) та контролювали його активність за розщепленням хромогенного субстрату S2765 (Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA 2HCl). Ефективність інгібіторної дії низькомолекулярних сполук визначали за швидкістю появи в розчині *n*-нітроаніліну, який відщеплюється від хромогенного субстрату S2765 активованим фактором X.

В таблиці 3.1 наведено рівень залишкової активності тромбіну та фактора Ха зсідання крові в присутності речовин, що тестувались. В результаті було відібрано речовини №2 та №9, як ефективні інгібітори тромбіну. Слід зазначити, що речовини №2 та №9 практично не впливали на активність фактора Ха зсідання крові, а речовина №14, що ефективно інгібувала фактор Ха зсідання крові мала незначний вплив на тромбін. Таким чином, синтезовані низькомолекулярні інгібітори тромбіну дійсно були селективними.

Таблиця 3.1

Інгібування тромбіну та фактора Ха зсідання крові низькомолекулярними речовинами

№ речовини	Рівень залишкової активності тромбіну, %	Рівень залишкової активності фактора Ха зсідання крові, %
1	85±2,9	67±3,0
2	33 ±6,7	78±2,8
3	44±3,0	78±3,1
4	37±2,3	86±3,2
5	59±1,9	100±2,4
6	35±2,4	80±2,1
7	57±0,4	66±2,6
8	62±8,9	63±9,5
9	34 ±4,6	63±4,9
10	36±4,5	62±5,8
11	100±1,8	83±2,9
12	80±2,8	93±2,0
13	85±11	61±3,4
14	63±3,5	26 ±12,1

При подальшому аналізі було визначено природ інгібіторного впливу на тромбін речовин №2 та №9. Для цього провели дві серії дослідів по визначенню початкової швидкості реакції за сталої концентрації тромбіну. В першій серії концентрація хромогенного субстрату S2238 була сталою, відтак ми визначали вплив інгібітора в кінцевій концентрації 80 та 40 мкг/мл на початкову швидкість реакції. В другій серії концентрація інгібітора була сталою, натомість змінювали концентрацію хромогенного субстрату S2238 (3,6 та 0,36 мМ). Результати представляли у вигляді графіків, побудованих в подвійних обернених координатах. Як видно з рис 3.2, інгібітор №2 та інгібітор №9 конкурентно інгібували тромбін.

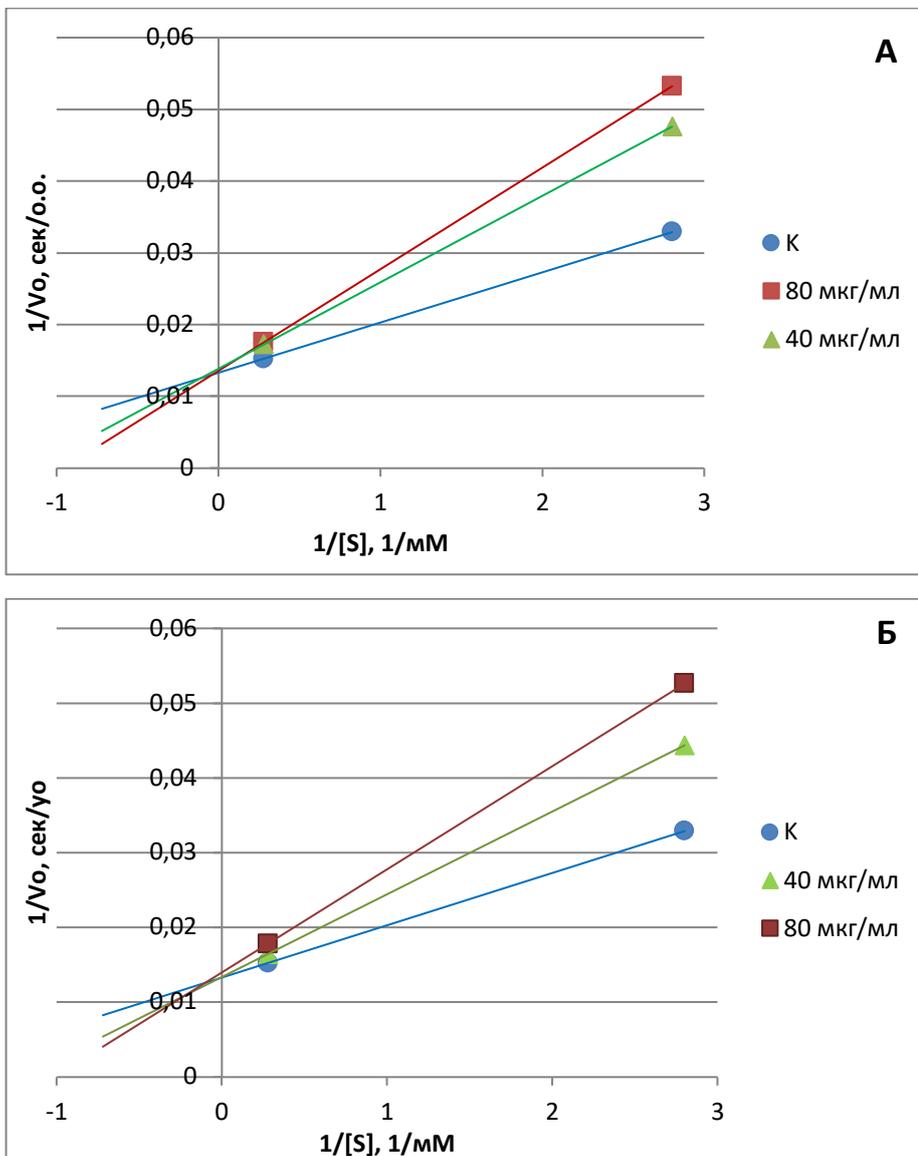


Рис. 3.2. Залежність початкової швидкості реакції від концентрації субстрату в обернених координатах за відсутності (К) та за присутності інгібіторів №2 (А) та №9 (Б) в концентраціях 40 та 80 мкг/мл.

Таким чином, досліджувані інгібітори взаємодіють з тромбіном на рівні його активного центра. Ключовими амінокислотними залишками, що формують активний центр тромбіну є Gys 43, Asp 99, Ser 205. Однак при розрахунках МД було показана можливість взаємодії інгібітора №2 з Ala 208, Gly 236 та Tyr 63, Trp 66, Trp 235.

Для подальшої порівняльної характеристики ефективності дії низькомолекулярних сполук інгібіторів тромбіну нами було побудовано калібрувальну криву (Рис. 3.3). За еталон було взято аргатробан, інгібітор

тромбіну, що зв'язується з його активним центром. Аргатробан є препаратом, що використовується в медичній практиці для профілактики та лікування тромбозів, за гепаринової тромбоцитопенії. Його інгібуючий вплив на тромбін визначали в модельній системі *in vitro*, як описано вище. Активність тромбіну фіксували за розщепленням хромогенного субстрату S2238. Для аргатробану та інгібіторів №2 та №9 було визначено IC50 (рис 3.3).

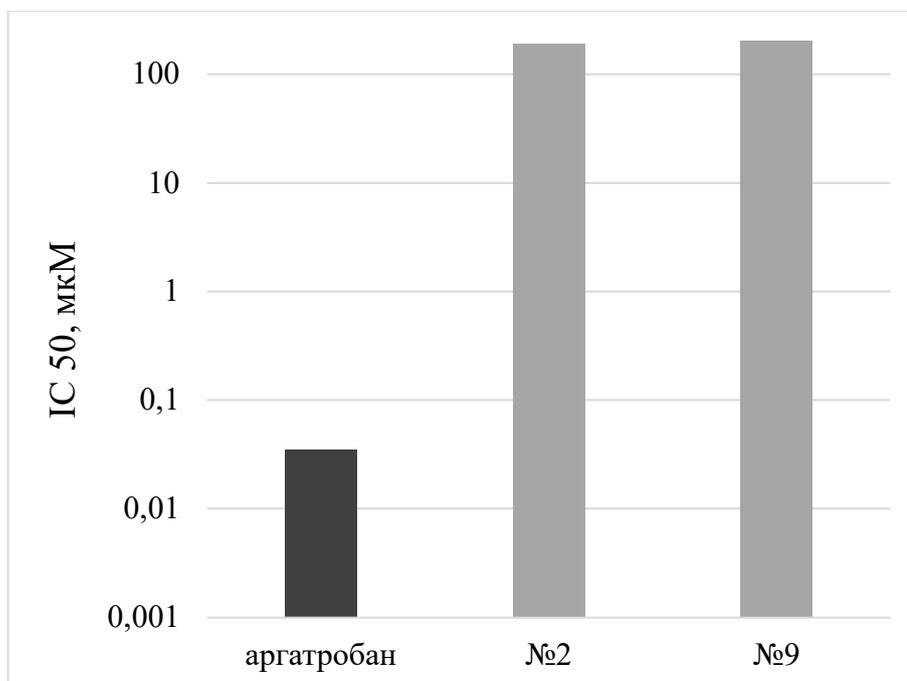


Рис. 3.3. Концентрація аргатробану та досліджуваних інгібіторів, при якій досягається інгібування активності тромбіну на 50% в модельній системі *in vitro*.

Таким чином, кінетичний аналіз показав, що обрані нами сполуки є прямими інгібіторами, здатними селективно інгібувати тромбін. Як видно, запропоновані інгібітори менш ефективні за аргатробан в модельній системі *in vitro*, однак IC₅₀ в межах 100 мкМ дає змогу легко варіювати дозу введення та запобігає передозуванню. Тим не менше, порівняння досліджуваних інгібіторів з аргатробаном дає розуміння необхідності їх вдосконавлення та модифікації перед подальшими дослідженнями. Тому надалі застосували метод морлекулярної динаміки для визначення точок взаємодії інгібіторів з активним центром тромбіну та передбачення можливих модифікацій молекул, які б дозволили збільшити їхню селективність та специфічність.

3.3 Молекулярна динаміка зв'язування тромбіну з інгібіторами

Розглянемо детальніше взаємодію активного центру тромбіну з низькомолекулярними сполуками № 2 та № 9, які виявили найбільшу здатність до інгібування активності тромбіну.

Для аналізу молекулярної динаміки зв'язування тромбіну з обраними інгібіторами було використано програмний пакет Schrödinger. Було визначено середньоквадратичне відхилення (RMSD), що використовується для вимірювання середньої зміни зміщення вибірки атомів для конкретного кадру щодо опорного кадру, та середньоквадратична флуктуація (RMSF), що використовується для характеристики локальних змін вздовж протеїнового ланцюга. Крім того, взаємодії протеїну з лігандом можна контролювати протягом усього моделювання. Ці взаємодії були класифіковані за типами: водневі, гідрофобні, іонні зв'язки та водні містки.

3.3.1. Сполука № 2

RMSD сполуки № 2 та тромбіну при комплексоутворенні (рис. 3.4) показує, що в тромбіні не спостерігається суттєвих перебудов, в той час як сполука № 2 короткотривало рухається для встановлення стабільних взаємодій з покетом, а потім лишається стабільною.

Визначення середньоквадратичної флуктуації (RMSF) вздовж протеїнового ланцюга при взаємодії тромбіну зі сполукою № 2 (Рис. 3.5) дозволило визначити амінокислотні залишки, які рухаються з максимальною амплітудою та приймають участь у взаємодії тромбіну з сполукою № 2.

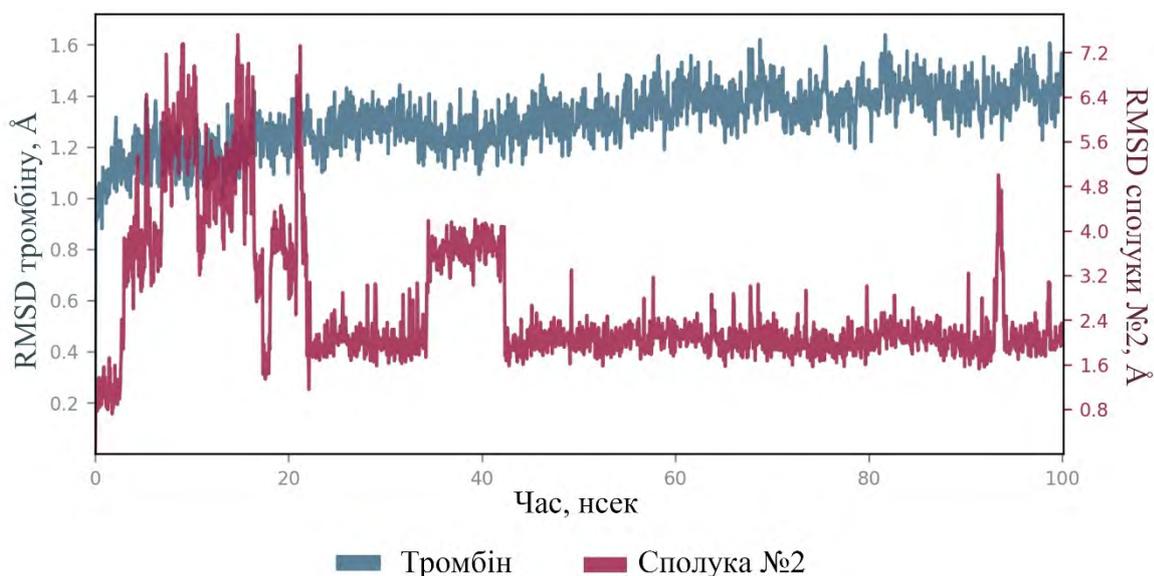


Рис 3.4. Середньоквадратичне відхилення (RMSD) сполуки № 2 та тромбіну отримані за допомогою програмного пакету «Schrödinger».

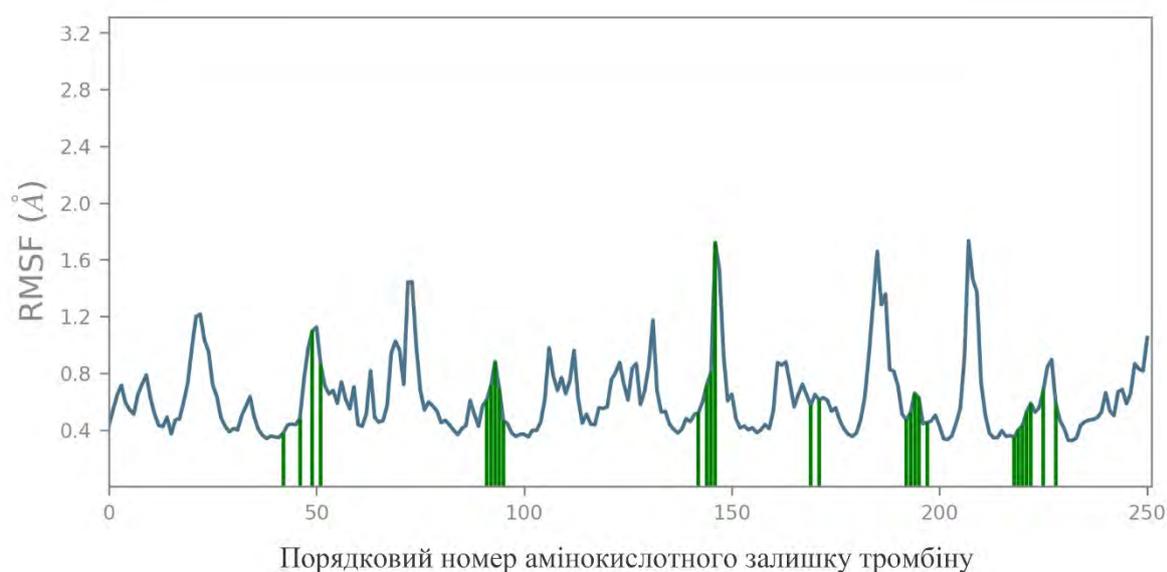


Рис 3.5. Середньоквадратична флуктуація (RMSF) вздовж протеїнового ланцюга при взаємодії тромбіну зі сполукою № 2. Зеленим позначено амінокислотні залишки, які беруть участь у взаємодії

Амінокислотні залишки, що взаємодіяли з лігандом, було виділено для аналізу типу взаємодій, які виникають між сполукою № 2 та тромбіном в комплексі. Як видно з рис. 3.6, протеїн з лігандом переважно взаємодіють завдяки водним місткам та в меншій мірі за рахунок гідрофобних взаємодій та

водневих зв'язків. При цьому, визначальними для зв'язування сполуки № 2 є водні містки, що утворюються з Asn98, Glu 192, водневі зв'язки з Gly 216, та гідрофобна взаємодія з Ala 190, Trp 215 (рис 3.7, А), що і визначає положення сполуки № 2 в активному центрі тромбіну (рис 3.7, Б). Особливу увагу слід звернути на те, що гідрофобний замісник сполуки № 2 (2-хлор-тіофен) займає положення в S1 покеті тромбіну.

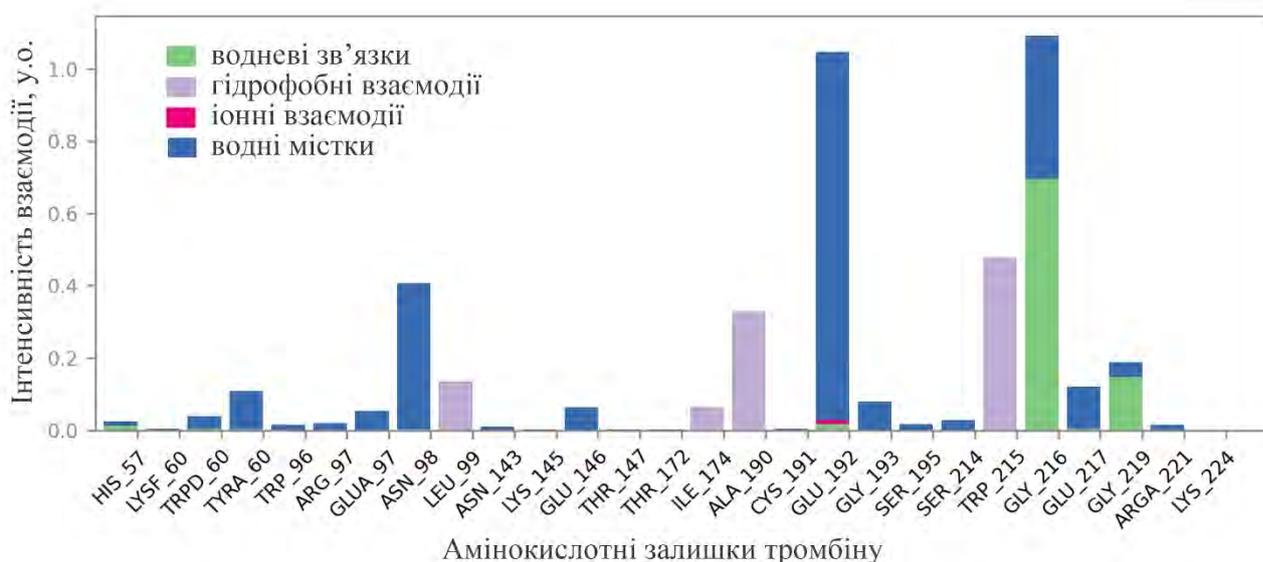


Рис. 3.6. Класифікація взаємодії тромбіну з сполукою № 2 за типами.

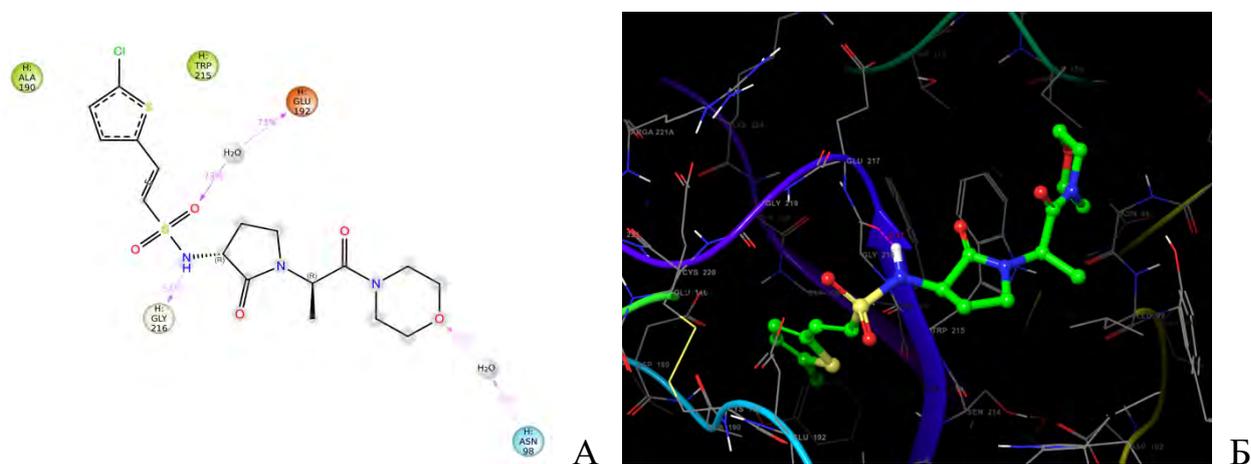


Рис 3.7 Схематичне зображення взаємодії атомів сполуки № 2 із амінокислотними залишками тромбіну (А). Розташування молекули ліганда в моделі сайту зв'язування (Б).

3.3.2. Сполука № 9

Середньоквадратичне відхилення динаміки сполуки № 9 та тромбіну при комплексоутворенні (рис. 3.8) показує, що і протеїн, і ліганд є стабільними при взаємодії. Середньоквадратичне відхилення динаміки тромбіну в цьому комплексі не перевищує 3 Å, ліганду – на рівні 4,2 Å.

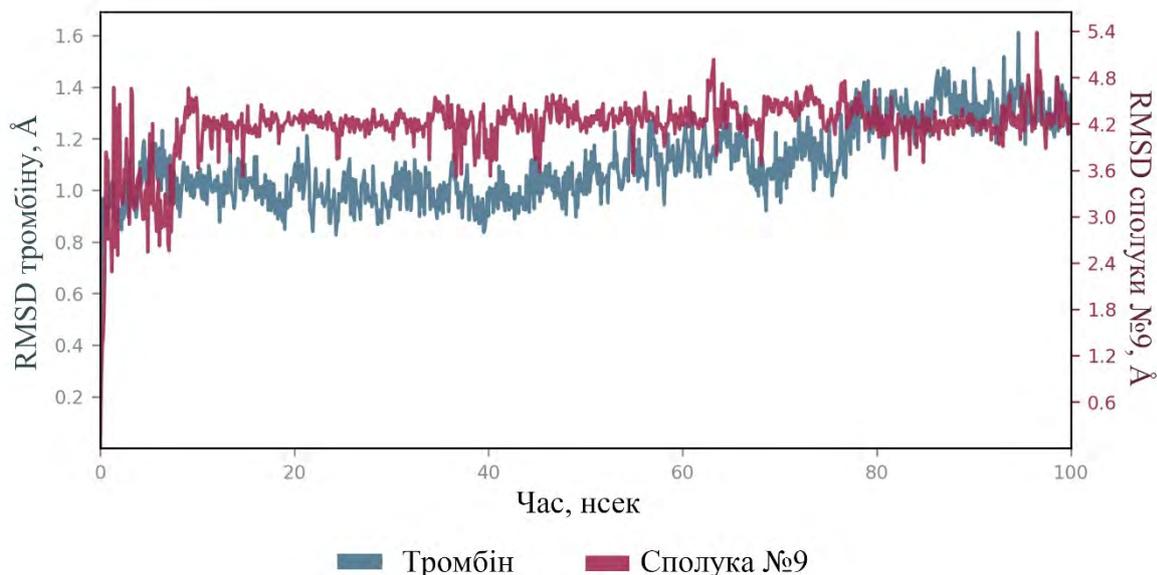


Рис 3.8. Середньоквадратичне відхилення (RMSD) сполуки № 9 та тромбіну отримані за допомогою програмного пакету «Schrödinger».

Як і для попереднього ліганду, було визначено RMSF вздовж протеїнового ланцюга при взаємодії тромбіну зі сполукою № 9 (рис. 3.9), що дозволило визначити амінокислотні залишки, які рухаються з максимальним діапазоном та беруть участь у взаємодії тромбіну з сполукою № 9.

Як видно з рис. 3.10, протеїн з лігандом переважно взаємодіють завдяки водневим зв'язкам та в меншій мірі за рахунок водних містків та гідрофобних взаємодій. При цьому, визначальними для зв'язування сполуки № 9 є водневі зв'язки, що утворюються з Gly 219, Asp 189, Glu 192, водні містки з Gly 216, Phe 227, Trp 215 та гідрофобна взаємодія з Val 213 (рис 3.11, А), що і визначає положення сполуки № 9 в активному центрі тромбіну (рис 3.7, Б). Слід зауважити, що більшість зв'язків з тромбіном цей ліганд утворює за рахунок

позитивно зарядженого залишку гуанідину, що обумовлює міцність взаємодії та домінування водневих зв'язків між протеїном та лігандом.

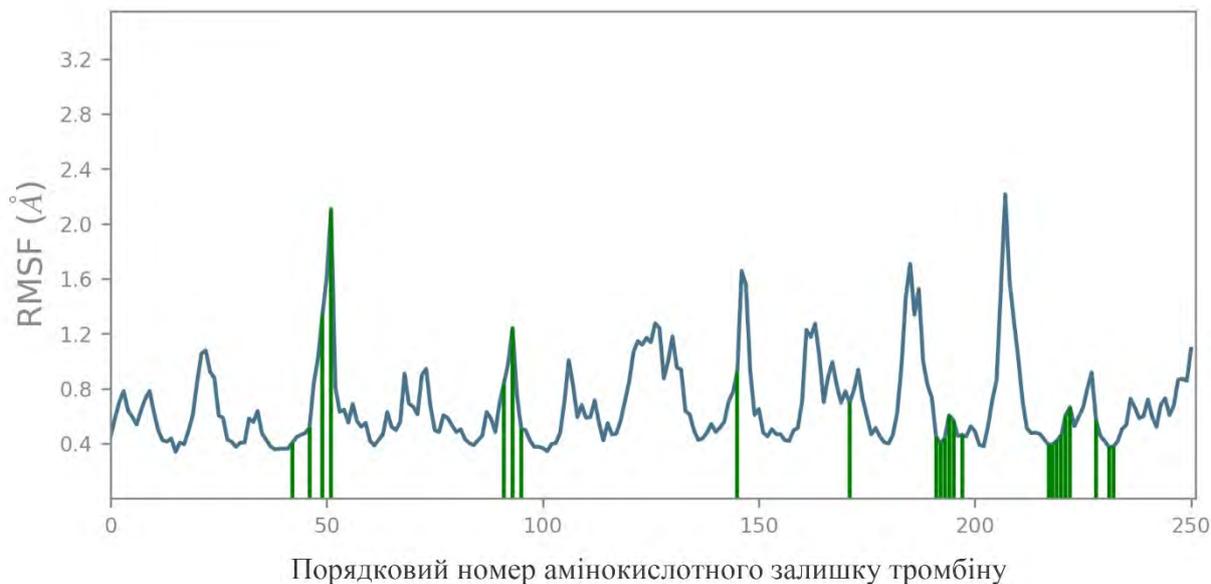


Рис 3.9. Середньоквадратична флуктуація (RMSF) вздовж протеїнового ланцюга при взаємодії тромбіну зі сполукою № 9. Зеленим позначено амінокислотні залишки, які беруть участь у взаємодії.

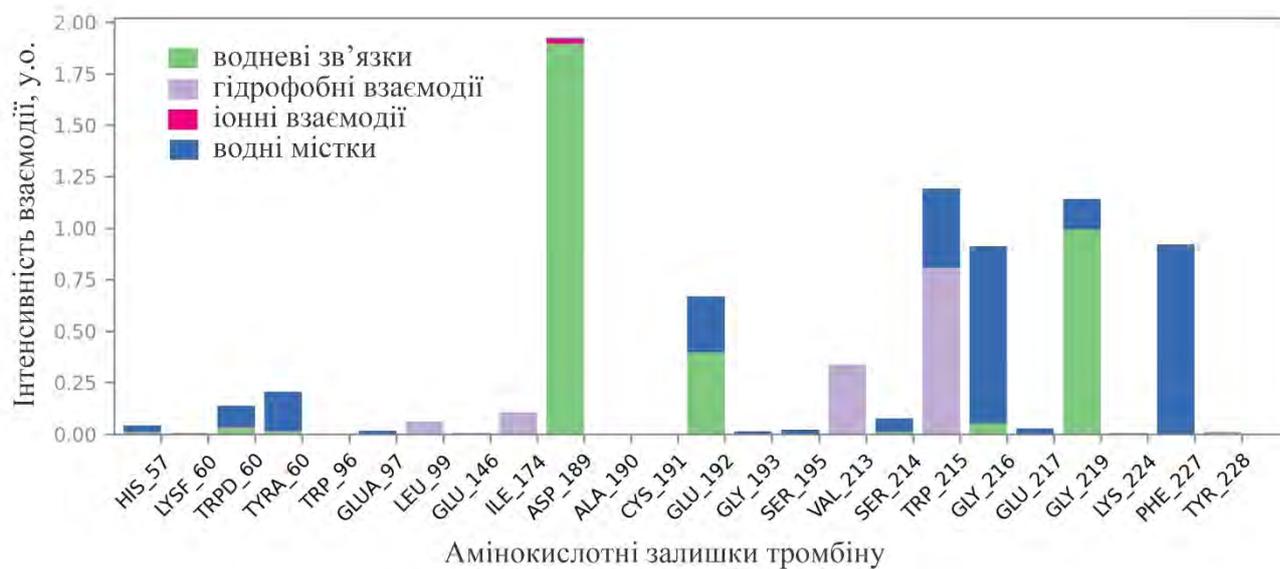


Рис 3.10. Класифікація взаємодії тромбіну з сполукою № 9 за типами.

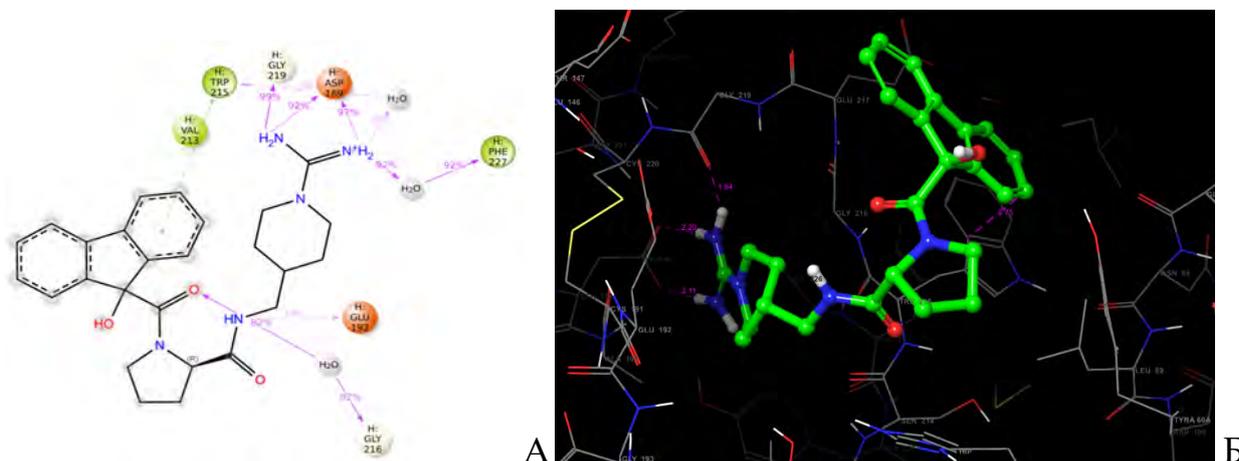


Рис 3.11. Схематичне зображення взаємодії атомів сполуки № 2 із амінокислотними залишками тромбіну (А). Розташування молекули ліганда в моделі сайту зв'язування (Б).

3.4. Оптимізація застосування та апробація інгібіторів тромбіну *in vivo*

Для оцінки ефективності дії інгібіторів тромбіну на клітинний та плазменний гемостаз *in vivo* використовували модель внутрішньовенного введення інгібіторів щурам. Тварин масою тіла 300 ± 50 г утримували в віварії Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України на стандартному харчовому раціоні. Усі маніпуляції з тваринами проводили згідно до рекомендацій Європейської конвенції із захисту хребетних тварин та використання їх в експериментальних та інших наукових цілях (Страсбург, 1986 р.).

Розчин інгібітора тромбіну у DMSO вводили у хвостову вену щура. Доза інгібіторів становила 0,5 мг/кг маси тіла. Контрольній групі тварин вводили відповідний об'єм DMSO Через 1 годину після введення препарату отримували кров щурів пункцією серця.

Отримані зразки плазми крові та плазму крові, використали для дослідження процесу активації факторів зсідання крові та агрегації тромбоцитів.

3.3.1. Дослідження *in vivo* інгібіторної дії низькомолекулярних сполук на фактори зсідання крові.

В плазмі крові контрольних та дослідних щурів визначали індуковану активність тромбіну. Для цього плазму крові щурів (10 мкл) активували АЧТЧ-реагентом (20 мкл), тобто запускали активацію факторів контактної фази в

присутності CaCl_2 (кінцева концентрація 1 мкМ) і визначали активність тромбіну за розщепленням хромогенного субстрату S2238. Крім того, для перевірки селективності інгібіторів, за таких же умов перевіряли активність фактора Ха зсідання крові, як серинової протеїнази, близької за структурою до тромбіну. Активність фактора Ха зсідання крові визначали за розщепленням хромогенного субстрату S2765.

Як видно з рис 3.12., у всіх дослідних щурів зменшувалась індукована АЧТЧ реагентом активність тромбіну в плазмі крові.

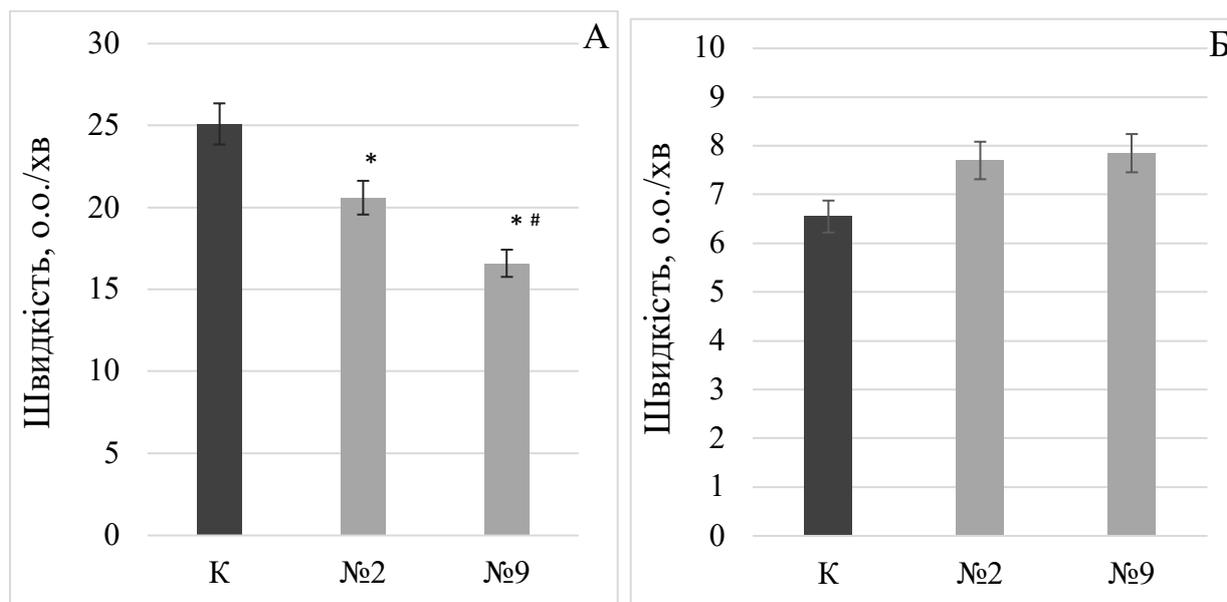


Рис. 3.12. Швидкість розщеплення тромбін-специфічного (А) та фактор Ха-специфічного (Б) субстратів в активованій АЧТЧ-реагентом плазмі крові контрольних щурів (К) та щурів, яким вводили інгібітори №2 та №9.

* – за тестом Манна-Уїтні результат достовірний при $p < 0,05$, порівняно з контрольною групою щурів.

– за тестом Манна-Уїтні результат достовірний при $p < 0,05$, порівняно з щурами, яким вводили інгібітори №2.

Таким чином, інгібітори №2 та №9 при введенні щурам пригнічували активність тромбіну і не інгібували активність фактора Ха зсідання крові, хоча в модельних системах *in vitro* виявляли слабку пригнічуючу дію на нього (таблиця 3.1). Зважаючи на відсутність інгібування активності фактора Ха зсідання крові з боку цих інгібіторів в модельній системі *in vivo*, можна

стверджувати, що їх вплив на активність тромбіну є результатом безпосередньої селективної взаємодії з тромбіном, а не результатом сповільнення каскаду зсідання крові на рівні фактора X.

*3.3.2. Дослідження *in vivo* інгібіторної дії низькомолекулярних сполук на процес активації та агрегації тромбоцитів*

Не менш важливою ланкою гемостазу є клітинний гемостаз. Тромбоцити, не лише безпосередньо створюють основу тромбу, але й активують гемостаз за рахунок вивільнення вмісту своїх гранул і забезпечують потужний початок роботи каскаду зсідання крові. З одного боку, саме тромбоцитарна мембрана стає осередком активації факторів зсідання крові, зокрема фактора X та протромбіну; з іншого боку, утворений тромбін стимулює активацію та агрегацію тромбоцитів. Таким чином, вивчаючи роботу інгібіторів тромбіну в системі *in vivo* неможливо не звернути увагу на роботу тромбоцитарного гемостазу при введенні їх щурам.

Інгібіторний ефект досліджуваних сполук на процес активації та агрегації тромбоцитів фіксували за допомогою агрегометра Солар 2110: до 0,2 мл збагаченої тромбоцитами плазми крові (ЗТПК) щурів (360 тис клітин в 1 мкл) вносили послідовно 0,05 мл 0,025 М розчину CaCl_2 та реагент АЧТЧ або 0,25 НИН розчину тромбіну, який ініціював активацію та агрегацію тромбоцитів. Кінцева концентрація тромбоцитів у пробі складала 240 тис/мкл. Процес агрегації тромбоцитів вивчали за зміною ступеня світлорозсіювання реакційної суміші, порівняно з вихідним світлорозсіюванням збагаченої тромбоцитами плазми крові щурів (рис. 3.13).

Полімеризацію фібрину детектували за різким зменшенням світлорозсіювання, якому передувало фібриноутворення. Кювета агрегометра перебувала під постійним перемішуванням за температури 37 °С. Об'єм реакційної суміші складав 0,3 мл.

Отримані нами дані щодо відсутності впливу DMSO на процес агрегації тромбоцитів (Рис. 3.13 А) повністю співпадають з результатами попередніх

досліджень. Помірна агрегація тромбоцитів, яка починалася через 1 хвилину після внесення індуктора, завершилася через 4-5 хв.

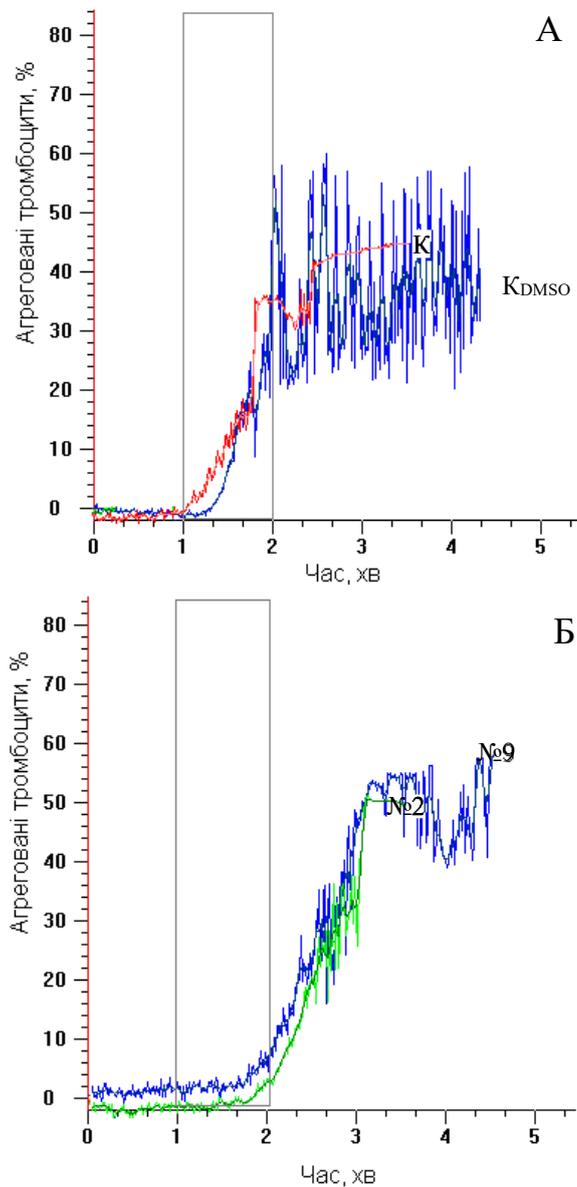


Рис. 3.13. Агрегатограма АЧТЧ-індукованої агрегації тромбоцитів в плазмі крові щурів збагаченої на тромбоцити. А – плазма крові щурів контрольної групи (К), 2 – плазма крові щурів контрольної групи, яким вводили DMSO (K_{DMSO}); В – плазма крові щурів дослідної групи, яким вводили внутрішньовенно сполуки № 2 та 9.

Ступінь агрегації тромбоцитів сягав 45 %. Подальша інкубація суміші призводила до формування полімерного фібрину через 6 – 7 хв після внесення

індуктора. За присутності інгібіторів час початку процесу агрегації подовжено в два рази.

Після внутрішньовенного введення щурам досліджуваних інгібіторів, тромбін-індукована агрегація ЗТПК взагалі унеможлилювалась (рис 3.14 Б).

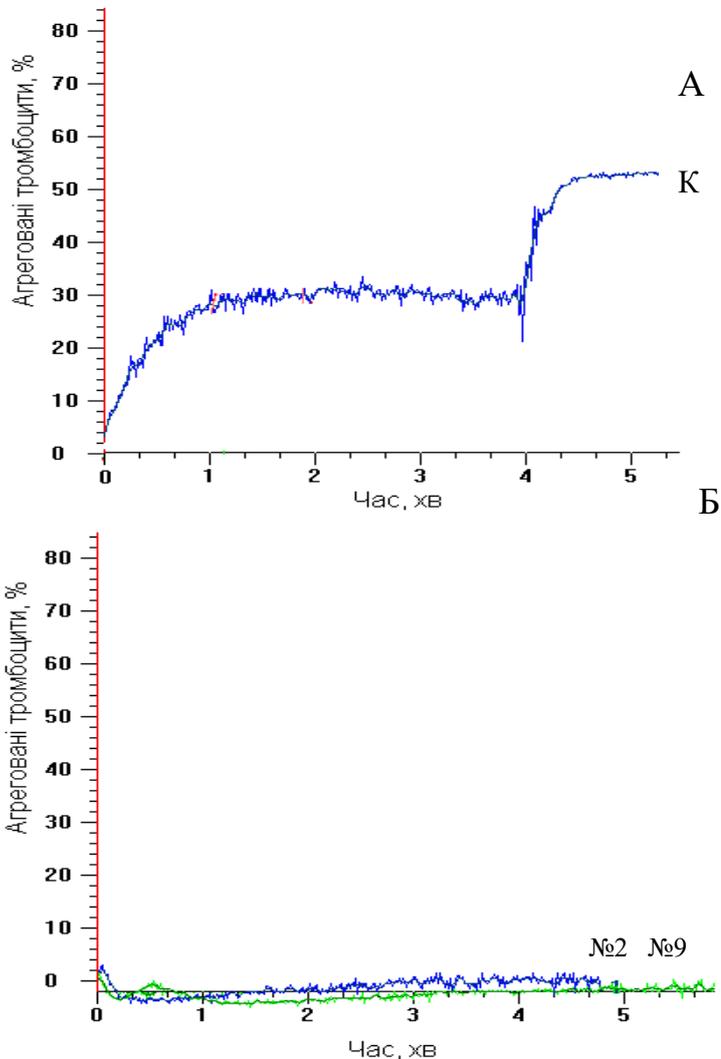


Рис. 3.14. Тромбін-індукована агрегація тромбоцитів в ЗТПК щурів, яким було введено внутрішньовенно інгібітори тромбіну №2 та №9 (Б) та агрегація тромбоцитів у ЗТПК контрольних тварин (А).

На наступному етапі досліджень процесу активації тромбоцитів використовували метод цитометрії на протоковому цитофлуориметрі COULTER® EPICS™ XL™ Flow Cytometer, який являє собою систему для якісного і кількісного визначення біологічних та фізичних властивостей клітин.

В ході експерименту використовували два типи світлорозсіювання: фронтальне, яке характеризує розмір клітин, та ортогональне, яке характеризує щільність цитоплазми клітини, тобто, гранулярність тромбоцитів.

В пробірку для протокового цитофлуориметра вносили 1 мл ЗТПК, 3 мкл 0,5 М CaCl₂. Активацію тромбоцитів ініціювали внесенням тромбіну 0,25НН в 0,05 М трис-НСІ буфері, рН 7,4 з 0,13 М NaCl. Тромбоцити з активатором інкубували при температурі 25 °С впродовж 5 хв. Параметри активації тромбоцитів, зміну розміру та гранулярності тромбоцитів, фіксували за зміною фронтального та ортогонального світлорозсіювання (Рис. 3.15)

Показано, що інгібітор №9 пригнічував процес активації тромбоцитів тромбіном (рис 3.15 А, Б). У контрольних щурів внутрішньовенне введення DMSO не впливало на ці параметри (Рис. 3.15 В, Г).

Тромбін запускає процес активації тромбоцитів шляхом розщеплення PAR-4, а для слабкої активації тромбоцитів достатньо розщеплення лише PAR-1. Константа дисоціації тромбіну з PAR коливається в межах 10⁻⁹-10⁻¹⁰ М, тож навіть наномолярні концентрації тромбіну достатні для ініціації активації тромбоцитів, а активовані тромбоцити, в свою чергу, посилюють активацію та агрегацію інших тромбоцитів, а також слугують поверхнею для активації факторів системи гемостазу. Тож ефективне інгібування досліджуваною речовиною процесу активації тромбоцитів тромбіном є додатковим важливим механізмом її прототромбоїчної дії.

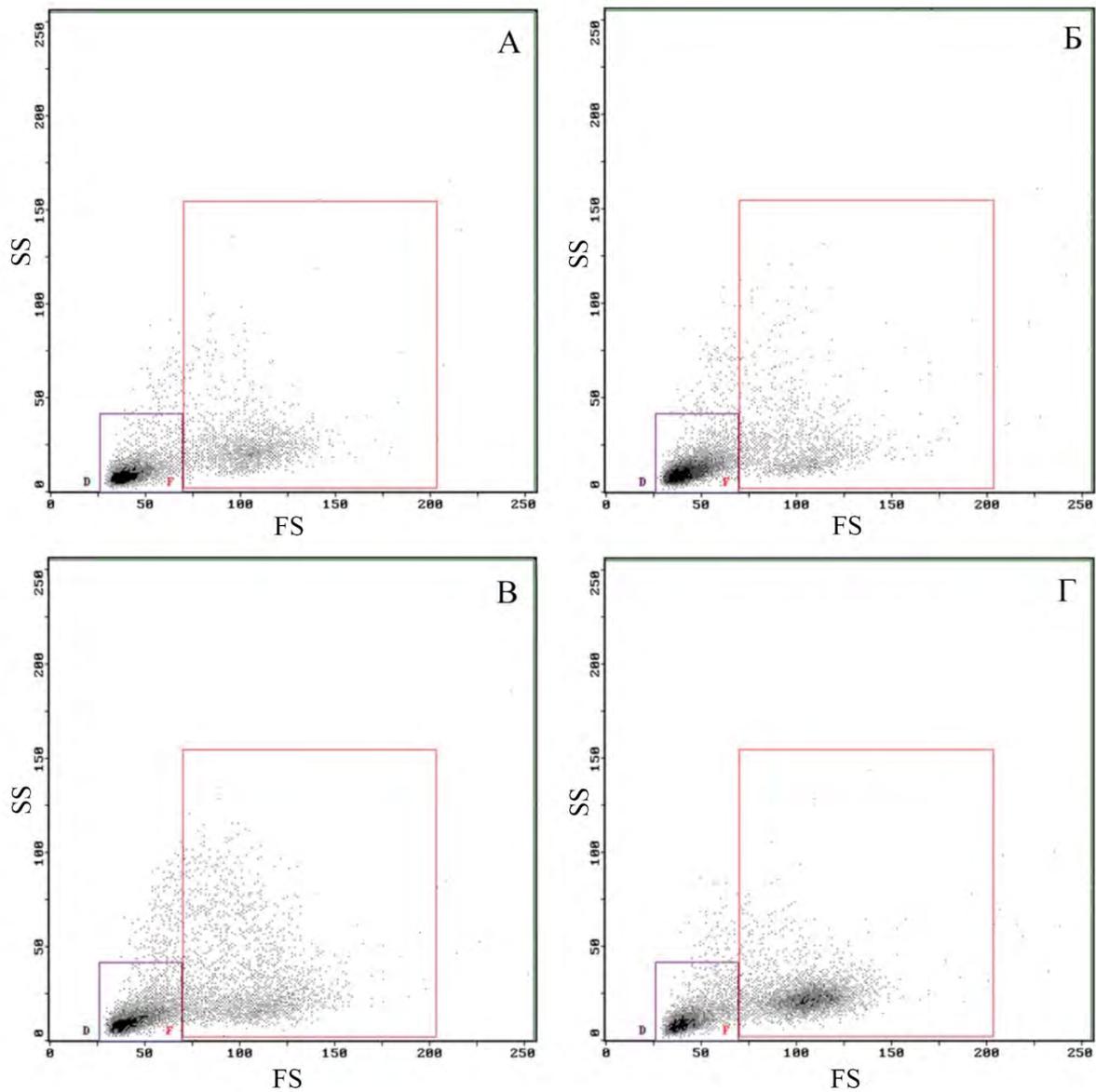


Рис. 3.15 Розподіл тромбоцитів у ЗТПК щурів відповідно до даних проточної цитометрії. FS – фронтальне світлорозсіювання, SS – ортогональне світлорозсіювання.

А. Після внутрішньовенного введення інгібітора № 9 (39.6 % активованих клітин);

Б. Після внутрішньовенного введення інгібітора № 9 та наступної активації ЗТПК 0,5 NIH/ml тромбіну (38.9 % активованих клітин);

В. Контроль (36,2 % активованих клітин);

Г. Контроль після активації ЗТПК 0,5 NIH/ml тромбіну (59,9 % активованих клітин).

Подяка

Автор висловлює щирю подяку к.б.н. Платонову Максиму Олеговичу за допомогу в проведенні аналізу молекулярної динаміки та консультації.

Висновки до розділу 3

За допомогою біоінформатичного аналізу було обрано та синтезовано низькомолекулярні сполуки, специфічні до активного центру тромбіну. Проведений біологічний скринінг *in vitro* дозволив обрати сполуки, які ефективно та селективно інгібували активність тромбіну в плазмі крові, а відтак і запобігали формуванню фібриново-тромбоцитарного тромбу. При внутрішньосудинному введенні низькомолекулярних сполук щурам спостерігали зниження активності тромбіну в плазмі крові щурів, пригнічення АЧТЧ-індукованої агрегації тромбоцитів, повне інгібування тромбін-індукованої агрегації тромбоцитів та інгібування тромбін-індукованої активації тромбоцитів. Це дає підстави стверджувати, що дані сполуки можуть стати основою для створення прототипу високоафінного антитромботичного препарату.

Матеріали розділу представлені в публікаціях [3] **Додатку А.**

РОЗДІЛ 4. ЗАСТОСУВАННЯ АКТИВАТОРУ ПРОТРОМБІНУ У МЕДИЦИНІ

Використання екзогенних активаторів протромбіну для ініціації фібриноутворення відкриває широкі перспективи використання таких препаратів в медицині, зокрема в хірургії. Екстрасудинна активація протромбіну дає змогу запустити безпосередньо процес полімеризації фібрину, оминаючи всі стадії каскаду зсідання, крім того, утворений тромбін стимулює активацію тромбоцитів. Таким чином, фібриноутворення стає контрольованим, швидким та ефективним.

Отрути змій багаті на активатори протромбіну. Вони класифікуються на чотири групи залежно від структури, механізму дії та необхідності кофакторів [125]. Активатори протромбіну груп А та В є Zn^{2+} -координуючі металопротеїнази, тоді як активатори протромбіну груп С та D є сериновими протеїназами. Активатори протромбіну групи А не потребують участі допоміжних факторів і гідролізують Arg320–Ile321 зв'язок протромбіну з утворенням мезотромбіну, який автокаталітично перетворюється на тромбін (наприклад esarin з отрути *Echis carinatus*). Активатори протромбіну групи В є Ca^{2+} -залежними двоходоменними металопротеїназами, які реалізують активацію також через мезотромбін, як проміжний продукт (наприклад carinactivase-1 з отрути *Echis carinatus* та екамулін з отрути *Echis multisquamatus*) [126, 127]. Важливо, що активатори протромбіну груп А і В здатні активувати не лише інтактний протромбін, але й його функціонально неактивні форми – декарбоксілований протромбін та претромбін-1. Активатори протромбіну групи С нагадують комплекс фактора Ха-фактора Va ссавців (наприклад, Oscutarin C з отрути *Oxyuranus scutellatus* та Pseutarin C з отрути *Pseudonaja textilis*), тоді як активатори групи D структурно та функціонально подібні до фактора Ха (активатор з отрути *Australian elapids*).

В якості екзогенного активатора протромбіну було обрано екамулін – ензим з отрути *Echis multisquamatus*, що показав себе ефективним активатором

протромбіну в попередніх дослідженнях [93]. Зокрема було запропоновано модифікувати карбоновий матеріал АУВМ «Дніпро»-МН (розроблений в Інституті експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, Україна) екамуліном, що надавала йому гемостатичних властивостей.

4.1 Кровоспинні засоби

Біоматеріали широко використовуються в медицині як терапевтичні матеріали, зокрема сорбенти, перев'язувальні засоби, неспецифічні кровоспинні засоби, опорний матеріал для тканин, у тому числі остеоопора для хірургії, стоматології, ортопедії, травматології тощо. Ці матеріали можуть бути отримані з природних джерел, синтетичних, напівсинтетичних та гібридних джерел [128 - 130]. Біоматеріали можна класифікувати різними способами, відповідно до їх функціональності в організмі людини та властивостей матеріалу. Класифікація, заснована на реакції тканин організму, розрізняє біоінертні, біоактивні та біоматеріали, здатні до біорозкладання [131, 132].

За біореактивністю біоматеріали можуть бути біоінертними та біоактивними [133, 134].

Біоінертні біоматеріали, які після введення не завдають шкоди організму, це нержавіюча сталь, титан, глинозем, цирконій, надвисокомолекулярний поліетилен, целюлозне волокно, гідроксиапатит.

Біоактивні біоматеріали викликають специфічну біологічну відповідь, таким чином не призводячи до утворення фіброзного шару, і здатні взаємодіяти з біологічним середовищем. Біоактивні біоматеріали можуть бути природними (мінеральна матриця бичачої кістки, гіалуронова кислота, колаген, желатин, фібрин, агароза, альгінат, хітозан, шовк) або синтетичними (кераміка, метали, полімери, гідрогелі та композити).

За часом використання біоматеріали можна розділити на постійні та тимчасові. Тимчасові біоматеріали бувають здатними до біодеградації (матеріали, які можна наносити на полімери та тверді пристрої, які піддаються

дисперсії *in vivo* в результаті макромолекулярної деградації) та біологічно абсорбовані (матеріали, які можуть розчинятися в рідинах організму без руйнування макромолекулярного ланцюга або зменшення молекулярної маси). [135, 136]. Біоматеріали здатні до біодеградації – це природні та біосумісні речовини, отримані з рослинних і тваринних джерел [137, 138]. Природними біоматеріалами є протеїни (наприклад, колаген, фібрин, еластин, шовк), полісахариди (наприклад, целюлоза, декстран, хітозан і глікозаміноглікани) і біоморфний вуглецевий матеріал рослинного походження [139]. Природні біоматеріали можуть імітувати склад позаклітинного матриксу та містити внутрішні біологічні ознаки, які забезпечують сприятливе середовище для застосування в тканинній інженерії [137].

Здатність біоматеріалів додатково виконувати кровоспинну функцію надзвичайно важлива для хірургії та травматології.

Для здійснення гемостазу переважно використовують природні полімери, синтетичні полімери, неорганічні матеріали та металовмісні матеріали [10, 11, 140]. Природні полімери, які використовуються в медицині для зупинки кровотечі, включають хітозан, целюлозу, гіалуронову кислоту, альгінат, колаген і фібрин. Для виготовлення синтетичних кровоспинних матеріалів використовують пептиди, поліетиленгліколь, поліуретан, полівініловий спирт, полікапролактон і поліетиленоксид. Добре вивчені гемостатичні матеріали на основі полісахаридів включають хітозан, целюлозу, гіалуронову кислоту та альгінат. Вони нетоксичні для тканин людини, не мають подразнюючої, гемолітичної та імуногенної дії, натомість гістосумісні та розкладаються природним шляхом. Однак механізм їх дії на гемостаз є неспецифічним.

За механізмом дії гемостатичні матеріали поділяються на три категорії: концентратори факторів, прокоагулянти та мукоадгезивні агенти [10]. Хітозан (прокоагулянт) опосередковано стимулює агрегацію тромбоцитів і є негативно зарядженою поверхнею для активації факторів зсідання крові [11, 12]. Целюлоза та гіалуронова кислота (концентратори факторів) фізично зупиняють кровотечу шляхом швидкого поглинання води та концентрування компонентів крові в місці

пошкодження. [13]. Альгінат (мукоадгезивний агент) забезпечує фізичний бар'єр для кровотоку шляхом перехресного зв'язування компонентів крові [10], проявляє клітинну хемотаксичну активність. Крім того, він має високу абсорбцію і може підвищувати концентрацію тромбоцитів, факторів зсідання та локальну концентрацію Ca^{2+} [11]. Колаген одночасно забезпечує адсорбування та активує тромбоцити [11, 13, 14].

Жоден із сучасних гемостатичних засобів не відповідає всім критеріям ідеального гемостатичного засобу [140].

Тому нами запропоновано модифікувати біоматеріали екамуліном (активатором протромбіну з отрути *Echis multisquamatis*). Екамулін специфічно та ефективно активує протромбін з утворенням тромбіну [141]. Тромбін є центральним ензимом системи коагуляції, який перетворює фібриноген у фібрин, активує тромбоцити та фактори каскаду зсідання крові. Таким чином, модифікація біоматеріалів екамуліном може надати їм специфічних прокоагулянтних властивостей.

Модифікація біоматеріалів

Нами було вивчено прокоагулянтні властивості біоінертних (целюлозне волокно, гідроксиапатит), біоактивних (вуглецевий сорбент, діоксид кремнію) та біорозкладних (колаген, желатин) біоматеріалів після модифікації екамуліном.

Екамулін іммобілізували на біоматеріалах нековалентно – за рахунок фізичної взаємодії. Стійкість нековалентної іммобілізації екамуліну на біоматеріалах визначали шляхом вимірювання його вимивання фізіологічним розчином. У таблиці 4.1 представлена амідолітична активність екамуліну, вимитого з модифікованих біоматеріалів. Як позитивний контроль використовували розчин екамуліну (400 мкл, 8 мкг/мл), що відповідає кількості активатора протромбіну, нанесеного на біоматеріали.

Таблиця 4.1

Амідолітична активність екамуліну, що вимивається при інкубації модифікованого біоматеріалу в фізіологічному розчині

№ п.п.	Біоматеріал	о.о./хв
1	Колаген	0,027 ± 0,005*
2	Желатин	0,070 ± 0,011*
3	Целюлозний матеріал	0,299 ± 0,015
4	Гідроксиапатит	0,252 ± 0,020
5	Карбоновий сорбент	0,016 ± 0,005*
6	Діоксид кремнію	0,010 ± 0,007*
7	Позитивний контроль (екамулін)	0,300 ± 0,027

* – за тестом Манна-Уїтні результат достовірний при $p < 0,05$, порівняно з позитивним контролем.

Як видно з таблиці 4.1, зв'язування екамуліну з целюлозним волокном і гідроксиапатитом було низьким, і екамулін вимивався. Інші біоматеріали надійно утримували екамулін за рахунок фізичних взаємодій.

Аналогічно визначали вимивання нековалентно іммобілізованого екамуліну з фібринового згустку, утвореного за присутності модифікованих біоматеріалів. У таблиці 4.2 представлена амідолітична активність екамуліну, вимитого з фібринового згустку.

Як видно з таблиці при утворенні згустку модифікованим колагеном та вуглецевим сорбентом екамулін не виходив із згустку. Таким чином лише ці два біоматеріали, модифіковані екамуліном можуть успішно використовуватись як гемостатичні засоби без додаткової хімічної обробки, направленої на міцне зв'язування екамуліну (наприклад, ковалентної прошивки).

Таблиця 4.2

Амідолітична активність екамуліну, що вимивається при інкубації фібринового згустку, утвореного модифікованим біоматеріалом у фізіологічному розчині

№ п.п.	Біоматеріал	о.о./хв
1	Колаген	0,018 ± 0,005*
2	Желатин	0,159 ± 0,031*
3	Целюлозний матеріал	0,104 ± 0,016*
4	Гідроксиапатит	0,091 ± 0,030*
5	Карбоновий сорбент	0,072 ± 0,005*
6	Діоксид кремнію	0,178 ± 0,025*
7	Позитивний контроль (екамулін)	0,297 ± 0,027

* – за тестом Манна-Уїтні результат достовірний при $p < 0,05$, порівняно з позитивним контролем.

На ЗТПК людини було показано, що біоматеріали, модифіковані екамуліном, мають прокоагулянтну дію та стимулюють агрегацію тромбоцитів (рис. 4.1). В якості контролю використовували еквівалентну кількість немодифікованого біоматеріалу. Як видно з рисунку, усі біоматеріали, модифіковані екамуліном, показали сильну прокоагулянтну активність у ЗТПК людини.

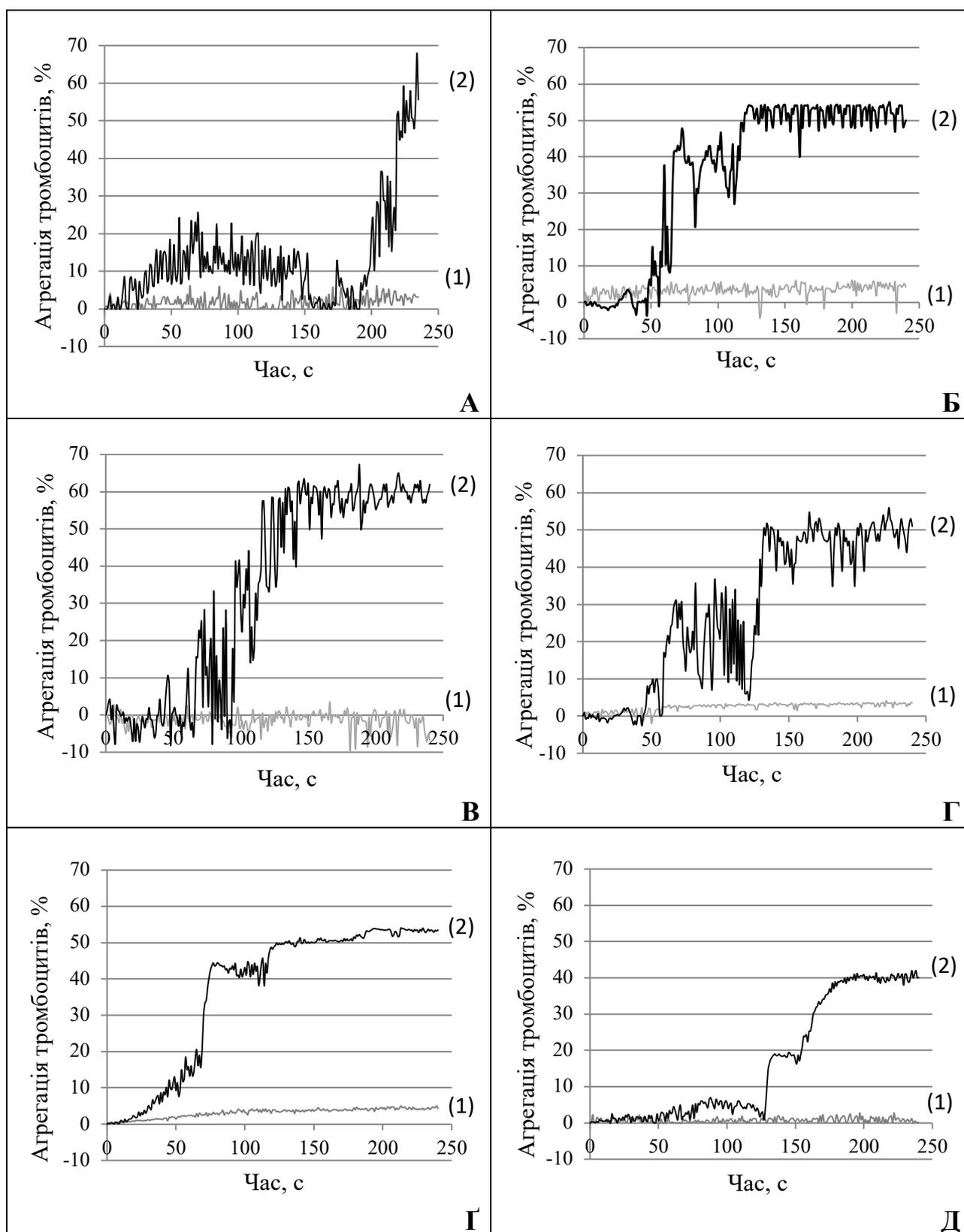


Рис. 4.1. Агрегатометрія збагаченої тромбоцитами плазми крові людини у присутності немодифікованих (1) та модифікованих екамуліном (2) біоматеріалів: А – колаген, Б – желатин, В – целюлозне волокно, Г – гідроксиапатит, Г – вуглецевий сорбент, Д – діоксид кремнію.

Гемостатичну дію біоматеріалів, модифікованих екамуліном, було також перевірено на моделі паренхіматозної кровотечі щурів *in vivo*. Випробовували біоматеріали, які володіють власною неспецифічною прокоагулянтною активністю та міцно зв'язували екамулін: модифікований екамуліном колаген, желатин, вуглецевий сорбент і діоксид кремнію. Модифіковане екамуліном целюлозне волокно та гідроксиапатит не тестувалися, оскільки зв'язування екамуліну з цими біоматеріалами було низьким (таблиця 4.1). В якості контролю використовували еквівалентну немодифіковану кількість біоматеріалу.

Як видно з рис 4.2 модифіковані екамуліном біоматеріали мають прокоагулянтну активність *in vivo* на моделі паренхіматозної кровотечі у щурів. Модифікований вуглецевий сорбент значно скорочує час кровотечі *in vivo* на моделі паренхіматозної кровотечі, порівняно з «чистим» вуглецевим сорбентом. Модифікований діоксид кремнію значно зменшує кількість кровотечі в моделі паренхіматозної кровотечі *in vivo*, порівняно з «чистим» діоксидом кремнію. Модифікований желатин несуттєво зменшує час і кількість кровотечі *in vivo* в цій моделі, порівняно з «чистим» желатином.

Обсяг кровотечі в першу чергу залежить від механізму гемостатичної дії вихідного біоматеріалу, що використовується. Зокрема, концентратори факторів (вуглецевий сорбент [142]), завдяки здатності до сорбції, наповнюються кров'ю і тому об'єм кровотечі в перші секунди застосування перед зупинкою крові може бути значним. Водночас, прокоагулянти (желатин [143]) не накопичують у собі кров і тому, попри менш ефективний гемостаз, на початку застосування не демонструють збільшення об'єму крововтрати. На нашу думку, більш інформативним параметром для оцінки гемостатичної дії біоматеріалів є час кровотечі.

Таким чином, носієм екамуліну можуть бути різні види біоматеріалів. Поєднання біоматеріалів з активатором протромбіну створює новий матеріал, який зберігає властивості носія і надає йому сильні прокоагулянтні властивості. Колаген і вуглецевий сорбент після модифікації міцно зв'язують екамулін і не

дають йому вийти з тромбу. Тому модифікований колаген і вуглецевий сорбент є перспективними кровоспинними засобами для використання в хірургії.

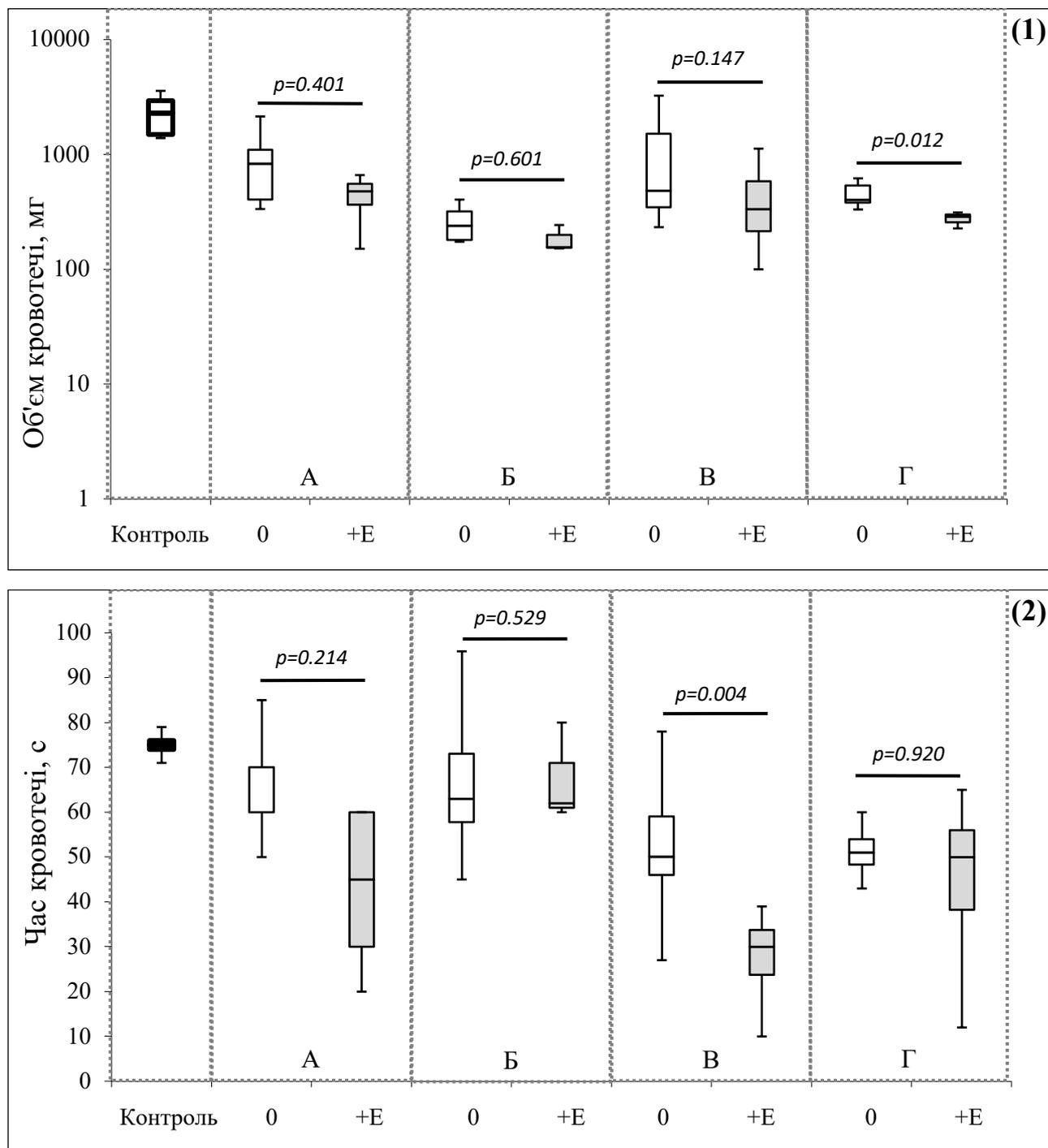


Рис 4.2. Об'єм (1) та час (2) кровотечі при застосуванні немодифікованих (0) та модифікованих екамуліном (+E) біоматеріалів: А – колаген, Б – желатин, В – вуглецевий сорбент, Г – діоксид кремнію.

Контроль – час кровотечі без застосування гемостатичних матеріалів.

4.2. Клінічні випробування модифікованого екамуліном карбонового сорбенту

Раніше в дослідженнях *in vitro* та *in vivo*, було показано, що модифікований екамуліном вуглецевий сорбент АУВМ «Дніпро»-МН – композит адсорбційний гемостатичний аплікаційний «Карбогемостат» (далі – «Карбогемостат») є ефективним гемостатичним перев'язувальним засобом для зупинки кровотечі на моделі гострої судинної кровотечі щурів; моделі печінкової кровотечі у щурів та моделі кровотечі з стегнової артерії свиней [141].

Зважаючи на перспективність застосування «Карбогемостату», на базі ДП «Науковий центр превентивної токсикології, харчової та хімічної безпеки імені академіка Л.І. Медведя Міністерства Охорони Здоров'я України», відповідно до стандартів GLP було проведено доклінічні дослідження (Заключний звіт – Додаток Б)

Санітарно-хімічні дослідження показали, що рівні потенційної міграції шкідливих хімічних речовин у воду із зразків «Карбогемостату» не перевищували гігієнічних регламентів. За санітарно-хімічними показниками «Карбогемостат» відповідає вимогам ДСТУ EN ISO 10993-13:2015.

Випробування на цитотоксичність *in vitro* показали, що водні змиви зі зразків «Карбогемостату» не цитотоксичні та відповідають вимогам ДСТУ EN ISO 10993-13:2015.

Випробування на подразнюючу дію показали, що «Карбогемостат» не викликає подразнення шкіри у експериментальних тварин. За показником подразнюючої дії зразки відповідають вимогам ДСТУ EN ISO 10993-10-2004.

Випробування на сенсibilізацію показали, що «Карбогемостат» не викликає сенсibilізацію у експериментальних тварин. За показником сенсibilізуючої дії зразки відповідають вимогам ДСТУ EN ISO 10993-10-2004.

Мікробіологічні дослідження показали відсутність аеробних та анаеробних бактерій, а також грибів у засівах зі зразків «Карбогемостату». Вироби стерильні і відповідають вимогам стерильності для медичних виробів відповідно до ДФУ 2.0.

Успішні доклінічні випробування стали передумовою для проведення клінічних досліджень «Карбогемостату».

На базі поліклінічного відділення Київського міського клінічного ендокринологічного центру, було проведено відкрите, одноцентрове, проспективне, рандомізоване, контрольоване паралельне дослідження ефективності та безпечності застосування виробу медичного – композиту адсорбційного гемостатичного аплікаційного «Карбогемостат» для зупинки артеріальних кровотеч, зокрема за антитромботичної терапії (Заключний звіт про проведене клінічне випробування; Код дослідження K1.2020 – **Додаток В**). До випробувань були залучені пацієнти, що проходять курс антикоагулянтної терапії та пацієнти, що не приймають антикоагулянти. До дослідження були залучені пацієнти, які мають зовнішню свіжу чи інфіковану рану кінцівок, що супроводжується артеріальною та профузною кровотечами і потребує зовнішнього застосування перев'язувального матеріалу з кровоспинною активністю. Контрольній групі пацієнтів було застосовано тиснучу пов'язку для зупинки кровотечі.

Первинною ціллю дослідження була демонстрація безпечності «Карбогемостату», тому первинною кінцевою точкою було обрано розвиток у пацієнтів побічних явищ, пов'язаних із застосуванням медичного виробу, що можуть нанести шкоду здоров'ю та життю пацієнта, а також неможливість припинити кровотечу впродовж години чи коли об'єм кровотечі загрожує життю та здоров'ю пацієнта.

Вторинною ціллю була демонстрація ефективності гемостатичних властивостей «Карбогемостату», тому вторинною кінцевою точкою було обрано отримання даних щодо часу та повторюваності кровотечі, наявності запальних процесів на рановій поверхні та суб'єктивного стану пацієнта після доби із часу застосування «Карбогемостату».

Загалом у дослідженні взяли участь 40 пацієнтів, з них 10 осіб, що не приймали антикоагулянти і отримали «Карбогемостат» в якості кровоспинного засобу, 10 осіб, які приймали антикоагулянти і отримали «Карбогемостат» в

якості кровоспинного засобу, 10 осіб, що не приймали антикоагулянти і яким зупинку кровотечі проводили з використанням тиснучої пов'язки, 10 осіб, які приймали антикоагулянти і яким зупинку кровотечі проводили з використанням тиснучої пов'язки.

Для оцінки ефективності було заплановано проаналізувати час зупинки кровотечі в досліджуваній групі та в групі порівняння, а також зібрати дані про можливі повторні кровотечі.

Як в досліджуваній групі пацієнтів, так і в групі порівняння незалежно від проведення антикоагулянтної терапії, повторні кровотечі були відсутні.

Визначення точного часу зупинки кровотечі у пацієнтів всіх груп було утруднено за рахунок локалізації артеріальної кровотечі глибоко відносно шкірних покривів (Рис 4.3). Однак, було зафіксовано, що кровотеча зупинялась у всіх пацієнтів упродовж не більше як 3 хвилин з моменту застосування досліджуваного виробу або тиснучої пов'язки. Час реєстрації зупинки кровотечі (3 хвилини) було обрано відповідно до Інструкції з застосування досліджуваного виробу.

У рамках даного дослідження показано, що «Карбогемостат» зупиняв кровотечу у всіх пацієнтів досліджуваної групи, незалежно від антикоагулянтної терапії, впродовж не більше як 3 хвилини, що відповідає заявленим властивостям.

Досліджуваний виріб був не менш ефективним, порівняно з тиснучою пов'язкою.



16/К



21/К

Рис. 4.3. Типове фото застосування досліджуваного виробу. Пацієнти з рандомізаційними номерами 16/К та 21/К

Для доведення безпечності було заплановано провести порівняння стану системи гемостазу до та після використання перев'язувального матеріалу («Карбогемостату» - для досліджуваної групи, та тиснучої пов'язки – для групи порівняння). Зокрема було заплановано визначити такі параметри: протромбінний індекс (ПІ), активований частковий тромбoplastиновий час (АЧТЧ) та рівень розчинних фібрин-мономерних комплексів (РФМК) в плазмі крові пацієнтів. Крім того, було заплановано зібрати дані щодо стану ранової поверхні після використання перев'язувального матеріалу (зокрема відмітити появу подразнення прилеглих тканин, появу некрозу, запалення, струпу).

Було показано, що значення ПІ недостовірно знижувалось після застосування досліджуваного виробу (рис. 4.4 А) у пацієнтів, які не отримували антикоагулянтної терапії. Показники ПІ до та після застосування «Карбогемостату» достовірно не відрізнялись від таких до та після застосування тиснучої пов'язки. Так само, достовірної відмінності в значенні ПІ не спостерігали в групі пацієнтів, які отримували антикоагулянти (рис 4.5 А). В той же час слід відмітити, що тенденція до зниження ПІ у групі пацієнтів, яким був застосований «Карбогемостат», порівняно з групою порівняння, була вираженішою на тлі антикоагулянтної терапії.

Час зсідання плазми крові в тесті АЧТЧ незначно подовжувався як в досліджуваній групі, так і в групі порівняння до та після зупинки кровотечі (рис. 4.4 Б). Відмінності не були достовірними. На тлі антикоагулянтної терапії відмінності у зміні АЧТЧ до та після зупинки кровотечі у досліджуваній групі та групі порівняння також не були достовірними (рис. 4.5 Б). Однак, тенденція до подовження АЧТЧ в групі пацієнтів, яким був застосований «Карбогемостат», порівняно з пацієнтами, яким була накладена тиснуча пов'язка, була менш вираженою на тлі антикоагулянтної терапії.

Рівень РФМК не достовірно підвищувався, як у пацієнтів групи порівняння, так і у пацієнтів дослідної групи після зупинки кровотечі (рис. 4.4 В). На фоні антикоагулянтної терапії рівень РФМК у дослідної групи залишався сталим до та після зупинки кровотечі (при оцінці медіани цього параметру), в той час як в групі порівняння рівень РФМК не достовірно підвищувався (рис. 4.5 В).

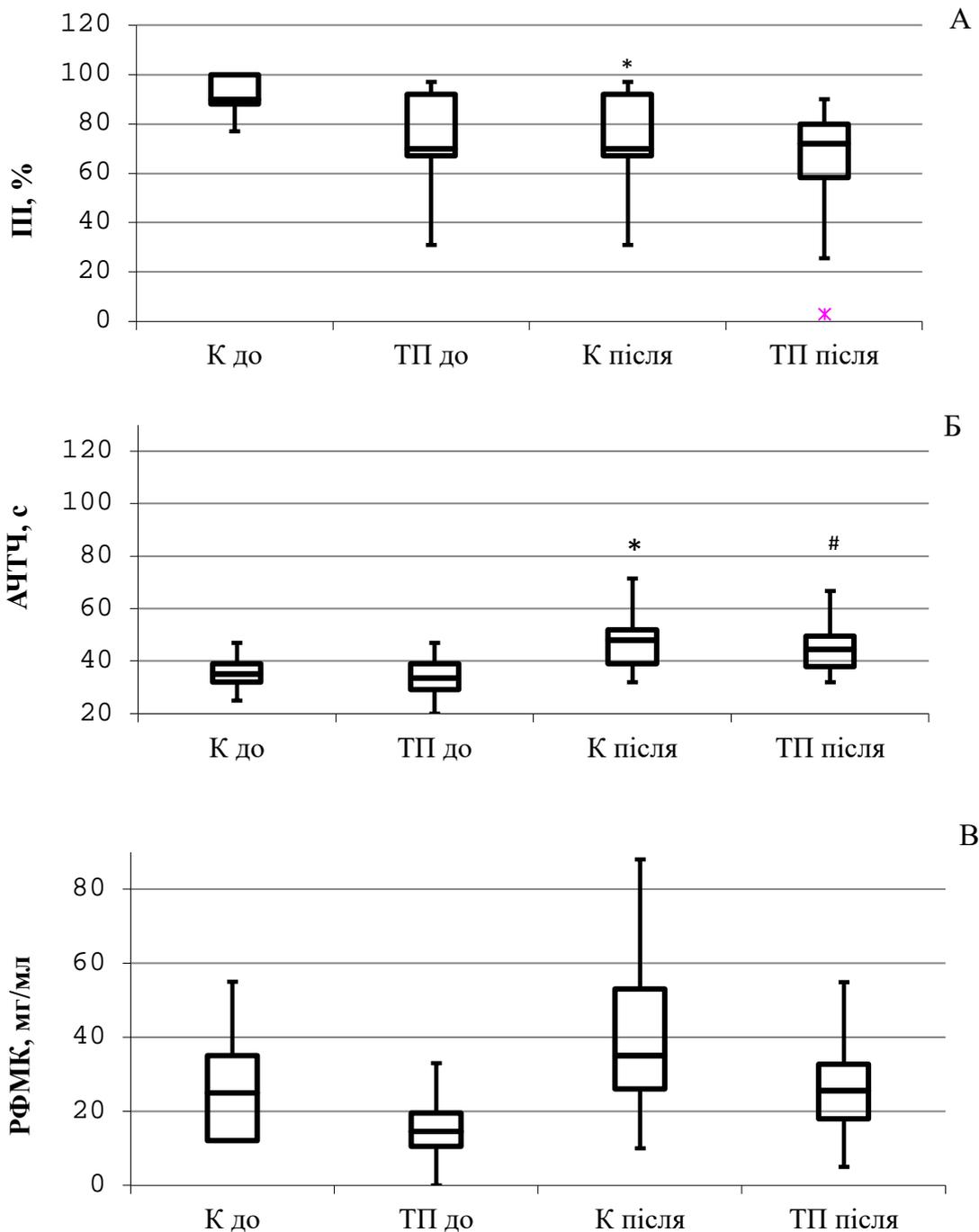


Рис. 4.4. Ш (А), АЧТЧ (Б), РФМК (В) плазми крові пацієнтів, які не приймали антикоагулянти (група N). Показники до застосування Карбогемстату (К до), до застосування тиснучої пов'язки (ТП до), після застосування «Карбогемостату» (К після) та після застосування тиснучої пов'язки (ТП після). К – «Карбогемостат», ТП – тиснуча пов'язка.

* – за тестом Манна-Уїтні результат достовірний при $p < 0,05$, порівняно з групою К до.

– за тестом Манна-Уїтні результат достовірний при $p < 0,05$, порівняно з групою ТП до.

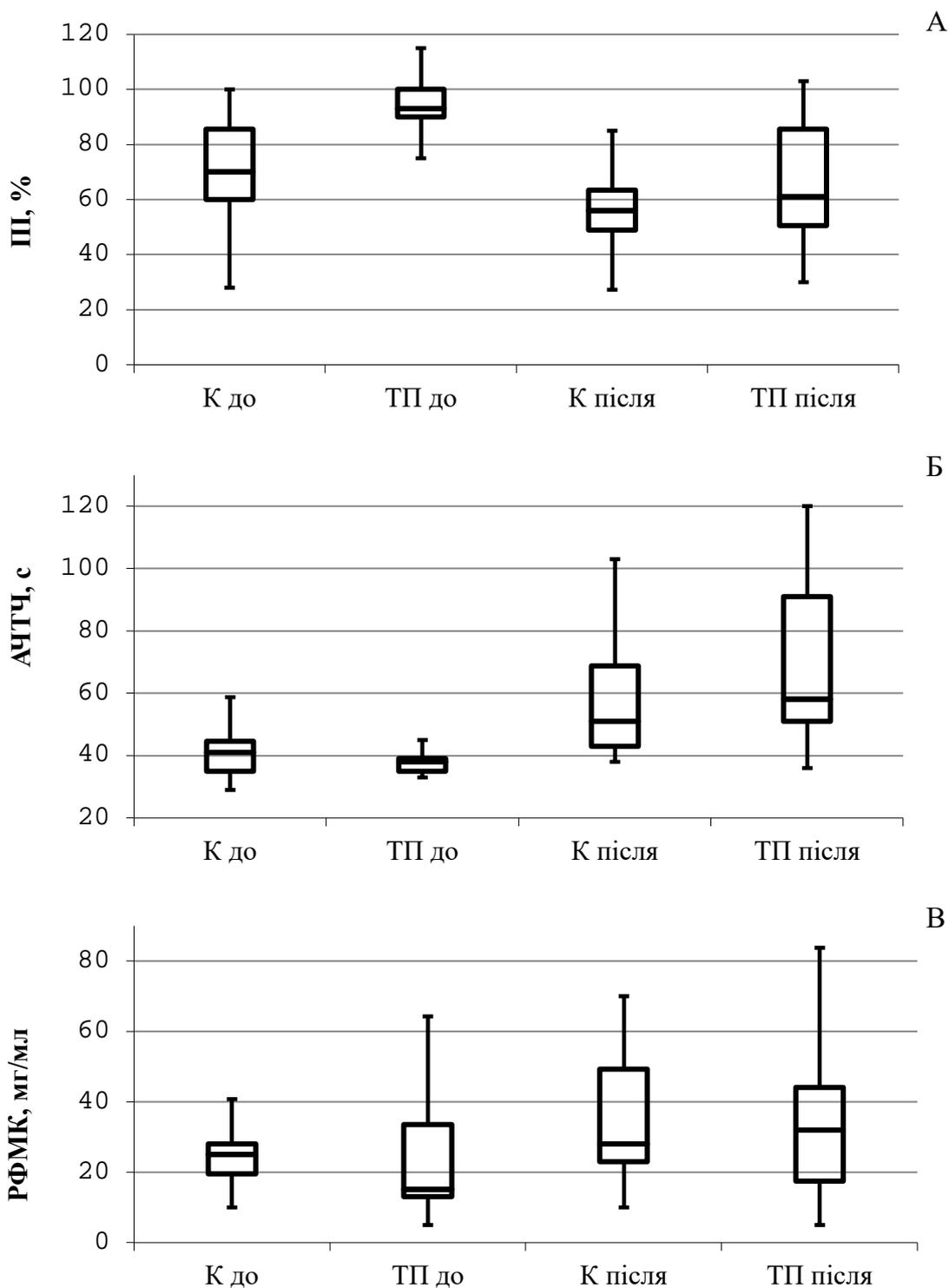


Рис. 4.5. ПТ (А), АЧТЧ (Б), РФМК (В) плазми крові пацієнтів, яким проводили антикоагулянтну терапію (група А). Показники до застосування Карбогемстату (К до), до застосування тиснучої пов'язки (ТП до), після застосування «Карбогемостату» (К після) та після застосування тиснучої пов'язки (ТП після). К – «Карбогемостат», ТП – тиснуча пов'язка
* – за тестом Манна-Уїтні результат достовірний при $p < 0,05$, порівняно з групою К до.

Клінічні дослідження реакцій системи зсідання крові показали, що використання «Карбогемостату» є безпечним, а визначені зміни параметрів гемостазу після використання досліджуваного виробу ідентичні до таких при використанні тиснучої пов'язки.

Серйозні побічні явища, а також серйозні побічні реакції у пацієнтів, що взяли участь в клінічному дослідженні, були відсутні. Незначне подразнення, що проявлялось в почервонінні навколоранової ділянки, спостерігалось у 36 % пацієнтів досліджуваної групи та у 41 % пацієнтів групи порівняння. У зв'язку з тим, що почервоніння спостерігали в однаковій мірі в досліджуваній групі та в групі порівняння, воно не є наслідком використання того чи іншого перев'язувального матеріалу, а отже не є побічною реакцією на використання «Карбогемостату».

Таким чином проведене клінічне дослідження «Відкрите, одноцентрове, проспективне, рандомізоване, контрольоване паралельне дослідження ефективності та безпечності застосування виробу медичного – композиту адсорбційного гемостатичного аплікаційного «Карбогемостат» для зупинки артеріальних кровотеч, зокрема за антитромботичної терапії» показало безпечність та ефективність «Карбогемостату» для зупинки кровотеч навіть за умови антитромботичної терапії. На сьогодні «Карбогемостат» успішно впроваджено на базі Київського міського клінічного ендокринологічного центру (Акт впровадження – Додаток Г).

4.3 Колагенова матриця (КМ)

За результатами досліджень на модельних системах *in vitro* та *in vivo* було продемонстровано ефективність використання колагену модифікованого екамуліном для зупинки кровотеч і, відповідно, його перспективність для застосування в медицині, зокрема в хірургії.

Зважаючи на це, було розроблено оптимальні умови отримання колагенової матриці (КМ), зокрема підібрано оптимальну концентрацію колагену – 3 мкг/см² ліофільно висушеної колагенової матриці (Рис. 4.6).

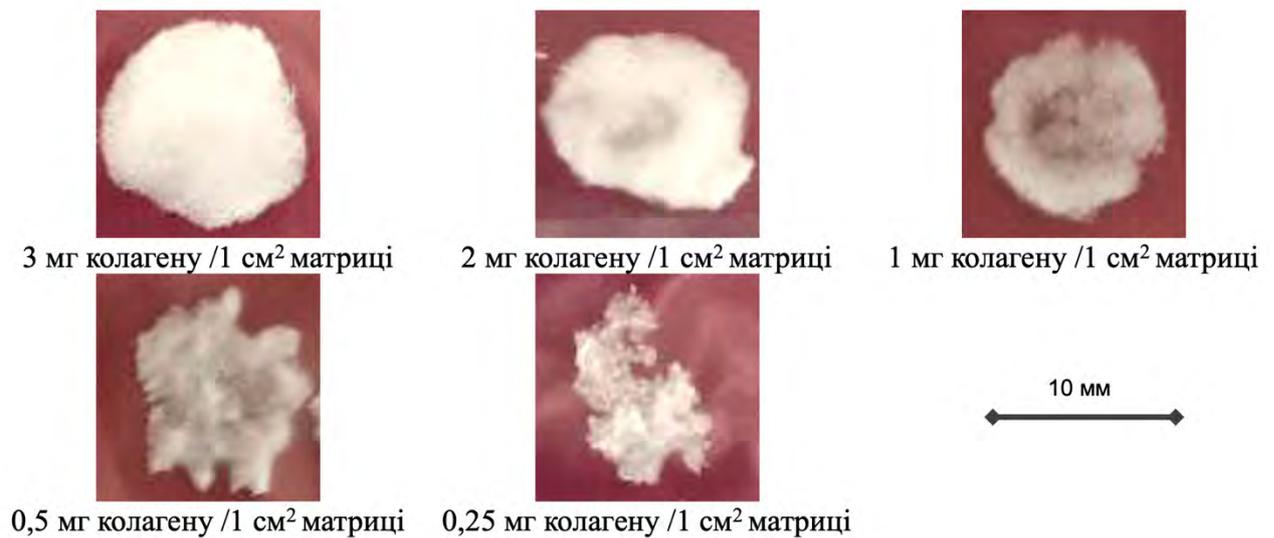


Рис. 4.6. Зразки колагенових матриць отриманих шляхом ліофільного висушування розчину колагену з різною кількістю колагену на площі 1 см² матриці.

Крім того, на моделі паренхіматозної кровотечі у щурів було підібрано оптимальний вміст екамуліну, що складав 10 мкг/см² та забезпечував достовірно швидку зупинку кровотечі (рис. 4.7)

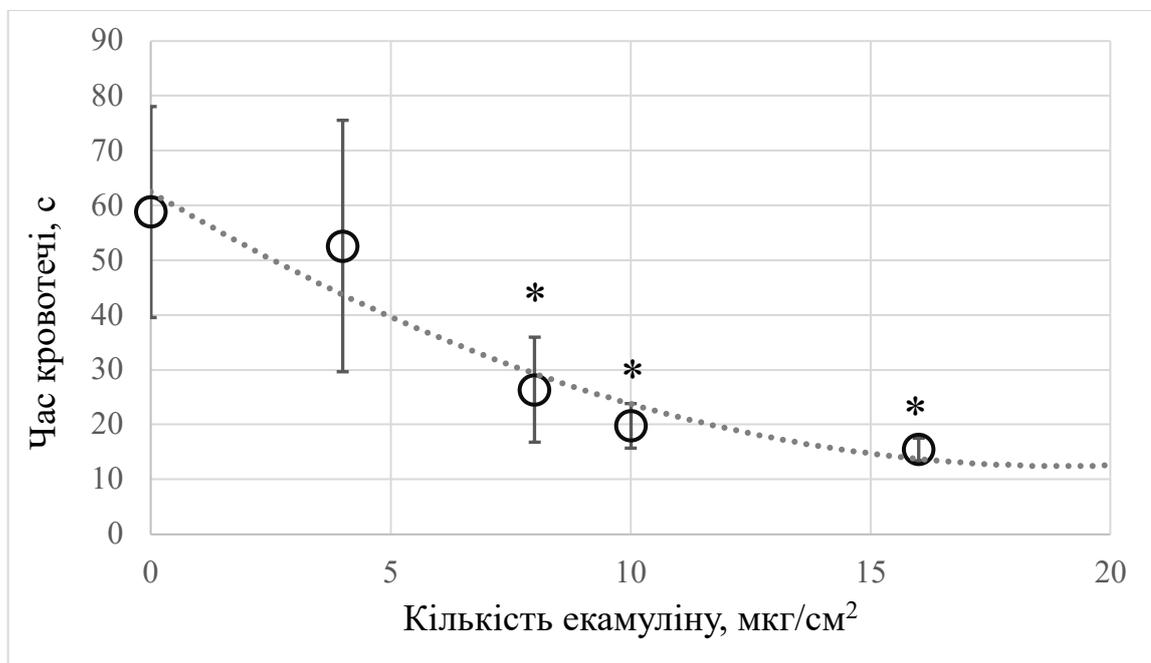


Рис. 4.7. Залежність часу зупинки кровотечі від кількості екамуліну на 1 см² колагенової матриці на моделі паренхіматозної кровотечі у щурів.

* – за тестом Манна-Уїтні результат достовірний при $p < 0,05$, порівняно з часом кровотечі при використанні колагенової матриці без активатора.

Для використання в хірургії КМ мають бути стерильними, однак стерилізація колагену утруднена. Радіаційна стерилізація спричиняє ковалентну прошивку колагену, що проявляється в зміні фізичних властивостей та утруднені деградації цього біоматеріалу. Стерилізація фільтрацією можлива лише для низькомолекулярного колагену, однак колаген молекулярною масою біля 300 kDa за рахунок своєї четвертинної структури не проходить через фільтри з порами 0,45 мкм чи 0,2 мкм. Нами було запропоновано стерилізувати колаген після ліофільного висушування шляхом експозиції в ультрафіолеті. Такий спосіб стерилізації не змінював фізичні властивості КМ та виявився недостатньо ефективним. Як видно з таблиці 4.4, оброблені таким способом КМ не були стерильні, відповідно до результатів санітарно-мікробіологічного дослідження. Автоклавовання та пастеризація колагену давала змогу отримати стерильні препарати, які після ліофілізації та подальшої обробки ультрафіолетом КМ забезпечували стерильність. Зважаючи на те що автоклавовання потребує меншої затрати ресурсів та часу, порівняно з пастеризацією, нами було обрано автоклавовання з подальшою ліофілізацією та обробкою ультрафіолетом як спосіб стерилізації КМ.

Таблиця 4.4

Кількість колоній утворюючих одиниць (КУО) при бактеріальному посіві КМ за різних способів стерилізації

Спосіб стерилізації	КУО/см ²
Не стерилізований	100
Стерилізований після ліофілізації ультрафіолетом	10
Пастеризація	стерильно
Автоклавовання	стерильно
Пастеризація з подальшою ліофілізацією та обробкою ультрафіолетом	стерильно
Автоклавовання з подальшою ліофілізацією та обробкою ультрафіолетом	стерильно

Однією з функцій МЕКМ може бути локальна доставка та утримання терапевтичних речовин, зокрема антибактеріальних. Було апробовано виготовлення МЕКМ з додаванням повідон-йоду (10 % від сухої маси колагенової матриці) та антибіотика цефтіофуру (5 % від сухої маси колагенової матриці). Повідон-йод та цефтіофур були додані у концентраціях, що є загальноприйнятими в лікарській практиці. Як видно з рис. 4.8., дані добавки (у кількості, що відповідають вмісту повідон-йоду або цефтіофуру на 1 см² МЕКМ) не впливали на здатність екамуліну (10 мкг, що відповідає його вмісту на 1 см² МЕКМ) забезпечувати зсідання крові.

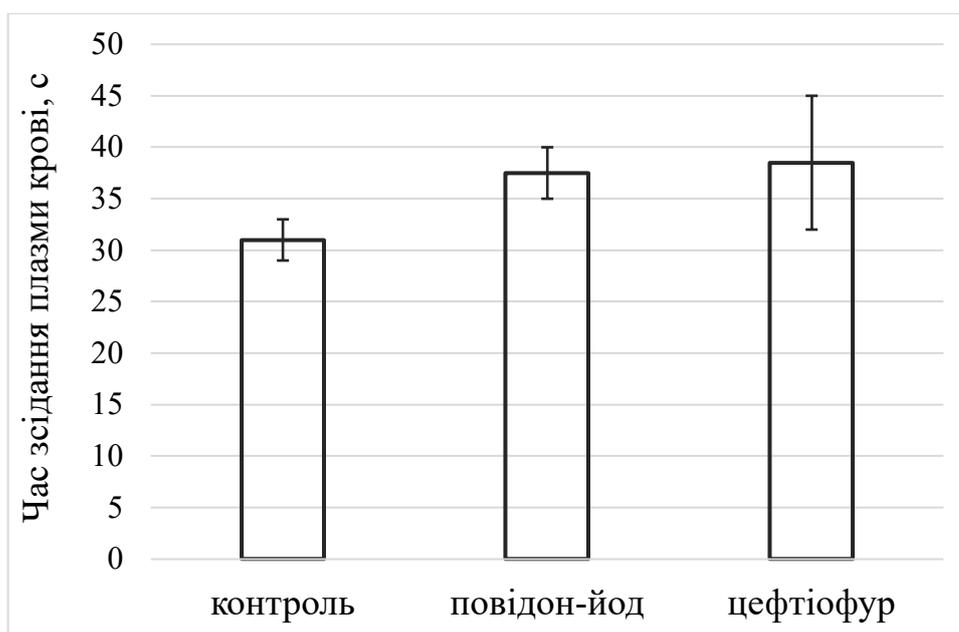


Рис. 4.8. Час зсідання плазми крові за дії 10 мкг екамуліну (контроль) в присутності добавок (повідон-йоду та цефтіофуру).

Ці та інші умови отримання колагенових матриць було викладено в Лабораторному регламенті виробництва Колагенової матриці, модифікованої ензимним активатором зсідання крові (Лабораторний регламент №1/23 (редакція 2), Додаток Г). Відповідно до Лабораторного регламенту було виготовлено експериментальну партію КМ та модифікованих екамуліном колагенових матриць (МЕКМ) для проведення доклінічних досліджень безпечності та ефективності використання МЕКМ в хірургії.

Колагенову матрицю, вдосконалену активатором зсідання крові, було впроваджено у виробництво на базі ТОВ «КОЛМАТЕК». Було виготовлено дослідну партію зразків для випробувань (Акт впровадження у промислове виробництво – **Додаток Д**).

Колагенову матрицю, вдосконалену активатором зсідання крові з додаванням повідон-йоду та цефтіофуру було успішно впроваджено у ветеринарію для обробки виразки підошви великої рогатої худоби (Акт про впровадження – **Додаток Е**)

4.3.1 Безпечність МЕКМ

На базі ДП «Науковий центр превентивної токсикології, харчової та хімічної безпеки імені академіка Л.І. Медведя Міністерства Охорони Здоров'я України» відповідно до стандартів GLP було проведено доклінічні дослідження місцевої переносимості колагенової матриці модифікованої екамуліном на щурах Wistar Han при підшкірній імплантації (Заключний звіт дослідження 1703/SOP/LET/M144/1 - **Додаток Є**).

Дослідження проводились на щурах самцях Wistar Han (n=15; три групи тварин, по п'ять щурів в групі). Експериментальні дослідження на тваринах виконувались у відповідності до вимог комісії з біоетики Центру превентивної і регуляторної токсикології.

Колагенова матриця, модифікована екамуліном (група 1), і колагенова матриця (група 2), як носій активатора зсідання крові, були імплантовані щурам під шкіру спини в окремі марковані ділянки (1 x 1 см) (у передній зоні спини зліва). В якості контролю реакції шкіри на хірургічне втручання використовували групу тварин, яким не проводилась імплантація колагенової матриці – Контроль (група 3).

У ході дослідження оцінювали загальний клінічний стан щурів (0-21 доба), динаміку маси тіла і її приріст (0, 3, 7, 14, 21 день). Клінічне спостереження за реакцією шкіри на місці імплантації проводилося щоденно. Реєстрували реакцію тварин на процедуру імплантації та місцеву реакцію шкіри через 4 години і в

подальшому щоденно. Після закінчення періоду спостереження (на 21 день) проведено евтаназію вуглекислим газом всіх піддослідних тварин, розтин та макроскопічний огляд тканин, що прилягають до місця імплантації (згідно маркування), а також внутрішніх органів. Було відібрано зразки тканин шкіри у місцях усіх проведених імплантацій і контролі згідно маркування, а також регіональні лімфатичні вузли для гістологічних досліджень. Депарафіновані зрізи тканин фарбувалися за стандартною методикою гематоксиліном та еозином. Дослідження тканин проводили під світловим мікроскопом Zeiss Primo Star, мікрофотографування камерою Canon EOS 1000D (Японія).

За даними проведеного дослідження, загальний стан тварин за показниками клінічного обстеження та маси тіла були без відхилень від норми. Імплантація тест-зразків не викликала змін поведінки тварин та ознак больової реакції на дотик до місць імплантації у всі терміни досліджень. Видимих змін шкіри (гіперемії, набряку, проявів судинних ушкоджень, змін кольору шкіри, затвердіння, некротичних та інших змін тканин прилеглих до місця імплантації) не виявлено.

У контрольних тварин вищезазначених змін шкіри також не спостерігалось.

Макроскопічне обстеження всіх груп тварин не виявило патологічних змін внутрішніх органів (мозок, легені, серце, печінка, селезінка, нирки, надниркові залози, шлунок, товстий і тонкий кишківник, сім'яники і придатки, тимус, підшлункова та щитоподібна залози).

За результатами гістоморфологічних досліджень, виявлені зміни у зразках шкіри тварин всіх піддослідних груп мали подібний характер. Імплантація модифікованої екамуліном колагенової матриці, імплантація «порожньої» колагенової матриці та хірургічне втручання без імплантації спричиняли в зразках шкіри легкі та помірні зміни. Гістоморфологічних змін в регіональних лімфовузлах не виявлено. В досліджених зразках залишків колагенової субстанції не спостерігалось, що свідчить про її деградацію.

Виявлені зміни в зразках шкіри відзначаються подібними характеристиками як у розподілі, так і в інтенсивності серед різних груп. Результати досліджень свідчать, що модифікована екамуліном колагенова матриця і «порожня» колагенова матриця, як носій активатора зсідання крові при підшкірній імплантації щурам Wistar Han характеризуються доброю місцевою переносимістю.

4.3.2. Ефективність МЕКМ

У співпраці з Кафедрою хірургії та хвороб дрібних домашніх тварин Білоцерківського національного аграрного університету було проведено доклінічні дослідження ефективності кровоспинної та ранозагоювальної дії *in vivo* модифікованої екамуліном колагенової матриці за операції на печінці у кролів.

Дослідження проводилось на кролях Каліфорнійської породи (n=15; по п'ять в кожній групі). Кролям проводили забір крові до операції, виконували лапаротомію і стандартне ушкодження печінки та оцінювали час кровотечі (в секундах) за стандартного ушкодження печінки за умов використання стандартного методу (група I), зупинки кровотечі КМ (група II) та зупинки кровотечі МЕКМ (група III).

Як видно з рисунку 4.9, КМ володіє гемостатичними властивостями, що узгоджується з результатами, отриманими в інших модельних системах. Однак використання МЕКМ достовірно скорочує час кровотечі в 15,8 рази, порівняно з контрольною групою, та в 3,3 рази, порівняно з групою, якій застосовували КМ, на моделі ушкодження печінки у кролів.

На 14-ту добу після операції відмічали утворення спайок у двох кролів контрольної групи та у двох кролів, яким застосовували МЕКМ (група III). Таким чином, спайкоутворення не було спровоковане використанням МЕКМ.

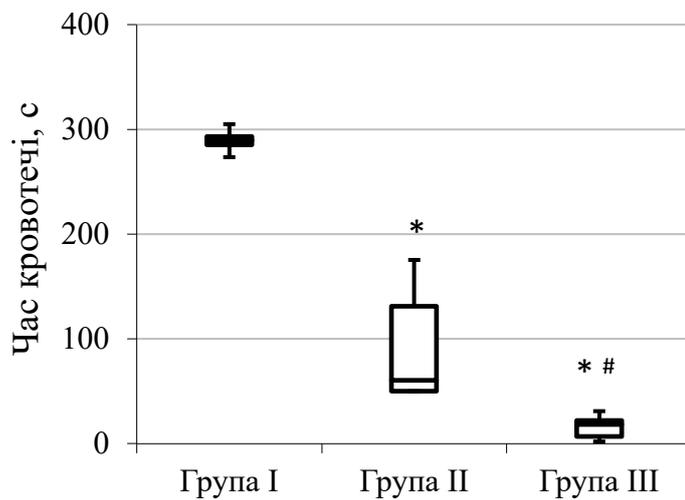


Рис. 4.9. Час кровотечі в моделі ушкодження печінки у кролів в контрольній групі (група I, n=5), при використанні КМ для зупинки кровотечі (група II, n=5) та при використанні МЕКМ для зупинки кровотечі (група III, n=5). * – за тестом Манна-Уїтні результат достовірний при $p < 0,05$, порівняно з групою I. # – за тестом Манна-Уїтні результат достовірний при $p < 0,05$, порівняно з групою II.

Гістологічні дослідження показали, що у контрольній групі тварин (група I) печінка має звичайну балочну структуру з добре помітними центральними венами (рис. 4.10, A1) і тріадами, без ознак ушкодження. У зоні пошкодження відмічено загоєння тканини печінки з поступовим заміщенням пошкодженої ділянки печінки гепатоцитами звичайної будови (рис. 4.10, A2).

При використанні КМ для зупинки кровотечі (група II), гепатоцити мають щільну цитоплазму, балочна структура печінки не пошкоджена (рис. 4.10, Б). У випадку застосування КМ виявлено значну лімфоцитарну і лейкоцитарну інфільтрацію (рис. 4.10, Б2) та ділянки некрозу, також у полі зору спостерігаються фібробласти.

У випадку використання МЕКМ для зупинки кровотечі (група III) була збережена балочна структура печінки і функціонування гепатоцитів не порушувалось. Гепатоцити містили прозору цитоплазму а також накопичували

глікоген (рис. 4.10, В1). У більшості тварин виявлено накопичення жирової тканини, утворення судиноподібних структур і щільне прилягання до тканини печінки (4.10, В2). В одному випадку в зоні застосування МЕКМ спостерігався некроз.

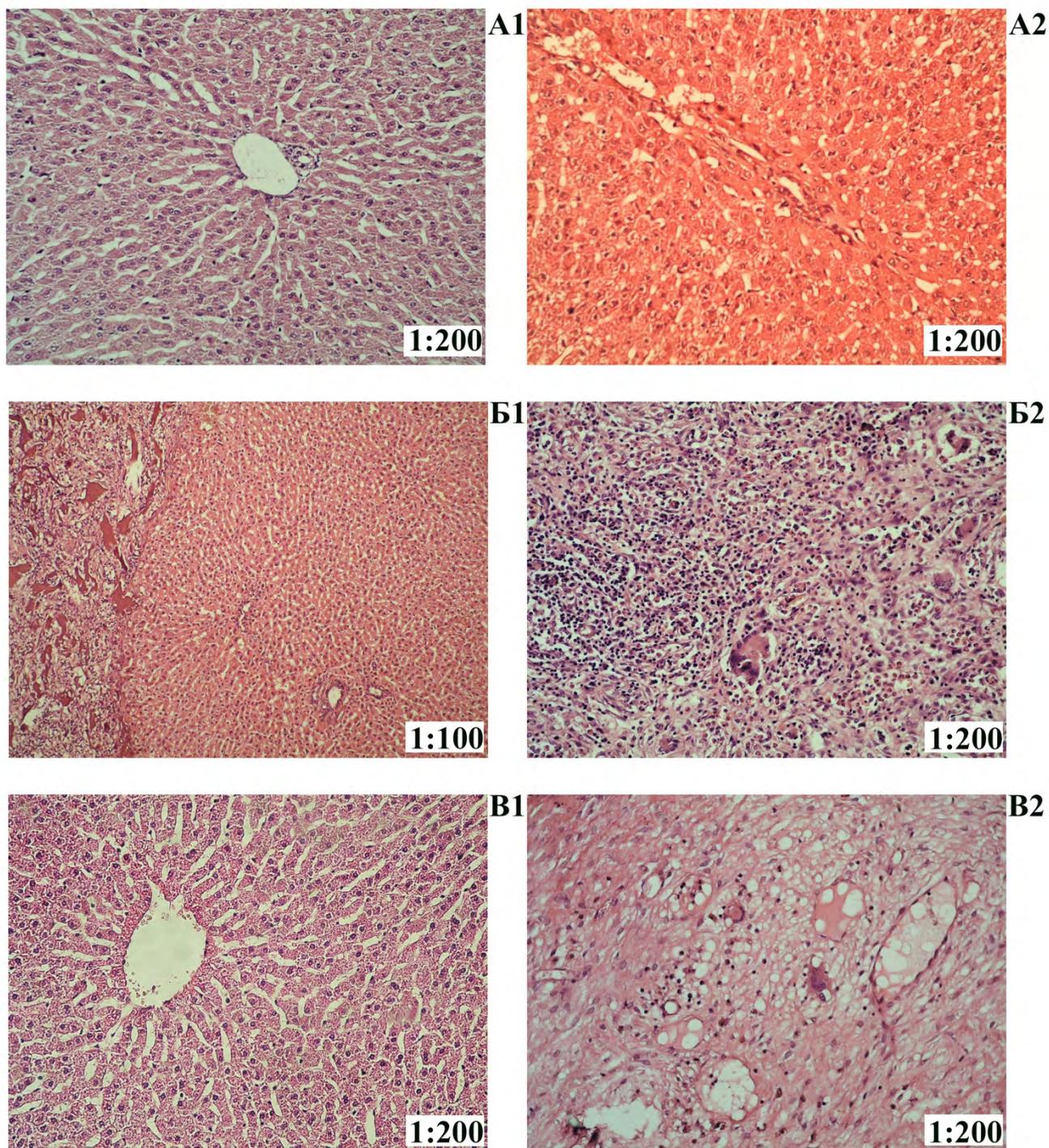


Рис. 4.10. Гістологія тканин печінки в моделі ушкодження печінки у кролів в контрольній групі (А), при використанні КМ для зупинки кровотечі (Б) та при використанні МЕКМ для зупинки кровотечі (В).

Порівняння результатів гістології свідчить, що використання МЕКМ мало більше позитивний вплив на тканину печінки, порівняно з використанням КМ, що проявлялось зменшенням запального процесу і збереженням нативної структури печінки в більшому ступені, ніж при використанні КМ.

Таким чином, доклінічні дослідження модифікованої екамуліном колагенової матриці показали, що даний гемостатичний засіб є безпечним та ефективним для застосування в хірургії та потенційно готовий для проведення клінічних досліджень.

4.4. Фібриновий гель

На даний момент широкого застосування в хірургії набули композитні матеріали, оскільки вони забезпечують герметизацію ран та швів, а також захист ран, мають протизапальний ефект, забезпечують знезараження ран, швидку регенерацію та ефективний гемостаз, зменшують утворення гематом, що особливо актуально при пластичній хірургії, слугують матриксом для мезинхімальних стовбурових клітин (МСК), що використовується в клітинній терапії.

Біологічні «клеї» за хімічною будовою можна розділити на:

1. Хімічно синтезовані фармакологічні препарати (епоксидні, ціанакрилатні, поліуретанові, поліетиленгліколеві клеї), зокрема на ринку представлені DERMABOND (хірургічний шкірний клей, виготовлений на основі 2-Октілціанокрілата) та «Сульфакрилат» (ціанакрилатна клейова композиція). Такі препарати мають обмеження в використанні через токсичність і використовуються лише поверхнево.
2. Біокераміка (композити на основі біоактивної склокераміки і гідроксиapatиту), зокрема шприц R.T.R.[®] (кістковий замінник, що складається з гранул β -трикальційфосфату синтетичного походження) та Facetem (філлер на основі гідроксиapatиту кальцію). Використання таких препаратів обмежено ортопедією, ортодонтією та стоматологією, що обумовлено фізичними властивостями матеріалу.

3. «Клеї», створені на основі біополімерів (на основі колагену, фібрину, желатину). Використання таких «клеїв» можливе в усіх тканинах організму завдяки природному походженню, що обумовлює біосумісність, відсутність пошкоджуючої дії на тканини, здатність до біодеградації (в організмі існує відлагоджений механізм деградації депозитів цих біополімерів). Крім того, «клеї» на основі біополімерів володіють гемостатичним ефектом, достатнім для зупинки паренхіматозних та капілярних кровотеч, та стимулюють регенерацію, оскільки є нормальним субстратом для забезпечення міграції фібробластів.

Найбільш розповсюдженими є «клеї» на основі фібрину. Тим не менше, такі препарати мають низку недоліків:

- Ризик інфікування гематогенними інфекціями (насамперед гепатитом В, С та ВІЛ-інфекцією), оскільки для отримання фібрину використовується плазма крові людини;
- Можливість розвитку алергічних реакцій;
- Поява в крові аутоантитромбінових антитіл, що порушує власний коагуляційний статус хворих;
- Необхідність дотримання специфічних умов зберігання (наприклад, TISSEEL, Fibrin Sealant), або необхідність попереднього розчинення ліофілізованих компонентів (наприклад, для препарату Beriplast Beriplast® P Combi Set);
- Неможливість контролювати час та швидкість утворення гелю, хоча за різних способів нанесення гелю (підшкірно, поверхнево, на внутрішні органи) хірурги потребують різної консистенції гелю під час використання.

Для подолання цих недоліків, ми вирішили запропонувати використовувати власну плазму крові пацієнта для формування аутологічного фібринового гелю, що знімає ризики пов'язані із зараженням гематогенними інфекціями та виникненням імунних реакцій та зберіганням основного

компоненту фібринового гелю. Раніше у відділі структури та функції білка було розроблено метод отримання аутологічного фібринового гелю [144]. Ефективність його регенеративної та ранозагоювальної дії *in vivo* було продемонстровано на моделі повної остеотомії діяфіза променевої кістки кролів, а також на собаках з поперечними переломами стегнової кістки, на моделі печінкової кровотечі у собак і на моделі опіків у щурів.

Використання цитратної плазми крові пацієнта дає змогу отримати сировину для формування фібринового гелю до операції (навіть за декілька днів до операції за умови зберігання плазми крові при -20°C в лікарському закладі, де планується оперативне втручання) та сформувати фібриновий гель безпосередньо перед використанням.

Для ініціації процесу утворення аутологічного фібринового гелю було запропоновано використовувати екамулін. Як видно з рис. 4.11, екамулін ефективно активує протромбін плазми крові, забезпечуючи утворення щільного згустку. У межах концентрації екамуліну від 5 до 40 мкг/мл можна легко регулювати час утворення згустку, відповідно до вимог хірурга, та способу нанесення аутологічного фібринового гелю. Наприклад, для підшовного нанесення аутологічного фібринового гелю достатньо 5 мкг ензиму з розрахунку на 1 мл готового фібринового гелю. Це дозволяє відтермінувати утворення щільного згустку до 60-90 с та створити умови для введення гелю через голку шприца.

Використання цитратної аутологічної плазми крові передбачає насичення плазми йонами Ca^{2+} , які були зв'язані цитратом перед утворенням гелю, оскільки кальцій необхідний для роботи тромбіну та полімеризації фібрину. Як видно з рис. 4.12, достатніми для швидкого утворення фібринового гелю є концентрація CaCl_2 3-5 мМ в розрахунку на кінцевий об'єм фібринового гелю. Аби зменшити кількість компонентів набору для одержання фібринового гелю, було запропоновано заздалегідь вносити відповідну кількість CaCl_2 в розчин екамуліну, призначеного для формування фібринового гелю.

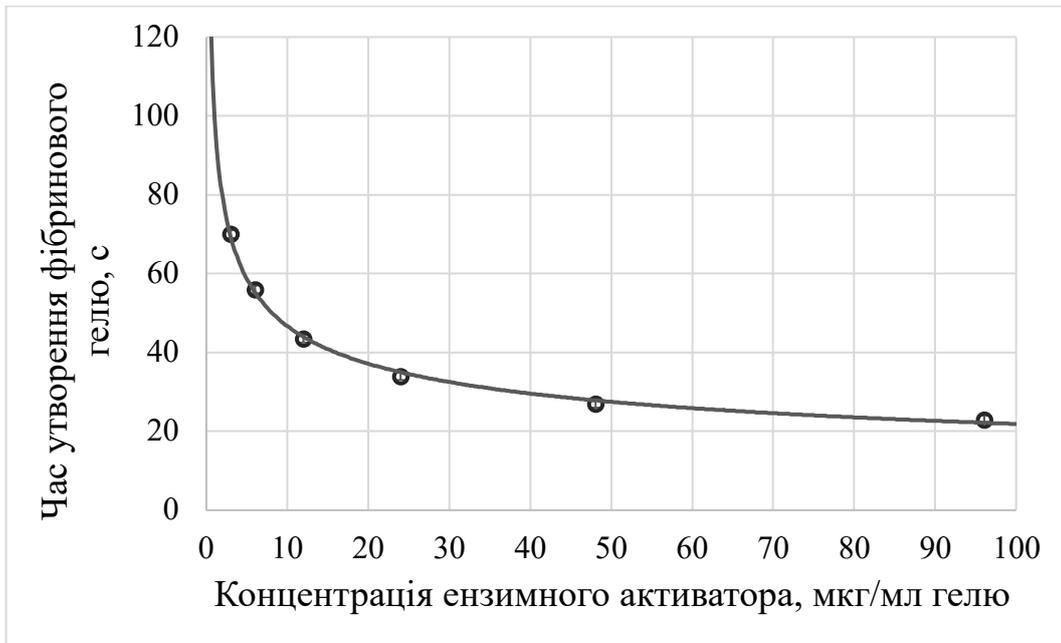


Рис. 4.11. Залежність часу утворення фібринового гелю з плазми крові людини від концентрації екамуліну в розрахунку на кінцевий об'єм фібринового гелю.

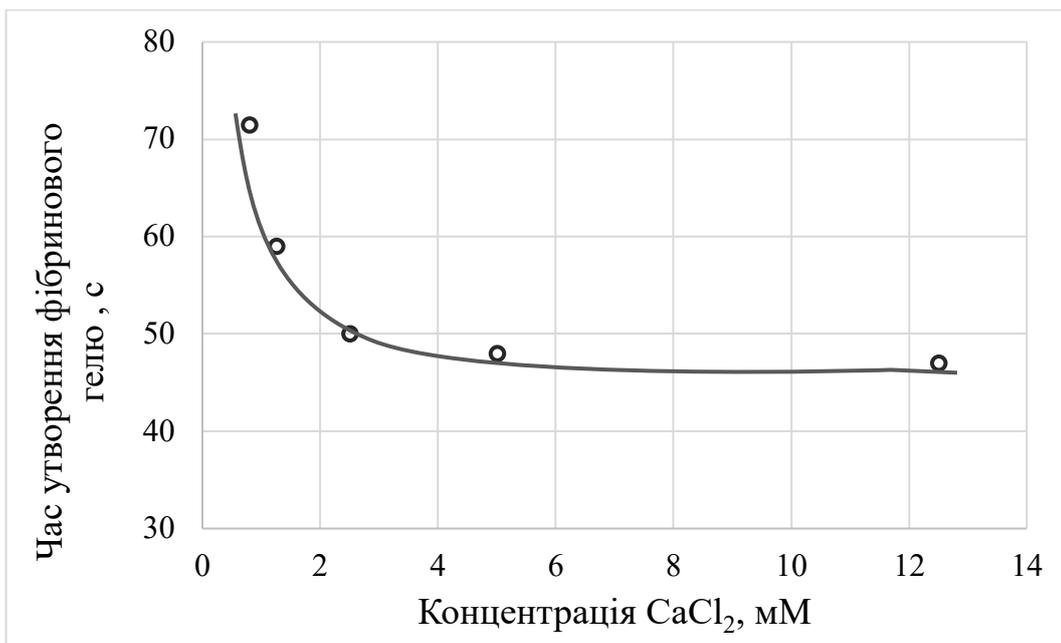


Рис. 4.12. Залежність часу утворення фібринового гелю з плазми крові людини від концентрації CaCl₂ в розрахунку на кінцевий об'єм фібринового гелю.

Відомо, що тромбоцити в процесі активації вивільняють ряд біологічно активних факторів, що можуть сприяти загоєнню та регенерації прилеглих тканин. Тому, ймовірно, ефективним регенеративним засобом може стати

фібриновий гель, отриманий на основі збагаченої тромбоцитами плазми крові (ЗТП).

За допомогою агрегатометрії було продемонстровано можливість формування фібринового гелю на основі ЗТП (рис. 4.13) за дії ензимного активатора зсідання крові. Для цього в кювету агрегометра вносили 250 мкл ЗТП (концентрація клітин складала 250-300 млнкл/мл), 25 мкл 0,025 МСаСІ₂ та 25 мкл ензимного активатора, в кінцевій концентрації 11, 23, 182 мкг/мл. Як видно з рисунку 4.13, ензимний активатор зсідання крові, без додаткових індукторів агрегації тромбоцитів, забезпечує необоротну агрегацію ЗТП, тобто спричиняє формування стійкого тромбоцитарного тромбу.

Слід зазначити, що під дією ензимного активатора в плазмі крові утворюється ендogenous тромбін. Саме він є індуктором агрегації тромбоцитів, а відтак забезпечує одночасно і активацію та агрегацію тромбоцитів, і формування фібринового згустку. Тобто застосування ЗТП замість збідненої на тромбоцити плазми крові не передбачає додаткові етапи чи процедури для одержання фібринового гелю.

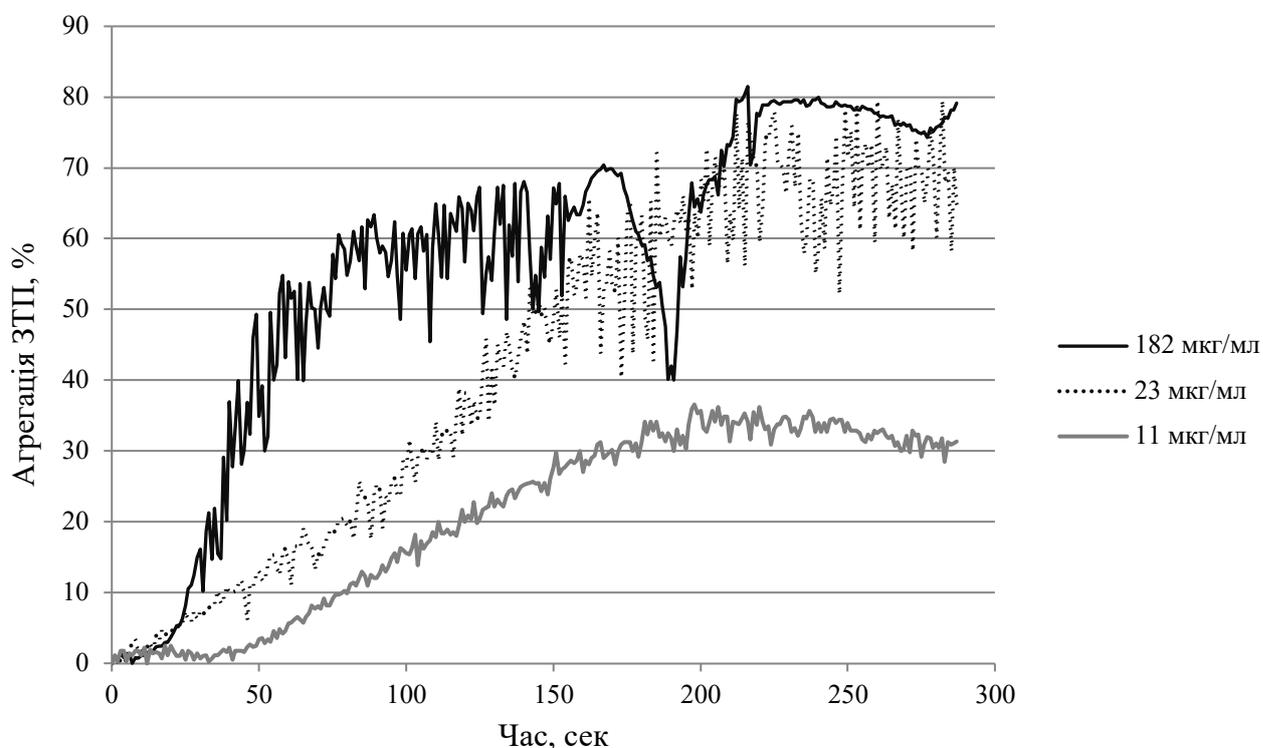


Рис. 4.13. Агрегатометрія утворення фібринового гелю зі збагаченої тромбоцитами плазми крові за дії ензимного активатора зсідання крові.

При порівнянні часу утворення згустку на основі плазми крові та ЗТП, було показано, що наявність тромбоцитів в плазмі крові дещо сповільнює формування щільного фібринового згустку (таблиця 4.5.). Крім того, маса згустку, утвореного на основі збідненої на тромбоцити плазми крові дещо більша, порівняно з масою згустку, утвореного на основі ЗТП, за умови однакового кількісного складу суміші для одержання фібринового гелю. Ймовірно, це пов'язано з тим, що не всі тромбоцити, наявні в ЗТП, залучаються до формування згустку. Таке припущення узгоджується з результатами агрегатометрії (рис. 4.13.), яка демонструє максимально можливий рівень агрегації ЗТП до 80%.

Крім того, при одержанні фібринового гелю на основі ЗТП в деяких випадках спостерігали відшаровування від гелю рідкої фракції, що не увійшла в склад згустку.

Таблиця 4.5

Формування фібринового гелю на основі плазми крові та збагаченої тромбоцитами плазми крові з використанням ензимного активатора зсідання крові.

Середовище формування згустку	Збіднена на тромбоцити плазма крові	Збагачена тромбоцитами плазма крові
Час формування щільного фібринового згустку, с	86±7	110±10
Маса згустку, мг	169±50	118±32

Отже, ЗТП, як і збіднена на тромбоцити плазма крові, може використовуватись для екамулін-індукованого одержання аутологічного фібринового гелю.

Для застосування в хірургії, всі компоненти аутологічного гелю мають бути стерильні. Якщо забір крові в вакуумні стерильні системи та центрифугування крові в вакуумних пробірках є рутинними маніпуляціями, що забезпечують стерильність сировини для отримання аутологічного фібринового

гелю, то препарат екамуліну потребує додаткової стерилізації. Оскільки екамулін – це протеїн, то найвдалішим методом стерилізації є фільтрація через стерилізаційний фільтр для гідрофільних розчинів з порами 0,2 мкм.

Тому, ми перевірили придатність використання фільтрації для стерилізації розчину ензимного активатора. Для цього розчин екамуліну (0,7 мкг/мл) в 0,9% водному розчині NaCl пропускали через стерилізаційний фільтр з розміром пор 0,2 мкм. До і після фільтрування визначали амідолітичну та зсідуючу активність екамуліну (таблиця 4.6). Амідолітичну активність визначали спектрофотометрично ($\lambda=405$ нм) за появою *n*-нітроаналіну при розщепленні 0,2 мМ розчину хромогенного субстрату S2302 екамуліном впродовж 5 хв при температурі 37 °С. Зсідуючу активність визначали за часом зсідання 100 мкл плазми крові при додаванні 100 мкл розчину ензиму.

Таблиця 4.6

Активність екамуліну до та після фільтрації через стерилізаційний фільтр з порами 0,22 мкм.

Умови	До фільтрування	Після фільтрування	Втрата активності, %
Амідолітична активність, о.о.	0,221±0,012	0,208±0,011	6
Час зсідання плазми крові, сек	24±1	24±1	0

Як видно з таблиці 4.6, втрата амідолітичної активності екамуліном, після проходження через стерилізаційний фільтр, є незначною, на рівні 6%, однак це не призводить до будь-якої помітної зміни в його зсідуючій активності. Тож стерилізація екамуліну шляхом пропускання через стерилізаційний фільтр є придатною.

Зручними для транспортування та використання в медичній практиці є препарати, що не потребують заморожування чи попереднього розчинення та можуть зберігатись при 2...8°C. Екамулін – протеїн, тож можливість тривалого зберігання в при температурі 2...8°C потребувала додаткового обґрунтування.

В асептичних умовах було розфасовано аліквоти стерильного препарату екамуліну у водному розчині та з додаванням стабілізаторів: глюкози в кінцевій концентрації 10% та 30% і гліцерину в кінцевій концентрації 20% та 50%. Було визначену зсідаючу активність екамуліну у різних розчинах одразу після фасування (нульовий день) та з інтервалом в місяць протягом року. Впродовж експерименту аліквоти різних розчинів екамуліну зберігались при температурі 2...8°C та за відносної вологості повітря не більше 60% (відповідно до рекомендацій МОЗ України щодо зберігання виробів медичного призначення, наказ № 44, від 16.03.1993), в захищеному від світла пакуванні, в герметично закритих ємностях.

На рис. 4.14 представлено зміну зсідаючої активності екамуліну впродовж року. Як видно, у водному розчині зсідаюча активність екамуліну при зберіганні знижувалась в 1,2-1,6; в той час як при зберіганні в розчинах гліцерину, ензим втрачав активність вже через чотири місяці зберігання, в 30% розчині глюкози – під кінець року.

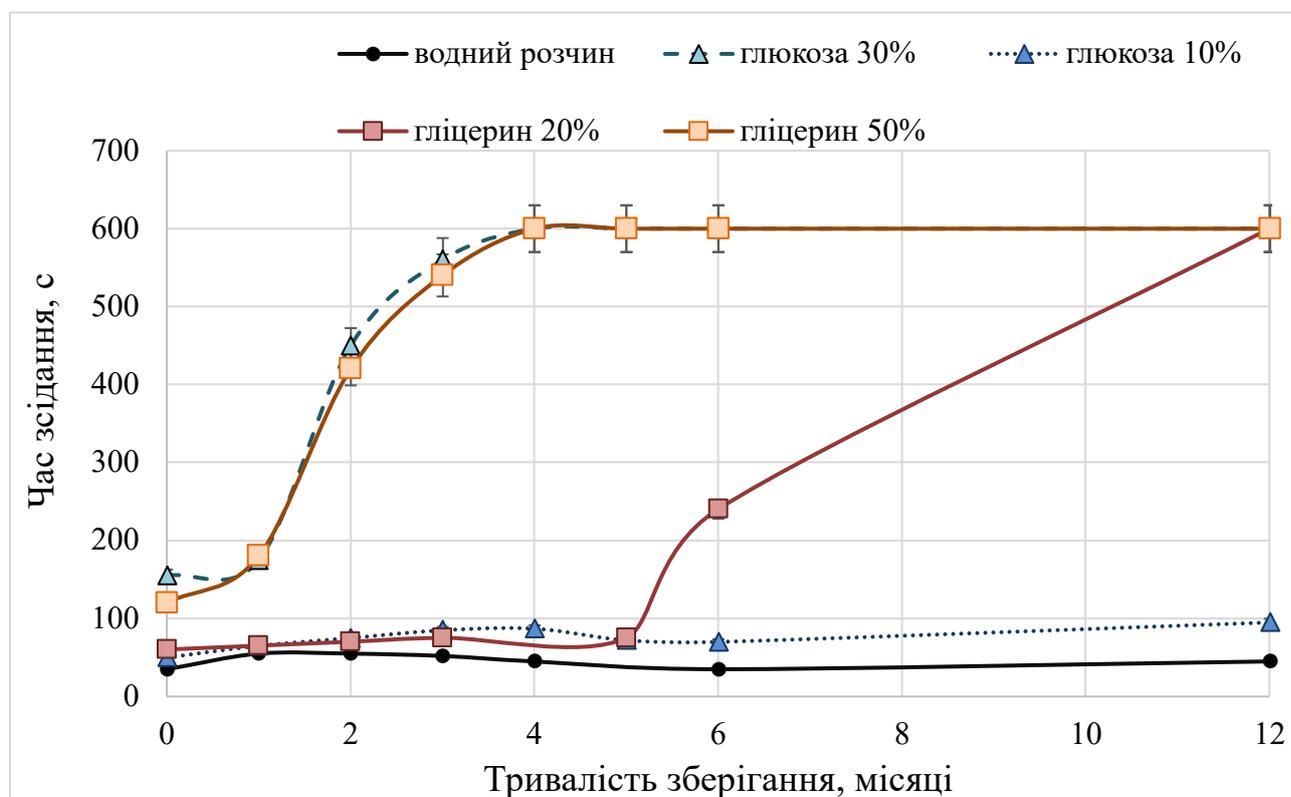


Рис. 4.14. Залежність зсідаючої активності екамуліну у водному розчині, 10% та 30% розчині глюкози, 20% та 50% розчині гліцерину від тривалості зберігання.

Відповідно було розроблено Лабораторний регламент виробництва комплекту для одержання фібринового гелю (Лабораторний регламент №1/21 (редакція 2) – **Додаток Ж**). Відповідно до Лабораторного регламенту, було виготовлено експериментальну партію комплекту для одержання аутологічного фібринового гелю для проведення доклінічних та клінічних досліджень безпеки та ефективності використання комплекту для одержання аутологічного фібринового гелю в хірургії.

Партію Комплекту для одержання аутологічного фібринового гелю було виготовлено в умовах Аптеки №2 «Хемотека» ПП «Інфузія» (Акт впровадження у виробництво – **Додаток З**).

4.4.1. Доклінічні дослідження комплекту для одержання аутологічного фібринового гелю

На базі ДП «Науковий центр превентивної токсикології, харчової та хімічної безпеки імені академіка Л.І. Медведя Міністерства Охорони Здоров'я України», відповідно до стандартів GLP, було проведено доклінічні дослідження місцевої переносимості лікарського засобу на основі активатора зсідання крові (екамуліну) виробництва Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України при підшкірному введенні кролям у вигляді аутологічного фібринового гелю (Заключний звіт дослідження 2043/SOP/LET/M226/1 - **Додаток И**).

Аутологічний фібриновий гель вводили групі з шести кролів підшкірно на лівій стороні спини у фіксованій дозі 0,6 мл. В якості контрольної речовини тваринам вводили аутологічну плазму з 0,1 мл 0,9 % розчину NaCl в загальному об'ємі отриманого розчину 0,6 мл. З метою оцінки місцевої переносимості екамуліну у вигляді аутологічного фібринового гелю, кожній тварині проводили ін'єкції у дві різні ділянки шкіри лівої сторони спини з інтервалом в п'ять днів та подальшим спостереженням впродовж двох днів, що давало можливість оцінити вплив речовини впродовж 48 годин (після другої ін'єкції) та впродовж семи днів (після першої ін'єкції).

Щоденно проводили клінічне спостереження за загальним станом тварин та реакцією шкіри в місці ін'єкції. У дні введення додатково реєстрували реакцію

тварин на процедуру введення та місцеву реакцію шкіри через 4 години. По закінченні періоду спостереження, проводили розтин, макроскопічне та гістопатологічне дослідження тканин у місці ін'єкцій. З метою контролю загального стану тварин виконували огляд органів черевної та грудної порожнини.

За даними проведеного дослідження, загальний стан тварин за показниками клінічного обстеження та маси тіла не мав відхилень від норми. Підшкірні ін'єкції аутологічного фібринового гелю не викликали змін поведінки тварин та ознак больової реакції при введенні та протягом 4 годин. Через 24 та 48 годин після обох ін'єкцій досліджуваної речовини, змін шкіри не спостерігали. Впродовж 7-денного періоду спостереження після першої ін'єкції, змін шкіри у місці введення та у місці повторної ін'єкції також не виявлено. За отриманими даними, ступінь переносимості препарату – добра.

Гістопатологічне дослідження тканин, що контактували при підшкірному введенні з аутологічним фібриновим гелем, не виявило токсикологічно значимих змін в тканинах на другий та сьомий день після підшкірного введення (рис. 4.15). У деяких кролів були зафіксовані такі зміни як гіперкератоз, паракератоз, лімфолейкоцитарні скупчення в субепідермальній стромі. Ці зміни були локальними, слабо вираженими і співставимими зі змінами, виявленими у зразках контрольної групи.

Не виявлено також і загальнотоксичної дії аутологічного фібринового гелю за макроскопією органів черевної та грудної порожнини.

Таким чином, екамулін при підшкірному введенні кролям альбіносам у вигляді аутологічного фібринового гелю характеризувався доброю місцевою переносимістю. Ознак, загальнотоксичної дії за дослідженими показниками не встановлено.

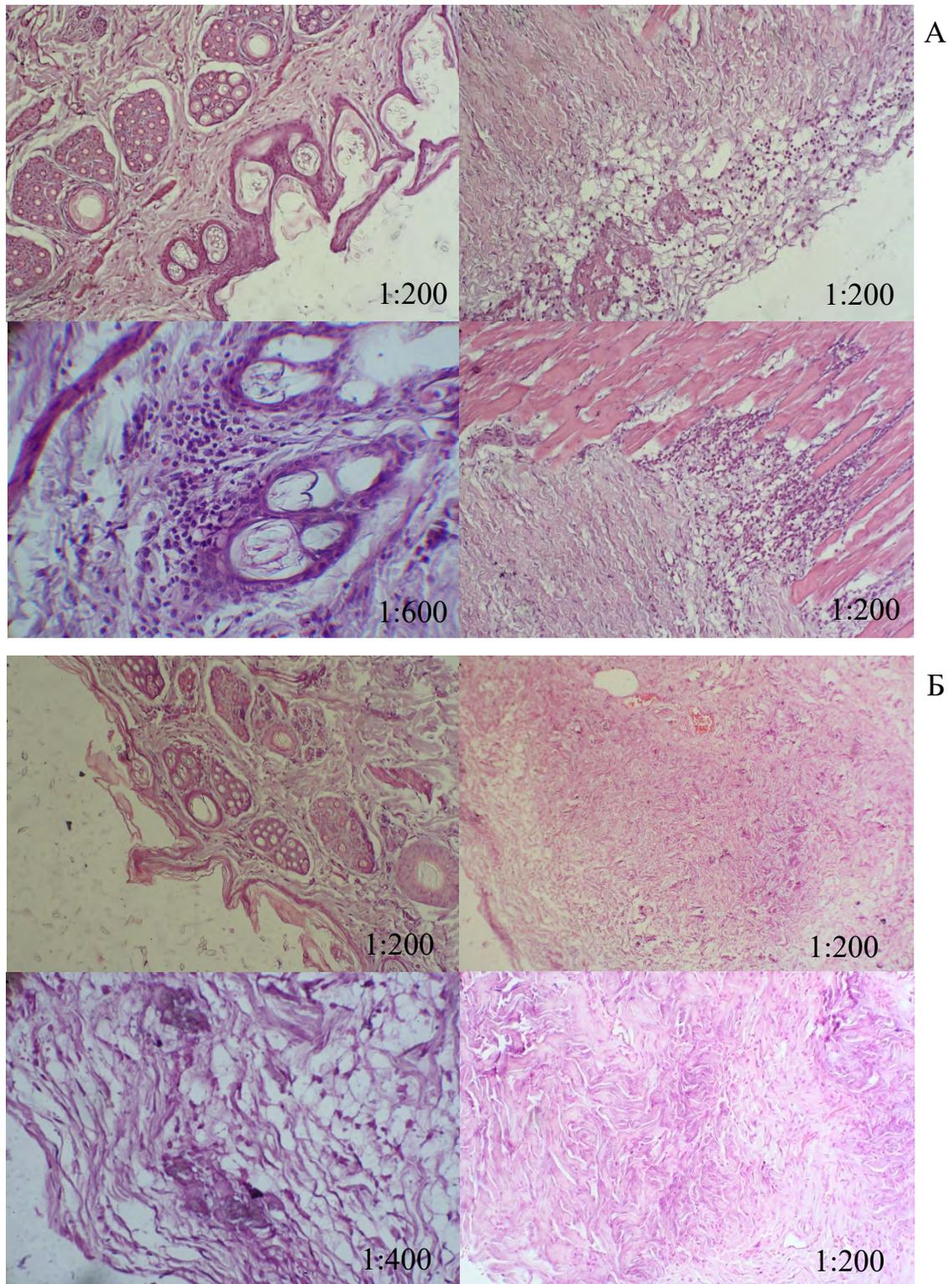


Рис. 4.15. Гістологічне дослідження шкіри кролів та прилеглої м'язової тканини в місці підшкірної ін'єкції аутологічного фібринового гелю (А) та в місці підшкірної ін'єкції аутологічної плазми крові з 0,1 мл 0,9 % розчину NaCl (Б) – контроль.

4.4.2 Клінічні дослідження комплекту для одержання аутологічного фібринового гелю

Позитивні результати безпечності аутологічного фібринового гелю, отримані в доклінічних дослідженнях, та попередні позитивні результати ефективності аутологічного фібринового гелю, отримані в дослідженнях *in vivo*, створили передумови проведення клінічних досліджень Комплекту для одержання аутологічного фібринового гелю (далі – Комплект).

На базі поліклінічного відділення «Лівобережного центру проктології» (ТОВ «Мед Сервіс Консалтинг») було проведено Рандомізоване, відкрите, контрольоване, паралельне, одноцентрове, проспективне клінічне дослідження безпечності та ефективності комплекту для одержання аутологічного фібринового гелю для стимуляції загоєння ран первинним натягом (Заключний звіт про проведене клінічне випробування; Код дослідження FG 01/21 – **Додаток І**). До випробувань були залучені пацієнти, що страждають на гострі та хронічні форми комбінованого геморою та потребують проведення тотальної циркулярної гемороїдектомії з лоскутною анопластиком. Дослідній групі пацієнтів після накладання швів проводили аплікацію фібринового гелю, отриманого за допомогою досліджуваного Комплекту, в підлоскутний простір. Контрольній групі пацієнтів Комплект застосовано не було.

Загальна кількість пацієнтів, що взяла участь в дослідженні склала 30 осіб, з них 15 осіб, що ввійшли в дослідну групу та 15 осіб, що склали групу порівняння.

Для оцінки ефективності застосування Комплекту для загоєння рани первинним натягом було проведено повний проктологічний огляд (візуальний огляд, пальцевий огляд, фотоаноскопія) пацієнтів на 7, 14, 21 добу після проведення лоскутної анопластики та визначено спроможність швів на зшитих краях рани. В разі виявленого діастазу швів, фіксували кількість лоскутів, що відірвались, та час відриву лоскутів з моменту проведення операції.

На рисунку 4.16 представлені типові фото післяопераційного поля одразу та на сьому добу після проведення анопластики пацієнтів досліджуваної групи (застосування Комплекту) та групи порівняння (Комплект НЕ застосовувався).

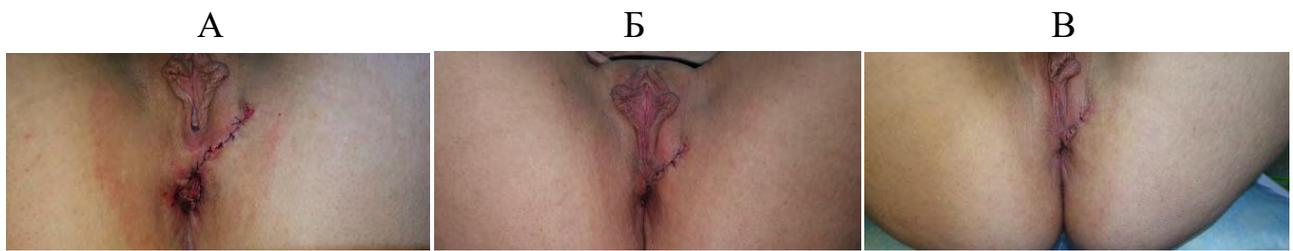


Рис. 4.16. Типові фото післяопераційного поля після проведення анопластики (А), на 7 добу після операції (Б) та на 14 добу після операції (В) за умов двохлопотної анопластики пацієнтці досліджуваної групи.

Як видно з рисунка 4.16, застосування Комплекту дозволило досягти ефективного та швидкого ранозагоєння.

Хоча частота появи діастазу в досліджуваній групі та групі порівняння була близькою (рис. 4.17), в досліджуваній групі поява діастазу спостерігалася впродовж першого тижня вдвічі рідше ніж в групі порівняння. В той час, як поява діастазу на другому тижні післяопераційного періоду, в обох групах спостерігалася з однаковою частотою (33%). Впродовж третього тижня після проведення операції поява діастазу не спостерігалась у жодного пацієнта.

Варто відзначити, що на ранніх стадіях після проведення операції ключовий внесок у загоєння швів первинним натягом належить ступеню адгезії оперованих тканин, а з віддаленням в часі від моменту проведення операції головну роль має вплив індивідуального способу життя, дотримання гігієни та особливостей харчування пацієнтів. Тому зниження частоти діастазу у пацієнтів при використанні Комплекту саме впродовж першого тижня після операції є свідченням його ефективності.

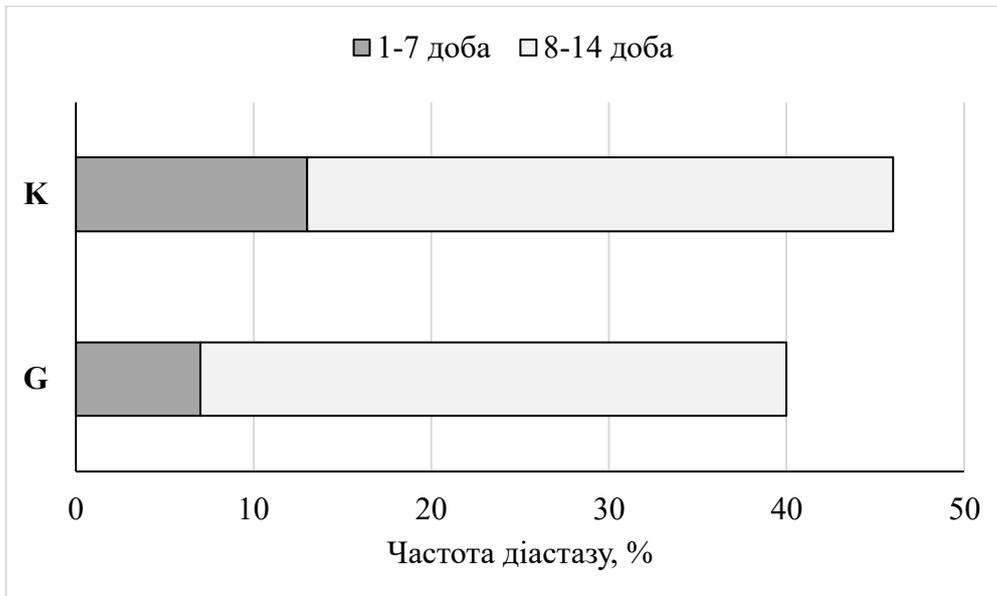


Рис. 4.17. Частота появи діастазу у пацієнтів дослідної групи (G) групи порівняння (К) на 1-7 та 8-14 добу після проведення лоскутної анопластики. На 15-21 добу після операції появи діастазу не спостерігали.

При проведенні лоскутної анопластики для закриття операційного поля формуються лоскути, які фіксуються хірургічним швом. Пацієнтам було проведено 2-, 3- та 4-лоскутну анопластику та гемороїдектомія за Фергюсоном, яку можна прирівняти до 3-лоскутної анопластики. Виникнення діастазу спричиняє відрив одного чи декількох лоскутів. Тому кількість відірваних лоскутів є кількісною характеристикою діастазу за лоскутної анопластики. Відрив лоскутів спостерігали лише за 3-лоскутної анопластики та гемороїдектомії за Фергюсоном, окрім того, в одного пацієнта групи порівняння спостерігали відрив двох лоскутів при 2-лоскутній анопластиці.

На рис. 4.18 представлено дані щодо частоти відриву одного, двох ти всіх трьох лоскутів в післяопераційний період після лоскутної анопластики у випадку виникнення діастазу у пацієнтів обох груп. Як видно з рисунку, в дослідній групі у пацієнтів з появою діастазу відриву всіх лоскутів не спостерігали, в той час як в групі порівняння відсоток пацієнтів, у яких спостерігали відрив всіх лоскутів в результаті діастазу, становив понад 40%. Крім того, в результаті діастазу у пацієнтів дослідної групи, в половині випадків спостерігали мінімальний відрив лоскута (лише один лоскут), в той час як

частота відриву лише одного лоскута при появі діастазу пацієнтів групи порівняння складала лише 14%.

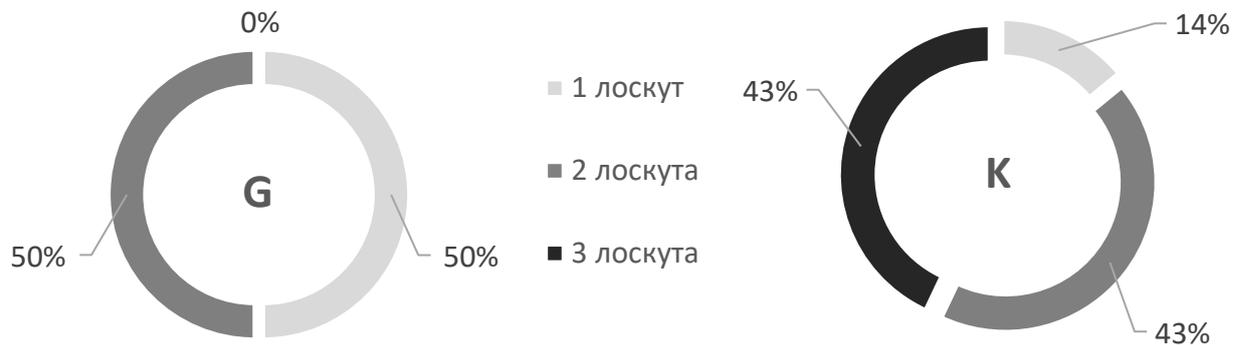


Рис. 4.18. Частота відриву одного, двох чи трьох лоскутів у випадку діастазу в післяопераційний період після лоскутної анопластики у пацієнтів дослідної групи (G) та пацієнтів групи порівняння (K). У пацієнтів дослідної групи відриву одночасно трьох лоскутів не спостігали, на відміну від контрольної групи.

У рамках даного дослідження було показано, що при застосуванні комплексу для одержання аутологічного фібринового гелю для загоєння рани первинним натягом скорочувалась частота появи діастазу на першому тижні післяопераційного періоду, а в разі появи діастазу, кількість відірваних лоскутів була меншою.

Загоєння рани первинним натягом із застосування Комплексу було більш ефективним, ніж за класичної лоскутної анопластики.

Для доведення безпеки застосування Комплексу було проведено порівняння стану швів та прилеглих тканин після проведення лоскутної анопластики (для групи порівняння) та аналогічної хірургічної операції з використанням комплексу для одержання аутологічного фібринового гелю. Зокрема, було визначено такі параметри: наявність запального процесу та алергічної реакції. Крім того, було зібрано дані щодо суб'єктивного стану пацієнтів, зокрема наявності больового синдрому.

Серйозні побічні явища, а також серйозні побічні реакції у пацієнтів, що взяли участь в клінічному дослідженні, були відсутні.

Загальний запальний процес в післяопераційний період спостерігали у одного пацієнта з дослідної групи та у двох пацієнтів з групи порівняння. У одного пацієнта групи порівняння спостерігали загострення кандидозної інфекції в післяопераційний період. Можливе зменшення ризику запалення в післяопераційний період пов'язане з використанням Комплекту потребує подальших досліджень.

Інші серйозні побічні явища, а також серйозні побічні реакції були відсутні.

Пацієнтам було запропоновано оцінити больові відчуття, що супроводжували післяопераційний період. У 20% пацієнтів групи порівняння відмічали сильний больовий синдром в той час, як в дослідній групі пацієнти вказували лише на помірні больові відчуття впродовж перших двох тижнів післяопераційного періоду.

Отже, використання Комплекту є безпечним та не викликає алергічних реакцій та подразнення. Крім того, використання Комплекту не викликає посилення больового синдрому в післяопераційний період.

Таким чином, розроблений медичний виріб було впроваджено (Акт впровадження – Додаток І), а клінічні дослідження комплекту для одержання аутологічного фібринового гелю показали, що цей медичний виріб є безпечним для використання, має здатність збільшувати ефективність загоєння ран первинним натягом за лоскутної анопластики і є перспективним для подальших досліджень в інших галузях хірургії, а також як засіб для зменшення запалення та больового синдрому в післяопераційний період.

4.5. Створення та апробація рекомбінантного активатора протромбіну

Застосування активаторів протромбіну у медицині відкриває широкі можливості та має різноспрямовані сфери застосування. Попередні підозділи яскраво ілюструють цю тезу. Нами було успішно використано в якості активатора протромбіну екамулін з отрути *Echis multisquamatus*. Однак, при

масштабуванні виробництва, використання отрути змії небажане з наступних причин:

1. Стандартизація такого виробництва ускладнена, оскільки ензими, синтезовані в організмі тварини, можуть відрізнятись за ізоформами, кількісним складом, питомою активністю, залежно від популяції, раціону, пори року, тощо.
2. Виділення ензимів з отрути потребує очищення в декілька етапів та додаткового контролю якості цільового протеїну.
3. Отрута, як джерло ензимів, ненадійна і може бути недоступна у необхідних кількостях.
4. Цільовий продукт має відносно велику вартість та потенційно меншу конкурентноздатність на ринку.

Всі перелічені недоліки можна подолати, створивши рекомбінантний протеїн, що не поступається екамуліну здатністю активувати протромбін, але є легкодоступним. Зважаючи на викладене, ми поставили за мету отримати рекомбінантний терапевтичний протеїн – активатор, здатний високоспецифічно активувати протромбін.

4.5.1. Вибір ензимного активатора зсідання крові

Серед Ca^{2+} -незалежних активаторів протромбіну є два добре досліджені ензими, що вже знайшли застосування в лабораторній діагностиці – екамулін з отрути *Echis multisquamatus* та екарин з отрути *Echis carinatus*. Для екарину була відомою первинна, вторинна та третинна структури.

Екамулін складається із двох нековалентно з'єднаних субодиниць з молекулярною масою 67 (S1) і 27 (S2) kDa, що взаємодіють у відношенні 1:1. Обидві субодиниці екамуліну було розділено електрофоретично в поліакріламідному гелі, а потім перенесено на PVDF-мембрану в електричному полі. Одержані таким чином зразки було використано для проведення N-кінцевого аналізу на автоматичному секвенаторі PPSQ-31A (Shimadzu, Японія) з використанням хімічної деградації поліпептидного ланцюга з N-кінця за методом Едмана. Кожну з субодиниць екамуліну вирізали з PVDF-мембрани,

поміщали послідовно в секвенатор і піддавали 10 циклам секвенування. Роботу проводили у співпраці з BioCentrum Sp. (Краків, Польща).

Амінокислотні залишки, виявлені в кожному циклі, представлені в таблиці 4.7, повна інформація щодо N-кінцевого аналізу екамуліну надана в Додатоку Й.

Таблиця 4.7

Послідовність амінокислотних залишків (АК) з N-кінця двох субодиниць (S1 та S2) екамуліну з отрути *Echis multisquamatus*.

Субодиниця	АК послідовно від N-кінця									
S1	F/G	P/G	P	R	K	K	K	F/K	D	K/D
S2	D/E	-	A/L	T/P	G/D	W	F/S	V/A	Y/A	G/E

Неоднозначність отриманих результатів, очевидно, є наслідком поліморфізму даного ензиму у різних особин виду *Echis multisquamatus*. На користь такого припущення свідчить той факт, що N-кінцева послідовність субодиниці S1, що є функціонально активною, більш визначена і лише у 25% амінокислотних позицій має два варіанти амінокислотних залишків. В той час як низькомолекулярна субодиниця, що не несе функціонального навантаження, більш гетерогенна.

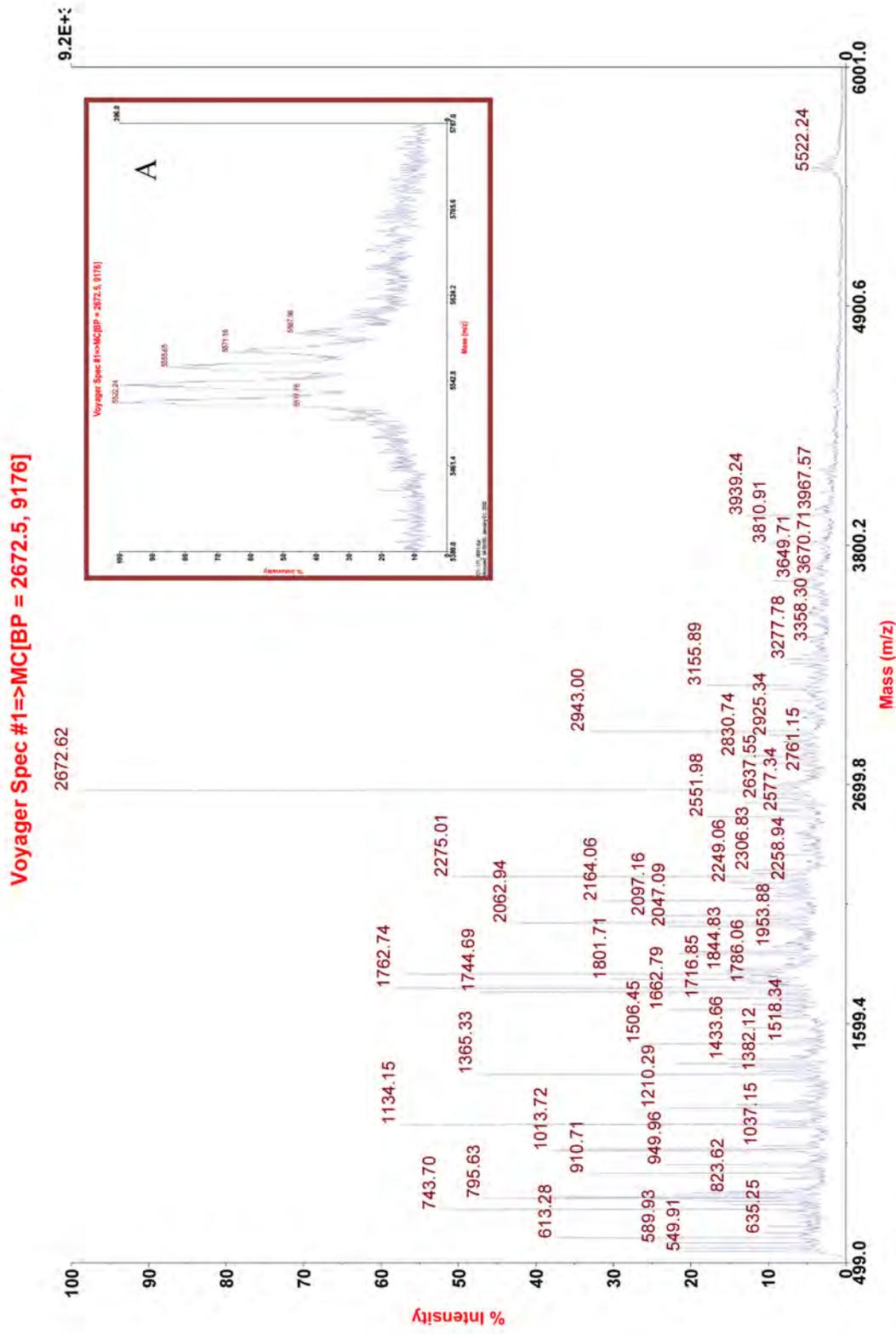
На наступному етапі нами було проведено трипсиноліз екамуліну. В ході досліджень, субодиниці екамуліну були електрофоретично розділені, виділені з гелю та піддані розщепленню трипсином за стандартною методикою. Отримані триптичні фрагменти були ідентифіковані за допомогою MALDI-TOF мас-спектрометрії (рис. 4.19, 4.20).

Було обрано основні піки, які за своїми масою і зарядом відповідали пептидам – продуктам трипсинолізу. Порівняння продуктів трипсинолізу екамуліну та екарину (дані псбі) показало, що 54 % амінокислотної послідовності екарину гомологічна послідовності низькомолекулярної субодиниці екамуліну (S2) та 23 % - послідовності високомолекулярної субодиниці екамуліну (S1).

Треба зазначити, що амінокислотна послідовність екарину S317-K364 містить чотири метіонінові залишки, що можуть незалежно один від одного окислюватись. Гомологічна ділянка знаходиться в низькомолекулярній субодиниці екамуліну і наявність в ній метіонінових залишків додатково підтверджується мас-спектром фрагменту із співвідношенням маса/заряд 5522. Як видно з рис. 4.19 (А), даний пік розподіляється на п'ять піків із різницею співвідношення маса/заряд 16, що відповідає молекулярній масі кисню. Таким чином, проявляються триптичні фрагменти екамуліну, що містять відновлені та окислені метіонінові залишки у співвідношенні 0/4 або 1/3, або 2/2, або 3/1, або 4/0. Знаходження в складі екамуліну метіонін-збагаченого регіону, гомологічного екарину, підтверджує гомологічність цих ензимів.

При електрофоретичному аналізі екамуліну було виявлено, що його низькомолекулярна субодиниця є гетерогенною та представлена на електрофореграмі трьома поліпептидними фрагментами. Проведений трипсиноліз та порівняння триптичних фрагментів дозволили визначити, що дві найменші протеїнові фракції низькомолекулярної субодиниці є ідентичними (рис. 4.21).

Показано, що гетерогенність S2-субодиниці пояснюється існуванням двох її ізоформ, які за даними трипсинолізу також є гомологічними, але неідентичними.



C:\...171_0001.dat
 Acquired: 04:09:00, January 01, 2002

Рис. 4.19. Мас-спектр триглічних пеплідів, отриманих в процесі трипінлізу низькомолекулярної субодиниці екамуліну (S2). А - мас-спектром фрагменту із співвідношенням маса/заряд 5522.

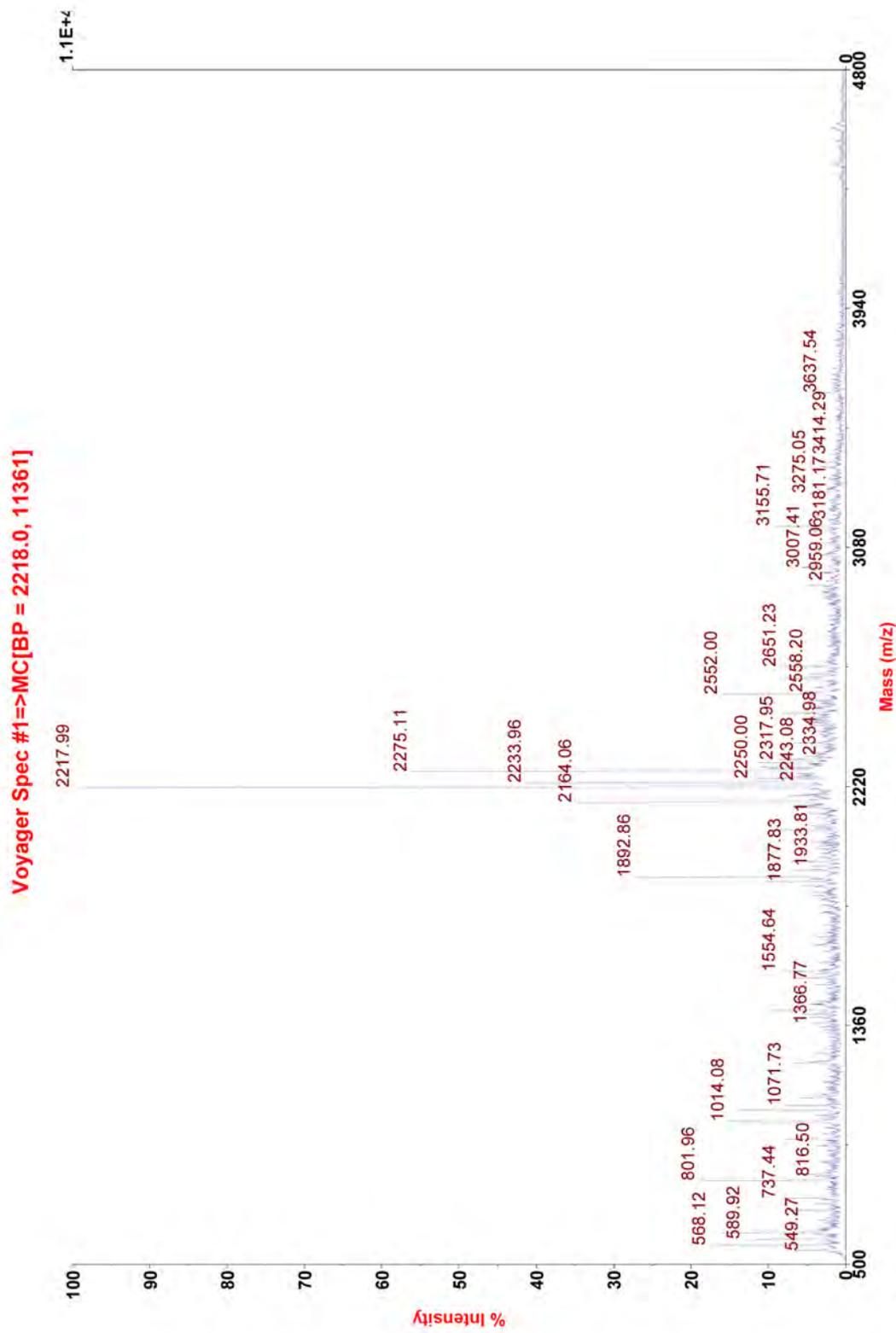


Рис. 4.20. Мас-спектр триптичних пептидів, отриманих в процесі трипсинолізу високомолекулярної субодиниці екамуліну (S1)


```

1  MIQILLVIIC  LAVFPYQGCS  IILGSGNVND  YEVVYPQKVT  ALPKGAVQQP
51  EQKYEDAMQY  EFEVKGEPVV  LHLEKNKELF  SEDYSETHYS  SDDREITTNP
101 SVEDHCYYHG  RIQNDAESTA  SISACNGLKG  HFKLRGETYF  IEPLKIPDSE
151 AHAVYKYENI  ENEDEAPKMC  GVTQDNWESD  EPIKKTGLI  VPPHERKFEK
201 KFIELVVVD  HSMVTKYNN  STAIRTWIYE  MLNTVNEIYL  PFNIRVALVG
251 LEFWCNGDLI  NVTSTADDTL  HSGEWRASD  LLNRKRHDHA  QLLTNVTLDH
301 STLGITFVYG  MCKSDRSVEL  ILDYSNITFN  MAYIIAHEMG  HSLGMLHDTK
351 FCTCGAKPCI  MFGKESIPPP  KEFSSCSYDQ  YNKYLLKYNP  KCILDPPLRK
401 DIASPAVCGN  EIWEEGEECD  CGSPADCRNP  CCDAATCKLK  PGAECGNGEC
451 CDKCKIRKAG  TECRPARDDDC  DVAEHCTGQS  AECPRNEFQR  NGQPCLNNSG
501 YCYNGDCPIM  LNQCIALFSP  SATVAQDSCF  QRNLQGSYYG  YCTKEIGYYG
551 KRFPCAPQDV  KCGRLYCLDN  SFKKNMRCKN  DYSYADENKG  IVEPGTKCED
601 GKVCINRKCV  DVNTAY

```

Рис. 4.22. Первинна структура екарину. Жовтим виділені фрагменти, гомологічні з низькомолекулярною субодиноцею екамуліну (S2); підкреслені послідовності гомологічні з високомолекулярною субодиноцею екамуліну (S1)

На рисунку 4.22 позначено послідовність екарину з виділеними фрагментами, які, за даними трипсинолізу, можуть бути гомологічними екамуліну. Ензими походять з отрути близьких видів змій та мають подібну ензиматичну активність. Так, відомо, що екамулін з отрути *Echis multisquamatus* та екарин з отрути *Echis carinatus* активують протромбін, тож для остаточного вибору протеїнового активатора зсідання крові, на якому буде зосереджено нашу роботу, ми порівняли функціональні активності цих двох ензимів.

Амідолітичну активність визначали як здатність розщеплювати амідний зв'язок між *n*-нітроаніліном та трипептидом у хромогенному субстраті. Відщеплення *n*-нітроаніліну реєстрували за зміною поглинання при довжині хвилі 405 нм. Була визначена амідолітична активність екарину та екамуліну по відношенню до таких хромогенних субстратів: S2238 D-Phe- Pip-Arg- pNA, S2251 H-D-Val-Leu-Lys-pNA, S2765 D-Arg- Gly- Arg- pNA, S2302 D-Pro-Phe-Arg- pNA („Biophen”, США).

Було показано, що екарин не розщеплює жоден з хромогенних субстратів, що використовуються в лабораторній діагностиці. Натомість, екамулін розщеплював лише S2302.

Здатність екарину та екамуліну активувати протромбін в плазмі крові оцінювали за розщепленням тромбін-специфічного субстрату S2238 після додавання екарину чи екамуліну до плазми крові. Досліджувані ензими розщеплювали протромбін плазми крові з утворенням тромбіну, який виявляли за розщепленням тромбін-специфічного хромогенного субстрату. Розщеплення субстрату реєстрували спектрофотометрично при довжині хвилі 405 нм.

На рис. 4.23, А видно, що екамулін більш ефективно, порівняно з екарином, активує протромбін плазми крові, що виявляється в швидшому розщепленні тромбін-специфічного субстрату.

Зсідаючу активність екамуліну та екарину визначали, реєструючи час зсідання плазми крові при додаванні CaCl_2 (8мМ) та розчину ензиму в концентрації 0,2 мг/мл. На рис. 4.23, Б видно, що екарин більш ефективно, порівняно з екамуліном, викликає зсідання плазми крові.

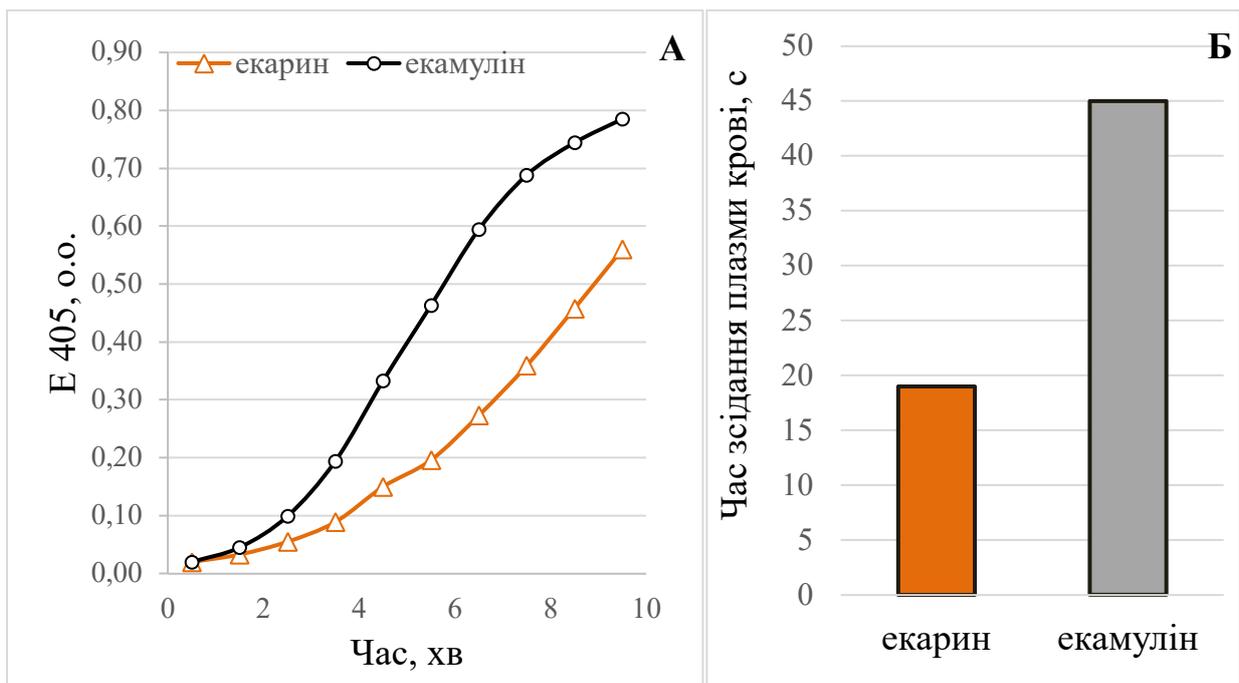


Рис. 4.23. Активація протромбіну плазми крові (А) та зсідання плазми крові (Б) екамуліном з отрути *Echis multisquamatis* та екарином з отрути *Echis carinatus*

Отже, з метою використання протеїнового активатора як агента для забезпечення зсідання крові, екарин є більш придатним та ефективним. Крім того, виходячи з відомостей про третинну будову екарину, його рекомбінантні аналоги простіше отримувати за допомогою сучасних технологій.

Таким чином, екамулін з отрути *Echis multisquamatus* та екарин з отрути *Echis carinatus* – це ефективні ензимні активатори протромбіну, що здатні забезпечувати коагуляцію без участі ензимів каскаду зсідання крові. Виходячи з результатів порівняння їхньої функціональної активності, можна сказати, що ензими є аналогічними за фізіологічною дією.

Зважаючи на те, що екамулін складається з двох субодиниць, а екарин є одноланцюговим протеїном, що дозволяє значно легше одержувати його рекомбінантний аналог, а також в зв'язку з високою функціональною активністю останнього, для подальшої роботи було обрано екарин з отрути *Echis carinatus*.

4.5.2. Створення генетичної конструкції, що кодує активатор протромбіну

У ході попередньо проведених досліджень було вирішено обрати як основу для створення рекомбінантного активатора зсідання крові ензим екарин з отрути *Echis carinatus*. Надалі було необхідно створити генетичні конструкції для клонування ензиму, що передбачало зокрема рестрикційний аналіз гену, створення генетичних конструкцій повнорозмірного та зрілого екарину.

Ген екарину, який в подальшому був використаний для клонування в плазмиду, являє собою лінійну дволанцюгову ДНК 1850 п.н. довжиною. Даний ген був отриманий у вигляді послідовності, заклонованої у комерційний вектор, з наступним переклоуванням у вектори рЕТ-28а(+) *gs*, рсDEF3(рсDNA3.1(+)). Цей ген не містить інтронів, оскільки, скоріше за все його першоджерелом була відповідна кДНК бібліотека, що робить можливим експресію в прокаріотичних системах.

Щодо екарину відомо, що протеїн після експресії підлягає протеолізу з відщепленням С-кінцевого фрагменту, тому при створенні генетичної конструкції афінну мітку слід розміщувати на N-кінці даного гену. Утворений зрілий екарин не містить послідовностей, закодованих інтронами. Послідовність зрілого протеїну відповідає нуклеотидам 681-1958, і складає 1277 нуклеотидів. Рестрикційну мапу гену екарину наведено на рис. 4.24.

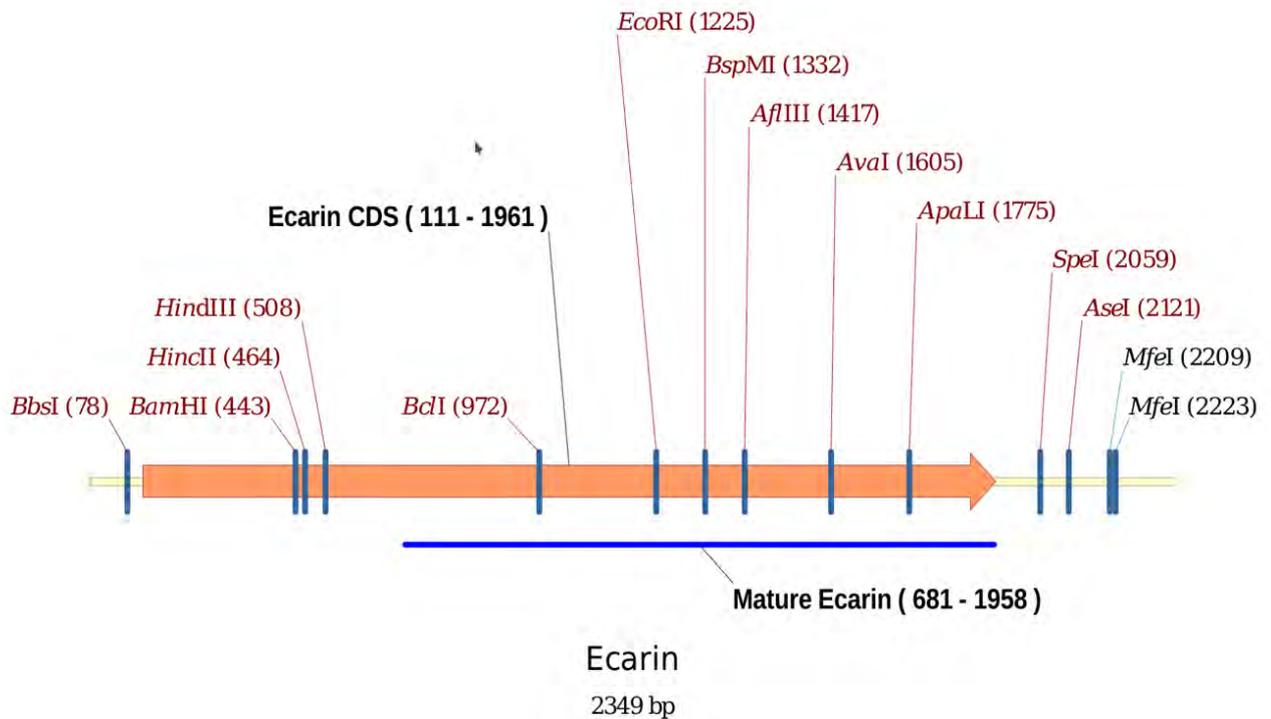


Рис. 4.24. Рестрикційна мапа гену екарину

Експресія гену відбувається в напрямку, вказаному стрілкою на мапі гену. Отже, старт-кодон розташований зліва, стоп-кодон – справа.

Безпосередньо в послідовності гену знаходяться рестрикційні сайти, у порядку справа наліво, починаючи зі старт-кодону: *ApaLI* (1775), *AvaI* (1605), *AflIII* (1417), *BspMI* (1332), *EcoRI* (1225), *BclI* (972), *HindIII* (508), *HincII* (464), *BamHI* (443).

Жоден сайт рестрикції не повторюється протягом послідовності гену і є унікальним.

Для експресії отриманого гену екарину нами було зроблено чотири варіанти генетичних конструкцій на основі векторів *pET-28a(+)* *gs*, *pcDEF3(pcDNA3.1(+))*.

Вектор *pET-28a(+)* *gs* є виключно бактерійним, а *pcDEF3(pcDNA3.1(+))* є човниковим і може підтримуватися, реплікуватися як в еукаріотичних так і в прокаріотичних клітинах. Еспресується цей вектор в клітинах ссавців. На конструкціях гени позначені стрілками, що співпадають з напрямком експресії. Вектори знаходяться у кільцевій формі.

Отже, були отримані такі генетичні конструкції: Full-length Ecarin-8xHis_pET-28a(+) rc (рис. 4.25) та 6His-TEV-Mature_Ecarin-pET-28a(+) rc (рис. 4.26)

Обидві конструкції створені на основі бактеріального вектора pET-28a(+) rc, що містить касету полілінкера для клонування, ген lac, що кодує регулятор експресії, який взаємодіє з геном lac-оператора, що стоїть після T7-промотора і регулює його. Також ген стійкості до канаміцину, fl origin та ColE1 pBR322 origin (сайти реплікації плазміди). На кінці полілінкерної касети міститься T7-термінатор. Обидві конструкції працюють і реплікуються лише в бактеріальній системі експресії. Червоним кольором і великим шрифтом на схемах позначено сайти рестрикції, по яких відбувалася вставка гена та polyHis-tag (рис. 4.25, 4.26).

Різниця між конструкціями полягає у розмірі His-tag, розташуванні цієї послідовності, та наявності сайту протеолізу. Також є різниця у розмірі гену екарину (повнорозмірний чи зрілий).

6His-TEV-Mature_Ecarin-pET-28a(+) rc має 6-His-tag що міститься на N-кінці, та сайт протеолізу для протеїнази TEV, що відокремлює послідовність His-tag від цільового протеїна. Ця конструкція кодує зрілий, процесований, екарин.

Full-length Ecarin-8xHis_pET-28a(+) rc має 8-His-tag на C-кінці та не має сайту протеолізу для TEV. Ця конструкція кодує повнорозмірний екарин, який може процесуватися і позбавлятися His-tag ще до виділення з клітин, якщо протеїн не буде накопичуватися у тільцях включень.

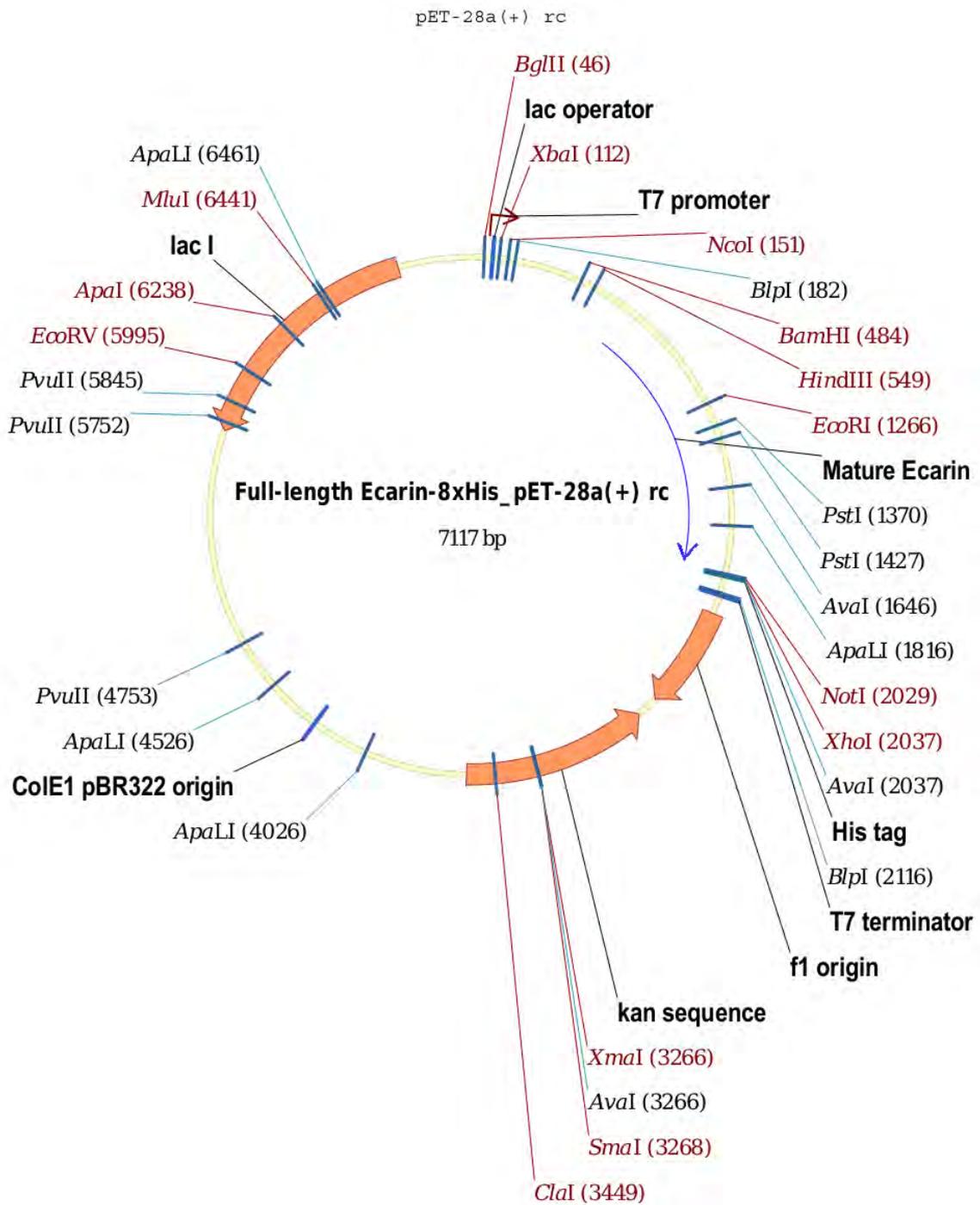


Рис. 4.25. Схема структури генетичної конструкції Full-length Ecarin-8xHis_pET-28a(+) rc

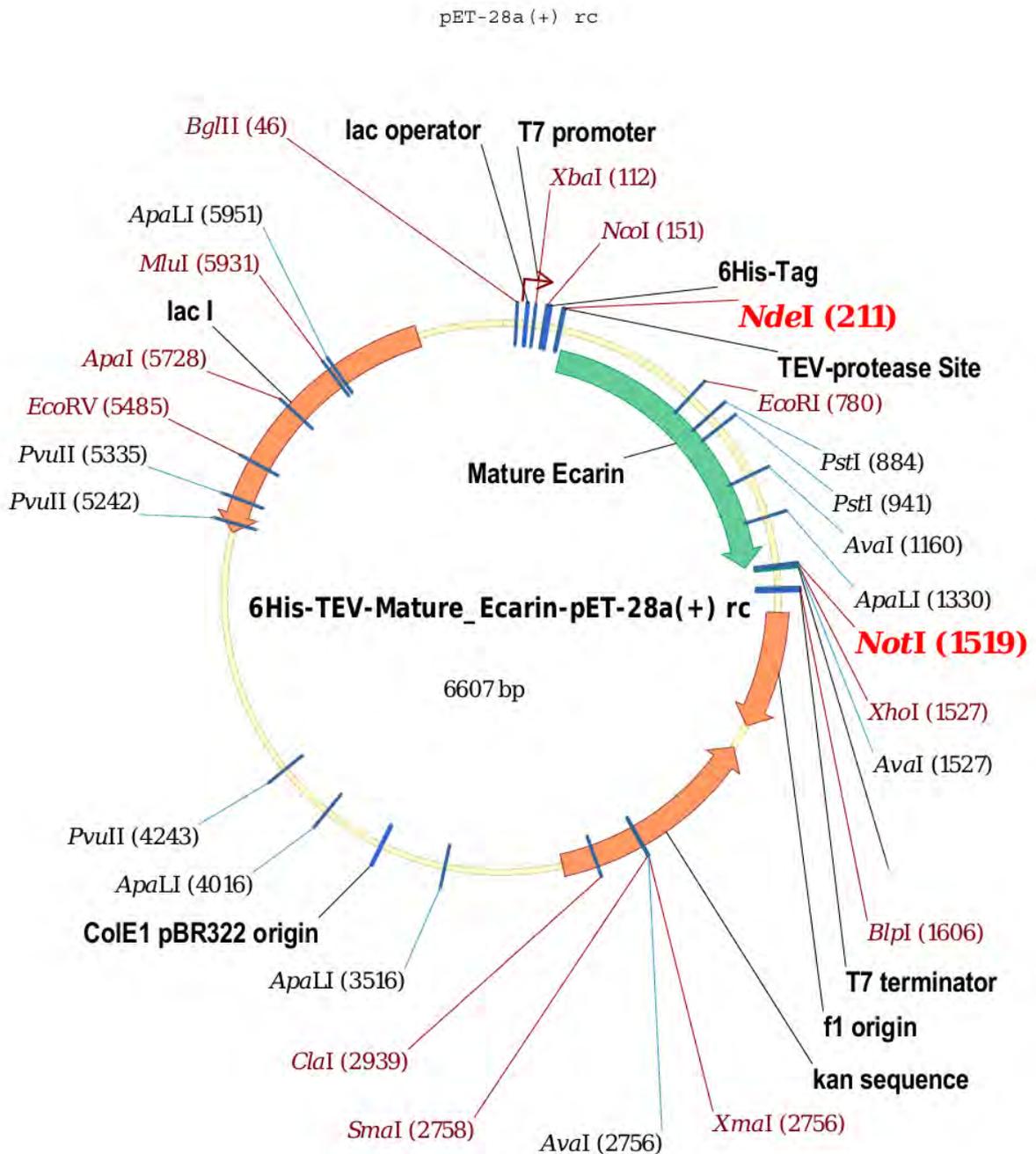


Рис. 4.26. Схема структури генетичної конструкції 6His-TEV-Mature_Ecarin-pET-28a(+) rc

Наступна пара конструкцій, що були отримані, мають назви: pcDEF3_6xHis-TEV-Mature_Ecarin (рис. 4.27) та pcDEF_Full-length Ecarin-8His (рис. 4.28). Обидві конструкції створені на основі човникового вектору pcDEF3(pcDNA3.1(+)), мають ген резистентності до ампіциліну Amp(R) під контролем bla-промотору, та ген резистентності до неоміцину Neo(R), що

закінчується SV40 сигналом поліаденілювання та контролюється SV40-промотором.

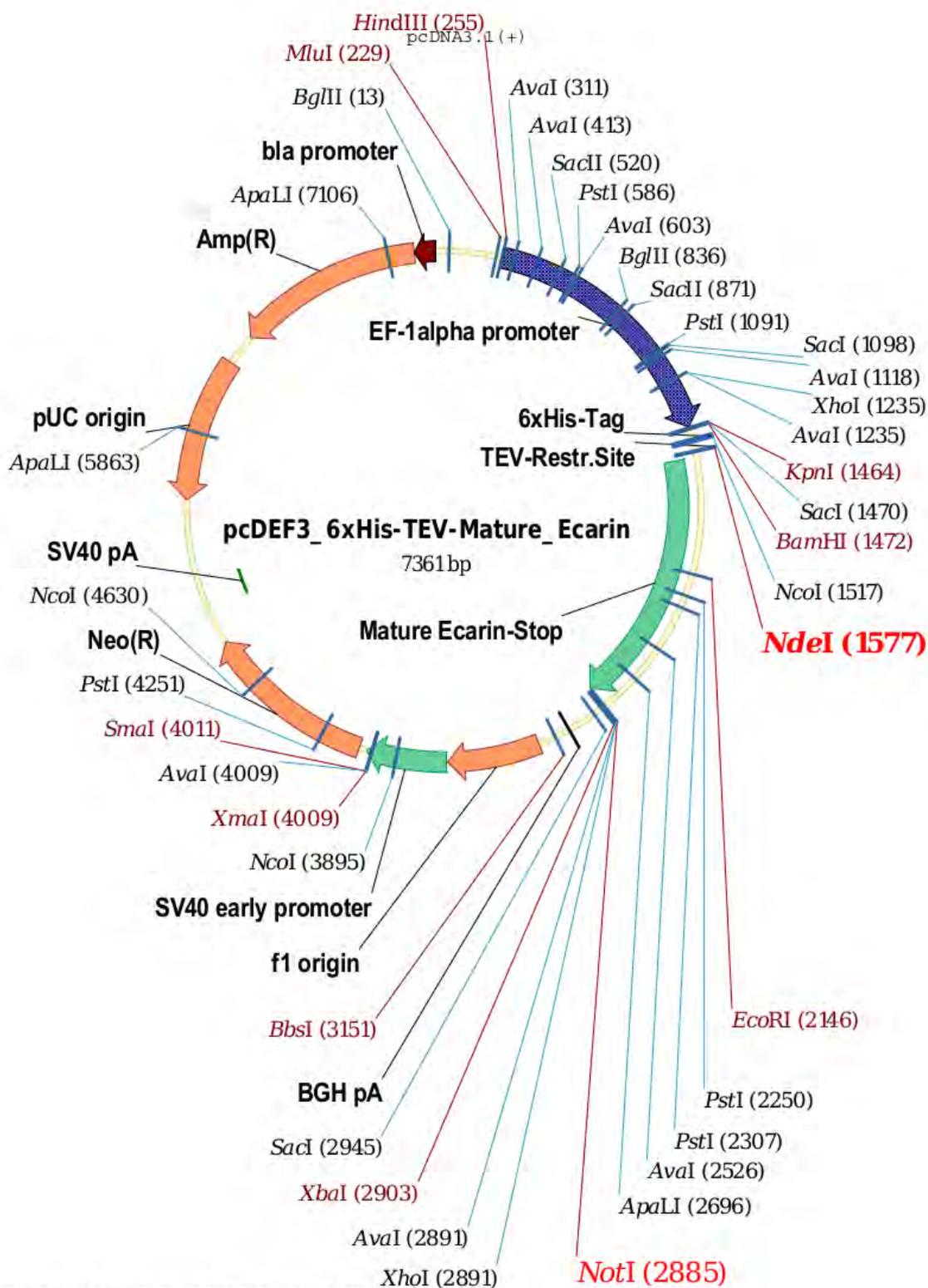


Рис. 4.27. Схема структури генетичної конструкції pcDEF3_6xHis-TEV-Mature_Ecarin

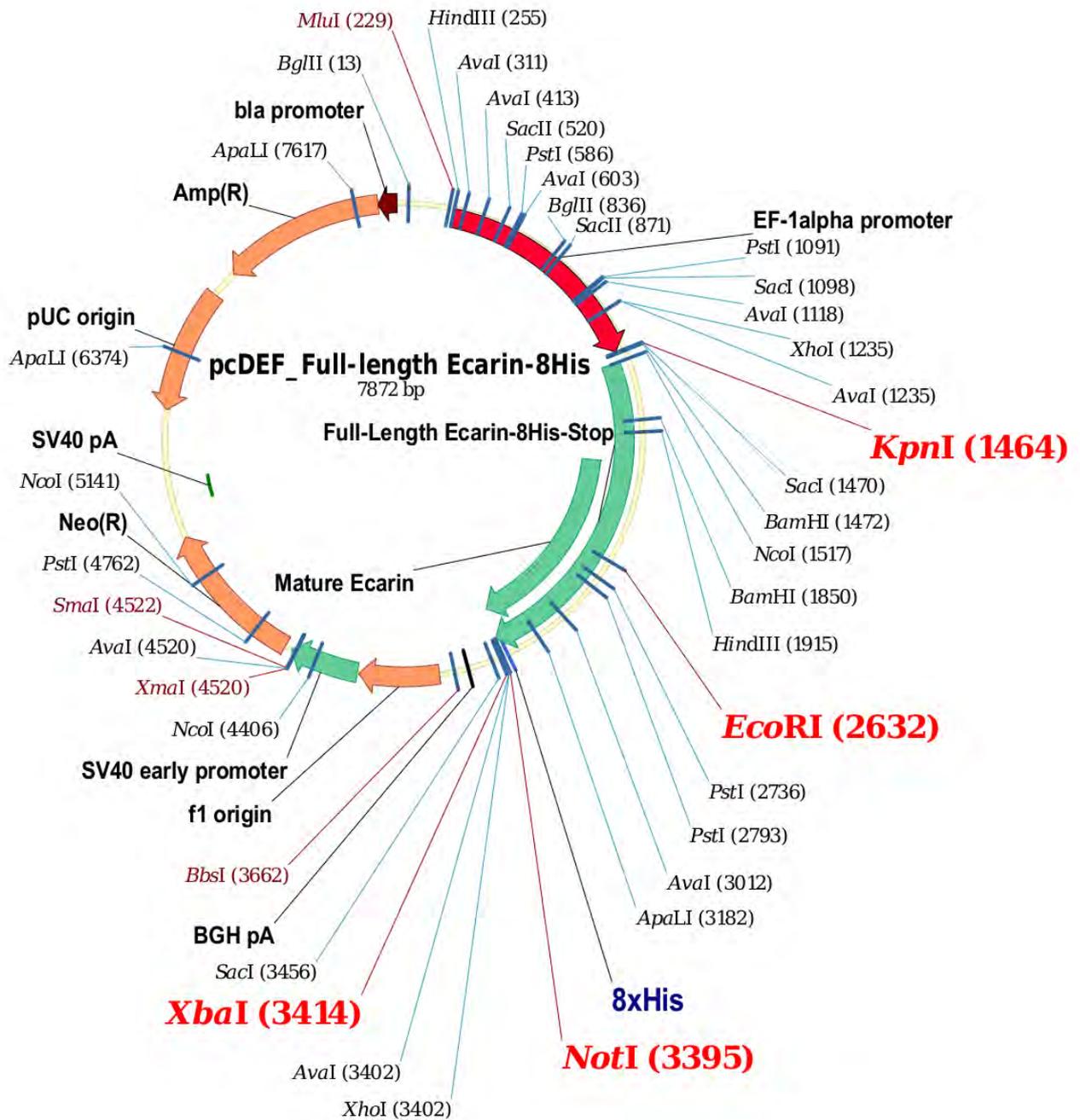


Рис. 4.28. Схема структури генетичної конструкції pcDEF_Full-length Ecarin-8His

Вектор має pUC origin та f1 origin сайти реплікації. Також в наявності є полілінкер для клонування, який дозволяє вставити сегмент ДНК під контроль EF-1alpha-промотора та термінувати його BGH pA сигналом поліаденілювання. Обидві конструкції реплікуються не тільки в бактеріальній системі експресії, але і у клітинах ссавців. Проте, експресія цільового гену, що був заклонований,

можлива лише у клітинах ссавців. Червоним кольором і великим шрифтом на схемах позначено сайти рестрикції, по яких відбувалася вставка гену та polyHis-tag (рис. 4.27, 4.28).

Різниця між двома останніми конструкціями полягає в розмірі His-tag, розташуванні цієї послідовності та наявності сайту протеолізу. Також є різниця у розмірі гену екарину (повнорозмірний чи зрілий).

pcDEF3_6xHis-TEV-Mature_Ecarin має 6-His-tag що міститься на N-кінці, та сайт протеолізу для протеїнази TEV, що відокремлює послідовність His-tag від цільового протеїна. Кодує зрілий процесований екарин.

pcDEF_Full-length Ecarin-8His має 8-His-tag на C-кінці та не має сайту протеолізу для TEV. Кодує повнорозмірний екарин.

4.5.3. Підготовка генетичної конструкції рекомбінантного активатора протромбіну для переклонування в еукаріотичній системі експресії

До кДНК повнорозмірного попередника ензимного активатора протромбіну було внесено фланкуючі рестрикційні ділянки NcoI (5'-кінець) і NotI (3'-кінець), а перед Stop-кодом зі збереженням рамки зчитування введено трек 8-His для спрощення процедури очистки рекомбінантного протеїну.

За допомогою молекулярного клонування нами було внесено кДНК повнорозмірного попередника ензимного активатора протромбіну до вектора для бактерійної експресії pET28a (рис. 4.29) зі створенням конструкції FL-Ecarin precursor-8His_pET-28a та перевірено ефективність клонування згаданої вставки за допомогою рестрикційного аналізу (рис.4.30).

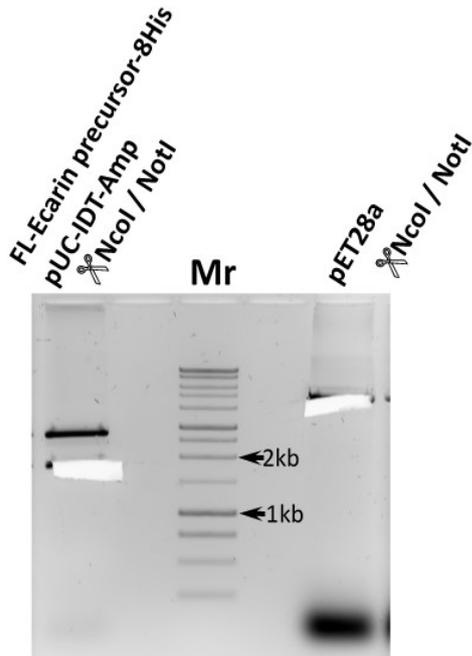


Рис. 4.29. Розділення та виділення із 1% агарозного гелю фрагментів для молекулярного клонування при створенні конструкції FL-Ecarin precursor-His_pET28a.

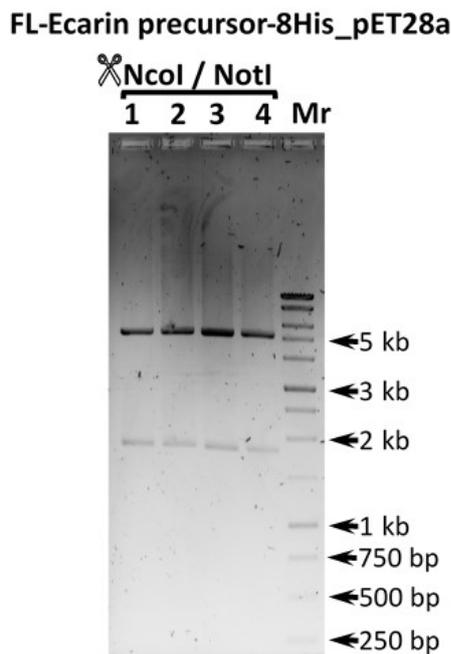


Рис. 4.30. Результати розділення на 1 % агарозному гелі аналітичних фрагментів рестрикційних реакцій в ході аналізу вбудовування вставки при створенні конструкції для бактерійної системи експресії FL-Ecarin precursor-His_pET28a.

Для створення вектора для експресії рекомбінантного ензимного активатора протромбіну в системі еукаріотичних клітин лінії НЕК-293 та наступного його очищення за допомогою класичного методу хроматографії на нікель-сефарозі, нами було перенесено вставку FL-Ecarin precursor-8His за допомогою рестрикційних ензимів XbaI та NotI (Рис. 4.31) та вставлено їх по ділянках SpeI NotI. Ефективність клонування було перевірено за допомогою пари фланкуючих рестрикційних ензимів KpnI I XbaI (Рис. 4.32).

З метою створення бактерійної експресійної системи для продукції зрілої форми ензимного активатора протромбіну нами проведено підбір умов ампліфікації частини кДНК, яка її кодує, за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). До праймерів були внесені ділянки, відповідальні за розпізнавання рестриктаз NdeI (5'-кінець) і NotI (3'-кінець). Крім цього, до 5'-праймера було додано ділянку розпізнавання протеїнази вірусу тютюнової мозаїки (Tobacco etch virus, TEV), а рамка зчитування була продовженням такої для N-кінцевої 6-His-мітки.

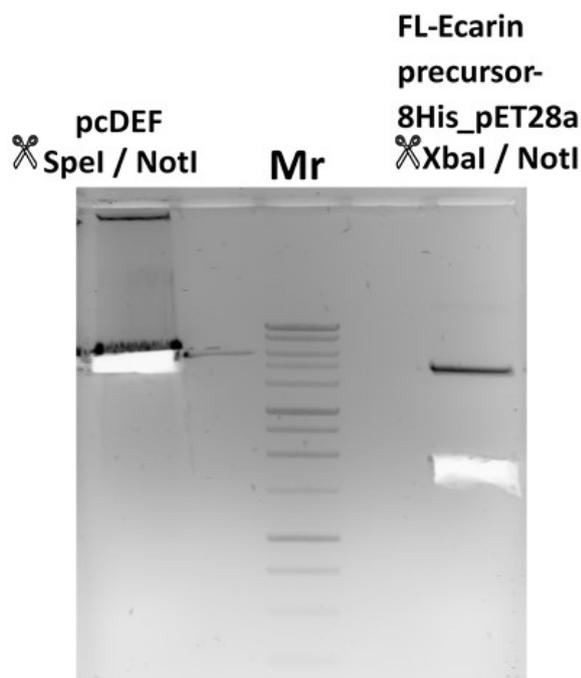


Рис. 4.31 Розділення та виділення із 1% агарозного гелю фрагментів для молекулярного клонування при створенні конструкції FL-Ecarin precursor-His_pET28a.

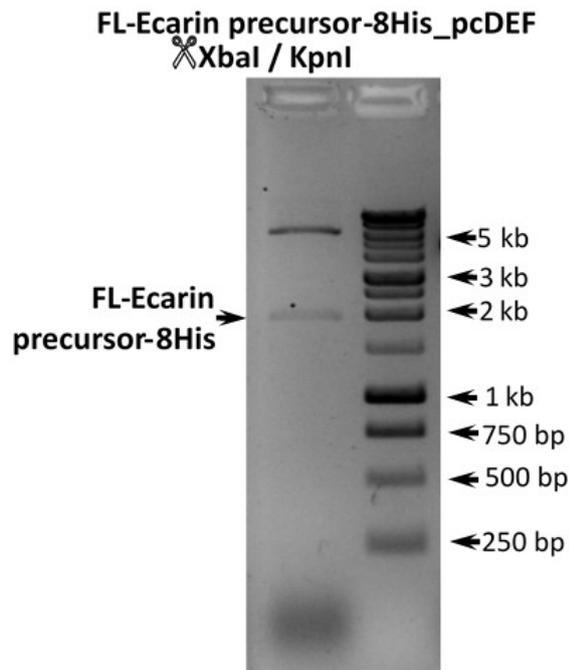


Рис. 4.32 Результати розділення на 1,5 % агарозному гелі аналітичних фрагментів рестрикційних реакцій, отриманих у ході аналізу вбудовування вставки при створенні конструкції FL-Ecarin precursor-8His_pcDEF.

Результати підбору умов проведення ПЛР показали, що за створеного дизайну ампліфікації всі три перевірені варіанти умов відпалювання праймерів (52 °C, 55 °C, 60 °C) є успішними і в результаті ПЛР утворюються очікувані продукти (рис. 4.33). Далі нами проведена підготовка одного із цих продуктів (60 °C) до молекулярного клонування і виділення відповідних фрагментів із агарозного геля (рис. 4.34). Три із десяти проаналізованих клонів (№1, 5 і 8) мали відповідну вставку (рис. 4.35) і були далі перевірені за допомогою секвенування на предмет наявності імовірних помилок полімерази.

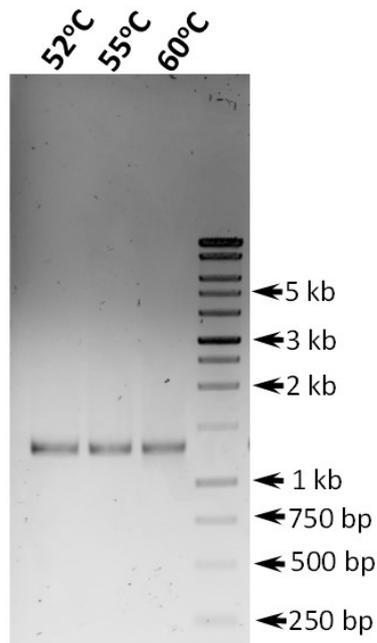


Рис. 4.33. Результати дослідження на 1 % агарозному гелі продуктів полімеразної ланцюгової реакції, проведеної з метою створення зрілої форми ензимного активатора протромбіну для бактерійної експресії. Для ідентифікації вказано умови відпалювання праймерів.

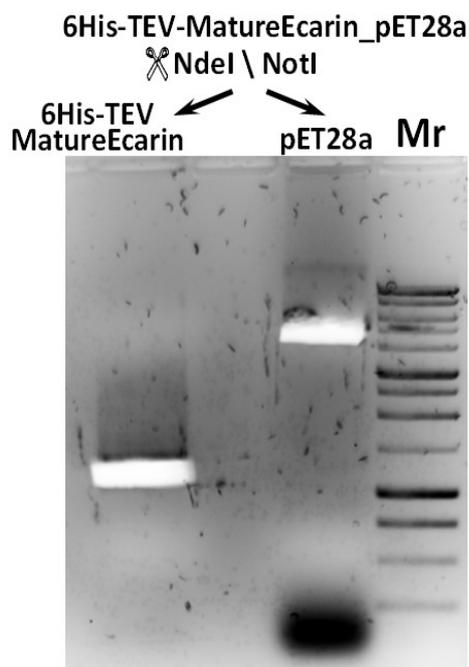


Рис. 4.34. Розділення та виділення із 1 % агарозного гелю фрагментів полімеразної ланцюгової реакції для молекулярного клонування при створенні конструкції 6His-TEV-MatureEcarin_pET28a.

6His-TEV-MatureEcarin_pET28a

✂ NdeI \ NotI

1 2 3 4 5 Mr 6 7 8 9 10

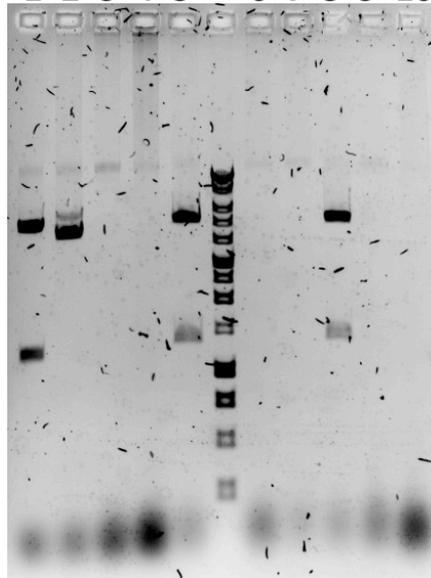


Рис. 4.35 Результати розділення на 1 % агарозному гелі аналітичних фрагментів рестрикційних реакцій, отриманих у ході аналізу вбудовування вставки при створенні конструкції зрілої форми ензимного активатора протромбіну для його бактерійної експресії.

4.5.4. Перевірка прокоагулянтної активності рекомбінантного протеїнового активатора зсідання крові, отриманого у еукаріотичній системі експресії

Створену генетичну конструкцію Full-length ecarin precursor тегований His в векторі PCDEF (FL-Ecarin precursor-8His_pcDEF) було успішно трансфіковано у клітини Human embryonic kidney HEK 293.

Культуральну рідину, в якій культивувалися клітини протягом 28 годин, було зібрано для отримання цільового протеїну. Цільовий протеїн – повнорозмірний активатор зсідання крові з His-tag – сорбувався на нікель-сефарозі та був елюйований буфером з 50 мМ імідазолом (буфер для елюції).

Напрацьований таким чином протеїн аналізували за функціональною здатністю ініціювати появу тромбіну, що призводить до активації тромбоцитів, фібриноутворення або ж гідролізу тромбін-специфічного амідного субстрату.

Здатність активувати протромбін плазми крові оцінювали за амідолітичною активністю тромбіну, що утворювався при інкубуванні рекомбінантного активатора протромбіну з плазмою крові. Для цього в інкубаційне середовище додавали 5 мкл рекомбінантного активатора протромбіну (20 мкг/мл), 5 мкл донорської плазми крові, 50 мкл 0,025 М CaCl₂, 12,5 мкл 2мМ хромогенного субстрату. Реакцію проводили в Трис-НСІ буфері, рН 7,4 з 0,13 М NaCl (загальний об'єм 125 мкл). Відщеплення *n*-нітроаніліну реєстрували за зміною поглинання при довжині хвилі 405 нм. Було показано, що отриманий рекомбінантний ензим здатен до активації протромбіну (рис. 4.36 А).

За кривою розщеплення тромбін-специфічного хромогенного субстрату в плазмі крові за активації протромбіну було розраховано питому швидкість розщеплення хромогенного субстрату і за калібрувальною кривою (рис. 4.36 Б) визначено, що в присутності 1 мг рекомбінантного активатора протромбіну утворюється 30 ± 3 NIH тромбінової активності.

Полімеризацію фібрину у плазмі крові за дії ензимного активатора (0,33 мкг/мл) та 0,001 М CaCl₂ вивчали за зміною мутності середовища інкубації під час формування полімерного фібрину. У контрольну пробу було внесено еквівалентний об'єм буфера для елюції (рис. 4.37).

Було показано, що внесення у середовище інкубації рекомбінантного активатора протромбіну прискорює рекальцифікацію плазми крові. Зокрема, протягом перших 20 хв інкубації ми відзначили початкові етапи формування фібринового полімеру. Процес, ініційований внесенням йонів Ca²⁺, за присутності ензимного активатора виявився значно ефективнішим (рис. 4.37).

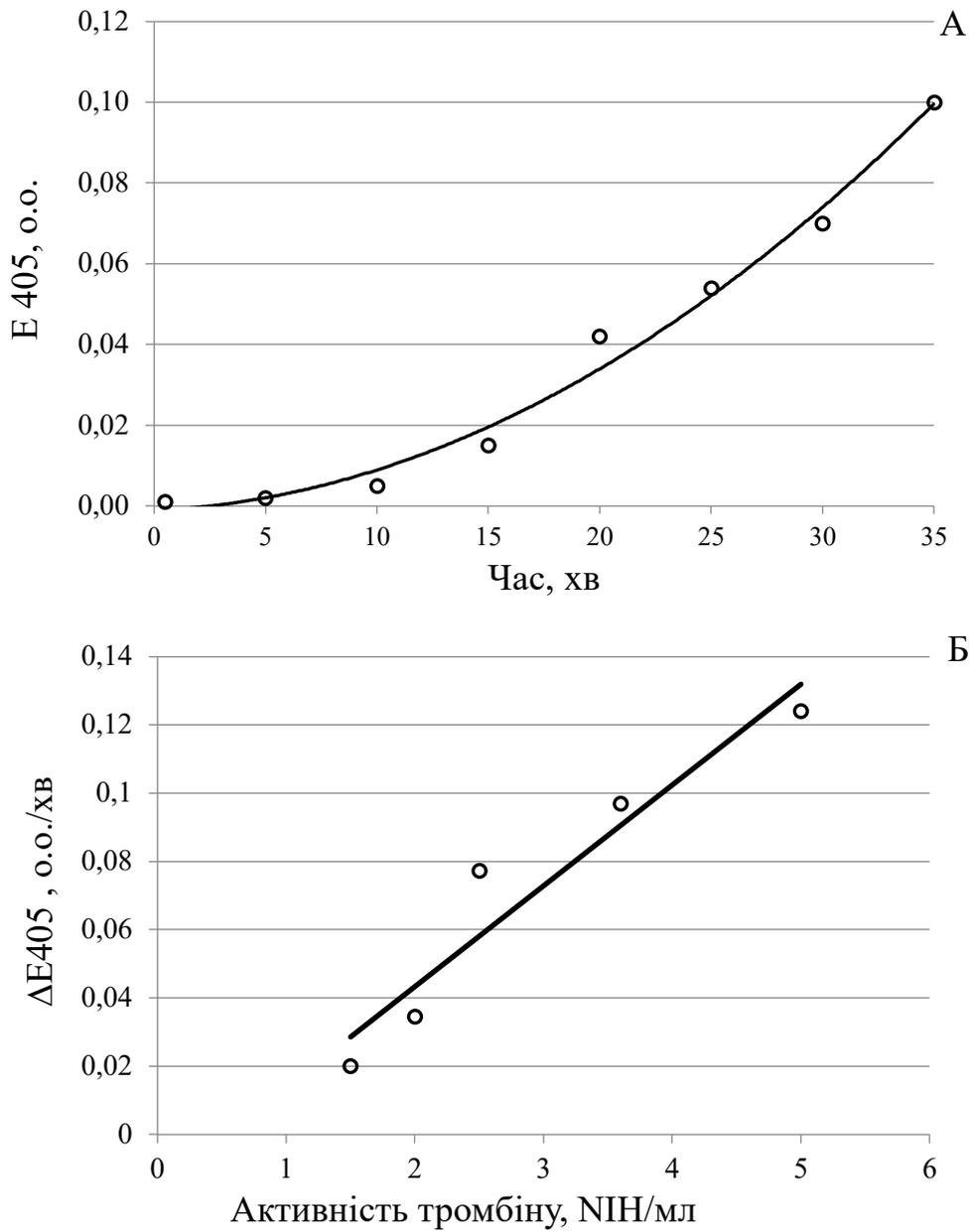


Рис. 4.36. Зміна оптичного поглинання в результаті розщеплення тромбін-специфічного хромогенного субстрату в плазмі крові за активації протромбіну плазми крові рекомбінантним активатором протромбіну (А) та за різної тромбінової активності (Б).

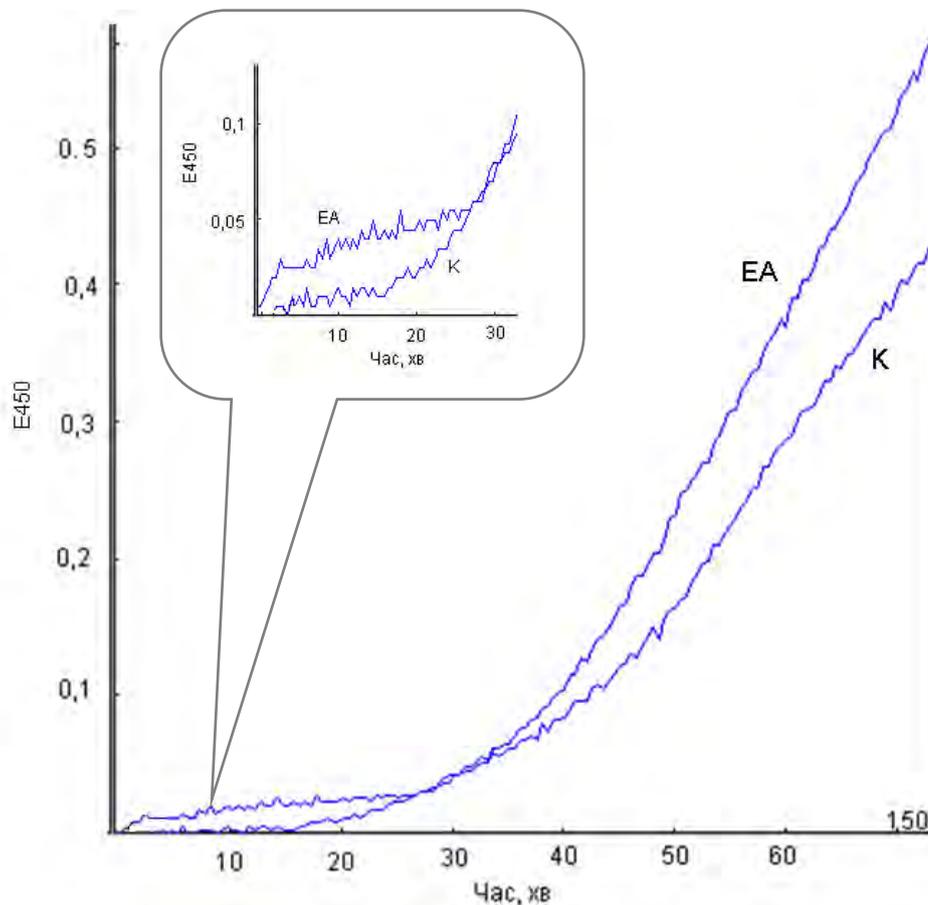


Рис. 4.37. Фібриноутворення у плазмі крові за дії рекомбінантного ензимного активатора протромбіну (0,3 мкг/мл) та 0,001 М CaCl_2 (EA). К – контрольна проба, до якої було внесено еквівалентний об'єм буфера для елюції.

Таким чином, рекомбінантний препарат, отриманий нами, був здатен ефективно активувати протромбін, що сприяло фібриноутворенню під дією утвореного тромбіну.

Показано, що за внесення у ЗТПК людини буферу для елюції та 0,001 М CaCl_2 через 3 хв інкубації у кюветі агрегометра при постійному перемішуванні спостерігається рекальцифікація. Цитрат натрію, що у препараті плазми крові забезпечує нейтралізацію йонів Ca^{2+} , тим самим перешкоджаючи коагуляції, при надлишку йонів Ca^{2+} втрачає свою дію, відтак у плазмі крові генерується тромбін, що у свою чергу активує тромбоцити та відщеплює від молекули фібриногену фібринопептиди А, забезпечуючи утворення фібрину, його полімеризацію та формування фібриново-тромбоцитарного згустку.

У випадку, коли розчин йонів Ca^{2+} вноситься у ЗТПК людини одночасно з рекомбінантним ензимним активатором зсідання крові, ми одразу ж спостерігали початок процесу формування агрегатів тромбоцитів. Відповідно до характеру кривої можна сказати, що до 3 хв спостерігаємо агрегацію тромбоцитів з поступовим виходом на плато (близько 10 %), характерним для тромбін-індукованої агрегації тромбоцитів. Через 3 хв у пробі з ензимним активатором спостерігається друга хвиля агрегації, яка у даному випадку включає фібриноутворення під дією тромбіну, утвореного за дії активатора та у результаті рекальцифікації плазми крові (рис. 4.38).

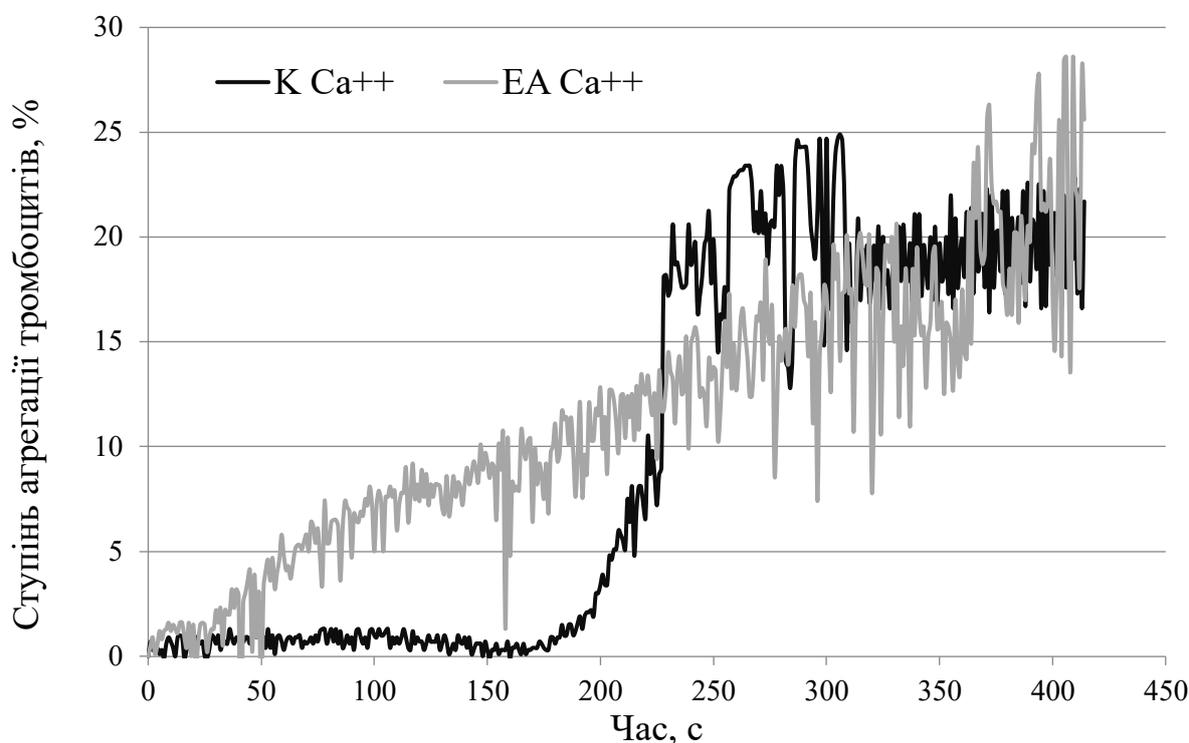


Рис. 4.38. Агрегація тромбоцитів людини у збагаченій тромбоцитами плазмі крові за дії рекомбінантного активатора протромбіну (0,33 мкг/мл) та 0,001 М CaCl_2 (ЕА). К – контрольна проба, агрегація тромбоцитів унаслідок рекальцифікації цитратної плазми крові внесенням 0,001 М CaCl_2 . У контрольну пробу було внесено еквівалентний об'єм буфера для елюції.

Для розмежування тромбіноутворення, викликаного ефектом активатора та ефектом рекальцифікації під час вимірювання довше ніж 3 хв, нами було використано іншу схему експерименту. Зокрема, ензимний активатор зсідання крові (0,6 мкг/мл) інкубували зі збагаченою тромбоцитами плазмою крові за

відсутності кальцію. За таких умов ензимний активатор був здатен активувати протромбін, однак утворений тромбін не виявляв своєї активності. Після 5 хв інкубації до середовища додавали 0,001 М CaCl₂ тим самим дозволяючи утвореному тромбіну проявити свою активність.

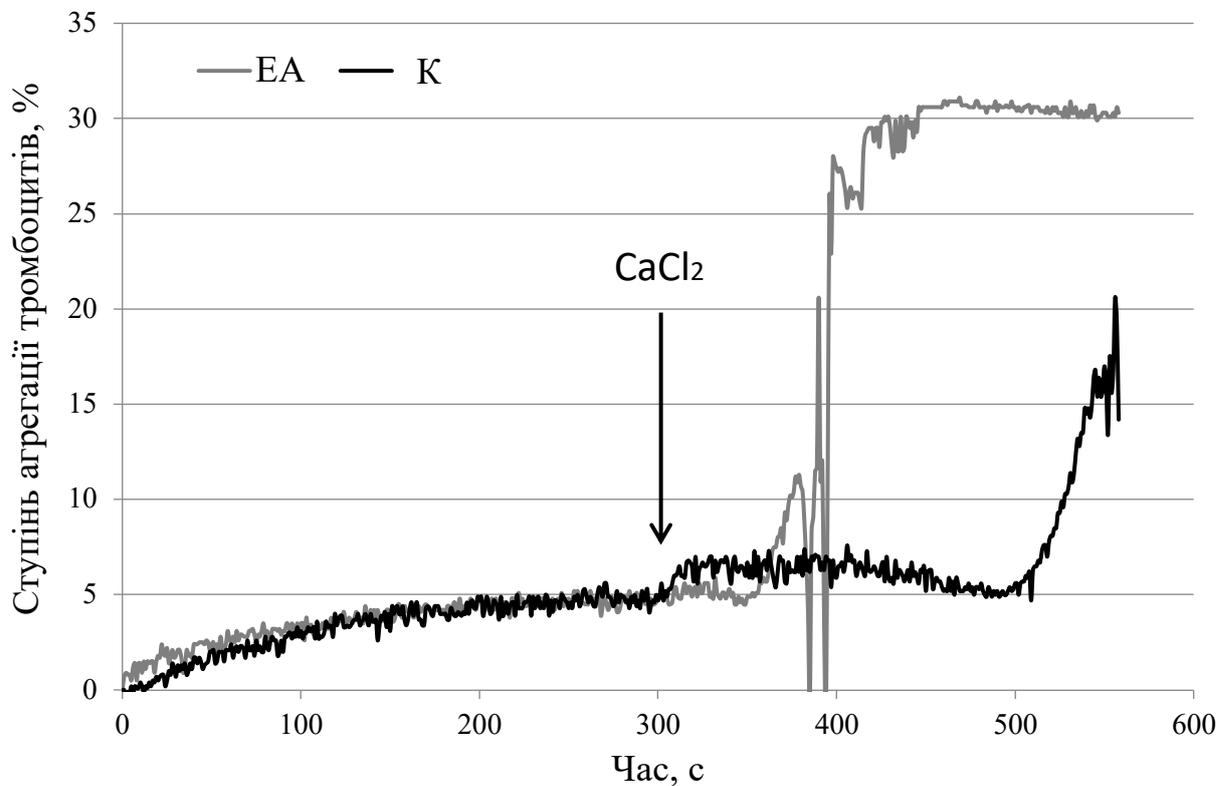


Рис. 4.39. Агрегація тромбоцитів людини у збагаченій тромбоцитами плазмі крові за дії рекомбінантного активатора протромбіну (0,6 мкг/мл) (ЕА). К – контрольна проба, до якої було внесено еквівалентний об'єм буфера для елюції. Агрегацію тромбоцитів уніціювали внесенням 0,001 М CaCl₂ через 5 хв після початку інкубації.

Було показано, що за постійного механічного перемішування, тромбоцити як у контрольній, так і в дослідній пробі утворювали мікроагрегати (не більше 5 %). Водночас, після внесення у дослідну пробу, яка містила активатор зсідання крові, 0,001 М CaCl₂ через 5 хв, спостерігали класичну криву тромбін-індукованої агрегації тромбоцитів. Ступінь першої хвили агрегації становила 10 %, ступінь другої хвили, пов'язаної з фібриноутворенням, становила 30 %.

Максимальною ступінь агрегації першої хвилі ставала через 1,5 хв після внесення CaCl_2 (рис. 4.39).

У контрольній пробі спостерігали утворення тромбіну, що з'являвся в результаті рекальцифікації, через 3 хв після внесення 0,001 М CaCl_2 , що вказує на відсутність додаткової тромбінової активності у цій пробі.

Таким чином, було показано, що отриманий нами ензимний активатор зсідання крові рекомбінантного походження був здатен ініціювати появу тромбіну в плазмі крові. Генерованої активатором кількості тромбіну було достатньо для індукції активації тромбоцитів та фібриноутворення.

Досліджували дію активатора протромбіну на хромогенні субстрати фактора Ха зсідання крові (S2765), тромбіну (S2238), плазміну (S2251) та калікреїну (S2302). Відщеплення *n*-нітроаніліну реєстрували за зміною поглинання при довжині хвилі 405 нм. Рекомбінантний активатор протромбіну не володів амідолітичною активністю відносно досліджених хромогенних субстратів, як і екарин природного походження.

Здатність рекомбінантного активатора протромбіну викликати гемоліз вивчали використовуючи суспензію відмитих еритроцитів отриманих зі свіжої цитратної крові донорів. Після інкубації еритроцитів з рекомбінантним активатором протромбіну осаджували клітини центрифугуванням протягом 10 хв при 1000 g і визначали поглинання супернатанту при довжині хвилі 543 нм проти робочого буферу. За 100% гемолізу приймали гемоліз, викликаний 50 мкл 1% Triton-X100.

В якості негативного контролю використовували Трис-НСІ буфер, рН 7,4 з 0,13М NaCl, тобто буфер в якому розчинений рекомбінантний активатор протромбіну. Як видно з таблиці 4.8, рекомбінантний активатор протромбіну не викликав гемолізу еритроцитів.

Оптичне поглинання середовища інкубації еритроцитів за присутності рекомбінантного активатора протромбіну та в контролях.

Гемолітичний агент	Оптичне поглинання при $\lambda=543$. о.о.	Рівень гемолізу, %
Triton-X100 (позитивний контроль)	40,00	100
Трис-НСІ буфер (негативний контроль)	0,36	0,9
Рекомбінантний активатор протромбіну	0,40	1

Вплив на тромбоцити досліджували методом цитометрії на протоковому цитофлуориметрі COULTER EPICS XL Flow Cytometer. В ході експерименту реєстрували два типи світлорозсіювання: фронтальне (FS), яке характеризує розмір клітин, та ортогональне (SS), яке характеризує щільність цитоплазми клітини, тобто – гранулярність тромбоцитів.

В пробірку для протокового цитофлуориметра вносили 1 мл збагаченої тромбоцитами плазми крові людини і 20 мкл рекомбінантного активатора протромбіну (20 мкг/мл). Слід відзначити, що за відсутності йонів Ca^{2+} , внесений рекомбінантний активатор протромбіну зберігав свою активність, однак ми повністю виключили можливі ефекти тромбіну на тромбоцити, що дало змогу зосередитися безпосередньо на дії активатора.

Параметри активації тромбоцитів (зміну розміру та гранулярності тромбоцитів) фіксували за зміною фронтального та ортогонального світлорозсіювання. Як видно з рис. 4.40, рекомбінантний активатор протромбіну не активував тромбоцити ЗТП та не викликав їх дегрануляцію.

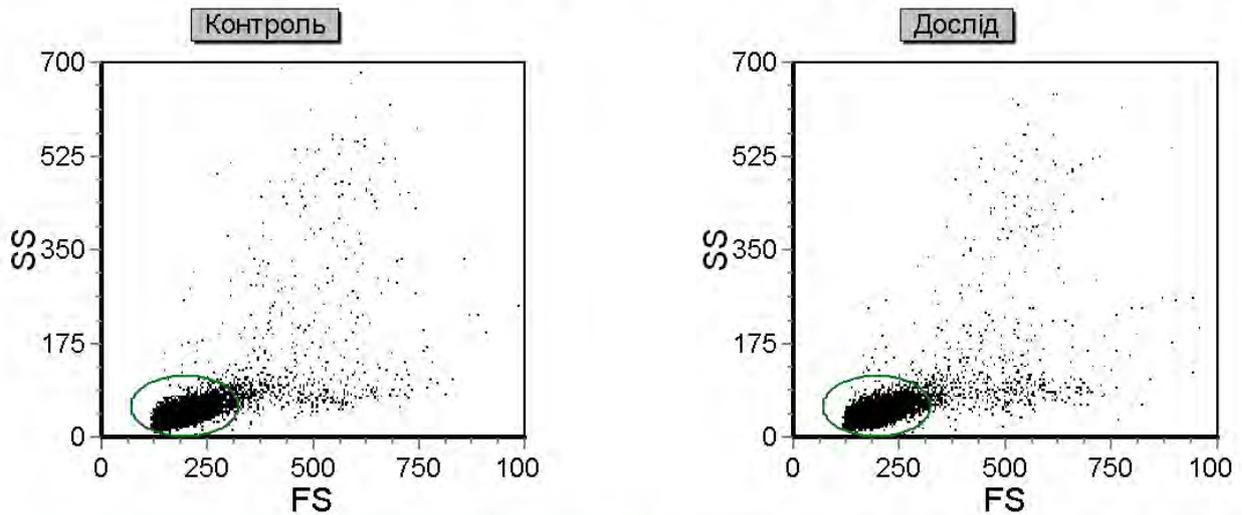


Рис. 4.40. Фронтальне (FS) та ортогональне (SS) світлорозсіювання тромбоцитів ЗТП в контролі та за інкубації з рекомбінантним активатором протромбіну (дослід).

Отже, на еритроцитах і тромбоцитах було показано, що препарат рекомбінантного активатора протромбіну не викликає гемолізу еритроцитів та активації тромбоцитів, що робить його безпечним для застосування в складі медичних виробів, які безпосередньо контактують з кров'ю пацієнта.

Слід відзначити, що використана нами на першому етапі досліджень система експресії, призначена для отримання протеїну в масштабі «small-scale». Це відносно дорога система з використанням клітин ссавців, яка насамперед показує ефективність обраної конструкції, доводить правильність її складання, демонструє можливість напрацювання такої конструкції у бактерійній системі у великій кількості. Зокрема, було досягнуто високої ефективності експресії, адже з чашки площею 60 см² зняли 2 мкг протеїну. На основі отриманих результатів було створено Лабораторний регламент виробництва рекомбінантного активатора протромбіну (Лабораторний регламент №2/21 – Додаток К) На даному етапі отримані результати дозволяють приступити до масштабування процесу отримання бактерійного зрілого конструкту активатора протромбіну, який ляже в основу біотехнологічного процесу.

4.5.5. Оцінка місцевої переносимості лікарського засобу на основі рекомбінантного активатора зсідання крові у вигляді аутологічного фібринового гелю

На базі ДП «Науковий центр превентивної токсикології, харчової і хмічної безпеки імені академіка Л.І.Медведя Міністерства охорони здоров'я України» було проведено оцінку місцевої переносимості лікарського засобу на основі рекомбінантного активатора зсідання крові у вигляді аутологічного фібринового гелю, на кролях альбіносах при підшкірному введенні з морфологічними дослідженнями тканин шкіри (Заключний звіт, 2044/SOP/LET/M226/1 – **Додаток Л**).

Дослідження було проведено у відповідності до принципів GLP (Directive 2004/10/EC of the European Parliament and of the Council of 11 February 2004), відповідно до принципів біоетики та вимог Комісії з питань етики медичних і біологічних досліджень ДП «Науковий центр превентивної токсикології, харчової та хімічної безпеки імені академіка Л.І. Медведя МОЗ України».

Рекомбінантний активатор зсідання крові змішували з аутологічною плазмою крові та вводили кролям (n = 6) під шкіру спини в об'ємі 0,6 мл у співвідношенні 1:5. В якості контрольної речовини використовували аутологічну плазму (0,5 мл) з 0,9 % розчином NaCl (0,1 мл).

День проведення першої ін'єкції рахували як 0-й. Введення рекомбінантного активатора зсідання крові здійснювали в дві зони лівої лопатки на 0-й та 5-й день. Це дозволяло оцінити місцеву переносимість досліджуваної речовини в динаміці – впродовж 48 годин (після останньої ін'єкції) та впродовж семи днів (після першої ін'єкції).

У ході дослідження не було виявлено порушень загального клінічного стану кролів (зовнішнього вигляду, активності, поведінки) протягом всього періоду спостережень (0-7 день), у всіх тварин за період дослідження відмічали приріст маси тіла.

За даними клінічного огляду, рекомбінантний активатор зсідання крові при підшкірному введенні характеризується як переносимий, ступінь переносимості

– добра. Зокрема, він не викликав дискомфорту у тварин, в місці введення виявлялися мінімальні за вираженістю зміни (блідо-рожева поверхнева еритема), які були нерегулярними – виявлялися в місці першої ін'єкції через 24 та 48 годин та були відсутні в місці другої ін'єкції в ці строки. В подальшому, аж до сьомого дня після введення стан шкіри не зазнавав змін.

Дані макроскопії внутрішніх органів також свідчать про добру місцеву переносимість рекомбінантного активатора зсідання крові: стан тварин не мав відхилень від норми, за результатами макроскопічного дослідження шкіри при розтині, виявлено зміни шкіри (набряк, ущільнення, крововилив) були мінімально вираженими, поодинокими і неспецифічними – тобто спотерігалися як при введенні досліджуваного, так і контрольного препаратів.

З метою уточнення даних, отриманих при макроскопічному огляді тканин в місці ін'єкцій, було проаналізовано гістологічні препарати зони ін'єкції (1см x 1см) через 48 годин та сім діб після підшкірного введення рекомбінантного аналога активатора зсідання крові. В таблиці 4.9 наведено дані результатів гістопатоморфологічного дослідження.

Через 48 годин після ін'єкції рекомбінантного аналога активатора зсідання крові виявлено: нечисельні лімфо-лейкоцитарні скупчення у субепідермальній стромі (одни випадок); осередковий помірний набряк тканини (три випадки); дезорганізацію колагенових волокон (два випадки); ацидофільні безструктурні маси (два випадки); осередкову деструкцію м'язових волокон (два випадки); слабку та помірну гіперемію та гемоліз (два випадки); набряк стінки судин та деформацію (два випадки); мінімальну/виражену клітинну реакцію (два випадки); осередок некрозу з великою кількістю клітинного детриту і помірним перифокальним набряком (один випадок).

Через сім діб після ін'єкції рекомбінантного аналога активатора зсідання крові спостерігали такі зміни, як гіперкератоз, паракератоз та лімфо-лейкоцитарні скупчення в субепідермальній стромі. Ці зміни були локальними, слабо вираженими і співставними зі змінами, виявленими у зразках контрольної групи. Зміна гістологічної структури колагенових, та деструкція м'язових

волокон, які спостерігалися як у контрольних, так і у дослідних зразках на сьому добу після ін'єкції, може бути наслідком стресу тканини після введення речовини. Некротичні зміни, що спостерігались як у дослідних, так і контрольних тварин, були стереотипними, а дезорганізація тканини у тварин мала характерні ознаки репаративного процесу незначної постін'єкційної рани, а отже свідчать про репаративний процес та формування повноцінного регенерату.

Таблиця 4.9

Гістопатоморфологічне дослідження шкіри кролів на 2 та 7 добу після ін'єкції. Дані наведені як співвідношення «кількість випадків»/«кількість місць ін'єкцій».

Речовина	Рекомбінантний аналог активатора зсідання крові		Контроль
	2	7	
Час після ін'єкції, доба	2	7	7
Наявність депонованого препарату	2/6	0/6	0/6
Зміни судин	2/6	0/6	0/6
Набряк	3/6	1/6	1/6
Гістіоцитарна інфільтрація	2/6	0/6	0/6
Гіперемія	2/6	1/6	1/6
Фіброз	0/6	0/6	0/6
Некротичні зміни	1/6	1/6	1/6

За даними клінічних спостережень, виявлені гістопатоморфологічні зміни не супроводжувалися токсикологічно значимими ушкодженнями шкіри та прилеглих тканин у місці введення.

Таким чином, нами було отримано рекомбінантний ензим, який виявився здатним активувати протромбін, генеруючи активний тромбін, таким чином

ініціюючи формування фібриново-тромбоцитарного згустку – основи тромбу. Ензим не діяв на тромбоцити та еритроцити, не гідролізував досліджені хромогенні субстрати, що свідчить про його високу селективність. Крім того, доклінічні дослідження рекомбінантного активатора протромбіну показали, що він характеризується доброю місцевою переносимістю та не має загальнотоксичної дії.

Подяка

Автор висловлює щиру подяку к.мед.н. Гаврецькому Анатолію Івановичу за проведення клінічних досліджень «Карбогемостату» та к.мед.н. Косенко Олександрю Петровичу за проведення клінічних досліджень Комплекту для одержання фібринового гелю, а також Васюті Олександрю Семеновичу, директору ТОВ «КОЛМАТЕК», за налагодження виробництва колагену.

Висновки до розділу 4

Активатор протромбіну забезпечує швидке, надійне та ефективне екstrasудинне тромбоутворення шляхом генерації активного тромбіну і тому може бути успішно використаний для надання біоматеріалам кровоспинних властивостей, а також для одержання аутологічного фібринового гелю. Використання медичних виробів, в складі яких є екамулін або його рекомбінантний аналог, є безпечним та ефективним, що доведено у доклінічних та клінічних дослідженнях.

Матеріали розділу представлені в публікаціях [15, 17, 25, 43-45, 47-50]
Додатку А.

РОЗДІЛ 5. ВИЯВЛЕННЯ ПАТОЛОГІЧНОЇ ВНУТРІШНЬОСУДИННОЇ ГЕНЕРАЦІЇ ТРОМБІНУ

Протромбін – домінуючий фактор зсідання крові, що активуючись до тромбіну виконує центральну, роль в регуляції системи гемостазу. Основними функціями тромбіну є активація факторів зсідання крові, відщеплення фібринопептидів з утворенням фібрину, активація представника антикоагулянтної ланки системи гемостазу – протеїну С та активація тромбоцитів. Саме тому внутрішньосудинна активація протромбіну загрожує ризиком внутрішньосудинного тромбоутворення, яке є причиною багатьох патологій, які можуть спричинити як інвалідизацію, так і смерть. Тому інформація про внутрішньосудинну появу тромбіну є важливою з клінічної точки зору, оскільки вона допомагає вчасно виявити загрозу тромбозу, скорегувати терапію, попередивши внутрішньосудинне тромбоутворення.

В той же час, концентрація тромбіну в кровотоці є динамічним параметром: тромбін зв'язується та елімінується з кровотоку антитромбіном III, зазнає аутокаталітичного розщеплення, частково лишається зв'язаним з полімерним фібрином. Крім того, слід враховувати, що «повільний» (Na^+ -не зв'язаний) тромбін та «швидкий» тромбін проявляють в лабораторних тестах однакову активність, хоча їх дія в організмі різноспрямована. Тому пряме визначення концентрації/активності тромбіну в кровотоці в конкретний момент часу може не відображати реального стану системи гемостазу. Отже, для характеристики стану системи гемостазу доцільним є виявлення маркерів появи тромбіну – результатів його «діяльності».

На сьогодні основним діагностичним тестом, що використовується для виявлення утворення тромбіну, є пряме визначення фрагменту протромбіну F1+2 (F1+2) [145]. F1+2 з'являється *in vivo* в результаті розщеплення протромбіну фактором Ха, і цей тест вважається корисним для діагностики тромбозу. У той же час, виявлення F1+2 показує кількість активованих молекул протромбіну, але

не дає інформації про активність тромбіну, який утворюється під час цієї активації.

5.1. Розробка діагностичних підходів для виявлення патологічної внутрішньосудинної активації тромбіну

Тромбін – мультисубстратний ензим, тож потенційно в кровотоці можна виявляти продукти його ензиматичної активності. В таблиці 5.1 представлені основні субстрати тромбіну та продукти їх розщеплення. Як видно з таблиці, такі субстрати як фактор V та фактор VIII містяться в плазмі крові в низьких концентраціях і тому продукти їх розщеплення не можуть бути ефективно виявлені. Єдиний результат активації факторів V і VIII тромбіном, який можливо детектувати, – це стимуляція формування тромбіну.

Таблиця 5.1

Основні плазменні субстрати тромбіну [146]

Субстрати тромбіну	Концентрація субстрату, нМ	Продукт розщеплення	Ензиматична активність продукту
фібриноген	7600	Фібрин desAB	-
фактори V	25	фактори Va	-
фактори VIII	0,7	фактори VIIIa	-
фактори XIII	80	фактори XIIIa	+
протромбін	1400	Претромбін-1	-
протеїн С	60	активований протеїн С	+

Лише два продукти, як утворюються під дією тромбіну – активований протеїн С (АПС) та фактор XIIIa – мають ензимативну активність, тому потенційно можуть бути виявлені методами ензимології. Однак, фактор XIIIa активується на фібрині (тромбін використовує його як кофактор) і залишається зв'язаним із фібрином. ПС активується «повільним» (Na^+ -незв'язаним) тромбіном в комплексі з тромбомодуліном інтактних ендотеліоцитів (рис. 5.1).

Концентрація пС в плазмі крові становить 60 нМ, але його легко детектувати в плазмі крові *in vivo*, оскільки продуктом розщеплення пС тромбіном є ензим – АПС. Слід наголосити, що за природніх умов активація пС проходить виключно за посередництва тромбомодуліну – він зсуває ензиматичну ефективність тромбіну по відношенню до пС з $5,6 \cdot 10^2$ до $5,9 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [29].

В свою чергу для «швидкого» тромбіну доміантними субстратами в плазмі крові є протромбін та фібриноген. Тромбін може відщеплювати фрагмент F1 (G1a-домен) гідролізуючи пептидний зв'язок Arg155-Ser156 свого попередника – протромбіну – з утворенням ензиматично неактивного продукту – претромбіну-1 (Пре-1). Пре-1 не містить активного центру (він перекритий амінокислотним залишком Trp 148 і Trp 215) та виключається з процесу коагуляції, оскільки не зв'язується з фосфоліпідними мембранами і, як наслідок, не активується протромбіназою до тромбіну. Концентрація протромбіну в плазмі крові сягає 1,4 мкМ, тому перетворення навіть 1% протромбіну на Пре-1 може бути детектована. Відомо, що концентрація йонів Ca^{2+} може сповільнювати гідроліз протромбіну тромбіном, однак за фізіологічних умов цей параметр крові не коливається в значних межах [147, 148].

Нарешті, фібриноген є доміантним субстратом тромбіну – його концентрація в крові складає 7,6 мкМ. Тромбін послідовно відщеплює з N-кінця молекули фібринопептиди А (16 амінокислотних залишків А α ланцюга) та В (14 амінокислотних залишків В β ланцюга). Утворений фібрин desAB може бути детектований за допомогою методу ELISA. Крім того, утворений фібрин desAB може формувати комплекси з фібриногеном і фібрином та їх похідними без утворення протофібрил. Такі комплекси в клінічній практиці визначаються як розчинні фібрин мономерні комплекси (РФМК). Суттєвими змінними, що можуть впливати на швидкість розщеплення фібриногену тромбіном, є концентрація субстрату, яка може збільшуватись в рази за деяких фізіологічних та патологічних станів, та концентрація йонів Na^+ , що може локально збільшуватись при дисфункції ендотелію, оскільки глікокалікс ендотелію слугує буфером обміну йонів Na^+ .

Як видно з рис. 5.1, ензиматична ефективність тромбіну у реакціях протеолізу пС, протромбіну та фібриногену – одного порядку, а отже всі три реакції є рівноймовірними та рівноправними. Домінування тої чи іншої ензиматичної реакції може досягатись при впливі таких факторів як зміна концентрації субстрату, доступність кофактору (тромбомодуліну), зміна концентрації йонів Ca^{2+} чи Na^+ .

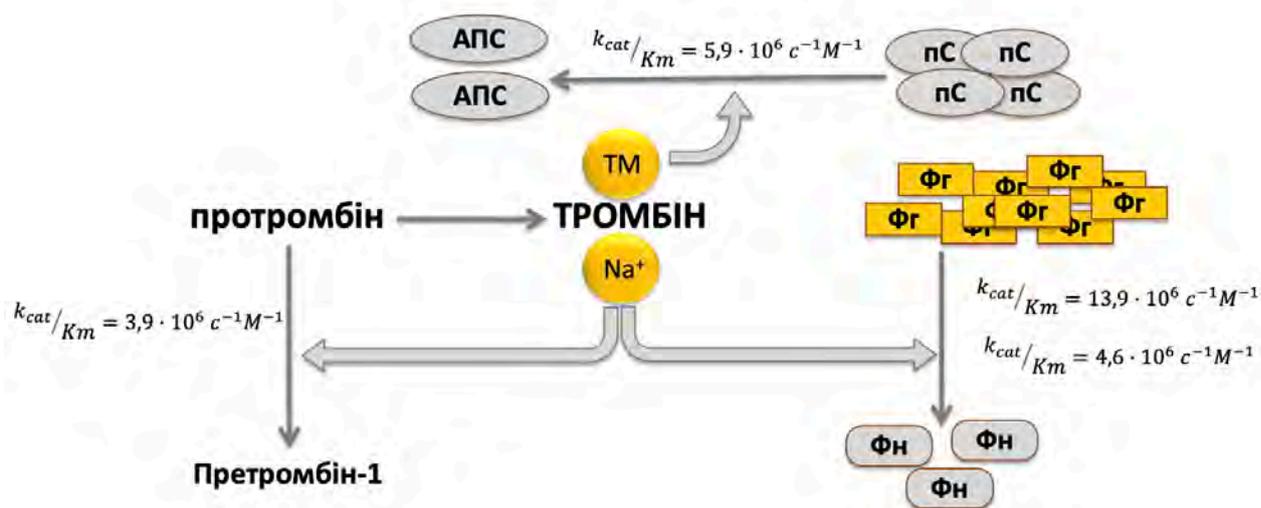


Рис. 5.1. Схема ензиматичної активності тромбіну, що може бути детектована *in vivo*. Тромбін розщеплює протромбін з утворенням претромбіну-1 (неактивного похідного протромбіну), реакція інгібується підвищеною концентрацією йонів Ca^{2+} ; протеїн С (пС) з утворенням активованого протеїну С (АПС) за участю тромбомодуліну (ТМ) відщеплює фібринопептиди А та В фібриногену (Фг) з утворенням фібрину (Фн). Константи специфічності згідно [22, 29, 147].

Таким чином, проведений аналіз продуктів тромбінового розщеплення демонструє, що потенційно можливими для виявлення маркерами появи тромбіну в кровотоці можуть слугувати поява розчинного фібрину, зниження вмісту/активності пС, поява Пре-1. Тому ми зосередились на розробці та вдосконавленні методів виявлення зазначених маркерів та підтвердженні їх діагностичної інформативності за патологічних станів.

5.2 Визначення рівню протромбіну-1 в плазмі крові, розробка методу

Раніше було показано, що екамулін, як і екарин з отрути *Echis carinatus*, розщеплює протромбін за Arg320-Ile321 [149, 150]. Таким чином, активація протромбіну екамуліном призводить до утворення мезотромбіну. Екамулін також активує Пре-1, але повільніше, ніж протромбін (таблиця 5.2), а також не гідролізує тромбін-специфічний хромогенний субстрат (S2238) і фібриноген [87, 141]. Тому екамулін можна використовувати для виявлення загального вмісту протромбіну в плазмі крові (рис. 5.2, А). Такий тест називається екамуліновим, а результати його представляють у вигляді екамулінового індексу (ЕІ) (формула 2.1., п.п. 2.4.15).

Таблиця 5.2

Кінетика розщеплення протромбіну та протромбіну-1 екамуліном

Субстрат	K_m , мкМ	V_{max} , нмоль/хв	$k_{cat} = V_{max}/[E]$, хв ⁻¹	$K_{ef} = k_{cat}/K_m$, (хв·мкМ) ⁻¹	Продукт
Протромбін	3,4	0,23	575,0	169,1	Мезотромбін
Пре-1	3,5	0,05	83,3	23,8	Мезотромбін-1

Натомість, традиційний тест лабораторної діагностики – протромбіновий час – заснований на активації коагуляційного каскаду тромбопластином і здатен виявити лише інтактний, функціонально активний протромбін (рис. 5.2, А). Результати протромбінового тесту представляють у вигляді протромбінового індексу (ПІ) (формула 2.2., п.п. 2.4.16).

Вищезазначене дозволило припустити, що відмінність ПІ та ЕІ може вказувати на накопичення функціонально неактивних форм протромбіну в плазмі крові. Як видно з рис. 5.2, Б, додавання Пре-1 до плазми крові здорового донора суттєво знижувало ЕІ, тобто підсилювало генерацію *n*-нітроаніліну при розщепленні хромогенним субстратом S2238 за рахунок генерації більшої кількості тромбіну в тесті (до тромбіну активувався як протромбін плазми крові, так і доданий Пре-1). В свою чергу, ПІ не змінювався, оскільки Пре-1 для нього

є «сліпою зоною» і розщеплення субстрату S2238 забезпечує тромбін, утворений лише з протромбіну плазми крові.

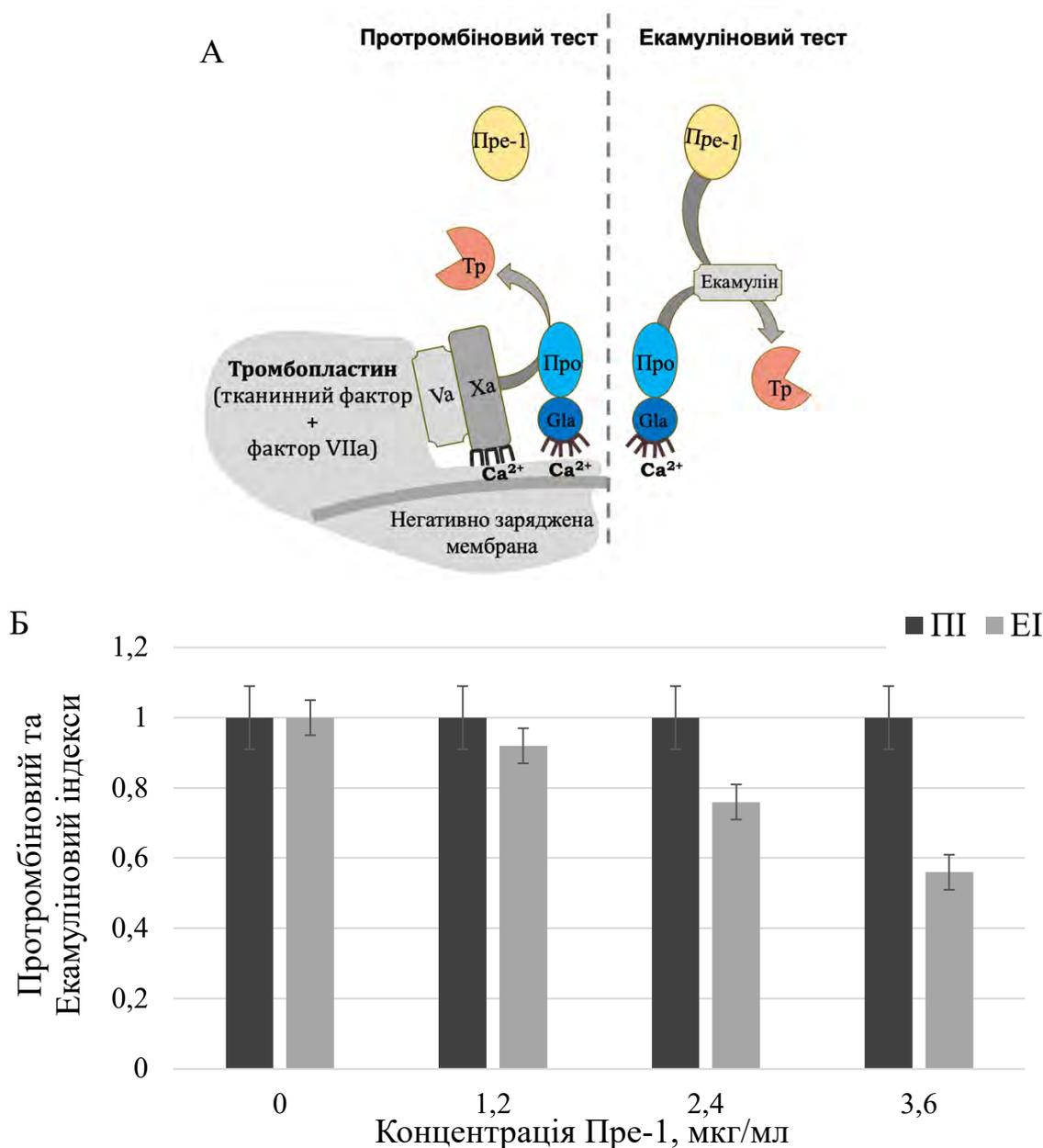


Рис. 5.2. Виявлення протромбіну та його похідних з використанням протромбінового та екамулінового тестів.

А – Схема проведення екамулінового та тромбопластинового тестів. Тромбопластин забезпечує активацію інтактного протромбіну (Про) протромбіназою (Va Xa) на негативно зарядженій поверхні, але не чутливий до наявності декарбоксільованого протромбіну (ДК Про) та Претромбіну-1 (Пре-1). Натомість, Екамуліновий тест перетворює всі похідні протромбіну на тромбін (Тр), що детектується за хромогенним субстратом.

Б – Протромбіновий (ПІ) та екамуліновий (ЕІ) індекси плазми крові в присутності претромбіну-1.

Тому ми використали поєднання протромбінового та екамулінового тестів для попереднього скринінгу та відбору зразків плазми крові з метою подальшого дослідження. Було проаналізовано плазму крові 12 пацієнтів з різними патологіями, що супроводжуються порушеннями зсідання крові: аневризма черевної аорти, ендопротезування кульшового суглоба після перелому та інсульту. Результати ПІ, для активації протромбіну тромбoplastином, та ЕІ, для активації протромбіну екамуліном, представлені на рис. 5.3.

Чітка різниця в екамуліновому та протромбіновому індексах спостерігалася для пацієнтів 2, 4, 6, 9, 10, 11, 15. Це демонструє зниження кількості нативного протромбіну, спричиненого або декарбоксілюванням всіх вітаміну К-залежних протеїнів системи гемостазу і протромбіну, зокрема, (утворення дескарбоксіпротеїнів) [148 - 150] або протеолітичним розщеплення протромбіну, що супроводжується накопиченням Пре-1.

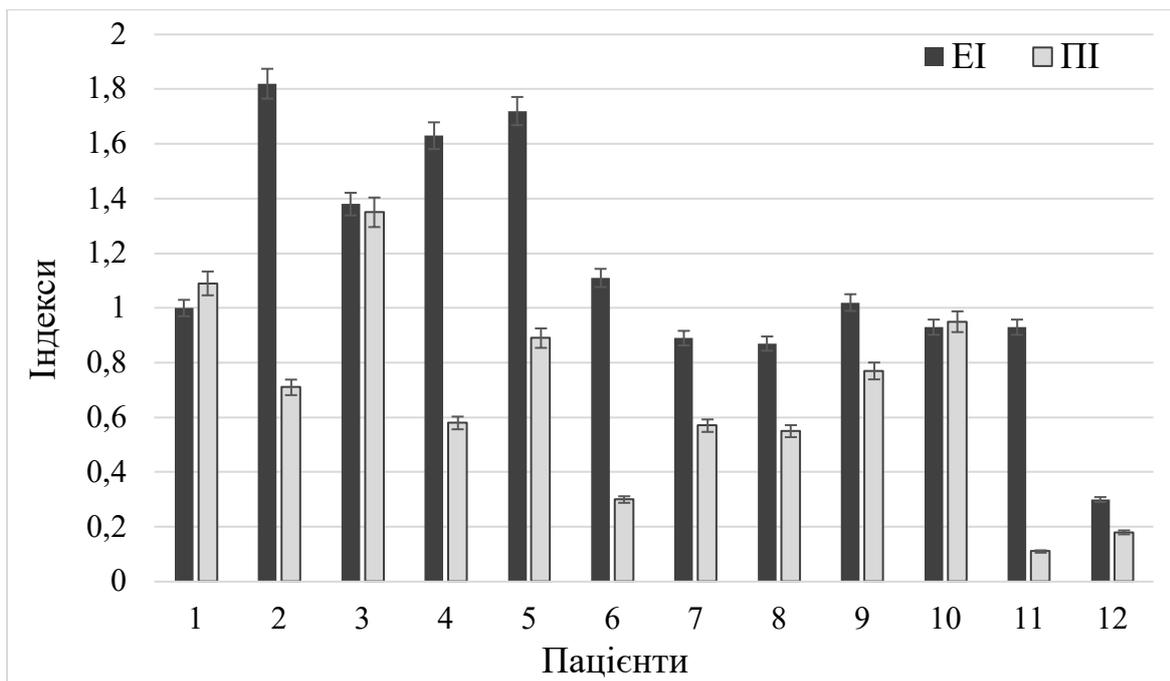


Рис. 5.3. Протромбіновий (ПІ) та екамуліновий (ЕІ) індекси плазми крові пацієнтів.

Щоб відрізнити порушення коагуляції, викликане утворенням Пре-1, від накопичення дескарбоксіпротеїнів (зокрема декарбоксіпротромбіну), ми використали модифікований тест – активований частковий тромбoplastиновий

час (АЧТЧ). АЧТЧ – це лабораторний тест, який характеризує внутрішній шлях зсідання крові. Подовження коагуляції (уповільнення розщеплення хромогенного субстрату) в АЧТЧ-тесті може бути наслідком декарбоксілювання факторів каскаду зсідання (протромбіну, факторів X, IX і VII), або ж – дефіциту протромбіну в разі трансформації протромбіну в Пре-1.

Додавання екзогенного протромбіну до плазми крові пацієнтів з накопиченням декарбоксіпротеїнів не призведе до зміни результатів тесту АЧТЧ (декарбоксіфактори каскаду зсідання не проактивуються). З іншого боку, додавання екзогенного протромбіну до плазми крові пацієнтів з інтактними факторами зсідання, але з накопиченням Пре-1, нормалізує результати тесту АЧТЧ за рахунок поповнення пулу нативного протромбіну. Схема проведення модифікованого тесту АЧТЧ представлена на рис. 5.4.

Для підтвердження цієї гіпотези ми розробили модельну систему з плазмою крові донора. Показано, що додавання інтактного протромбіну до плазми крові спричиняло посилення розщеплення хромогенного субстрату в АЧТЧ-тесті. Додавання Пре-1 (на відміну від протромбіну) не впливало на результати АЧТЧ (таблиця 5.3). Результати представлено у вигляді співвідношення АЧТЧ за додавання екзогенного протромбіну/претромбіну-1 до АЧТЧ плазми крові донора (співвідношення АЧТЧ).

Зважаючи на отримані в модельній системі результати, ми використали модифікований тест АЧТЧ для виявлення Пре-1 у зразках плазми крові, відібраних відповідно до результатів ЕІ та ІІІ. У всіх пацієнтів спостерігалось уповільнення розщеплення хромогенного субстрату в АЧТЧ-тесті. Проте, додавання екзогенного інтактного протромбіну до плазми крові викликало прискорення розщеплення хромогенного субстрату в тесті АЧТЧ (рис. 5.6, чорні лінії).

Зразки плазми крові пацієнтів, які отримували варфарин (n=5), були обрані як негативний контроль, тобто як такі, що містять декарбоксільовані протеїни [153]. Як показано на рис. 5.5. (сірі лінії), для цих пацієнтів не спостерігалось прискорення розщеплення хромогенного субстрату в тесті АЧТЧ.

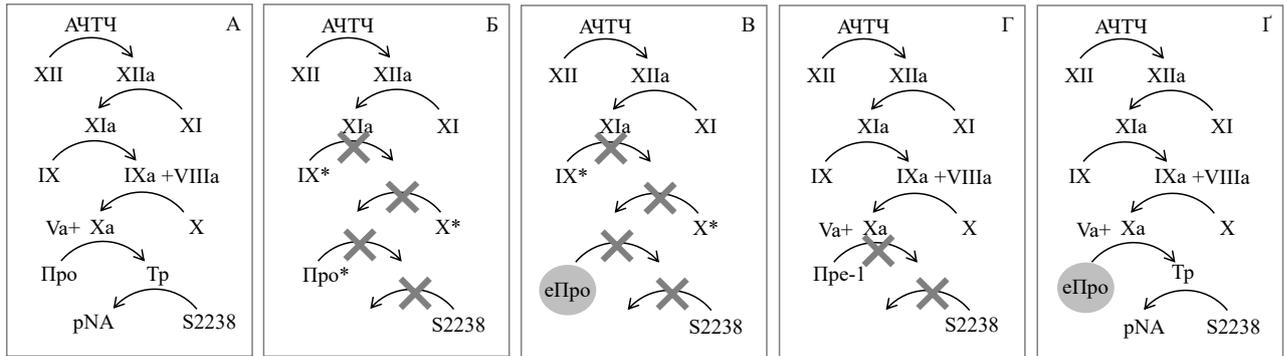


Рис. 5.4. Схема проведення модифікованого тесту АЧТЧ для виявлення причини гальмування генерації тромбіну в тесті АЧТЧ. А – проведення тесту АЧТЧ в нормальній плазмі крові – фактори каскаду зсідання крові активуються, утворений тромбін гідролізує хромогенний субстрат; Б – інгібування тесту АЧТЧ за наявності декарбоксіфакторів зсідання крові – тромбін не утворюється; В – додавання екзогенного протромбіну не нормалізує результати тесту АЧТЧ, оскільки причина інгібування – це накопичення декарбоксіфакторів зсідання крові; Г – інгібування генерації тромбіну в тесті АЧТЧ за умов накопичення Пре-1; Ґ – додавання екзогенного протромбіну нормалізує результати тесту АЧТЧ, якщо причина інгібування – це накопичення Пре-1.

Про – протромбін, Пре-1 – претромбін-1, Тр – тромбін, еПро – екзогенний протромбін, рNA – *n*-нітроанілін, * – декарбоксільовані вітамін К залежні фактори зсідання крові.

Таблиця 5.3

Співвідношення АЧТЧ плазми крові людини, визначений після додавання екзогенного протромбіну або претромбіну 1

Субстрат	Співвідношення АЧТЧ
Плазма крові здорового донора	1,00±0,05
Плазма крові донора з додаванням екзогенного протромбіну (2 мкг/мл)	1,35±0,05
Плазма крові донора з додаванням екзогенного Пре-1 (2 мкг/мл)	1,00±0,05

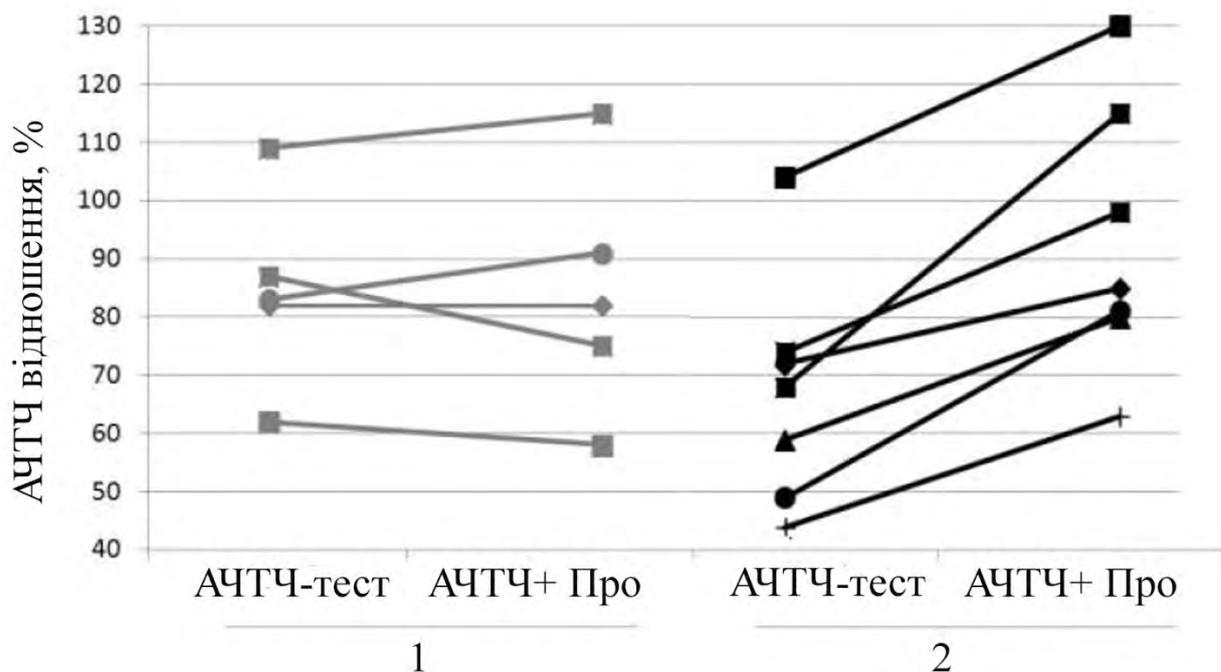


Рис. 5.5. Вплив додавання екзогенного протромбіну до зразків плазми крові на результати тесту АЧТЧ. 1 – хворі з накопиченням дескарбоксіпротеїнів, 2 – пацієнти без дескарбоксіпротеїнів.

Для безпосереднього підтвердження накопичення Пре-1 у плазмі крові пацієнтів, провели Вестерн-блот аналіз досліджуваних зразків плазми крові з використанням протромбінспецифічних поліклональних антитіл, які взаємодіють з протромбіном та всіма його похідними. Зразок, що містить Пре-1, тромбін і протромбін, використовували як позитивний контроль (рис. 5.6, доріжка 4). У плазмі крові відібраних пацієнтів було виявлено дві протеїнові смуги з молекулярною масою 72 kDa і 55 kDa, що відповідають молекулярним масам протромбіну і Пре-1, відповідно (рис. 5.6, доріжки 6-12). Однак, у плазмі крові пацієнтів, які отримували варфарин (негативний контроль – рис. 5.6, доріжки 1-3, 5), ми спостерігали лише протеїн 72 kDa, що відповідає протромбіну, і не спостерігали Пре-1.

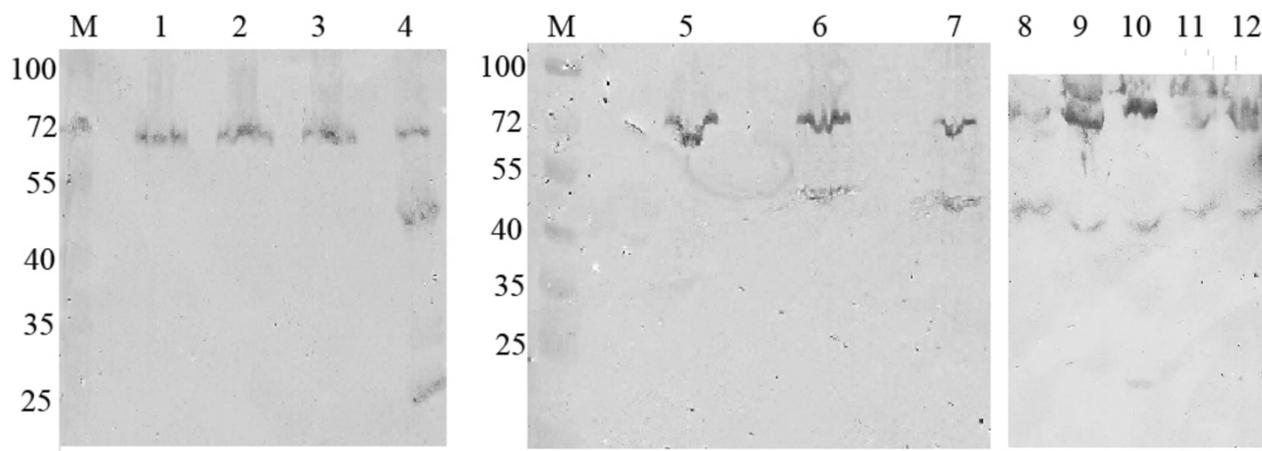


Рис. 5.6. Вестерн-блот аналіз плазми крові пацієнтів з протромбінспецифічними антитілами.

М – маркери молекулярної маси (100, 72; 55; 40; 35; 25 kDa). 1-3, 5 – плазма крові пацієнтів, які отримували варфарин (негативний контроль); 6-12 – плазма крові пацієнтів з гострими порушеннями гемостазу (відібрана за модифікованим АЧТЧ-тестом); 4 – суміш протромбіну, Пре-1 і тромбіну (позитивний контроль).

Для кількісного визначення Пре-1 в плазмі крові було розроблено калібрувальний графік (рис. 5.8, А). Для цього, до донорської плазми крові додавали Пре-1 в різних концентраціях та визначали ПІ та ЕІ суміші. Відповідно калібрувальному графіку, було обчислено формулу (5.1) для визначення рівню Пре-1 в плазмі крові.

$$C = \frac{EI/PI - 0,9919}{0,141} - 0,1, \quad (5.1)$$

де C – концентрація Пре-1, мкг/мл;

ЕІ – екамуліновий індекс (відповідно до формули 2.1);

ПІ – протромбіновий індекс (відповідно до формули 2.2).

На рис. 5.7, Б наведено приклад визначення рівню Пре-1 в плазмі крові пацієнтів 5-12. В подальшому формулу (5.1), розраховану по калібрувальному графіку, нами було використано для визначення рівню Пре-1 в плазмі крові пацієнтів та тварин.

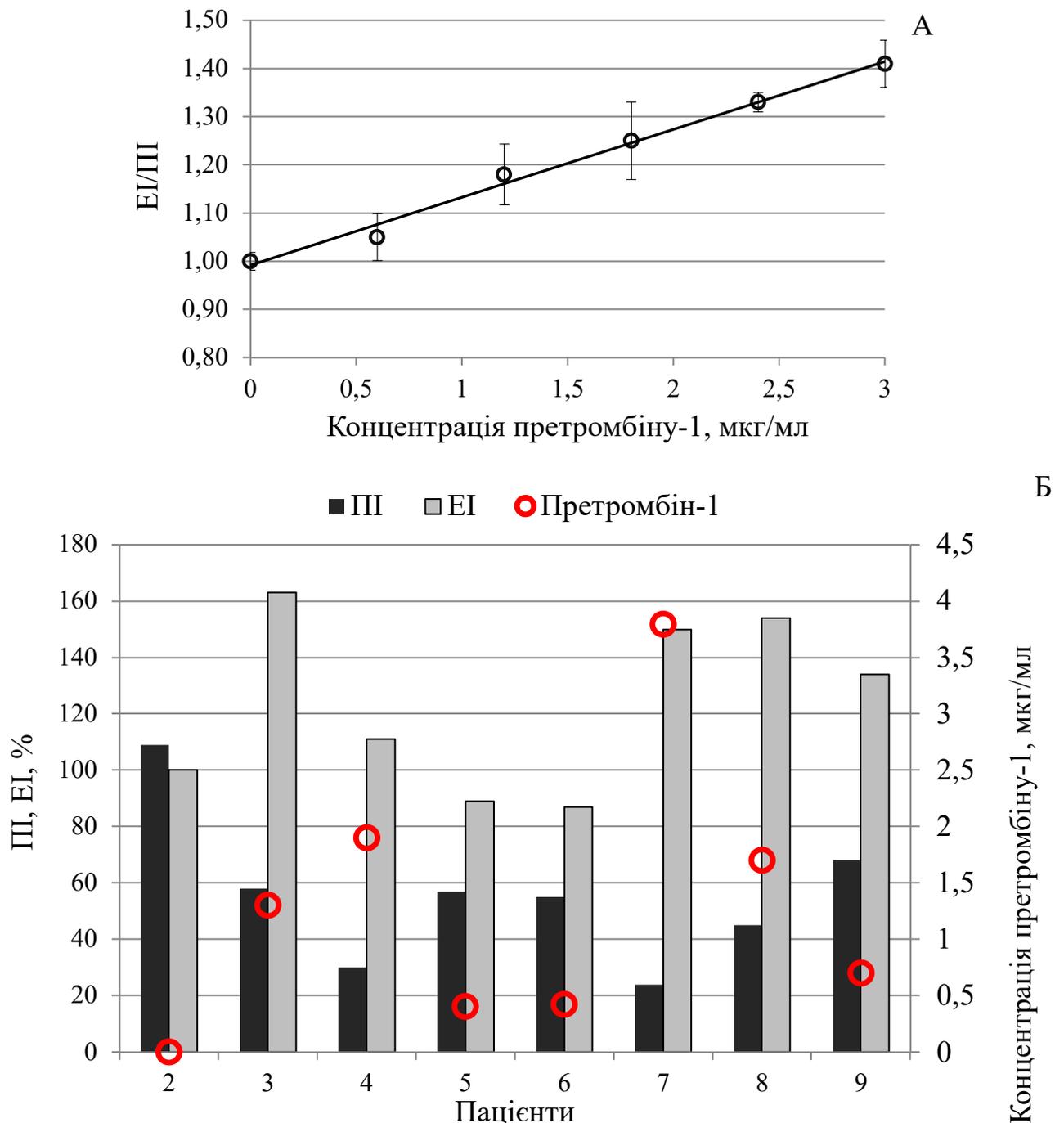


Рис. 5.7. Калібрувальний графік для визначення рівню протромбіну-1 (Пре-1) в плазмі крові за відношенням екамулінового (ЕІ) та протромбінового (ІІІ) індексів (А), рівень Пре-1 в плазмі крові пацієнтів 5-12, визначений за калібрувальним графіком (Б).

Таким чином, нами вперше *in vivo* виявлено накопичення Пре-1 у плазмі крові людини при патологіях, пов'язаних з порушеннями системи гемостазу. Розроблений метод виявлення Пре-1 у плазмі крові людини, заснований на поєднанні протромбінового та екамулінового тестів було верифіковано

модифікованим тестом АЧТЧ та Вестерн-блот аналізом із використанням поліклональних антитіл проти протромбіну. Розроблений тест лабораторної діагностики може бути використаний у клінічних дослідженнях, зокрема, його було впроваджено на базі лабораторії біохімії ДУ “Інститут отоларингології ім. проф. О.С.Коломійченка НАМН України” (Акт про впровадження – Додаток М).

Виявлення Пре-1 у плазмі крові показує появу в крові тромбіну, який залишається ензиматично активним і не інгібується природними інгібіторами або вживанням ліків. Детекція фрагменту протромбіну F1+2 такої інформації не надає [154].

5.3 Визначення рівню протеїну С в плазмі крові, розробка методу

Важливу регуляторну функцію системи зсідання крові виконує складна багатофункціональна система протеїну С (пС). Дію даної системи розглядають, як один із найраніших та найшвидших механізмів, що включається в процес регуляції гемостазу при загрозі тромбоутворення. Активований протеїн С (АПС) функціонує як антикоагулянт, що принципово відрізняється від дії специфічних інгібіторів факторів зсідання крові, при цьому опосередковано стимулюючи фібриноліз. В той же час, активне споживання пС розглядається як один з головних показників загрози розвитку тромбофілії.

Одним із підходів розроблення методів для такого аналізу є застосування моноклональних антитіл, які ефективно можна використовувати для визначення вмісту протеїну С. Тому ми поставили за мету розробити та адаптувати до використання в клініці бісайтовий варіант імуноензимного методу визначення протеїну С в плазмі крові людини. На першому етапі було отримано протеїн С людини для імунізації мишей та перевірки специфічності антитіл, на другому етапі було отримано рекомбінантний пС для імунізації мишей та як калібратор, на третьому етапі було отримано клітинні лінії гібридом, що здатні продукувати моноклональні антитіла, специфічні до пС та підібрано пару антитіл, які б були здатні розпізнавати нативний пС в плазмі крові та рекомбінантний пС як калібратор.

5.3.1 Отримання протеїну С з плазми крові людини

Отримання гомогенного електрофоретично чистого пС необхідне для стандартизації активатора пС виділеного з отрути щитомордника звичайного, який використовували для проведення тесту з визначення функціональної активності пС і для отримання полі- та моноклональних антитіл до пС з метою створення діагностичних тест-систем.

Проблеми по виділенню пС пов'язані з невисокою концентрацією протеїну в плазмі крові і складними умовами відокремлення пС від інших вітамін-К-залежних протеїнів плазми крові.

Традиційне очищення пС з плазми крові або з фракції IV-1 за Коном складається з декількох етапів: адсорбція сульфатом барію, фракціонування сульфатом амонію та застосування методів колоночної хроматографії. Перші два етапи вважаються класичними для отримання препарату протромбіну, але вони визнані доцільними також і для очищення пС [155, 156].

Як вихідну сировину для одержання пС людини було використано елюат протеїнів плазми крові людини з сірчаноокислого барію. В такій сировині залишаються лише вітамін-К-залежні протеїни плазми крові, що полегшує подальше виділення та очистку пС.

Розчин одержаних вітамін-К-залежних протеїнів розділяли шляхом афінної хроматографії на активованій BrCN-сефарозі з іммобілізованими на ній моноклональними антитілами 7D7B10 до пС. Елюцію пС проводили за допомогою 0,05 М Tris-HCl, рН 7,4, з вмістом 10 мМ ЕДТА та 0,15 М NaCl.

Як показано на рисунку 5.8, А очищення пС пройшло ефективно.

Гомогенність одержаного протеїну перевіряли електрофоретично. Спираючись на результати електрофоретичного дослідження (рис.5.8, Б), можна припустити, що отриманий елюат містить цільовий протеїн, молекулярна маса якого відповідає масі пС – 62 kDa.

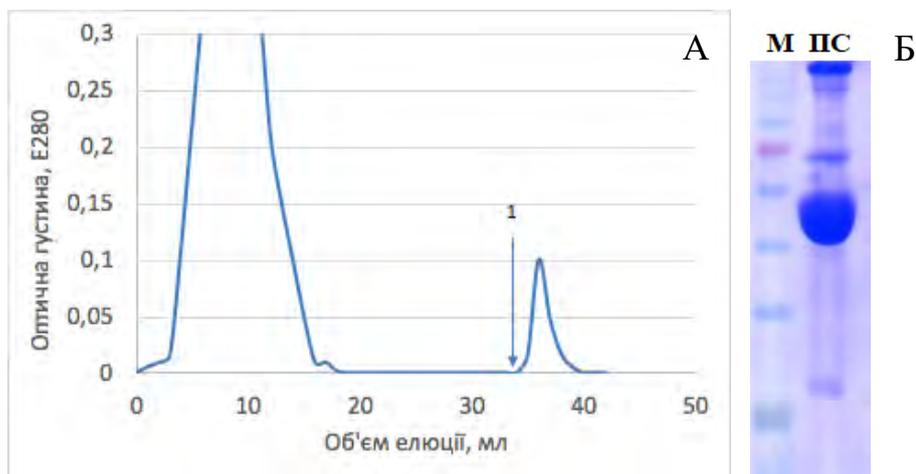


Рис. 5.8. Профіль елюції протеїну С з барієвого елюату на колонці Anti-Protein C Affinity Matrix; стрілкою позначено момент заміни 0,05 М Tris-HCl буфера, рН 7,4, що містив 0,15 М NaCl на 0,05 М Tris-HCl буфер, рН 7,4, з 10 мМ ЕДТА та 0,15 М NaCl (А); та електрофореграма отриманого протеїну С із плазми крові донорів на афінному носії з моноклональними антитілами 7D7B10 до протеїну С (Б).

Для функціональної характеристики пС визначали його амідолітичну активність, тобто ензиматичну активність по відношенню до трипептидних субстратів, використовуючи хромогенний субстрат S2366 (pyroGlu-Pro-Arg~pNA). Розщеплення пС хромогенного субстрату S2366 проходить по зв'язку між карбоксильною групою аргінінового залишку та *n*-нітроаніліном (pNA). Розпізнавання аргінінового залишку в активному центрі є характерним для серинових протеїназ, до яких належить пС. Для активації пС використовували активатор з отрути щитомордника звичайного (*Agkistrodon halys halys*). Вивільнення pNA під дією АПС визначали спектрофотометрично, вимірюючи оптичне поглинання в області 405 нм відносно 492 нм (рис. 5.9).

В якості контролю використовували суміш відповідного препарату пС та хромогенного субстрату в буферному розчині за відсутності активатора. Значення оптичного поглинання в контрольних пробах вважались фоновими і віднімалися від значень оптичного поглинання в дослідних пробах.

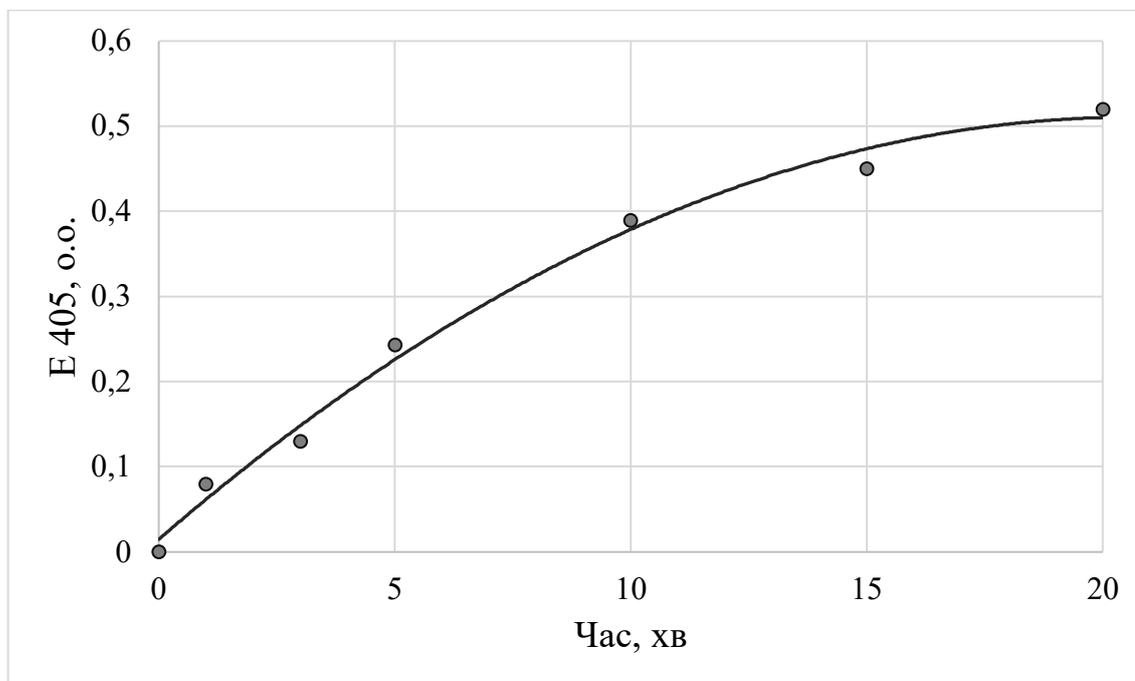


Рис. 5.9. Амідолітична активність протеїну С, отриманого з плазми крові людини (пС).

Отже, отриманий нами пС із плазми крові людини є функціонально активним, і це дозволяє використовувати його в якості калібратора для визначення вмісту пС в плазмі крові методом твердофазного імуоензимного аналізу, а також використовувати його як антиген для отримання моноклональних антитіл до пС.

5.3.2. Розробка підходів одержання рекомбінантних аналогів протеїну С з антигенними властивостями, максимально наближеними до його нативної молекули

Концентрація пС в плазмі крові складає 3,7-5,0 мкг/мл, тож плазма крові людини не є ефективним та вигідним джерелом препарату пС, як калібратора в тест-системі для визначення кількості пС в плазмі крові.

Тому в якості калібратора було запропоновано використовувати рекомбінантний пС. Суттєвим недоліком рекомбінантних протеїнів часто є неправильний фолдинг, результатом якого є некоректне виконання протеїном своїх функцій або повна відсутність активності (у випадку ензиму). пС складний проензим, що в організмі піддається таким посттрансляційним модифікаціям як глікозилювання та карбоксилювання, однак використання його в якості

калібратора в ELISA тест-системі передбачає лише розпізнавання антитілами, але не повноціну активацію та ензиматичну активність.

Для створення рекомбінантного пС на сам перед необхідно створити генетичні конструкції для клонування протеїну, що передбачало, зокрема, рестрикційний аналіз гену, створення генетичних конструкцій повнорозмірного та зрілого пС, який може бути перетвореним в його активну форму шляхом обмеженого протеолізу тромбіном.

Із даних літератури відомо, що пС людини синтезується клітинами печінки [157]. Тому для активної експресії мРНК пС були вибрані клітини HepG2 гепатоцелюлярної карциноми людини [158].

Надалі було необхідно створити генетичні конструкції для клонування ензиму, що передбачало зокрема рестрикційний аналіз гену, створення генетичних конструкцій повнорозмірного (попередника) пС, який може бути перетвореним в його активну форму шляхом обмеженого протеолізу тромбіном.

5.3.2.1. Дані рестрикційного аналізу гену, що кодує протеїназу. Рестрикційна мапа повно-розмірної кДНК, що кодує попередник пС.

Ген пС, який в подальшому був використаний для клонування в плазміді, являє собою лінійну дволанцюгову ДНК 1769 п.н. довжиною. Послідовність ділянки, кодуєщої попередник протеїну, відповідає нуклеотидам 88-1470, і складає 1382 нуклеотиди.

Рестрикційну мапу гену пС (NCBI Reference Sequence: NM_000312.4) наведено на рис. 5.10. Експресія гену відбувається в напрямку, вказаному стрілкою на мапі гену. Отже, старт-кодон розташований зліва, а термінуючий кодон – справа.

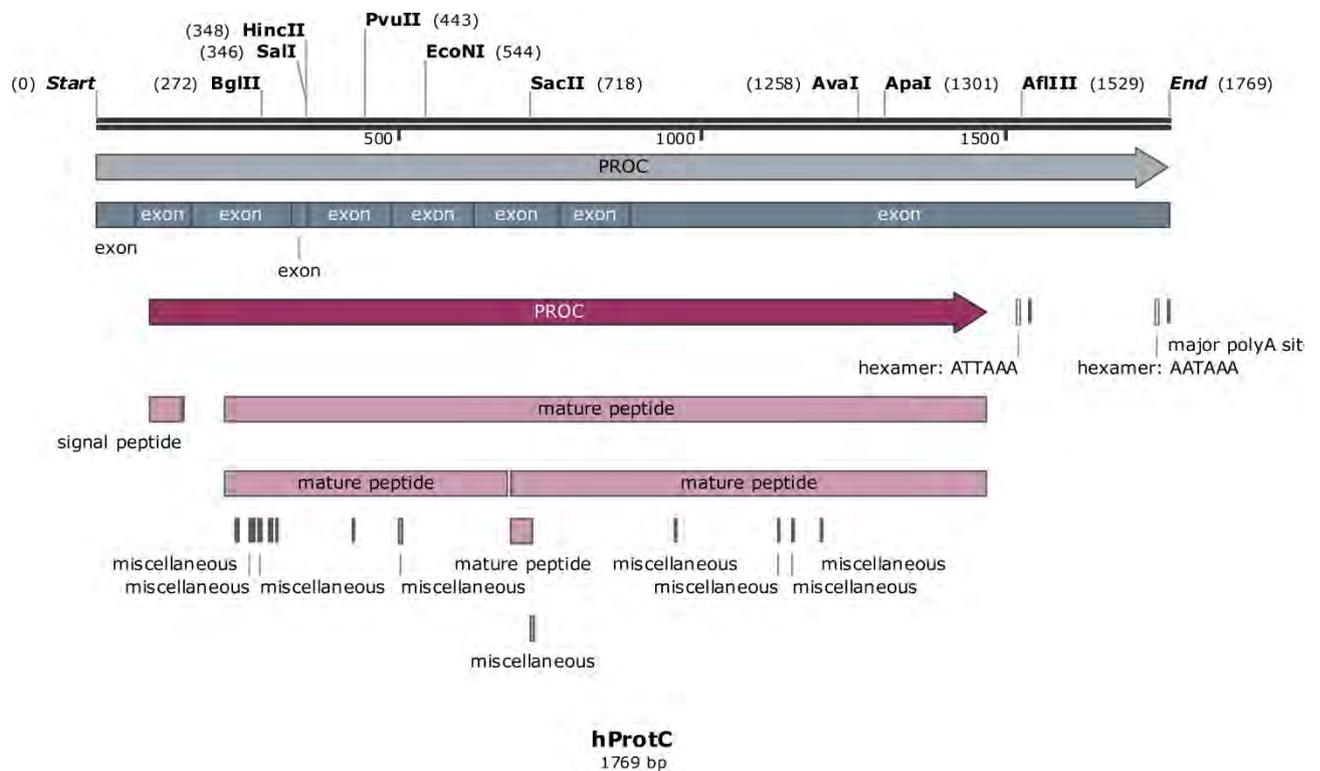


Рис. 5.10. Рестрикційна мапа гену протеїну С людини. На мапі вказані лише унікальні ділянки рестрикції.

Безпосередньо в послідовності повнорозмірної кДНК виявляються 39 унікальних рестрикційних ділянок, з яких дев'ять є зручними для рестрикційного аналізу та клонування делеційних мутантів. Крім цього, зручними для рестрикційної перевірки наявності вставки у векторі виявились дві ділянки, специфічні для рестриктази *VamHI*. Позиції вищезгаданих рестрикційних сайтів наведено внизу у порядку справа наліво, починаючи від старт-кодону:

- VamHI* (200; 1418);
- BglIII* (272);
- SalI* (346);
- HincII* (348);
- PvuII* (443);
- EcoNI* (544);
- SacII* (718);
- AvaI* (1258);
- ApaI* (1301);
- AflIII* (1529).

Жоден із вказаних сайтів рестрикції не повторюється протягом послідовності гену.

Для клонування кДНК гену пС людини були використані специфічні праймери, комплементарні до початку та кінця молекули РНК, знайденої в базі даних NCBI (клон NM_000312.4). кДНК пС було ампліфіковано за допомогою ПЛР праймерами, що містили рестрикційні ділянки NotI та EcoRI, для клонування відразу до експресійного вектора pSport6-CMV (рис. 5.11: згадані рестрикційні ділянки є відсутніми в послідовності кДНК пС). Бактерійні клони із наявними вставками було відібрано та нарощено (рис. 5.12), надалі з них було очищено плазмиди для секвенування. Вставку було просеквеновано за допомогою M13(+) та M13(-) праймерів, ділянки яких присутні в будові вектора pSport6-CMV (рис. 5.11).

Успішність клонування та специфічність вставки були підтвержені спочатку за допомогою рестрикційного аналізу за допомогою ензиму BamHI, сайти рестрикції якого відсутні у векторі, але дві такі ділянки містяться всередині вставки (рис. 5.12). Три вибрані позитивні клони були згодом перевірені на предмет помилок полімерази та можливих помилок в складі праймерів в ході ампліфікації кДНК .

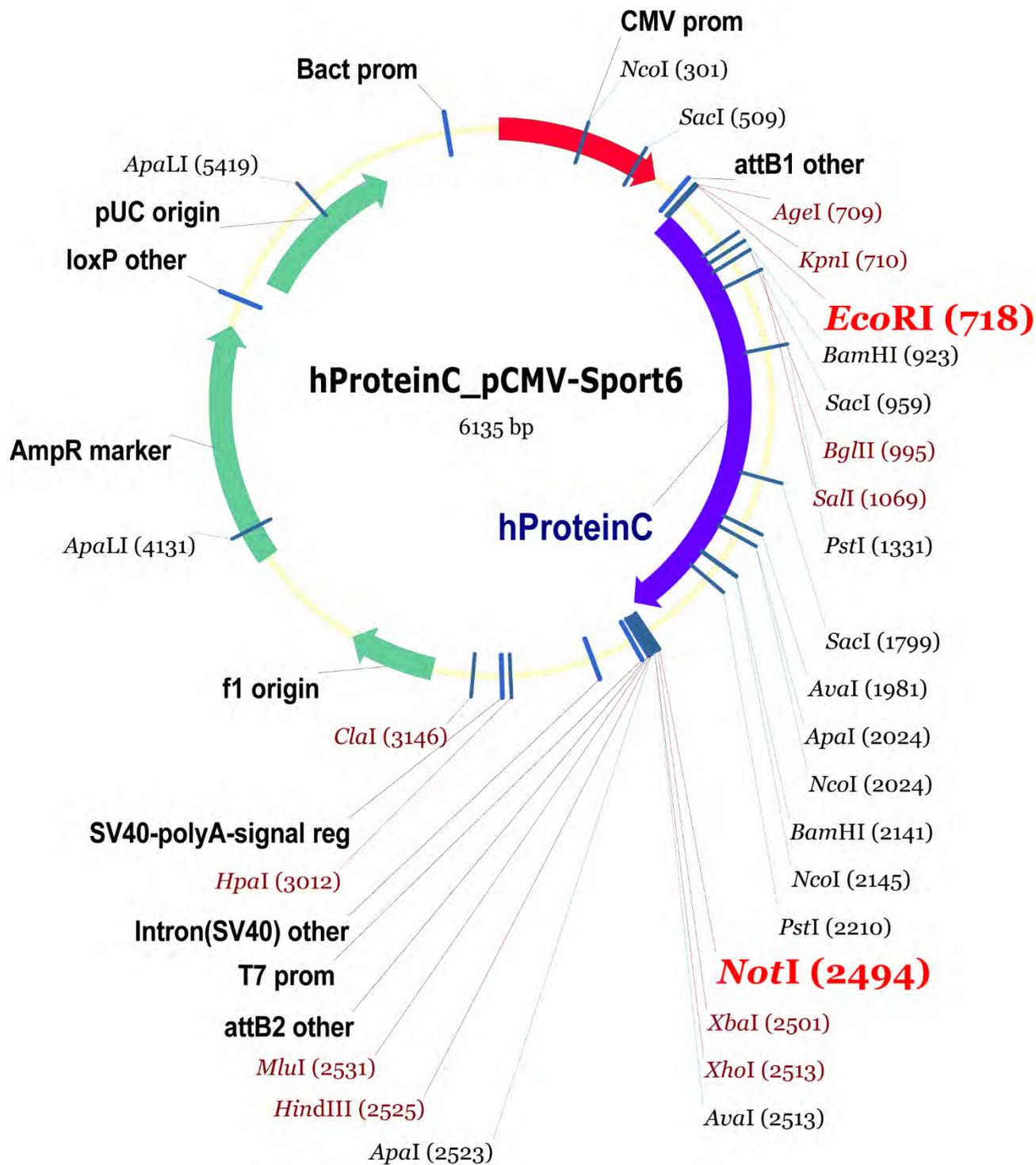


Рис. 5.11. Схема структури генетичної конструкції Full-length PrePro-hProteinC pSport6-CMV

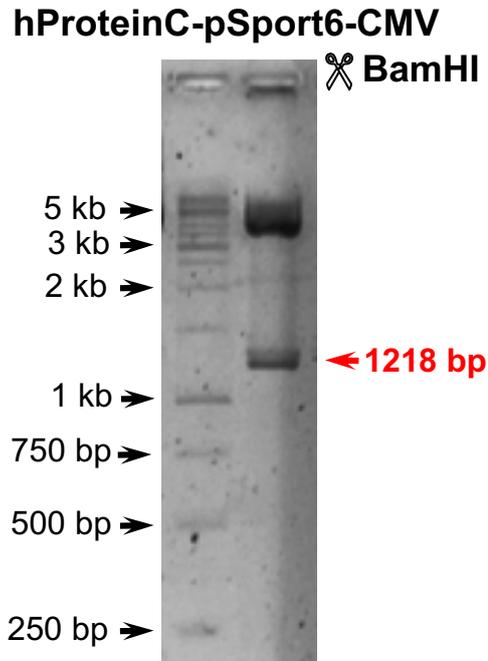


Рис. 5.12. Підтвердження успішності клонування кДНК протеїну С людини до вектора pSport6-CMV. Продукти рестрикційної реакції були розділені електрофорезом на 1% агарозному гелі. Червоним кольором вказаний очікуваний фрагмент вставки розміром 1218 п.н.

Даний ген був отриманий у вигляді послідовності, заклонованої у комерційний вектор pSport6-CMV із внесенням ділянок в праймери для клонування та з наступним переклонованням до вектора pET-28a(+). В хромосомній ДНК людини цей ген містить вісім інтронів із початком кодуючої ділянки в 2-му екзоні. Проте, оскільки ми клонували його із повністю процесованої зрілої кДНК, це робило можливим його ефективну експресію і в прокаріотичних системах.

Щодо протеїну С відомо, що його попередник містить сигнальний пептид (відповідає нуклеотидам 88-141). Секретований протеїн після експресії підлягає наступному протеолізу з утворенням двох ланцюгів: легкого, що відповідає нуклеотидам 214-678, і важкого (нуклеотиди 685-1470), тому при створенні генетичної конструкції афінну мітку слід розміщувати на С-кінці даного гену.

5.3.2.2. Опис структури генетичної конструкції для експресії рекомбінантного протеїну С.

Для експресії отриманого гену пС нами було зроблено чотири варіанти генетичних конструкцій на основі векторів pSport6-CMV (рис.8), pET-28a(+) rc, pET-24a(+) rc та pCMV.

Вектори pET-28a(+)-rc та pET-24a(+) rc є виключно бактерійними, а pSport6-CMV і pCMV є призначеними для експресії в еукаріотичних клітинах ссавців. На конструкціях гени позначені стрілками, що співпадають з напрямком експресії. Усі створені конструкції є кільцевими плазмідами.

Отже, були отримані такі генетичні конструкції:

1. Full-length PrePro- hProteinC pSport6-CMV (рис. 5.11).
2. Full-length 6His-TrombinCleav-PrePro- hProteinC-pET-28a(+) rc (рис. 5.13)
3. 6His-EnteroCleav-PrePro- hProteinC- pET-24a(+) rc (рис. 5.14)
та
4. pCMV- 6xHis-Entero-prePro_Human Protein C (рис. 5.15)

Конструкції для продукції рекомбінантного пС в бактеріальних експресійних системах були створені на основі бактеріальних векторів pET-28a(+) rc та pET-24a(+) rc, що містять касету полілінкера для клонування, ген lac, що кодує регулятор експресії, який взаємодіє з геном lac-оператора, що розташований після T7 промотора і регулює його активність. Різні гени стійкості до канаміцину (pET-28a і pET-24a), fl origin та ColE1 pBR322 origin (сайти реплікації плазміди). На кінці полілінкерної касети міститься T7-термінатор. Обидві конструкції створені для реплікації та експресії рекомбінантного протеїну в бактеріальній системі. polyHis-tag (вказаний на мапі рожевим кольором) може бути усунутий за допомогою протеїнази тромбіну або ентерокінази (рис. 5.13 та 5.14; ділянки вказані на мапах рожевим кольором).

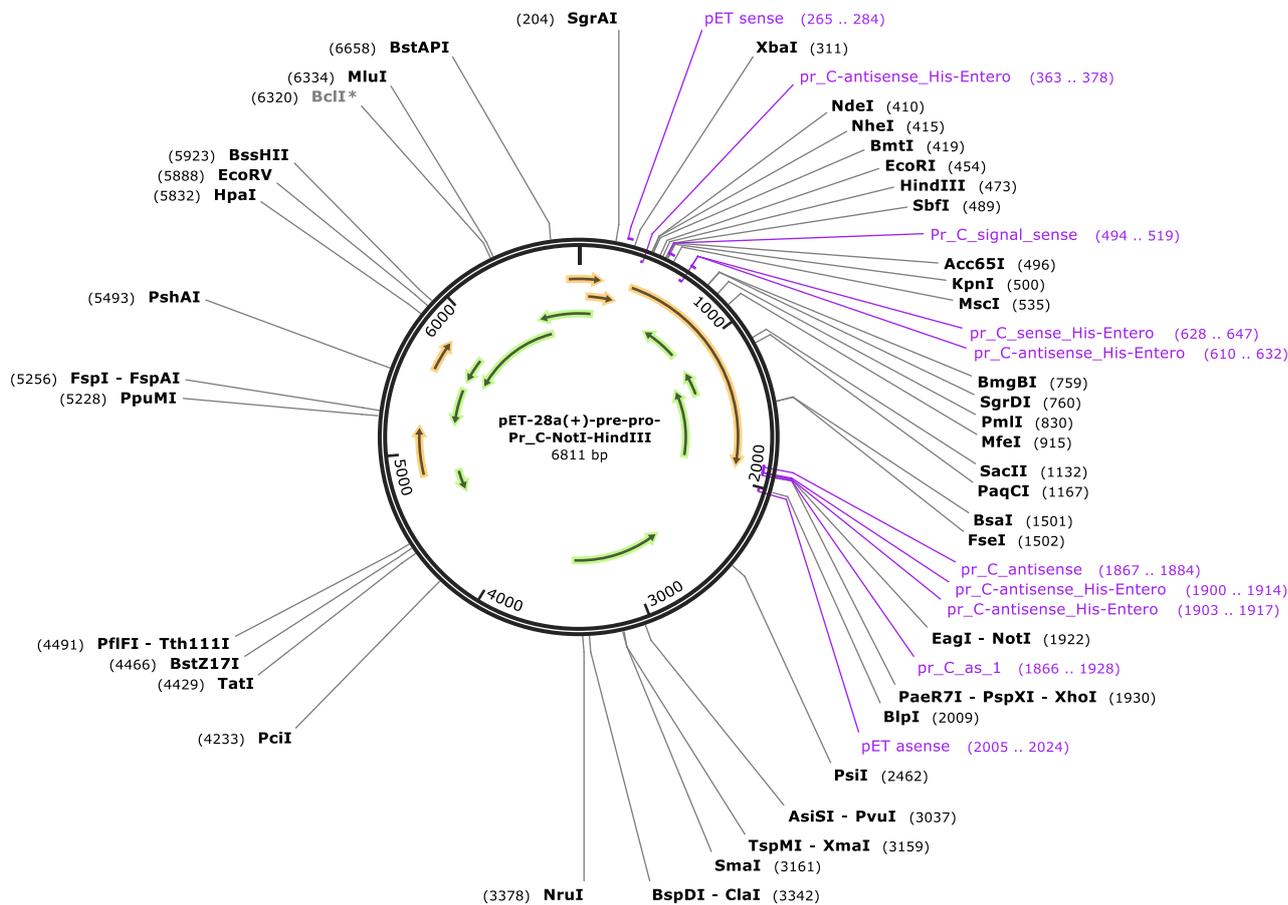


Рис. 5.13. Схема структури генетичної конструкції 6His-TrombinCleav-PrePro- hProteinC-pET-28a(+) rc.

Конструкції відрізняються за сайтами протеолізу для усунення His-tag.

Full-length 6His-TrombinCleav-PrePro- hProteinC-pET-28a(+) rc (рис. 5.12) та 6His-EnteroCleav-PrePro-hProteinC- pET-24a(+) rc (рис. 5.13) кодують повнорозмірний пС людини, який, як виявилось, накопичується у тільцях включень і тому вимагає відповідної процедури денатурації інкапсульованого протеїну за допомогою 8М сечовини, очистки на нікель-сефарозі в присутності 8М сечовини та наступної ренатурації рекомінантного протеїну.

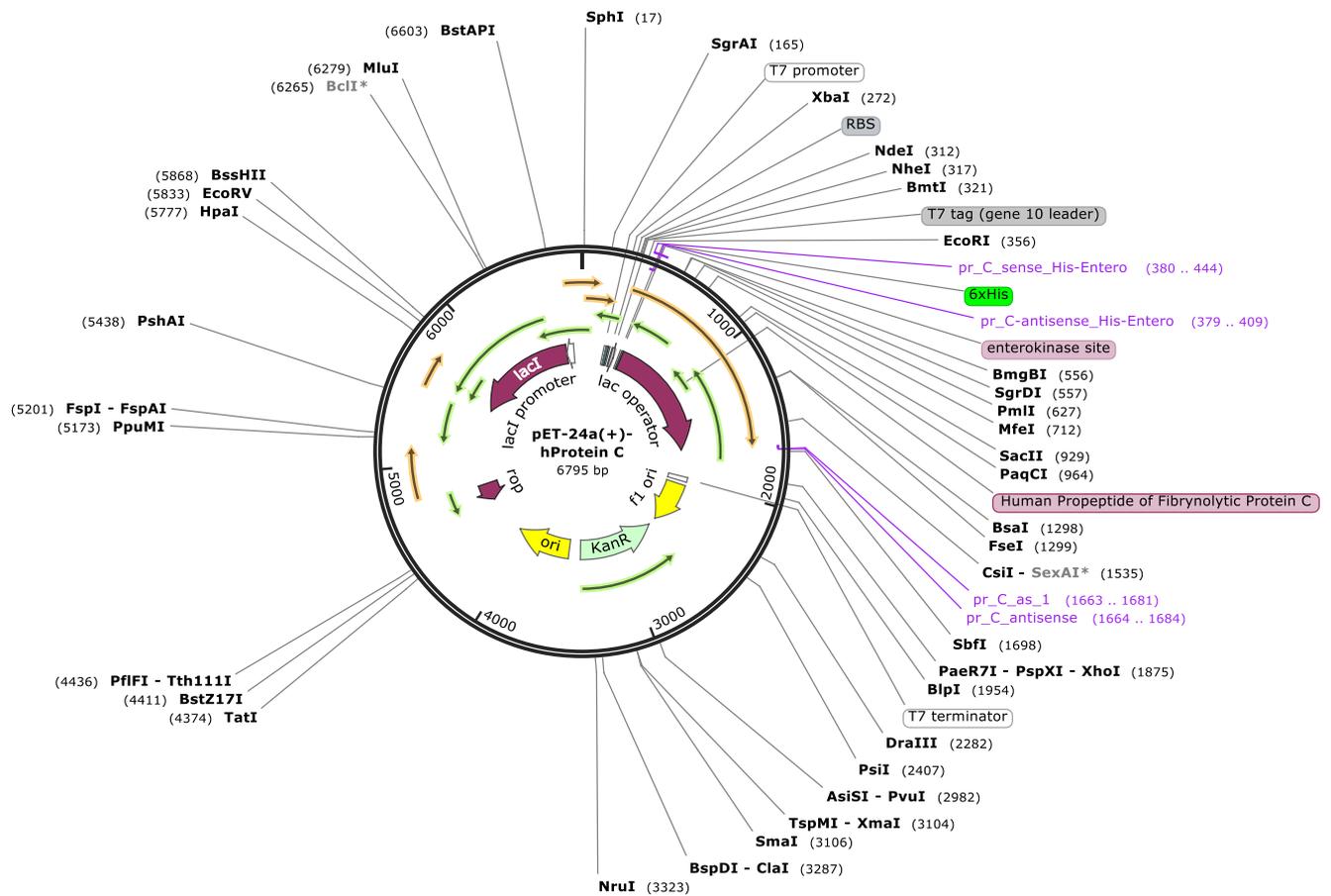


Рис. 5.14. Схема структури генетичної конструкції 6His-EnteroCleave-PrePro-hProteinC-pET-24a(+) rc

Всі плазмідні конструкції із результатами клонування рекомбінантного пС людини були перевірені за допомогою секвенування на предмет можливих помилок полімерази або ж помилок в праймерах при їх синтезі. Для зручності наводимо результати секвенування для якісної частини секвенування лише однієї із конструкцій: 6His-EnteroCleave-PrePro-hProteinC-pET-24a(+) rc.

Наступна конструкція, що були отримані, має назву:

pCMV-6xHis-Entero-prePro_Human Protein C (рис. 5.14)

Ця конструкція створена на основі човникового вектора pSport6-CMV, містить ген резистентності до ампіциліну Amp(R) під контролем bla-промотора. Вектор має сайти реплікації pUC origin та f1 origin. Також конструкція містить полілінкер для клонування, який дозволяє вставити сегмент ДНК під контроль потужного CMV-промотора та термінувати його BGH рА сигналом

поліаденілювання. Ця конструкція реплікується тільки в бактеріальній системі експресії, і є ефективною як для тимчасової експресії рекомбінантного протеїну, так і для постійної експресії після селекції позитивних клонів та під наступним контролем генетицину в клітинах ссавців.

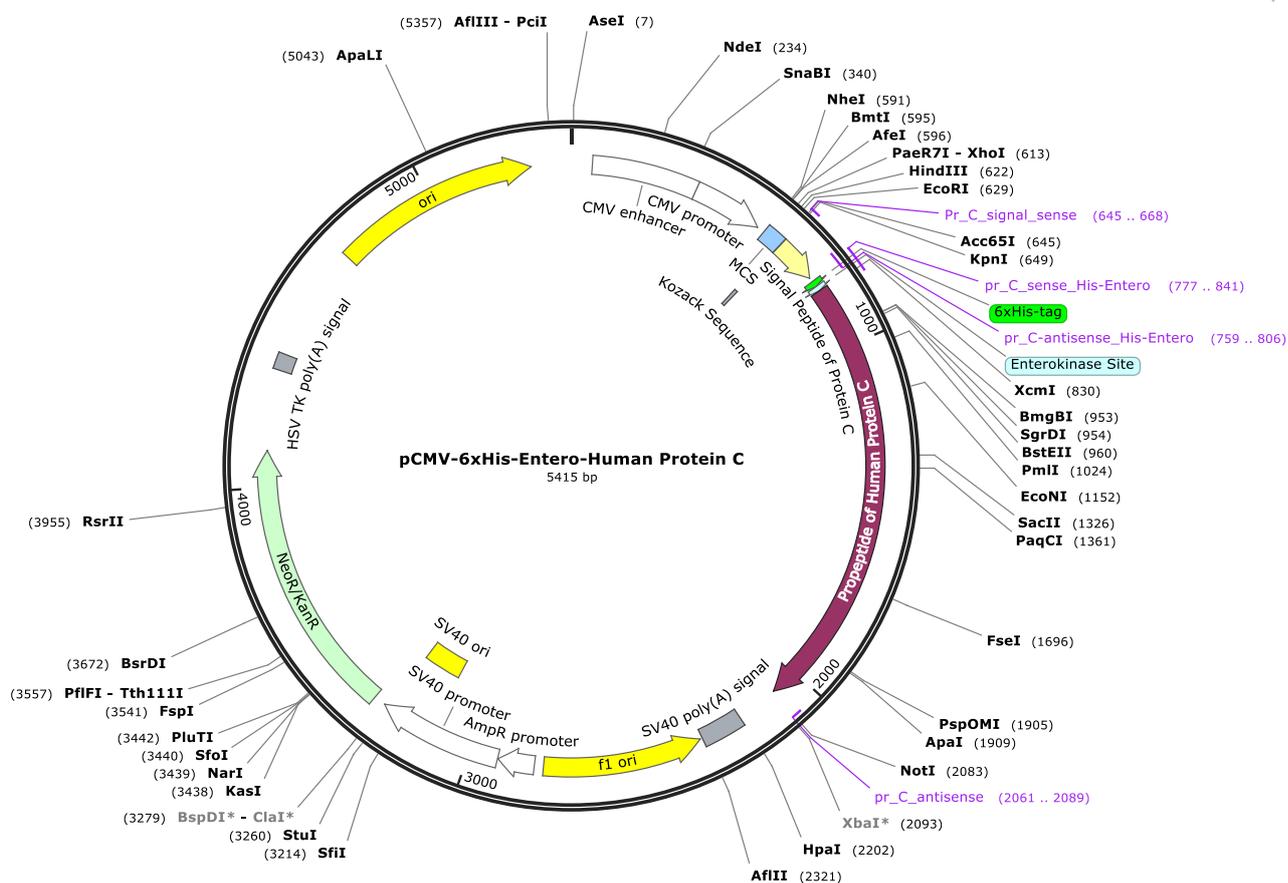


Рис. 5.15. Схема структури генетичної конструкції pCMV- 6xHis-Entero-prePro_Human Protein C

Оскільки рекомбінантний пС виявився відносно токсичним для бактерійних клітин, він акумулювався в тільцях включення. Для повної солубілізації і відновлення дисульфідних містків, тільця включення інкубували в 50 мМ Трис-НСІ буфері, рН 8.0, який містив 20 мМ ЕДТА, 8М сечовину та 50 мМ 1,4 – дитіоеритрирол.

Рефолдинг даних протеїнів в ході елюції проходив із різкою зміною 8 М сечовин на 50 мМ Трис (рН 7,8), 300 мМ NaCl, 200 мМ імідазол, 1мМ β-меркаптоетанол (без інгібітора протеїназ). В той же час, коли рефолдинг проводили більш м'якою зміною концентрації сечовини: ступінчастим градієнтом

6, 5, 4, 3, 2, і 1 М, спостерігали менший ступінь деградації молекули протеїну С і меншу кількість продуктів з неправильним фолдингом. Як видно з рисунку 5.16, очищення було проведено успішно, було отримано електрофоретично чистий рекомбінантний пС.

Отримані зразки рекомбінантного пС були проаналізовані на здатність розщеплювати хромогенний субстрат S2236. Було показано, що дані зразки не виявляли амідолітичної активності до субстрату S2236, що може бути пояснено, тим що рефолдинг протеїну пройшов не повністю, або неправильно, що призвело до неправильної конформації активного центру ензиму, часткової денатурації і втрати ним активності.

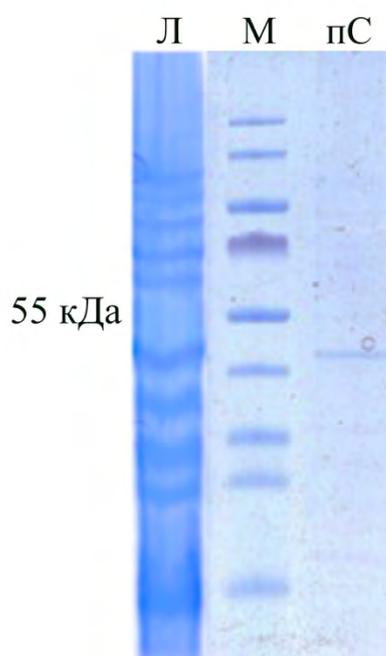


Рис. 5.16. Електрофореграма отриманого рекомбінантного протеїну С людини із вектору рЕТ32 за умов ІПТГ-індукованої експресії при 37°C впродовж 3-х год; Л – лізат перед нанесенням на Ni-NTA агарозу; М – маркери молекулярної маси; пС – протеїн С.

В той же час, вестерн-блот аналіз (рис. 5.17) показав здатність рекомбінантного пС розпізнаватись антитілом IV-6А, специфічним до пС.

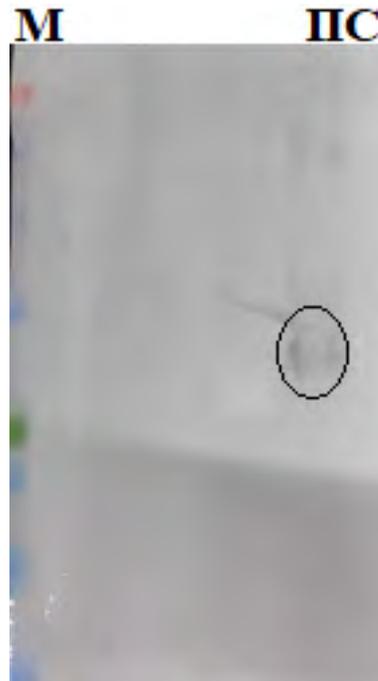


Рис. 5.17. Аналіз за методом вестерн-блоттингу рекомбінантного аналогу ПС людини, отриманого в клітинах *E. Coli* (вектор – рЕТ-28а).

М – маркери; ПС – протеїн С.

Таким чином, із використанням різних генетичних конструкцій для отримання рекомбінантного пС людини, було отримано, очищено і охарактеризовано зразки рекомбінантного пС. Відібрано найбільш вдалі зразки для використання їх, як калібратора для визначення активності протеїну С.

5.3.3. Створення бібліотеки моноклональних антитіл до протеїну С.

З 2015 року у відділі молекулярної імунології та у відділі структури та функції білка Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України тривала робота по отримання гібридом-продуцентів моноклональних антитіл (АТ), специфічних до пС. Для імунізації тварин використовували такі антигени: рекомбінантний пС; кон'югат бичачого сироваткового альбуміну (BSA) з пептидом, похідним С-кінця Н-ланцюга пС; кон'югат гемоцианіну равлика (KLH) з пептидом, похідним С-кінця Н-ланцюга. Однак, не всі отримані антитіла були здатні розпізнавати пС плазми крові людини. Крім того, жодна пара отриманих антитіл не виявилася ефективною в бісайтовому методі ELISA.

Тому, для створення методу визначення пС в плазмі крові на основі бісайтового методу ELISA, було необхідно створити нову гібридому. В якості антигену для її створення використано нативний пС плазмі крові людини.

Для цього антиген (нативний пС людини) в кількості 50 мкг вводили внутрішньочеревинно мишам лінії BALB/c, перший раз у повному ад'юванті Фрейнда, наступні два рази – з неповним ад'ювантом Фрейнда. Після другої та третьої реімунізації, сироватку крові імунізованих тварин аналізували на присутність антитіл до пС та його рекомбінантного аналога за допомогою прямого методу ELISA. Як видно з рис. 5.18, після другої (А, Б) та третьої (В, Г) реімунізації в сировотці мишей містились антитіла, що розпізнавали нативний пС та його рекомбінантний аналог, при цьому титр антитіл збільшувався після повторної реімунізації.

Мишу з найвищим титром антитіл (миша III) було обрано для подальшої гібридизації спленоцитів із мієломними клітинами. Для цього за чотири дні до гібридизації обраним мишам було введено 50 мкг протеїну С без ад'юванту. Через чотири дні з моменту введення антигену, була проведена декапітація тварини з наступним виділенням її спленоцитів і проведенням власне процедури гібридизації.

Для отримання гібридоми використовували стандартний протокол EuroMAbnet [100]. Клітини гібридоми ресуспендували в селективному поживному селективному середовищі (НАТ), яке містило гіпоксантин, аміноптерин, тимідин та 20 % розчин ембріональної сироватки великої рогатої худоби, після чого їх розсіювали в 24-коміркові планшети.

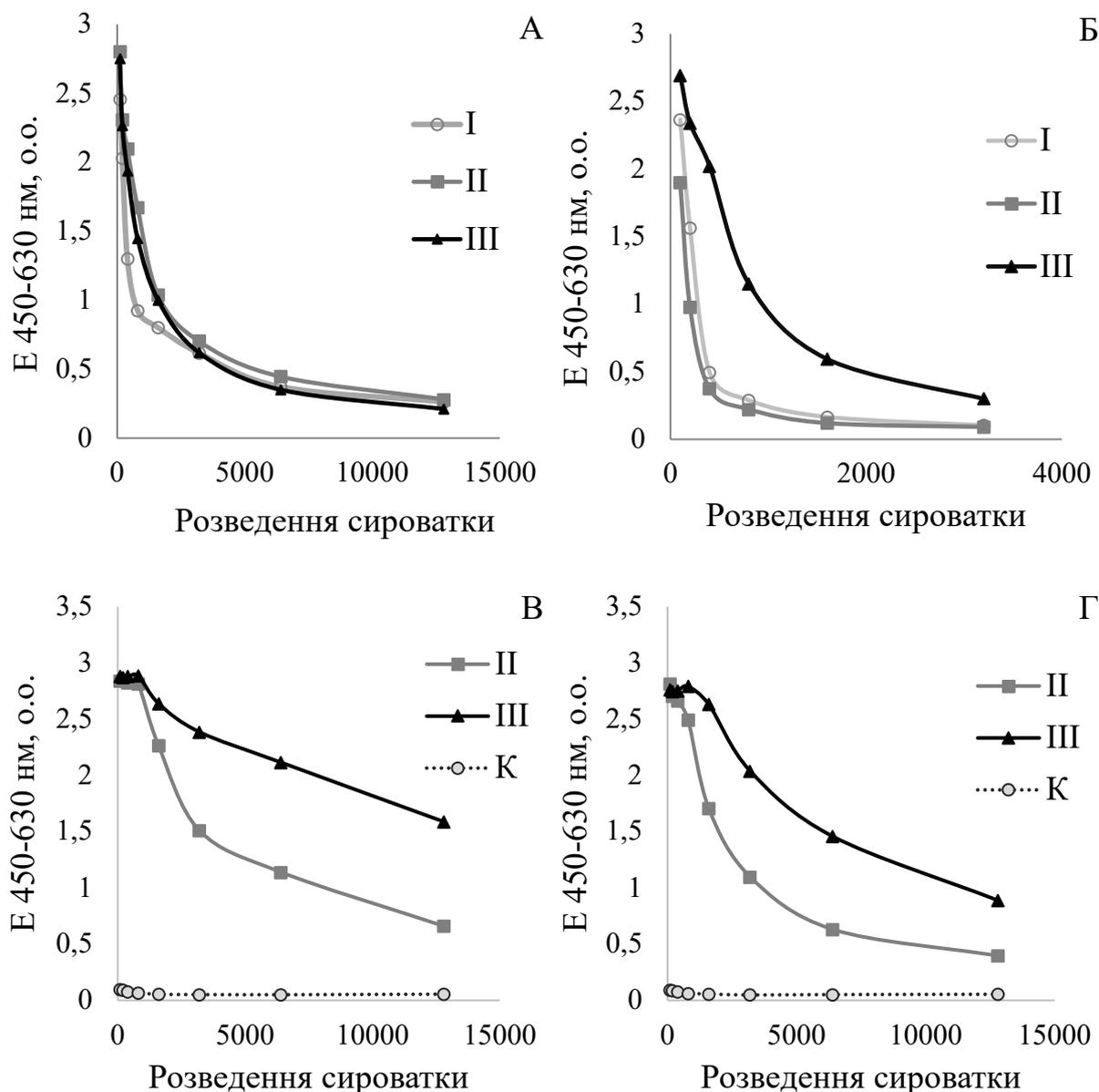


Рис. 5.18. Титр специфічних антитіл у сироватці крові мишей, імунованих нативним пС людини: А, В – розпізнавання нативного протеїну С, виділеного з плазми крові людини; Б, Г – розпізнавання рекомбінантного аналога протеїну С. Після другої (А, Б) та третьої (В, Г) реімунізації. К – контрольна (неімунована) миша.

Через 10 днів проводили скринінг культурально середовища на наявність специфічних антитіл методом ELISA. Лунки, в яких під час аналізу спостерігали найвищу активність, вважали такими, що містять колонії – продуценти цільових АТ. Клітини розсіювали, титруючи методом кінцевого розведення, від максимальної кількості. Після культивування та повторного виявлення гібридом,

що продукують цільові АТ, було отримано низку гібридом, що продукували моноклональні антитіла до пС.

Таким чином, було доповнено бібліотеку моноклональних АТ, специфічних до пС. В таблиці 5.4 наведено маркування отриманих моноклональних АТ, антигену, яким імунізували мишей для їх отримання, та ізотип АТ, що продукувались отриманими гібридомами.

Таблиця 5.4

Бібліотека антитіл до протеїну С

Маркування гібридоми	Антиген, яким імунізували мишей	Ізотип
III-4A	Протеїн С з плазми крові донорів	IgG _{2b}
IV-5A	Рекомбінантний протеїн С	IgG ₁
III-5C	Рекомбінантний протеїн С	IgG ₁
II-4d	Рекомбінантний протеїн С	IgG _{2b}
IV-6A	Кон'югат BSA-пептиду та С-кінця Н-ланцюга протеїну С	IgG ₃
III-5D	Кон'югат KLH- пептиду та С-кінця Н-ланцюга протеїну С	IgG _{2b}

Методом ELISA було перевірено зв'язування АТ до пС, виділеного з плазми крові донорів, та до концентрату вітамін К-залежних факторів і протромбіну (рис. 5.19). Протромбін було обрано для перевірки селективності зв'язування АТ, як мажорний протеїн системи зсідання крові крові, що має спільні з пС домени. Концентрат вітамін К-залежних факторів містить фактор ІХ, фактор Х, протромбін, які, як і пС, містять гомологічні ділянки – крингли. Зв'язування отриманих антитіл з протромбіном чи концентратом вітамін К-залежних факторів не виявлено.

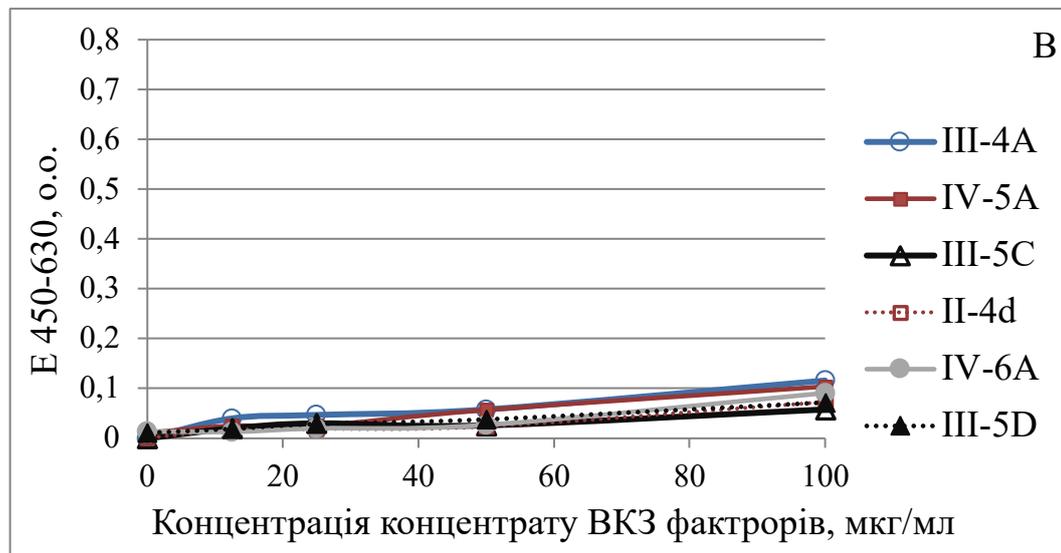
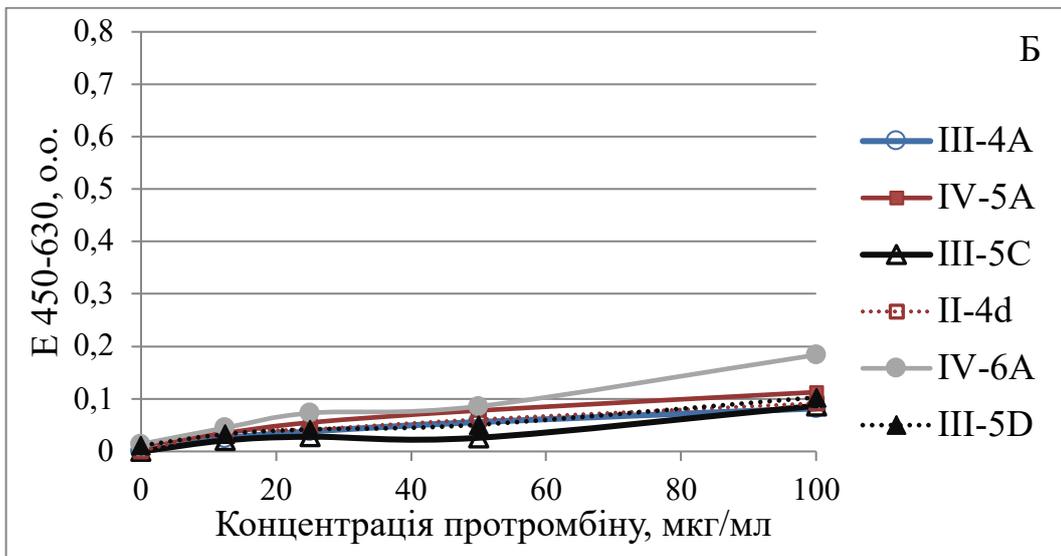
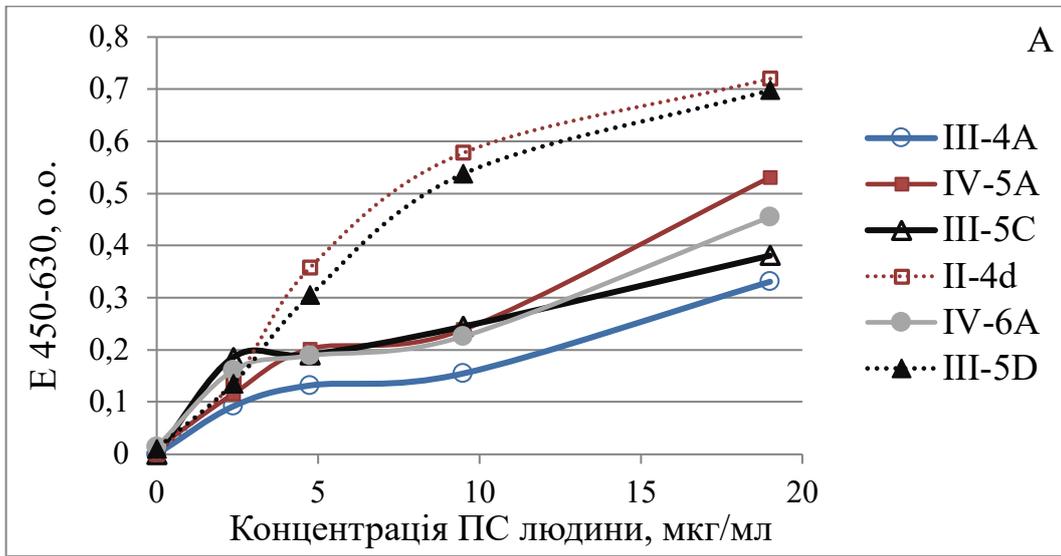


Рис. 5.19. Зв'язування отриманих АТ з протеїном С плазми крові (А), протромбіном (Б), концентратом вітан К-залежних (ВКЗ) факторів (В).

В плазмі крові зв'язування АТ з пС перевірили в прямому методі ELISA (рис. 5.20). за результатами, для подальшої роботи було обрано АТ III-4А та IV-6А. В ході роботи було показано, що конкуренція між АТ III-4А та IV-6А відсутня.

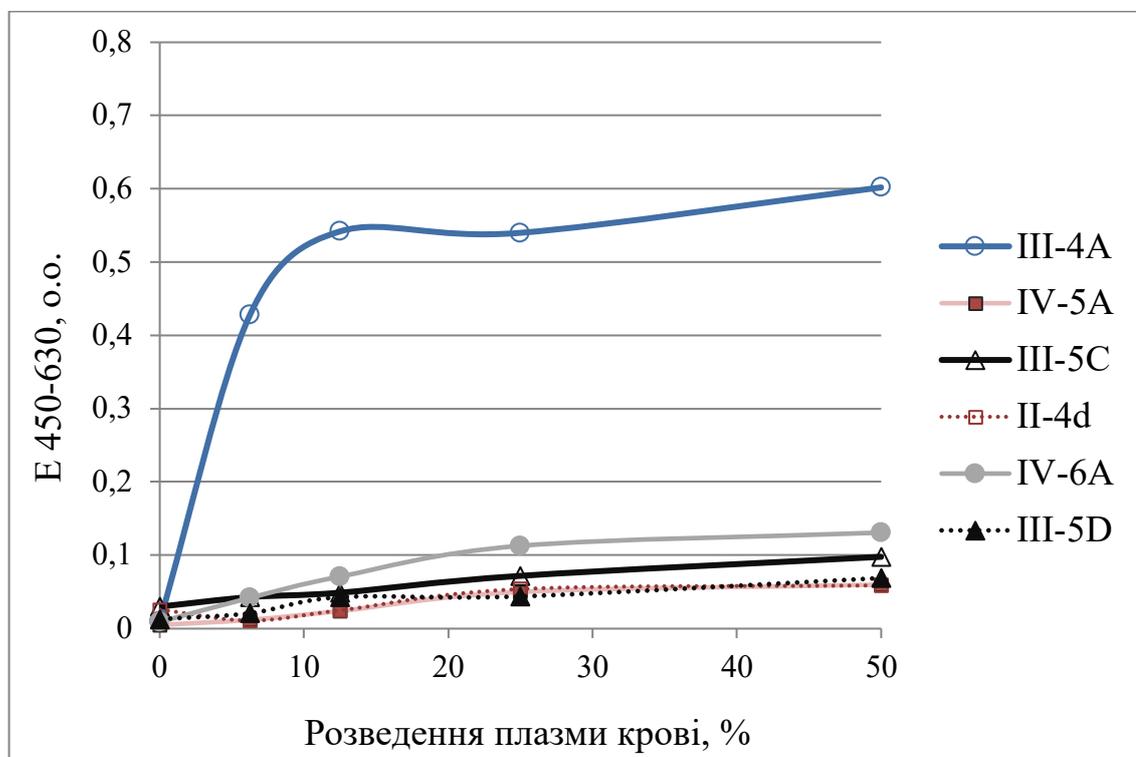


Рис. 5.20. Зв'язування АТ з протеїном С в плазмі крові в ELISA.

При цьому АТ III-4А та IV-6А було біотинильовано та було перевірено можливість їх використання в бісайтовому ELISA (рис. 5.21). Було продемонстровано, що ефективна детекція пС можлива за використання IV-6А як catch-АТ, а біотинильованого III-4А, як tag-АТ.

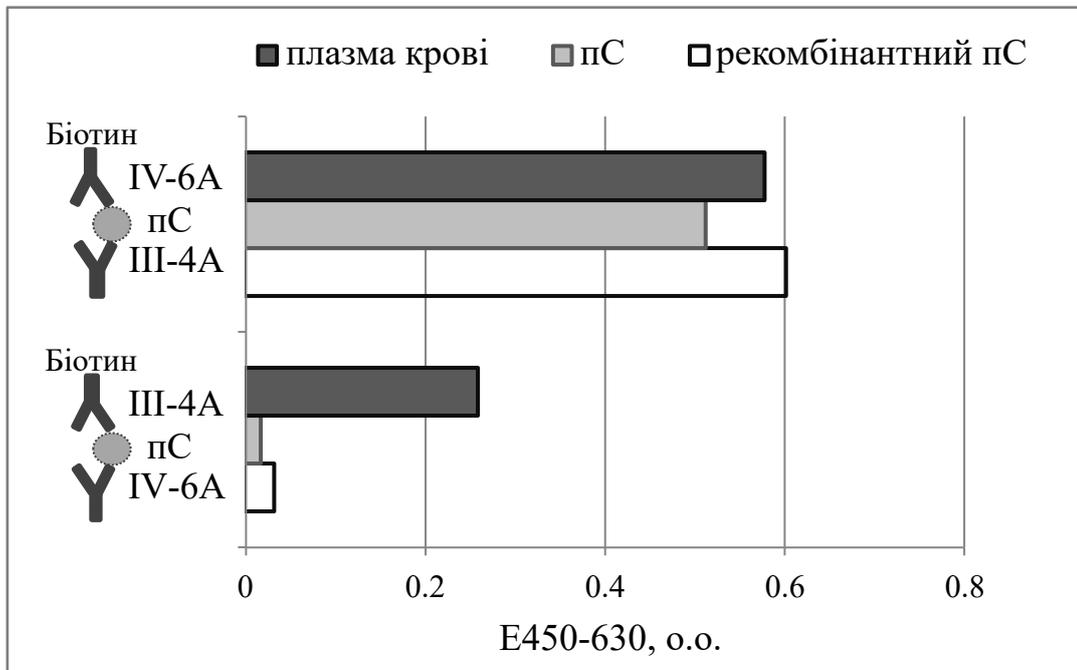


Рис. 5.21. Розпізнавання протеїну С людини, рекомбінантного протеїну С та протеїну С в плазмі крові в бісайтовому ELISA. Ліва панель – III-4A catch-AT, біотинильовані IV-6A tag-AT. Права панель – IV-6A catch-AT, біотинильовані III-4A tag-AT.

Як видно з рис. 5.21, було підібрано пару антитіл, які могли однаково ефективно детектувати нативний пС як в розчині, так і в плазмі крові, крім того вони взаємодіяли з рекомбінантним пС, що необхідно для використання рекомбінантного пС в якості калібратора.

Було проведено детекцію пС, рекомбінантного пС та пС в плазмі крові донорів в обраному варіанті бісайтового ELISA (рис. 5.22). З рисунку видно, що такий варіант ELISA можна використовувати для виявлення концентрації пС до 4 мкг/мл з використанням калібрувальної кривої, побудованої як з використанням нативного пС з плазми крові, так і рекомбінантного пС.

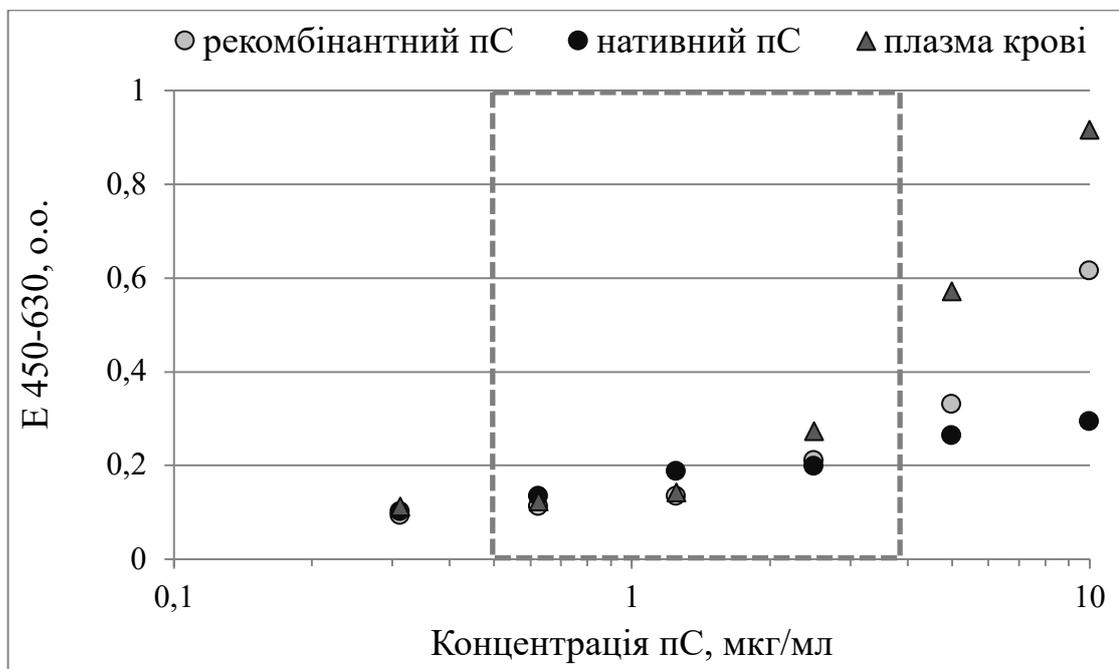


Рис. 5.22. Детекція ПС, виділеного з плазми крові донорів, рекомбінантного ПС та ПС в плазмі крові донорів в сандвіч ELISA з використанням АТ IV-6А та біотинильований АТ II-4А. Пунктиром позначено зону «робочої» концентрації потенційної тест-системи.

Для розробки тест-системи для визначення вмісту ПС на основі обраних раніше моноклональних антитіл (АТ) – IV-6А в якості *cach*-АТ та II-4А в якості *tag*-АТ – було проведено визначення рівню ПС в донорській плазмі крові за різних умов: в різних буферних системах та з використанням різних способів блокування вільних місць зв'язування на плашці.

Як видно з рис. 5.23, найменше відхилення від лінії тренду спостерігалось при використанні фосфатної буферної системи та 5% розчину молока в якості блокування. Тож надалі використовували описані умови для проведення визначення ПС в плазмі крові.

На наступному етапі було підібрано концентрацію *cach*-АТ та *tag*-АТ, придатну для вловлювання ПС в плазмі крові. Було використано такі комбінації концентрацій АТ: 2 мкг/мл IV-6А, 1 мкг/мл II-4А; 2 мкг/мл IV-6А, 2 мкг/мл II-4А; 4 мкг/мл IV-6А, 2 мкг/мл II-4А; 4 мкг/мл IV-6А, 4 мкг/мл II-4А; 8 мкг/мл IV-6А, 4 мкг/мл II-4А. На рис. 5.24 представлені калібрувальні криві з використанням

відповідних комбінацій концентрацій АТ, з яких було обрано співвідношення 4 мкг/мл IV-6А, 2 мкг/мл II-4А.

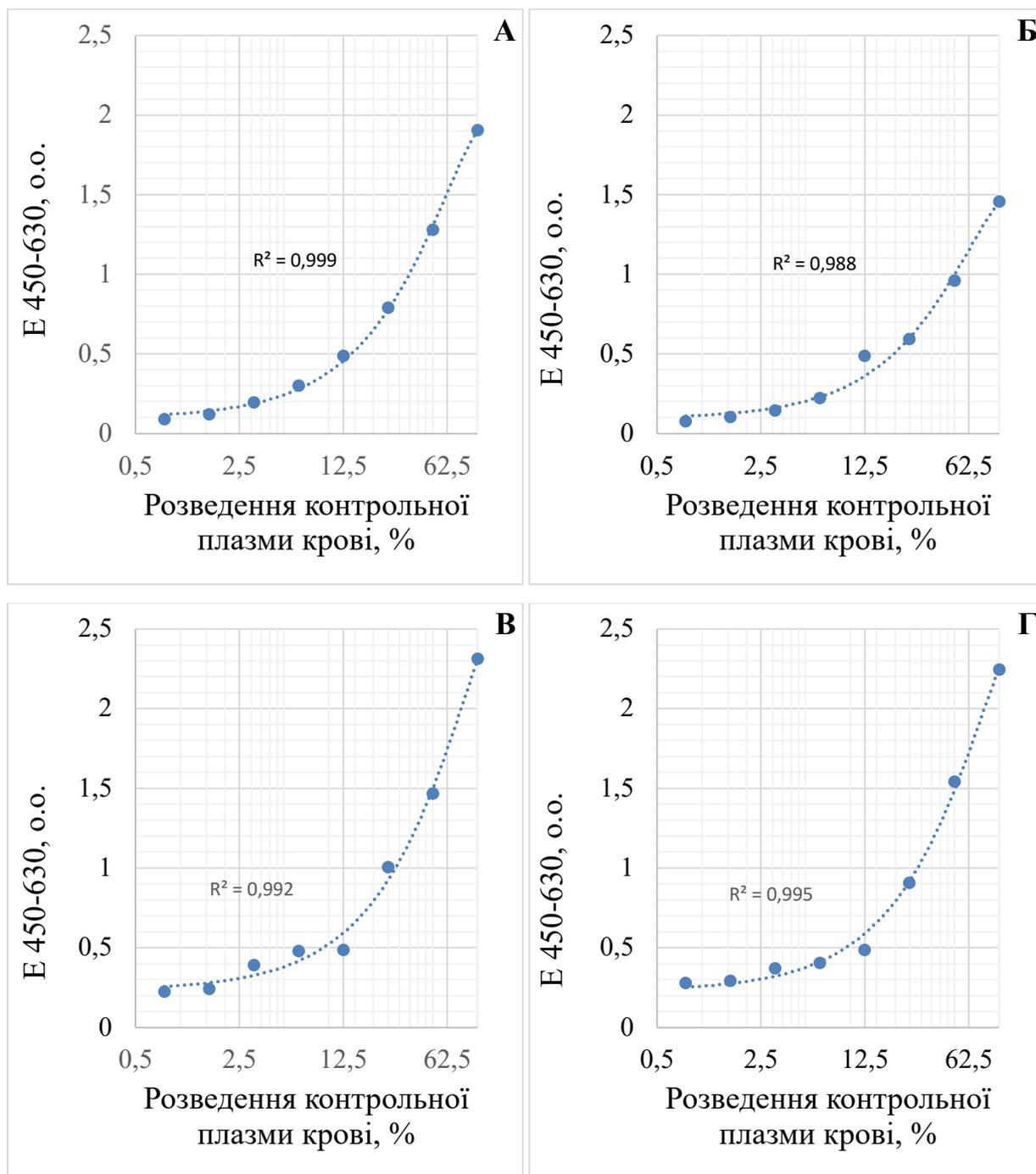


Рис. 5.23. Калібрувальні криві для визначення вмісту пС з використанням донорської плазми крові в фосфатній буферній системі (А, Б) та трис-НСІ буферній системі (В, Г) з використанням 5% розчину молока (А, В) та 1% альбуміну (Б, Г) для блокування вільних місць зв'язування на плащі.

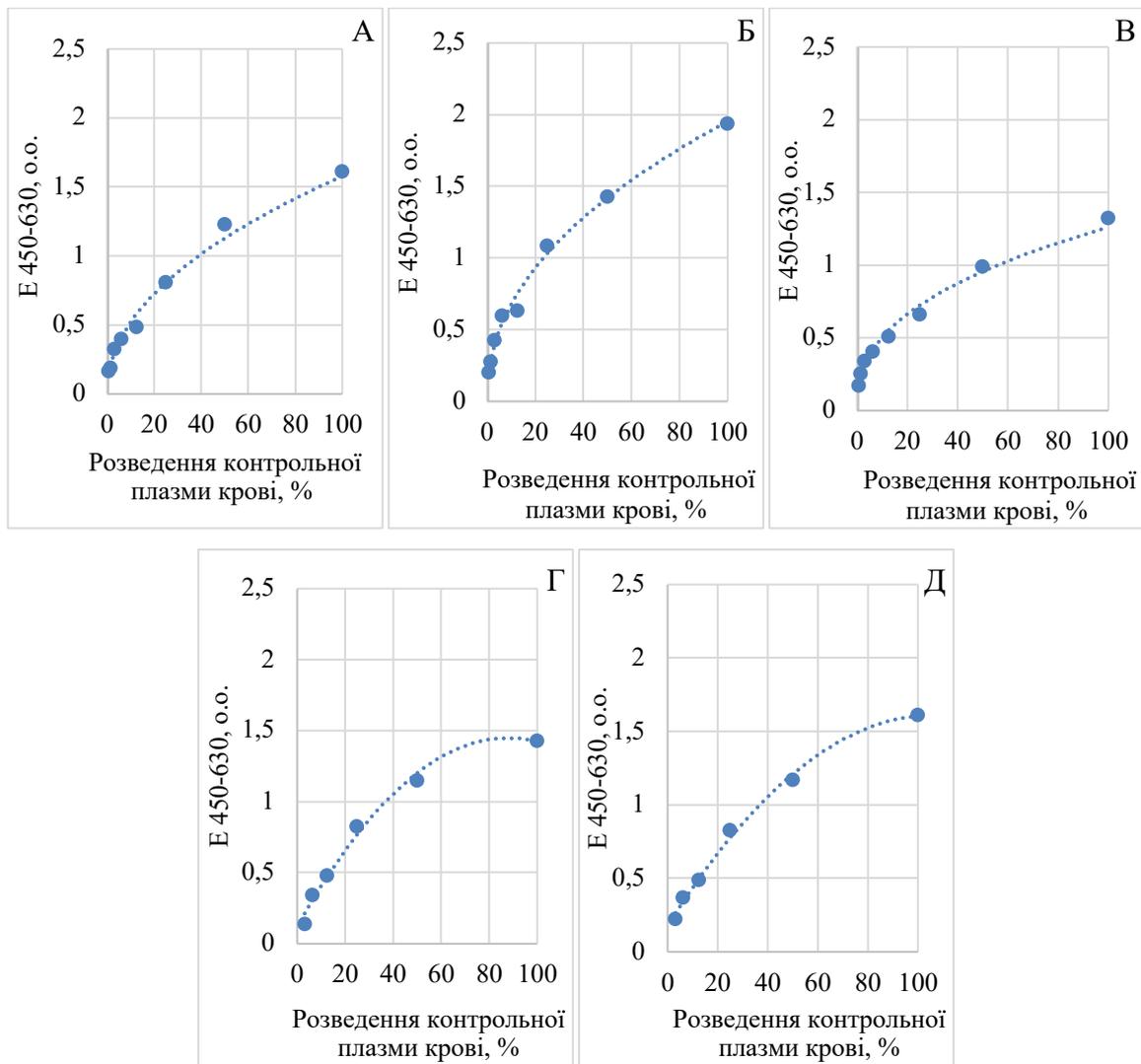


Рис. 5.24. Калібрувальні криві для визначення вмісту пС в плазмі крові з використання таких комбінацій концентрацій АТ: 2 мкг/мл IV-6А, 1 мкг/мл II-4А (А); 2 мкг/мл IV-6А, 2 мкг/мл II-4А (Б); 4 мкг/мл IV-6А, 2 мкг/мл II-4А (В); 4 мкг/мл IV-6А, 4 мкг/мл II-4А (Г); 8 мкг/мл IV-6А, 4 мкг/мл II-4А (Д).

На наступному етапі було проведено визначення рівню пС в плазмі крові здорових донорів (таблиця 5.5). Концентрацію пС визначали, виходячи з відомої концентрації пС в контрольній плазмі крові (4,5 мкг/мл). Як видно, у донорів № 1, 3, 4, 6, 7, 8, 9 рівень пС в плазмі крові визначався як нормальний (від 80 до 120 %, відносно контрольної плазми крові), однак у донорів № 2, 5, 10 визначений вміст пС був нижче норми. Для виявлення причин такого зниження провели корекційну пробу (таблиця 5.5). Для цього плазму крові здорових донорів змішували з контрольною плазмою 1:1 і проводили визначення вмісту

пС за стандартних умов. Таким чином, у випадку, коли вміст пС у донора був дійсно низьким, вміст пС в корекційній пробі мав зростати понад 2,25 мкг/мл, адже половину зразка, що аналізувався, складала контрольна плазма крові (1/2 від 4,5 мкг/мл відповідає 2,25 мкг/мл). Така картина спостерігалась у донора № 2. В той же час виявлення вмісту пС, що був меншим за 2,25 мкг/мл, свідчить про нездатність АТ розпізнати пС в даній плазмі крові, тобто про наявність екрануючих агентів в плазмі крові – протеїнових партнерів пС, наприклад тромбомодуліну. Таку картину спостерігали при визначенні вмісту пС в корекційній пробі у донорів № 5 та 10.

Таблиця 5.5

Визначення вмісту пС в ELISA аналізі та в корекційній пробі в плазмі крові здорових донорів

№ п.п.	Визначена в ELISA концентрація пС,	Визначена в корекційній пробі концентрація пС, мкг/мл
1	5,4	-
2	1,7	2,7
3	5,4	-
4	5,4	-
5	1,5	1,8
6	5,0	-
7	5,4	-
8	4,5	-
9	4,3	-
10	0,7	1,4

Крім того, для оцінки причин зменшення відгуку тест-системи було проведено активацію пС донорської плазми крові та визначено вміст пС в цій плазмі крові за описаних умов. Для активації пС плазму крові було проінкубовано впродовж 30 хв при температурі 37°C з активатором пС (Berichrom® Protein C) у співвідношенні 1:1. У випадку, якщо тест-система дає

відгук не лише на інтактний, але й на активований пС, визначений вміст пС мав би скласти 50%. Однак визначений тест-системою вміст пС становив 35%. Таким чином, тест-система здатна визначати лише інтактний, а не активований, пС.

Таким чином, було створено продуцента для напрацювання рекомбінантного пС, що може бути використаний як калібратор тест-системи для визначення концентрації протеїну С в плазмі крові.

Доповнено бібліотеку моноклональних антитіл до протеїну С. Показано, що найбільш селективними до протеїну С, як рекомбінантного, так і виділеного з плазми крові, виявилися антитіла III-4A та IV-6A. Було підібрано умови проведення ELISA в бісайтовому варіанті для визначення концентрації протеїну С.

5.3. Розчинний фібрин: удосконалення та оптимізація методу визначення

В клінічній практиці розчинний фібрин визначають різними методами. Зокрема до них належать: функціональні методи (засновані на здатності розчинного фібрину прискорювати перетворення плазміногену на плазмін під дією тканинного активатора); методи, засновані на преципітації різними хімічними агентами, зокрема фенантроліном, протамін сульфатом, β -нафтолом, етанолом, фосфатами калію і натрію. Однак, найнадійнішими кількісними методами вважаються імунохімічні методи, засновані на використанні специфічних моноклональних антитіл (монАТ). Однак, всі три перелічені групи методів, якими користуються в цей час, мають суттєві недоліки. Методи, що належать до першої і другої груп, є напівкількісними. Вони не дають інформацію про структуру розчинного фібрину і ступінь його розщеплення плазміном, яка необхідна для визначення загрози тромбоутворення. Імунохімічні методи визначення розчинного фібрину є кращими, оскільки дають найбільш точну кількісну інформацію. Однак, у більшості випадків вони також не дозволяють

диференціювати інтактний розчинний фібрин, продукти його деградації плазміном і продукти деградації фібрину з тромбу.

У відділі імунології Інституту Палладіна НАН України раніше була розроблена тест-система для визначення концентрації розчинного фібрину, що є твердофазним бісайтовим ELISA аналізом з використанням антитіл I-3C (catch-AT) та II-4d (tag-AT).

5.3.1 Стандартизація калібратора

Важливими компонентами імунодіагностичних тест-систем є протеїни калібратори, стандартизація отримання яких відіграє ключову роль для точної побудови калібрувальних кривих та отримання об'єктивних результатів. Для використання в клініці та масштабування виробництва необхідним було розробити систему контролю якості desAB фібрину, що використовується як калібратор для тест-системи.

Фібриноген, як попередник фібрину desAB, очищували з плазми крові людини висолюванням Na_2SO_4 за стандартною методикою.

Фібрин desAB отримували з використанням тромбіну, розчиняли в 0,125 % оцтовій кислоті та характеризували електрофоретично. Як видно з електрофореграми (рис. 5.24, А), отриманий протеїн відповідає молекулярній масі для фібрин(оген)у – 340 kDa – та є електрофоретично чистим. На електрофореграмі не спостерігається додаткових смуг, окрім смуги цільового протеїну.

Здатність фібрину до полімеризації залежить від його структури і навіть незначне підщеплення фібрину або неповне перетворення фібриногену на фібрин, які неможливо вловити електрофоретично, позначаються на його здатності полімеризуватись. Тому було запропоновано якісно характеризувати фібрин, що буде використовуватись як калібратор, за допомогою турбідиметрії. На рис. 5.24, Б наведено приклад турбідиметричної кривої процесу полімеризації фібрину desAB, що є функціональним підтвердженням, що отриманий протеїн має всі риси фібрину desAB.

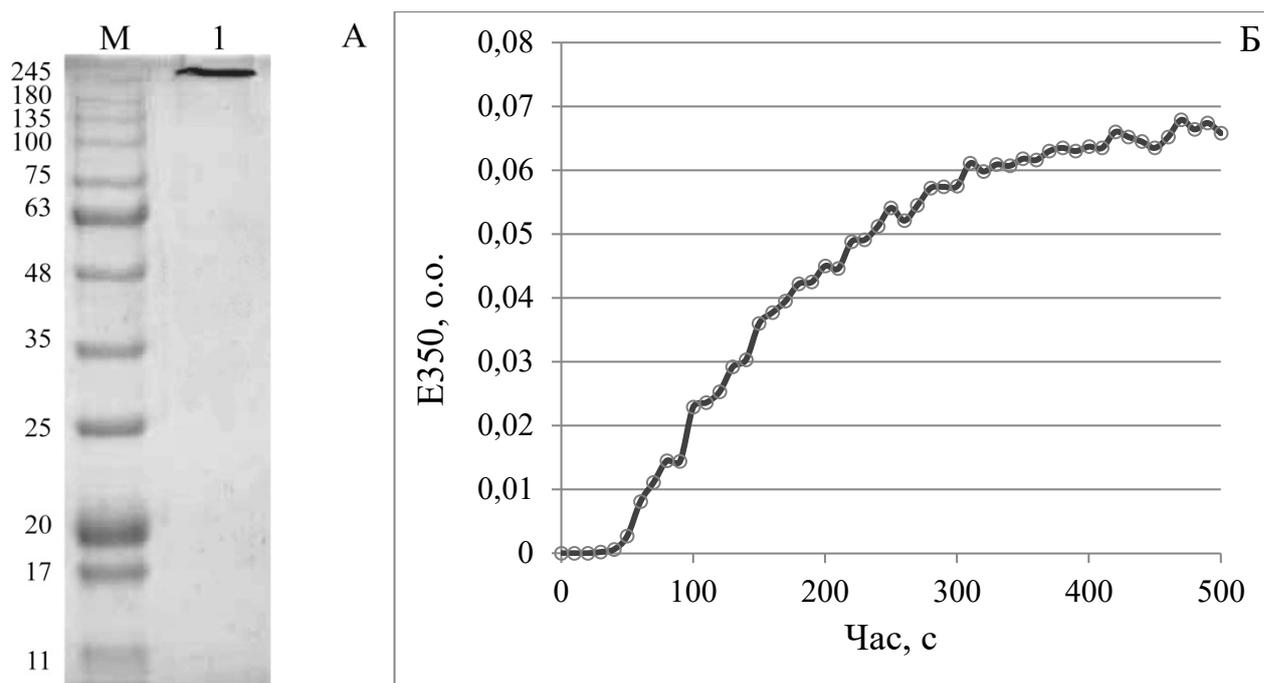


Рис. 5.24. Характеристика фібрину desAB для використання в якості калібратора в тест-системі. А – Електрофореграма фібрину desAB з використанням 7% поліакриламідного гелю; М – маркери молекулярної маси протеїну; 1 – отриманий desAB фібрин. Б – Турбідиметричний аналіз процесу полімеризації фібрину. Полімеризацію фібрину desAB вивчали шляхом внесення кислотного фібрину у 0,05 М трис-НСl буфер з 0,013 М NaCl у кінцевій концентрації 0,1 мг/мл.

Таким чином, стандартизовано методологію отримання фібрину desAB , придатного до використання у якості калібратора в імунодіагностичній тест-системі для визначення розчинного фібрину.

5.3.2. Визначення концентрації розчинного фібрину в плазмі крові за допомогою різних tag-антитіл

Імунохімічні методи ґрунтуються переважно на застосуванні моноклональних антитіл, які реагують з фібрином, але не реагують перехресно з фібриногеном. Епітопи специфічних антитіл формуються у процесі перетворення фібриногену на фібрин. Такі епітопи розташовано або в NH₂-кінцевих ділянках α- і

β -поліпептидних ланцюгів фібрину, що відкриваються після відщеплення фібринопептидів А і В, або в інших фрагментах молекули, які експонуються при переході фібриногену у фібрин.

P.J. Gaffney et al. провели гель-фільтрацію зразків плазми крові хворих на ДВЗ-синдром і знайшли, що основними молекулярними компонентами розчинного фібрину є олігомери з молекулярною масою 2×10^6 Da і вище. В імуноензимному аналізі була виявлена реакція з такими олігомерами моноклональних антитіл до фібринопептиду А (або навіть фібриногену), фібрину desA і продуктів їх деградації. Таким чином, після активації системи зсідання крові, доля розчинного фібрину, який формується у кровотоці, залежить від співвідношення трьох різних процесів: полімеризації фібрину з утворенням твердофазного фібрину, поглинання розчинного фібрину макрофагами і процесу його деградації плазмінном.

Найбільше діагностичне значення має визначення кількості ранніх форм розчинного фібрину, підвищений вміст яких свідчить про загрозу тромбоутворення і необхідність проведення антитромботичної терапії.

Найнадійнішими кількісними методами вважаються імунохімічні методи, засновані на використанні специфічних моноклональних АТ. Але існує складність з інтерпретацією результатів у зв'язку з різною специфічністю моноклональних АТ, які використовуються у складі імуносорбенту та як детектуючі «tag»-антитіла.

Для кількісного визначення розчинного фібрину в плазмі крові людини було розроблено бісайтовий імуноензимний метод з використанням фібрин-специфічних моноклональних АТ Fn I-3C (catch-антитіла, які адсорбуються на планшеті) та кількох біотинільованих моноклональних АТ (tag-антитіл), специфічних до різних ділянок молекули фібрин(оген)у. Шляхом імунізації мишей ланцюгами фібриногену раніше було отримано гібридами, здатні продукувати моноклональні АТ II-4d, а шляхом імунізації α C-доменом фібрину – АТ I-5A. В прямому методі ELISA обидва ці моноклональні АТ (рис. 5.25) ефективно розпізнавали розчинний фібрин, фібриноген, а АТ II-4d також розпізнавало D-димер. Таким чином, АТ II-4d та I-5A можуть використовуватись, як tag-антитіла в тест-системах для визначення розчинного фібрину та/або фібриногену.

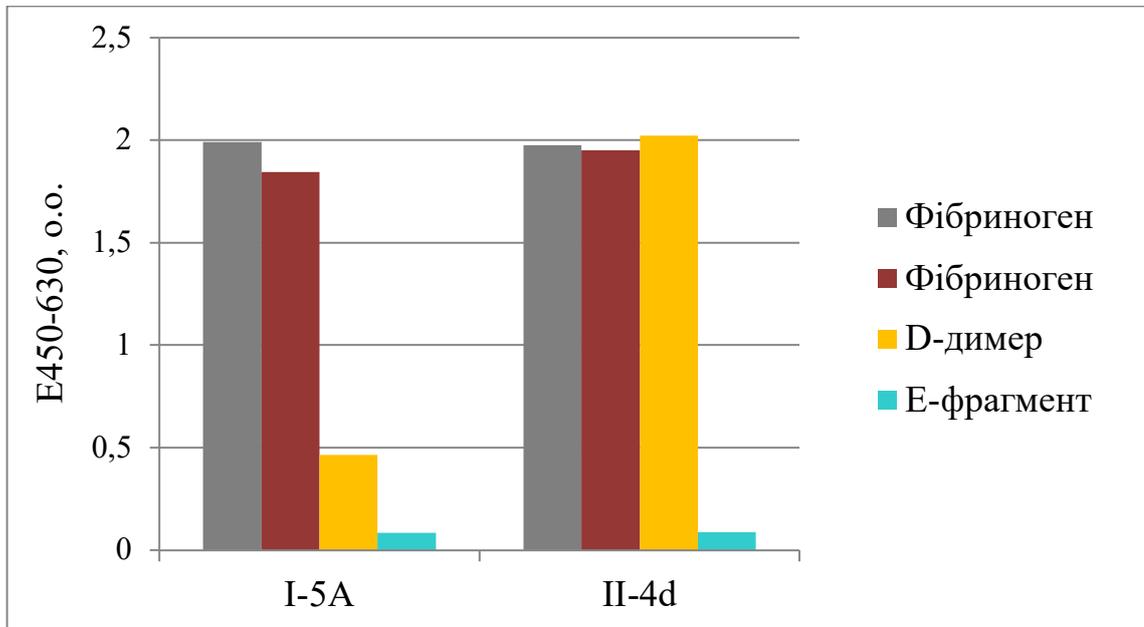


Рис. 5.25. Зв'язування моноклональних антитіл II-4d та I-5A (5 мкг/мл) в прямому методі ELISA

У Вестерн-блот аналізі було деталізовано специфічність АТ II-4d та I-5A. Для аналізу використовували електрофоретично розділені препарати відновленого фібриногену, відновленого фібрину desAB, відновленого фібрину desAB-desA α 414-610, відновленого фібрину desAB-desB β 1-42, D-фрагмент та DDE-комплекс. Як видно з рис. 5.26, АТ I-5A зв'язується з A α -ланцюгом фібрину та фібриногену і, відповідно, не зв'язується з фібрином desAB-desA α 414-610, а лише з відщепленими A α 414-610 фрагментом (смуга, що відповідає Mr<48 kDa), але взаємодіють з фібрином desAB-desB β 1-42, а II-4d – з γ -ланцюгом фібрину та фібриногену. АТ II-4d, на відміну від I-5A, розпізнавали в Вестерн-блот аналізі також D-фрагмент та D-димер в DDE-комплексі.

Відповідно епітоп моноклонального АТ II-4d розташований у NH₂-термінальній половині фрагменту γ -ланцюга D-фрагменту фібрину, а моноклональне АТ I-5A взаємодіє з α C-доменом фібрин(оген)у (A α 414-610) (таблиця 5.6).

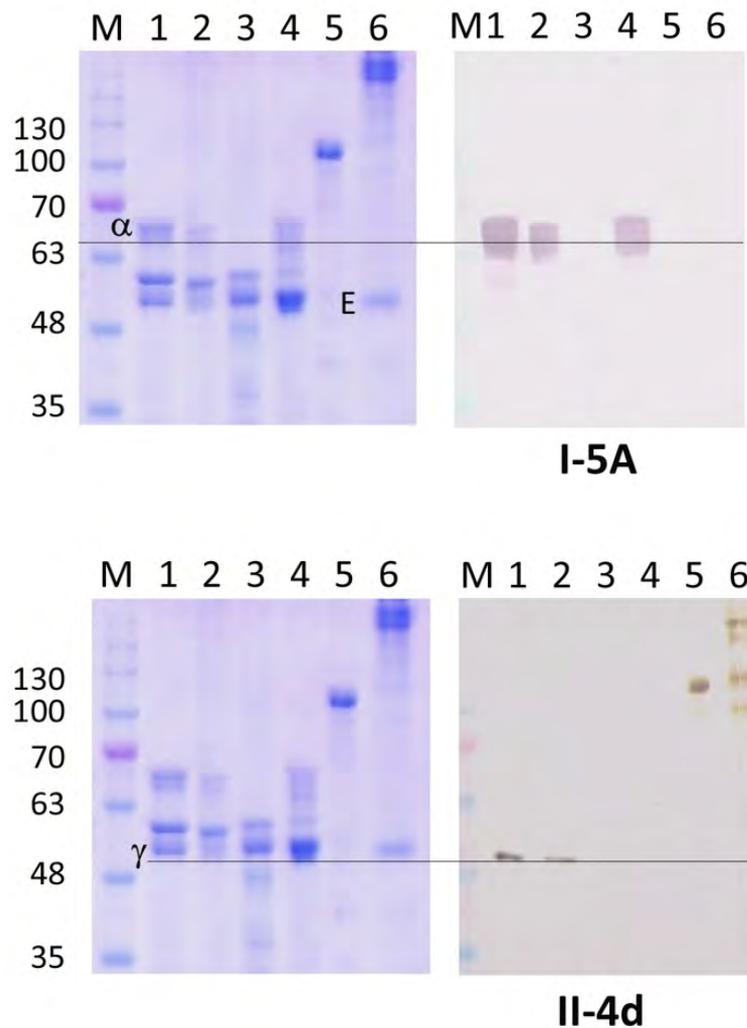


Рис. 5.26. Вестерн-блот аналіз зв'язування АТ II-4d та I-5A з відновленим фібриногеном (1), відновленим фібрином desAB (2), відновленим фібрином desAB-desA α 414-610 (3), відновленим фібрином desAB-desB β 1-42 (4), D-фрагментом (5) та DDE-комплексом (6). М-маркери молекулярної маси.

Таблиця 5.6

Характеристика моноклональних АТ, придатних для використання в тест-системі для виявлення розчинного фібрину як tag-АТ

№	Кодування	Специфічність		Ізотип
		Ланцюг	Епітоп	
1	II-4d	γ	86-240	IgG2a
2	I-5A	α	509-610	IgG2a
3	I-3C	β	122-134	IgG2a

Ми припустили, що АТ I-5A розпізнають в плазмі крові лише самі ранні форми розчинного фібрину, у якого плазмін не відщепив С-кінцеву область А α -ланцюга (Рис. 5.27).

Для підтвердження цього припущення моноклональні АТ II-4d та I-5A були біотинильовані та використані в якості tag-АТ в сендвіч ELISA для виявлення деградованого (плазміном) фібрину (рис. 5.28). В якості catch-АТ використали моноклональне АТ I-3C, епітоп якого розташований в В β 122-134 (таблиця 5.6). І дійсно, після часткового гідролізу фібрину плазміном, антитіл I-3C зв'язували всі молекули фібрину не залежно від наявності С-кінцевої області А α –ланцюга, однак лише антитіла II-4d могли виявити весь зв'язаний фібрин, в той час як антитіла I-5A розпізнавали лише ранні форми фібрину, які зберігли α С-регіони і відгук в імуноензимному аналізі був значно нижчим.

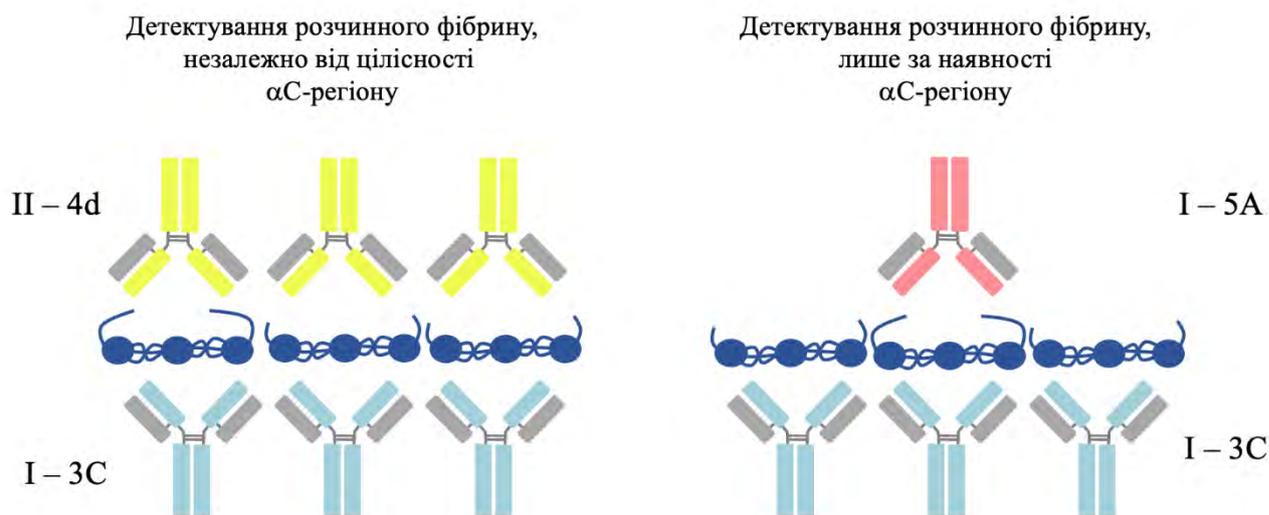


Рис. 5.27. Схема виявлення розчинного фібрину з використанням моноклональних антитіл II-4d та I-5A в якості tag-антитіл.

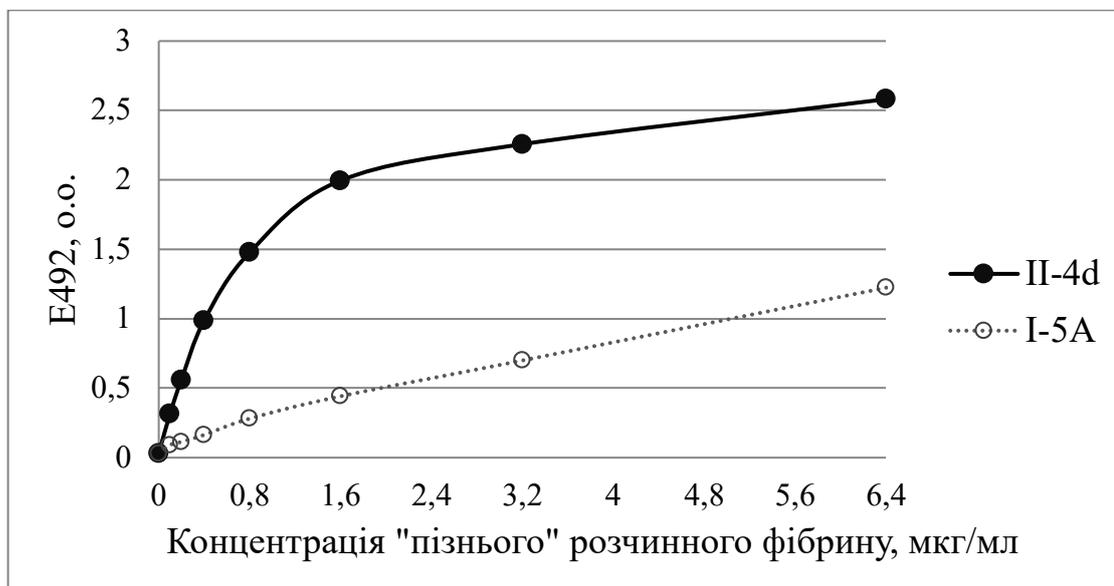


Рис. 5.28. Розпізнавання «пізнього» розчинного фібрину біотинильованими моноклональними tag-АТ II-4d та I-5A; catch-АТ – специфічні до фібрину моноклональні АТ I-3С.

Таким чином, використання моноклональних АТ II-4d або I-5A в якості tag-АТ дає змогу диференціювати ступінь деградації розчинного фібрину та визначити ранній розчинний фібрин.

5.3.3. Підбір умов для ліофілізації tag-антитіла

Для створення тест-системи з метою використання в клініці, необхідним є забезпечення довгого терміну зберігання всіх компонентів, зокрема tag-АТ. Відомо, що найефективніше протеїни зберігаються ліофільно висушеними. Тому, ми поставили за мету підібрати оптимальні умови для ліофілізації АТ. Першим параметром, що впливав на швидкість висушування АТ, і який ми змінювали, була концентрація АТ II-4d. Другим змінним параметром була концентрація стабілізатора – бичачого сироваткового альбумну (BSA).

З використанням ліофілізованих tag-АТ та еталонних tag-АТ, які зберігались в розчині за стандартних умов, було визначено концентрацію розчинного фібрину в плазмі крові здорових донорів та пацієнтів. На рис. 5.29. представлено порівняння концентрації розчинного фібрину, визначеної з використанням еталонних tag-АТ, та концентрації розчинного фібрину,

визначеної з використанням ліофілізованих tag-АТ. Для всіх варіантів умов ліофілізації tag-АТ було визначено достовірність апроксимації (R^2), кутовий коефіцієнт тренду (k) та кут нахилу тренду (α). Було обрано варіант при якому достовірність апроксимації відповідала одиниці, а кут нахилу тренду наближався до 45° (рис. 5. 29, 3): вихідна концентрація 0,6 мг/мл та вміст БСА в якості стабілізатора 0,25%.

Таким чином, було підібрано умови для висушування tag-АТ П-4d і показано, що після розчинення вони працюють в тест-системі для визначення розчинного фібрину як еталонні АТ з розчину.

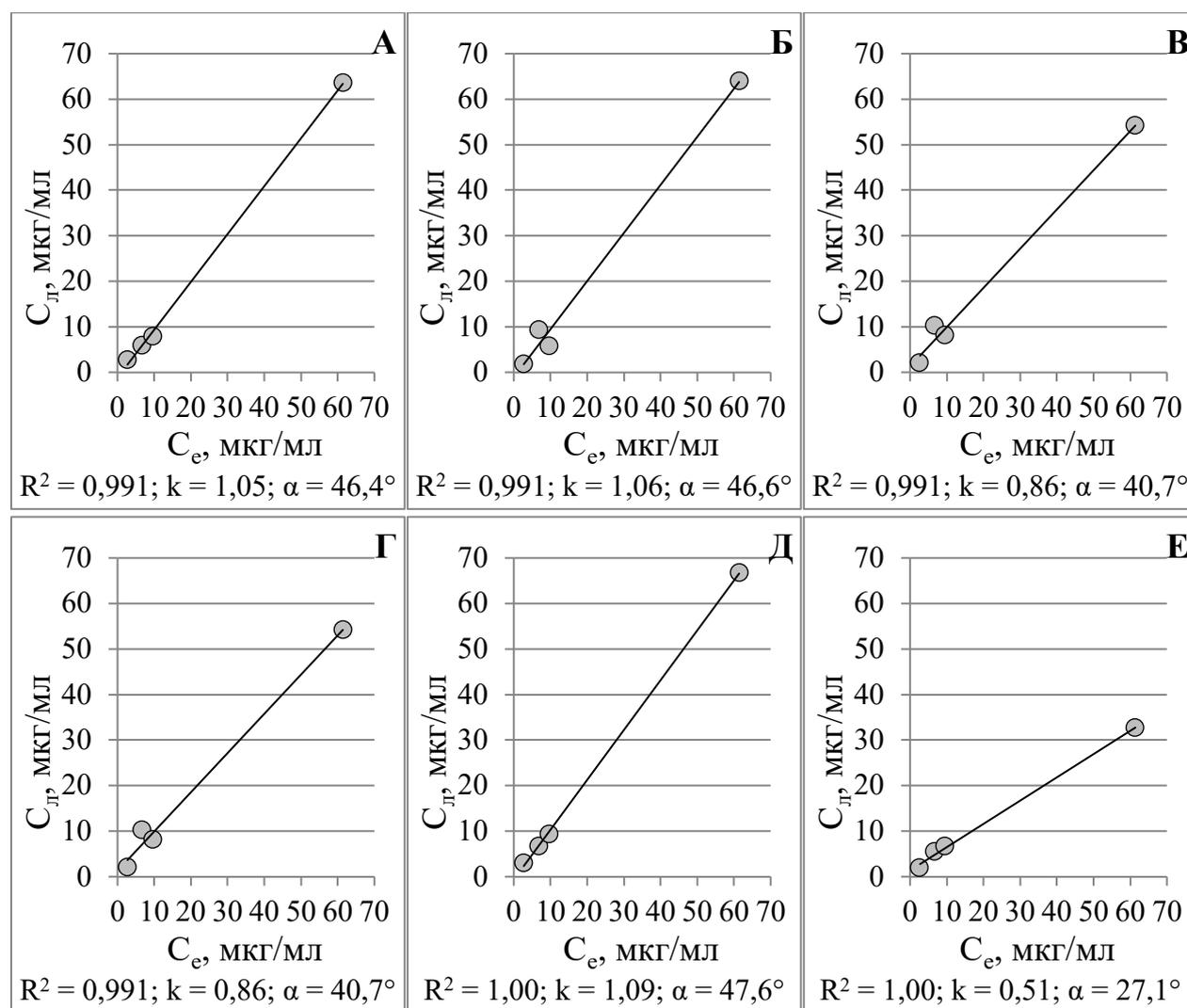


Рис. 5.29 (початок). Порівняння концентрації розчинного фібрину, визначеної з використанням еталонних tag-АТ (C_e) та концентрації розчинного фібрину, визначеної з використанням ліофілізованих tag-АТ ($C_{л}$).

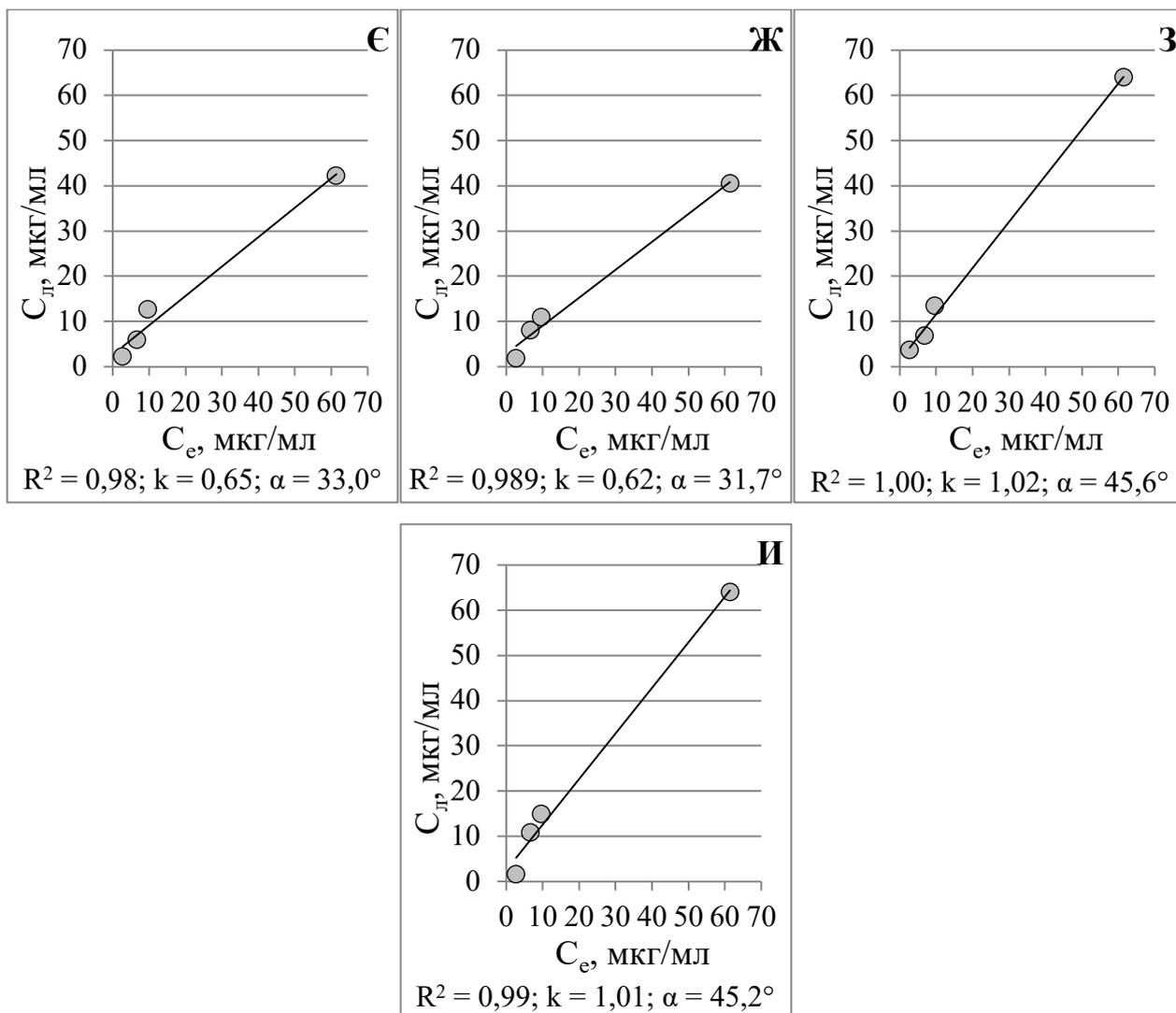


Рис. 5.29 (продовження). Порівняння концентрації розчинного фібрину, визначеної з використанням еталонних tag-АТ (C_e) та концентрації розчинного фібрину, визначеної з використанням ліофілізованих tag-АТ ($C_{л}$) без використання стабілізаторів (А, Е), з використанням в якості стабілізатора 0,05% БСА (Б, Є), 0,1% БСА (В, Ж), 0,25% БСА (Г, З), 0,5% БСА (Д, И). Ліофілізація tag-АТ проводили з розчину 0,3 мг/мл (А-Д) та 0,6 мг/мл (Е-И).

R^2 – достовірність апроксимації (при ідеальній апроксимації $R^2=1$); k – кутовий коефіцієнт тренду (при співпадінні результатів аналізу $k=1$); α – кут нахилу тренду (при співпадінні результатів аналізу $\alpha=45^\circ$).

5.3.4 Апробація імуноензимних тест-систем для кількісного аналізу розчинного фібрину для діагностики загрози тромбоутворення.

Було вироблено дослідні зразки тест-систем для визначення розчинного фібрину. Було адаптовано під використання в рутинній клінічній діагностиці протокол побудови калібрувальної кривої для визначення зазначеного маркера та розроблено електронний шаблон на основі програмного забезпечення Microsoft Excel, для обрахунку результатів тесту.

Було проведено апробацію тест-системи для визначення концентрації розчинного фібрину в плазмі крові пацієнтів на базі ДУ «Національний інститут хірургії та трансплантології ім. О.О. Шалімова» НАМН України (Акт про клінічну апробацію – **Додаток Н**) та на базі ДУ «Інститут гематології та трансфузіології НАМН України» – **Додаток О**).

В процесі апробації тест-системи виявилось, що обрахунок результатів з використанням калібрувальної кривої, що апроксимується квадратичною функцією, викликає складнощі у медичного персоналу. Тому спільно з ліцеїсткою наукового Ліцею № 142 м. Києва Катериною Фроловою додатково було розроблено програмне забезпечення для обрахунку результатів тесту, що враховує розведення зразку плазми крові та функцію тренду калібрувальної кривої (рис. 5.30).

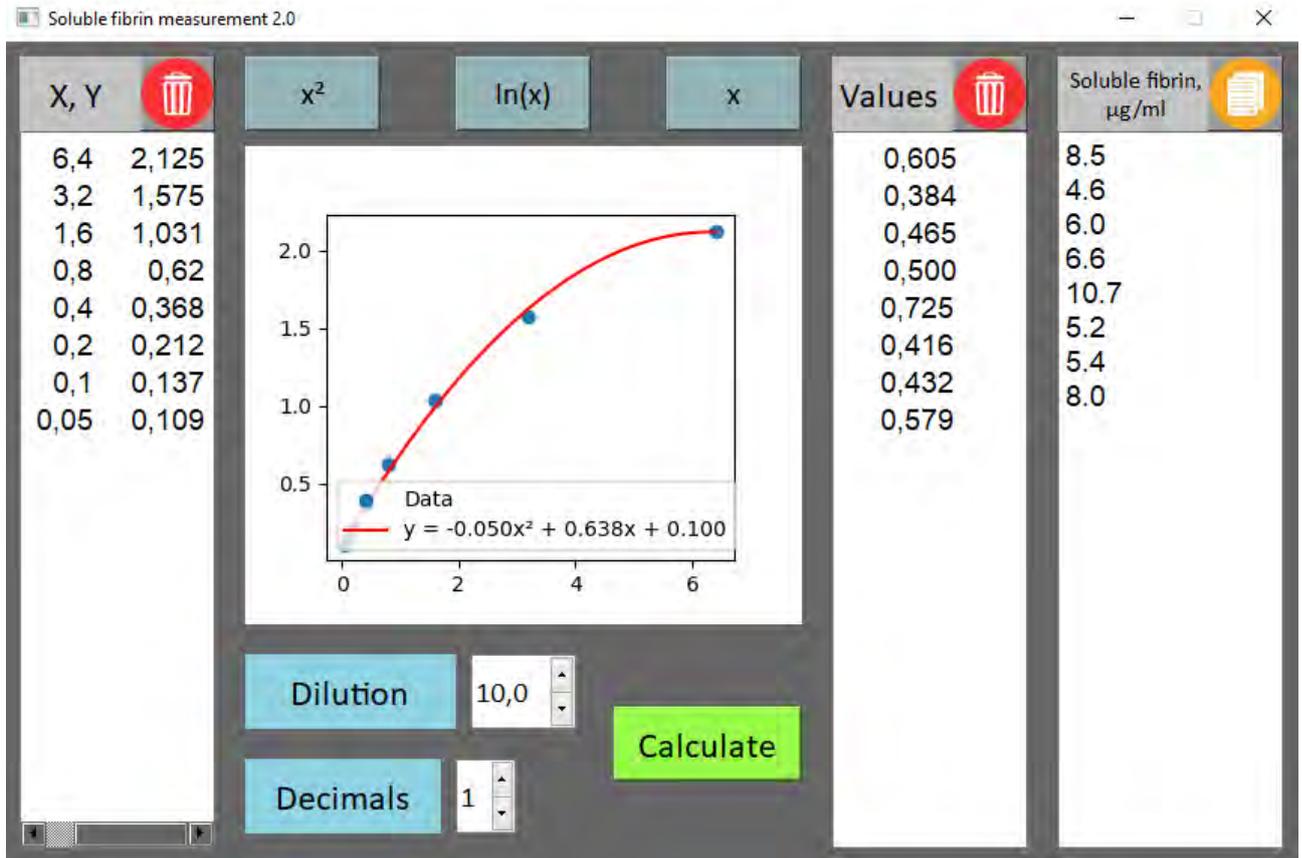


Рис. 5.30. Інтерфейс програмного забезпечення для обрахунку результатів тесту за квадратичним трендом калібрувальної кривої.

Таким чином, запропоновані модифікації складу та проведення аналізу дозволили оптимізувати дослідний зразок тест-системи для визначення концентрації розчинного фібрину для його ефективного використання в умовах діагностичної лабораторії.

Подяка

Автор висловлює щире подяку к.б.н. Корчинському Олександрю Геннадійовичу за допомогу в створенні рекомбінантного протеїну С; Костюченко Олені Перівні за допомогу в розробці та удосконавленні імуноензимних тест-систем; Фроловій Катерині Артемівні за написання програмного забезпечення для обробки результатів тесту.

Висновок до розділу 5

Поява претромбіну-1 та розчинного фібрину, зниження вмісту протеїну С було обрано як потенційні маркери появи тромбіну в кровотоці, що можуть бути виявленими методами лабораторної діагностики. Розроблено методи кількісного визначення претромбіну-1 що базується на протиставленні результатів активації протромбіну і його похідних до тромбіну екамуліном (екзогенним активатором протромбіну) та активації інтактного протромбіну через каскад зсідання тромбомодуліном. Продемонстровано ефективність запропонованого методу на плазмах крові пацієнтів. Отримано бібліотеку антитіл, специфічних до протену С та на їх основі розроблено імуноензимний метод визначення концентрації протеїну С в плазмі крові. Удосконавлено імуноензимну тест-систему для визначення концентрації розчинного фібрину в плазмі крові людини. Зокрема, запропоновано спосіб стандартизації калібраторів, підібрано умови ліофілізації вторинних антитіл, розроблено програмне забезпечення для обробки результатів тесту.

Матеріали розділу представлені в публікаціях [4, 18, 19, 21, 24, 28, 31, 37, 38, 41] **Додатку А.**

РОЗДІЛ 6. ВИЗНАЧЕННЯ ОЗНАК ВНУТРІШНЬОСУДИННОЇ ГЕНЕРАЦІЇ ТРОМБІНУ ЗА МОДЕЛЮВАННЯ ПАТОЛОГІЧНИХ СТАНІВ У ТВАРИН

Тромбін є одним із протеїнів, що опосередковує взаємодію системи гемостазу та імунної системи. Насамперед, тромбін стимулює клітини імунної системи шляхом активації PAR-1 та PAR-4. Крім того, розщеплення PAR-1 посилює TLR3-опосередковану противірусну відповідь. Тромбін через активацію PAR також стимулює руху Т-лімфоцитів, вивільнення прозапальних цитокінів (інтерлейкінів 6 та 8, простагландіна E2). Окрім того, експресія моноцитами тканинного фактора запускає каскад зсідання та утворення тромбіну, вивільнення нейтрофільних екстрацелюлярних пасток (NETs) створює негативно заряджену поверхню, на якій проходить збірка активаційних комплексів системи зсідання крові, зокрема протромбінази. Все це посилює тромбіноутворення [6]. Таким чином, запалення різного генезу може викликати збільшення прокоагулянтного потенціалу, появу тромбіну, а іноді – призводити до тромбозів.

В розділі 5 нами було обґрунтовано вибір маркерів появи тромбіну в плазмі крові та розроблено методи кількісної детекції Пре-1 і пС, а також було удосконалено кількісний метод виявлення розчинного фібрину в плазмі крові людини. Для доведення інформативності цих маркерів нами було розроблено моделі запалення на тваринах, за яких спостерігається порушення системи гемостазу.

Оскільки метод виявлення розчинного фібрину за допомогою ELISA розпізнає розчинний фібрин людини, а не інших ссавців, як аналог було використано метод визначення розчинних фібрин-мономерних комплексів (РФМК), розроблений В.О. Беліцером і Т.В. Варецькою, що базуються на реакції паракоагуляції в присутності фосфатних буферів. Метод є напівкількісним.

Для визначення вмісту пС в плазмі крові тварин використовували амідолітичний метод визначення активності пС за розщепленням хромогенного субстрату S2366, за умов активації пС в плазмі крові екзогенним активатором.

Результати виражали у відсотках, відносно активності пС визначеної в плазмі крові контрольних тварин.

6.1. Модель променевої хвороби

Одним з основних результатів гострого радіаційного опромінення є запальна реакція. Променева хвороба призводить до продукування численних прозапальних цитокінів та активних форм кисню, що робить запалення прямим наслідком опромінення. Раніше ми досліджували основні параметри зсідання крові опромінених щурів і показали, що напівлетальна доза опромінення призводила до підвищення протромботичного потенціалу, зокрема до скорочення часу зсідання плазми крові в тесті АЧТЧ та підвищення рівню фібриногену. [78].

На моделі променевої хвороби у щурів було перевірено інформативність обраних нами маркерів появи тромбіну в кровотоці. Щурів було поділено на 3 групи. Група 1 була опромінена. Група 2 була опромінена на фоні терапії ентеросорбентами (ЕС). ЕС є ефективним протизапальним засобом при гострій променевої хвороби, тому ця група була позитивним контролем. Група 3 не опромінювалась і була контрольною групою здорових щурів.

Ми відмітили тенденцію до підвищення концентрації фібриногену в плазмі крові опромінених щурів ($4,2 \pm 0,6$ мг/мл порівняно з $3,2 \pm 0,3$ мг/мл у контролі), що вказує на розвиток запального процесу. Прийом ЕС помірно запобігав збільшенню концентрації фібриногену після опромінення ($3,8 \pm 0,6$ мг/мл).

На фоні запального процесу після опромінення ми виявили значне достовірне збільшення концентрації РФМК (рис. 6.1, А) та концентрації Пре-1 (рис. 6.1, Б). При цьому, рівень пС достовірно знижувався, тобто при запаленні, спричиненому опроміненням, відбувалось споживання пС (рис. 6.1, В).

В той же час, при терапії ЕС, тобто при зменшенні запального процесу, концентрація РФМК та рівень пС нормалізувались. Концентрація Пре-1 повністю не нормалізувалась, але спостерігали тенденцію до зниження рівню цього параметру. Враховуючи ефективність ентеросорбції для зняття гострого

запалення за променевої хвороби, можна стверджувати, що накопичення маркерів появи тромбіну сигналізувало саме про гострий запальний процес.

Таким чином, ми спостерігали появу запропонованих маркерів утворення тромбіну в плазмі крові, що відображало реакцію системи зсіання крові на гострий запальний процес та нормалізацію цих параметрів при лікуванні запалення.

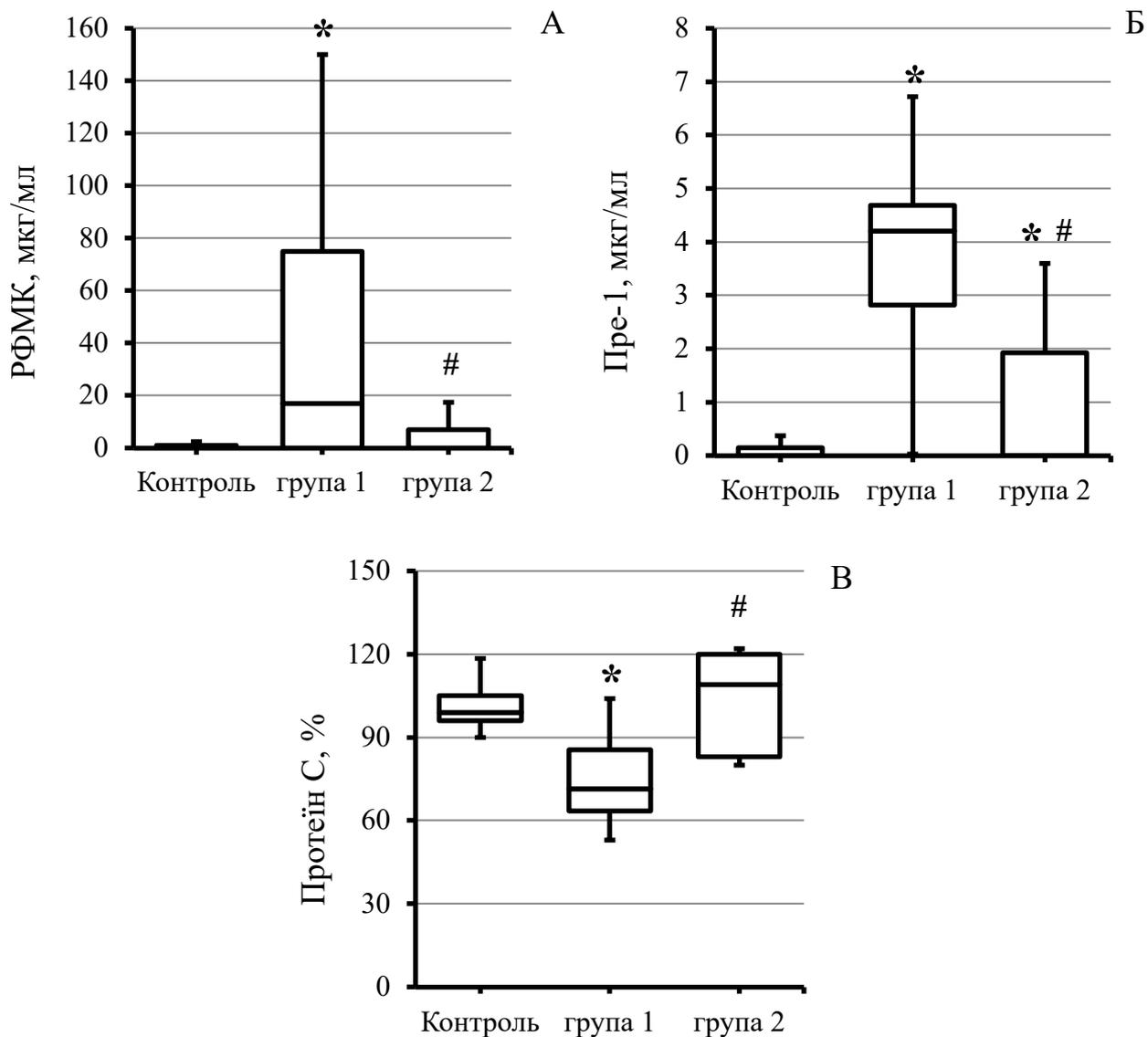


Рис. 6.1. Концентрація розчинних фібрин-мономерних комплексів (А), претромбіну-1 (Б) та протеїну С (В) в плазмі крові щурів після опромінення (група 1, n = 9), після опромінення на фоні терапії ентеросорбентами (група 2, n = 5). Контроль – не опромінені щури (група 3, n = 5).

* – за тестом Манна-Уїтні результат достовірний при $p < 0,05$, порівняно з контролем.

– за тестом Манна-Уїтні результат є значущим при $p < 0,05$, порівняно з групою опромінених.

6.2. Модель гострого запалення

Однією з розповсюджених моделей системного запалення є ліпополісахарид-індуковане запалення [159]. Ліпополісахариди (LPS) – це ендотоксини, що є основним компонентом клітинної стінки бактерій та виділяються грамнегативними бактеріями, такими як *Escherichia coli*, *Salmonella sp.*, *Porphyromonas sp.* і *Helicobacter sp.* Потрапляючи в кровообіг, LPS чинить виражену стимулюючу дію на імунну систему, а LPS-опосередкована передача сигналів може спричинити низку патологій, включаючи нейродегенеративні, метаболічні та серцево-судинні захворювання. LPS зв'язується переважно з TLR4 опосередковано через LPS-зв'язуючий протеїн та CD14 рецептор. LPS, який потрапляє до цитоплазми, розпізнається та активує неканонічний запальний шлях. Таким чином, LPS значно посилює відповідь господаря, що призводить до індукції експресії цитокінів і хемокінів, спричиняючи системне гостре запалення.

Нами було використано модель введення LPS мишам для перевірки інформативності маркерів появи тромбіну в кровотоці при запаленні. Мишей було розділено на дві групи по 12 тварин в кожній. Мишам групи 1 (досліджувані тварини) внутрішньоочеревинно вводили LPS, мишам групи 2 (контрольні тварини) – еквівалентний об'єм 0,9 % розчину NaCl. Зразки крові мишей відбирали на 2-й день після ін'єкції.

У плазмі крові піддослідних тварин виявлено достовірне підвищення концентрації фібриногену в чотири рази (до $4,25 \pm 1,15$ мг/мл порівняно з $1,35 \pm 1,25$ мг/мл у контрольній групі), що характерно для такого важкого запалення, спричинений ін'єкцією LPS.

На рисунку 6.2 представлено дані щодо появи маркерів утворення тромбіну в кровотоці мишей за LPS-індукованого запалення. У мишей на фоні запального процесу виявили статистично значуще підвищення рівню РФМК та Пре-1, зниження вмісту пС було достовірне й іноді досягало 35%.

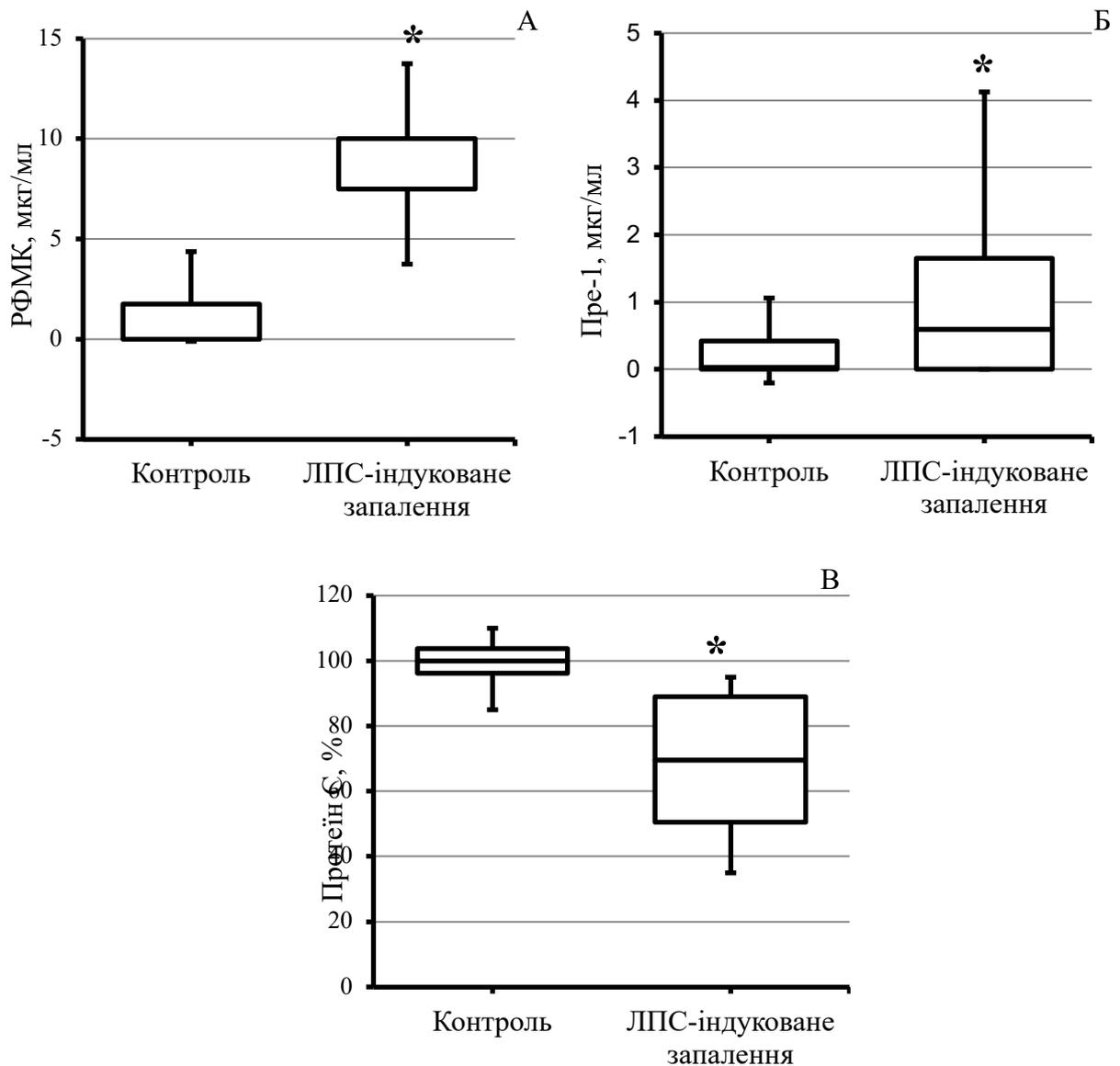


Рис. 6.2. Концентрація розчинних фібрин-мономерних комплексів (А), претромбіну-1 (Б) та протеїну С (В) в плазмі крові мишей, яким індукували запалення LPS (n = 12). Контроль – миші, яким вводили 0,9 % розчину NaCl (n = 12).

* – за тестом Мана-Уїтні результат достовірний при $p < 0,05$ порівняно з контролем.

Отже, при LPS-індукованому запаленні, як і у випадку з запаленням, спричиненим опроміненням, запальний процес провокував активацію системи зсідання крові, яку виявляли запропонованими маркерами утворення тромбіну.

Таким чином, поява РФМК та Пре-1, а також зниження вмісту пС можуть бути інформативними маркерами ризику внутрішньосудинного тромбоемболізму.

6.3. Модель інсулінорезистентності з врахуванням вікового параметру

Діабет є патологією, за якої спостерігається дисфункція ендотелію судин, що призводить до порушення роботи системи гемостазу. Інтактний ендотелій утримує систему зсідання крові від активації завдяки експонуванню тромбомодуліну та гепарину. За ендотеліальної дисфункції спостерігається дисбаланс про- та анти-коагулянтних ланок гемостазу завдяки зниженню внеску антикоагулянтного впливу ендотелію судин.

Тому, нами було обрано модель інсулінорезистентності (ІР) на щурах [160]. Щурів було розділено на 4 групи. Контрольна група зрілих щурів (віком шість місяців, $n = 4$) та контрольна група «старих» щурів (вік понад 12 місяців, $n = 5$) споживали стандартний корм. Дослідна група 6-місячних щурів ($n = 8$) та дослідна група 1-річних щурів ($n = 8$) споживали крім стандартного корму суміші свинячого та яловичого вісцерального жиру, що провокувало розвиток ІР та ожиріння. Наявність діабету та ожиріння підтверджували, контролюючи масу тіла щурів, та за результатами тесту на толерантність до глюкози.

У дослідних щурів 6-місячного віку спостерігали підвищення концентрації фібриногену (таблиця 6.1). Контрольні щури обох вікових груп по рівню фібриногену та інших показниках системи гемостазу не відрізнялись, тому їх в подальшому об'єднали в загальну контрольну групу.

Таблиця 6.1

Концентрація фібриногену в плазмі крові щурів з індукованим діабетом,
мг/мл

Вікові групи	Контрольні групи	Дослідні групи
6 місяців	$1,9 \pm 0,2$	$4,8 \pm 3,3$
Понад 12 місяців	$2,0 \pm 0,3$	$1,8 \pm 0,4$

У контрольних щурів та щурів з ІР в різних вікових групах було визначено маркери появи тромбіну в плазмі крові. Як видно з рисунку 6.3, у всіх щурів з ІР

спостерігали появу маркерів утворення тромбіну. Достовірним відносно здорових щурів (контрольної групи) було підвищення рівню РФМК та зниження вмісту пС. Крім того, була тенденція до підвищення концентрації Пре-1. Цікаво, що суттєвих відмінностей у зміні маркерів появи тромбіну між віковими групами не спостерігалось.

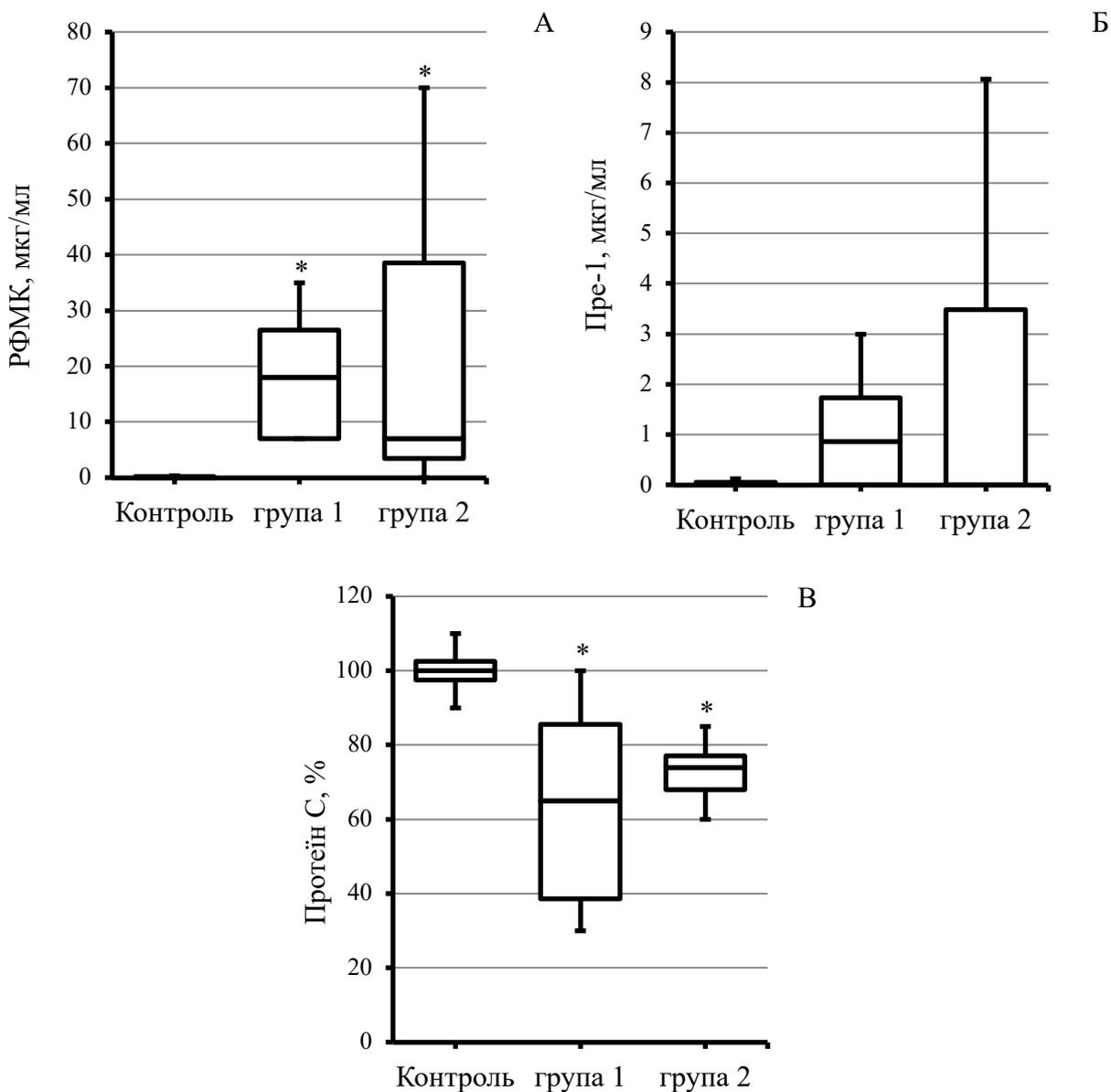


Рис. 6.3. Концентрація РФМК (А), претромбіну-1 (Б) та вміст протеїну С (В) в плазмі крові здорових щурів (Контроль, n = 9), щурів 6-місячного віку з індукованим діабетом (група 1, n = 8) та щурів віком понад 12-місяців з індукованим діабетом (група 2, n = 8).

* – за тестом Манна-Уїтні результат достовірний при $p < 0,05$, порівняно з контролем.

Отже, за інсулінорезистентності відповідь системи зсідання крові може бути детектована за допомогою таких маркерів появи тромбіну як підвищення концентрації РФМК (аналог розчинного фібрину), підвищення концентрації Пре-1 та зниження вмісту протеїну С.

Висновок до розділу 6

В моделях *in vivo* на тваринах показано, що запропоновані нами маркери появи тромбіну, а саме підвищення концентрації розчинного фібрину, претромбіну-1 та зниження вмісту протеїну С, з'являються в кровотоці при моделюванні гострого та хронічного запалення, тобто станів, пов'язаних з порушенням роботи системи гемостазу. Водночас, при терапії, що нівелює патологічні прояви (введення ентеросорбентів при радіаційному синдромі), зазначені параметри нормалізуються, тобто є чутливими до важкості прояву патології.

Матеріали розділу представлені в публікаціях [5, 28] Додатку А.

РОЗДІЛ 7. РАЦІОНАЛЬНА МОЛЕКУЛЯРНА ДІАГНОСТИКА ПАТОЛОГІЧНИХ СТАНІВ, ПОВ'ЯЗАНИХ З ВНУТРІШНЬОСУДИННОЮ ГЕНЕРАЦІЄЮ ТРОМБІНУ

В розділі 5 нами було обґрунтовано вибір параметрів системи гемостазу, що відображають внутрішньосудинну активацію системи зсідання крові загалом та появу тромбіну, зокрема. В розділі 6 на прикладах індукованого запалення різного генезу та індукованого порушення обміну речовин у тварин було доведено інформативність обраних параметрів.

На наступному етапі ми поставили за мету верифікувати зроблені висновки за допомогою клінічних даних і визначити інформативність тестів для детекції розчинного фібрину, претромбіну-1 та вмісту протеїну С для діагностики порушень системи гемостазу за різних патологічних станів у людини.

7.1 Діагностика системи гемостазу за COVID-19

Коронавірусна хвороба 2019 (COVID-19), як і інші вірусні пневмонії, сильно впливає на систему гемостазу [161, 162]. Основними ускладненнями COVID-19 є тромбоз, коагулопатія та дисеміноване внутрішньосудинне зсідання крові [163-166]. Дослідження пацієнтів із захворюванням на COVID-19 демонструють, що підвищений рівень циркулюючого D-димеру пов'язаний зі збільшенням рівня смертності. З початку пандемії визначення рівню D-димеру стало основним параметром оцінки ризику тромбозу [167]. Тим не менш, підвищення рівню D-димеру має місце як при тромбозах, так і при кровотечах [168]. Такими параметрами гемостазу є підвищення рівню фібриногену та фактора VIII [169, 170], поява розчинних фібрин-мономерних комплексів [171] або протромбінового фрагменту F1+2 [166, 172].

Ці параметри стану системи зсідання крові можуть бути інформативними маркерами для оцінки стану системи гемостазу під час COVID-19. Тим не менш, інші параметри, такі як міжнародне нормалізоване відношення (МНВ),

активований частковий тромбoplastиновий час (АЧТЧ), кількість/ступінь агрегації тромбоцитів або рівень протеїну С (пС) також мають діагностичне значення [173].

Таким чином, вивчення порушень гемостазу під час COVID-19 є важливим як для виживання пацієнтів, так і для розуміння механізмів взаємодії коагуляції та запалення при цій патології.

Увага вчених і лікарів була прикута переважно до методів лікування COVID-19. Однак така сильна активація коагуляції, яка спостерігається під час патології, може призвести до тривалого дисбалансу між коагуляційною та антикоагуляційною системами, що може становити серйозну небезпеку для здоров'я пацієнтів з постковідною хворобою.

Тому ми зосередилися на аналізі молекулярних маркерів активації системи гемостазу в плазмі крові пацієнтів, які одужали після COVID-19. Ми порівняли маркери появи тромбіну в плазмі крові пацієнтів з постковідною хворобою (n=191) двох груп, відповідно до факторів ризику (група з низьким ризиком ускладнень – ГНР та група з високим ризиком ускладнень – ГВР), за шкалою часу після одужання (1 місяць, 2 місяці, 3 місяці) та відповідно до стадій захворювання на COVID-19 у пацієнтів ГВР (рис. 2.1). В якості контролю було використано плазму крові здорових серонегативних добровольців (референтна група – РГ, n=19).

У пацієнтів після перенесеного COVID-19 рівень фібриногену, як протеїну гострої фази запалення, залишався підвищеним впродовж трьох місяців після одужання (таблиця 7.1) Водночас у пацієнтів ГВР рівень фібриногену зростав впродовж другого місяця після коронавірусної інфекції, відповідно до стадії перенесеного захворювання.

Таблиця 7.1

Концентрація фібриногену у пацієнтів, що перенесли COVID-19 (група з низьким ризиком ускладнень – ГНР та група з високим ризиком ускладнень – ГВР) та референтної групи

Група пацієнтів	Важкість перенесеного захворювання	Рівень фібриногену, мг/мл	
		медіана	середнє±стандартне відхилення
ГНР	-	2,2	2,3±0,9
ГВР	легка	2,4	2,4±0,7
	середня	3,5*#	3,6±0,9
	важка і критична	4,2*#	4,1±0,7
Референтна група	-	2,0	1,9±0,5

* – за тестом Манна-Уїтні результат достовірний при $p < 0,05$, порівняно з РГ.

– за тестом Манна-Уїтні результат достовірний при $p < 0,05$, порівняно з ГНР.

У плазмі крові обох груп (ГНР, ГВР) пацієнтів було виявлено розчинний фібрин (рис. 7.1, А), його концентрація була достовірно вищою, ніж у плазмі крові пацієнтів РГ. Концентрація розчинного фібрину в плазмі крові пацієнтів з ГВР залишалася високою протягом тривалого часу після одужання (рис. 7.1, Б). У пацієнтів з ГНР концентрація цього маркера була близькою до референтного діапазону протягом 1-го місяця після одужання, але була значно підвищена в 3,3 рази після 2-го місяця (рис. 7.1, В).

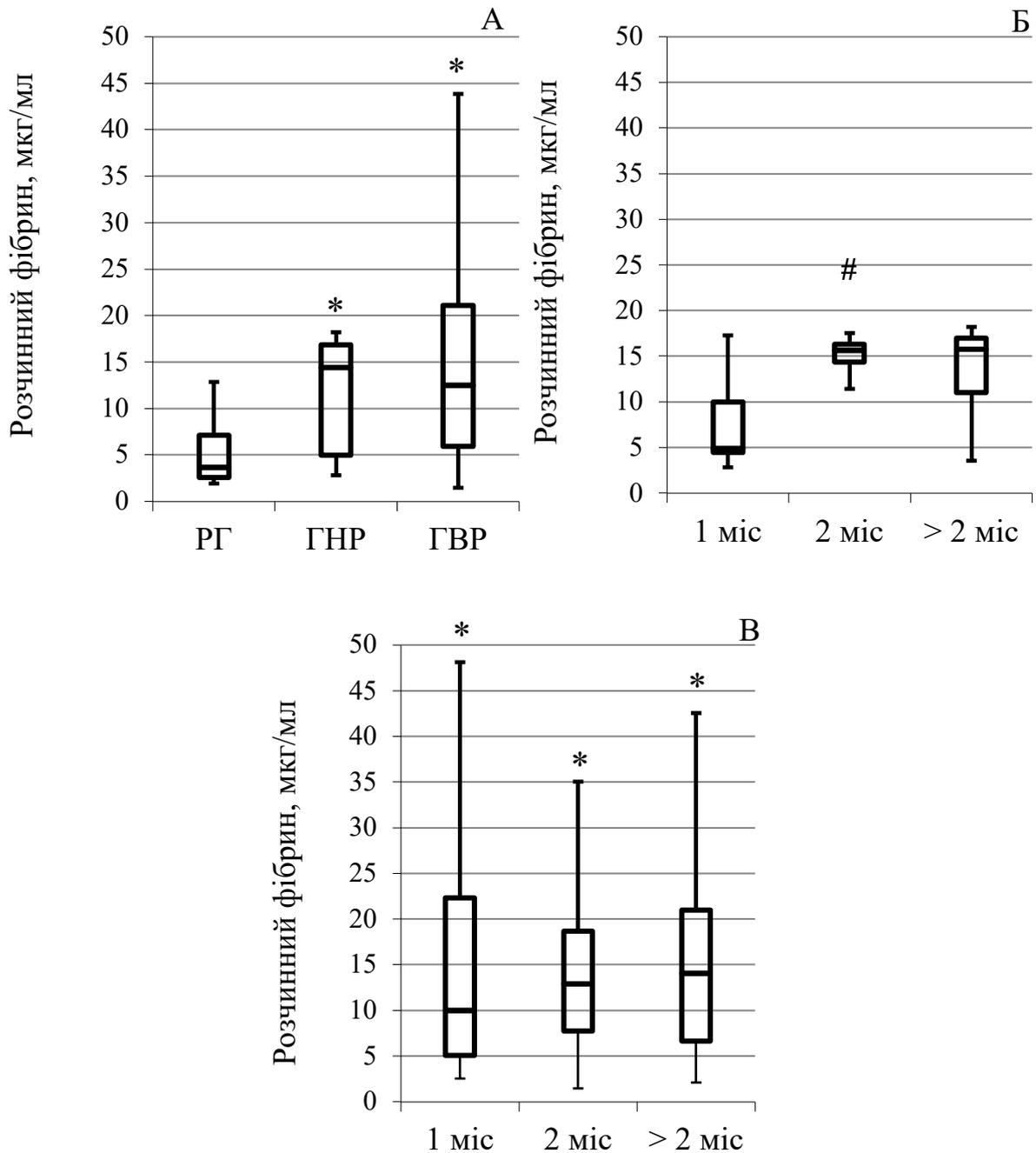


Рис. 7.1. Рівень розчинного фібрину у плазмі крові донорів референтної групи (РГ, n = 19) та пацієнтів групи низького ризику (ГНР, n = 28) і групи високого ризику (ГВР, n = 161) загалом (А) і в часі після одужання в ГНР (Б, 1 місяць, 2 місяць, >2 місяць) і ГВР (В, 1 місяць, 2 місяць, >2 місяць).

* – за тестом Манна-Уїтні результат є достовірним при $p < 0,05$, порівняно з РГ .

– за тестом Манна-Уїтні результат є достовірним при $p < 0,05$, порівняно з групою «1 місяць».

Підвищення концентрації розчинного фібрину в плазмі крові пацієнтів ГВР впродовж першого місяця після одужання залежало від важкості перенесеного захворювання на COVID-19 (рис. 7.2). Слід зазначити, що у 94 % пацієнтів із захворюваннями органів дихання та у 96 % хворих із серцево-судинними захворюваннями виявлено підвищену концентрацію розчинного фібрину.

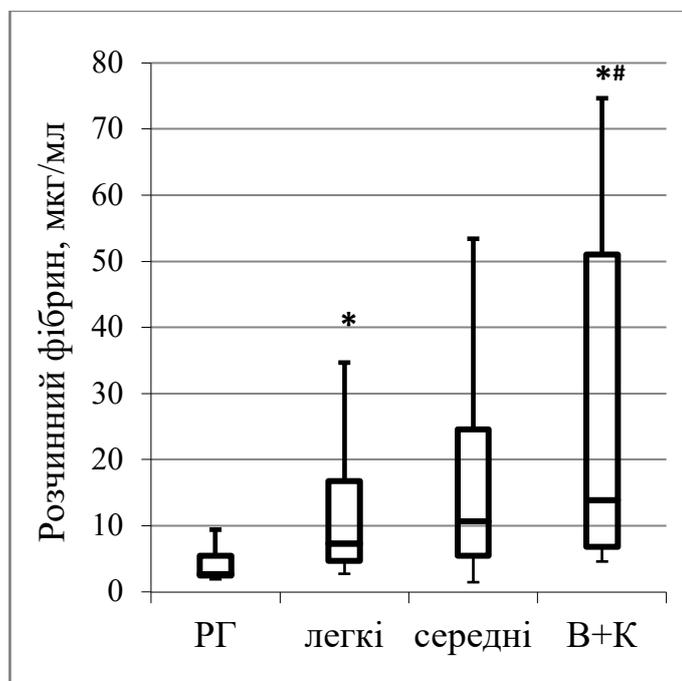


Рис. 7.2. Рівень розчинного фібрину у плазмі крові пацієнтів групи високого ризику ускладнень відповідно до важкості перенесеного захворювання на COVID впродовж першого місяця після одужання. (легкий n=30, помірний n=36, важкий та критичний n=19). В+К – важкий і критичний. РГ – референтна група.

* – за тестом Манна-Уїтні результат достовірний при $p < 0,05$, порівняно з референтною групою.

– за тестом Манна-Уїтні результат достовірний при $p < 0,05$, порівняно з групою легкої стадії хвороби.

Показано, що концентрація Пре-1 була високою в плазмі крові пацієнтів як у групі ГНР, так і в ГВР (рис. 7.3, А). Ми продемонстрували тенденцію до зниження концентрації Пре-1 через два місяці після одужання в плазмі крові пацієнтів як з ГНР, так і з ГВР. Однак, у плазмі крові пацієнтів з ГНР вміст Пре-1

все ще був високим через два місяці після одужання (рис. 7.3. Б, В). У плазмі крові хворих на ГВР рівень Пре-1 підвищувався, відповідно до важкості перенесеного захворювання на COVID-19, впродовж місяця після одужання, а в плазмі крові пацієнтів важкої та критичної груп був у 10 разів (за медіанним значенням) вищий, порівняно з пацієнтами легкої групи (рис. 7.4).

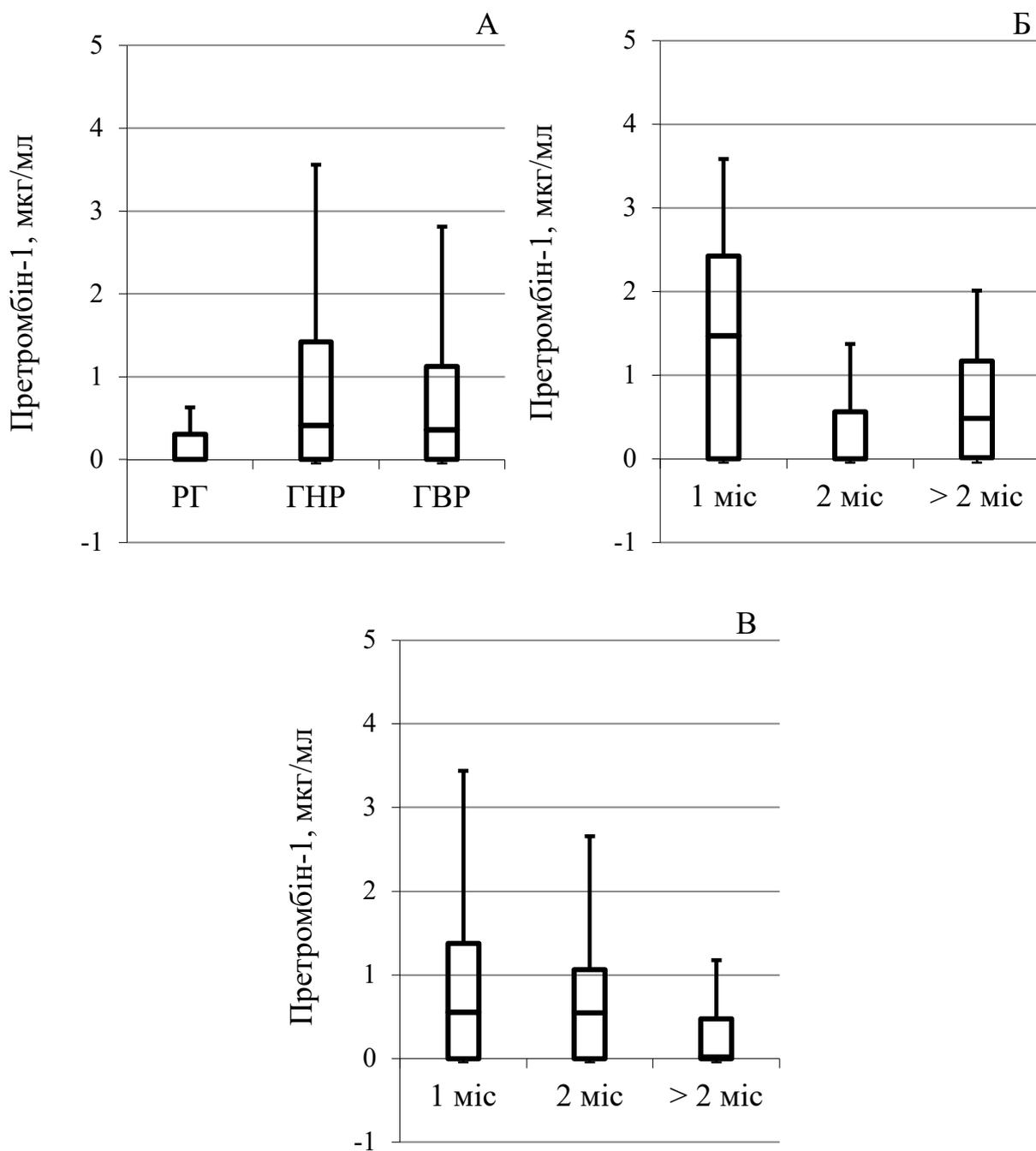


Рис. 7.3. Рівень претромбіну-1 у плазмі крові донорів референтної групи (РГ, n = 19) та пацієнтів групи низького ризику (ГНР, n = 28) і групи високого ризику (ГВР, n = 161) загалом (А) і в часі після одужання в ГНР (Б, 1 місяць, 2 місяць, >2 місяць) і ГВР (В, 1 місяць, 2 місяць, >2 місяць).

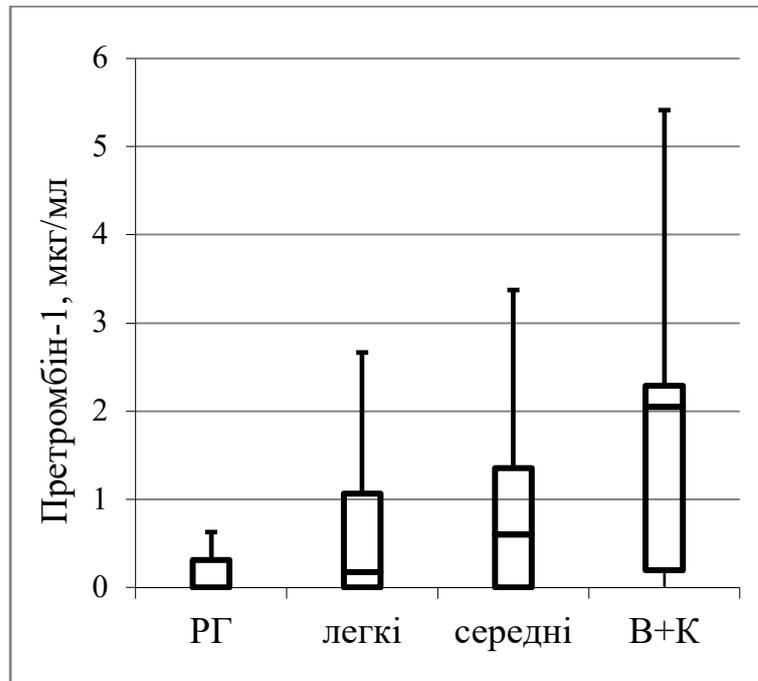


Рис. 7.4. Рівень претромбіну-1 у плазмі крові пацієнтів групи високого ризику ускладнень впродовж першого місяця після одужання, відповідно до важкості перенесеного захворювання на COVID-19: (легкий n=56, помірний n = 67, важкий та критичний n = 38). В+К – важкий і критичний.

Рівень пС був знижений у плазмі крові 11 % пацієнтів з постковідною хворобою, зокрема у 20 % пацієнтів ГНР та у 9 % пацієнтів ГВР (рис. 7.5, А). У плазмі крові хворих ГВР рівень пС достовірно нормалізувався більше ніж через 2 місяці після одужання (рис. 7.5, В). Рівень пС також майже не залежав від важкості перенесеного захворювання. Лише в групі важких і критичних хворих ГВР рівень пС достовірно знижувався, порівняно з пацієнтами з легким перебігом захворювання (рис. 7.6).

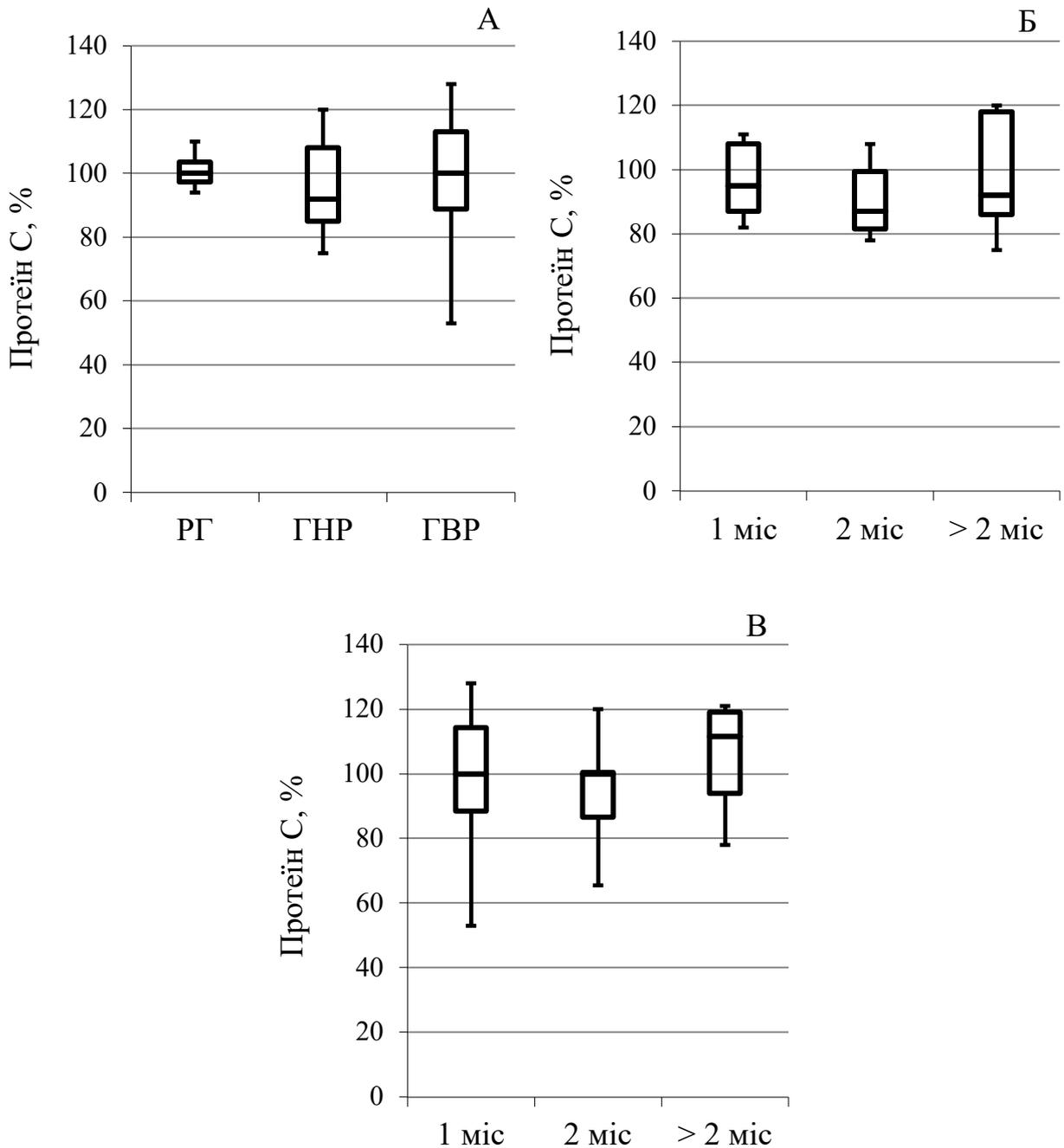


Рис. 7.5. Рівень протеїну С у плазмі крові донорів референтної групи (РГ, n = 19) та пацієнтів групи низького ризику (ГНР, n = 28) і групи високого ризику (ГВР, n = 161) загалом (А), а також у часі – після одужання в ГНР (Б, 1 місяць, 2 місяць, >2 місяць) і ГВР (В, 1 місяць, 2 місяць, >2 місяць).

Отже, у плазмі крові хворих ГВР виявлено достовірно підвищену концентрацію фібриногену, а також спостерігали тенденцію до збільшення кількості розчинного фібрину. Концентрація Пре-1 була високою в плазмі крові пацієнтів як у ГНР, так і ГВР. Кількість пацієнтів із зниженим рівнем пС була

дещо більшою у ГВР. Ці дані свідчать про те, що патологічна активація системи зсідання крові була типовою для пацієнтів з постковідною хворобою у групі пацієнтів з високим ризиком ускладнень і меншою мірою була характерна для пацієнтів групи з низьким ризиком ускладнень.

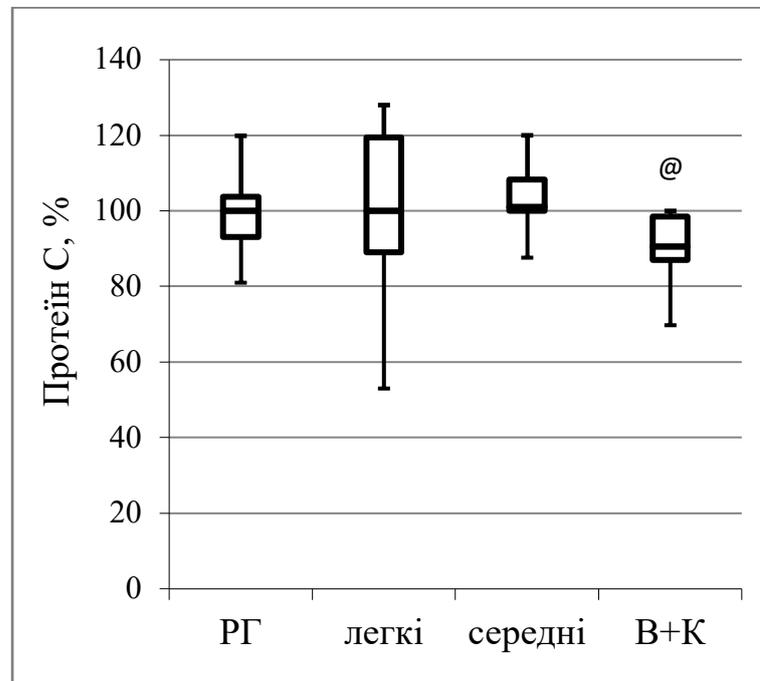


Рис. 7.6. Рівень протеїну С у плазмі крові пацієнтів групи високого ризику ускладнень впродовж першого місяця після одужання, відповідно до важкості перенесеного захворювання на COVID-19: (легкий $n = 56$, помірний $n = 67$, важкий та критичний $n = 38$). В+К – важкий і критичний.

@ – за тестом Манна-Уїтні результат достовірний при $p < 0,05$, порівняно з групою середньої стадії хвороби.

Концентрація розчинного фібрину залишається високою протягом усього часу дослідження ГВР (більше двох місяців). Це свідчить про тривалий дисбаланс гемостазу після перенесеного COVID-19.

У пацієнтів з ГНР ми спостерігали нормальну концентрацію фібриногену та помірний рівень розчинного фібрину на 1-й місяць після одужання. Однак, обидва ці параметри значно зростали через два місяці після одужання в групі ГНР. Це вказує на тривалий вплив COVID-19 на систему зсідання крові та може вказувати на схильність до внутрішньосудинного тромбоутворення.

Водночас, рівні Пре-1 та пС мали тенденцію до нормалізації через два місяці після одужання як у хворихобох груп (ГНР та ГВР), що можна вважати повільною, але певною ознакою стабілізації стану системи гемостазу.

Отримані дані чітко продемонстрували, що важкість перенесеного захворювання на COVID-19 впливає на стан системи зсідання крові пацієнтів ГВР. Ми показали зростання концентрації фібриногену та Пре-1 у пацієнтів з ГВР, відповідно до важкості перенесеного захворювання. Оскільки фібриноген є протеїном гострої фази запалення, його накопичення, очевидно, було пов'язане з важкістю запального процесу, викликаного COVID-19. Пре-1, як продукт гіперактивності тромбіну, вказував на збільшення утворення тромбіну при важкому перебігу захворювання.

Важливо, що активація системи зсідання крові не лише спостерігалася у пацієнтів з COVID-19 під час хвороби та реабілітації, але й зберігалася протягом тривалого періоду після одужання. Ця патологічна активація була більш вираженою в плазмі крові пацієнтів з факторами ризику (спутні захворювання) та важким перебігом COVID-19.

Таким чином, ми дійшли висновку, що моніторинг основних маркерів ризику внутрішньосудинного тромбоутворення є обов'язковим у пацієнтів з постковідною хворобою.

7.2 Діагностика системи гемостазу за ускладненої вагітності

Нормальна вагітність пов'язана з інтенсивним формуванням судинної мережі як зі сторони матері, так і зі сторони плоду, та підготовкою системи гемостазу до крововтрати під час пологів. Тому, нормальна вагітність пов'язана з суттєвими змінами в системі гемостазу, особливо на пізніх етапах.

Тромбоз – одне з найнебезпечніших ускладнень вагітності, яке може вплинути як на здоров'я матері, так і на плід. Це основна причина материнської смертності в розвинених країнах [174]. Раннє виявлення та ефективна профілактика тромбозу глибоких вен і тромбоемболії легеневої артерії є

важливими питаннями під час гестації [175, 176]. Прогноз ризику утворення внутрішньосудинного тромбу під час вагітності базується переважно на клінічних даних, ретроспективному аналізі, визначення генетичних маркерів, тощо. Параметри системи зсідання крові часто не враховуються в сучасних алгоритмах [177].

Відповідно до клінічного протоколу з акушерської допомоги «Ведення вагітності та пологів у жінок з хворобами серця» (Наказ МОЗ України № 42 від 28.01.2011) у жінок з серцево-судинними захворюваннями контролюють лише протромбіновий індекс, навіть при лікуванні гепаринами чи антикоагулянтами непрямої дії. На думку лікарів, безпечніше призначати гепарини вагітним у III триместрі без додаткового аналізу [178]. Було навіть повідомлено, що оцінку тромбофілії не слід проводити у вагітних жінок, оскільки баланс у системі гемостазу під час вагітності зміщується в бік тромбоутворення, що супроводжується зростанням вмісту прокоагулянтних та зниженням вмісту антикоагулянтних факторів [179]. Відомо, що при нормальній вагітності в крові може відбуватися незначне підвищення рівню комплексу тромбін-антитромбін, розчинного фібрину, D-димеру і комплексу плазмін- α_2 -антиплазмін [180]. Тому класичні маркери ризику тромбозу (наприклад, D-димер) не мають практичної діагностичної цінності для виключення такої патології, як венозна тромбоемболія в третьому триместрі. Концентрація D-димеру просто зростає під час нормальної вагітності, як і концентрація фібриногену [181].

При ускладненій вагітності (гіпертензія, прееклампсія та ін.) концентрація розчинного фібрину і D-димеру значно зростає, порівняно з вагітністю без ускладнень. Існує прямий зв'язок між тромбофілією та загрозою переривання вагітності. Як відомо, причиною тромбофілії частіше всього є присутність в крові фактора V Leiden, дефіцит антитромбіну III і протеїнів C та S, мутація G20210A в гені протромбіну. Практика призначення антикоагулянтів на пізніх термінах гестації [182], на нашу думку, є небезпечною, адже може призвести до сильних кровотеч під час пологів.

Ми поставили за мету оцінити інформативність маркерів появи тромбіну для оцінки ризику тромбоутворення під час вагітності.

Одним з факторів ризику тромбоутворення під час вагітності є дисфункція плаценти. Тому на наступному етапі було обстежено вагітних із дисфункцією плаценти, які звернулися за консультацією в акушерсько-гематологічний кабінет, спостерігалися в спеціалізованій жіночій консультації або перебували на стаціонарному лікуванні в КНП «Перинатальний центр м. Києва». Усі пацієнтки були розподілені на групи, відповідно до терміну вагітності: I триместр (до 13 тижнів гестації) – 14 вагітних, II та III триместри (13-41 тижнів) – 58 вагітних.

У пацієнток спостерігали підвищення рівню фібриногену в плазмі крові зі збільшенням гестаційного періоду, що є характерним для нормальної вагітності (таблиця 7.2). Таким чином організм готується до великих крововтрат при пологах, але водночас високий рівень фібриногену на фоні навіть незначного порушення регуляції системи гемостазу, зокрема пов'язаного з плацентарною дисфункцією, є фактором ризику внутрішньосудинного тромбоутворення.

Таблиця 7.2

Рівень фібриногену в плазмі крові пацієнток на різному гестаційному періоді

Групи	Референтна група (РГ)	Вагітні жінки	
		I триместр	II-III триместри
Концентрація фібриногену, мг/мл	2,6±0,3	3,8±1,1*	4,4±0,9*#

* – за тестом Манна-Уїтні результат достовірний при $p < 0,05$, порівняно з РГ.

– за тестом Манна-Уїтні результат достовірний при $p < 0,05$, порівняно з I триместром.

Ми виявили, що за плацентарної дисфункції в плазмі крові вагітних жінок підвищується концентрація розчинного фібрину в II-III триместрах (рис. 7.7, А); суттєво підвищується концентрація Пре-1 на першому триместрі (рис. 7.7, Б); а вміст пС залишається зниженим впродовж всієї вагітності (рис. 7.7, В).

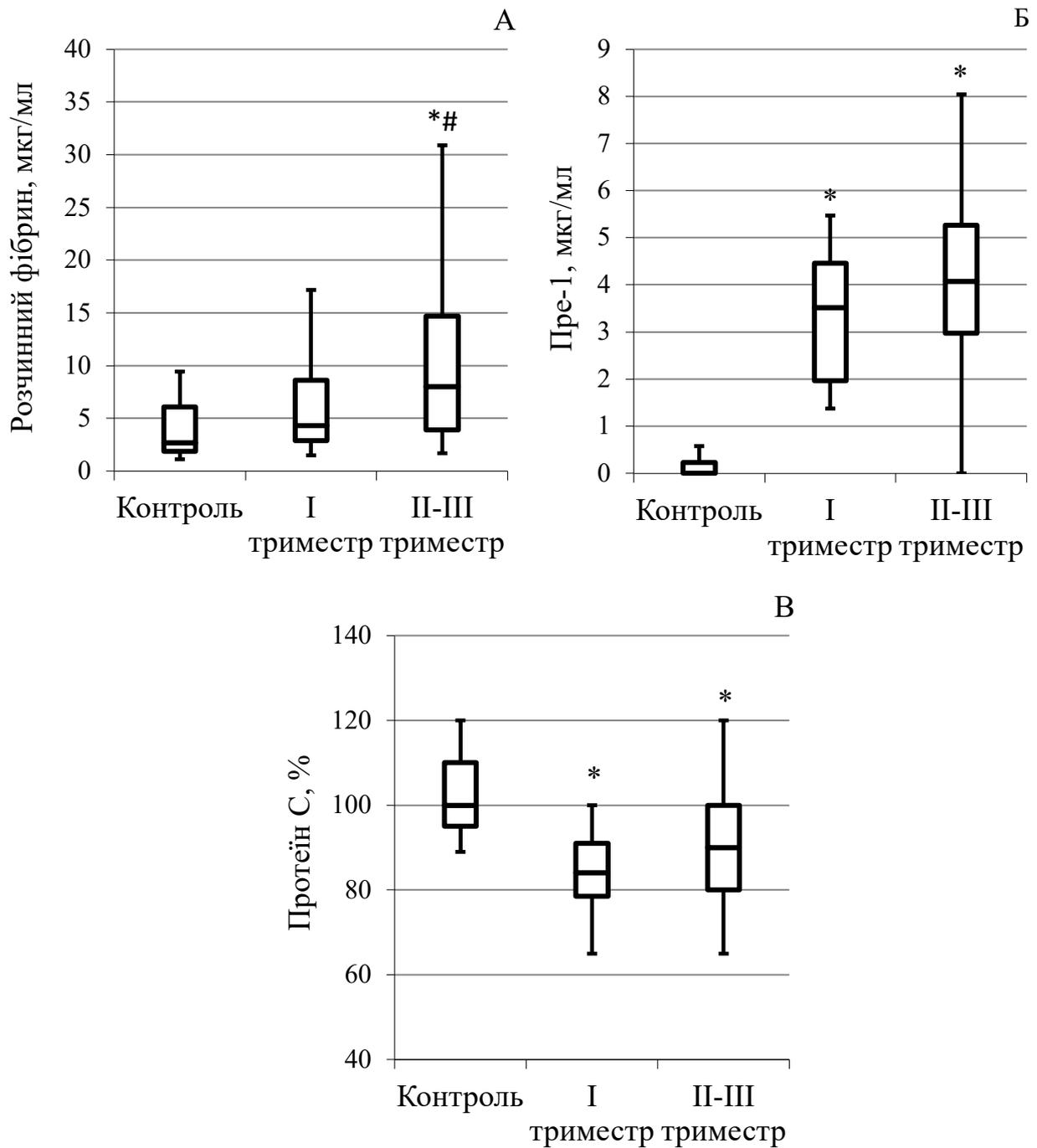


Рис. 7.7. Концентрація розчинного фібрину (А), претромбіну-1 (Б) та вміст протеїну С (В) в плазмі крові вагітних жінок на різних строках гестації. Контроль – параметри плазми крові здорових донорів.

* – за тестом Манна-Уїтні результат достовірний при $p < 0,05$, порівняно з контролем.

– за тестом Манна-Уїтні результат достовірний при $p < 0,05$, порівняно з I триместром.

Ожиріння є ще однією причиною порушення роботи гемостазу, зокрема при вагітності [183]. Відомо, що ожиріння часто супроводжується субфібрильним запаленням, яке здатне призводити до активації системи зсідання крові та тромбоутворення. Ступінь ожиріння вагітних характеризували за індексом маси тіла (ІМТ). Було відібрано плазму крові вагітних на II-III триместрах (з 20 по 38 тижні вагітності) та виділено нормальну групу з ІМТ < 30 (в середньому ІМТ = 24,8, n = 12) та групу з надмірною вагою ІМТ > 30 (в середньому ІМТ = 36,5, n = 13). В обох групах вагітних рівень фібриногену був однаково підвищений відносно здорових донорів, що характерно для II-III триместрів вагітності (таблиця 7.3).

Таблиця 7.3

Концентрація фібриногену в плазмі крові вагітних жінок з різним індексом маси тіла (ІМТ)

Групи	Референтна група (РГ)	Вагітні жінки	
		ІМТ<30	ІМТ>30
Концентрація фібриногену, мг/мл	2,6±0,3	4,2±1,5*	4,3±1,4*

* – за тестом Манна-Уїтні результат достовірний при $p < 0,05$, порівняно з референтною групою

Аналіз маркерів появи тромбіну в кровотоці показав, що вміст пС та концентрація розчинного фібрину в обох групах вагітних достовірно не відрізнялись (рис. 7.8, А, В). Тим часом, концентрація Пре-1 суттєво зростає у вагітних на I-III триместрах з ІМТ більше 30 (рис. 7.8, Б). Слід зазначити, що таке зростання більш яскраво виражено на II триместрі: у 37% вагітних з ІМТ > 30 на II триместрі вагітності концентрація Пре-1 перевищує 1 мкг/мл, в той час як на III триместрі частка таких вагітних складає 21%.

Отже, за ускладненої вагітності показовими є такі маркери появи тромбіну як розчинний фібрин та Пре-1. Саме ці показники зростають зі збільшенням

гестаційного періоду. Зважаючи на підвищення рівню фібриногену впродовж вагітності, що є фізіологічним механізмом захисту жінки від масивної кровотечі під час пологів, активація зсідання крові, зокрема поява тромбіну в кровотоці, може призвести до внутрішньосудинних тромбозів, що загрожують здоров'ю як матері, так і дитини.

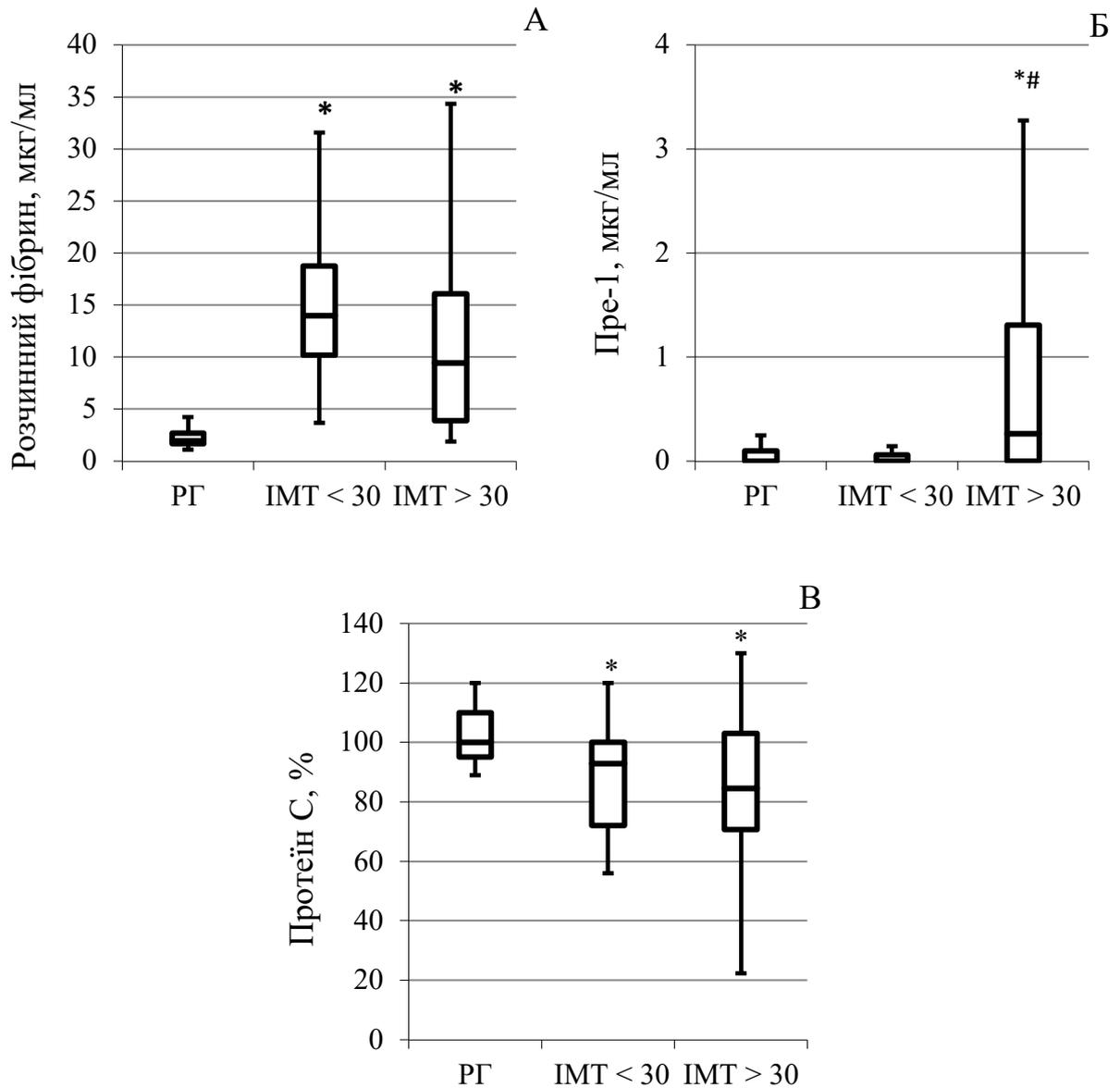


Рис. 7.8. Концентрація розчинного фібрину (А), претромбіну-1 (Б) та вміст протеїну С (В) в плазмі крові вагітних жінок, що відрізняються за показниками індексу маси тіла (ІМТ) (n = 25). РГ – параметри плазми крові здорових донорів (референтної групи).

* – за тестом Манна-Уїтні результат достовірний при $p < 0,05$, порівняно з РГ.

– за тестом Манна-Уїтні результат достовірний при $p < 0,05$, порівняно з групою з ІМТ < 30.

Тому контроль стану системи гемостазу під час вагітності не повинен обмежуватись визначенням рівню фібриногену та загальними коагуляційними тестами, а включати визначення рівню розчинного фібрину та Пре-1.

7.3 Діагностика системи гемостазу за серцевосудинних захворюваннях

Порушення системи гемостазу найбільш тісно пов'язані з серцево-судинними захворюваннями. При серцево-судинних захворюваннях причинно-наслідкові зв'язки і першоджерело патології часто важко виявити: дисбаланс про- та антикоагулянтних ланок гемостазу, поява тромбіну в кровотоці, формування фібринових депозитів та внутрішньосудинне тромбоутворення є водночас і наслідками серцево-судинних захворювань, і їх пусковим механізмом. Оскільки серцево-судинні захворювання є основними причинами смертності серед дорослого населення, то вчасне виявлення механізмів їх розвитку та контрольоване корегування терапії залишається актуальною проблемою.

Ми зупинились на таких серцево-судинних захворюваннях як ішемічна хвороба серця та аневризми черевної аорти, та визначили у пацієнтів маркери появи тромбіну в кровотоці.

7.3.1. Ішемічна хвороба серця

Ішемічна хвороба серця (ІХС) є одним із найрозповсюдженіших серцево-судинних захворювань, яке виникає внаслідок абсолютного або відносного порушення кровопостачання міокарду через ураження коронарних артерій серця [184, 185]. Клінічна класифікація ІХС виділяє такі захворювання: раптова коронарна смерть, стабільна стенокардія (СС), нестабільна стенокардія (НСС), гострий інфаркт міокарда (ГІМ), кардіосклероз. Кардіосклероз є наслідком ГІМ, а раптова коронарна смерть є швидким і раптовим явищем, тож ми вирішили зупинитись на СС, НСС та ГІМ. З певним ступенем спрощення ці захворювання можна вважати різними стадіями розвитку ІХС, що відповідають важкості захворювання: від легкого при СС до важкого при ГІМ.

Перш за все, ми визначили рівень фібриногену в плазмі крові пацієнтів з СС (n = 27), НСС (n = 43) та ГІМ (n = 56) (таблиця 7.4). Як видно з таблиці, лише за ГІМ достовірно підвищується концентрація фібриногену в плазмі крові, що, імовірно, пов'язанно з гострим запаленням під час ГІМ. Стенакардія, хоча й має чіткі клінічні прояви, не позначається на рівні фібриногену.

Таблиця 7.4

Рівень фібриногену в плазмі крові пацієнтів з ішемічною хворобою серця

Наведено медіану та (мінімальне-максимальне) значення.

Групи	Референтна група (РГ)	ІХС		
		СС	НСС	ГІМ
Концентрація фібриногену, мг/мл	2,5 (2,3-3,0)	2,9 (1,6-5,4)	2,7 (1,5-4,1)	3,1 (2,2-5,5)*

* – за тестом Манна-Уїтні результат достовірний при $p < 0,05$, порівняно з РГ.

На наступному етапі ми визначили маркери появи тромбіну за цих патологій. На заміну розчинному фібрину було визначено рівень розчинних фібрин-мономерних комплексів. Як видно з рис. 7.10, за маркерами появи тромбіну СС незначно відрізняється від норми (РГ), лише рівень Пре-1 достовірно підвищується в плазмі крові пацієнтів з СС (рис. 7.10, Б). СС є початковою стадією ІХС, що часто не має чітких симптомів й іноді не пов'язана з явним ушкодженням коронарних судин, може мати епізодичний характер.

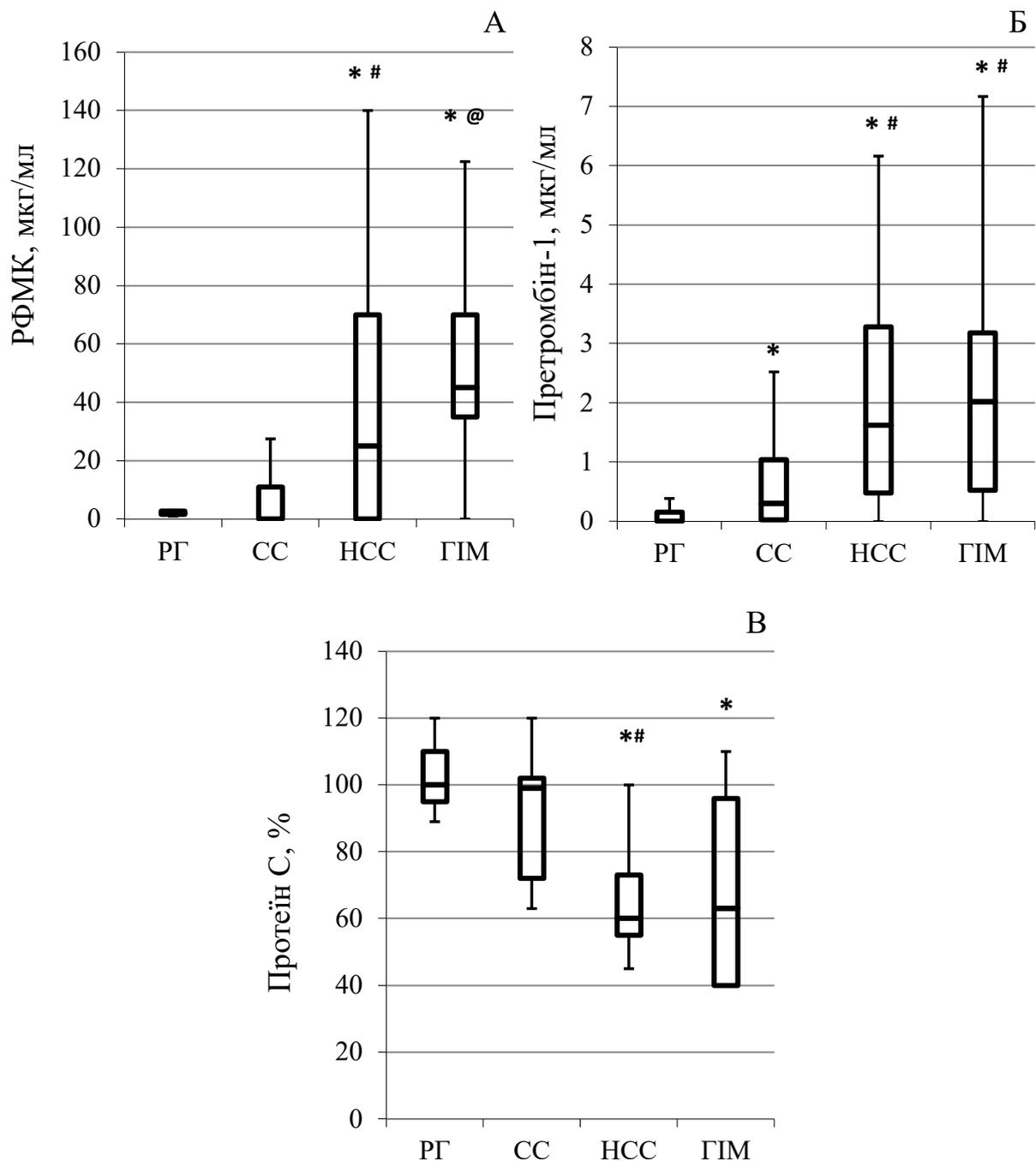


Рис. 7.10. Концентрація розчинних фібрин-мономерних комплексів - РФМК (А), претромбіну-1 (Б) та вміст протеїну С (В) в плазмі пацієнтів з ішемічною хворобою серця за стабільної (СС), нестабільної (НСС) стенокардії та гострого інфаркту міокарда (ГІМ). РГ – референтна група.

* – за тестом Манна-Уїтні результат достовірний при $p < 0,05$, порівняно з РГ.

– за тестом Манна-Уїтні результат достовірний при $p < 0,05$, порівняно з СС.

@ – за тестом Манна-Уїтні результат достовірний при $p < 0,05$, порівняно з НСС.

Таким чином, маркери появи тромбіну в кровотоці за ІХС корелюють з важкістю захворювання, визначеного за клінічними параметрами. Тому визначення концентрації розчинного фібрину, Пре-1 та вмісту пС з одного боку є цінним додатковим інструментом диференціальної діагностики, а з іншого – вказують на серйозні порушення роботи гемостазу за важкого та критичного ступеню ІХС (нестабільної стенокардії та ГІМ).

7.3.2. Аневризма черевної аорти

Аневризма черевної аорти – це збільшення ділянки у нижній частині черевної аорти. АЧА протікає зазвичай безсимптомно або помилково діагностується як порушення роботи травної системи. Серйозним ускладненням АЧА є розрив черевної аорти і ризик такого ускладнення зростає зі збільшенням розміру АЧА (при діаметрі АЧА >70 мм ризик становить 50 %) та стажу АЧА. Догоспітальна летальність при розриві АЧА оцінюється в 40-60 % і біля 40 % пацієнтів помирають у періопераційний період [186, 187]. Хірургічне лікування з приводу аневризми є складною операцією, пов'язаною з ризиком значних крововтрат. Найбільш поширені ускладнення після відкритого хірургічного лікування включають анастомотичну псевдоаневризму та тромбоз графта з подальшою ішемією кінцівки. Тож контроль стану системи гемостазу за АЧА є необхідним для збереження здоров'я та життя пацієнтів [188].

Нами було досліджено стан системи зсідання крові 23 пацієнтів, госпіталізованих з приводу аневризми черевної аорти. Пацієнтам було проведено хірургічне лікування АЧА. Плазму крові у пацієнтів набирали перед та після операції.

Як видно з таблиці 7.5 ще напередодні операції у плазмі крові 55% хворих відмічено значно підвищений вміст фібриногену (до 7 г/л при нормі 2-3 мг/мл),

Рівень фібриногену в плазмі крові пацієнтів з ішемічною хворобою серця

Наведено медіану та (мінімальне-максимальне) значення.

Групи	Референтна група (РГ)	АЧА	
		До операції	Після операції
Концентрація фібриногену, мг/мл	2,5 (2,3-3,0)	4 (1,8-7,0)*	3,4 (1,3-9,8)

*– за тестом Манна-Уїтні результат достовірний при $p < 0,05$, порівняно з РГ.

Згідно таблиці 7.5, ще напередодні операції у плазмі крові 55% хворих відмічено достовірно підвищений вміст фібриногену (від 4 до 7 г/л при нормі 2-3 г/л), тенденція до підвищення рівню фібриногену в плазмі крові зберігалась і після операції (в окремих випадках втричі, відносно норми). Таким чином, ще до операції у пацієнтів виявлено ризик внутрішньосудинного тромбоутворення.

Наступним кроком дослідження було визначення стану системи зсідання крові пацієнтів після операції. Для цього пацієнтів за клінічними ознаками було розподілено на дві групи: до першої включено пацієнтів з АЧА діаметром менше 7 см і відносно невеликою крововтратою (менше 1 л), до другої – пацієнти з АЧА діаметром більше 7 см і великою крововтратою (понад 1,5 л). Такий розподіл пояснюється тим, що об'єм крововтрати під час операції залежить від максимального діаметра АЧА (чим більший діаметр, тим більша крововтрата).

За результатами дослідження в плазмі крові пацієнтів другої групи рівень розчинного фібрину до операції значно перевищував такий в першій групі, а вміст пС достовірно знижувався в першій групі, порівняно з першою (рис. 7.11). Концентрація Пре-1 достовірно зростала лише в плазмі крові пацієнтів другої (важкої) групи (рис. 7.11, Б).

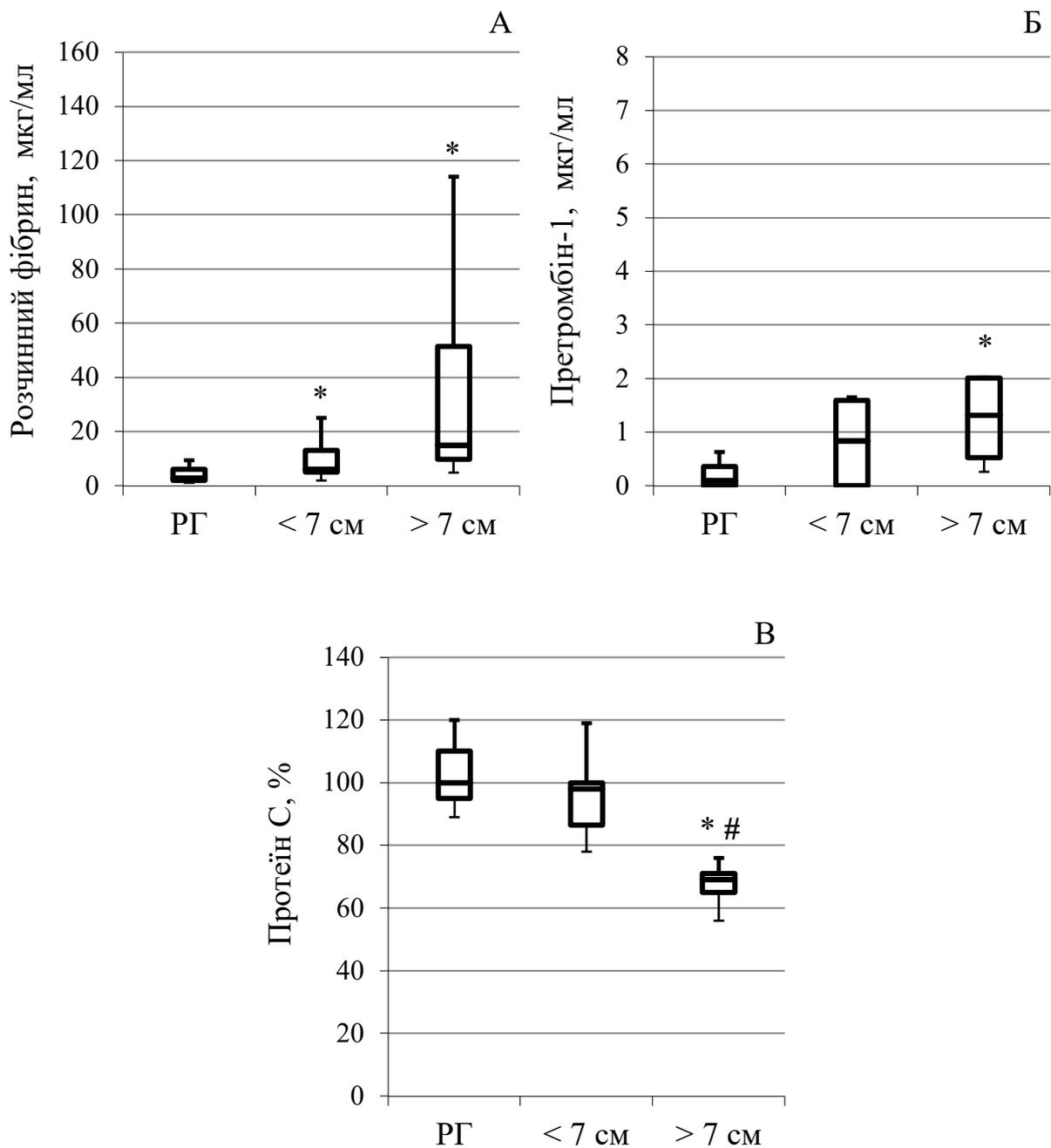


Рис. 7.11. Концентрація розчинного фібрину (А), протромбіну-1 (Б) та вміст протеїну С (В) в плазмі пацієнтів з анеризмою черевної аорти (АЧА). РГ – референтна група; < 7 см – група пацієнтів з АЧА діаметром менше 7 см; > 7 см – група пацієнтів з АЧА діаметром більше 7 см.

* – за тестом Манна-Уїтні результат достовірний при $p < 0,05$, порівняно з РГ.

– за тестом Манна-Уїтні результат достовірний при $p < 0,05$, порівняно з групою < 7 см.

Таким чином, ще до операції за маркерами появи тромбіну в кровотоці можна передбачити перебіг операції, зокрема об'єм крововтрати, та клінічну картину (розмір АЧА). Це особливо актуально зважаючи на те, що характерним ускладненням АЧА є емболізація – закупорювання артерії тромбом з порушенням гемостатичного балансу [186, 189], що супроводжується активацією системи зсідання крові.

7.4 Діагностика системи гемостазу за інших патологій.

7.4.1. Системний червоний вовчак

Системний червоний вовчак (СЧВ) – це системне аутоімунне захворювання, що характеризується не лише хронічним запальним процесом, але й появою антитіл до протеїнів системи гемостазу та фосфоліпідів, що беруть активну участь в роботі каскаду зсідання [190]. Як наслідок, за СЧВ порушується робота системи гемостазу, виникає ризик внутрішньосудинного тромбоутворення, але водночас спотворюються результати тестів лабораторної діагностики, приховуючи справжню картину стану системи гемостазу пацієнта. Тож за СЧВ особливої актуальності набуває вчасна і об'єктивна діагностика стану системи гемостазу.

Досліджено стан системи зсідання крові пацієнтів з СЧВ (n=190). Показано, що найбільш частими варіантами порушень системи зсідання крові серед хворих на СЧВ є гіперфібриногенемія (у 22,9 %) та зниження вмісту протеїну С (у 53,1 %) за рахунок його споживання при активації коагуляції. Зниження антитромбіну III виявлено у 4,7% пацієнтів. Активація коагуляційного процесу підтверджується значним накопиченням розчинних фібрин-мономерних комплексів (РФМК) у 54,4 %) пацієнтів (таблиця 7.6).

Таблиця 7.6

Характеристика системи гемостазу хворих на системний червоний вовчак (СЧВ). Наведено значення медіани та (мінімальне-максимальне) значення.

Параметри	Фібриноге н, мг/мл	АЧТЧ, с	РФМК, мкг/мл	Пре-1, мкг/мл	пС, %
Пацієнти з СВЧ	2,9 (0,6-8,5)	46 (28-110)	7,0 (0,0-140,0)*	0,4 (0,0-5,8)	75 (41-120)*
Референтна група (РГ)	2,5 (2,3-3,0)	45 (41-49)	0,0 (0,0-3,0)	0,1 (0,0-0,5)	100 (90-110)

* – $p < 0,05$ порівняно з РГ за критерієм Вілкоксона-Манна-Уїтні.

Пацієнтів з СЧВ ми розділили відповідно до важкості захворювання та інтенсивності ураження судин [191]: до першої групи увійшли пацієнти з індексом ушкодження судин менше 20 та індексом активності захворювання (SLEDAI) менше 7; до другої групи увійшли пацієнти з індексом ушкодження судин від 20 та більше та індексом активності захворювання від 7 і більше (> 20).

У пацієнтів із високим рівнем маркерів запалення судин достовірно збільшується рівень РФМК та Пре-1. Однак, зменшення вмісту пС достовірно не відрізняється в цих двох групах пацієнтів (рис. 7.12).

Таким чином, показано, що, підсилення запального процесу призводить до підвищення ступеню активації коагуляційного процесу, про що свідчить високий вміст РФМК та Пре-1.

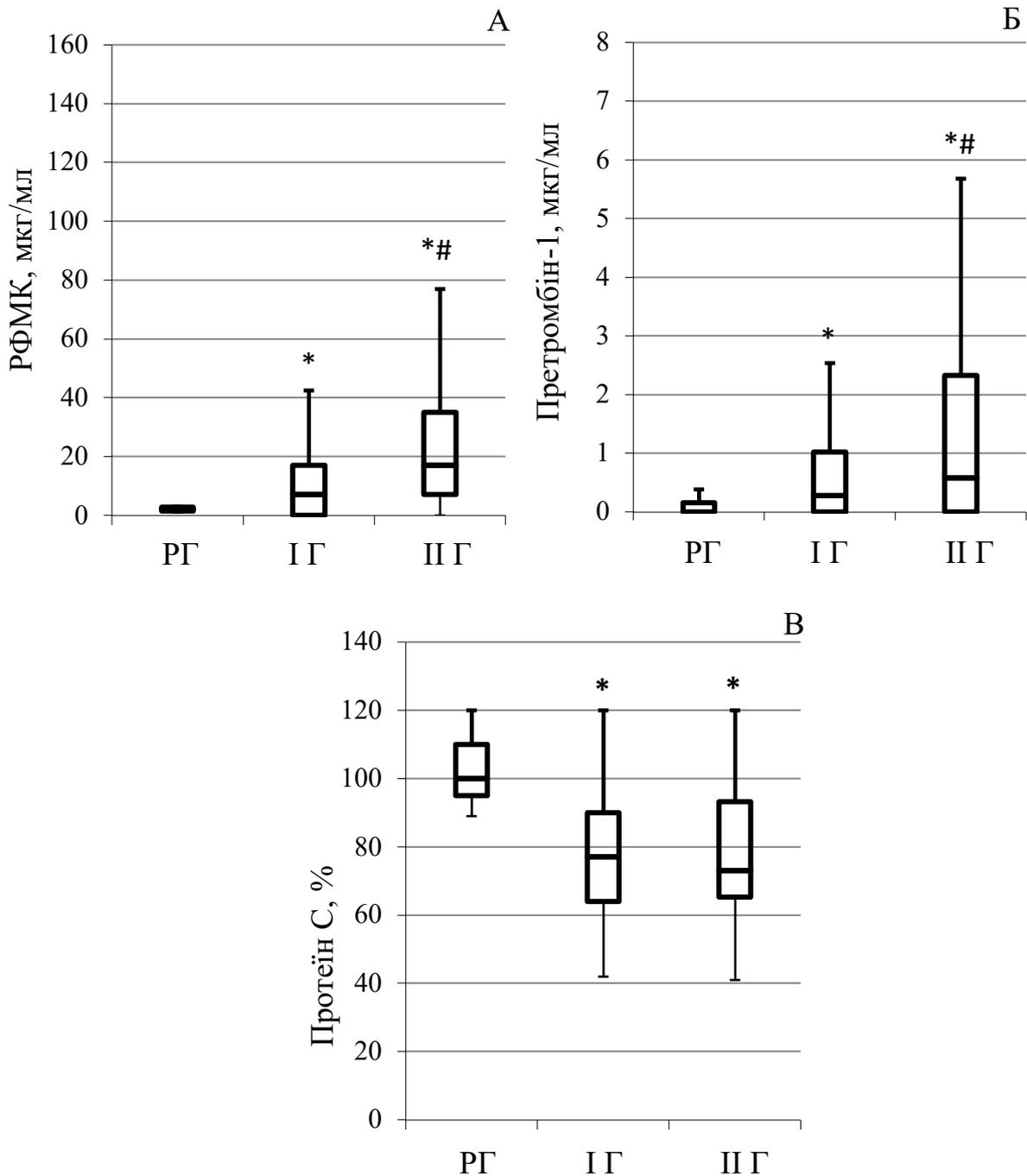


Рис. 7.12. Концентрація розчинних фібринмономерних комплексів (РФМК) (А), претромбіну-1 (Б) та вміст протеїну С (В) в плазмі пацієнтів з системним червоним вовчаком. РГ – референтна група; І Г – група пацієнтів з помірним індексом ушкодження судин (< 20) та індексом активності захворювання (SLEDAI < 7); ІІ Г – група пацієнтів з високим індексом ушкодження судин (≥ 20) та індексом активності захворювання (≥ 7).

* – за тестом Манна-Уїтні результат достовірний при $p < 0,05$, порівняно з РГ.

– за тестом Манна-Уїтні результат достовірний при $p < 0,05$, порівняно з І Г.

7.4.2. Операція з приводу ендопротезування кульшового суглобу

Оперативні втручання – ще один фактор, який спричиняє локальну запальну реакцію та навантаження на систему зсідання крові, а у випадку тривалого захворювання до операції, оперативне втручання спричиняє ризик внутрішньосудинного тромбоутворення [192, 193].

Зразки плазми крові пацієнтів до та після хірургічного втручання за ендопротезування кульшового суглоба (n = 31) аналізували за схемою, описаною вище. Пацієнти були розділені на групу з плановою операцією (n = 16) та із операцією після перелому шийки стегна (n = 15). З таблиці 7.7 видно, що в обох групах пацієнтів був наявний запальний процес, на що вказує підвищення концентрації фібриногену, але у пацієнтів після перелому шийки стегна підвищувався ризик тромботичних ускладнень, порівняно з групою планової операції, що проявляється в достовірному (відносно референтної групи) скороченні часу зсідання плазми крові в тесті АЧТЧ та достовірному (відносно першої групи) підвищенні концентрації маркерів активації системи зсідання – розчинного фібрину та Пре-1.

Таблиця 7.7

Характеристика системи гемостазу хворих перед операцією з приводу ендопротезування кульшового суглобу (ЕПКС). Наведено значення медіани та (мінімальне-максимальне).

Параметри	Фібриноген, мг/мл	АЧТЧ, с	Розчинний фібрин, мкг/мл	Пре-1, мкг/мл	pC, %
ЕПКС, як планова операція	3,6 (2,0-7,0)*	40 (38-48)	3,95 (1,0 – 16,8)*	0,1 (0,0-0,8)	97 (30-120)
ЕПКС після перелому	3,3 (1,8-5,6)*	42 (35-48)*	11,5 (1,95-55,7)*#	2,9 (0,7-4,8)*#	100 (50-120)
Референтна група (РГ)	2,5 (2,3-3,0)	45 (41-49)	2,0 (1,0-3,0)	0,1 (0,0-0,5)	100 (90-110)

* – за тестом Манна-Уїтні результат достовірний при $p < 0,05$, порівняно з РГ.

– за тестом Манна-Уїтні результат достовірний при $p < 0,05$, порівняно з групою планової операції.

Аналіз маркерів появи тромбіну в плазмі крові хворих після операції з приводу ендопротезування кульшового суглобу (рис. 7.13) показав, що у пацієнтів, яким проводили планову операцію, достовірного зростання концентрації Пре-1 не спостерігалось. Натомість, зростання концентрації розчинного фібрину було менш вираженим, порівняно з групою пацієнтів з переломом (концентрація розчинного фібрину в цих групах різнилась втричі). Відмічаємо також тенденцію до зниження вмісту пС після операції, що свідчить про активне залучення антикоагулянтної системи до протидії загрози тромбоутворення (рис. 7.13, В).

Водночас, саме зростання концентрації Пре-1 до операції (виявлене лише у пацієнтів з переломом, див. таблицю 7.7), може бути важливим діагностичним маркером тромботичних ускладнень після операції. Застосування цього підходу потенційно дозволило б передбачити тромботичні ускладнення та допомогло б підібрати адекватну антитромботичну терапію.

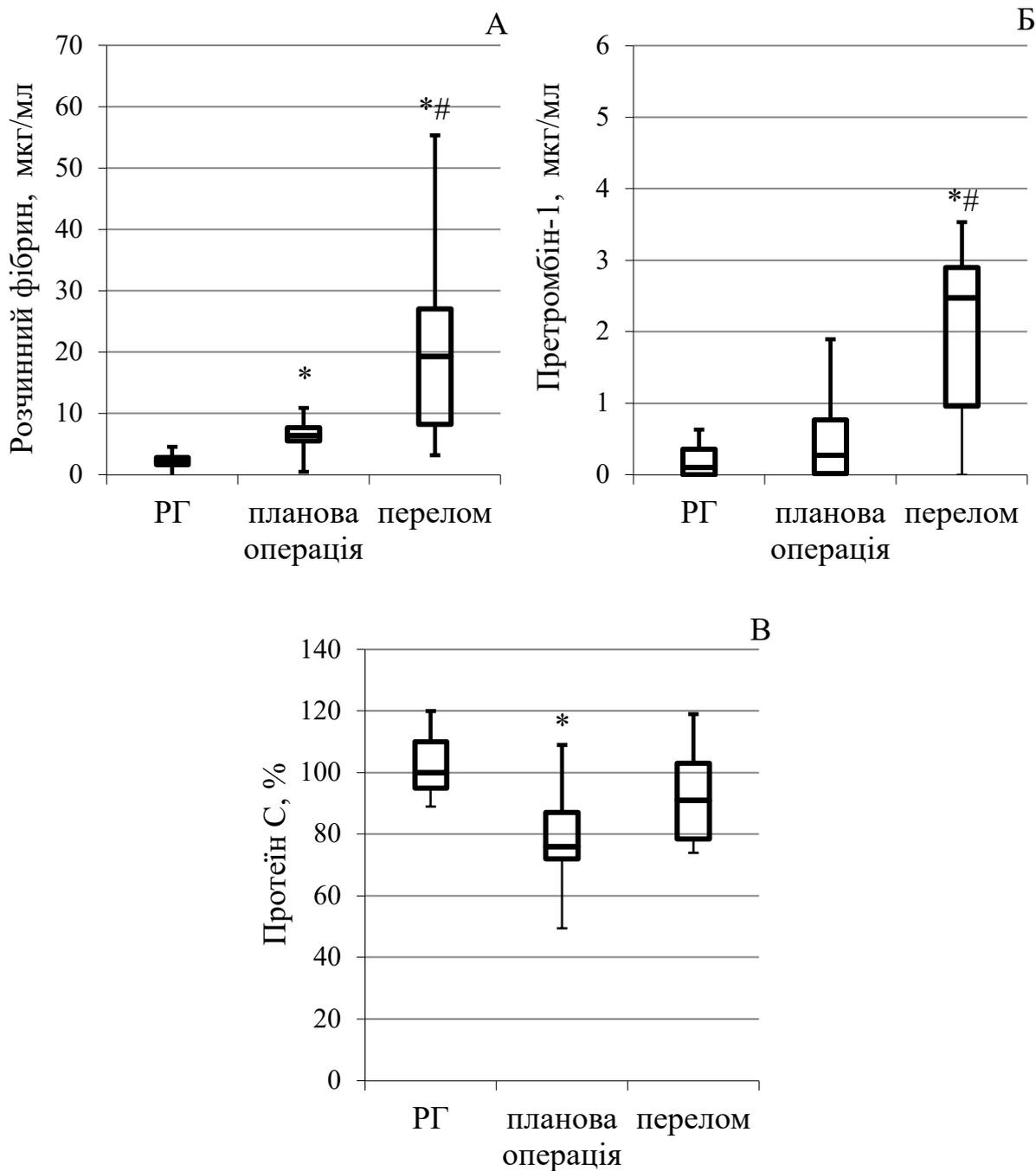


Рис. 7.13. Концентрація розчинного фібрину (А), претромбіну-1 (Б) та вміст протеїну С (В) в плазмі пацієнтів після операції з приводу ендопротезування кульшового суглоба в групах пацієнтів з плановою операцією та операцією у зв'язку з переломом шийки стегна. РГ – референтна група.

* – за тестом Манна-Уїтні результат достовірний при $p < 0,05$, порівняно з РГ.

– за тестом Манна-Уїтні результат достовірний при $p < 0,05$, порівняно з групою пацієнтів з плановою операцією.

7.4.3. Морбідне ожиріння

Ожиріння не лише входить до першої трійки серйозних соціальних проблем, викликаних діяльністю людини (30% населення світу мають надмірну вагу або страждають на ожиріння), але й як складний метаболічний розлад, який супроводжується схильністю до атеросклерозу та атеротромбозу [194, 195].

Вивчення особливостей організму пацієнтів з ожирінням, особливо з морбідним ожирінням, займає особливу нішу: добре відомий зв'язок надлишкової маси тіла та цукрового діабету 2 типу або інсулінорезистентності, артеріальної гіпертензії та дисліпідемії, що призводить до підвищення ризику серцево-судинних захворювань, таких як ішемічна хвороба серця та ішемічний інсульт [196]. Крім того, накопичені дані свідчать про зв'язок між ожирінням, метаболічним синдромом та венозною тромбоемболією. Дослідниками було показано, що відносний ризик для розвитку легеневої та венозної тромбоемболії, тромбозу глибоких вен у пацієнтів з ожирінням, особливо з морбідним ожирінням, у два рази вищий, ніж у пацієнтів без нього.

Було досліджено стан системи гемостазу 24 пацієнтів з морбідним ожирінням. Серед досліджуваної групи лише в чотирьох осіб (20%) вміст фібриногену відповідав нормі, в той час як у інших спостерігалось значне підвищення концентрації фібриногену (таблиця 7.8). У більшості випадків гіперфібриногенемія вважається ознакою хронічного запалення низького ступеню та підвищеного ризику внутрішньосудинного зсідання крові. Крім того, підвищена концентрація розчинного фібрину свідчить про ризик тромбоутворення у цих пацієнтів (таблиця 7.8).

Ми розділили пацієнтів з морбідним ожирінням на дві групи, залежно від того, чи наявне у них внутрішньосудинне тромбоутворення. В якості маркера тромбоутворення було використано підвищену концентрацію D-димеру (понад 200 нг/мл). Саме поява D-димеру свідчить про те, що фібриновий згусток розщеплюється системою фібринолізу і (за відсутності хірургічних втручань або інших пошкоджень цілісності судинного русла) саме за підвищенням

концентрації D-димеру можна зробити висновок про наявність внутрішньосудинного тромбу.

Таблиця 7.8

Характеристика системи гемостазу пацієнтів з морбідним ожирінням.

Наведено значення медіани та (мінімальне-максимальне).

Параметри	Фібриноген, мг/мл	АЧТЧ, с	Розчинний фібрин, мкг/мл	Пре-1, мкг/мл	рС, %
Морбідне ожиріння	5,9 (3,0-9,2)*	Не визначали	3,0 (1,4 – 13,5)*	Не визначали	100 (68-120)
Референтни група (РГ)	2,5 (2,3-3,0)	45 (41-49)	2,0 (1,0-3,0)	0,1 (0,0-0,5)	100 (90-110)

* – $p < 0,05$, порівняно з РГ за критерієм Манна-Уїтні.

Як видно з рис. 7.14, система гемостазу пацієнтів з морбідним ожирінням, не залежно від наявності тромбоутворення, не виявила суттєвих змін в антикоагулянтній ланці: вміст пС лишився в межах нормального. В той же час, концентрація розчинного фібрину достовірно підвищувалась (рис. 7.14, А) у пацієнтів з ознаками внутрішньосудинного тромбоутворення (група ОТ) порівняно з референтною групою та групою пацієнтів без ознак тромбоутворення (БТ). Отже у пацієнтів з морбідним ожирінням, концентрація розинного фібрину може бути інформативним маркером, що свідчить про появу тромбіну в кровотоці та можливість подальшого внутрішньосудинного формування тромбів.

Отримані нами результати узгоджуються з даними літератури та свідчать про активацію системи зсідання крові, що призводить до збільшення утворення тромбіну – маркера гіперкоагуляції. Високий рівень фібриногену дозволяє рекомендувати пацієнтам з ожирінням регулярне лабораторне дослідження основних показників системи зсідання крові.

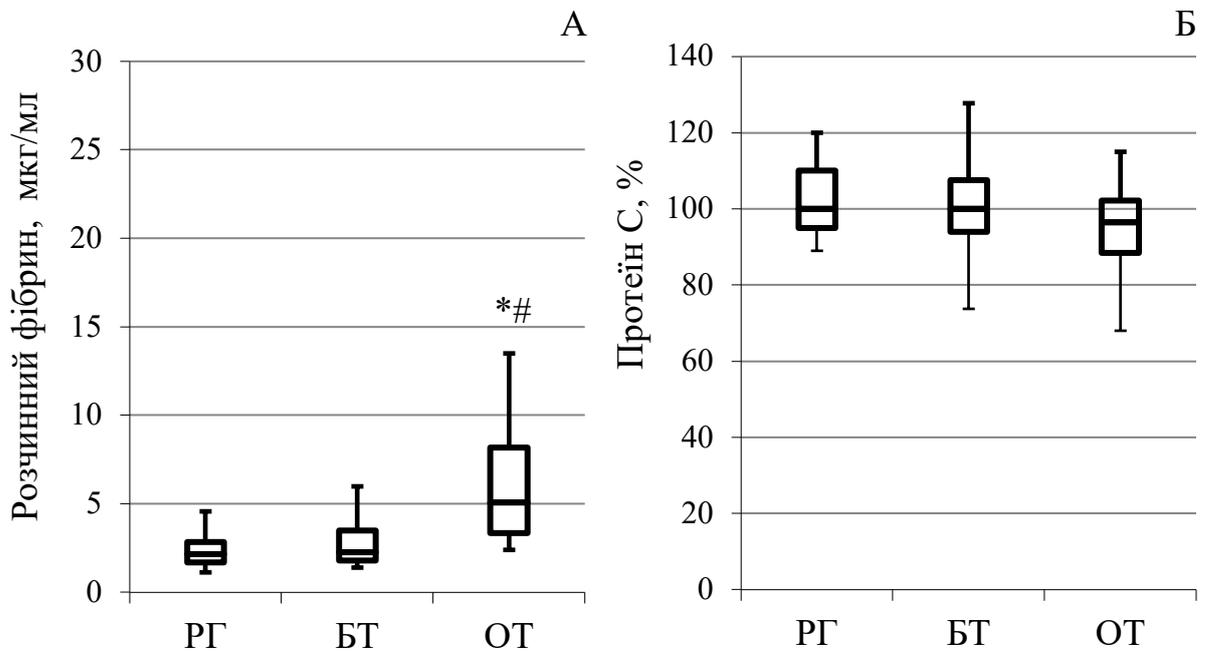


Рис. 7.14. Концентрація розчинного фібрину (А) та вміст протеїну С (Б) в плазмі пацієнтів з морбідним ожирінням. РГ – референтна група; БТ – група пацієнтів без ознак тромбозу (D-димер < 200 нг/мл); ОТ – група пацієнтів з ознаками тромбозу (D-димер \geq 200 нг/мл).

* – за тестом Манна-Уїтні результат достовірний при $p < 0,05$, порівняно з РГ.

– за тестом Манна-Уїтні результат достовірний при $p < 0,05$, порівняно з групою пацієнтів БТ.

Таким чином, при захворюваннях, що супроводжуються запальним процесом спостерігаємо появу маркерів тромбіну в кровотоці, що корелюють з ступенем запалення та клінічними параметрами.

7.4.4. Опікова травма

Опікові травми мають суттєвий вплив на роботу системи гемостазу, оскільки пов'язані як з ініціацією зовнішнього шляху каскаду зсідання крові, так і з інтенсивним запальним процесом [197, 198]. Особливістю опікової травми є підвищення рівню фактора X в плазмі крові пацієнтів та стимуляція тромбоутворення за рахунок пошкодження тканин [199].

Було охарактеризовано стан системи гемостазу пацієнтів (n=5) з обширною опіковою травмою II-III ступеня, що проходили лікування в КНП "Київська міська клінічна лікарня №2".

З таблиці 7.9 видно, що концентрація фібриногену достовірно зростає, як результат запалення, рівень фактора X зсідання крові в плазмі крові пацієнтів має тенденцію до зростання. Ці два параметри свідчать про збільшення прокоагулянтного потенціалу системи гемостазу. В той же час, достовірне зростання концентрації D-димеру в плазмі крові цих пацієнтів підтверджує наявність у них внутрішньосудинного тромбоутворення.

Таблиця 7.9

Характеристика системи гемостазу пацієнтів з опіковою травмою.

Наведено значення медіани та (мінімальне-максимальне).

Параметри	Фібриноген, мг/мл	АЧТЧ, с	Концентрація D-димеру, нг/мл	Рівень фактора X зсідання крові, %
Опікова травма	4,7 (3,5 – 6)*	Не визначали	583 (88 – 4000)*	108 (62 – 160)
Референтни група (РГ)	2,5 (2,3 – 3,0)	45 (41 – 49)	80 (59 – 110)	100 (90 – 110)

* – $p < 0,05$, порівняно з РГ за критерієм Манна-Уїтні.

На наступному етапі було визначено маркери появи тромбіну в плазмі крові цих пацієнтів (рис.7.15). Ми виявили достовірне зростання концентрації розчинного фібрину у пацієнтів з опіковою травмою та тенденцію до зростання концентрації Пре-1 і зниження рівню пС.

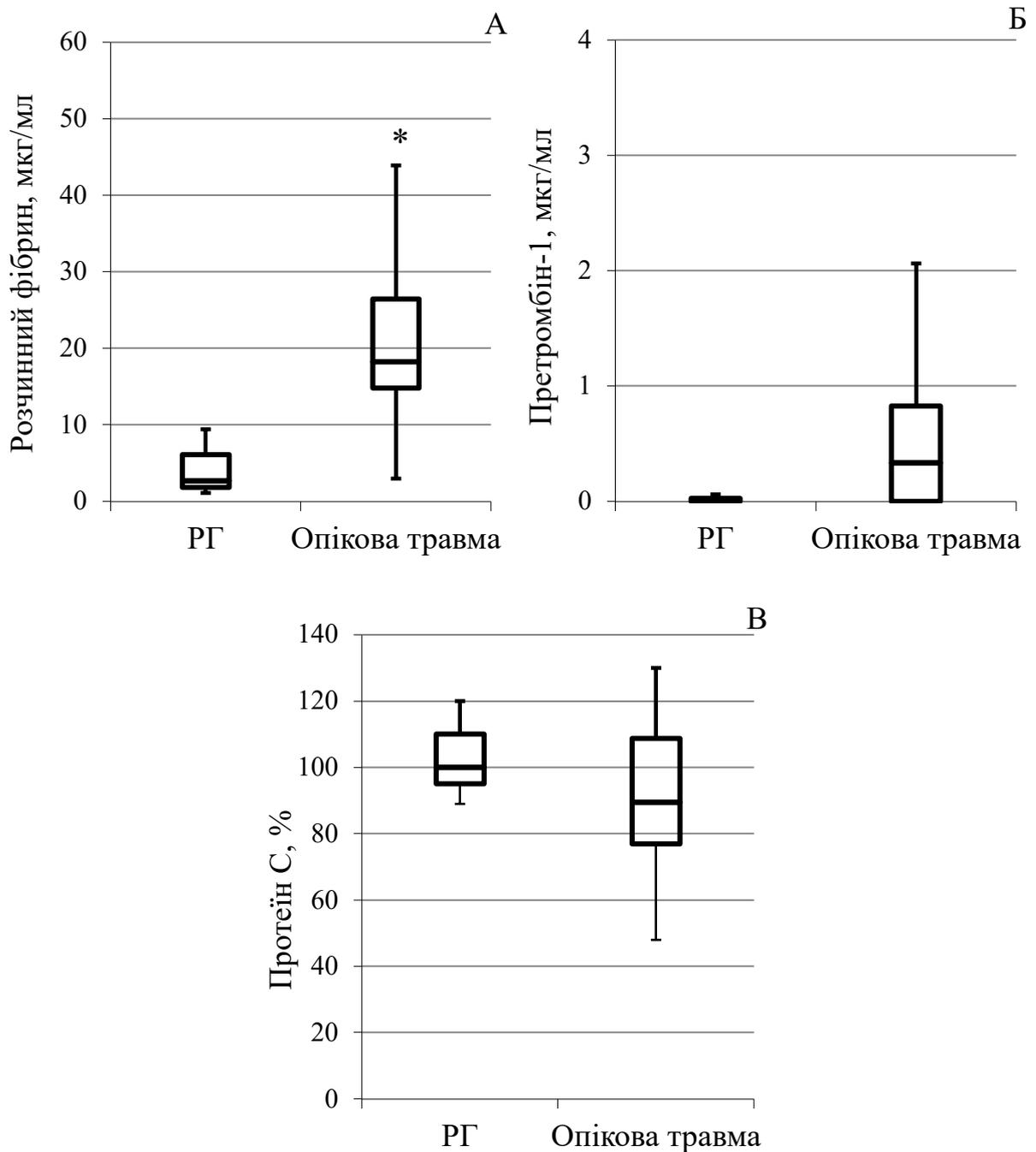


Рис. 7.15. Концентрація розчинного фібрину (А), претромбіну-1 (Б) та вміст протеїну С (В) в плазмі пацієнтів з опіковою травмою. РГ – референтна група.

* – за тестом Манна-Уїтні результат достовірний при $p < 0,05$, порівняно з РГ.

Отже, за опікової травми, що пов'язана з запальним процесом та стимуляцією системи зсідання крові, спостерігали таку ж закономірність, як і при інших патологіях: зростання концентрації розчинного фібрину та Пре-1 і зниження вмісту ПС.

7.5. Можливі механізми менеджменту тромбіну при патологіях

Зважаючи на те, що тромбін працює як у в рідкій фазі крові, так і у клітинно-зв'язаному стані, одним із факторів, які можуть спрямовувати активність цього ензиму в бік того чи іншого субстрату, є доступність партнерів на клітинній мембрані. Найбільш суттєвий внесок в зміну спорідненості тромбіну до субстратів робить тромбомодулін на поверхні ендотеліоцитів, направляючи тромбін на антикоагулянтний шлях активації пС.

При ураженні ендотелію, активація пС тромбіном сповільнена, оскільки уражений ендотелій не експонує тромбомодулін (кофактор тромбіну в цьому процесі) на своїй поверхні [200, 201]. Вільний тромбомодулін в кровотоці не здатен забезпечити повноцінну активацію пС тромбіном – його концентрація коливається в межах 0,1 - 0,2 нМ. В той же час, АТІІІ у разі ендотеліальної дисфункції, не здатен ефективно інгібувати тромбін з причин відсутності достатньої кількості гепарину на поверхні ендотелію. Таким чином, можна спрогнозувати, що за дисфункції ендотелію, активація системи зсідання крові призведе до активації протромбіну протромбіназою, розщеплення протромбіну тромбіном, перетворення фібриногену на фібрин, але не до активації пС.

Ураження судин, що супроводжується активацією системи гемостазу, може спостерігатись зокрема при ішемічній хворобі серця (в людей, які померли від нападу стенокардії у 85-90 % випадків, виявляють ознаки атеросклерозу коронарних артерій різної вираженості), при системному червоному вовчаку, за рахунок аутоімунного запалення стінки судин, та при морбідному ожирінні, що призводить до атеросклерозу та розвитку діабету 2 типу.

В розділах 7.3.1, 7.4.1 та 7.4.3 було розглянуто зміни стану системи гемостазу за цих патологій.

За ІХС та СЧВ концентрації протромбіну-1 та РФМК змінюються пропорційно до важкості захворювання (рис. 7.10; 7.12). При морбідному ожирінні, концентрація розчинного фібрину також відзеркалювала стан пацієнтів (рис. 7.14). В той же час, зниження вмісту пС за патологій, що тісно пов'язані з порушенням функції ендотелію, не корелювало з важкістю захворювання: вміст

пС дещо знижувався за патологічного стану, але важкий перебіг захворювання не поглиблював споживання пС, хоча інші маркери свідчили про потужне внутрішньосудинне функціонування тромбіну.

Отже, у разі запалення ендотелію, спостерігаємо лише два маркери появи тромбіну у кровотоці – розчинний фібрин та Пре-1. Водночас, не було виявлено розщеплення пС тромбіном. Це підтверджує припущення про те, що стан ендотелію (а саме щільність експонування тромбомодуліну на мембрані [200]) впливає на інтенсивність проходження реакції активації пС тромбіном *in vivo* за патологічних станів (рис. 7.16).

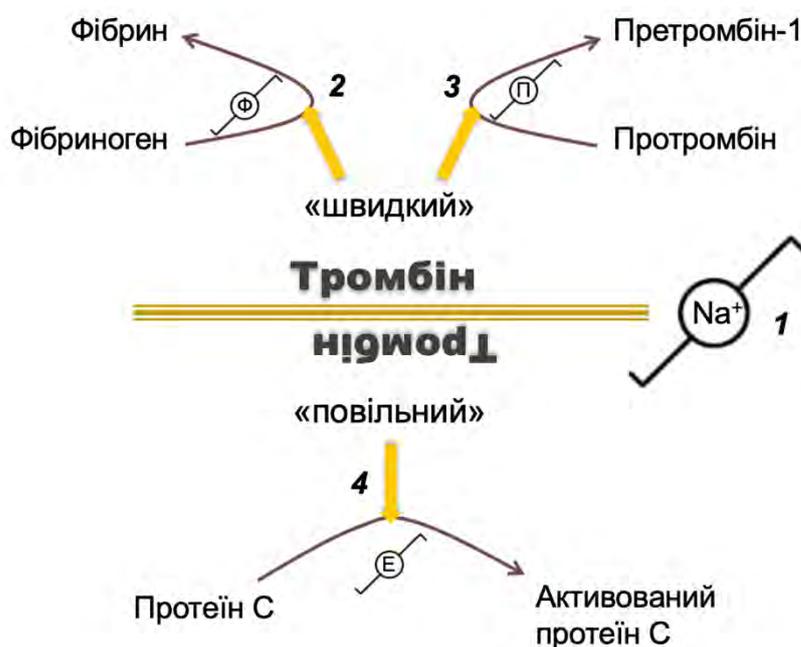


Рис. 7. 16. Схема спрямування ензиматичної активності тромбіну за патологічних станів: 1. Зв'язування йонів Na^+ перемикає тромбін з анти- на прокоагулянтну активність; 2. Підвищення концентрації фібриногену стимулює появу розчинного фібрину; 3. Зниження концентрації протромбіну пригнічує формування претромбіну-1; 4. Дисфункція ендотелію утруднює активацію протеїну С.

Φ – концентрація фібриногену; Π – концентрація протромбіну; Ε – інтактний ендотелій.

Слід також враховувати, що дисфункція ендотелію може супроводжуватись накопиченням йонів Na^+ в глікокаліксі ендотелію [202].

Зв'язування тромбіну з йонами Na^+ з утворенням «надлишку» швидкого тромбіну, може бути додатковим фактором, що пригнічує активацію пС тромбіном за порушення роботи ендотелію.

Інтенсивна робота тромбіну по розщепленню фібриногену, на фоні слабкої активації протеїну С, може вилитись в дисбаланс між прокоагулянтною та антикоагулянтною ланками гемостазу і з точки зору клінічного прогнозу є негативною. В той же час, при запаленні ендотелію тромбін зберігає здатність до негативної зворотньої регуляції тромбіноутворення шляхом розщеплення свого попередника (як результат реакції ми спостерігаємо появу Пре-1). Цей процес може частково компенсувати неспроможність системи пС.

Ще одним фактором вибору субстрату може бути його концентрація. В той час як «повільний» тромбін володіє спорідненістю до тромбомодуліну та пС, «швидкий» тромбін має більше субстратів. Основними (домінантними) субстратами «швидкого» тромбіну є фібриноген та протромбін. Тоді як концентрація протромбіну є стабільною (за виключенням ДВЗ-синдрому та масованих кровотеч), концентрація фібриногену може помітно зростати при запаленні, а також із збільшенням строку гестації. Можна припустити, що при розвитку інфекційного запалення або під час вагітності, на тлі активації системи зсідання крові, розщеплення тромбіном фібриногену буде домінувати над розщепленням протромбіну.

В розділі 7.1 було розглянуто зміни стану системи гемостазу в постінфекційний період, в розділі 7.4.4. було розглянуто та охарактеризовано стан системи гемостазу при опікових травмах, що пов'язані із запаленням, а в розділі 7.2. – зміни стану системи гемостазу під час вагітності.

Важливо, що для цих патологій характерне зростання концентрації фібриногену. У пацієнтів, що переохворіли на COVID-19 і були віднесені до групи високого ризику, рівень фібриногену зростав відповідно до важкості перенесеного захворювання (таблиця 7.1), а ризик активації системи зсідання крові провокувався супутніми захворюваннями, віком та ожирінням. Впродовж

вагітності, концентрація фібриногену у пацієток з плацентарною дисфункцією стрімко зростала (таблиця 7.2), а наявність плацентарної дисфункції сприяла активації системи зсідання крові.

Як результат, в обох (на перший погляд абсолютно різних) групах пацієнтів спостерігали однакову тенденцію: накопичення розчинного фібрину (похідного фібриногену) супроводжувало зростання концентрації фібриногену (рис. 7.2, рис. 7.7), в той час як концентрація Пре-1 (похідного протромбіну) достовірно не зростала, відповідно до цих параметрів, адже концентрація протромбіну лишалась однаковою.

Так само у хворих з опіками II-III ступенів на момент госпіталізації достовірно зростав рівень фібриногену (таблиця 7.9), що супроводжувалося появою розчинного фібрину. Натомість, виявлені зростання концентрації Пре-1 та зниження рівню пС були не достовірними.

Чи свідчить помірна концентрація Пре-1 в кровотоці цих пацієнтів про помірне утворення тромбіну? Ні, адже тромбін активно розщеплює інші субстрати (фібриноген та пС).

В той же час, в розділі 7.3.2. описано стан системи гемостазу у випадку, коли за рахунок потужної кровотечі (АЧА з діаметром понад 7 см) концентрація протромбіну суттєво знижується [203] (слід зауважити, що фібриноген теж втрачається, але його концентрація лишається в межах норми – таблиця 7.5). Не важко передбачити, що в разі зменшення концентрації субстрату (протромбіну) утворення продукту (Пре-1) буде зниженим. Саме це ми і спостерігали (рис. 7.11): важка операція провокувала появу тромбіну в кровотоці, «повільний» тромбін сприяв потужному споживанню пС, а «швидкий» тромбін забезпечував утворення розчинного фібрину. Обидва маркери були достовірно змінені при великій кровотечі (група > 7 см), однак концентрація Пре-1 в цій групі, та у групі з помірною кровотечею не відрізнялась.

Чи можна в даному випадку покладатись лише на концентрацію Пре-1 для оцінки накопичення тромбіну в кровотоці? Ні, оскільки продукція Пре-1 знижена за рахунок нестачі субстрату для реакції.

Ймовірно, можна говорити про розподілення активності тромбіну між трьома домінантними субстратами (пС, протромбіном та фібриногеном), залежно від того, чи супроводжується патологія такими змінами: порушенням функції ендотелію; зміною локальної концентрації йонів Na^+ ; накопиченням фібриногену; втратою протромбіну.

З точки зору діагностики, це означає, що жоден маркер появи тромбіну в кровотоці сам по собі не може бути використаний для точної і вичерпної діагностики загрози тромбоутворення. Активність тромбіну в кровотоці можливо оцінити лише за сумою його ензиматичної активності, щодо трьох домінантних субстратів: фібриногену, протромбіну та пС. Тобто, для об'єктивної оцінки появи тромбіну в кровотоці, необхідне одночасне визначення підвищеної концентрації розчинного фібрину, Пре-1 та зниження вмісту пС .

Подяка

Автор висловлює щирі подяку проф. д.б.н. Платоновій Тетяні Миколаївні за консультації та поради.

Висновок до розділу 7

На плазмі крові пацієнтів було показано, що обрані маркери появи тромбіну в кровотоці – поява протромбіну-1 та розчинного фібрину, зниження вмісту протеїну С – з'являються за низки патологічних станів в кровотоці і можуть бути детектовані. Оскільки інтенсивність прояву вказаних маркерів узгоджується з клінічними проявами захворювання, зокрема важкістю або стадією захворювання, то можемо говорити про інформативність запропонованих параметрів.

З іншого боку, комплексний аналіз стану системи гемостазу пацієнтів дав змогу сформулювати парадигму, суть якої полягає в тому, що інтенсивність вираженості того чи іншого маркера появи тромбіну в кровотоці обумовлюється перерозподілом ензиматичної активності тромбіну між такими субстратами як

фібриноген, протромбін та протеїн С. Зокрема, зниження доступності тромбомодуліну за дисфункції ендотелію зсуває ензиматичну активність тромбіну в прокоагулянтний бік (розщеплення фібриногену), а перерозподіл активності «швидкого» тромбіну відбувається при патологічній зміні концентрацій субстратів (фібриногену та протромбіну).

Матеріали розділу представлені в публікаціях [1, 6-13, 22, 26, 27, 32-36, 39, 40] Додатку А.

РОЗДІЛ 8. ЗАКЛЮЧЕННЯ

Тромбін, завдяки численним шляхам регуляції активності та специфічності, займає центральне положення в функціонуванні та регуляції системи гемостазу. З одного боку, він забезпечує перетворення фібриногену на фібрин, що складає основу тромбу, а з іншого – запускає антикоагулянтну ланку активуючи протеїн С. На цьому його регуляторна роль не обмежується, оскільки він є однією з ланок, що зв'язує плазменний гемостаз із активацією тромбоцитів та ендотелію судин. Крім того, він є одним з посередників у взаємодії системи гемостазу та імунної системи, в першу чергу, за рахунок активації рецепторів імунних клітин.

Центральна роль та виключна багатонаправленість тромбіну нашою думкою, що він є ключем до направленої регуляції роботи системи гемостазу та ключем до діагностики її стану за патологій, пов'язаних з ризиком розвитку внутрішньосудинного тромбоутворення.

Інгібування тромбіну може бути як важливим інструментом впливу на систему гемостазу за протромботичних станів. Однак, безпосередня активація протромбіну з утворенням тромбіну дає можливість швидкої та ефективної зупинки кровотечі.

Нами було застосовано біоінформатичні підходи для створення низькомолекулярних сполук – специфічних інгібіторів тромбіну. Такий підхід дозволив синтезувати речовини, що дійсно були ефективними та селективними інгібіторами тромбіну. І що найважливіше, знижували прокоагулянтний потенціал не лише в моделі *in vitro*, але й при введенні в організм. Введення отриманих інгібіторів тромбіну щурам пригнічувало роботу плазменого гемостазу і агрегаційну здатність тромбоцитів. Тобто, участь тромбіну в плазменому та тромбоцитарному гемостазі дає змогу знизити потенціал обох цих ланок гемостазу, діючи точково лише на тромбін.

З іншого ж боку, точкова специфічна активація протромбіну з утворенням тромбіну дає змогу запуснути утворення фібринового та тромбоцитарного

тромбу, оминаючи каскад зсідання. Зручним інструментом для забезпечення такої активації є екзогенні активатори протромбіну. Попередньо нами було охарактеризовано екамулін – активатор протромбіну з отрути *Echis multisquamatus* та показано, що він швидко та ефективно розщеплює протромбін навіть за терапії гепаринами та варфарином. Тож саме екамулін було обрано як індуктор тромбоутворення для створення кровоспинних медичних виробів.

В якості носія екамуліну було розглянуто декілька біоматеріалів та обрано карбоновий сорбент (АУВМ) і колагенові матриці, оскільки саме ці біоматеріали не лише набували коагуляційної активності при модифікації екамуліном, але й міцно зв'язували ензим, перешкоджаючи його потраплянню в кровотік та, як наслідок, запуску внутрішньосудинного тромбоутворення.

В ході створення кровоспинного засобу на основі карбонового сорбенту (композиту адсорбційного гемостатичного аплікаційного «Карбогемостат») було пройдено успішні випробування на тваринах, перевірку безпечності та токсичності за результатами доклінічних досліджень, розроблено технічні умови для виробництва пілотної партії «Карбогемостату» та, власне, вироблено партію засобу для проведення клінічних досліджень.

Після погодження з Державною службою України з лікарських засобів та контролю за наркотиками було проведено клінічне дослідження «Відкрите, одноцентрове, проспективне, рандомізоване, контрольоване паралельне дослідження ефективності та безпечності застосування виробу медичного – композиту адсорбційного гемостатичного аплікаційного «Карбогемостат» для зупинки артеріальних кровотеч, зокрема за антитромботичної терапії». Дане клінічне дослідження було успішним та показало безпечність та ефективність «Карбогемостату» навіть за гепаринотерапії. Єдиним очевидним недоліком «Карбогемостату» була нездатність до біодеградації і, відповідно, необхідність видалення його з рани. Тож саме біоматеріал обмежував сферу застосування «Карбогемостату» лише поверхневими ранами. В той же час, збереження ензиматичної активності екамуліну в складі «Карбогемостату» надавало виключну можливість швидко зупинити масивні кровотечі, а нерозчинність та

висока адсорбційна здатність карбонового волокна – ефективно тампонувати рани.

Іншим біоматеріалом, який було використано в якості носія для активатора протромбіну, став колаген. Його суттєвою перевагою є здатність до біодеградації та можливість введення в склад колагенової матриці допоміжних діючих речовин, зокрема антибіотиків чи повідон-йоду. Саме тому створення кровоспинного засобу на основі колагенової матриці, модифікованої екамуліном, є перспективним не лише для поверхневого використання, але й для застосування при внутрішньому хірургічному втручанні, що було успішно продемонстровано на тваринах. Крім того, колаген, як природній компонент позаклітинного матриксу, забезпечував збільшення швидкості загоєння ран. Тож, якщо екамулін в складі даного медичного засобу визначає ефективну кровоспинну функцію, то саме біоматеріал забезпечує додаткові ранозагоювальні властивості та визначає сферу застосування даного засобу.

Кровоспинний засіб на основі колагенових матриць також успішно пройшов перевірку безпечності та токсичності за результатами доклінічних досліджень, тож є перспективним медичним засобом для подальшого клінічного дослідження.

Тож саме підхід, що передбачає запуск потужної та вузькоспрямованої продукції тромбіну дав змогу розробити ефективні кровоспинні засоби, які пройшли успішні випробування.

Екзогенна спрямована продукція тромбіну може бути застосована також для отримання аутологічного фібринового гелю. Зокрема, було розроблено протоколи виробництва комплекту для одержання аутологічного фібринового гелю та показано його ефективність для герметизації швів, поверхонь рани, а також для пришвидшення регенерації тканин. В процесі утворення фібринового гелю, екамулін виступає як інструмент для продукції власного тромбіну в плазмі крові пацієнта, що забезпечує формування фібринового каркасу, інфекційно- та алерго-безпечного завдяки використанню аутологічної крові пацієнта. Тоді як кровоспинні властивості фібринового гелю є слабо вираженими, значною його

перевагою є високі регенераційні властивості, оскільки фібрин є природнім матриксом для міграції мезенхімальних стовбурових клітин. Регенераційні властивості аутологічного фібринового гелю були успішно підтверджені на тваринних моделях. Крім того, було показано, що введення фібринового гелю, отриманого за допомогою комплекту для одержання аутологічного фібринового гелю, є безпечним – не спричиняє алергічних реакцій, некрозів, тромбозів, тощо.

Це стало передумовою для проведення клінічного дослідження «Рандомізоване, відкрите, контрольоване, паралельне, одноцентрове, проспективне клінічне дослідження безпечності та ефективності комплекту для одержання аутологічного фібринового гелю для стимуляції загоєння ран первинним натягом», яке було схвалене Державною службою України з лікарських засобів та контролю за наркотиками.

Клінічні дослідження комплекту для одержання аутологічного фібринового гелю підтвердили, що цей медичний виріб є безпечним та має здатність збільшувати ефективність загоєння ран первинним натягом, а отже є перспективним для подальших досліджень в інших галузях хірургії та як засіб для зменшення запалення та больового синдрому в післяопераційний період.

Таким чином, контрольована позасудинна продукція тромбіну була успішно використана нами для створення ефективних кровоспинних та ранозагоювальних препаратів.

В той же час, багатоспрямованість ензиматичної активності тромбіну може стати небезпечною для здоров'я на фоні порушення роботи гемостазу за низки патологій, оскільки призводить до внутрішньосудинного тромбоутворення. Тож необхідною є інформативна діагностика появи тромбіну в кровотоці. Нами було обрано маркери появи тромбіну в кровотоці, що можуть бути виявлені в рутинній лабораторній діагностиці. Такими маркерами є три основні продукти його ензиматичної активності: розчинний фібрин, претромбін-1 та активований протеїн С.

При відщепленні тромбіном фібринопептидів, фібриноген перетворюється на фібрин, здатний формувати комплекси з іншими молекулами фібрину та з

молекулами фібриногену, не формуючи при цьому полімерної фібринової сітки, а відтак лишаючись у розчинній фазі. Такі продукти отримали назву розчинний фібрин, їх може бути виявлено за допомогою ELISA. Нами було вдосконалено існуючу тест-систему для кількісного визначення розчинного фібрину з використанням пари моноклональних антитіл I-3C та II-4d.

Природнім шляхом сповільнення активації протромбіну є негативна зворотня регуляція з боку тромбіну. Вона полягає в розщепленні молекул протромбіну з утворенням неактивного продукту – претромбіну-1, який не може бути активований протромбіназним комплексом, а відтак вилучається з процесу активації системи зсідання крові. Нами було розроблено кількісний метод детектування претромбіну-1 в плазмі крові людини. Метод базується на визначенні співвідношення загального рівню протромбіну та його неактивних похідних, до рівню нативного протромбіну.

В разі коли тромбін зв'язується з тромбомодуліном на поверхні ендотелтоцитів, він забезпечує активацію протеїну С. Відтак, споживання цього антикоагулянтного проензиму свідчить про появу тромбіну в кровотоці. Оскільки протеїн С є проензимом, існують лабораторні тест-системи для визначення його вмісту за розщепленням хромогенного субстрату. В той же час, ми розробили імуноензимну тест-систему для кількісного визначення протеїну С в плазмі крові з використанням моноклональних антитіл IV-6A та III-4A.

На тваринних моделях було підтверджено інформативність та клінічну значимість обраних маркерів появи тромбіну в кровотоці. Було створено модель LPS-індукованого запалення на мишах, модель променевої хвороби на щурах (супроводжується запальною реакцією), та модель інсулінорезистентності на щурах (асоційована з дисфункцією ендотелію судин).

Слід підкреслити, що поява претромбіну-1 та розчинного фібрину, зниження вмісту протеїну С, не лише супроводжували представлені патології, але й корелювали з клінічним станом тварин. Зокрема, спостерігали нормалізацію досліджуваних параметрів при лікуванні щурів з променевою

хворобою, а у випадку інсулінорезистентності – менш виражені зміни в досліджуваних параметрах відмічали у молодих тварин.

Тож поява розчинного фібрину, претромбіну-1 та зменшення вмісту протеїну С, що є результатами роботи тромбіну в кровотоці, дійсно відображає стан системи гемостазу та стан організму в цілому.

Тож наступним логічним кроком стало застосування розробленого підходу для характеристики стану пацієнтів з патологічними станами, асоційованими з порушеннями роботи гемостазу, для розробки підходів інформативної діагностики протромботичних станів.

Було охарактеризовано стан системи гемостазу за низки патологій, серед яких постковідній стан, ішемічна хвороба серця, аневризми черевної аорти, ускладнена вагітність, морбідне ожиріння, системний червоний вовчак, ендопротезування кульшового суглобу, опікова травма. Спільним за цих захворювань є порушення системи гемостазу та наявність запального процесу. Для всіх патологій була показана достовірна поява принаймні одного з маркерів внутрішньосудинного утворення тромбіну. Важливо, що інтенсивність прояву того чи іншого захворювання (скажімо, ступінь ішемічної хвороби серця, розмір аневризми аорти, важкість перенесеного COVID-19, індекс ураження судин при системному червоному вовчаку, тощо) корелює зі зміною принаймні одного маркера появи тромбіну в кровотоці, а отже можемо говорити про інформативність та чутливість запропонованого діагностичного підходу.

З іншого боку, аналіз змін маркерів появи тромбіну в кровотоці на фоні патологій, що мають спільні риси, дозволяє сформулювати певні закономірності ензиматичної роботи тромбіну.

Так, при ішемічній хворобі серця, при системному червоному вовчаку та при морбідному ожирінні характерним є порушення функції ендотелію судин. При аналізі маркерів появи тромбіну в кровотоці за цих патологій ми спостерігали збільшення концентрації претромбіну-1 та розчинного фібрину, що змінювались відповідно до важкості захворювання. Натомість, зниження вмісту протеїну С було слабо вираженим. Ми зробили припущення, що саме запалення

ендотелію судин за цих патологій може інгібувати розщеплення протеїну С тромбіном за рахунок дефіциту тромбомодуліну (кофактора цієї реакції, експонованого інтактним ендотелієм). Така картина свідчить не лише про перерозподіл субстратної переваги тромбіну, але і про появу дисбалансу про- та антикоагулянтної ланок гемостазу як наслідок зміни субстратної переваги тромбіну.

Натомість, для постінфекційного періоду за COVID-19 та вагітності характерним є збільшення концентрації фібриногену – субстрату для утворення розчинного фібрину, а для аневризми черевної аорти на фоні крововтрати характерним є зменшення концентрації протромбіну – субстрату для утворення претромбіну-1. Зміна концентрації субстрату може вплинути на швидкість його розщеплення та появу продукту, який ми детектуємо. І дійсно, якщо тромбін з'являється в кровотоці на тлі зростання концентрації фібриногену, посилюється продукція розчинного фібрину. Якщо ж поява тромбіну супроводжується зменшенням концентрації протромбіну – спостерігаємо менш інтенсивну продукцію претромбіну-1.

З точки зору діагностики це означає, що жоден маркер появи тромбіну в кровотоці сам по собі не може бути використаний для точної і вичерпної діагностики загрози тромбоутворення. Активність тромбіну в кровотоці можливо оцінити лише за сумою його ензиматичної активності щодо фібриногену, протромбіну та протеїну С.

Таким чином, управління активністю тромбіну є основою для розробки способів інгібування внутрішньосудинного тромбоутворення, створення ефективних кровоспинних засобів та для діагностики стану системи гемостазу за патологічних станів.

ВИСНОВКИ

Було показано, що тромбін, як центральний регуляторний ензим системи гемостазу, є універсальною мішенню

- для інгібування з метою запобігання внутрішньосудинному тромбоутворенню;

- для індукції екстрасудинного тромбоутворення з метою створення гемостатиків;

- для моніторингу та діагностики протромботичних станів з метою прогнозування та терапії порушення роботи системи гемостазу.

1. Створено фокусну бібліотеку низькомолекулярних сполук – потенційних інгібіторів тромбіну *in silico*, у модельних системах *in vitro* обрано найефективніші сполуки-кандидати, здатні селективно та специфічно інгібувати активність тромбіну, апробовано їх у модельних системах *in vivo* і показано, що обрані сполуки забезпечують зниження прокоагулянтного потенціалу системи зсідання крові.

2. Запропоновано активатор протромбіну з отрути *Echis multisquamatus* як основу для надання біоматеріалам кровоспинних властивостей за рахунок ефективної генерації ендogenous тромбіну. Створено рекомбінантний аналог активатора протромбіну, застосування якого може суттєво здешевити технологію.

3. Створено універсальний засіб для зупинки кровотеч – «Карбогемостат» – шляхом поєднання кровоспинних властивостей активатора протромбіну та сорбційної здатності активованих карбонових волокон. Вперше проведено клінічне випробування, яке засвідчило безпечність та ефективність «Карбогемостату».

4. Вперше створено специфічний гемостатик, здатний до біодеградації, за рахунок поєднання колагенових матриць та активатора протромбіну. Проведено доклінічні дослідження, які підтвердили безпечність та нетоксичність виробу, розпочато підготовку до клінічних випробувань.

5. Застосування активатора протромбіну дозволило розробити комплект для одержання аутологічного фібринового гелю, який володіє регенеративними та ранозагоювальними властивостями. Проведено доклінічні дослідження, які підтвердили безпечність та нетоксичність виробу. Вперше проведено клінічні дослідження, які засвідчили його безпечність та високий ранозагоювальний потенціал.

6. Запропоновано претромбін-1 як молекулярний маркер генерації активного тромбіну та вперше розроблено спосіб його кількісного визначення в плазмі крові.

7. Отримано моноклональні антитіла до протеїну С, що дало змогу створити імунодіагностичну тест-систему для його кількісного визначення у плазмі крові.

8. Удосконалено спосіб кількісного імунодіагностичного методу визначення концентрації розчинного фібрину в плазмі крові. Вперше запропоновано напівавтоматичний спосіб підрахунку результатів тесту.

9. Показано діагностичну ефективність кількісного визначення претромбіну-1, протеїну С та розчинного фібрину за умов запалення у лабораторних тварин, а також у пацієнтів за патологій, пов'язаних з ризиком внутрішньосудинного тромбоутворення.

10. Обґрунтовано парадигму перемикання активності тромбіну за тромбофілії, згідно з якою ензим надає перевагу субстратам (фібриногену, протромбіну, протеїну С), відповідно до стану ендотелію судин та концентрації субстрату.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Kuharsky AL, Fogelson AL. Surface-mediated control of blood coagulation: the role of binding site densities and platelet deposition. *Biophysical Journal*. 2001; 80 (3): 1050-1074. doi:10.1016/S0006-3495(01)76085-7
2. Di Cera E. Thrombin Interactions. *Chest*. 2003; 124 (3): 11S–17S. doi:10.1378/chest.124.3_suppl.11S
3. Lim L, Bui H, Farrelly O et al. Hemostasis stimulates lymphangiogenesis through release and activation of VEGFC. *Blood*. 2019; 134 (20): 1764-1775. doi: 10.1182/blood.2019001736.
4. Coughlin S. Colloquium Paper: How the protease thrombin talks to cells. *Proceedings of the national Academy of Sciences USA*. 1999; 96 (20): 11023–11027. doi:10.1073/pnas.96.20.11023
5. Burzynski LC, Humphry M, Pyrillou K et al. The Coagulation and Immune Systems Are Directly Linked through the Activation of Interleukin-1 α by Thrombin. *Immunity*. 2019; 50 (4): 1033-1042 doi:10.1016/j.immuni.2019.03.003
6. Antoniak S. The coagulation system in host defense. *Res Pract Thromb Haemost*. 2018; 2:549–557. doi: 10.1002/rth2.12109
7. Margetic S. Inflammation and haemostasis. *Biochemia Medica*. 2012; 22(1): 49–62.
8. Brännert D, Shekhawat I, Chahar KR et al. Thrombin stimulates gene expression and secretion of IL-11 via protease-activated receptor-1 and regulates extravillous trophoblast cell migration. *J Reprod Immunol*. 2019; 132:35-41. doi: 10.1016/j.jri.2019.03.001.
9. Bayrak O, Alper M, Basbinar Y, Bayrak S. The role of thrombin in the paradoxical interplay of cancer metastasis and the vascular system: A driving dynamic. *Biomed Pharmacother*. 2025; 186:118031. doi: 10.1016/j.biopha.2025.118031.
10. Zhong Y, Hu H, Min N, et al. Application and outlook of topical hemostatic materials: a narrative review. *Ann Transl Med*. 2021; 9(7): 577. doi: 10.21037/atm-20-7160.

11. Guo Yu, Wang M, Liu Q, Liu G, Wang Sh, Li J. Recent advances in the medical applications of hemostatic materials. *Theranostics*. 2023; 13(1): 161-196. doi: 10.7150/thno.79639
12. Rodríguez-Vázquez M, Vega-Ruiz B, Ramos-Zúñiga R, Saldaña-Koppel DA, Quiñones-Olvera LF. Chitosan and its potential use as a scaffold for tissue engineering in regenerative medicine. *Biomed Res Int*. 2015; 2015: 821279. doi: 10.1155/2015/821279
13. Parikka K, Leppänen AS, Xu C, Pitkänen L, Eronen P, Osterberg M, Brumer H, Willför S, Tenkanen M. Functional and anionic cellulose-interacting polymers by selective chemo-enzymatic carboxylation of galactose-containing polysaccharides. *Biomacromolecules*. 2012; 13(8):2418-28. doi: 10.1021/bm300679a.
14. Manon-Jensen T, Kjeld NG, Karsdal MA. Collagen-mediated hemostasis. *J Thromb Haemost*. 2016; 14(3): 438-48.
15. Higgins DL, Lewis SD, Shafer JA. Steady State Kinetic Parameters for the Thrombin-catalyzed Conversion of Human Fibrinogen to Fibrin. *J Biol Chem*. 1983; 258(5): 9276-82. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6409903/>
16. Orfeo Th, Brufatto N, Nesheim ME et al. The factor V activation paradox. *The J Biol Chem*. 2004; 279: 19580-19591. doi: 10.1074/jbc.M400727200
17. Nogami K, Zhou Qi, Wakabayashi H, Fay PhJ. Thrombin-catalyzed activation of factor VIII with His substituted for Arg372 at the P1 site. *Blood*. 2005; 105(11): 4362–4368. doi: 10.1182/blood-2004-10-3939
18. Lorand L. Factor XIII and the clotting of fibrinogen: from basic research to medicine. *J Thromb Haemost*. 2005. 3; 1337–1348. doi:10.1111/j.1538-7836.2005.01213.x
19. Dörmann D, Clemetson KJ, Kehrel BE. The GPIb thrombin-binding site is essential for thrombin-induced platelet procoagulant activity. *Blood*. 2000; 96(7): 2469-78. doi: 10.1182/blood.V96.7.2469.h8002469_2469_2478

20. De Candia E, Hall SW, Rutella et al. Binding of Thrombin to Glycoprotein Ib Accelerates the Hydrolysis of Par-1 on Intact Platelets. *J Biol Chem.* 2001; 276, (7): 4692–4698. doi: 10.1074/jbc.M008160200
21. Barranco-Medina S, Murphy M, Pelc L et al. Rational design of protein c activators. *Sci Rep.* 2017; 7: 44596. doi: 10.1038/srep44596
22. Esmon CT. Molecular events that control the protein C anticoagulant pathway. *J Thromb Haemost.* 1993; 70: 29-35. PMID: 8236111.
23. Foley JH, Kim P, Nesheim ME. Thrombin-activable Fibrinolysis Inhibitor Zymogen Does Not Play a Significant Role in the Attenuation of Fibrinolysis. *J Biol Chem.* 2008; 283(14): 8863–8867. doi: 10.1074/jbc.M800127200
24. Boffa MB, Wang W, Bajzar L, Nesheim ME. Plasma and Recombinant Thrombin-Activable Fibrinolysis Inhibitor (TAFI) and Activated TAFI Compared With Respect to Glycosylation, thrombin/thrombomodulin-dependent Activation, Thermal Stability, and Enzymatic Properties. *J Biol Chem.* 1998; 273(4): 2127-35. doi: 10.1074/jbc.273.4.2127.
25. Rezaie AR, Olson ST. Calcium enhances heparin catalysis of the antithrombin-factor Xa reaction by promoting the assembly of an intermediate heparin-antithrombin-factor Xa bridging complex. Demonstration by rapid kinetics studies. *Biochemistry.* 2000; 39:12083-12090. doi: 10.1021/bi0011126.
26. Verhamme IM, Bock PE, Jackson CM. The preferred pathway of glycosaminoglycan-accelerated inactivation of thrombin by heparin cofactor II. *J Biol Chem.* 2004; 279: 9785-9795. doi: 10.1074/jbc.M313962200
27. Chen Z, Pelc LA, Di Cera E. Crystal structure of prethrombin-1. *PNAS.* 2010; 107 (45): 19278–19283. doi/10.1073/pnas.1010262107
28. Kolodzeyskaya MV, Sokolovskaya LI, Chernyshenko VA, Lugovskoy EV. Thrombin and anticoagulant therapy. *Ukr Biochem J.* 2009; 81 (2): 5-13.
29. Huntington J. Molecular recognition mechanisms of thrombin. *J Thromb Haemost.* 2005; (3): 1861-1872. doi: 10.1111/j.1538-7836.2005.01363.x
30. Bode W, Turk D, Karshikov A. The refined 1.9-Å X-ray crystal structure of D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone-inhibited human alpha-thrombin: structure analysis,

- overall structure, electrostatic properties, detailed active-site geometry, and structure-function relationships. *Protein Sci.* 1992; 1(4): 426–471. doi: 10.1002/pro.5560010402
31. Lane DA, Philippou H, Huntington JA. Directing thrombin. *Blood.* 2005; 106 (8): 2605 – 2612. doi:10.1182/blood-2005-04-1710
 32. Di Cera E, Guinto ER, Vindigni A et al. The Na⁺ binding site of thrombin. *J. Biol. Chem.* 1995; 270 (38): 22089-22092. doi: 10.1074/jbc.270.38.22089.
 33. Verhamme IM, Olson ST, Tollefsen DM, Bock PE. Binding of exosite ligands to human thrombin: re-evaluation of Allosteric linkage between thrombin exosites I and II. *J Biol Chem.* 2002; 277(9): 6788-98. doi: 10.1074/jbc.M110257200
 34. Fredenburgh J.C., Weitz J.I. Exosite crosstalk in thrombin. *J Thromb Haemost.* 2025; 23(4):1160-1168. doi: 10.1016/j.jtha.2025.01.003.
 35. Fredenburgh J.C., Stafford A.R., Weitz J.I. Evidence for Allosteric Linkage between Exosites 1 and 2 of Thrombin. *JBC.* 1997; 272(41): 25493-25499. doi: 10.1074/jbc.272.41.25493
 36. Petrera N.S., Stafford A.R., Leslie B.A. et al. Long Range Communication between Exosites 1 and 2 Modulates Thrombin Function. *J Biol Chem.* 2009; 284(38): 25620-25629. doi:10.1074/jbc.M109.000042
 37. Domingues MM, Macrae FL, Cédric Duval et al. Thrombin and fibrinogen γ' impact clot structure by marked effects on intrafibrillar structure and protofibril packing. *Blood.* 2016; 127(4): 487-495. doi: 10.1182/blood-2015-06-652214
 38. Pineda AO, Carrell Ch.J, Bush LA et al. Molecular dissection of Na⁺ binding to thrombin. *J Biol Chem.* 2004; 279 (30): 31842–31853. doi: 10.1074/jbc.m401756200
 39. Gohara D.W., Di Cera E. Molecular mechanisms of enzyme activation by monovalent cations. *J Biol Chem.* 2016; 291(40): 20840 –20848. doi:10.1074/jbc.R116.737833
 40. Chatterjee MS, Denney WS, Jing H, Diamond SL. Systems biology of coagulation initiation: kinetics of thrombin generation in resting and activated human blood. *PLoS Computational Biology.* 2010; 6 (9): 1- 24

41. Bos MHA, Camire RM. Blood coagulation factors V and VIII: Molecular mechanisms of procofactor activation. *J Coagul Disord.* 2010; 2(2): 19–27. PMID: 21165149
42. Oliver JuA, Monroe DM, Roberts HaR, Hoffman M. Thrombin Activates Factor XI on Activated Platelets in the Absence of Factor XII. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* Volume. 1999; 19: 170-177. doi:10.1161/01.ATV.19.1.170
43. Maas C, Meijer JCM, Marquart JA et al. Activated factor V is a cofactor for the activation of factor XI by thrombin in plasma. *PNAS.* 2010; 107 (20): 9083–9087. doi:.1073/pnas.1004741107
44. Brass LF. Thrombin and Platelet Activation. *Chest.* 2003; 124 (3): 18S–25S. doi: 10.1378/chest.124.3_suppl.18s.
45. Bouton MC, Thurieau C, Guillin MC, Jandrot-Perrus M. Characteristics of the interaction between thrombin exosite 1 and the sequence 269-287 [correction of 269-297] of platelet glycoprotein Ib alpha. *J Thromb Haemost.* 1998; 80(2): 310-5. – PMID: 9716158
46. Soslau G, Class R, Morgan DA. et al. Unique pathway of thrombin-induced platelet aggregation mediated by glycoprotein Ib. *J. Biol. Chem.* 2001; 276 (24): 21173–21183. doi: 10.1074/jbc.M008249200
47. Adam F, Guillin MC, Jandrot-Perrus M. Glycoprotein Ib-mediated platelet activation. A signalling pathway triggered by thrombin. *Eur. J. Biochem.* 2003; 270 (14): 2959–2970. doi: 10.1046/j.1432-1033.2003.03670.x.
48. Li R. The Glycoprotein Ib-IX-V Complex. In: *Platelets (Fourth Edition)* Editors: Michelson AD, Cattaneo M, Frelinger A, Newman P. Academic Press: 2019. 1268p. ISBN: 9780128134566
49. de la Peña NC, Gutiérrez-Aguilar M, Hernández-Reséndiz I et al. Glycoprotein Ib activation by thrombin stimulates the energy metabolism in human platelets. *PLoS ONE.* 2017; 12(8): e0182374. doi: 10.1371/journal.pone.0182374
50. Coughlin SR. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature.* 2000; 407: 258–64. doi:10.1038/35025229

51. Li CQ, Vindigni A, Sadler JE, Wardell MR. Platelet glycoprotein Ib alpha binds to thrombin anion-binding exosite II inducing allosteric changes in the activity of thrombin. *J Biol Chem.* 2001; 276(9): 6161-8. doi: 10.1074/jbc.M004164200.
52. Covic L, Gresser AL, Kuliopulos A. Biphasic kinetics of activation and signaling for PAR1 and PAR4 thrombin receptors in platelets. *Biochemistry* 2000; 39: 5458–67. doi: 10.1021/bi9927078.
53. French SL, Arthur JF, Lee H et al. Inhibition of protease-activated receptor 4 impairs platelet procoagulant activity during thrombus formation in human blood. *J Thromb Haemost.* 2016; 14: 1642– 54. doi: 10.1111/jth.13293.
54. Whitley MJ, Henke DM, Ghazi A et al. The protease-activated receptor 4 Ala120Thr variant alters platelet responsiveness to low-dose thrombin and protease-activated receptor 4 desensitization, and is blocked by non-competitive P2Y12 inhibition. *J Thromb Haemost.* 2018; 16 (12): P. 2501-2514. doi: 10.1111/jth.14318
55. Covic L, Gresser AL, Kuliopulos A. Biphasic kinetics of activation and signaling for PAR1 and PAR4 thrombin receptors in platelets. *Biochemistry.* 2000; 39 (18): 5458–5467. doi: 10.1021/bi9927078.
56. Crawley JT, Lam JK, Rance JB et al. Proteolytic inactivation of ADAMTS13 by thrombin and plasmin. *Blood.* 2005; 105 (3): 1085–1093.
57. Vindigni A, White CE, Komives EA, Di Cera E Energetics of thrombin-thrombomodulin interaction. *Biochemistry.* 1997; 36(22). 6674-81. doi: 10.1021/bi962766a.
58. Baerga-Ortiz A, Rezaie AR, Komives EA. Electrostatic dependence of the thrombin-thrombomodulin interaction. *J Mol Biol* 2000; 296:651–658. doi: 10.1006/jmbi.1999.3447.
59. Dahlbäck B, Villoutreix BO. Regulation of blood coagulation by the protein C anticoagulant pathway novel insights into structure–function relationships and molecular recognition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25:1311-1320 doi: 10.1161/01.ATV.0000168421.13467.82

60. Gabazza EC, Kobayashi T, Yasuma T, Hataji O. Coagulation cascade: protein C and protein. reference module in biomedical sciences, Elsevier. 2020. ISBN 9780128012383. doi: 10.1016/B978-0-12-801238-3.11697-6.
61. Esmon CT. The protein C pathway. *Chest*. 2003; 124(3): 26S-32S. doi: 10.1378/chest.124.3_suppl.26s.
62. Nesheim M. Thrombin and fibrinolysis. *Chest*. 2003; 124 (3): 33S – 39S. doi: 10.1378/chest.124.3_suppl.33s.
63. Bouma BN, Mosnier LO. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI)—How does thrombin regulate fibrinolysis? *Ann Med*. 2006; 38 (6): 378-88 doi: 10.1080/07853890600852898
64. Молекулярні механізми утворення та деградації фібрину Луговської Є.В., Макогоненко Є.М., Комісаренко С.В. Київ: Наук. Думка; 2013. 230 с.
65. Medved L, Tsurupa G, Yakovlev S. Conformational changes upon conversion of fibrinogen into fibrin. The mechanisms of exposure of cryptic sites. *Annals of the New York academy of sciences*. 2000; 936: 185–204.
66. Wolberg AS, Campbell RA. Thrombin generation, fibrin clot formation and hemostasis. *Transfus. Apher. Sci*. 2008; 38 (1): 15–23.
67. Udovenko A, Makogonenko Y, Korolova D, Chernyshenko V, Komisarenko S. Formation and elimination of soluble fibrin and D-dimer in the bloodstream. *Croatian Medical Journal*. 2023; 64(6): P. 421-429. doi:10.3325/cmj.2023.64.421.
68. Platonova TM, Hrabovskyi OO, Chernyshenko VO, Stohnii YM, Kucheryavii YeP, Korolova DS, Komisarenko SV. Alternative role of B:b knob-hole interactions in the fibrin assembly. *Biochemistry*. 2025; 64(4): 791-800. doi:10.1021/acs.biochem.4c00695.
69. Pechik I, Madrazo J, Mosesson MW, et al. Crystal structure of the complex between thrombin and the central “E” region of fibrin. *PNAS*. 2004; 101(9) doi: 10.1073/pnas.0303440101

70. Gupta S, Biswas A, Akhter M, et al. Revisiting the mechanism of coagulation factor XIII activation and regulation from a structure/functional perspective. *Sci Rep.* 2016; 6, 30105. doi:10.1038/srep30105
71. Korolova D, Syrko M, Stohnii Ye, Druzhyna N, Chernyshenko T, Gogolinska G. Standardization of the protein calibrators isolation methodology for thrombophilia markers detecting immunodiagnostic test systems. *Biotechnologia acta*, 2022; 15(6): 61-69. doi:10.15407/biotech15.06.061
72. Chernyshenko V, Korolova DS. Echis multisquamatis venom enzymes acting on haemostasis. *Bridges in Life Sciences Second Annual Review of the Regional Cooperation for Health, Science and Technology Consortium, Zagreb.* 2008:37.
73. Rochat H, Martin-Eauclaire MF. *Animal Toxins: Facts and Protocols.* Birkhauser Verlag, Basel, 2000: 365. doi:10.1007/978-3-0348-8466-2
74. Korolova D, Chernyshenko V, Platonova T, et al. Detection of prethrombin 1 in human blood plasma. *International blood research & reviews.* 2016; 5(2): 1-7. doi: 10.9734/IBRR/2016/24683
75. Yu L, Liu Z, Tong Z, et al. Sequential-crosslinking fibrin glue for rapid and reinforced hemostasis. *Adv. Sci.* 2024; 11: 2308171. doi: 10.1002/advs.202308171
76. Jochims K, Kemkowski J, Nolte T, et al. Local tolerance testing of parenteral drugs: how to put into practice. *Regulatory Toxicology and Pharmacology.* 2003. 38(2): 166-182. doi: 10.1016/s0273-2300(03)00089-8
77. Lykhmus O, Mishra N, Koval L, et al. Molecular mechanisms regulating LPS-induced inflammation in the brain. *Front. Mol. Neurosci.* 2016; 9: 19. doi.10.3389/fnmol.2016.00019
78. Chernyshenko V, Snezhkova E, Mazur M, et al. Blood coagulation parameters in rats with acute radiation syndrome receiving activated carbon as a preventive remedy. *Ukr. Biochem. J.*, 2019; 91(2): 52-62. doi: 10.15407/ubj91.02.052
79. Онопченко ОВ, Косякова ГВ, Горідько ТМ, та ін. *Укр. біохім. журн.* 2013; 85(5):88-96.

80. Collier GR, Chisholm K, Sykes S ,et al. More Severe Impairment of Oral than Intravenous Glucose Tolerance in Rats after Eating a High Fat Diet. *J.Nutr.* 1985; 115 (11): 1471–1476. doi:10.1093/jn/115.11.1471
81. World Health Organization. Clinical management of severe acute respiratory infection when novel coronavirus (2019-nCoV) infection is suspected: interim guidance. January 28, 2020. (<https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/clinical-management-of-novel-cov.pdf>).
82. Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis Rheum.* 1992; 35(6): 630-40. doi: 10.1002/art.1780350606.
83. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, Lloyd JK, Deanfield JE. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet.* 1992; 340(8828): 1111-5. doi: 10.1016/0140-6736(92)93147-f.
84. Chernyshenko V, Shteinberg K, Lugovska N, et al. Preparation of highly-concentrated autologous Platelet-rich Plasma for biomedical use. *Ukr.Biochem.J.* 2019; 91(2): 19-27. doi: 10.15407/ubj91.02.019
85. Medved L, Tsurupa G, Yakovlev S. Conformational changes upon conversion of fibrinogen into fibrin. The mechanisms of exposure of cryptic sites. *Ann N Y Acad Sci.* 2001; 936:185-204. doi: 10.1111/j.1749-6632.2001.tb03505.x.
86. Butkowski RJ, Elion J, Downing MR, Mann KG. Primary structure of human prethrombin 2 and alpha-thrombin. *J Biol Chem.* 1977; 252(14):4942-57. PMID: 873923.
87. Соловьев ДА, Платонова ТН, Угарова ТП. Выделение и характеристика экамулина – активатора протромбина из яда эфы многочешуйчатой (*Echis multisquamatus*). *Биохимия.* 1996. 61(6): 1094–1105.
88. He F. Laemmli-SDS-PAGE. *Bio-101.* 2011: e80. doi: 10.21769/BioProtoc.80

89. Гершкович АА, Кибирев ВК. Хромогенные и флуорогенные пептидные субстраты протеолитических ферментов. *Биоорганическая химия*. 1988; 14(11): 1461–1488.
90. Костерін СО, Карахім СО. Біохімічна кінетика, К.: Наукова думка, 310 с. ISSN 978-966-00-1779-5
91. Born GV. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature*. 1962; 194: 927–929.
92. Pelagalli A, Scalia G, Pero ME. et al. Platelet aggregation and flow cytometry analysis of canine platelet rich plasma. *Rev. Méd. Vétér.* 2008; 10 (159): 481–484.
93. Korolova DS, Chernyshenko TM, Gornytska OV, et al. Meizothrombin preparation and its role in fibrin formation and platelet aggregation. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 2014; 5. 588-595. doi:10.4236/abb.2014.57069
94. Toh CH, Giles AR. Waveform analysis of clotting test optical profiles in the diagnosis and management of disseminated intravascular coagulation (DIC). *Clin Lab Haematol*. 2002; 24:321-327. doi: 10.1046/j.1365-2257.2002.00457.x
95. Pozdnjakova TM, Musjalkovskaja AA, Ugarova T.P., et al. On the properties of fibrin monomer prepared from fibrin clot with acetic acid. *Thrombosis Res* 1979; 16: 283–288. doi:10.1016/0049-3848(79)90292-5
96. Reen DJ. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Methods Mol Biol*. 1994; 32:461-466. doi:10.1385/0-89603-268-x:461.
97. Korolova DS, Parkhomenko AM, Chernyshenko VO. et al. Decrease of prothrombin level during thrombolysis in acute myocardium infarction. 2023; 70 (4): 991–995. doi: 10.18388/abp.2020_6962
98. Abraham Ja. Western blot in maize Bio-101: e3257 doi:10.21769/BioProtoc.3257
99. Lerner EA. How to make a hybridoma. *Yale J. Biol. Med*. 1981; 54(5): 387–402. PMID: 7039149
100. Cordell J, Maestre L, Pulford K. Monoclonal antibody production process. *European Monoclonal Antibodies Network*. <https://www.euromabnet.com/protocols/>

101. Rogozea LM, Diaconescu DE, Dinu EA, et al. Bioethical dilemmas in using animal in medical research. Challenges and opportunities. Rom J Morphol Embryol. 2015; 56(3):1227-1231. PMID: 26662165.
102. Lakshmi priya T, Gopinath SCB, Tang T-H. Biotin-Streptavidin Competition Mediates Sensitive Detection of Biomolecules in Enzyme Linked Immunosorbent Assay. PLoS ONE. 2016; 11(3): e0151153. doi:10.1371/journal.pone.0151153
103. Green MR, Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (4th ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press: 2012. 2028 p. ISBN: 978-1-936113-42-2
104. Cohen SN, Chang AC, Boyer HW, Helling RB. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. Proc Natl Acad Sci USA. 1973; 70(11):3240-4. doi: 10.1073/pnas.70.11.3240.
105. Исследование системы крови в клинической практике. Под ред. Г.И. Козинца, В.А. Макарова. М.: Триада-Х, 1997. 480 с.
106. Deak T. Chapter 17 – Thermal treatment. In: Food safety management. Editors: Motarjemi Ya, Lelieveld H. Academic Press, 2014: 423-442, ISBN 9780123815040, doi: 10.1016/B978-0-12-381504-0.00017-2.
107. Грегірчак НМ, Тетеріна СМ, Нечипор ТМ. Мікробіологія, санітарія і гігієна виробництв з основами НАССР. Лабораторний практикум: навч. посіб. К.: НУХТ, 2018. 274 с.
108. Skordalakes E, Dodson GG, Green DS, et al. Inhibition of human α -thrombin by a phosphonate tripeptide proceeds via a metastable pentacoordinated phosphorus intermediate. J Mol Biol. 2001; 311(3): 549-55. doi: 10.1006/jmbi.2001.4872.
109. Bowers KJ, Chow E, Xu H, et al. Scalable algorithms for molecular dynamics simulations on commodity clusters. Proceedings of the ACM/IEEE Conference on Supercomputing (SC06), Tampa, Florida. 2006, November 11-17.
110. Гурмач ВВ, Балинський ОМ, Платонов МО, та ін. Застосування методів молекулярного моделювання для пошуку нових біологічно активних речовин. Ukr.Biochem.J. 2015; 87(1): 109-120. doi:10.15407/ubj87.01.109.

111. Kühnast C, Neuhäuser M. A note on the use of the non-parametric Wilcoxon-Mann-Whitney test in the analysis of medical studies. *Ger Med Sci.* 2008; 6. PMID: 19675730
112. Україна: інформаційний бюлетень на основі STEPS. Гіпертонія та серцево-судинні захворювання серед дорослих у віці 18-69 років. <https://www.who.int/ukraine/uk/publications/m/item/factsheet-on-ukraine-based-on-steps-hypertension-and-cardiovascular-diseases-in-adults>
113. Chan NC, Weitz JI. Antithrombotic Agents: New Directions in Antithrombotic Therapy. *Circulation Research.* 2019; 124 (3): 426-436 doi:10.1161/CIRCRESAHA.118.313155
114. Franchini M, Mannucci PM. Direct oral anticoagulants and venous thromboembolism. *Eur Respir Rev.* 2016; 25: 295–30.
115. J Hee Kim, Kyung-Min Lim, and Hye Sun Gwa. New Anticoagulants for the Prevention and Treatment of Venous Thromboembolism *Biomol Ther* 25(5), 461-470 (2017).
116. Lori-Ann Linkins. Bleeding risks associated with vitamin K antagonists. *Blood Reviews* 2013, 27:111-118
117. Xu C, Liu H, Sun M, et al. Oral functional protein Z: Mitigation of thrombosis via thrombin inhibition to prevent cardiovascular disease. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2025; 251:114569. doi: 10.1016/j.colsurfb.2025.114569.
118. Connors JM. Antidote for Factor Xa Anticoagulants. *N Engl J Med.* 2015; 373(25): 2471-2. doi: 10.1056/NEJMe1513258.
119. Mega JL, Simon T. Pharmacology of antithrombotic drugs: an assessment of oral antiplatelet and anticoagulant treatments. *Lancet.* 2015; 386(9990): 281-91. doi: 10.1016/S0140-6736(15)60243-4.
120. Ogbonna KC, Dixon DL. Critical appraisal of dabigatran in the treatment of deep vein thrombosis and pulmonary embolism. *J Blood Med.* 2015; 6:177-84. doi: 10.2147/JBM.S54033.
121. Mekaj YH, Mekaj AY, Duci SB, Miftari EI. New oral anticoagulants: their advantages and disadvantages compared with vitamin K antagonists in the

- prevention and treatment of patients with thromboembolic events. *Ther Clin Risk Manag.* 2015;11:967-77. doi: 10.2147/TCRM.S84210.
122. McCullagh L, Tilson L, Walsh C, Barry M. A cost-effectiveness model comparing rivaroxaban and dabigatran etexilate with enoxaparin sodium as thromboprophylaxis after total hip and total knee replacement in the Irish healthcare setting. *Pharmacoeconomics.* 2009; 27(10):829-46. doi: 10.2165/11313800-000000000-00000.
 123. Mavrakanas T, Bounameaux H. The potential role of new oral anticoagulants in the prevention and treatment of thromboembolism. *Pharmacol Ther.* 2011; 130(1):46-58. doi: 10.1016/j.pharmthera.2010.12.007.
 124. McMartin C, Bohacek RS. QXP: powerful, rapid computer algorithms for structure-based drug design. *J Comput Aided Mol Des.* 1997;11(4):333-44. doi: 10.1023/a:1007907728892.
 125. Kini RM The intriguing world of prothrombin activators from snake venom. *Toxicon.* 2005; 45(8): 1133-1145. doi: j.toxicon.2005.02.019
 126. Zhao KN, Masci P, Dimeski G et al. Potential Application of Recombinant Snake Prothrombin Activator Ecarin in Blood Diagnostics. *Biomolecules.* 2022; 12(11):1704. doi: 10.3390/biom12111704
 127. Yamada D, Sekiya F, Morita T. Isolation and characterization of carinactivase, a novel prothrombin activator in *Echis carinatus* venom with a unique catalytic mechanism. *J Biol Chem.* 1996; 271(9): 5200-7. doi: 10.1074/jbc.271.9.5200.
 128. Chong ETJ, Ng JW, Lee P-Ch. Classification and Medical Applications of Biomaterials. A Mini Review *BIOI.* 2023; 4(2): 54–61 doi: 10.15212/bioi-2022-0009.
 129. Bhat S, Kumar A. Biomaterials and bioengineering tomorrow's healthcare. *Biomatter.* 2013; 3:e24717 PMID: 23628868. doi: 10.4161/biom.24717.
 130. Arjunan A, Baroutaji A, Preveen AS, Robinson J, Wang C. Classification of biomaterial functionality. *Encycl Smart Mater.* 2022;1:86-102. doi: 10.1016/b978-0-12-815732-9.00027-9.

131. Agrawal R, Kumar A, Mohammed, MKA, et al. Biomaterial types, properties, medical applications, and other factors: a recent review. *J. Zhejiang Univ. Sci. A.* 2023; 24: 1027–1042. doi:10.1631/jzus.A2200403.
132. Momin M, Mishra V, Gharat S, Omri A. Recent advancements in cellulose-based biomaterials for management of infected wounds. *Expert Opin Drug Deliv.* 2021;18(11):1741-1760. doi: 10.1080/17425247.2021.1989407.
133. Arjunan A, Baroutaji A, Preveen AS, Robinson J, Wang C. Classification of biomaterial functionality. *Encycl Smart Mater.* 2022;1:86-102. doi: 10.1016/b978-0-12-815732-9.00027-9.
134. *Biomaterials in Clinical Practice. Advances in Clinical Research and Medical Devices Bioactive.* Editors: Fatima Zivic, Saverio Affatato, Miroslav Trajanovic, Matthias Schnabelrauch, Nenad Grujovic, Kwang Leong Choy // Jelena Najdanović, Jelena Rajković, Stevo Najman *Biomaterials: Potential for Application in Bone Regenerative Medicine Pages 333-360/ Springer 2018.*
135. Vert M, Li M S, Spenlehauer G, Guerin P. Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 1992; 3: 432-446.
136. Santos Jr. AR. Bioresorbable Polymers for Tissue Engineering [Internet]. *Tissue Engineering.* InTech; 2010. Available from: <http://dx.doi.org/10.5772/8580>
137. Geevarghese R, Sajjadi SS, Hudecki A, et al. Biodegradable and Non-Biodegradable Biomaterials and Their Effect on Cell Differentiation. *Int J Mol Sci.* 2022; 23(24):16185. doi: 10.3390/ijms232416185.
138. Xing H, Lee H, Luo L, Kyriakides TR. Extracellular matrix-derived biomaterials in engineering cell function. *Biotechnol Adv.* 2020; 42:107421. doi: 10.1016/j.biotechadv.2019.107421.
139. Brovold M, Almeida JI, Pla-Palacín I, et al. Naturally-Derived Biomaterials for Tissue Engineering Applications. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1077:421-449. doi: 10.1007/978-981-13-0947-2_23.
140. Xiao X, Wu Z. A narrative review of different hemostatic materials in emergency treatment of trauma. *Emerg Med Int.* 2022; 2022:6023261. doi: 10.1155/2022/6023261.

141. Чернишенко ВО. Механізми екстраваданного та внутрішньосудинного тромбоутворення: фундаментальні дослідження для потреб клінічної практики (за матеріалами наукового повідомлення на засіданні Президії НАН України 27 лютого 2019 р.) / В. О. Чернишенко. Вісник Національної академії наук України. 2019; 4: 50-56. doi:10.15407/vsn2019.04.050.
142. Tarakhovskii ML, Tsytkun AG, Sergeev VP, et al. Effektivnost' énterosorbentov i mekhanizmy detoksikatsii pri modelirovannom gepatite u nepolovozrelykh kryс [Efficiency of enterosorbents and detoxication mechanisms in immature rats with simulated hepatitis]. Fiziol Zh (1978). 1991; 37(6):48-55. Russian. PMID: 1820952.
143. Woodworth BA, Chandra RK, LeBenger JD, Ilie B, Schlosser RJ. A gelatin-thrombin matrix for hemostasis after endoscopic sinus surgery. Am J Otolaryngol. 2009; 30(1):49-53. doi: 10.1016/j.amjoto.2007.11.008.
144. Комісаренко С.В., Луговської Е.В., Рубленко М.В., Андрієць В.Г., Корольова Д.С., Чернишенко В.О., Чернишенко Т.М., Горницька О.В., Платонова Т.М., Макогоненко Є.М. Спосіб одержання аутологічного фібринового гелю для стимуляції регенерації кісткових та м'яких тканин і зниження інтенсивності запальних процесів: пат. 113094 України: МПК А61Р19/00, А61Р31/00, А61К35/14, А61К35/16. № а201501207; заявл. 13.02.2015; опубл. 25.08.2016, Бюл.№ 16. 11 с.
145. Páramo JA. Prothrombin fragments in cardiovascular disease. Adv Clin Chem. 2010;51:1-23. doi: 10.1016/s0065-2423(10)51001-1.
146. Волков ГЛ, Платонова ТН, Савчук АН, та ін. Современные представления о системе гемостаза. Киев: Наукова думка, 2005. 295 с. ISBN: 966-00-0447-8
147. Silverberg SA. Proteolysis of prothrombin by thrombin. Determination of kinetic parameters, and demonstration and characterization of an unusual inhibition by Ca²⁺ ions. J Biol Chem. 1979; 254(1):88-94. PMID: 758328.
148. Chen Z, Pelc LA, Di Cera E. Crystal structure of prethrombin-1. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010; 107(45):19278-83. doi: 10.1073/pnas.1010262107.

149. Kornalik F, Blombäck B. Prothrombin activation induced by Ecarin - a prothrombin converting enzyme from *Echis carinatus* venom. *Thromb Res.* 1975; 6(1): 57-63. doi: 10.1016/0049-3848(75)90150-4.
150. Nowak G. The ecarin clotting time, a universal method to quantify direct thrombin inhibitors. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2003; 33(4):173-83. doi: 10.1159/000081505.
151. Hryshenko VA, Tomchuk VA, Lytvynenko OM, Chernyshenko VO, Gryshuk VI, Platonova TM. An estimate of protein synthesis in liver under induced hepatitis. *Ukr Biokhim Zh.* 2011;83:63-68.
152. Suttie JW. Vitamin K in health and disease. Boca Raton: CRC Press. 2009; 231 p. doi:10.1201/9781420005110
153. Cavallari LH, Nutescu EA. Warfarin pharmacogenetics: to genotype or not to genotype, that is the question. *Clin Pharmacol Ther.* 2014 Jul;96(1):22-4. doi: 10.1038/clpt.2014.78.
154. Lippi G, Cervellin G, Franchini M, Favaloro EJ. Biochemical markers for the diagnosis of venous thromboembolism: the past, present and future. *J Thromb Thrombolysis.* 2010; 30(4): 459-71. doi: 10.1007/s11239-010-0460-x.
155. Fenton JW 2nd, Fasco MJ, Stackrow AB. Human thrombins. Production, evaluation, and properties of alpha-thrombin. *J Biol Chem.* 1977; 252(11):3587-98. PMID: 16908.
156. Pérez-Campos E, Córdoba F, Pérez-Ortega E, Martínez M, Zenteno E. Purification of protein C a natural anticoagulant, from human plasma by affinity chromatography with Convanavalin A. *Prep Biochem Biotechnol.* 1996; 26(3-4):183-188. doi: 10.1080/10826069608000064.
157. D'Ursi P, Marino F, Caprera A, et al. ProCMD: a database and 3D web resource for protein C mutants. *BMC Bioinformatics.* 2007; 8 Suppl 1(Suppl 1):S11. doi: 10.1186/1471-2105-8-S1-S11.
158. Hayashi T, Usui M, Nishioka J, et al. Regulation of the human protein C inhibitor gene expression in HepG2 cells: role of Sp1 and AP2. *Biochem J* 1998; 332 (2): 573–582. doi: 10.1042/bj3320573.

159. Page MJ, Kell DB, Pretorius E. The Role of Lipopolysaccharide-Induced Cell Signalling in Chronic Inflammation. *Chronic Stress (Thousand Oaks)*. 2022; 6:24705470221076390. doi: 10.1177/24705470221076390.
160. Робота з лабораторними тваринами: догляд та відтворення моделей патологічних станів (посібник). За заг. ред. Насібулліна БА, Гушчі СГ, Олешко ОЯ. Одеса: «Поліграф», 2023. 96 с. ISBN 978-966-2326-79-6.
161. Komisarenko SV. Scientists' pursuit for SARS-COV-2 coronavirus: strategies against pandemic *Ukr.Biochem.J.* 2020; 92 (6): 5-52 doi: doi:10.15407/ubj92.06.005
162. Vari SG. COVID infection: disease mechanism, vascular dysfunction, immune responses, markers, multiorgan failure, treatments, and vaccination *Ukr.Biochem.J.* 2020; 92 (3): 6-21 doi: 10.15407/ubj92.03.006
163. Asakura H, Ogawa H. COVID-19-associated coagulopathy and disseminated intravascular coagulation. *Int J Hematol.* 2021; 113(1):45-57. doi: 10.1007/s12185-020-03029-y.
164. Iba T, Levy JH, Connors JM, et al. The unique characteristics of COVID-19 coagulopathy. *Crit Care.* 2020; 24(1):360. doi: 10.1186/s13054-020-03077-0.
165. Franchini M, Marano G, Cruciani M, et al. COVID-19-associated coagulopathy. *Diagnosis (Berl)*. 2020; 7(4):357-363. doi: 10.1515/dx-2020-0078.
166. Ranucci M, Sitzia C, Baryshnikova E, et al. Covid-19-Associated Coagulopathy: Biomarkers of Thrombin Generation and Fibrinolysis Leading the Outcome. *J Clin Med.* 2020; 9(11):3487. doi: 10.3390/jcm9113487.
167. Yu B, Li X, Chen J, et al. Evaluation of variation in D-dimer levels among COVID-19 and bacterial pneumonia: a retrospective analysis. *J Thromb Thrombolysis.* 2020; 50(3):548-557. doi: 10.1007/s11239-020-02171-y.
168. Al-Samkari H, Karp Leaf RS, Dzik WH, et al. COVID and coagulation: bleeding and thrombotic manifestations of SARS-CoV-2 infection. *Blood.* 2020; 136(4):489-500. doi: 10.1182/blood.2020006520.

169. Calderon-Lopez MT, Garcia-Leon N, Gomez-Arevalillo S, et al. Coronavirus disease 2019 and coagulopathy: other prothrombotic coagulation factors. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2021; 32(1):44-49. doi: 10.1097/MBC.0000000000000996.
170. Eljilany I, Elzouki AN. D-Dimer, Fibrinogen, and IL-6 in COVID Patients with Suspected Venous Thromboembolism: A Narrative Review. *Vasc Health Risk Manag*. 2020; 16:455-462. doi: 10.2147/VHRM.S280962.
171. Sridharan M, Ashrani AA, Chen D, et al. Evaluation of Soluble Fibrin Monomer Complex in Patients with Sars-Cov-2 COVID Infection. *Blood*. 2020; 136 (Supplement 1): 27–28. doi: 10.1182/blood-2020-136717.
172. Al-Samkari H, Song F, Van Cott EM, et al. Evaluation of the prothrombin fragment 1.2 in patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Am J Hematol*. 2020; 95(12):1479-1485. doi: 10.1002/ajh.25962.
173. Wool GD, Miller JL. The Impact of COVID Disease on Platelets and Coagulation. *Pathobiology*. 2021;88(1):15-27. doi: 10.1159/000512007.
174. Say L, Chou D, Gemmill A, Tunçalp Ö, Moller AB, Daniels J, Gülmezoglu AM, Temmerman M, Alkema L. Global causes of maternal death: a WHO systematic analysis. *Lancet Glob Health*. 2014; 2(6):e323-33. doi: 10.1016/S2214-109X(14)70227-X.
175. Robert-Ebadi H, Moumneh T, Le Gal G, Righini M. Diagnosis of Pulmonary Embolism during Pregnancy. *Diagnostics (Basel)*. 2022; 12(8):1875. doi: 10.3390/diagnostics12081875.
176. Simcox LE, Ormesher L, Tower C, Greer IA. Pulmonary thrombo-embolism in pregnancy: diagnosis and management. *Breathe (Sheff)*. 2015; 11(4):282-9. doi: 10.1183/20734735.008815.
177. Pabinger I, Grafenhofer H. Thrombosis during pregnancy: risk factors, diagnosis and treatment. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2002; 32(5-6):322-4. doi: 10.1159/000073590.
178. Greer IA. Thrombosis in pregnancy: updates in diagnosis and management. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2012;2012:203-7. doi: 10.1182/asheducation-2012.1.203.

179. Bremme KA. Haemostatic changes in pregnancy. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2003; 16(2):153-68. doi: 10.1016/s1521-6926(03)00021-5.
180. Khan F, Vaillancourt C, Bourjeily G. Diagnosis and management of deep vein thrombosis in pregnancy. *BMJ.* 2017; 357:j2344. doi: 10.1136/bmj.j2344.
181. Kline JA, Williams GW, Hernandez-Nino J. D-dimer concentrations in normal pregnancy: new diagnostic thresholds are needed. *Clin Chem.* 2005; 51(5):825-9. doi: 10.1373/clinchem.2004.044883.
182. Konkle BA. Diagnosis and management of thrombosis in pregnancy. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2015; 105(3):185-9. doi: 10.1002/bdrc.21104.
183. Denison FC, Roberts KA, Barr SM, Norman JE. Obesity, pregnancy, inflammation, and vascular function. *Reproduction.* 2010;140(3):373-85. doi: 10.1530/REP-10-0074.
184. Severino P, D'Amato A, Pucci M, et al. Ischemic Heart Disease Pathophysiology Paradigms Overview: From Plaque Activation to Microvascular Dysfunction. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(21):8118. doi: 10.3390/ijms21218118
185. Stone PH, Libby P, Boden WE. Fundamental Pathobiology of Coronary Atherosclerosis and Clinical Implications for Chronic Ischemic Heart Disease Management-The Plaque Hypothesis: A Narrative Review. *JAMA Cardiol.* 2023; 8(2):192-201. doi: 10.1001/jamacardio.2022.3926.
186. Golledge J, Tsao PS, Dalman RL, Norman PE. Circulating markers of abdominal aortic aneurysm presence and progression. *Circulation.* 2008; 118(23):2382-92. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.802074.
187. Majd P, Mylonas S, Gawenda M, Brunkwall J. External validation of risk stratification models predicting the immediate mortality after open repair of ruptured AAA. *World J Surg.* 2016; 40(7):1771-7. doi: 10.1007/s00268-016-3461-x.
188. Kapetanios DM, Karkos CD, Papazoglou KO. Changes in circulating markers of coagulation and fibrinolysis after EVAR. *Int Angiol.* 2018; 37(6):444-450. doi: 10.23736/S0392-9590.18.04046-4.

189. Wu IH, Liang PC, Huang SC, Chi NS, Lin FY, Wang SS. The significance of endograft geometry on the incidence of intraprosthetic thrombus deposits after abdominal endovascular grafting. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2009; 38(6):741-7. doi: 10.1016/j.ejvs.2009.09.004.
190. Yu H, Nagafuchi Y, Fujio K. Clinical and Immunological Biomarkers for Systemic Lupus Erythematosus. *Biomolecules.* 2021; 11(7):928. doi: 10.3390/biom11070928.
191. Gladman DD, Ibañez D, Urowitz MB. Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000. *J Rheumatol.* 2002; 29(2):288-91.
192. Miller RA, Ro JY, Schwartz MR. Adverse tissue reactions after total hip arthroplasty. *Ann Diagn Pathol.* 2017; 27:83-87. doi: 10.1016/j.anndiagpath.2016.07.006.
193. Sedlář M, Kudrnová Z, Trča S, et al. Inflammatory response in patients undergoing hip surgery due to osteoarthritis or different types of hip fractures. *Osteoarthritis and Cartilage.* 2008; 16(1): 26 – 33. doi:10.1016/j.joca.2007.05.023.
194. King RJ, Ajjan RA. Vascular risk in obesity: Facts, misconceptions and the unknown. *Diab Vasc Dis Res.* 2017; 14(1):2-13. doi: 10.1177/1479164116675488.
195. Gregg EW, Shaw JE. Global Health Effects of Overweight and Obesity. *N Engl J Med.* 2017; 377(1):80-81. doi: 10.1056/NEJMe1706095.
196. Morange PE, Alessi MC. Thrombosis in central obesity and metabolic syndrome: mechanisms and epidemiology. *Thromb Haemost.* 2013; 110(4):669-80. doi: 10.1160/TH13-01-0075.
197. Burgess M, Valdera F, Varon D, et al. The Immune and Regenerative Response to Burn Injury. *Cells.* 2022; 11(19):3073. doi: 10.3390/cells11193073. PMID: 36231034; PMCID: PMC9563909.
198. Evers LH, Bhavsar D, Mailänder P. The biology of burn injury. *Exp Dermatol.* 2010; 19(9):777-83. doi: 10.1111/j.1600-0625.2010.01105.x.

199. Kozynets GP, Tsyhankov VP, Korolova DS, Gornytska OV, et al. The Rise of Factor X Level in Blood Plasma of Patients at Severe Burn Injuries. *J Burn Care Res.* 2022; 43(4):965-970. doi: 10.1093/jbcr/irab235.
200. Mori Y, Wada H, Okugawa Y, et al. Increased plasma thrombomodulin as a vascular endothelial cell marker in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura and hemolytic uremic syndrome. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2001;7(1):5-9. doi: 10.1177/107602960100700102.
201. Conway EM. Thrombomodulin and its role in inflammation. *Semin Immunopathol.* 2012; 34(1):107-25. doi: 10.1007/s00281-011-0282-8.
202. Knezović A, Kolobarić N, Drenjančević I, et al. Role of Oxidative Stress in Vascular Low-Grade Inflammation Initiation Due to Acute Salt Loading in Young Healthy Individuals. *Antioxidants (Basel).* 2022; 11(3):444. doi: 10.3390/antiox11030444.
203. de Lloyd L, Jenkins PV, Bell SF, et al. Acute obstetric coagulopathy during postpartum hemorrhage is caused by hyperfibrinolysis and dysfibrinogenemia: an observational cohort study. *J Thromb Haemost.* 2023; 21(4):862-879. doi: 10.1016/j.jtha.2022.11.036.