

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України

**КОРОЛЬОВА ДАР'Я СЕРГІЇВНА**



УДК 577.151.042.5: 612.115

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

03.00.04. – біохімія  
03.00.20. – біотехнологія

Реферат  
дисертації на здобуття наукового ступеня доктора наук

**Київ – 2025**

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України

Науковий  
консультант

академік НАН України,  
доктор біологічних наук, професор  
**Комісаренко Сергій Васильович**,  
директор, завідувач відділу молекулярної імунології,  
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України

Офіційні  
Опоненти

академік НАН України,  
доктор біологічних наук, професор  
**Дзядевич Сергій Вікторович**,  
заступник директора, головний науковий співробітник  
Інституту молекулярної біології і генетики

член-кореспондент НАН України,  
доктор біологічних наук, професор  
**Стойка Ростислав Стефанович**,  
завідувач відділу регуляції проліферації клітин і апоптозу  
Інституту біології клітини НАН України

доктор медичних наук, професор,  
заслужений лікар України  
**Король Сергій Олександрович**,  
начальник кафедри військової хірургії,  
Української військово-медичної академії,  
полковник медичної служби.

Захист відбудеться «08» грудня 2025 року о 14 годині 00 хвилин на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.240.01 Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України за адресою: [01054, м. Київ, вул. Леонтовича, 9](https://www.gov.ua/addresses/01054-m-kyiv-vul-leontovycha-9).

Захист транслюватиметься на <https://www.youtube.com/live/KOWPVcrLiwQ>

Із дисертацією можна ознайомитися на офіційному [сайті](https://www.biochemistry.org.ua) Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України <https://www.biochemistry.org.ua> в розділі Спеціалізовані вчені ради, Прийняті дисертації та у бібліотеці Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України (01054, м. Київ, вул. Леонтовича, 9, корпус 4).

Про дату та місце захисту громадськість проінформовано [«08» листопада 2025 р.](https://www.gov.ua/news/08-listopada-2025-r)

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради Д 26.240.01  
доктор біологічних наук, професор



Ольга МАТИШЕВСЬКА

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Порушення функціонування системи гемостазу може призводити до внутрішньосудинного тромбоутворення (Vilahur G. et al, 2024), що призводить до серйозних ускладнень. Як наслідок, найпоширенішою причиною природної смертності за статистикою ВООЗ є атеротромбоз ([World Health Organization. 2025. "Cardiovascular Diseases \(CVDs\)." World Health Organization, July 31, 2025](#)). В Україні смертність від хвороб системи кровообігу складає понад 60% природних смертей, а з 2022 р. ВООЗ фіксує їх зростання внаслідок захворювань серцево-судинної системи на 10-20% через стрес та обмежений доступ до медичної допомоги ([World Health Organization. "Ukraine War: The Impact of Disruption on Infectious and Chronic Disease Programmes is Expected to be Severe and Durable." World Health Organization, 17 Mar. 2022](#)).

З іншого боку, за статистикою ВООЗ, крововтрата є основною причиною смертності під час військових конфліктів, катастроф та ускладнень за хірургічних втручань ([World Health Organization. Blood Safety and Availability. 2 June 2023](#); Halme A.L.E. et al, 2024; Sauaia A. et al, 2020). Зокрема, в Україні (з лютого 2022 по травень 2024) кількість смертей, спричинених геморагічним шоком, орієнтовно складає за даними ООН приблизно 2500-4000 серед цивільного населення (The Office of the High Commissioner for Human Rights of United Nation. 2024. ["Two-year update. Protection of civilians: impact of hostilities on civilians since 24 February 2022"](#)) та приблизно 14000-30000 серед військових (при аналізі даних *UALosses*, ["Ukraine's losses in the war". 23 October 2025](#), відповідно до статистики нещодавніх військових конфліктів Hinojosa-Laborde C. Et al, 2022).

Тож, саме попередження внутрішньосудинного тромбоутворення та ефективна зупинка кровотечі є надзвичайно важливою задачею, що ставиться перед біологами та медиками.

Всі існуючі гемостатичні засоби забезпечують опосередковану стимуляцію каскаду зсідання крові або ж адсорбують рідину, забезпечуючи концентрування компонентів крові (Zhong Y. Et al, 2021; Xiao X. al, 2022). Це не є достатнім для зупинки масованих кровотеч та не забезпечує ефективного тромбоутворення у осіб з гемофілією. Для вирішення таких задач необхідний гемостатик зі специфічним механізмом дії, який би активував кінцеві стадії каскаду зсідання крові – утворення тромбіну та полімеризацію фібрину.

Вирішення проблеми попередження внутрішньосудинного тромбоутворення полягає як у застосуванні ефективних прямих антикоагулянтів, так і в ранній діагностиці ризику тромбозів. На даний момент в медичній практиці використовуються два типи антикоагулянтів. Непрямі антикоагулянти пригнічують синтез вітамін К-залежних факторів зсідання крові, тобто діють опосередковано та із затримкою в часі, що спричиняє складнощі з контролем антикоагулянтного ефекту та дозуванням препарату (Tadesse, T.A. et al., 2022). Прямі антикоагулянти – переважно інгібітори тромбіну або фактора Ха – діють безпосередньо на ензими каскаду зсідання крові. Однак, існуючі прямі антикоагулянти здатні викликати сильні кровотечі, зокрема внутрішньочерепні (Escobar C. Et al, 2024; Kam P.C. et al, 2005), або ж, хоч як

це не парадоксально, спричиняти тромбози (Perzborn E. Et al, 2014). Тож пошук нових ефективних і, водночас, безпечних антикоагулянтів залишається актуальним завданням гемостазіології.

Рання діагностика внутрішньосудинного тромбоутворення є ключовою для ефективного лікування (Obi A.T. et al, 2020; Corvino F. Et al, 2025; Chang Y. Et al, 2025). Однак, традиційні для клінічної практики коагуляційні тести та визначення концентрації D-димеру виявляються нечутливими та неспецифічними до ранніх прокоагулянтних змін у системі гемостазу (Massignon D. et al, 1996; Levi M., 2010).

На нашу думку, саме тромбін, як центральний регуляторний ензим системи гемостазу (Al-Amer, Osama M., 2022), є тією мішенню, дія на яку здатна забезпечити вчасну діагностику та ефективне попередження внутрішньосудинного тромбоутворення, а також – за умов ушкодження цілісності судин – стимулювати ефективне екстрасудинне тромбоутворення. Саме тому дисертаційну роботу було присвячено узагальненню ролі тромбіну в регуляції системи гемостазу та формуванню уявлення про тромбін, як головний ензим екстрасудинного 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 діагностиків 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 «Протеїн-протеїнові 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 комплексу 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 претромбіну-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 претромбіну-1, протеїну С та розчинного фібрину за патологій, пов'язаних з ризиком внутрішньосудинного тромбоутворення.

**Об'єкт досліджень:** система гемостазу людини.

**Предмет досліджень:** регулювання ензиматичної активності (про)тромбіну із застосуванням низькомолекулярних інгібіторів та ензимних активаторів, а також детектування тромбіну в кровотоці за маркерами його активності.

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

**Дисертація на здобуття ступеня кандидата наук.** «Похідні протромбіну та їх роль у функціонуванні коагуляційної ланки системи гемостазу», 2010 рік. Матеріали та висновки дисертації на здобуття ступеня кандидата наук використано в літературному огляді та розділі Матеріали і методи.

**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).

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

*«The hemostasis system is undoubtedly one of the most amazing and elegant dances of proteins. Between its partners, all shades of emotion flare up in a short time – from hatred to wild passion, from complacency to self-punishment – forming a perfect picture of harmonious work.»*

Edalyn Collard

### Огляд літератури

У розділі представлено узагальнення ролі тромбіну в системі гемостазу. Визначено роль вільного та зв'язаного з клітинними рецепторами тромбіну в регуляції гемостазу, зокрема описано субстрати, гідроліз яких тромбіном визначає формування фібриново-тромбоцитарного тромбу або пригнічення коагуляції (рис. 1).

Описано основні шляхи регуляції активності тромбіну. Зокрема, приділено увагу ролі екзосайтів I та II у взаємодії тромбіну з кофакторами/субстратами та у зміні специфічності ензиму, обумовленій цими взаємодіями. Описано роль іонів  $\text{Na}^+$  у переході між «швидкою» (прогоагулянтною) та «повільною» (антикоагулянтною) формами тромбіну. Проаналізовано послідовність гідролізу субстратів у процесі збільшення концентрації тромбіну за активації системи гемостазу.

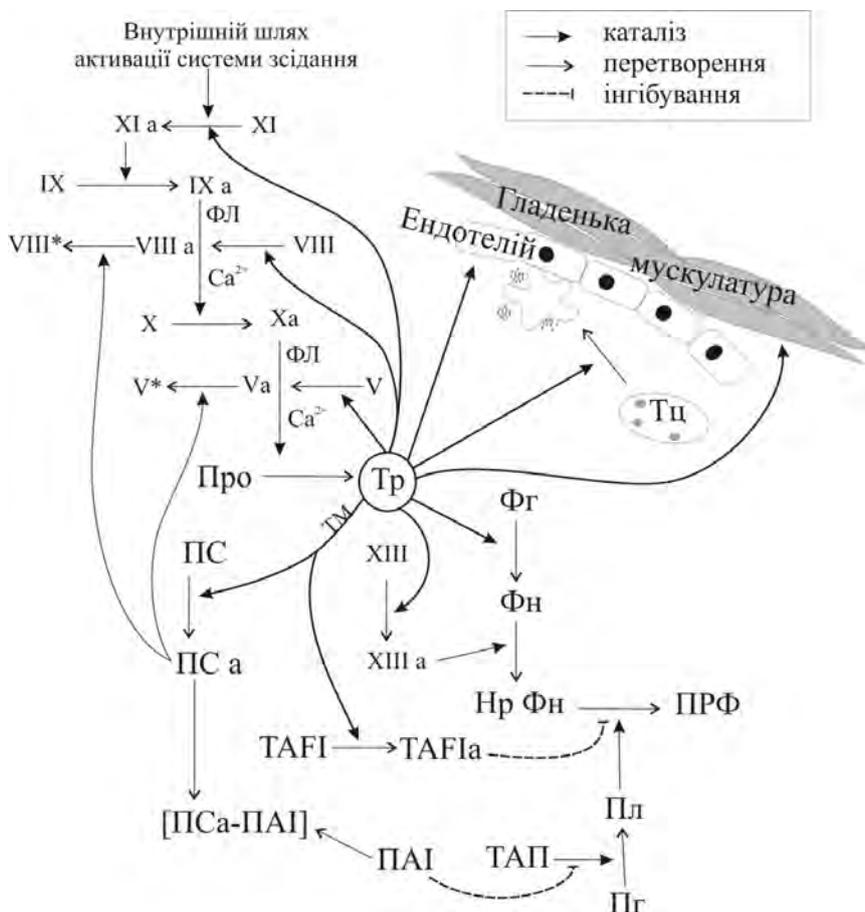


Рис. 1. Схематичне зображення основних функцій тромбіну.

Тр – тромбін,  
 Про – протромбін,  
 ПС – протеїн С,  
 ТМ – тромбомодулін,  
 Тц – тромбоцити,  
 ФЛ – фосфоліпиди,  
 Фг – фібриноген,  
 Фн – фібрин,  
 Нр Фн – нерозчинний фібрин, ПРФ – продукти розщеплення фібрину, Пл – плазмін,  
 Пг – плазміноген,  
 ТАП – активатор плазміногену тканинного типу,  
 ПАІ – інгібітор активатору плазміногену,  
 V\*, VIII\* – дезактивовані фактори Va і VIIIa зсідання крові.

## Матеріали і методи

Враховуючи мету та поставлені завдання, робота складається з трьох основних блоків, що визначають методи дослідження (рис. 2).



Рис. 2. Схема дисертаційної роботи

В першому блоці, присвяченому пошуку інгібіторів тромбіну з метою запобігання внутрішньосудинному тромбоутворенню, були використані методи комп'ютерного моделювання та молекулярної динаміки для створення бібліотеки потенційних інгібіторів тромбіну та класифікації типів зв'язків, що визначають взаємодію потенційного інгібітора з активним центром тромбіну; моделі *in vitro* з використанням очищеного препарату тромбіну, плазми крові та специфічних хромогенних субстратів для скринінгу ефективності та встановлення природи інгібування тромбіну запропонованими сполуками; моделі *in vivo* на щурах для апробації обраних інгібіторів тромбіну.

В другому блоці, присвяченому екstrasудинному активуванню протромбіну з метою створення кровоспинних засобів, були використані методи ензимології для визначення умов використання ензимного активатора протромбіну для забезпечення екstrasудинного зсідання крові; методи молекулярної біології для створення рекомбінантного аналога активатора протромбіну; гістологічні методи для проведення доклінічних досліджень; та методи лабораторної діагностики для перевірки безпечності запропонованих засобів у клінічних дослідженнях.

В третьому блоці було використано модифіковані методи лабораторної діагностики та вестерн-блот аналіз для розробки методу кількісного визначення протромбіну-1; методи молекулярної біології, гібридомну технологію та імунохімічні методи для створення тест-системи для кількісного визначення протеїну С; імунохімічні методи для модифікації тест-системи для кількісного визначення розчинного фібрину. Було створено тваринні моделі запалення, асоційованого з порушенням роботи системи гемостазу, для підтвердження інформативності запропонованих маркерів появи тромбіну в кровотоці. Стан системи гемостазу пацієнтів за низки патологій оцінювали методами лабораторної діагностики.

## Результати власних досліджень

### Розробка нових способів інгібування активності тромбіну з метою створення антитромботичних препаратів

За допомогою молекулярного докінгу з використанням пакету QXP та наступної перевірки за допомогою молекулярної динаміки в GROMACS нами було відібрано 14 низькомолекулярних сполук в якості потенційних інгібіторів тромбіну (рис. 3).

Всі запропоновані сполуки було синтезовано на потужностях ТОВ «НВП «УКРОРГСИНТЕЗ» та апробовано *in vitro* та *in vivo*.

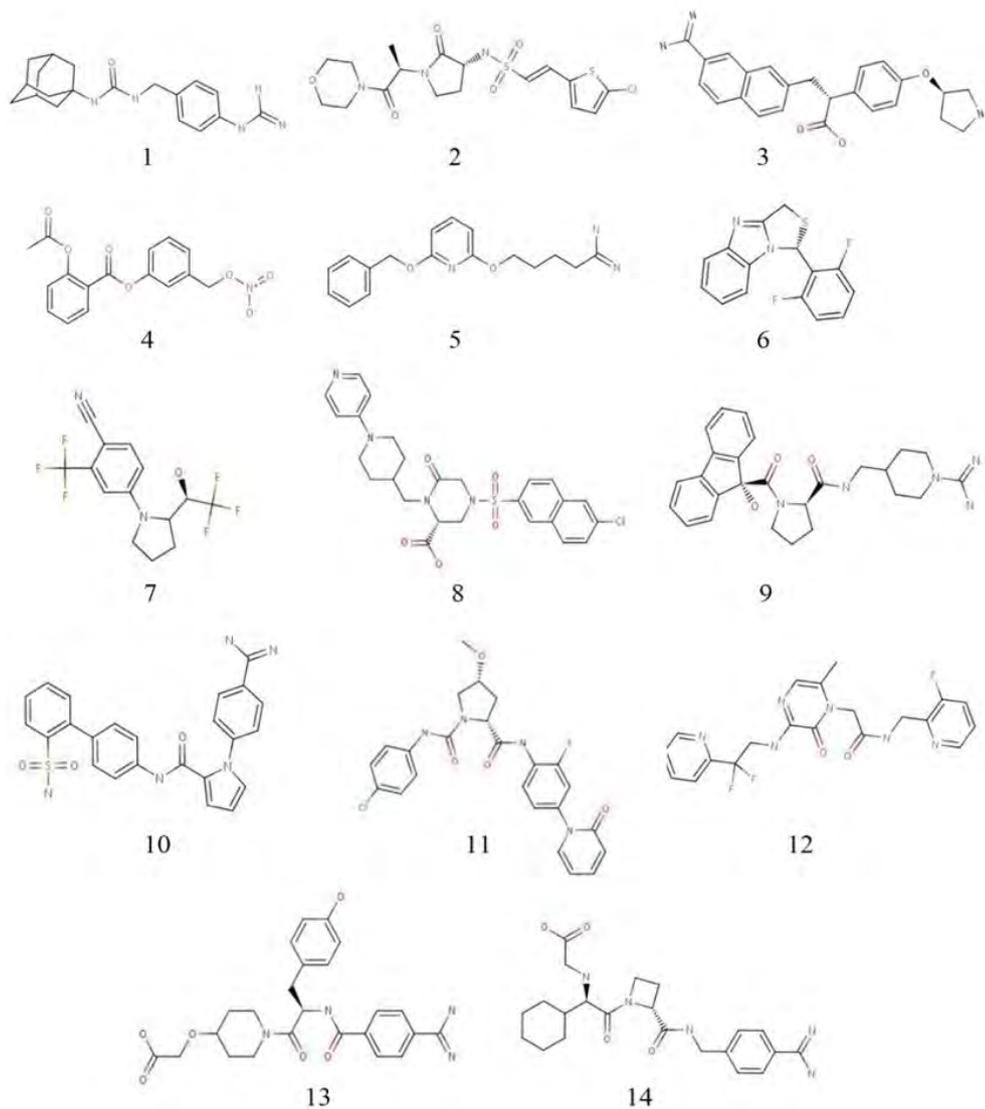


Рис. 3. Центроїди (ієрархічна кластеризація структури), отримані в результаті кластеризації 987 інгібіторів серинових протеїназ в пакеті ICM.

В модельних системах *in vitro*, які включали очищений препарат тромбіну, було проведено скринінг інгібіторної здатності синтезованих сполук та показано, що дві сполуки (№2 та №9) виявляють здатність інгібувати тромбін. Крім того, з

використанням плазми крові та активатора фактора X, було показано, що сполуки №2 та №9 менш ефективні щодо фактора Ха (гомологічного тромбіну), тобто є селективними (рис. 4).

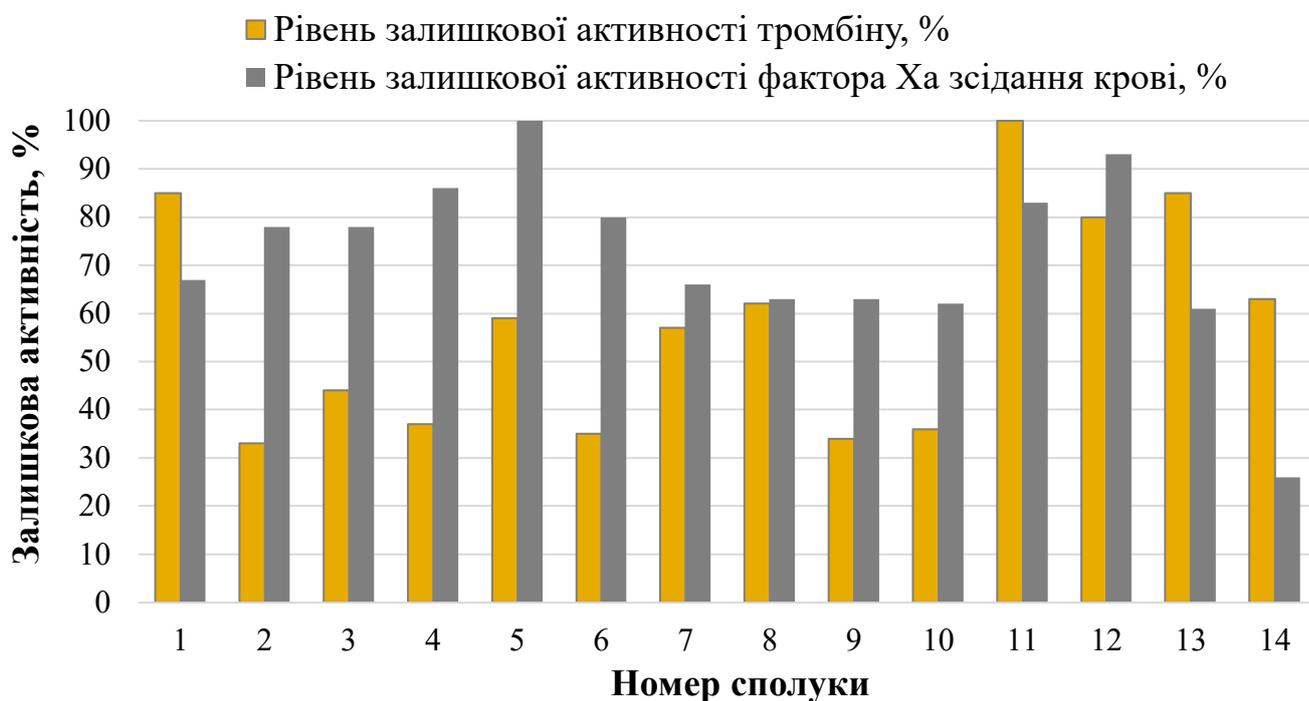


Рис. 4. Інгібування тромбіну та фактора Ха зсідання крові низькомолекулярними сполуками.

Було продемонстровано конкурентну природу інгібування тромбіну сполуками №2 та №9, тобто підтверджено їх зв'язування з активним центром тромбіну.  $IC_{50}$  для сполук №2 та №9 становило 192 та 234 мкг/мл, відповідно.

За допомогою молекулярної динаміки було оцінено внесок різних типів нековалентних взаємодій у процес зв'язування обраних сполук з активним центром тромбіну (рис. 5). Зокрема, для сполуки №2 це, в основному, водні містки, та в меншій мірі водневі та гідрофобні взаємодії. Особливу увагу слід звернути на те, що гідрофобний замісник сполуки № 2 (2-хлор-тіофен) займає положення в S1 кишені тромбіну (рис. 6, А).

Сполука №9 переважно взаємодіє з тромбіном завдяки водневим зв'язкам та в меншій мірі за рахунок водних містків та гідрофобних взаємодій (рис. 5). 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. 6, Б).

В модельній системі *in vivo* при внутрішньовенному введенні обраних сполук щурам (0,5 мг/кг маси тіла), спостерігали зниження активності тромбіну в плазмі крові дослідних тварин (рис. 7, А), проте активність фактора Ха зсідання крові не змінювалась (рис. 7, Б), що підтверджує селективність дії обраних інгібіторів. Крім того, введення сполук №2 та №9 спричиняло пригнічення АЧТЧ-індукованої агрегації тромбоцитів, повне інгібування тромбін-індукованої активності та агрегації тромбоцитів.

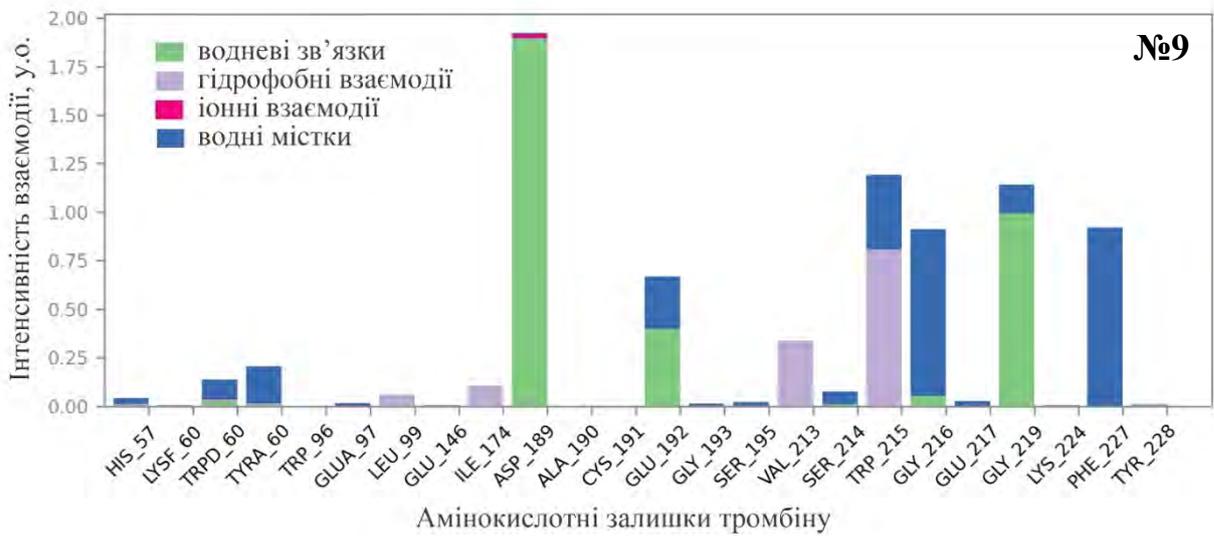
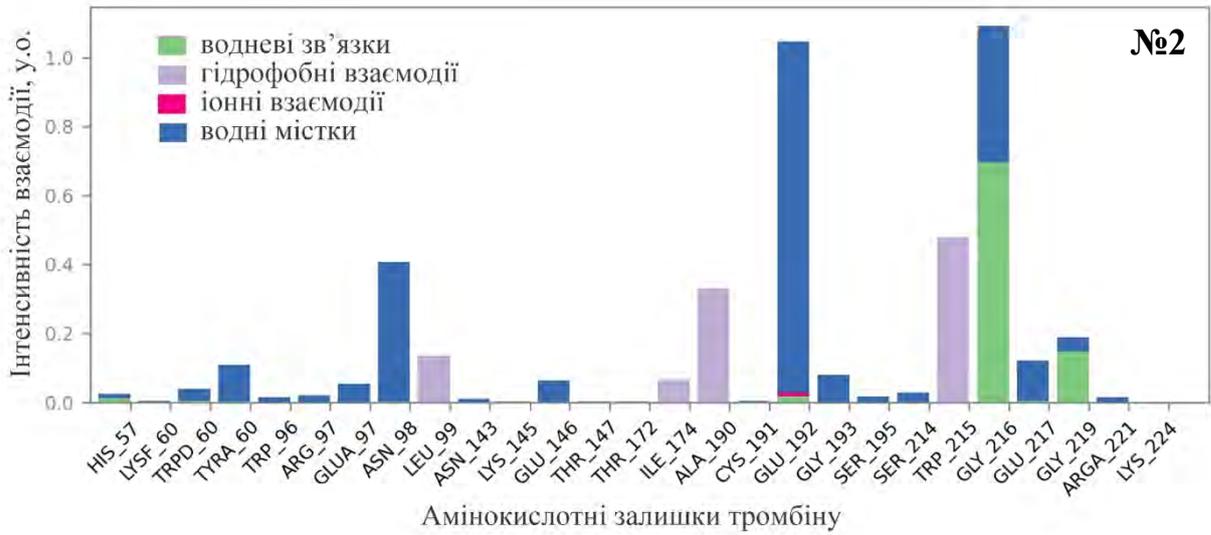


Рис. 5. Внесок нековалентних взаємодій у процес зв'язування тромбіну зі сполуками №2 та №9 за типами.

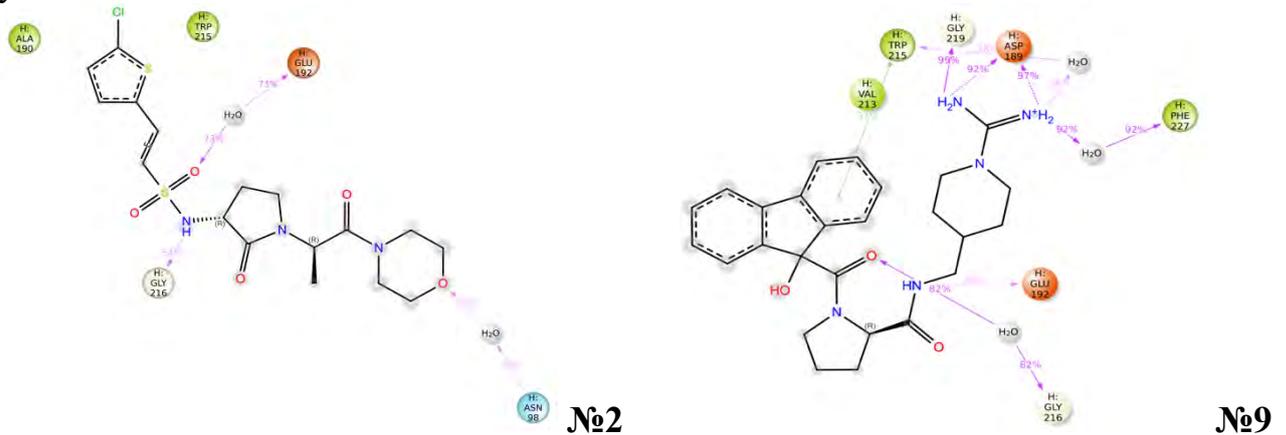


Рис. 6. Схематичне зображення взаємодії атомів сполуки № 2 та № 9 із амінокислотними залишками тромбіну.

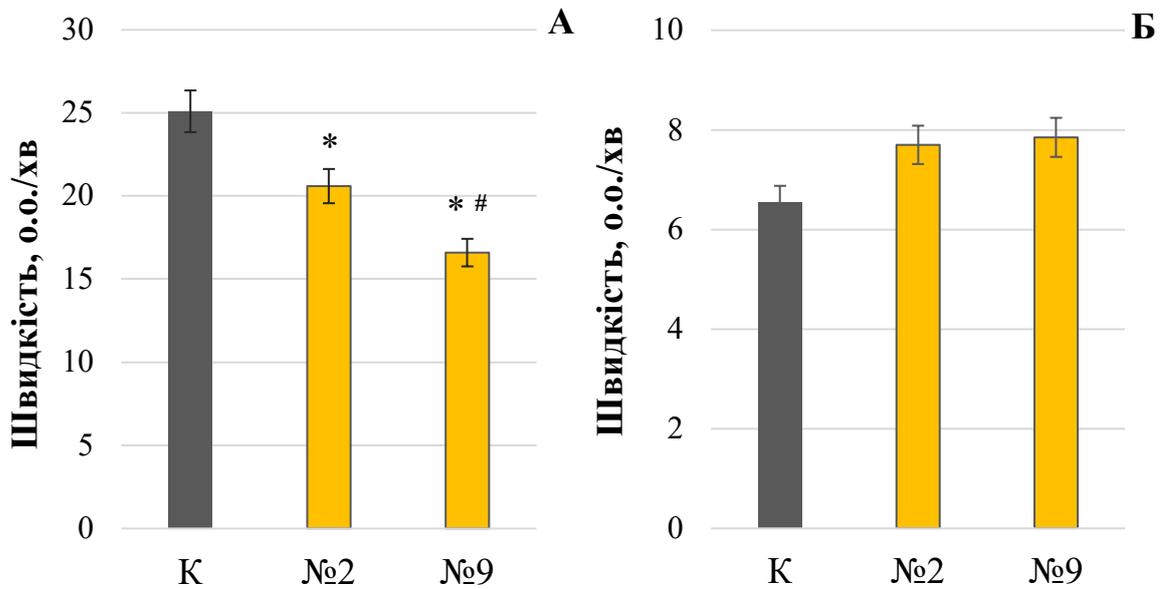


Рис. 7. Швидкість розщеплення тромбін-специфічного (А) та фактор Ха-специфічного (Б) субстратів в активованій АЧТЧ-регентом плазмі крові контрольних щурів (К) та щурів, яким вводили інгібітори №2 та №9.

\* – 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, було обрано за допомогою біоінформатичного аналізу та синтезовано низькомолекулярні сполуки, специфічні до активного центру тромбіну. Проведений біологічний скринінг *in vitro* дозволив обрати сполуки, які ефективно та селективно інгібували активність тромбіну та *in vivo* пригнічували формування фібриново-тромбоцитарного тромбу. Це дає підстави стверджувати, що дані сполуки можуть стати основою для створення прототипу високоафінного антитромботичного препарату.

### *Застосування активатора протромбіну у медицині*

#### Модифікація біоматеріалів екамуліном.

Всі існуючі на даний момент кровоспинні біоматеріали не є специфічними до ензимів системи зсідання, натомість працюють за рахунок фізико-хімічних взаємодій з компонентами крові. Ми пропонуємо використовувати специфічний ензимний активатор протромбіну з отрути *Echis multisquamatus* (екамулін), який, оминаючи весь каскад зсідання, безпосередньо активує протромбін до тромбіну, що забезпечує формування стабілізованого фібринового згустку.

На першому етапі були нековалентно модифіковані гемостатичні біоматеріали трьох основних типів – біоінертні (целюлозне волокно, гідроксиапатит), біоактивні (вуглецевий сорбент, діоксид кремнію) та біорозкладні (колаген, желатин).

З використанням хромогенного субстрату S2302, що розщеплюється екамуліном, детектували вимивання екамуліну з біоматеріалів у фізіологічному розчині та

показали, що деякі з них здатні утримувати на своїй поверхні екамулін за рахунок нековалентних взаємодій (рис. 8).

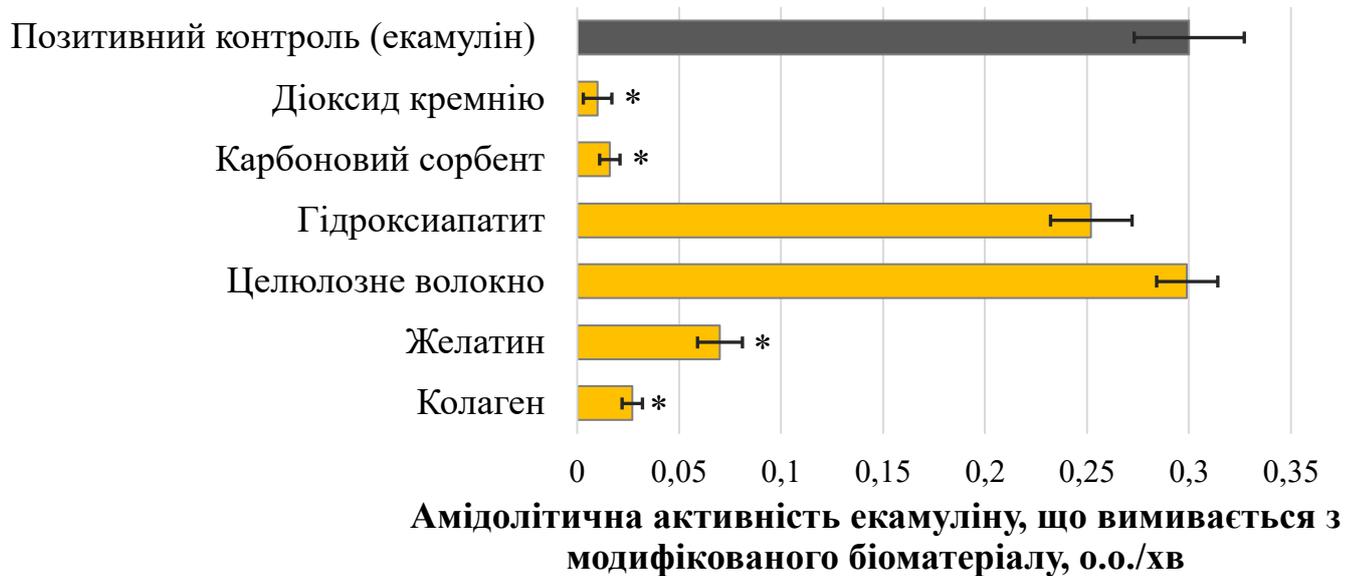


Рис. 8. Вимивання екамуліну з модифікованих біоматеріалів, визначене за розщепленням хромогенного субстрату S2302.

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

В модельних системах *in vitro* було продемонстровано, що модифікація біоматеріалів екамуліном значно прискорює утворення фібриново-тромбоцитарного тромбу, порівняно з немодифікованими біоматеріалами. В якості прикладу, на рис. 9 наведено формування фібриново-тромбоцитарного тромбу в збагаченій тромбоцитами плазмі крові в присутності модифікованих екамуліном колагену та карбонового сорбенту.

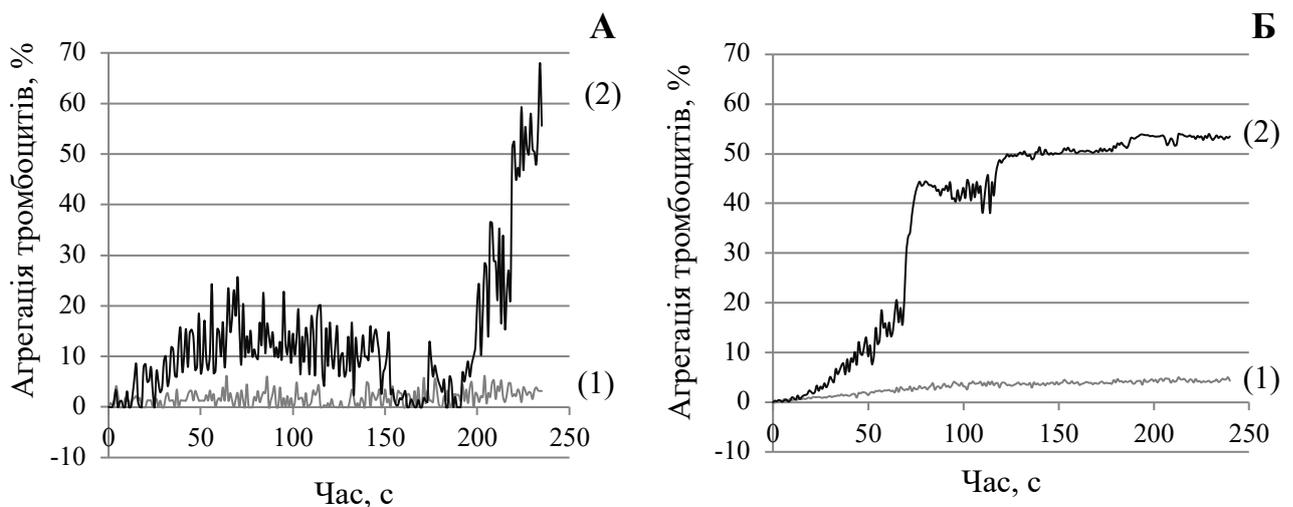


Рис. 9. Агрегатометрія збагаченої тромбоцитами плазми крові людини у присутності немодифікованих (1) та модифікованих екамуліном (2) біоматеріалів:

А – колаген, Б — вуглецевий сорбент.

На моделі паренхіматозної кровотечі у щурів *in vivo* було показано, що модифікований екамуліном колаген та карбоновий сорбент здатні значно скорочувати час кровотечі, а отже є перспективними матеріалами для створення гемостатичних засобів (рис. 10).

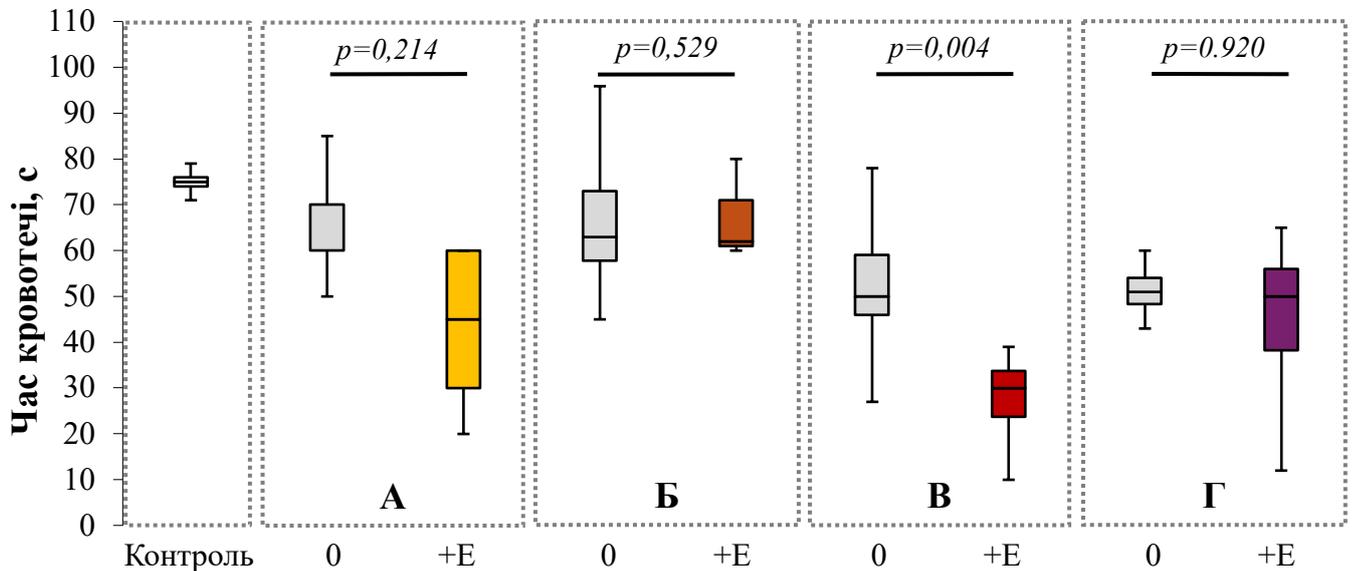


Рис. 10. Час кровотечі при застосуванні немодифікованих (0) та модифікованих екамуліном (+E) біоматеріалів: А – колаген, Б – желатин, В – вуглецевий сорбент, Г – діоксид кремнію. Контроль – час кровотечі без застосування гемостатичних матеріалів.

#### Модифікований екамуліном карбоновий сорбент.

На основі карбонового сорбенту і екамуліну було створено пілотну партію композиту адсорбційного гемостатичного «Карбогемостат». Він успішно пройшов доклінічні дослідження, які підтвердили його безпечність.

За погодження Державною службою України з лікарських засобів та контролю за наркотиками, було проведено клінічні дослідження ефективності та безпечності «Карбогемостату» на базі КНП «Київський міський клінічний ендокринологічний центр» під керівництвом лікаря ортопеда-травматолога вищої кваліфікаційної категорії, к.мед.н. А.І. Гаврецького. Суб'єктом досліджень були пацієнти, які мають зовнішню свіжу чи інфіковану рану кінцівок, що супроводжується артеріальною та профузною кровотечею і потребують зовнішнього застосування перев'язувального матеріалу з кровоспинною активністю. В дослідженні взяло участь 40 пацієнтів: група порівняння (n=10), група порівняння, якій проводили антикоагулянтну терапію (n=10), досліджувана група (n=10), досліджувана група, якій проводили антикоагулянтну терапію (n=10).

У всіх випадках застосування «Карбогемостату» кровотеча зупинялась не більше як за 3 хвилини, навіть на фоні антикоагулянтної терапії. Для підтвердження безпечності медичного виробу, характеризували стан системи гемостазу до та після застосування «Карбогемостату», або накладання тиснучої пов'язки (група порівняння). Досліджувані параметри системи гемостазу достовірно не відрізнялись у пацієнтів дослідної та контрольної груп, тобто безпечність виробу була

підтверджена в клінічних дослідженнях. Зокрема, на рис. 11 представлені дані щодо накопичення маркера тромбоутворення – розчинних фібрин-мономерних комплексів (РФМК) – після застосування «Карбогемостату» на фоні антикоагулянтної терапії. Таким чином, «Карбогемостат» був успішно впроваджений в хірургічну практику на базі КНП «Київський міський клінічний ендокринологічний центр».

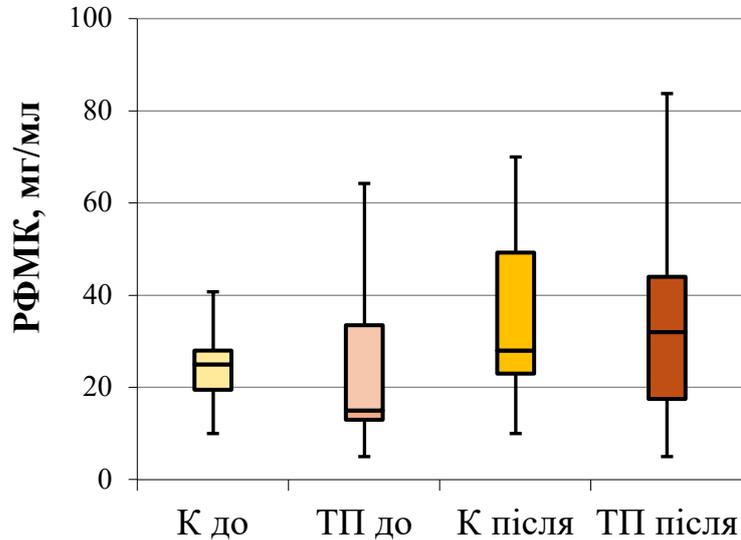


Рис 11. Концентрація розчинних фібрин-мономерних комплексів (РФМК) у плазмі крові пацієнтів, яким проводили антикоагулянтну терапію, до та після зупинки кровотечі «Карбогемостатом» (К до / К після) або тиснучою пов'язкою (ТП до / ТП після).

#### Модифікований екамуліном колаген.

Шляхом модифікації екамуліном колагенових матриць, було створено кровоспинний засіб, здатний до біодеградації. Було підбрано умови його виготовлення та стерилізації. Зокрема, на моделі паренхіматозної кровотечі у щурів (рис. 12) було підбрано оптимальну кількість екамуліну: 10 мкг/см<sup>2</sup> матриці.

Модифікована екамуліном колагенова матриця успішно пройшла доклінічні дослідження на кролях альбіносах (відповідно до стандартів GLP), які підтвердили її безпечність. За результатами гістоморфологічних досліджень, імплантація модифікованої екамуліном колагенової матриці не спричиняла змін у прилеглих тканинах, порівняно з хірургічним втручанням без імплантації (рис. 13). Печінка кролів контрольної групи мала звичайну балочну структуру з добре помітними центральними венами (А1) і триадами, без ознак ушкодження. У зоні пошкодження відмічали загоєння тканини печінки з поступовим заміщенням пошкодженої ділянки печінки гепатоцитами звичайної будови (А2). Гепатоцити дослідних тварин містили прозору цитоплазму, а також накопичували глікоген (Б1). У більшості тварин виявлено накопичення жирової тканини, утворення судиноподібних структур у тканині печінки (Б2). В досліджених зразках не спостерігали залишків колагенової субстанції, що свідчить про її деградацію.

Крім того, була продемонстрована можливість додатково вводити в склад модифікованих екамуліном колагенових матриць додаткові компоненти (повідон-йод

та цефтіофур). Такі матриці були впроваджені в ветеринарію для обробки виразки підошви великої рогатої худоби.

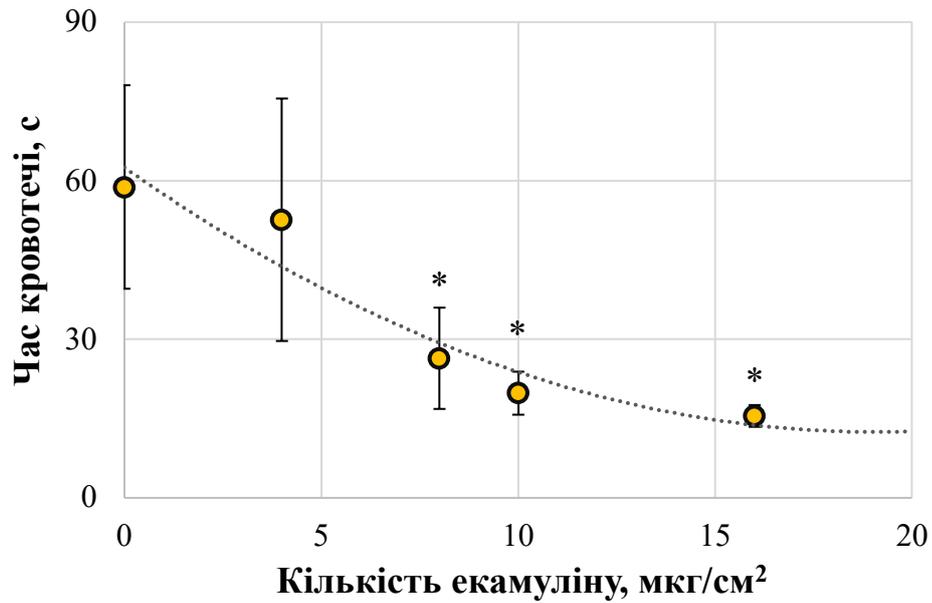


Рис. 12. Залежність часу зупинки кровотечі від кількості екамуліну на 1 см<sup>2</sup> колагенової матриці на моделі паренхіматозної кровотечі у шурів.  
\* – за тестом Манна-Уїтні результат достовірний при  $p < 0,05$ , порівняно з часом кровотечі при використанні колагенової матриці без активатора.

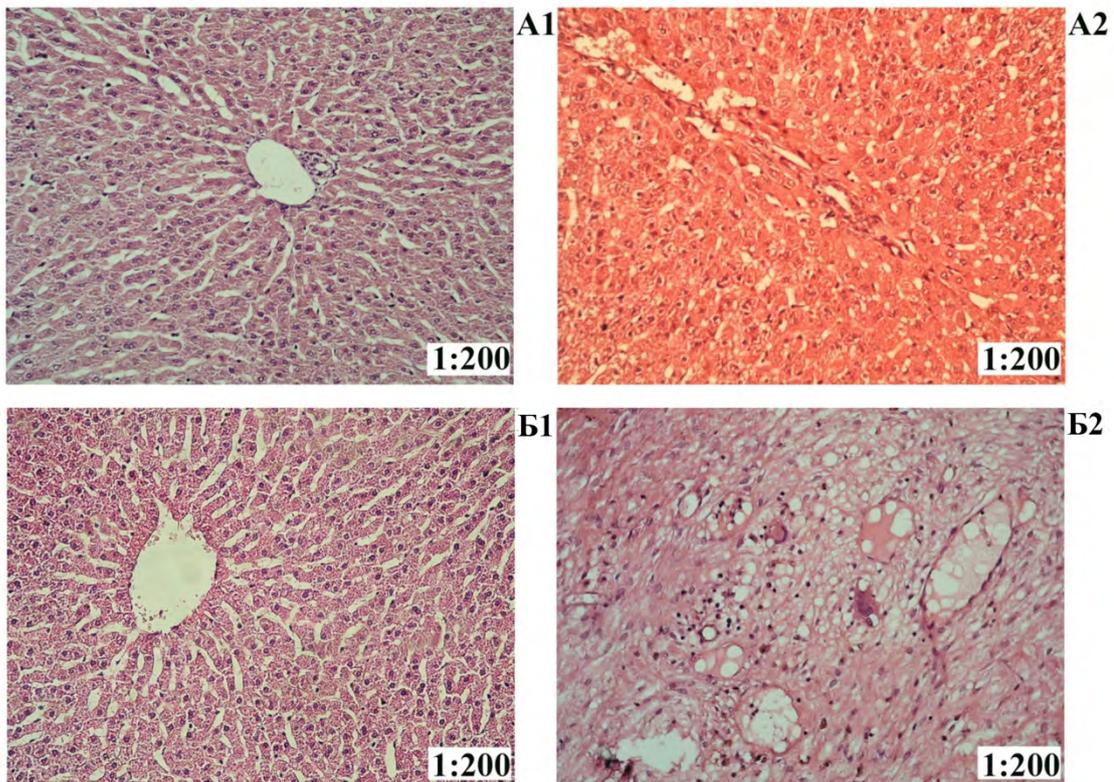


Рис. 13. Гістологія тканин у моделі ушкодження печінки у кролів в контрольній групі (А) та при використанні модифікованої екамуліном колагенової матриці (Б).

### Аутологічний фібриновий гель.

Активатор протромбіну також можна використовувати для створення аутологічного фібринового гелю, який прискорює регенерацію тканин. Використання екамуліну дає змогу створити умови, при яких фібриновий гель формується за зручний для хірурга час (рис. 14). Поряд з тим, використання аутологічної плазми крові пацієнта, замість препаратів фібриногену, дає змогу уникнути зараження чи імунних реакцій, а також дозволяє формувати фібриновий гель з плазми крові, збагаченої тромбоцитами, що може надавати йому протизапальних властивостей.

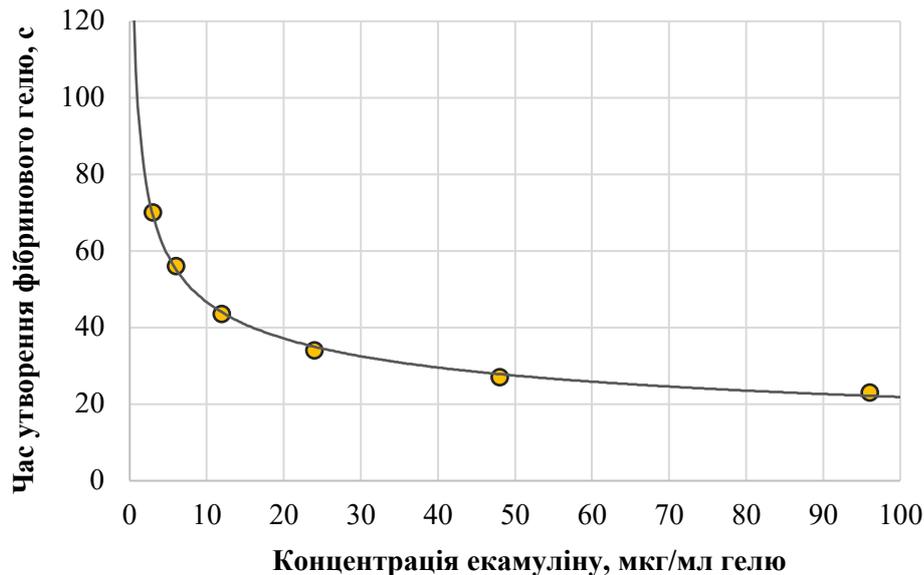


Рис. 14. Залежність часу утворення фібринового гелю з плазми крові людини від концентрації екамуліну в розрахунку на кінцевий об'єм фібринового гелю.

Було показано, що екамулін може бути стерилізований фільтрацією без втрати ензиматичної активності і, що дуже важливо, водний розчин екамуліну може зберігатися до 12 місяців при кімнатній температурі, не втрачаючи коагуляційної активності (рис. 15). Це є значною перевагою, порівняно з іншими існуючими двокомпонентними фібриновими клеями, які потребують спеціальних умов зберігання, таких як ліофілізація чи заморожування.

Було створено пілотну партію Комплекту для одержання аутологічного фібринового гелю для використання в хірургії і проведено доклінічні дослідження, відповідно до стандартів GLP, що засвідчили його безпечність. Екамулін, при дворазовому підшкірному введенні кролям альбіносам у вигляді аутологічного фібринового гелю, характеризувався доброю місцевою переносимістю. Ознак загальнотоксичної дії за дослідженими показниками не встановлено.

Комплект для одержання аутологічного фібринового гелю успішно пройшов клінічні дослідження на базі ТОВ «Мед Сервіс Консалтинг» під керівництвом хірурга-проктолога вищої категорії, к.мед.н. О.П. Косенка. Суб'єктом дослідження були пацієнти, які страждають на гострі та хронічні форми комбінованого геморою та потребують проведення тотальної циркулярної гемороїдектомії з лоскутною анопластиком. В дослідженні взяли участь 30 пацієнтів: група порівняння, пацієнти,

яким проводилась класична анопластика (n=15), та пацієнти, яким при проведенні анопластики аутологічний фібриновий гель вводили підлоскутно (n=15).

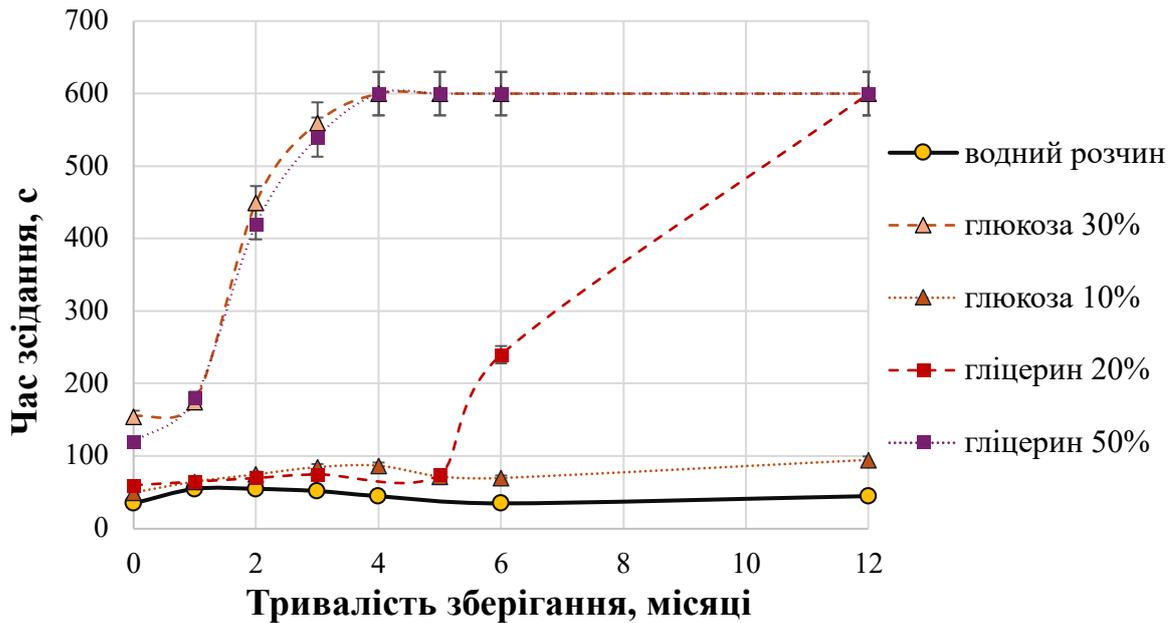


Рис 15. Залежність коагуляційної активності екамуліну від часу зберігання у водному розчині, 10% та 30% розчині глюкози, 20% та 50% розчині гліцерину. Коагуляційну активність визначали як час утворення згустку в 100 мкл цитратної плазми крові за дії 5 мкг екамуліну в присутності 8 мМ  $\text{CaCl}_2$ .

Для підтвердження ефективності застосування Комплекту для одержання аутологічного фібринового гелю, оцінювали частоту діастазів у пацієнтів після операції. В перший тиждень після операції у пацієнтів, яким вводили фібриновий гель, частота діастазів скорочувалася (рис. 16). Крім того, у контрольних пацієнтів, в разі, якщо шви розходилися, майже в половині випадків відривалися всі три лоскути. У дослідних пацієнтів такої картини не спостерігали.

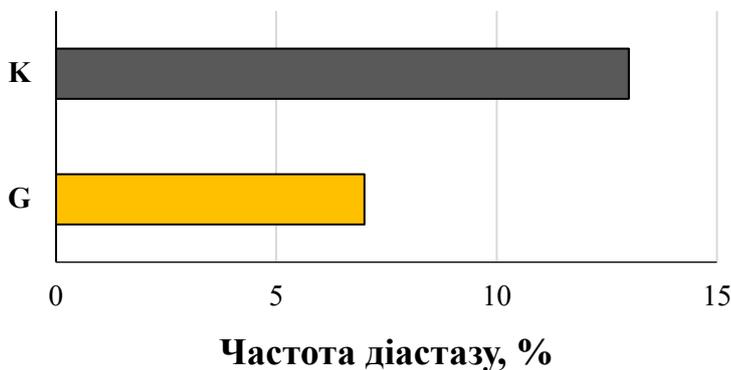


Рис. 16. Частота появи діастазів у пацієнтів дослідної групи (G) і групи порівняння (K) на 1-7 добу після операції.

Для оцінки безпечності застосування комплекту для одержання аутологічного фібринового гелю, було проведено порівняння стану швів та прилеглих тканин після проведення лоскутної анопластики. Зокрема, визначали наявність запального процесу та алергічної реакції, збирали дані щодо суб'єктивного стану пацієнтів, зокрема

наявності больового синдрому. Відмінностей у пацієнтів дослідної та контрольної груп не було виявлено.

Таким чином, Комплект для одержання аутологічного фібринового гелю було успішно впроваджено у хірургічну практику, а згодом впроваджено у виробництво на базі аптеки №2 «ХЕМОТЕКА» ПП «Інфузія».

#### Рекомбінантний аналог активатора протромбіну.

Для здешевлення виробів медичного призначення на основі екамуліну було створено рекомбінантний аналог – активатор протромбіну на основі екарину з отрути *Echis carinatus*. Отриманий ензим володів коагуляційною активністю, зокрема на рис. 17 представлено утворення фібриново-тромбоцитарного тромбу за його дії на збагачену тромбоцитами плазму крові.

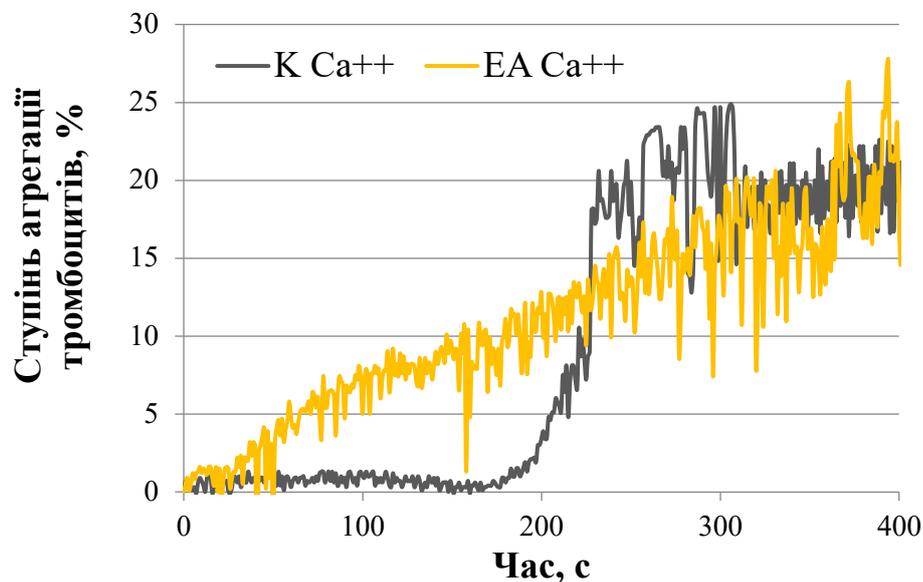


Рис. 17. Утворення фібриново-тромбоцитарного тромбу в плазмі крові, збагаченій тромбоцитами, за дії рекомбінантного ензимного активатора протромбіну (0,3 мкг/мл) та 0,001 М CaCl<sub>2</sub> (ЕА).

К – контрольна проба, до якої було внесено еквівалентний об'єм буфера для елюції та 0,001 М CaCl<sub>2</sub>.

Доклінічні дослідження, відповідно до стандартів GLP, рекомбінантного активатора протромбіну у вигляді аутологічного фібринового гелю засвідчили його безпечність, як за клінічними даними, так і за даними макроскопії внутрішніх органів тварин та гістопатоморфології.

Отже, 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, у складі яких є екамулін або його рекомбінантний аналог, є безпечним та ефективним, що доведено у доклінічних та клінічних дослідженнях.

### Виявлення патологічної внутрішньосудинної генерації тромбіну

Тромбін – мультисубстратний ензим, тож потенційно в кровотоці можна виявляти продукти його ензиматичної активності. 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 важливий результат активації факторів V і VIII тромбіном, який можливо детектувати, – це стимуляція формування тромбіну.

Домінантними субстратами «швидкого» ( $\text{Na}^+$ -зв'язаного) тромбіну в плазмі крові є протромбін та фібриноген (рис. 18). Тромбін може відщеплювати фрагмент F1 (Gla-домен) протромбіну, гідролізуючи пептидний зв'язок Arg155-Ser156 свого попередника з утворенням ензиматично неактивного продукту – претромбіну-1. Претромбін-1 не містить активного центру 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 претромбін-1 може бути детектована.

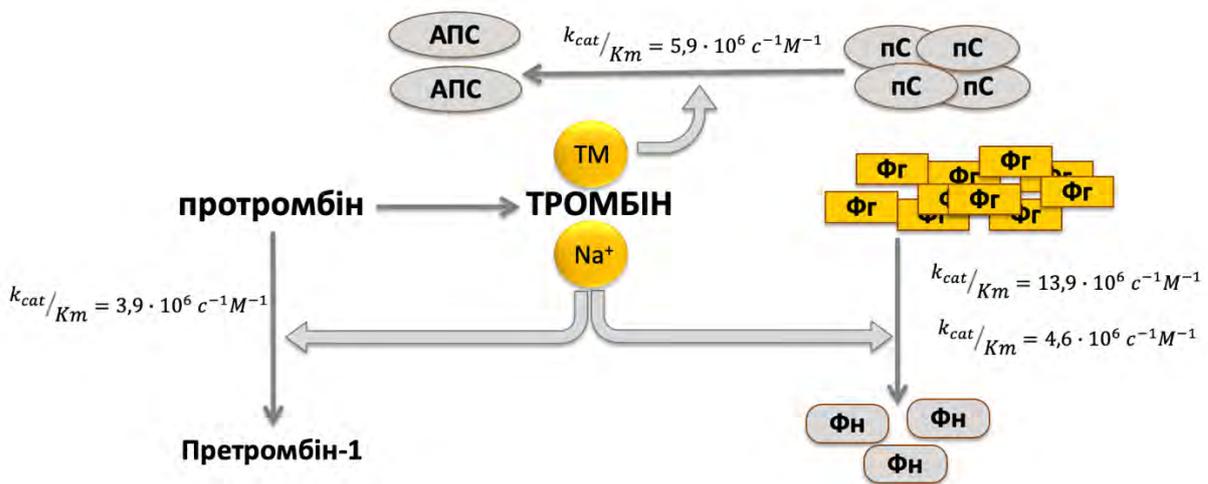


Рис. 18. Схема ензиматичної активності тромбіну, що може бути детектована *in vivo*. Тромбін розщеплює протромбін з утворенням претромбіну-1 (неактивного похідного протромбіну); за участю тромбомодуліну (ТМ) активує протеїн С (пС) з утворенням активованого протеїну С (АПС); відщеплює фібринопептиди А та В фібриногену (Фг) з утворенням фібрину (Фн).

Концентрація другого доміантного субстрату «швидкого» тромбіну, фібриногену, складає 7,6 мкМ. Тромбін послідовно відщеплює з N-кінця молекули фібринопептиди А, а потім фібринопептиди В. Утворений фібрин desA може формувати олігомерні комплекси з фібриногеном (розчинний фібрин) та бути детектований за допомогою методу ELISA. Комплекси олігомерного фібрину з фібриногеном та продуктами розщеплення фібрину не утворює протофібрили та в клінічній практиці визначається як розчинні фібрин-мономерні комплекси (РФМК).

Лише два продукти, які утворюються під дією тромбіну – активований протеїн С та фактор XIIIa – мають ензиматичну 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. Протеїн С активується «повільним» ( $\text{Na}^+$ -незв'язаним) тромбіном в комплексі з тромбомодуліном інтактних ендотеліоцитів (рис. 18). Концентрація протеїну С в плазмі крові становить 0,06 мкМ, але його легко детектувати в плазмі крові, оскільки продуктом розщеплення протеїну С тромбіном є ензим – активований протеїн С.

Всі три субстрати (фібриноген, протромбін, протеїн С) є рівноцінними, оскільки ефективність їх розщеплення є близькою (рис. 18). Тому для детектування тромбіну нами були обрані такі результати його появи в кровотоці: збільшення концентрації претромбіну-1, накопичення розчинного фібрину та зниження вмісту протеїну С.

### Розробка способу детектування претромбіну-1.

Для визначення концентрації претромбіну-1 в плазмі крові ми запропонували використовувати пару коагуляційних тестів. Протромбіновий тест, в якому тромбопластин активує лише функціонально активний протромбін до тромбіну, і екамуліновий тест, де екамулін активує до тромбіну як інтактний протромбін, так і претромбін-1 (рис. 19). Таким чином, за різницею результатів цих двох тестів, можна якісно оцінити появу претромбіну-1.

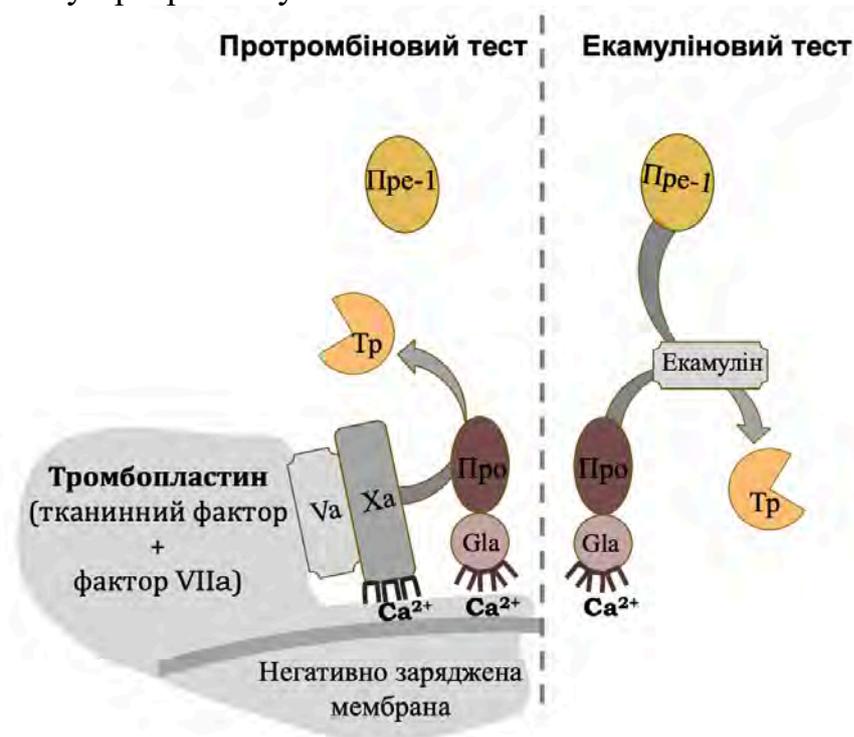


Рис. 19. Схема проведення екамулінового та тромбопластинового тестів. Тромбопластин забезпечує активацію інтактного протромбіну (Про) протромбіназою (Va Ха) на негативно зарядженій поверхні, але не активує претромбін-1 (Пре-1). Натомість, Екамуліновий тест перетворює протромбін та претромбін-1 на тромбін (Тр), що детектується за розщепленням хромогенного субстрату.

Наявність претромбіну-1, детектована запропонованим способом в зразках плазми крові ми підтверджували вестерн-блот аналізом з використанням поліклональних антитіл до протромбіну (рис. 20).

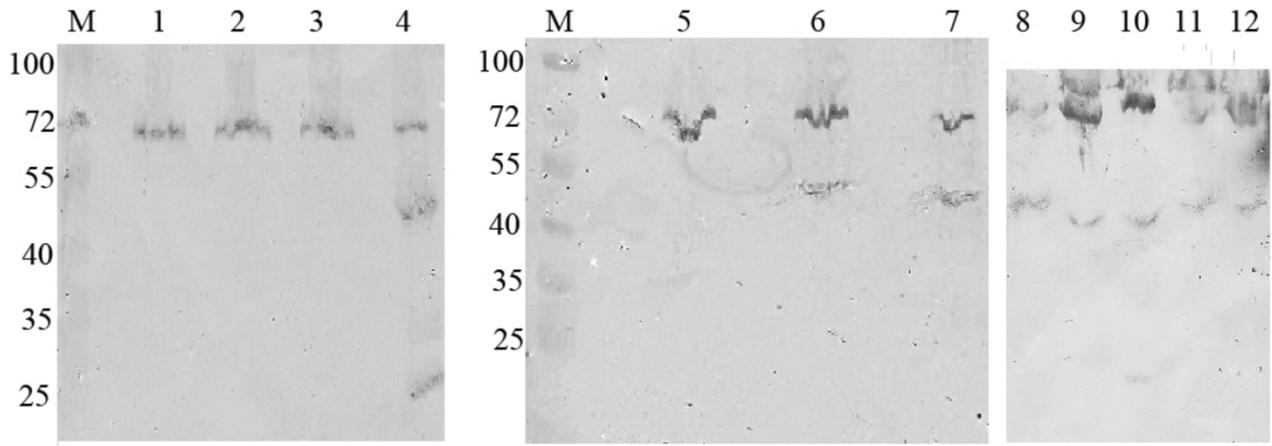


Рис. 20. Вестерн-блот аналіз плазми крові пацієнтів з протромбін-специфічними антитілами.

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; 4 – суміш протромбіну, претромбіну-1 і тромбіну (позитивний контроль).

Створена калібрувальна крива (рис. 21) дозволила перейти від якісної оцінки різниці результатів тестів протромбінового та екамулінового тестів до кількісного визначення претромбіну-1 в плазмі крові (рис. 22). Розроблений тест для кількісного виявлення претромбіну-1 в плазмі крові був впроваджений в лабораторну практику на базі біохімічної лабораторії ДУ «Інститут отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка Національної академії медичних наук України».

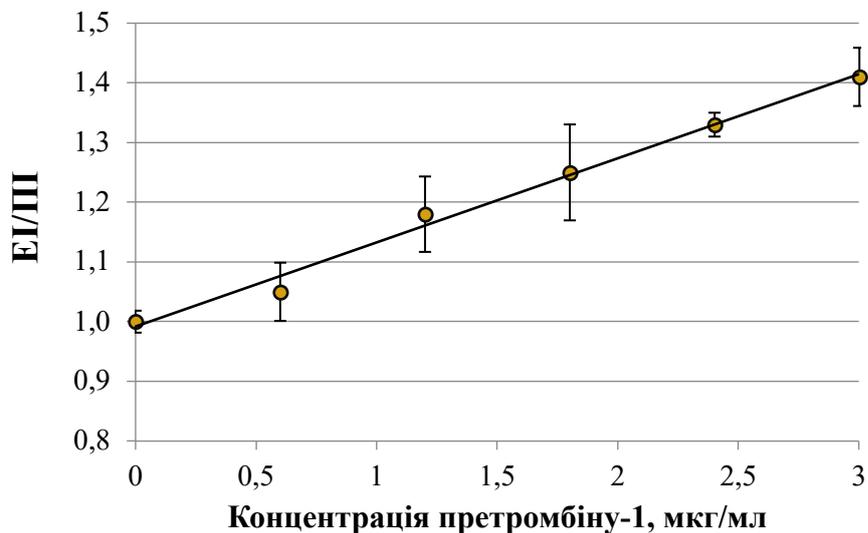


Рис. 21. Калібрувальний графік для визначення рівню претромбіну-1 в плазмі крові за відношенням екамулінового (ЕІ) та протромбінового (ПІ) індексів.

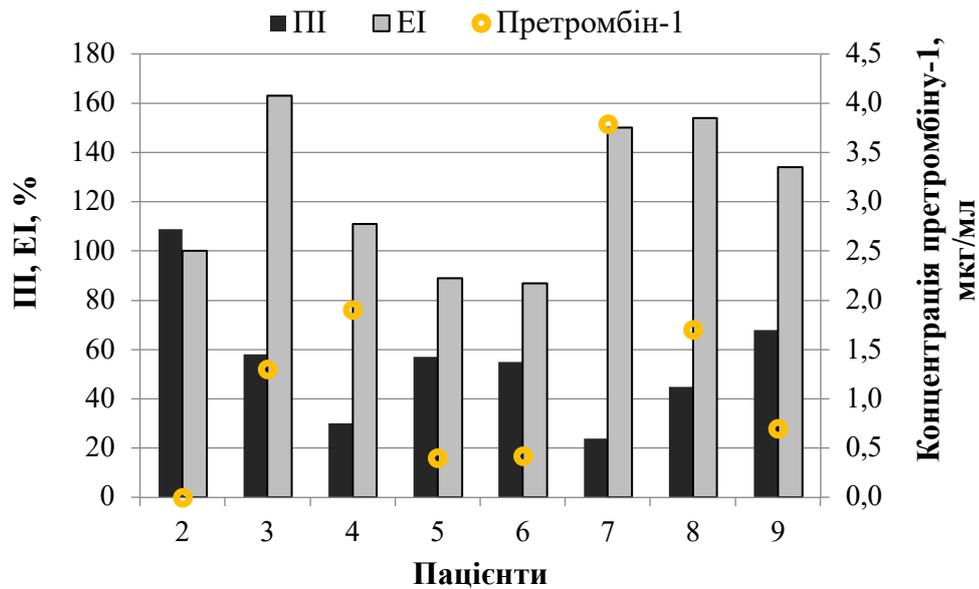


Рис. 22. Концентрація претромбіну-1 в плазмі крові пацієнтів, визначений за калібрувальним графіком (рис. 21). ПТ – протромбіновий індекс; ЕІ – пекамуліновий індекс.

#### Розробка способу детектування протеїну С.

Для визначення вмісту протеїну С в плазмі крові використовують функціональні тести, що полягають в активації протеїну С плазми крові екзогенним активатором. Результати тестів визначають за розщепленням хромогенного субстрату або ж за подовженням часу зсідання плазми крові в тесті АЧТЧ. Такі тести дають уявлення про потенціал антикоагулянтної ланки системи гемостазу, але не визначають реальну концентрацію протеїну С.

Нами було розроблено імуноензимну тест-систему для визначення концентрації протеїну С в плазмі крові. Ця робота була розпочата у відділі молекулярної імунології Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, потім продовжена в відділі структури і функції білка. Було створено бібліотеку моноклональних антитіл до протеїну С, показано, що вони розпізнають протеїн С, але не інші гомологічні вітамін К-залежні протеїни (табл. 1).

Таблиця 1.  
Бібліотека моноклональних антитіл до протеїну С.

<b>Маркування гібридоми</b>	<b>Антиген, яким імунізували мишей</b>	<b>Ізотип</b>
III-4A	Протеїн С з плазми крові донорів	IgG <sub>2b</sub>
IV-5A	Рекомбінантний протеїн С	IgG <sub>1</sub>
III-5C	Рекомбінантний протеїн С	IgG <sub>1</sub>
II-4d	Рекомбінантний протеїн С	IgG <sub>2b</sub>
IV-6A	Кон'югат BSA-пептиду та С-кінця Н-ланцюга протеїну С	IgG <sub>3</sub>
III-5D	Кон'югат KLH- пептиду та С-кінця Н-ланцюга протеїну С	IgG <sub>2b</sub>

Було підібрано пару антитіл, яка здатна детектувати протеїн С в бісайтовому імуноензимному аналізі, а також показано, що рекомбінантний, нативний протеїн С, а також протеїн С плазми крові, детектуються цим методом у фізіологічних межах (рис. 23).

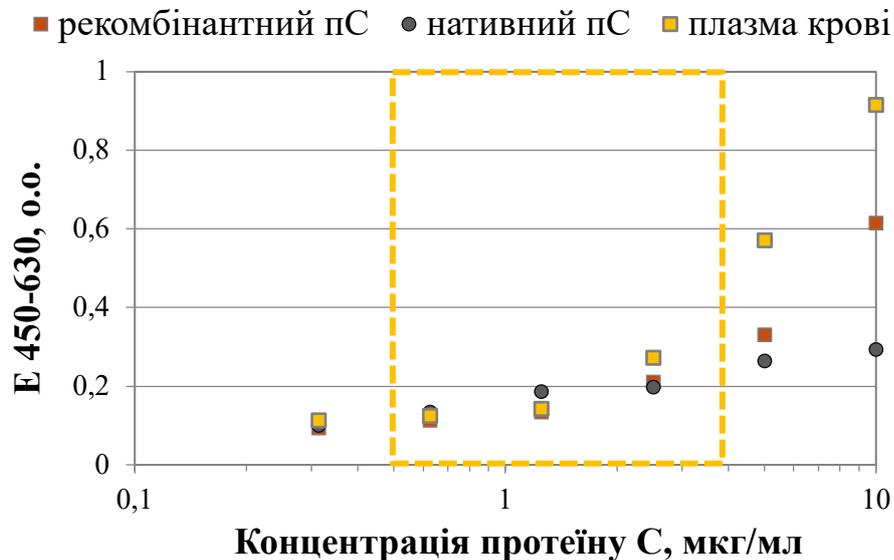


Рис. 23. Детектування протеїну С, виділеного з плазми крові донорів (нативний пС), рекомбінантного протеїну С (рекомбінантний пС) та протеїну С в плазмі крові донорів в сандвіч ELISA з використанням антитіла IV-6А та біотинильованого антитіла III-4А. Пунктиром позначено зону «робочої» концентрації для коректного використання методу.

Надалі було розроблено умови проведення тесту, зокрема підібрано буферну систему, спосіб блокування вільних місць зв'язування, підібрано концентрацію антитіл та, зрештою, апробовано цей тест на плазмі крові донорів.

#### Удосконалення методу визначення концентрації розчинного фібрину.

Раніше у відділі молекулярної імунології Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України було розроблено тест-систему для кількісного визначення розчинного фібрину в плазмі крові. Ми вдосконалили цю тест-систему. Зокрема, запропонували спосіб ліофілізації tag-антитіл, що спрощує зберігання тест-системи. Виявилось, що визначальними для збереження антитілами активності після розчинення є наявність стабілізатора (бичачого сироваткового альбуміну) та швидкість ліофілізації, яка визначається об'ємом і концентрацією антитіл.

Крім того, було введено стандартизацію калібратора (фібрину desAB) як електрофоретично, так і функціонально, за турбідиметрією. Це дає змогу оцінити не лише чистоту препарату, але й визначити ступінь гідролізу фібрину.

Слід окремо зазначити, що ми запропонували альтернативу tag-антитілу II-4d, яке розпізнає  $\gamma$ -ланцюг фібрин(оген)у – антитіло I-5A, яке розпізнає  $\alpha$ C регіон фібрин(оген)у (рис. 24). Таким чином, в модифікованому імуноензимному аналізі розчинний фібрин сорбується за рахунок зв'язування з catch-антитілом I-3C, специфічним до фібрину desAB. За допомогою антитіла I-5A можна диференціювати «ранні» форми розчинного фібрину (рис. 25, Б), які щойно утворилися, мають

інтактний  $\alpha$ C регіон і розпізнаються як I-5A, так і II-4d антитілами (рис. 25, А), та «пізній» розчинний фібрин, який вже піддався гідролізу плазміногеном, втратив  $\alpha$ C регіон і зв'язується лише з II-4d антитілом (рис. 25, В).

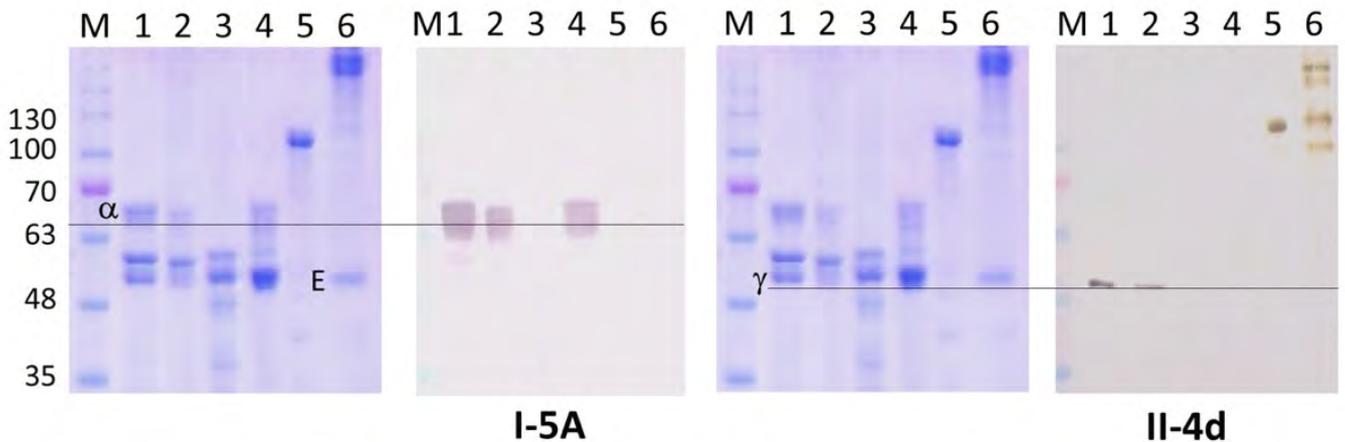


Рис. 24. Зв'язування моноклональних антитіл II-4d та I-5A у вестерн-блот аналізі з фібриногеном (1), фібрином desAB (2), фібрином desAB-desA $\alpha$ 414-610 (3), фібрином desAB-desB $\beta$ 1-42 (4), D-фрагментом (5) та DDE-комплексом (6). Аналіз зразків фібрин(оген)у проводили за присутності  $\beta$ -меркаптоетанолу. М – маркери молекулярної маси.

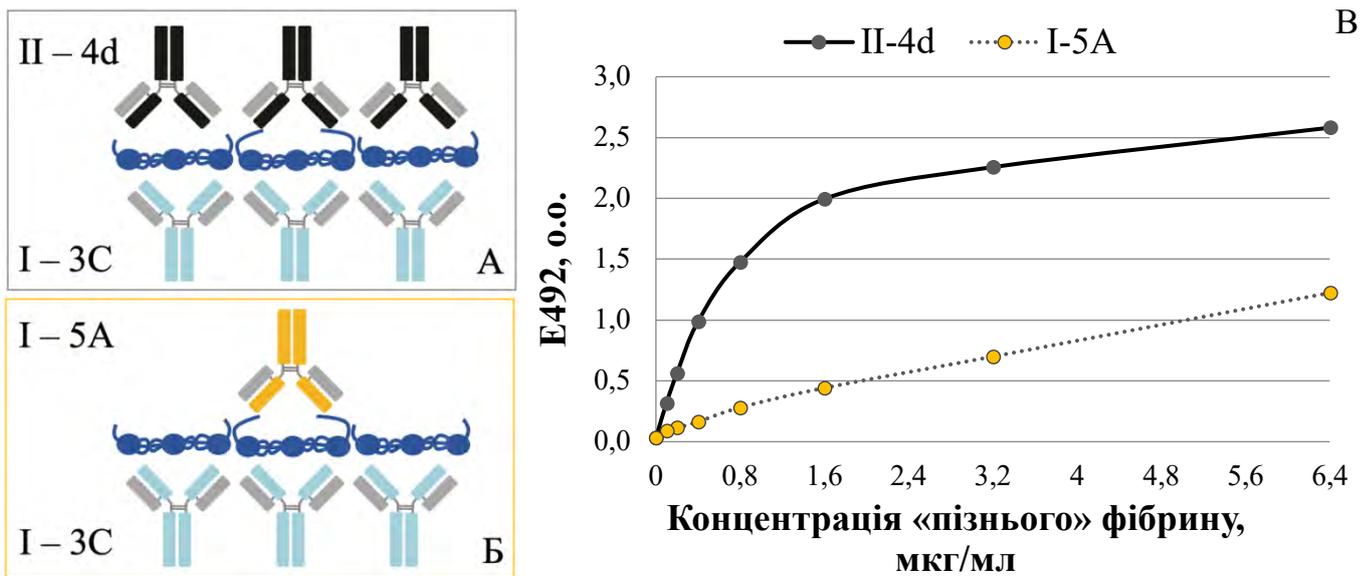


Рис. 25. Схема диференціювання «ранніх» форм розчинного фібрину (Б) та всіх форм розчинного фібрину (А) в бісайтовому ELISA аналізі. Зв'язування «пізнього» розчинного фібрину моноклональними tag-антитілами II-4d та I-5A в бісайтовому ELISA аналізі (В); catch-антитіло – специфічне до фібрину моноклональне антитіло I-3C.

Створену на основі цього підходу тест-систему було апробовано в медичних закладах міста Києва. Для спрощення підрахунку результатів тесту було створене програмне забезпечення.

Отже, було обрано три маркери появи тромбіну в кровотоці: зростання концентрації розчинного фібрину, претромбіну-1 та зниження вмісту протеїну С. Було розроблено та удосконалено методи кількісного визначення цих маркерів в плазмі крові.

Визначення ознак внутрішньосудинної генерації тромбіну за моделювання патологічних станів у тварин.

Інформативність обраних маркерів появи тромбіну в кровотоці було перевірено на модельних системах, асоційованих із запаленням, а саме: моделі променевої хвороби щурів, моделі LPS-індукованого запалення у мишей і моделі інсулінорезистентності у щурів.

Запальний процес тісно пов'язаний з роботою системи гемостазу. З одного боку, запалення сприяє експонуванню тканинного фактора, який запускає каскад зсідання крові, та підвищенню концентрації фібриногену, який є протеїном гострої фази запалення, а нейтрофільні позаклітинні пастки забезпечують негативну поверхню на якій збираються комплекси тенازی та протромбінази активно забезпечуючи роботу каскаду зсідання крові. З іншого боку, серинові проєїнази системи гемостазу, зокрема тромбін, активують PAR-рецептори клітин імунної системи. Тож, запальний процес часто супроводжується прокоагулянтними станами та порушенням балансу про- та антикоагулянтної ланок системи гемостазу.

За всіх вказаних моделей запалення на тваринах, було продемонстровано накопичення розчинних фібрин-мономерних комплексів (аналог розчинного фібрину), появу претромбіну-1 та зниження вмісту протеїну С (рис. 26).

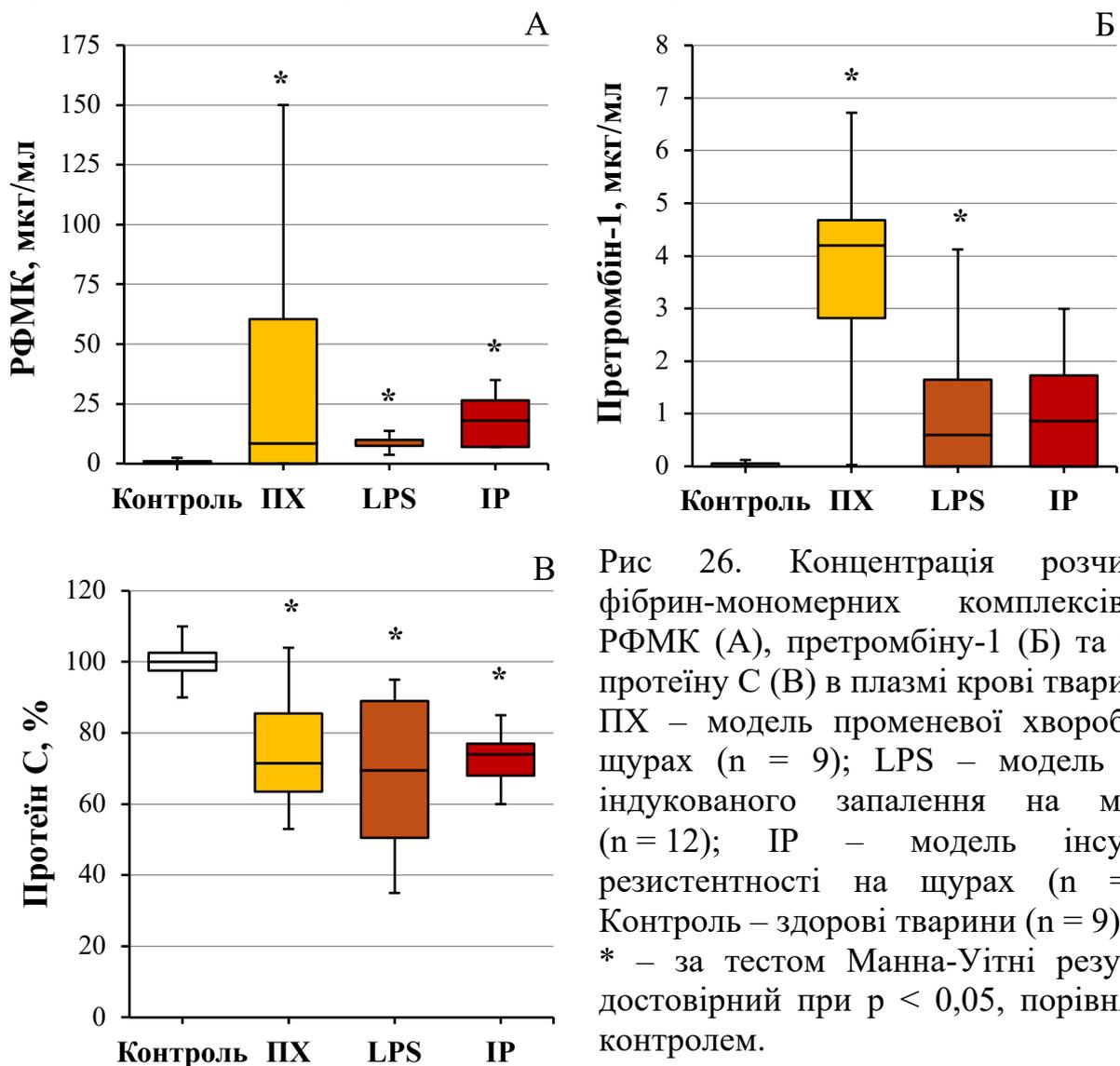


Рис 26. Концентрація розчинних фібрин-мономерних комплексів – РФМК (А), претромбіну-1 (Б) та вміст протеїну С (В) в плазмі крові тварин: ПХ – модель променевої хвороби на щурах (n = 9); LPS – модель LPS-індукованого запалення на мишах (n = 12); IP – модель інсулінорезистентності на щурах (n = 8). Контроль – здорові тварини (n = 9). \* – за тестом Манна-Уїтні результат достовірний при  $p < 0,05$ , порівняно з контролем.

Водночас, важливо зазначити, за умов променевої хвороби терапія ентеросорбентами нівелює патологічні прояви захворювання. Зазначені параметри нормалізуються, тобто є чутливими до важкості прояву патологічного стану.

Отже, 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.

### Раціональна молекулярна діагностика патологічних станів, пов'язаних з внутрішньосудинною генерацією тромбіну.

На наступному етапі ми поставили за мету верифікувати зроблені висновки за допомогою клінічних даних, визначивши інформативність тестів для детектування розчинного фібрину, претромбіну-1 та вмісту протеїну С з метою діагностики порушень системи гемостазу за різних патологічних станів, асоційованих із загрозою внутрішньосудинного тромбоутворення у людини. Ми проаналізували стан системи гемостазу, зокрема визначили маркери появи тромбіну в кровотоці, за таких патологій: постковідний синдром, ішемічна хвороба серця, аневризма черевної аорти, системний червоний вовчак, ускладнена вагітність, ендопротезування кульшового суглобу, морбідне ожиріння, опікова травма.

За цих патологій принаймні один з маркерів появи тромбіну корелює з клінічною картиною захворювання або з анамнезом пацієнта. Цей факт, з однієї сторони, говорить про необхідність комплексної діагностики, тобто ненадійність виявлення першопричин порушення гемостазу лише за одним маркером появи тромбіну в кровотоці, а з іншої сторони, породжує питання, чому той чи інший маркер проявляється в більшій чи меншій мірі за певної патології.

Загальний аналіз стану системи гемостазу цих пацієнтів в поєднанні з клінічною картиною дозволив висунути припущення про те, які фактори впливають на перерозподіл ензиматичної активності тромбіну між різними субстратами.

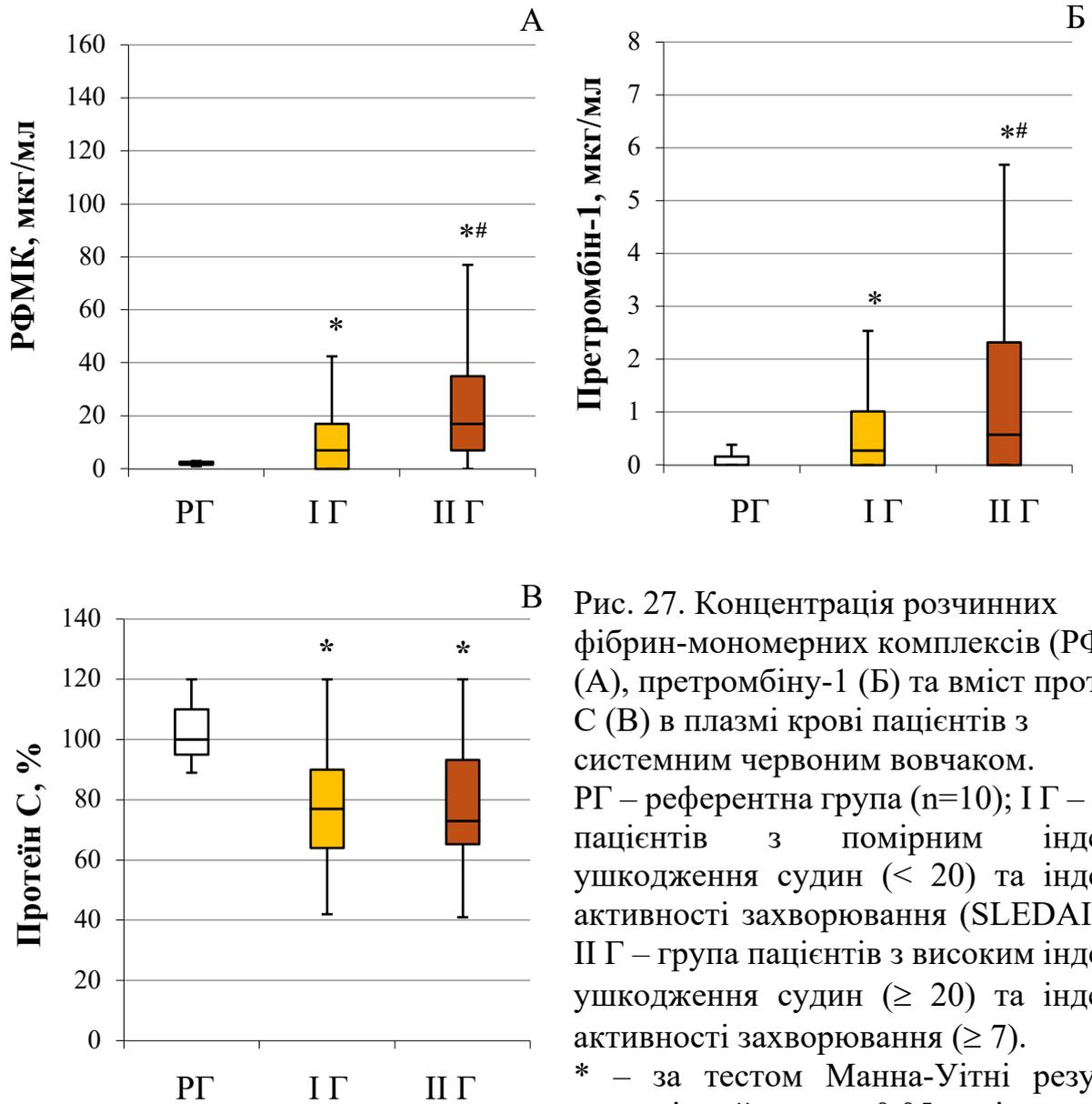
#### Фактор 1. Стан ендотелію судин.

При ураженні ендотелію, активація протеїну С тромбіном сповільнена, оскільки уражений ендотелій не експонує на своїй поверхні тромбомодулін (кофактор тромбіну в цьому процесі), а глікокалікс ендотелію функціонує як депо, яке накопичує йони  $\text{Na}^+$ , що змінює співвідношення «швидкого» та «повільного» тромбіну в бік першого (рис. 18). При цьому, накопичення тромбіну все ще забезпечує протеоліз фібриногену та протромбіну, що виявляється в накопиченні розчинного фібрину та претромбіну-1. Яскравим прикладом патології за якої спостерігається дисфункція ендотелію є системний червоний вовчак (рис. 27).

При збільшенні важкості захворювання, яке оцінювали за індексом ушкодження судин та індексом активності захворювання (SLEDAI), відповідно до міжнародної класифікації, зростало накопичення претромбіну-1 та розчинного фібрину. Попри це, зменшення вмісту протеїну С не корелювало з важкістю захворювання, оскільки, за нашим припущенням, при важких формах системного червоного вовчака, запалений

ендотелій не здатен забезпечити інтенсивної активації цього протеїну тромбіном в комплексі з тромбомодуліном.

Аналогічну картину спостерігали при ішемічній хворобі серця, яка у 85-90 % випадків асоційована з атеросклерозом коронарних артерій. Хоча гострий інфаркт міокарда є значно важчим захворюванням ніж нестабільна стенокардія, вміст протеїну С за обох патологій знижується однаково.



РГ – референтна група (n=10); 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.

## Фактор 2. Концентрація фібриногену.

Основними (домінантними) субстратами «швидкого» тромбіну є фібриноген та протромбін. Тоді як концентрація протромбіну є сталою (за виключенням коагулопатії та масованих кровотеч), концентрація фібриногену може помітно зростати при запаленні, а також упродовж вагітності. Можна припустити, що при зростанні концентрації фібриногену, на тлі активації системи зсідання крові, протеоліз тромбіном фібриногену буде домінувати над протеолізом протромбіну.

І дійсно, у пацієнтів, що перехворіли на COVID-19 і були віднесені до групи високого ризику ускладнень за класифікацією BOOЗ, рівень фібриногену зростає, відповідно до важкості перенесеного захворювання (більш ніж у два рази, порівняно з референтною групою для важких та критичних пацієнтів), а ризик активації системи зсідання крові провокувався супутніми захворюваннями, віком та ожирінням. Поява тромбіну в кровотоці у цих пацієнтів яскраво проявлялась у накопиченні розчинного фібрину, відповідно до важкості захворювання, оскільки концентрації фібриногену суттєво зростала у важких та критичних пацієнтів (рис. 28). Водночас, не відмічали достовірного зростання концентрації претромбіну-1, відповідно до цих параметрів, адже концентрація протромбіну не залежала від важкості захворювання.

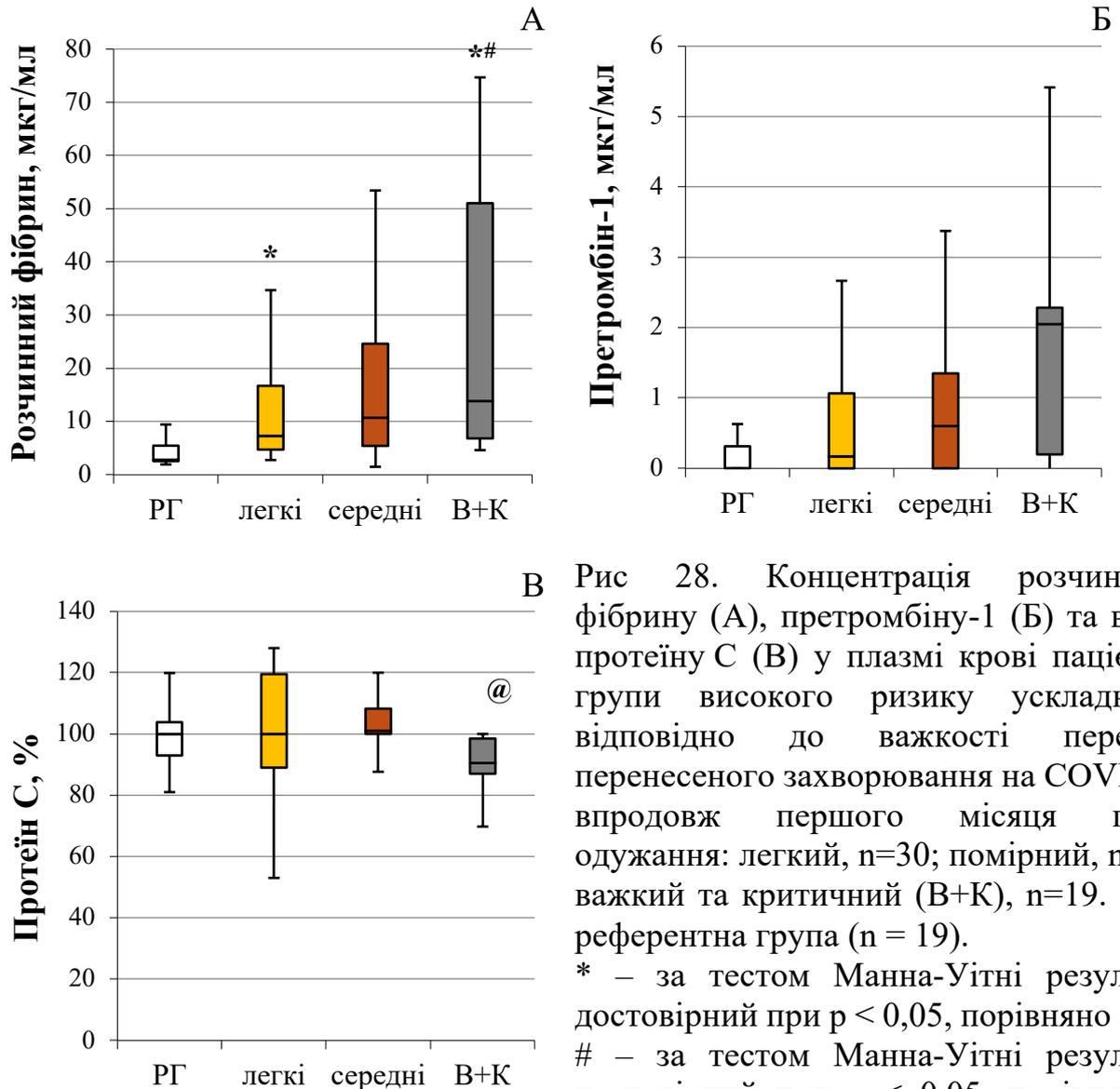


Рис 28. Концентрація розчинного фібрину (А), претромбіну-1 (Б) та вміст протеїну С (В) у плазмі крові пацієнтів групи високого ризику ускладнень, відповідно до важкості перебігу перенесеного захворювання на COVID19 впродовж першого місяця після одужання: легкий, n=30; помірний, n=36; важкий та критичний (B+K), n=19. PG – референтна група (n = 19).

\* – за тестом Манна-Уїтні результат достовірний при  $p < 0,05$ , порівняно з PG. # – за тестом Манна-Уїтні результат достовірний при  $p < 0,05$ , порівняно з групою легкої стадії хвороби.

Тенденцію до накопичення розчинного фібрину на тлі зростання концентрації фібриногену спостерігали також за вагітності, ускладненої плацентарною дисфункцією та у пацієнтів з опіковою травмою.

### Фактор 3. Концентрація протромбіну.

Концентрація іншого домінантного субстрату «швидкого» тромбіну, протромбіну, може зменшуватись унаслідок потужної кровотечі. У випадку оперативного втручання з приводу аневризми черевної аорти діаметром, що перевищує 7 см, спостерігається крововтрата понад 1,5 л. За даними Lucy de Lloyd et al., така кровотеча супроводжується зниженням концентрації протромбіну в 1,5-2 рази. В той же час, концентрація фібриногену у досліджуваних хворих після операції лишається у межах норми: з огляду на підвищену концентрацію фібриногену до операції, кровотеча після операції не призводила до фібриногенемії. Оскільки концентрація протромбіну знижувалась, переважав гідроліз іншого субстрату «швидкого» тромбіну – фібриногену (рис. 29).

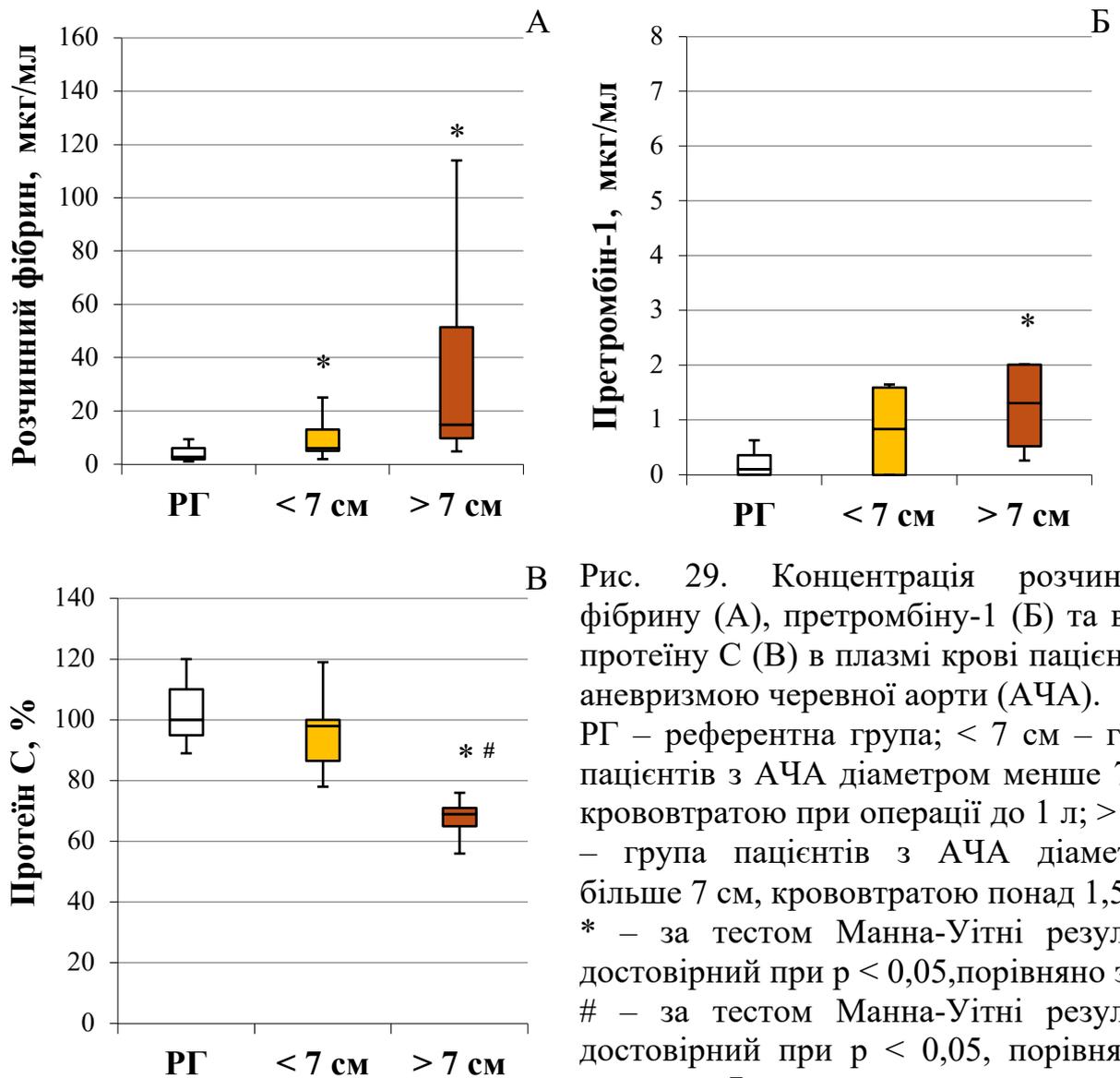


Рис. 29. Концентрація розчинного фібрину (А), претромбіну-1 (Б) та вміст протеїну С (В) в плазмі крові пацієнтів з аневризмою черевної аорти (АЧА). РГ – референтна група; < 7 см – група пацієнтів з АЧА діаметром менше 7 см, крововтратою при операції до 1 л; > 7 см – група пацієнтів з АЧА діаметром більше 7 см, крововтратою понад 1,5 л. \* – 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.

Отже, було показано, що обрані ознаки появи тромбіну в кровотоці – поява претромбіну-1 та розчинного фібрину, зниження вмісту протеїну С – спостерігаються за низки патологічних станів і можуть бути детектовані. Оскільки інтенсивність прояву вказаних маркерів узгоджується з клінічними проявами захворювання,

зокрема з важкістю або стадією захворювання, то можемо говорити про їх інформативність.

Комплексний аналіз стану системи гемостазу пацієнтів дав змогу сформулювати парадигму, суть якої полягає в тому, що поява того чи іншого маркера генерація 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 (перетворення фібриногену на фібрин), а перерозподіл активності «швидкого» тромбіну відбувається при патологічній зміні концентрацій субстратів (фібриногену та протромбіну).

## 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 ендогенного 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 властивостями. Проведено доклінічні дослідження, які підтвердили місцеву переносимість та нетоксичність виробу. Вперше проведено клінічні дослідження, які засвідчили його безпечність та високий ранозагоювальний потенціал.

6. Запропоновано протромбін-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 інформативність кількісного визначення претромбіну-1, протеїну С та розчинного фібрину на моделях запалення у лабораторних тварин, а також діагностичну ефективність цих маркерів у пацієнтів за патологій, пов'язаних з ризиком внутрішньосудинного тромбоемболізму.
10. Обґрунтовано парадигму перемикачності активності тромбіну за тромбофілії, згідно з якою ензим надає перевагу субстратам (фібриногену, протромбіну, протеїну С), відповідно до стану ендотелію судин та концентрації субстрату.

## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

*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, Korchynskyi 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 концентрацій розчинного фібрину в плазмі крові пацієнтів, статистичний аналіз стану системи гемостазу пацієнтів.*
2. Platonova TM, Hrabovskyi OO, Chernyshenko VO, Stohnii YM, Kucheryavyi YP, **Korolova DS**, Komisarenko SV. Alternative role of B:bkno-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 претромбіну-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, Kobylynska 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, Kobylynska 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  $\beta$ 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, Kostuchenko O, Chernyshenko T, Klymenko K, Platonova T, Ivankiv Ya, Palii 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, Gornytka 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, Деєв 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: 38<sup>th</sup> 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, Gornyska 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., Деєв В.А., Куповська С.І. Тест-система та спосіб контролю ефективності лікування та профілактики тромбозів антикоагулянтами непрямой дії: пат. 86856 України: МПК G01N 33/50 A61B 5/00. № a200708173; 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. № a201501207; 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: A61F13/00, A61K38/43, A61P7/04. № 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: A61F13/00, A61K38/43, A61P7/04. № 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: A61K35/19, A61P7/00. № 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., Жмілько П.Г. Спосіб надання біоматеріалам прокоагулянтних властивостей шляхом модифікації їхньої поверхні екзогенним активатором протромбіну екамуліном: пат. 149443 України: A61K38/36, A61P7/04, A61L15/32. № 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. №. РСТ/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., Жмінко 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.

## 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.

Дисертацію присвячено пошуку шляхів регуляції активності тромбіну в нормі та за патологічних станів.

Запропоновано низькомолекулярні специфічні оборотні інгібітори тромбіну для пригнічення прокоагулянтного потенціалу системи гемостазу та апробовано їх в модельних системах *in vitro* та *in vivo*.

Показано, що активатор протромбіну надає біоматеріалам прокоагулянтних властивостей, що дозволяє створювати вискоєфективні кровоспинні засоби. Зокрема, «Карбогемостат» на основі активатору протромбіну та карбонового сорбенту пройшов успішні доклінічні та клінічні дослідження, які засвідчили його безпечність та ефективність.

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.

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.

The thesis is devoted to the search for ways to regulate thrombin activity under normal and pathological conditions.

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. 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 and clinical studies of “Carbohemostat” demonstrated its safety and efficacy 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, 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 Autologous Fibrin Gel Kit with regenerative properties. Successful preclinical and clinical studies confirmed the safety, non-toxicity and high wound-healing potential of the 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.