

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

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**КУЧЕРЯВИЙ**

**Євгеній Петрович**

УДК 577.112.083; 577.151.45

**ДИСЕРТАЦІЯ**

**ДОСЛІДЖЕННЯ СТРУКТУРИ ТА ФУНКЦІЙ  $\alpha$ C-РЕГІОНІВ ТА В $\beta$ N-ДОМЕНІВ  
ФІБРИН(ОГЕН)У ЗА ДОПОМОГОЮ МОЛЕКУЛЯРНИХ ЕФЕКТОРІВ**

091 – Біологія

09 – Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

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

\_\_\_\_\_ / Є.П. Кучерявий /

Науковий керівник: Чернишенко Володимир Олександрович, доктор біологічних  
наук, старший дослідник

## АНОТАЦІЯ

*Кучерявий Є.П.* Дослідження структури та функцій  $\alpha$ C-регіонів та B $\beta$ N- доменів фібрин(оген)у за допомогою молекулярних ефекторів. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія». – Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ, 2025.

Процеси полімеризації фібрину та агрегації тромбоцитів є центральними етапами формування фібриново-тромбоцитарного згустку, що лежить в основі тромбоутворення. У фізіологічних умовах тромбоутворення є критично важливим для зупинки кровотечі у відповідь на ушкодження судинної стінки та ініціації репаративних процесів. Водночас, розвиток тромбів у непошкоджених ділянках судинного русла становить серйозну патофізіологічну загрозу, спричиняючи ішемічне ураження органів і тканин. У зв'язку з цим, дослідження молекулярних механізмів, що регулюють полімеризацію фібрину та агрегацію тромбоцитів, має важливе значення для розробки стратегій селективної модуляції тромбоутворення – з метою інгібування патологічного внутрішньосудинного тромбогенезу та стимуляції фізіологічного екстрасудинного гемостазу.

У дисертаційній роботі вперше проведено комплексне дослідження функції окремих структурно-функціональних одиниць фібрин(оген)у –  $\alpha$ C-регіону та B $\beta$ N-домену – з використанням молекулярних ефекторів, які відрізняються за принципом дії. Порівняння ефектів протеолітичного відщеплення, прямого блокування антитілами або конкуренції з пептидами за сайти взаємодій дозволило зробити висновки щодо особливостей функціонування активних сайтів молекули, розміщених у межах  $\alpha$ C-регіону та B $\beta$ N-домену.

Реалізація запланованого дослідження передбачала отримання протеїназ, здатних гідролізувати фібриноген, приготування зразків частково гідролізованих форм фібриногену, продукцію моноклональних антитіл до визначених епітопів фібриногену та отримання протеолітичних низькомолекулярних пептидів.

Протеїназа з отрути *Echis multisquamatis* гідролізує пептидний зв'язок В $\beta$ 42-43 з утворенням частково гідролізованої форми фібриногену desВ $\beta$ 1-42. Ця форма, позбавлена N-кінця В $\beta$ -ланцюга не має центрів полімеризації «В» та «С». Окрім того, вона має дисоційовані  $\alpha$ С-регіони.

Протеїназа з отрути *Agkistrodon halys halys* гідролізує пептидний зв'язок А $\alpha$ 413-414, призводячи до утворення частково гідролізованої форми фібриногену – desА $\alpha$ 414-610. Ця форма має нативні В $\beta$ N-домени, які не поєднуються з  $\alpha$ С-регіонами. Втім, така молекула має обидві пари фібринопептидів А та В, які можуть бути відщеплені з формуванням центрів полімеризації «А» та «В», експоновані центри полімеризації «а» та «b», нативну послідовність, що включає центр полімеризації «С» та комплементарний йому центр «с». Водночас, фібрин(оген) desА $\alpha$ 414-610 не має доменної частини  $\alpha$ С-регіонів, а конекторна частина  $\alpha$ С-регіонів, що не має сайтів між- та внутрішньомолекулярних взаємодій, вільно дисоціює від остову молекули.

Протеїназа з культурального середовища *Bacillus thuringiensis var israeliensis*, яка гідролізує пептидний зв'язок А $\alpha$ 504-505, дозволяє отримати унікальну частково гідролізовану форму фібриногену desА $\alpha$ 505-610, позбавлену С-кінцевого субдомену  $\alpha$ С-регіону, а також і сам пептид А $\alpha$ 505-610. Вочевидь, у такій формі фібриногену залишок  $\alpha$ С-регіону не формує комплекс з В $\beta$ N-доменом та є вільним. Імовірно також  $\alpha$ С-регіони фібриногену desА $\alpha$ 505-610 не формують зв'язки одне з одним.

Використані протеїнази також дозволяють отримати пептиди.

Пептид В $\beta$ 1-42 зберігає якщо не структурні, то принаймні функціональні особливості В $\beta$ N-домену. Зокрема, він містить центр полімеризації «С», а отже здатен зв'язуватися і з комплементарним йому центром «с» в D-регіоні молекули.

Пептид А $\alpha$ 414-610 зберігає сайти міжмолекулярних взаємодій, властиві доменній частині  $\alpha$ С-регіону. Завдяки цьому, він конкурентно зв'язуватися з сайтами, комплементарними до доменної частини  $\alpha$ С-регіону. Зокрема, імовірно

його зв'язування з фібринопептидом В, а також з фрагментами  $\alpha$ С-регіону нативної молекули фібрин(оген)у.

Пептид A $\alpha$ 505-610 представляє собою С-кінцевий субдомен  $\alpha$ С-регіону. Відкритим лишається питання, чи може цей фрагмент формувати внутрішньомолекулярні комплекси з В $\beta$ N-доменом та  $\alpha$ С-регіоном. Якщо таке зв'язування можливе, то фрагмент конкуруватиме з відповідними регіонами нативної молекули в процесі полімеризації фібрину та інших протеїн-протеїнових взаємодій.

Моноклональне антитіло 2d2a здатне прямо блокувати В $\beta$ 14-15 сайт. Антитіло здатне взаємодіяти з фібриногеном, а отже зв'язується зі своїм епітопом незалежно від наявності комплексу з  $\alpha$ С-регіонами.

Моноклональне антитіло I-5A, специфічне до епітопу A $\alpha$ 535-595. Таким чином, воно здатне зв'язуватися з С-кінцевим субдоменом, перешкоджаючи його міжмолекулярним та внутрішньомолекулярним взаємодіям.

Моноклональне антитіло I-5B специфічне до фрагменту A $\alpha$ 414-492, отже взаємодіє з N-кінцевим субдоменом  $\alpha$ С-регіону, імовірно блокуючи опосередковані ним міжмолекулярні взаємодії. Імовірно, структура та функціональні риси інших фрагментів молекули фібрин(оген)у змін не зазнають.

Застосування зазначених ефекторів у комбінації з турбідиметрією, трансмісійною електронною мікроскопією та агрегатометрією дозволило отримати унікальні результати, що дають відповіді на низку питань щодо структури та функцій окремих субдоменів молекули фібрин(оген)у.

Фібриноген, позбавлений фрагменту В $\beta$ 1-42, втрачав здатність до полімеризації. Внесення до середовища інкубації вільного пептиду В $\beta$ 1-42 не впливало на здатність фібрину формувати протофібрили та фібрили, хоча моноклональне антитіло, специфічне до цієї ділянки, суттєво пригнічувало процес фібриноутворення. Такі результати, підтверджені як турбідиметрією, так і електронною мікроскопією, дозволили зробити припущення, що центр

полімеризації «С» у В $\beta$ N-домені функціонує лише в комплексі з  $\alpha$ C-регіонами. Відщеплення В $\beta$ N-домену або його блокування антитілом 2d2a призводить до втрати здатності до полімеризації, що свідчить про важливість цього комплексу. Натомість, пептид В $\beta$ 1-42, який міг би взаємодіяти з комплементарним центром полімеризації «с», не показав ефективності, що вказує на критичну роль саме комплексу В $\beta$ N-домену з  $\alpha$ C-регіоном у реалізації взаємодії центрів «С»:«с».

За допомогою турбідиметрії та електронної мікроскопії було показано, що протеолітичне відщеплення як N- так і С-кінцевих субдоменів  $\alpha$ C-регіонів подовжує lag-період полімеризації фібрину, а отже гальмує формування протофібрил. Ефекту втрати субдоменів  $\alpha$ C-регіонів на швидкість латеральної асоціації протофібрил не виявлено. Натомість, пептиди A $\alpha$ 414-610, A $\alpha$ 505-610, а також моноклональні антитіла I-5B, I-5A, що здатні блокувати взаємодії  $\alpha$ C-регіонів, не впливають на lag-період, але суттєво пригнічують латеральну асоціацію протофібрил. Це вказує на відмінність механізмів залучення  $\alpha$ C-регіонів на різних етапах полімеризації: на етапі побудови протофібрил вони функціонують у комплексі з В $\beta$ N-доменами, імовірно стабілізуючи їхню структуру, а на етапі латеральної асоціації протофібрил – залучають сусідні протофібрили завдяки  $\alpha$ C: $\alpha$ C взаємодіям.

Дослідження агрегації тромбоцитів за присутності описаних вище молекулярних ефекторів також дозволило сформулювати висновок, щодо залучення  $\alpha$ C-регіонів у цьому процесі. Зокрема, втрата В $\beta$ N-доменів не інгібувало швидкості та ступеня агрегації тромбоцитів, тоді як втрата молекулою фібриногену субдоменів  $\alpha$ C-регіонів дещо знижувала ступінь агрегації. Зроблено припущення, що  $\alpha$ C-регіони сприяють агрегації тромбоцитів, збільшуючи кількість та протяжність контактів між клітинами. Їхня дія реалізується після відщеплення фібринопептидів, що супроводжується дисоціацією  $\alpha$ C-регіонів від остову молекули. Саме тому блокування  $\alpha$ C-регіонів антитілами чи пептидами не впливає на швидкість агрегації, але знижує її ступінь і сприяє дезагрегації, а втрата В $\beta$ N-домену призводить лише до дезагрегації.

Отримані результати дозволяють запропонувати нову модель участі  $\alpha$ C-регіонів і V $\beta$ N-домену у фібриноутворенні та тромбоцитарній агрегації, що є важливим для розуміння механізмів формування фібриново-тромбоцитарного тромбу.

**Ключові слова:** фібриноген, тромбоцити, фібрин, протеїни, структурна біологія, полімеризація фібрину, агрегація тромбоцитів, міжмолекулярна взаємодія, кінетика, електронна мікроскопія, тромбоутворення, інгібування, мікроскопія.

## ANNOTATION

*Kucheriavyi Ye.P.* Investigation of the structure and functions of the  $\alpha$ C-regions and B $\beta$ N-domains of fibrin(ogen) using molecular effectors. – Qualification scientific work as a manuscript.

Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in specialty 091 "Biology". – Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine, Kyiv, 2025.

Fibrin polymerization and platelet aggregation are central stages in the formation of the fibrin-platelet clot, which underlies thrombogenesis. Under physiological conditions, thrombus formation is essential for the cessation of bleeding in response to vascular injury and the initiation of reparative processes. However, the development of thrombi in undamaged areas of the vasculature poses a serious pathophysiological threat, leading to ischemic damage of organs and tissues. Therefore, the study of molecular mechanisms regulating fibrin polymerization and platelet aggregation is crucial for the development of strategies for the selective modulation of thrombogenesis – aimed at inhibiting pathological intravascular thrombosis and stimulating physiological extravascular hemostasis.

This dissertation presents the first comprehensive study of the functions of specific structural-functional domains of fibrin(ogen) – the  $\alpha$ C-region and the B $\beta$ N-domain – using molecular effectors that differ in their mechanism of action. Comparison of the effects of proteolytic cleavage, direct antibody blocking, or peptide competition for interaction sites allowed conclusions to be drawn about the functional roles of active sites located within the  $\alpha$ C-region and the B $\beta$ N-domain.

The implementation of the study involved the preparation of proteases capable of hydrolyzing fibrinogen, the preparation of partially hydrolyzed fibrinogen forms, the generation of monoclonal antibodies against specific fibrinogen epitopes, and the isolation of proteolytic low-molecular-weight peptides.

A protease from *Echis multisquamatis* venom hydrolyzes the B $\beta$ 42–43 peptide bond, generating a partially hydrolyzed form of fibrinogen – desB $\beta$ 1-42 – that lacks polymerization centers "B" and "C" and possesses dissociated  $\alpha$ C-regions.

A protease from *Agkistrodon halys halys* venom hydrolyzes the A $\alpha$ 413–414 bond, yielding desA $\alpha$ 414–610 fibrinogen. This form retains native B $\beta$ N-domains unbound to  $\alpha$ C-regions but possesses both fibrinopeptides A and B, capable of exposure and interaction. It retains polymerization centers "A", "B", "a", and "b", along with sequences for center "C" and its complementary site "c", but lacks the domain part of the  $\alpha$ C-region, with its connector region freely dissociating.

A protease from the culture medium of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, which cleaves the A $\alpha$ 504-505 bond, produces a unique form – desA $\alpha$ 505-610 – lacking the C-terminal  $\alpha$ C-subdomain and yielding peptide A $\alpha$ 505-610. In this form, the  $\alpha$ C-region likely does not interact with the B $\beta$ N-domain or other  $\alpha$ C-regions.

The proteases also allow the isolation of peptides B $\beta$ 1-42, which preserves at least the functional features of the B $\beta$ N-domain and binds via polymerization center "C".

Peptide A $\alpha$ 414-610, containing intermolecular interaction sites of the  $\alpha$ C-domain, may bind fibrinopeptide B and native  $\alpha$ C-region fragments.

Peptide A $\alpha$ 505-610, representing the C-terminal  $\alpha$ C-subdomain, may form intramolecular complexes with the B $\beta$ N-domain or other  $\alpha$ C-regions.

Monoclonal antibody 2d2a directly blocks site B $\beta$ 14-15 and binds its epitope on fibrinogen independently of  $\alpha$ C-region complexation.

Antibody I-5A binds A $\alpha$ 535-595, potentially inhibiting intermolecular and intramolecular interactions of the C-terminal subdomain.

Antibody I-5B targets A $\alpha$ 414-492, likely blocking N-terminal  $\alpha$ C-subdomain interactions.

The combination of these effectors with turbidimetry, transmission electron microscopy, and aggregometry allowed for unique insights into the structure and function of fibrin(ogen) subdomains.



Fibrinogen lacking B $\beta$ 1-42 loses its polymerization capacity. Free B $\beta$ 1-42 peptide did not restore protofibril/fibril formation, but monoclonal antibody 2d2a significantly inhibited fibrin formation. This suggests that polymerization center "C" is functional only in complex with  $\alpha$ C-regions. Neither isolated peptide nor antibody could substitute this interaction, highlighting the B $\beta$ N- $\alpha$ C complex's importance.

Proteolytic removal of either  $\alpha$ C-subdomain delayed the fibrin polymerization lag phase, without affecting lateral protofibril association. Peptides A $\alpha$ 414-610, A $\alpha$ 505-610, and antibodies I-5A and I-5B had no effect on the lag phase but significantly inhibited lateral protofibril association. This indicates different roles for  $\alpha$ C-regions: in protofibril formation (via B $\beta$ N-complex stabilization) and in lateral association (via  $\alpha$ C: $\alpha$ C interactions).

Platelet aggregation studies revealed that B $\beta$ N-domain loss had no effect on aggregation rate or extent, whereas  $\alpha$ C-subdomain loss moderately decreased aggregation extent.  $\alpha$ C-regions likely increase platelet contact area post-fibrinopeptide cleavage, and their blockage or removal primarily affects aggregation extent and reversibility, not initiation.

These findings support a new model for  $\alpha$ C-region and B $\beta$ N-domain involvement in fibrin formation and platelet aggregation, relevant for understanding fibrin–platelet thrombus formation mechanisms.

**Keywords:** fibrinogen, platelets, fibrin, proteins, structural biology, fibrin polymerization, platelet aggregation, intramolecular complexes, kinetics, electron microscopy, thrombosis, inhibition, microscopy.

## ПЕРЕЛІК ПУБЛІКАЦІЙ

1. Platonova T.M., Hrabovskyi O.O., Chernyshenko V.O., Stohnii Y.M., **Kucheryavyi Y.P.**, Korolova D.S., Komisarenko S.V. (2025). Alternative role of B:b knob-hole interactions in the fibrin assembly. *Biochemistry* 2025, 64, 4, 791 - 800. <https://10.1021/acs.biochem.4c00695> (Q1).

*Платонова Т.М. – ідея досліджень, супровід експериментальної роботи, аналіз даних;*

*Грабовський О.О. – комп'ютерне моделювання;*

*Чернишенко В.О. – планування досліджень, підготовка рукопису;*

*Стогній Є.М. – підготовка протейнових препаратів;*

*Кучерявий Є.П. – електронна мікроскопія, написання статті, редагування;*

*Корольова Д.С. – аналіз та візуалізація даних;*

*Комісаренко С.В. – загальне керівництво роботою, формування висновків.*

2. **Kucheriavyi, Y.P.**, Panas, I.D. (2023). Transmission electron microscopy for the direct analysis of fibrin clot structure. *Biotechnologia Acta*, 16(2), 30-31. <https://10.15407/biotech16.02.030>

*Кучерявий Є.П. – електронна мікроскопія, написання статті, редагування;*

*Панас І.Д. – електронна мікроскопія.*

3. Stohnii, Y.M., Yatsenko, T.A., Nikulina, V.V., **Kucheriavyi, Y.P.**, Hrabovskyi, O.O., Slominskyi, O.Y., Savchenko, K.S., Garmanchuk, L.V., Varbanets, L.D., Tykhomyrov, A.O., & Chernyshenko, V.O. (2023). Functional properties of individual sub-domains of the fibrin(ogen)  $\alpha$ C-domains. *BBA advances*, 1867(3), 100072. <https://doi.org/10.1016/j.bbadv.2023.100072> (Q3).

*Стогній Є.М. – турбідиметричні та електрофоретичні дослідження;*

*Яценко Т.А. – вивчення функції системи фібринолізу;*

*Нікуліна В.В. – робота з культурами клітин;*

*Кучерявий Є.П. – електронна мікроскопія, турбідиметрія, агрегація тромбоцитів, редагування та написання статті;*

*Грабовський О.О. – молекулярне моделювання;*

*Сломінський О.Ю. – хроматографічні дослідження;*  
*Савченко К.С. – робота з культурами клітин;*  
*Гарманчук Л.В. – робота з культурами клітин;*  
*Тихомиров А.О. – робота з компонентами системи фібринолізу;*  
*Комісаренко С.В. – загальне керівництво роботою, формування висновків, підготовка статті до друку.*

4. Zhelavskiy, M.A., Platonov, O.M, **Kucheryavyi, Y.P.**, Stohnii, Y.M. (2023). Aprobation of platelet aggregation inhibitor from Echis multisquamatis snake venom in vitro, in vivo and ex vivo. Biotechnologia Acta, 16(5). <https://doi.org/10.15407/biotech16.05>

*Желавський М.А. – агрегація тромбоцитів;*  
*Платонов О.М. – хроматографічні дослідження;*  
*Кучерявий Є.П. – дослід на тваринах, редагування та написання статті.*

5. **Kucheriavyi Y.**, Hrabovskyi O., Rebriev A.V., Stohnii Y. Limited proteolysis of fibrinogen  $\alpha$ C-region reveals its structure. Biotechnologia Acta T. 15, No. 2, 2022. P. 60-61. <https://doi.org/10.15407/biotech15.02.060>

*Кучерявий Є.П. – електронна мікроскопія, турбідиметрія, редагування та написання статті;*

*Грабовський О.О. – молекулярне моделювання;*

*Ребрієв А.В. – мас-спектрометрія;*

*Стогній Є.М. – електронна мікроскопія.*

6. Iskandarov E., Zinenko O., Tupikov A., Pitishkina A., Platonov O., Gryshchuk V., **Kucheriavyi Y.**, Stohnii Y. (2022) Action of venom of Vipera snake of Ukraine on blood coagulation in vitro. Biotechnologia Acta. 15(2):56-57. <https://doi.org/10.15407/biotech15.02.056>

*Іскандаров Е. – підготовка рукопису, хроматографія;*

*Зіненко О. – отримання та характеристика отрути змії;*

*Тупіков А. – отримання та характеристика отрути змії;*

*Пітішкіна А. – підготовка рукопису;*

*Платонов О. – хроматографія;*

*Гришук В. – ідеологія досліджень, загальне керівництво;*

*Кучерявий Є. – агрегація тромбоцитів, редагування та написання статті;*

*Стогній Є. – електрофоретичні дослідження.*

7. Iskandarov E., Gryshchuk V., Platonov O., **Kucheriavyi Y.**, Slominskyi O., Stohnii Y., Vartanov V., Chernyshenko V. Fractionation of Vipera berus berus snake venom and detection of bioactive compounds targeted to blood coagulation system. Southeastern European Medical Journal. 6 (2022) 20-31.  
<https://doi.org/10.26332/seemedj.v6i2.256>

*Іскандаров Е. – підготовка рукопису, хроматографія;*

*Гришук В. – ідеологія досліджень, загальне керівництво;*

*Платонов О. – хроматографія;*

*Кучерявий Є. – агрегація тромбоцитів, аналіз даних;*

*Сломінський О.Ю. – хроматографічні дослідження;*

*Стогній Є.М. – електронна мікроскопія;*

*Вартанов В.Г. – хроматографічні дослідження;*

*Чернишенко В.О. – ідеологія досліджень, редагування рукопису.*

8. Stohnii Y., Baidakova K., Platonov O., **Kucheryavyi Y.**, Iskandarov E., Zinenko O., Gryshchuk V. Fibrinogenases from the animal venoms in the study of fibrinogen structure and fuctions / 26<sup>th</sup> Congress of the International Society for Fibrinolysis and Proteolysis, October 11-14, 2023, Budapest, Hungary. Plasminogen activation and fibrinolysis workshop of the Hungarian society of thrombosis and haemostasis. Abstracts. P. 55.
9. **Kucheriavyi Y.**, Didkivskyi V., Selikhova A., Tokmakova Y., Cherenok S., Zhminko P., Chernyshenko V. Antithrombotic action of sodium salt of 5,11,17,23-bis(dihydroxyphosphoryl)methylcalix[4]arene in vivo. RECOOP 16th Bridges in Life Sciences Video Conference. 16 April 2021. P. 53.

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ .....	15
ВСТУП .....	16
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ .....	20
1.1. Структура фібриногену та полімеризація фібрину .....	20
1.2. Молекулярні ефектори для вивчення структури та функцій фібрин(оген)у .....	23
1.2.1. Моноклональні антитіла .....	23
1.2.2. Пептиди-міметики .....	31
1.2.3. Високоселективні протеїнази .....	38
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ .....	45
2.1. Реактиви, матеріали та обладнання .....	45
2.1.1. Реактиви .....	45
2.1.2. Фібриноген .....	45
2.1.3. Антитіло 2d2a .....	46
2.1.4. Антитіло I-5A .....	47
2.1.5. Антитіло I-5B .....	48
2.1.6. Фібриногеназа з отрути <i>Echis multisquamatis</i> .....	48
2.1.7. Фібриногеназа з культурального середовища <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	49
2.1.8. Фібриногеназа з отрути <i>Gloydius halys halys</i> .....	49
2.1.9. Фібриноген <i>desBβ1-42</i> .....	50
2.1.10. Фібриноген <i>desAα505-610</i> .....	51
2.1.11. Фібриноген <i>desAα414-610</i> .....	51
2.1.12. Пептид <i>Bβ1-42</i> .....	52
2.1.13. Пептид <i>Aα505-610</i> .....	52
2.1.14. Пептид <i>Aα414-610</i> .....	53
2.1.15. Збагачена тромбоцитами плазма крові .....	53
2.2. Методи .....	54

2.2.1. Електрофорез у системі Лемлі.....	54
2.2.2. Вестерн-Блот аналіз .....	55
2.2.3. Турбідиметрія.....	55
2.3.4. Електронна мікроскопія.....	55
2.3.5. Агрегація тромбоцитів.....	56
2.3.6. Денситометрія у програмі ImageJ.....	57
2.3.7. Моделювання <i>in silico</i> .....	58
2.3.8. Статистичний аналіз .....	58
РОЗДІЛ 3. В $\beta$ N-домен .....	59
3.1. Турбідиметричний аналіз. ....	60
3.2. Електронна мікроскопія.....	63
3.2. Агрегація тромбоцитів.....	69
РОЗДІЛ 4. С-кінцевий субдомен $\alpha$ C-регіону .....	73
4.1. Турбідиметричний аналіз. ....	74
4.1.2. Електронна мікроскопія.....	77
4.2. Агрегація тромбоцитів.....	82
РОЗДІЛ 5. Доменна частина $\alpha$ C-регіону .....	86
5.1. Турбідиметричний аналіз. ....	87
5.2. Електронна мікроскопія.....	91
5.3. Агрегація тромбоцитів.....	97
ВИСНОВКИ.....	109
ЛІТЕРАТУРА .....	110

## ВСТУП

**Актуальність теми.** Процеси полімеризації фібрину та агрегації тромбоцитів лежать у основі формування фібриново-тромбоцитарного згустку – тромбу. Тромбоутворення, що здійснюється у відповідь на ушкодження судин, запобігає втраті крові та стимулює регенерацію. Водночас, патологічне формування тромбів всередині судини становить загрозу для життя, викликаючи ішемізацію тканин та органів. Тому дослідження молекулярних механізмів, які лежать в основі полімеризації фібрину та агрегації тромбоцитів, дає розуміння, яким чином можна регулювати процеси тромбоутворення – запобігати внутрішньосудинному, та стимулювати екстрасудинне формування тромбу.

Моноклональні антитіла, специфічні до різних сайтів молекули фібрин(оген)у, пептиди, що імітують окремі фрагменти молекули, а також селективні протеїнази, здатні відщеплювати її окремі субдомени, є важливими інструментами вивчення структури та функцій фібриногену та фібрину в процесі тромбоутворення.

Важливо, що ефекти антитіл пов'язані з безпосереднім блокуванням функціонально активних сайтів молекули. У цьому випадку міжмолекулярна взаємодія блокується стерично, оскільки досліджуваний сайт уже є заблокований специфічним антитілом, афінність якого співмірна афінності природного ліганда.

На відміну від антитіл, які блокують досліджуваний фрагмент молекули, пептиди імітують структуру сайту, а отже блокують комплементарну йому ділянку взаємодії. Тобто, дія пептиду на досліджуваний сайт не безпосередня, а конкурентна – сайт зберігає свою структуру, доступний до зв'язування, але його ліганд заблокований.

Протеїнази дозволяють отримувати частково гідролізовані форми молекули з визначеною структурою, позбавлені чітко визначених фрагментів, тоді як інші фрагменти молекули лишаються нативними. Селективне відщеплення від молекули протеїну певного фрагменту дає змогу оцінити його функціональну роль.

**Мета і завдання дослідження.** Метою роботи стало вивчення процесів полімеризації фібрину та агрегації тромбоцитів за допомогою молекулярних ефекторів, які протеолітично відщеплюють, стерично блокують або конкурентно інгібують активні сайти молекули.

Відповідно до мети було поставлено такі завдання.

1. Дослідити участь  $B\beta N$ -доменів фібрин(оген)у у процесах побудови протофібрил, формування тривимірної сітки фібрину та агрегації тромбоцитів.
2. Вивчити роль внутрішньомолекулярних взаємодій  $B\beta N$ -доменів та  $\alpha C$ -регіонів у полімеризації фібринів.
3. Дослідити залучення N-кінцевих та C-кінцевих субдоменів  $\alpha C$ -регіонів фібрин(оген)у до формування фібриново-тромбоцитарного тромбу.

**Об'єктом дослідження** є внутрішньомолекулярний комплекс  $B\beta N$ -доменів та  $\alpha C$ -регіонів фібрин(оген)у.

**Предметом дослідження** є фібриново-фібринові та фібриново-тромбоцитарні взаємодії, опосередковані активними сайтами  $B\beta N$ -доменів та  $\alpha C$ -регіонів, у формування фібриново-тромбоцитарного тромбу.

**Методи дослідження.** Реалізація запланованого дослідження передбачала отримання протеїназ, здатних гідролізувати фібриноген, приготування зразків частково гідролізованих форм фібриногену, продукцію моноклональних антитіл до визначених епітопів фібриногену та отримання протеолітичних низькомолекулярних пептидів. Для цього застосовували широкий спектр хроматографічних та електрофоретичних методів. Вивчення ефектів проводили за допомогою турбідиметрії, електронної мікроскопії, агрегатометрії та методів структурної біології.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Тривалі та кропіткі дослідження, які тривали у Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна понад пів століття, дозволили накопичити велику кількість наукової інформації щодо молекулярних перетворень молекули фібрин(оген)у в процесі полімеризації. Крім того, було сформовано



інструментарій для проведення досліджень. Бібліотека моноклональних антитіл, специфічних до окремих сайтів молекули, набір високоселективних протеїназ, колекція пептидів-міметиків – усі ці набутки потребували систематизації та застосування у режимі паралельного експерименту. Таке їх застосування дозволило не лише порівняти функціональну важливість окремих сайти молекули фібрин(оген)у, а й порівняти наслідки інгібування одного й того ж сайту ефекторами різної природи. Саме такий підхід і дозволив отримати нову наукову інформацію про роль комплексу В $\beta$ N-доменів та  $\alpha$ C-регіонів у формуванні фібриново-тромбоцитарного тромбу.

**Практичне значення одержаних результатів.** Дослідження молекулярних механізмів побудови тривимірної сітки фібрину та формування фібриново-тромбоцитарного тромбу є необхідним для розуміння природи патологічного внутрішньосудинного тромбоутворення та для пошуків способів запобігання цьому патологічному процесу. Проведені дослідження дозволяють розглядати N- кінець В $\beta$ -ланцюга молекули фібриногену як мішень дії антитромботичних препаратів нового покоління, а моноклональне антитіло та специфічну протеїназу, які діють на цей фрагмент молекули – як основу для їх розробки.

**Особистий внесок здобувача.** Тему, мету та завдання роботи було сформульовано дисертантом спільно з науковим керівником зав. відділу В.О. Чернишенком. Отримання протеїназ та частково гідролізованих форм фібриногену проведено спільно з н.с. Є.М. Стогнієм. Напрацювання та перевірку активності моноклональних антитіл здійснено спільно з с.н.с. Д.С. Корольовою. Турбідиметричні, електронно-мікроскопічні дослідження, а також агрегатометрію виконано дисертантом самотужки. Аналіз результатів досліджень та їх узагальнення здійснено спільно з проф. Т.М. Платоною.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** 0121U110361 «Створення прототипу лікарського препарату «Антитромботичний засіб калікс[4]арен С-145» та його доклінічні дослідження», 2021; 0119U000660 «Розробка прототипу лікарського препарату з антитромботичною та

проангіогенною дією на основі калікс[4]арену C-145», 2019; 0115U003650 «Дослідження каліксаренів як кровозберігаючих антифібринолітичних та антитромботичних агентів», 2015-2019; 0123U100894 «Створення сучасних каліксаренових регуляторів біохімічних процесів для медицини та біотехнології», 2023-2024 рр.

**Апробація результатів дисертації.** Дисертант представив результати виконання дисертаційної роботи на міжнародних та вітчизняних конференціях. Зокрема на 26th Congress of the International Society for Fibrinolysis and Proteolysis, (2023), RECOOP 16th Bridges in Life Sciences Video Conference (2021) та на конференції «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології» (2022).

**Публікації.** За результатами проведеної роботи опубліковано 7 статей у фахових журналах, у тому числі по одній статті Q1- та Q3-квартилів у базі даних SCOPUS.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертаційна робота складається з анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів досліджень та їх обговорення, заключення, висновків, списку використаних джерел літератури, що містить 157 посилань. Дисертаційна робота викладена на 126 сторінках, містить 55 рисунків та 3 таблиць.

## РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1. Структура фібриногену та полімеризація фібрину

Фібриноген – розчинний попередник фібрину – життєво важливий протеїн плазми крові, який бере участь не лише в коагуляції, а й у регуляції фібринолізу, взаємодіях клітин з позаклітинним матриксом, запальній відповіді та регенерації пошкоджених тканин. Саме полімеризація фібрину забезпечує формування тривимірного згустку – каркасу тромбу – у місцях пошкодження судин, тим самим зупиняючи кровотечу.

Ланцюг A $\alpha$  складається з 610 амінокислотних залишків, ланцюг B $\beta$  – з 461, а головна форма  $\gamma$  ланцюга – з 411 залишків. Альтернативна форма  $\gamma$ -ланцюга ( $\gamma'$ -ланцюг) виникає через альтернативну обробку транскрипту первинної мРНК та містить заміну фрагменту  $\gamma$ 408-411 аніонною послідовністю з 20 амінокислот ( $\gamma'$ 408–427), яка містить два сульфатовані тирозини [1, 2].

Ланцюги A $\alpha$ , B $\beta$  і  $\gamma$  разом формують унікальні функціональні домени в межах регіонів, що сприяють виконанню протеїном різноманітних функцій у процесі коагуляції та за його межами. Відповідно до рекомендацій щодо номенклатури, запропонованих Міжнародним товариством дослідників фібриногену IFRS у 2008 році, виокремлено основні структурні одиниці фібриногену [3].

Молекула фібриногену містить два периферійні D регіони. Між D регіонами та центральним E регіоном розташовано суперспіральний D домен та суперспіральний E домен. Суперспіральний D домен знаходиться ближче до D регіону, а суперспіральний E домен – відповідно ближче до E регіону – пообіч невпорядкованої ділянки, що є мішенню фібринолізу [4].

Кожен з D регіонів, сформований  $\beta$ - та  $\gamma$ -нодулями (вузликами), утвореними  $\beta$ - та  $\gamma$ -ланцюгами відповідно. В межах кожного з нодулів виділяють домени A, B і

P, при цьому P-домен розташовано у C-кінцевій ділянці, а A-домен – у N-кінцевій ділянці ланцюга, що формує нодуль.

N-кінцеві фрагменти A $\alpha$ - та B $\beta$ -ланцюгів, що знаходяться у E регіоні, закінчуються фібринопептидами A та B, відщеплення яких відбувається при перетворенні фібриногену на фібрин [4]. C-кінцева частина A $\alpha$ -ланцюга (A $\alpha$ 221-610) утворює невпорядковану конекторну частину ( $\alpha$ C-конектор) та доменну частину ( $\alpha$ C-домен), який у свою чергу поділяється на два субдомени – C-кінцевий та N-кінцевий [5].

В результаті активації шляху коагуляції, утворюється тромбін, який відщеплює від A $\alpha$ - та B $\beta$ -ланцюгів фібриногену фібринопептид A, а згодом і фібринопептид B відповідно [6, 7].

Відщеплення послідовності фібринопептиду A тромбіном, ініціює полімеризацію фібрину шляхом експонування сайту полімеризації «A», який знаходиться на N-кінці A $\alpha$ -ланцюга фібрину, що містить амінокислотні залишки A $\alpha$ 17-20 (GPRV) [8]. Центр полімеризації «B», який експонується після відщеплення фібринопептиду B, розташовано у B $\beta$ -ланцюзі фібрину, що містить амінокислотні залишки B $\beta$ 15-18 (GHRV) [9].

Комплементарний центру полімеризації «A» центр «a» розташовано в D-регіоні сусідньої молекули фібрину у кишені, яка розташована між  $\gamma$ Asn337 і  $\gamma$ Met379 [10]. Натомість, комплементарний центру полімеризації «B» центр «b» сформовано амінокислотними залишками B $\beta$ -ланцюга Glu397, Asn398, Arg406, Cys407 і His408, Asn432 [7].

На відміну від центрів полімеризації «A» та «B», відомі також як випини (knobs), які з'являються лише після відщеплення фібринопептидів, центри полімеризації «a» та «b», відомі також як кишені (holes) «a» та «b», існують на поверхні фібрину конституційно [11].

Утворений фібрин desA, як і фібрин desAB, здатні до самоскладання. Дволанцюгові протофібрили утворюються завдяки латеральній асоціації між молекулами фібрину зі зсувом на  $\frac{1}{2}$  молекули: центральний регіон E контактує

електростатично завдяки «А»:«a» та «В»:«b» взаємодіям, з периферійними D регіонами двох сусідніх молекул фібрину [12,11].

Самоскладання фібрину полегшує міжмолекулярне антипаралельне С-кінцеве вирівнювання пар  $\gamma$ -ланцюгів, які потім ковалентно стабілізуються шляхом утворення ізопептижних зв'язків  $\gamma$ Lys406-Gln398 та/або  $\gamma$ Lys406- $\gamma$ Gln399 фактором XIIIa з утворенням « $\gamma$ -димерів» [13, 14].

Дотаково існують також сайти взаємодій між D регіонами, які сприяють правильному взаємному розташуванню молекул фібрину в протофібрилі. Ці контактні зони роташовано між залишками  $\gamma$ 275 і  $\gamma$ 300  $\gamma$ -модуля [15]. Відомо, що молекули фібрину, які мають амінокислотні заміни у цьому фрагменті (наприклад фібриноген Токіо II,  $\gamma$ Arg275C) утворюють аномально розгалужені фібрили, що є результатом уповільненої збірки фібрину, а також неточної «від кінця до кінця» розташування збірних мономерів фібрину [16, 17], які мають дефектні взаємодії сайтів «D:D», характеризуються мережами, що відображають підвищене розгалуження волокон.

У фібриногені  $\alpha$ C домени є нековалентно з'язаними між собою та з E регіоном, завдяки взаємодіям з негативно зарядженими фібринопептидом В. Після відщеплення фібринопептиду В вони дисоціюють та віддаляються від остова молекули [18]. Ця подія, очевидно, робить  $\alpha$ C домени доступними для взаємодії з  $\alpha$ C-доменами інших молекул фібрину, таким чином сприяючи латеральній асоціації протофібрил [19, 5].

Дволанцюгові протофібрили асоціюють латерально з утворенням багатоланцюгових фібринових волокон, які галузяться, зростають та зрештою формують тривимірну сітку фібрину – каркас тромбу [20].

~~Метою нашого огляду є аналіз~~ основних молекулярних інструментів, які застосовуються науковцями для розкриття структурних особливостей фібрин(оген)у та тонких молекулярних механізмів полімеризації фібрину. Зокрема ми зосередимо свою увагу на таких молекулярних ефекторах як моноклональні антитіла, пептиди-міметики та високоселективні протеїнази, навівши приклади

їхнього успішного застосування, які лягли в основу сучасного уявлення про структуру та функції ключового протеїну системи зсідання крові – фібриногену.

## **1.2. Молекулярні ефектори для вивчення структури та функцій фібрин(оген)у**

### **1.2.1. Моноклональні антитіла**

Антитіла (або ж імуноглобуліни) є протеїновими молекулами, які утворюються клітинами імунної системи для виявлення та зв'язування чужорідних протеїнів. З'являючись у відповідь на появу в організмі невідомих раніше протеїнів, вони володіють унікальною специфічністю та афінністю, що дозволяє використовувати їх у біотехнології [21].

Створення моноклональних антитіл для біотехнологічного застосування здійснюють з використанням гібридомної технології. Для отримання гібридомної лінії клітин, лабораторним тваринам, найчастіше кролі або миші, вводять вибраний антиген, проти якого виробляють антитіла за допомогою серії ін'єкцій протягом декількох тижнів, щоб стимулювати диференціацію В-клітин у плазматичні В-клітини та В-клітини пам'яті. Після того, як достатня кількість антитіл утворюється в сироватці крові, тварину забивають, а селезінку видаляють в асептичних умовах для виділення активованих В-клітин [22]. Потім активовані В-лімфоцити зливають з клітинами міеломи. Для ефективного злиття клітини міеломи інкубують у 8-азагуаніні, щоб отримати нефункціональні гени гіпоксантин-гуанінфосфорибозилтрансфери (HGPRT) у клітинах міеломи. Це робить метастатичні пухлинні клітини чутливими до середовищ НАТ як кращого методу в гібридомній технології. Злиття клітин – це процес, у якому активовані В-лімфоцити зливаються з НАТ-чутливими клітинами міеломи [23]. Поліетиленгліколь сприяє злиттю плазматичної мембрани клітин міеломи з плазматичною мембраною клітин, що виробляють антитіла, таким чином

створюючи клітину з більш ніж одним ядром, утворюючи гетерокаріон. Інший метод, який використовується для злиття, електрозлиття, при якому клітини зливаються під дією електричного поля. Цей метод більш ефективний, ніж попередній [24].

У середовищі, що містить ПЕГ, клітини зливаються з утворенням гібридомних клітин, але навіть найефективніший метод злиття дозволить утворити лише близько 1-2 % злитих гібридомних клітин. Крім того, приблизно 1 зі 100 клітин буде життєздатними гібридними клітинами. Тому в середовищі є ряд незлитих клітин [25]. Цей крок дозволяє вибрати злиті клітини з усіх незлитих клітин. Це досягається шляхом інкубації клітинної суміші з подальшим культивуванням протягом 10-14 днів у середовищі НАТ (селективне середовище). Середовище НАТ містить гіпоксантин-аміноптерин-тимідин. Аміноптерин, присутній у середовищі НАТ, блокує здатність клітин синтезувати нуклеотиди шляхом синтезу *de novo*. Гіпоксантин і дезокситимідин дозволяють клітинам з функціональними генами гіпоксантин-гуанінфосфорибозилтрансферази (HGPRT) виживати за допомогою шляхів порятунку. Через обмежену тривалість життя незлиті В-клітини гинуть протягом кількох днів. Незлиті злоякісні пухлинні клітини гинуть внаслідок відсутності гена гіпоксантин-гуанінфосфорибозилтрансферази (HGPRT). Наявність аміноптерину блокує їх здатність синтезувати нуклеотиди шляхом *de novo* [26]. Таким чином, життєздатні клітини, що залишилися в середовищі, є гібридними клітинами; ці гібридні клітини мають здатність рости та ділитися на середовищі НАТ, оскільки вони мають функціональний ген HGPRT з В-лімфоцитів, що робить їх HGPRT позитивними, і, таким чином, вони можуть рости в необмеженій концентрації на середовищі НАТ [26].

Клітини гібридоми НАТ-селекції переносяться на планшети ELISA, де кожна лунка містить одну гібридомну клітину. Це досягається за допомогою методу граничного розведення. Гени В-клітинної лінії, присутні в клітинах гібридоми, виробляють специфічне антитіло зі специфічним епітопом; це антитіло відоме як «моноклональне антитіло». В інших лунках можуть бути інші гібридоми, що

продукують антитіла, специфічні до іншого епітопу того самого антигену. Після поділу та ізоляції різних гібридом проводиться скринінг для відбору гібридом, які продукують бажані антитіла, націлені на специфічні епітопи для антигену [27].

Ці гібридомні клітини можна підтримувати та зберігати в культуральному середовищі для виробництва моноклональних антитіл, специфічних до окремих сайтів протеїнової молекули, які є незамінними інструментами у вивченні структури та функції протеїнів, для розробки імунодіагностикумів та для імуногістохімічної візуалізації протеїнів.

Антитіла це великі молекули з молекулярною масою приблизно 150 кДа, що складаються з двох різних видів поліпептидного ланцюга. Один, приблизно 50 кДа, називається важким або H-ланцюгом, а інший, 25 кДа, називається легким або L-ланцюгом. Кожна молекула IgG складається з двох важких і двох легких ланцюгів. Два важкі ланцюги з'єднані один з одним дисульфідними зв'язками, а кожен важкий ланцюг з'єднаний з легким ланцюгом дисульфідним зв'язком. У будь-якій даній молекулі імуноглобуліну два важких і два легких ланцюги ідентичні, що дає молекулі антитіла два ідентичних антигензв'язуючих сайти, а отже, здатність зв'язуватися одночасно з двома ідентичними структурами.

Молекулярна маса антитіла складає 150 kDa, крім того, антитіло є бівалентим, тобто має два центри зв'язування протеїну. Молекули антитіл IgG можуть бути розщеплені на три фрагменти ферментом папаїном. Два з них є ідентичними Fab-фрагментами, які називаються так тому, що вони є F-фрагментами зі специфічним антигеном. Фрагмент Fab складається з легкого ланцюга та N-кінцевої половини важкого ланцюга, які утримуються міжланцюговим дисульфідним зв'язком. Інша протеаза, пепсин, розрізає ту саму загальну область молекули антитіла, що й папаїн, але на карбоксикінцевій стороні дисульфідних зв'язків. У результаті утворюється фрагмент  $F(ab')_2$ , у якому два плеча молекули антитіла залишаються зв'язаними.

**Ефекти антитіл пов'язані з безпосереднім блокуванням функціонально активних сайтів молекули. У цьому випадку міжмолекулярна взаємодія**



**блокується стерично, оскільки досліджуваний сайт уже є заблокований специфічним антитілом, афінність якого співмірна афінності природного ліганда.**

Перші дослідження полімеризації фібрину з використанням моноклональних були опубліковані в 1984 році. Досить швидко було виявлено, що в більшості випадків зв'язування моноклональних антитіл з фібрином не перешкоджає його полімеризації та формуванню фібринового згустку. Здатністю інгібувати полімеризацію фібрину володіють лише ті антитіла, які взаємодіють зі специфічними сайтами фібрину або з сусідніми ділянками.

Найважливішими для аналізу є ті дослідження, у яких чітко визначено епітоп моноклонального антитіла. Зокрема, антитіло Mab-Y18, отримане Nieuwenhuizen та співавт. було специфічне до сайту A $\alpha$ 1-51 молекули фібриногену, не взаємодіяло з фібрином та з фібринопептидом А. Це антитіло ефективно інгібувало відщеплення фібринопептиду А тромбіном [39]. Його можна застосовувати зокрема для імунохімічної детекції продуктів деградації фібриногену, а також для розрізнення фібринових та фібриногенових депозитів при імуногістохімічному аналізі.

Отримане Kudryk та співавт. моноклональне антитіло MoAb/8C2-5 мало специфічність до епітопу A $\alpha$ 7-16. Автори запропонували застосування цього антитіла для виявлення мутацій Asp-7, Phe-8, and Arg-16, які можуть призводити до розладів коагуляції. Також їхнє застосування можливе для вивчення кінетики вивільнення фібринопептиду А у моделі тромбозу [40].

Інше антитіло Y22, отримане групою Nieuwenhuizen та співавт., є специфічним до епітопу, розташованого в D-регіоні молекули фібриногену. Це одне з небагатьох антитіл, яке ефективно інгібувало активацію плазміногену tPA на фібрині [41]. Таке антитіло та його похідні могли б бути антифібринолітичним агентом нового типу, який міг би застосовуватися при гіперфібринолізі та для запобігання геморагіям. Слід відзначити, що гіпотетичні антифібринолітичні

засоби на основі моноклональних антитіл за специфічністю своєї дії не мали б аналогів.

Антитіло 1-5A, отримане групою під керівництвом Komisarenko, є специфічним до  $\alpha$ C-регіону – а саме фрагменту A $\alpha$ 537-595. Авторами запропоновано його використання як компонента імунодіагностичної sandwich-ELISA для виявлення найбільш ранніх форм розчинного фібрину, які ще не зазнали дії фібринолізу. Одночасне визначення розчинного фібрину в класичному та у запропонованому авторами тестах дозволило б зробити висновки про інтенсивність та час процесів активації внутрішньосудинного тромботворення [30].

Інше антитіло, отримане Galanakis та співавт. (TF 359) мало специфічність до A $\alpha$ 529-539 фрагменту та було використане авторами для фундаментальних досліджень взаємодії фібриногену та фібрину з біоматеріалами [43]. Використання такого високоспецифічного інструменту як моноклональне антитіло, дозволило визначити, якими саме регіонами контактує молекула фібриногену з поверхнями різної природи. Такі дослідження мають виключне значення для розробки атромботичного покриття стентів, протезів та серцевих клапанів.

Групою Matsueda було отримано декілька моноклональних антитіл, здатних взаємодіяти з фібрином desAB, але не з фібриногеном. Найбільш ефективно з них антитіло 64C5 було використано для детекції фібрину та розчинного фібрину. Така специфічність антитіла була пов'язана з тим, що його епітоп включав у себе центр полімеризації «B», та був ідентифікований як B $\beta$ 15-22 [44].

Тоді як антитіло 64C5 селективно взаємодіяло з фібрином, інше антитіло, отримане отримано Lugovskoi та співавт., стало основою для розробки імунодіагностичної тест-системи для кількісного визначення фібриногену [45]. Це стало можливо завдяки специфічності антитіла до епітопу B $\beta$ 26-42, доступному лише в молекулі фібриногену та екранованому в молекулі фібрину. Окрім того, це антитіло інгібує полімеризацію фібрину та може бути використане для вивчення особливостей формування фібриново-тромбоцитарного тромбу [28]

Nieuwenhuizen та співавт. Отримали також антитіло FDP-14, специфічне до до фрагменту B $\beta$ 54-118 [48]. Взаємодіючи з E $\alpha$ -фрагментом фібрину, це антитіло може бути використане як для детекції пізніх продуктів деградації фібриногену, так і для досліджень міжмолекулярних взаємодії, обумовлених цим фрагментом. Згодом автори створили з використанням цього антитіла сендвіч-ELISA для діагностичного застосування [29]. Водночас про ефекти антитіла на полімеризацію фібрину не повідомлялося. Можливо, порівняння даних щодо ранніх продуктів деградації фібрину (які містять N-кінцеві ділянки B $\beta$ -ланцюга), визначених альтернативними тестами, та даних тесту, розробленого авторами, дозволить отримувати інформацію про тривалість розвитку тромбофілії.

Антитіло, отримане до пептиду B $\beta$ 43-47 групою на чолі з Cierniewski виявилось ефективним інгібітором полімеризації фібрину та дозволило авторам стверджувати про існування у цьому фрагменті молекули сайтів, відповідальних за міжмолекулярні взаємодії при полімеризації [45]. Імовірно, ці результати можна вважати першими згадками про можливість існування сайту «С» полімеризації, який було згодом локалізовано Lugovskoi та співавт. [30].

У 2023 році Fuchigami та Matsumura було описано антитіло 102-10, специфічне до епітопу B $\beta$ 102-110, доступного лише у твердофазному фібрині. Це антитіло було запропоновано використовувати для імуногістохімічного виявлення фібринових депозитів у тканинах [46]. Окрім того, на основі цих антитіл було створено злитий протеїн, здатний гідролізувати фібринові тромби [31]. Запропоновано також їхнє використання для таргетної доставки протипухлинних агентів [32].

Схожими властивостями володіє антитіло I-3C створене групою Lugovskoi під керівництвом Komisarenko, Маючи епітоп у фрагменті  $\beta$ 118-134, воно взаємодіє виключно з фібрином desA та desAB [33]. На його основі було створено тест-систему для визначення розчинного фібрину, яка пройшла успішну апробацію в клініках України та засвідчила свою діагностичну значимість [34]. У 2022 році було припинено роботи по створенню на основі цього антитіла стрептокіназа-вмісних

імуноліпосом з тромболітичною дією, які однак мали дуже обнадійливі результати [35].

Антитіло П-4d, специфічне до  $\gamma$ 86-240, стало іншим компонентом вищезгаданої тест-системи, а саме tag-антитілом [49]. Його було отримано Lugovskoi та співавт. Та широко апробовано у діагностичній практиці.

Отримане Medved та співавт. моноклональне антитіло, специфічне до епітопу  $\gamma$ 312-324 дозволило глибше дослідити інший аспект процесу формування та елімінації тромбу. Воно виявилось ефективним інгібітором tPA-опосередкованої активації плазміногену [50]. Це вказує на існування у цьому фрагменті фібрину сайтів зв'язування плазміногену та/або його активаторів.

Антитіло YCU-R3, отримане Ohkubo та співавт., було специфічне до С-кінцевого додекапептиду  $\gamma$ -ланцюга фібрин(оген)у –  $\gamma$ 397-411. Його ефективна інгібіторна дія на зв'язування фібриногену з GPIIb/IIIa рецептором тромбоцитів довела важливість цих взаємодій у побудові фібриново-тромбоцитарного тромбу [51].

Таким чином, антитіла, специфічні до окремих сайтів молекули фібриногену та його похідних показали себе як придатний інструмент для вивчення механізмів полімеризації фібрину, взаємодій фібриногену з тромбоцитами та компонентами фібринолітичної система, а також для створення імунодіагностиків. Знайшли вони своє застосування і як інструмент в імуногістохімії. Таке широке застосування антитіл обумовлене їхньою унікальною специфічністю.

Таблиця. 1.1. Моноклональні антитіла як інструменти дослідження структури та функції фібриногену.

	Епітоп антитіла	Ефекти	Тип	Посилання
Aα	1-51	інгібування вивільнення фібринопептиду А	IgM	[36]
	7-16	виявлення мутацій із замінами амінокислот	IgG1	[37]
	D-регіон	інгібують індуковане фібрином посилення t-РА активації плазміногену	IgG1	[38]
	537-595	Використання в якості мітки	n.d.	[39]
	529-539	інгібування	IgG	[40]
Bβ	15-22	Детекція фібрину в імунохімічному тесті		[41]
	15-53	Взаємодіють з центром молімеризації «С»	IgG1	[30]
	14-15	Детекція фібриногену в імунохімічному тесті	IgG1	[31]
	43-47	Інгібування полімеризації фібрину	IgG	[42]
	102-110	Детекція твердофазного фібрину		[43]
	54-118	Детекція продуктів деградації фібрину в імунохімічному тесті		[44]
	118-134	Детекція розчинного фібрину	IgG	[30]
γ	86-240	Застосування у імунодіагностиці	IgG	[45]
	312-324	Інгібування tРА- опосередкованої активації плазміногену	IgG	[46]
	397-411	Блокування зв'язування з GPIIbIIIa		[47]

### 1.2.2. Пептиди-міметики

Протеїни є складно просторово організованими поліпептидами. Молекула протеїну складається з одного чи кількох поліпептидних ланцюгів, які формують локально впорядковані фрагменти – домени, субдомени, регіони – та ділянки локальної невпорядкованості [48]. Частина пептидних фрагментів у молекулі протеїну є екранованими, схованими у глобулах, а інші – експоновані на поверхню, контактують з розчинником та є сайтами міжмолекулярних взаємодій протеїнів [49].

Тому, хоча прийнято писати, що у здійсненні біологічних функцій бере участь той чи інший протеїн, насправді ту чи іншу функцію виконує певна частина молекули: функціональний сайт, зона контактної взаємодії, тощо. Саме така властивість робить можливим застосування пептидів-міметиків у дослідженні міжмолекулярних взаємодій протеїнів. Навіть низькомолекулярний пептид, який містить у своєму складі функціонально активну групу, з високою ймовірністю демонструватиме біологічну дію цілого протеїну [50].

Такий великий та функціонально активний протеїн як фібриноген містить численні сайти міжмолекулярної взаємодії. Зокрема як основний протеїн системи зсідання крові та компонент позаклітинного матриксу фібрин(оген) має сайти зв'язування інших молекул фібрину (центри полімеризації) [16], ділянки взаємодії з тромбоцитами [51], гепарином [52], йонами  $\text{Ca}^{2+}$  [53], лейкоцитами, еритроцитами [54], клітинами ендотелію [55], тощо. Потенційно, кожен пептид, який імітує послідовність вищезгаданих сайтів може бути інструментом дослідження цих взаємодій або ж їх потенційним інгібітором [56].

Пептиди-міметики можуть походити з молекули фібрину та бути наслідком її протеолітичного розщеплення [57], або ж бути їхніми синтетичними аналогами [58]. При цьому саме синтез пептидів-міметиків слід вважати більш доцільним, оскільки він дозволяє не лише відтворювати практично будь-який фрагмент молекули, але і вносити амінокислотні заміни до досліджуваної послідовності [59].

Існує кілька стратегій для *de novo* синтезу пептидів, серед яких найбільш поширеними є твердофазний синтез пептидів (SPPS) та рідкофазний синтез (LPPS). Твердофазний підхід є провідним методом отримання як пептидів, так і білків. У цьому методі першу амінокислоту закріплюють на спеціальному полімерному носії (смолі), після чого послідовно приєднують наступні амінокислоти, використовуючи відповідні активатори для утворення пептидного зв'язку. Завершальний етап полягає у відокремленні готового поліпептиду від твердого носія.

Значення методу SPPS полягає в можливості повної автоматизації процесу, що дозволяє проводити синтез у великому масштабі. Найбільш популярними варіантами цього підходу є методи з використанням захисних груп Fmoc і Boc. У Fmoc-методі для захисту аміногруп застосовується флуоренілметоксикарбоніл, тоді як Boc-варіант базується на використанні трет-бутилоксикарбонілу як захисної групи.

Рідкофазний синтез, на відміну від твердофазного, відбувається повністю в рідкому середовищі. Його основна перевага — м'які умови реакції, що дозволяє зберігати структурну цілісність чутливих молекул. Водночас очищення продуктів у рідкій фазі ускладнене через значну кількість використаних реагентів.

Однією з ключових реакцій у процесі синтезу пептидів є реакція конденсації, яка забезпечує з'єднання карбоксильної групи однієї амінокислоти з аміногрупою іншої. Для цього застосовують конденсуючі агенти, наприклад DCC або HOBT, що забезпечують ефективне ацилювання за м'яких умов з високим виходом. Також у синтезі використовується реакція елімінації, наприклад, для знеактивації метіоніну через його відновлення до дитіольної форми за допомогою  $\text{NaBH}_4$  або інших редукторів — ця реакція проводиться в основному середовищі.

Оскільки амінокислоти мають різноманітні функціональні групи, у ході синтезу застосовують різні захисні групи, які після завершення процесу необхідно зняти. У Fmoc-схемі для цього зазвичай використовують піперидин, тоді як у Boc-підході видалення захисту проводиться з використанням трифлуороцтової кислоти (TFA)[60].

**На відміну від антитіл, які блокують досліджуваний фрагмент молекули,**

**пептиди імітують структуру сайту, а отже блокують комплементарну йому ділянку взаємодії. Тобто, дія пептиду на досліджуваний сайт не безпосередня, а конкурентна – сайт зберігає свою структуру, доступний до зв'язування, але його ліганд заблокований.**

Найочевиднішим прикладом пептидів-міметиків, які імітують функціональні сайти молекули фібрину, є GPRP та GHRP. Це тетрапептиди відтворюють послідовність центрів полімеризації «А» та «В» відповідно – A $\alpha$ 17-20 (GPRV) та B $\beta$ 15-18 (GHRP) [61,62]. Пептиди GPRP та GHRP здійснюють свою дію на процес полімеризації, взаємодіючи з центрами полімеризації «а» та «b».

Пептид GPRP вперше було запропоновано як інгібітор полімеризації фібрину у 1978 році Laudano та Doolittle [59]. Цей пептид повністю інгібував зсідання плазми крові, пригнічував полімеризацію фібрину, зв'язувався з молекулою фібриногену. Такі його ефекти було пов'язано з тим, що він імітував сайт полімеризації «А» (N-кінець A $\alpha$ -ланцюга фібрину) та взаємодівав з сайтом полімеризації «а», розташований у  $\gamma$ -ланцюзі фібрину[63]. Відтоді його широко застосовують у дослідженні полімеризації фібрину [88]. Також запропоновано прямі інгібітори полімеризації фібрину, які є кон'югатом GPRP з альбуміном (GPRPGGGGCam-albumin) [64].

Синтетичний пептид KVQHIQLLQKNVRA, який імітує фрагмент A $\alpha$ 113-126, було використано Walz та співавт. Для дослідження взаємодій фібрин(оген)у з тромбоспондином [65]. Тромбоспондин — багатофункціональний адгезивний глікопротеїн, який зв'язується з поверхнею спочиваючих і активованих тромбоцитів. Тромбоспондин також зв'язується з різними білками, включаючи фібриноген. Вважається, що взаємодія між тромбоцитарним тромбоспондином і фібриногеном сприяє необоротній агрегації тромбоцитів. Як A $\alpha$ -, так і B $\beta$ -ланцюги фібриногену специфічно зв'язуються з тромбоспондином. Продукти розщеплення ціаногенбромідом  $\alpha$ - і B $\beta$ -ланцюгів фібриногену А та синтетичні пептиди, що відповідають певним ділянкам цих продуктів розщеплення, були використані для ідентифікації ділянок альфа- та В бета-ланцюгів фібриногену А, які зв'язуються з тромбоспондином. Фрагменти бромиду ціаногену ланцюгів A $\alpha$ - та B $\beta$ -фібриногену, розділені гель-фільтрацією та хроматографією з оберненою фазою, досліджували



на активність зв'язування тромбоспондину. Тромбоспондин специфічно зв'язується з фрагментом А $\alpha$ -ланцюга, що включає залишки 92-147, і фрагментом В $\beta$ -ланцюга, що включає залишки 243-305. Аналіз характеристик зв'язування двох серій синтетичних пептидів, що перекриваються, показав, що пептиди, відповідні залишкам 113-126 А $\alpha$ -ланцюга та залишкам 243-252 В $\beta$ -ланцюга, зберегли активність зв'язування тромбоспондину. Окремі кон'югати бичачого сироваткового альбуміну активних пептидів А $\alpha$ -ланцюга та В $\beta$ -ланцюга інгібували агрегацію тромбоцитів. Ці дослідження показують, що фібриноген має принаймні дві унікальні послідовності, які розпізнаються тромбоспондином, і що така взаємодія може впливати на агрегацію тромбоцитів [66]. Для виявлення сайту взаємодії з тромбоспондином авторами було використано низку пептидів, послідовності яких частково перекривались. Найбільш афінний пептид було визначено як такий, що [67] найточніше імітує досліджуваний сайт. Таких пептидів авторами було виявлено два – інший імітує фрагмент В $\beta$ 243-252.

З використанням синтетичного пептиду KVQHIQLLQKNVRA Komisarenko та співавт. було доведено існування у фрагменті молекули А $\alpha$ 195-205 сайту міжмолекулярних взаємодій, який бере участь у стадії формування протофібрил фібрину [90]. Цікаво, що фрагмент А $\alpha$ 195-205 знаходиться у суперспіральній ділянці молекули фібриногену, яку традиційно вважали функціонально інертною. Відкриття у цьому сайті важливої контактної зони стало несподіванкою для дослідників. Окрім можливої ролі цього фрагменту у побудові протофібрил, яку було запропоновано авторами, вони також припустили його використання як потенційного прототипу для створення антитромботичного засобу [68].

Яскравим прикладом використання пептидів для дослідження структури та функції фібриногену є використання RGD-вмісних пептидів, які імітують послідовності фібриногену, здатні взаємодіяти з GPIIb/IIIa рецептором тромбоцитів. Такі роботи проведено зокрема Bennett та співавт. [69]. Застосування синтетичних пептидів дозволило виявити фрагменти рецептора, здатні зв'язувати фібриноген [70]. Такі ж підходи було використано для виявлення на поверхні

рецептора ліганд-індукованих сайтів зв'язування (ligand-induced binding sites). Відкриття важливості RGD-вмісних мотивів у процесі агрегації тромбоцитів дозволило запропонувати використання низки поліпептидів, зокрема дезінтегринів отрути змій, як антиагрегантних агентів [71].

На відміну від GPRP, пептид GHRP не здатен впливати на полімеризацію фібрину. Однак, роботи Belitser та співавт. показали зниження здатності фібриногену інгібувати полімеризацію фібрину за присутності пептиду GHRP. Вочевидь, це пов'язано з участю центру полімеризації «b» у побудові тривимірної сітки фібрину [72]. Застосування цього пептиду також дозволяє дослідити «B»:«b» взаємодії та дослідити їхні додаткові функції. Зокрема, Kostelansky та ін. [73] використав цей пептид для кристалографічного дослідження молекули фібрину та виявив з його допомогою  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язувальний сайт, який з'являється після формування міжмолекулярних «B»:«b» зв'язків.

Послідовності, що входять до  $\text{B}\beta\text{N}$ -домену містять сайти взаємодій з численними рецепторами клітин, зокрема з VE-кадгерином. Застосування пептиду  $\text{B}\beta 15-66$  та його димеру дозволило групі Medved та Yakovlev довести таку взаємодію на молекулярному рівні та ідентифікувати на поверхні рецептора сайти, які за них відповідають [74]. Таким же чином було доведено і зв'язування фібриногену з VLDLP рецептором [75, 76]. Слід відзначити, що використані авторами пептиди були рекомбінантними, на відміну від інших, згаданих вище, синтезованих хімічно.

Групою Lugovskoi та співавт. було використано пептид APSLRPAPPPIISGGGYRARPA, який імітує послідовність  $\text{B}\beta 26-46$  для доведення існування сайту полімеризації «C» [77]. Слід відзначити, що автори застосували для ідентифікації сайту полімеризації «C» окрім пептиду ще й моноклональне антитіло I-3B (див. таблицю 1), підтвердивши існування активного сайту за допомогою двох незалежних підходів.

Mosseson та співавт. з використанням пептиду NGIIWATWKTREWYSMK, який імітує послідовність  $\gamma 365-380$  молекули фібриногену довели участь цього

фрагменту у формуванні центру «а»-полімеризації фібрину [95]. Раніше Podolnikova та співавт. виявили у цій частині молекули сайти взаємодій з рецепторами тромбоцитів. Щоправда, вони використовували пептид  $\gamma 370-383$  [78].

Існує низка досліджень, спрямованих на вивчення ролі С-кінцевих фрагментів  $\gamma$ -ланцюгів фібрину у взаємодіях з тромбоцитами. С-кінцевий додекапептид  $\gamma 397-411$  є відомим лігандом рецепторів тромбоцитів, критичний для їхньої агрегації [79, 80]. Також, С-кінцеві ділянки  $\gamma$ -ланцюгів зазнають ковалентної прошивки фактором XIIIa [81].

Таким чином, пептиди-міметики є зручним інструментом дослідження структури та функції фібриногену. Зв'язуючись із сайтами, які є комплементарними до досліджуваних фрагментів, вони дозволяють вивчати взаємодії на мономолекулярному рівні, при цьому, завдяки невеликому розміру, не створюючи стеричних перешкод. Різні пептиди було успішно використано для вивчення механізмів полімеризації фібрину, взаємодії фібриногену з іншими протеїнами та клітинними рецепторами. Їх також можна розглядати як основу для створення нових антитромботичних препаратів.

Таблиця. 1.2. Пептиди-міметики функціональних сайтів молекули фібриногену як інструменти дослідження його структури та функції.

	Послідовність пептиду	Фрагмент молекули, яку він імітує	Застосування	Посилання
A $\alpha$	GPRP	17-21	Інгібування полімеризації фібрину	[82]
	KVQHIQLLQKNVRA	113-126	Блокує сайти зв'язування з тромбоспондином	[83]
	LPSRDRQHLPL	195-205	Інгібування полімеризації фібрину	[84]
	RGD	572-574	Інгібування зв'язування з рецептором GPIIb/IIIa тромбоцитів	[85]

B $\beta$	GHRP	15-18	Блокує зв'язування по центрам полімеризації «В»:«b»	[86]
	GHRPLDKKREEAPSLRPAP PPISGGGYRARPAKAAAT QKKVERKAPDAGGCL	15-66	Зв'язується з VE-кадгерином	[87]
	APSLRPAPPPISGGGYRAR PA	26-46	Взаємодіють з центром полімеризації «С»	[88]
	QPDSSVKPY	228-236	Інгібування полімеризації фібрину	[91]
	IKIIDFGLAR	243-252	Блокує сайти зв'язування з тромбоспондином	[91]
	RPFFPQ	455-460	Інгібування полімеризації фібрину	[25]
$\gamma$	NPDESSKPN	69-77	Інгібування полімеризації фібрину	[25]
	NGIHWATWKTREWYSMK	365-380	Інгібування полімеризації фібрину	[89]
	ATWKTRWYSMKKTT	370-383	Інгібування зв'язування з тромбоцитами	[90]
	GQQHHLGGAKQAGDV	397-411	Блокує зв'язування з тромбоцитами	[91]

### 1.2.3. Високоселективні протеїнази

Протеїнази – це ензими, що каталізують протеоліз, розщеплюючи протеїни на менші поліпептиди або окремі амінокислоти шляхом розщеплення пептидних зв'язків у протеїнах. Протеїнази беруть участь у багатьох біологічних шляхах, включаючи перетравлення спожитих протеїнів, катаболізм «старих» чи чужорідних протеїнів, та передачу сигналів клітинами [92].

Існують різні типи протеолітичних ензимів, відповідно до сайтів, у яких вони каталізують розщеплення протеїнів. Дві основні групи – це екзопептидази, які націлені на кінцеві ділянки поліпептидного ланцюга, і ендопептидази, які націлені на ділянки всередині поліпептидного ланцюга. Ендопептидази використовують різні каталітичні механізми; в цю групу входять аспарагінові ендопептидази, цистеїнові ендопептидази, глутамінові ендопептидази, металоендопептидази, серинові ендопептидази та треонінові ендопептидази [93].

Субстратна специфічність ендопептидаз визначається молекулярними взаємодіями у ділянці зв'язування протеїнази з субстратом. Бічні амінокислотні ланцюги субстрату розміщені в субкишеннях протеїнази. Шехтер і Бергер [94] розробили унікальну номенклатуру для субкишень протеїназ: розщеплюваний пептидний зв'язок розміщено між залишками P1 (N-кінець) і P1' (C-кінець). Наступні амінокислотні залишки нумеруються відповідно у обох напрямках: P1-P2-P3...Pn та P1'-P2'-P3'...Pn'. Комплементарні субстрату субкишені протеїнази пронумеровані відповідно S1-S2-S3...Sn та S1'-S2'-S3'...Sn' [95]. Специфічність ензиму до субстрату як правило залежить від трьох амінокислотних залишків, найближчих до гідролізованого зв'язку, однак у окремих випадках навіть залишок P5 міцно зв'язаний з протеїназою [96].

Іншим важливим фактором, що визначає специфічність протеїнази є конформація гідролізованого субстрату. Здатність протеїнази гідролізувати пептидний зв'язок залежить зокрема від конформації поліпептиду. Як правило, пептидні зв'язки, які зазнають гідролізу, знаходяться у ділянках локальної

просторової невпорядкованості або між структурними одиницями, на шпильках та перегибах пептидного ланцюга.

Саме тому специфічний гідроліз глобулярного протеїну відбувається, як правило, лише в певній кількості сайтів, обумовлених специфічністю протеїнази. Використання протеїназ із різною специфічністю дає змогу отримувати дані щодо просторової гнучкості та оточення конкретних амінокислотних послідовностей [97, 98], ідентифікувати та характеризувати просторово впорядковані структури протеїнів та оцінити їхню стабільність [99], передбачити існування доменних структур [100, 101], охарактеризувати проміжні конформаційні стани протеїнових молекул [102, 103, 104].

**Таким чином, протеїнази дозволяють отримувати частково гідролізовані форми молекули з визначеною структурою, позбавлені чітко визначених фрагментів, тоді як інші фрагменти молекули лишаються нативними. Селективне відщеплення від молекули протеїну певного фрагменту дає змогу оцінити його функціональну роль.**

Молекула фібриногену має численні сайти, які потенційно є мішенями протеїназ. Тому протеїнази знайшли широке застосування у вивченні структури та функції молекули.

Окремим класом ензимів, які гідролізують пептидні зв'язки молекули фібриногену є тромбіноподібні ензими [105]. Такі ензими гідролізують виключно сайт A $\alpha$ 16-17, відщеплюючи фібринопептид A, однак, на відміну від тромбіну, не здатні відщеплювати фібринопептид B. Тромбіноподібні ензими містяться у отруті багатьох змій, наприклад *Trimeresurus mucrosquamatus* та *Trimeresurus erythrurus* [106, 107]. Натомість ензими, які селективно відщеплюють фібринопептид B, гідролізуючи зв'язок B $\beta$ 14-15, є досить рідкісними та менш цікавими дослідникам з практичної точки зору. Один з таких ензимів знайдено у отруті *Agkistrodon contortrix contortrix* [136].

Більшість протеїназ, специфічних до фібриногену (фібриногеназ), селективно гідролізують A $\alpha$ -ланцюг молекули [108]. Попри тривалу історію

досліджень, сайти протеолізу фібриногену такими ензимами є переважно невизначеними. Мішенню протеолітичної дії таких ензимів як правило є  $\alpha$ C-регіон молекули фібриногену.

В отруті *Trimeresurus albolabris* виявлено протеїназу, яка відщеплює від  $A\alpha$ -ланцюга фібриногену невеликий фрагмент, молекулярна маса якого не перевищує 15 kDa. При цьому, відчутне подовження часу зсідання плазми крові під дією протеїнази, виявлене дослідниками, вказує на те, що мішенню протеолізу може бути N-кінець  $A\alpha$ -ланцюга, що є нетиповим для  $\alpha$ -фібриногеназ [109].

Зокрема, з отрути *Naja nigricollis* було отримано цинк-вмісну металопротеїназу [110]. Сайти розщеплення  $A\alpha$ -ланцюга фібриногену не було ідентифіковано, однак її дія на фібриноген не призводила до втрати ним здатності перетворюватися на фібрин та полімеризуватися під дією тромбіну. Те, що місце розщеплення  $A\alpha$ -ланцюга фібриногену тромбіном лишалося неушкодженим, свідчить про те, що гідроліз відбувається на C-кінцевому кінці молекули. Судячи з ходу протеолізу фібриногену протеїнзою з отрути *Naja nigricollis*, цей ензим ефективно відщеплює  $\alpha$ C-регіон (продукт близько 37 kDa), який одразу ж поділяється на два субпродукти молекулярною масою близько 20 kDa та 17 kDa, які можуть представляти собою конекторну та доменну частини регіону [111].

З отрути *Agkistrodon contortrix contortrix* у лабораторії Markland та Retzios було отримано фібриногенолітичну цинк-вмісну протеїназу, яка отримала назву фібролаза [112]. Авторами було виявлено, що протеїназа мала високу специфічність до  $A\alpha$ -ланцюга молекули фібриногену, тоді як  $B\beta$ -ланцюг розщеплювався слабше. Було також отримано та охарактеризовано продукт гідролізу  $A\alpha$ -ланцюга фібрилазою, та встановлено що ензим селективно розщеплює пептидний зв'язок  $A\alpha$ 413-414 [113]. Згодом цей ензим було запропоновано використовувати як фібринолітичний агент [114]. Було також створено його рекомбінантний аналог – альфімепразу [115].

Іншим ензимом, який, за даними Stohnii та співавт. виявився здатним гідролізувати пептидний зв'язок  $A\alpha$ 413-414, є протеїназа з отрути *Gloydius halys*

*halys* [134]. Авторами було показано, що його протеолітична дія на фібриноген призводить до зниження його здатності полімеризуватися, перетворюючись на фібрин, та підтримувати агрегацію тромбоцитів [116].

Отже, пептидний зв'язок A $\alpha$ 413-414 імовірно знаходиться у такій ділянці молекули, яка є доступною для протеолізу. Відповідно до сучасних уявлень про структуру  $\alpha$ C-регіону, саме у цій ділянці закінчується  $\alpha$ C-конектор і починається доменна частина.

Цікаво, що Stohnii та співавт. також знайшли ензим бактеріального походження (*Bacillus thuringiensis*), який виявився здатним розщеплювати пептидний зв'язок A $\alpha$ 504-505, розташований між N- та С-кінцевими субдоменами  $\alpha$ C-регіону [133].

Специфічність до таких же або близьких сайтів протеолізу має протеїназа Cbfib1.1 (ізоформа Cbfib1.2 ) з отрути *Crotalus basiliscus basiliscus*, отримана та охарактеризована Retzios та Markland [117]. Вона розщеплює той самий сайт Lys413-Leu414, характерний для багатьох ензимів, а також сайт A $\alpha$ 505-506, просторово близький до A $\alpha$ 504-505, який зазнає гідролізу під дією ензиму з культурального середовища *Bacillus thuringiensis*. Також виявила специфічність до пептидного зв'язку в цій зоні (A $\alpha$ 516-517) і інша протеїназа з отрути *Crotalus basiliscus basiliscus* (Cbfib2) [118].

Окрім описаних сайтів, Cbfib2 також гідролізує пептидний зв'язок Gly254-Ser255, а Cbfib1.1/2 – A $\alpha$ Tyr560-Ser561. Остання точка гідролізу викликає інтерес з огляду ще й на те, що групою Komisarenko та співавт. було описано ензим з культурального середовища *Bacillus sp.*, здатний розщеплювати пептидні зв'язки A $\alpha$ 549-550, 552-553 та 583-584 [119]. Вочевидь, варто шукати місця локальної невпорядкованості структури, придатні для гідролізу протеїназами, в межах фрагменту A $\alpha$ 549-A $\alpha$ 584  $\alpha$ C-домену фібриногену.

Отже, основним джерелом протеїназ, специфічних до фібриногену, є отрути тварин [120], культуральні середовища мікроорганізмів [121] та загалом біологічні рідини різного походження [122].



Наприклад, Grashof та співавт. описали одразу декілька таких ензимів з отрути павуків роду *Loxosceles* та *Sicarius*, які мали вибірккову специфічність до А $\alpha$ -ланцюга фібриногену. Продукти протеолізу не було ідентифіковано, однак за молекулярною масою вони були близькими до тих, які утворюються під дією плазміну [123].

Тоді як  $\alpha$ -фібриногенази є переважно металопротеїназами, фібриногенази, специфічні до В $\beta$ -ланцюгів, як правило є сериновими протеїназами. Основним їхнім джерелом також є отрута змій.

Дослідниками Т. Matsui та командою було ізольовано серинову протеїназу галістазу з отрути *Agkistrodon halys blomhoffii* [124], яка, хоч і містила послідовність RGD у залишках 181-183, не інгібувала агрегацію тромбоцитів, індуковану АДФ або колагеном. Ензим найбільш ефективно гідролізував тканинний калікреїновий субстрат і вивільняв брадикінін з бичачого кініногену. Галістаза не викликає полімеризацію плазми крові людини, але розщеплює В $\beta$ -ланцюг фібриногену, а саме пептидний зв'язок В $\beta$ 42-43, проте має низьку селективність до А $\alpha$ -ланцюга фіброгену. Фібриноген, що зазнав гідролізу втрачав можливість зв'язуватись з тромбіном та формувати фібриновий згусток. Автори прийшли до висновку, що відщеплений пептид В $\beta$ 1-42 містить сайт зв'язування тромбіну.

Таку ж специфічність до пептидного зв'язку В $\beta$ 42-43 має і протеїназа з отрути *Crotalus atrox*, описана групою Budzynski [125]. Авторами було доведено, що позбавлений фрагменту В $\beta$ 1-42 фібрин не здатен до полімеризації. Це дозволило припустити наявність у цьому фрагменті додаткових сайтів міжмолекулярних взаємодій. Згодом групою Lugovskoi та Komisarenko це спостереження було підтверджене експериментально із застосуванням пептидів-міметиків та моноклональних антитіл, про що йшлося у відповідних розділах [138].

Вочевидь, сайт В $\beta$ Arg42-Ala43 є найбільш лабільним і легко зазнає гідролізу, адже згодом групою Chernyshenko та співавт. було отримано та охарактеризовано протеїназу з отрути *Echis multisquamatis*, яка селективно відщеплювала саме 1-42 фрагмент В $\beta$ -ланцюга, після чого починала гідролізувати С-кінцеві ділянки А $\alpha$ -

ланцюга [126]. Дія фібриногенази на молекулу фібриногену зменшувала його здатність підтримувати агрегацію тромбоцитів, проліферацію ендотеліоцитів та пухлинних клітин [127]. Цікаво, що фібриногеназа змінювала свою специфічність і починала в першу чергу гідролізувати А $\alpha$ -ланцюг фібрину після його полімеризації [128].

З отрути *Agkistrodon halys* Віао Ма та співавт. було отримано фібриноген-специфічну протеїназу, яка селективно гідролізувала В $\beta$ -ланцюг з формуванням двох основних продуктів з молекулярною масою 43 та 20 kDa [129]. Це вказує на те, що сайт протеолізу містився далі в N-кінця В $\beta$ -ланцюга, орієнтовно поблизу суперспіральної ділянки молекули.

Ланцюг  $\gamma$  не є типовою мішенню фібриногеназ, проте протеїнази з отрути деяких змій, наприклад *Echis carinatus* або *Gloydius halys halys* може частково гідролізувати  $\gamma$ -ланцюг молекули фібриногену при тривалому гідролізі [130].

Таким чином, протеїнази, специфічні до фібриногену, володіють унікальною специфічністю до окремих сайтів молекули. Однак, точне з'ясування специфічності, визначення гідролізованих пептидних зв'язків, яке б дало змогу охарактеризувати продукти, у більшості випадків не здійснювалося. Дослідники переважно обмежувалися характеристикою ензимів та вивченням їхніх ефектів на систему коагуляції. Водночас, застосування тих протеїназ, для яких було чітко ідентифіковано сайти протеолізу, дозволяє отримувати нову фундаментальну інформацію щодо ролі відщеплених ділянок у протеїно-протеїнових та протеїно-клітинних взаємодіях.

**З огляду на принципову різницю в дії на окремі сайти молекули фібриногену антитіл, пептидів-міметиків та протеїназ, вважаємо паралельне застосування цих трьох типів ефекторів надзвичайно перспективним для вивчення структури і функції цих сайтів. На цьому принципі і ґрунтуються подальші дослідження у дисертаційній роботі.**

Таблиця. 1.3. Високоселективні протеїнази, специфічні до окремих фрагментів молекули фібриногену як інструменти дослідження його структури та функції.

	Джерело протеїнази	Мішень протеолізу	Стабільний продукт протеолізу	Посилання
A $\alpha$	Agkistrodon rhodostoma	A $\alpha$ 16-17	фібрин desA	[131]
	Bothrops alternatus	A $\alpha$ 16-17	фібрин desA	[132]
	Gloydius halys halys	A $\alpha$ 413-414	фібриноген desA $\alpha$ 414-610	[133]
	Agkistrodon contortrix contortrix	A $\alpha$ 413-414	фібриноген desA $\alpha$ 414-610	[134]
	Crotalus basiliscus basiliscus	Lys413-Leu414 Ser505-Thr506 Tyr560-Ser561	n.d.	[125]
	Bacillus thuringiensis	A $\alpha$ 504-505	фібриноген desA $\alpha$ 505-610	[135]
	Bacillus sp.	A $\alpha$ 549-550 A $\alpha$ 552-553 A $\alpha$ 583-584	n.d.	[126]
B $\beta$	Agkistrodon contortrix contortrix	B $\beta$ 14-15	фібрин desB	[136]
	Agkistrodon halys blomhoffii	B $\beta$ 42-43	desB $\beta$ 1-42	[131]
	Echis multisquamatis	B $\beta$ 42-43	desB $\beta$ 1-42	[137]
	Crotalus atrox	B $\beta$ 42-43	desB $\beta$ 1-42	[138]
$\gamma$	n.d.			

## РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

### 2.1. Реактиви, матеріали та обладнання

#### 2.1.1. Реактиви

DMSO, RPMI 1640, FBS («Gibco», Великобританія), амфотерицин, трансферин, тимідин, гіпоксантин («Thermo Fisher Scientific», Китай), Protein G Sepharose, контривен, гліцин, HCl, мікроконцентратор PM-10, 96-коміркових планшетів («Greiner Microlon», США), ацетатному буфері, NaCl, кон'югат пероксидаза хрону із кролячими антимишачими антитілами, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ортофенілендіамін, Трис («Sigma», США), гепарин-агароза, Q-сефароза, протеїн G-сефароза, Blue-Sepharose (Pharmacia, Швеція), Toyopearl HW-55 («Toyosoda», Японія), субстрат S2238, ТЕМЕД, ДСН, сахарози, бромфенол, Кумассі G-250, оцтова кислота, маркерні протеїни («Fermentas», США), KН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub>, метанол, знежирене молоко («Thermo Fisher Scientific», США), пероксидаза хрону, 4-хлорнафтол, Твін-20 («Serva», Німеччина), уранілацетат («Agar Scientific», Великобританія), мідні сіточки з формвар-карбоновим покриттям 200 mesh («Polysciences», США).

#### 2.1.2. Фібриноген

Фібриноген отримували з плазми крові людини шляхом висолювання 16%-им розчином сульфату натрію [139].

Препарат фібриногену позбавляли від домішок плазміногену за допомогою лізин-сефарози. Чистоту препарату перевіряли електрофоретично в системі Лемлі. Вміст протеїну, що полімеризується під дією тромбіну – 96-98 %. Заморожений матеріал зберігали при температурі -20 °С.

### 2.1.3. Антитіло 2d2a

Клітини продуценти моноклонального антитіла 2d2a, які зберігали у парах азоту, поступово розморожували на водяній бані при 37 °C. Промивали від DMSO середовищем Хенкса шляхом центрифугування протягом 10 хвилин при 400 g. Процедуру повторювали двічі. Осад клітин ресуспендували в поживному кондиційному середовищі (на 200 мл розчину 100 мл RPMI 1640, 40 мл FCS, 60 мл культурального середовища мієломи х-63, 800 мкл амфотерицину, 100 мкл трансферину, 4 мл розчину НТ, що містив 0,19 г/л тимідину та 0,68 г/л гіпоксантину). Надалі культивування проводили в 10 % середовищі для гібридоми (на 500 мл культури – 450 мл RPMI 1640, 50 мл FCS, 10 мл розчину НТ) при 37 °C. Коли культура клітин почала наростати, кондиційне середовище замінювали на поживне середовище RPMI 1640 [140].

Моноклональні антитіла виділяли із середовища, в якому росли гібридоми, методом афінної хроматографії на Protein G Sepharose. Колонку зрівноважували калій фосфатним буфером (0,1 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,0), наносили профільтовану надосадову рідину з моноклональними антитілами, в який додавали інгібітор протеаз – контривен 10000 кіо/мл (калікреїнінактивуючих одиниць) (20 мкл на 100 мл надосадової рідини). Швидкість нанесення складала 0,5 мл/хв. Збирали матеріал, що не зв'язався з Protein G Sepharose, для перевірки наявності в ньому моноклональних антитіл. Промивали носій 0,1 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  буфером pH 7,0. Якість відмивки колонки перевіряли спектрофотометрично за допомогою спектрофотометра Optizen POP (Optizen, Південна Корея) при довжині хвилі 280 нм. Антитіла, що зв'язалися з носієм, елюювали 0,1 М гліцин-HCl буфером pH 3,0 зі швидкістю 0,5 мл/хв. Зібрані фракції миттєво нейтралізували розчином 1 М  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . Діаліз та концентрування матеріалу проводили в 0,1 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  буфером pH 7,0 з використанням мікроконцентратора з мембраною PM-10 («Amicon», США) [140].

Для дослідження специфічності та активності моноклонального антитіла використовували непрямий твердофазний імуноензимний аналіз (ELISA). Для

цього в лунки 96-коміркових планшетів (greiner Microlon, США) вносили по 110 мкл розчинів антигенів (фібриногену в 0,2 М SAB pH 8,5; фібрину в 0,2 М SAB pH 8,5 з додаванням 3 М сечовини). Концентрація антигену складала 10 мкг/мл. Інкубацію проводили протягом 18 годин при 4 °С. Лунки відмивали 3 рази 150 мкл 0,01 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  буферу pH 7,0 з додаванням 0,14 М NaCl та 0,05 % твін-20 (ТФБ) протягом 30 хвилин при кімнатній температурі. Рідину струшували з плашки, ретельно видаляючи залишки вологи. Далі в ряд А вносили по 200 мкл очищеного моноклонального антитіла, розведеного в ТФБ до концентрації 10 мкг/мл. У всі інші ряди вносили по 100 мкл ТФБ. Заповнений мікропланшет інкубували в термостаті при 37 °С протягом 1 години. Повторювали процедуру відмивання. Далі вносили в кожну лунку по 100 мкл кон'югату пероксидази хрому із кролячими антимишачими антитілами при розведенні 1:5000 та інкубували в термостаті при 37 °С протягом 1 години. Знову промивали лунки мікропланшета. Далі в лунки вносили по 100 мкл 0,05 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  буферу pH 6,0 з 0,03 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  та 0,04 % ортофенілендіаміну та інкубували протягом 30 хв у темряві при кімнатній температурі. Реакцію зупиняли додаванням в усі лунки по 50 мкл 4 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Оптичну густину визначали при довжині хвилі 492 нм за допомогою автоматичного мікроспектрофотометра (RT 2100 C) [140].

Моноклональне антитіло 2d2a володіло здатністю селективно зв'язувати фібриноген та не взаємодіяло з фібрином. Раніше було показано, що його епітоп знаходиться у фрагменті B $\beta$ 14-15 [141]. Отримане таким чином моноклональне антитіло зберігали при 4 °С.

#### **2.1.4. Антитіло I-5A**

Для отримання моноклонального антитіла I-5A застосовували методичні підходи, які було описано у п. 2.1.4. Однак, для дослідження його специфічності та активності в лунки 96-коміркових планшетів (Greiner Microlon, США) вносили по 110 мкл розчинів фібриногену в 0,2 М SAB pH 8,5; фібрину в 0,2 М SAB pH 8,5 з додаванням 3 М сечовини та D-димеру в 0,2 М SAB pH 8,5.

Моноклональне антитіло I-5A володіло здатністю селективно зв'язувати фібриноген та фібрин, та не взаємодіяло з D-димером. Раніше було показано, що його епітоп знаходиться у фрагменті A $\alpha$ 537-595 [140]. Отримане таким чином моноклональне антитіло зберігали при 4 °C.

#### 2.1.5. Антитіло I-5B

Для отримання моноклонального антитіла I-5B застосовували методичні підходи, які було описано у п. 2.1.4. Однак, для дослідження його специфічності та активності в лунки 96-коміркових планшетів (Greiner Microlon, США) вносили по 110 мкл розчинів фібриногену в 0,2 М SAB pH 8,5; фібрину в 0,2 М SAB pH 8,5 з додаванням 3 М сечовини та D-димеру в 0,2 М SAB pH 8,5.

Моноклональне антитіло I-5A володіло здатністю селективно зв'язувати фібриноген та фібрин, та не взаємодіяло з D-димером. Раніше було показано, що його епітоп знаходиться у фрагменті A $\alpha$ 505-610 [140]. Отримане таким чином моноклональне антитіло зберігали при 4 °C.

#### 2.1.6. Фібриногеназа з отрути *Echis multisquamatis*

Для отримання фібриногенази цільну отруту *Echis multisquamatis* розчиняли у 0,025 М Tris-HCl буфері pH 8,9. Фракціонували отруту *E. multisquamatis* на Q-сефарозі. Колонку об'ємом 3 мл зрівноважували 0,025 М Tris-HCl буфером pH 8,9. Елюювали фракції отрути ступінчатим градієнтом NaCl від 0,125 до 1 М зі швидкістю 2 мл/хв. Фракцію, яка містила фібриногеназу, елюювали за йонної сили 0,125 М.

Фібриногеназну активність визначали за здатністю розщеплювати фібриноген у коагуляційному тесті. Для цього до 0,1 мл розчину фібриногену (1 мг/мл) додавали 0,1 мл досліджуваної фракції та інкубували протягом 10 хв. Після цього ініціювали полімеризацію фібрину внесенням 0,02 мл тробіну (1 NIH/мл). Час утворення згустку фіксували за допомогою коагулометра СФ2000 (Solar, Харків). Показана також відсутність фібриногеназної активності в суміжних фракціях.

На другому етапі очистки отриману на Q-sepharose фракцію фібриногенази розділяли афінною хроматографією на гепарин-агарозі у 0,05 М Трис-НСl буфері рН 7,4. Об'єм колонки складав 2 мл, швидкість нанесення – 1 мл/хв. Елюцію проводили ступінчатим градієнтом NaCl від 0,1 до 1 М. Фібриногеназу елюювали за концентрації NaCl 0,3 М [<sup>142</sup>]. Перевіряли фібриногеназну активність як описано вище. Чистоту препарату підтверджували електрофоретично.

Отриманий препарат фібриногенази зберігали при температурі -20 °С.

#### 2.1.7. Фібриногеназа з культурального середовища *Bacillus thuringiensis*

Протеїназу з культурального середовища *Bacillus thuringiensis var. israelensis* IMV B-7465 очищали за описаною раніше методикою. Клітини-продуценти відділяли від культуральної рідини шляхом центрифугування при 5000 g протягом 30 хв. Проводили висолювання за допомогою  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  до 90 % насичення. Суміш витримували 24 год при 4 °С, центрифугували при 5000 g 30 хв. Осад розчиняли в рівному об'ємі 0,01 М трис-НСl буфера, рН 7,5 і наносили на колонку (1,8×40 см) Toyopearl HW-55 (Toyosoda, Японія). Швидкість нанесення складала 0,5 мл/хв. Об'єм колонки складав 100 мл. Елюцію зразка проводили тим самим буфером [<sup>143</sup>]. Фракція, що мала фібриногеназну активність елюювалася окремим піком.

Перевіряли фібриногеназну активність як описано вище. Чистоту препарату підтверджували електрофоретично. Отриманий препарат фібриногенази зберігали при температурі -20 °С.

#### 2.1.8. Фібриногеназа з отрути *Gloydius halys halys*

Для виділення фібриноген-специфічної протеїнази з отрути *Gloydius halys halys* застосовували розроблену раніше методику [<sup>144</sup>] з модифікаціями, використаними у [<sup>145</sup>]. Для цього 100 мг кристалізованої отрути розчиняли в 2 мл 0,05 М трис-НСl буфера рН 7,4, що містив 0,13 М NaCl і  $1 \cdot 10^{-3}$  М  $\text{NaN}_3$ . Пробу центрифугували протягом 10 хв при 1000 G. Після видалення центрифугуванням часток, що не розчинилися, наносили на колонку Blue-сефароза об'ємом 6 мл,



врівноважену тим самим буфером. Швидкість нанесення складала 0,5 мл/хв. Із сорбентом зв'язалося близько 10 % від нанесеної кількості протеїнів отрути. У протеїновому матеріалі, що не зв'язався з носієм, за допомогою описаного вище методу виявили фібриногеназну активність.

Отриману фракцію, що містила фібриногеназну активність, діалізували проти у 0,025 М Трис-НСІ буферу рН 8,9. Проводили хроматографію на Q-сефарозі. Колонку об'ємом 3 мл зрівноважували тим самим буфером. Елюювали фракції отрути ступінчастим градієнтом NaCl від 0,125 до 1 М зі швидкістю 2 мл/хв. Фракцію, яка містила фібриногеназу, елюювали за йонної сили 0,3 М.

Перевіряли фібриногеназну активність як описано вище. Чистоту препарату підтверджували електрофоретично. Отриманий препарат фібриногенази зберігали при температурі -20 °С.

#### **2.1.9. Фібриноген *desBβ1-42***

Препарат частково гідролізованого фібриногену *desBβ1-42* отримували гідролізом 14 мг/мл фібриногену, очищеного від плазміногену на лізин-сефарозі, фібриногеназою (0,023 мг/мл) у 0,05 М трис-НСІ буфері, рН 7,4, який містив 0,13 М NaCl, протягом 45 хв при температурі 25 °С відповідно до методики [146]. Реакцію зупиняли додаванням 0,016 М бензамідину. Високомолекулярний продукт гідролізу – фібриноген *desBβ1-42* – відділяли за допомогою гель-проникної хроматографії на Superdex G-75. Отриманий таким чином препарат *desBβ1-42* фібриногену характеризували електрофоретично за присутності β-меркаптоетанолу. Було підтверджено, що Аα-ланцюг отриманого частково розщепленого фібриногену лишається нативним, тоді як Вβланцюг повністю втрачає свої N-кінці. Відсутність домішок фібриногенази контролювали за амідазною активністю щодо хромогенного субстрату S2238. Отриманий препарат фібриногену заморожували у рідкому азоті та ліофільно висушували за допомогою LyoQuest (Telstar, Іспанія). Сухий матеріал зберігали при +4 °С. Перед використанням фібриноген розчиняли у 0,05 М трис-НСІ буфері, рН 7,4.

### 2.1.10. Фібриноген desAα505-610

Фібриноген desAα505-610 отримували використовуючи протеїназу з *Bacillus thuringiensis* вар. *israelensis* IMV B-7465. Гідроліз проводили за співвідношенням ензим:субстрат = 1:300 в 0,05 М трис-НСІ буфері, рН 7,4, який містив 0,13 М NaCl, за температури 37 °С протягом 1 години. Реакцію гідролізу зупиняли додаванням розчину бензамідину до кінцевої концентрації 0,0016 М.

Суміш фракціонували за допомогою гель-фільтрації на колонці Superdex G-75 (об'єм колонки 120 мл) з використанням FPLC системи Akta Prime. Швидкість елюції 2 мл/хв. Колонку було врівноважено 0,05 М трис-НСІ буфером, рН 7,4, який містив 0,13 М NaCl.

Отримані препарати фібриногену заморожували у рідкому азоті та ліофільно висушували за допомогою LyoQuest (Telstar, Іспанія). Висушений матеріал зберігали при +4 °С. Перед використанням фібриноген розчиняли у 0,05 М трис-НСІ буфері, рН 7,4.

### 2.1.11. Фібриноген desAα414-610

Фібриноген desAα414-610 отримували використовуючи протеїназу з отрути *Gloydius halys halys* відповідно до методики [147]. Гідроліз проводили за співвідношенням ензим:субстрат = 1:300 в 0,05 М трис-НСІ буфері, рН 7,4, який містив 0,13 М NaCl, за температури 37°С протягом 30 хв для протеїнази з отрути *Gloydius halys halys*. Реакцію гідролізу зупиняли додаванням розчину бензамідину до кінцевої концентрації 0,0016 М. Суміш фракціонували за гель-фільтрації на колонці Superdex G-75 (об'єм колонки 120 мл) з використанням FPLC системи Akta Prime. Швидкість елюції 2 мл/хв. Колонку було врівноважено 0,05 М трис-НСІ буфером, рН 7,4, який містив 0,13 М NaCl. Отриманий препарат фібриногену заморожували у рідкому азоті та ліофільно висушували за допомогою LyoQuest (Telstar, Іспанія). Сухий матеріал зберігали при +4 °С. Перед використанням фібриноген розчиняли у 0,05 М трис-НСІ буфері, рН 7,4.

### 2.1.12. Пептид B $\beta$ 1-42

Для отримання пептиду B $\beta$ 1-42 проводили гідроліз фібриногену протеїназою з отрути *E. multisquamatis*, як описано у п. 2.1.9. За допомогою гель-проникної хроматографії на Superdex G-75 отримували високомолекулярний продукт гідролізу – фібриноген desB $\beta$ 1-42. Збирали фракції, які елюювалися після зони виходу протеїнази, яку детектували за допомогою хромогенного субстрату S2238, але раніше за бензамідин. Концентрували отримані фракції за допомогою мікроконцентраторів Amicon Ultra 5K (Millipore, США), центрифугуючи їх при швидкості 1000 g. Отриманий препарат пептиду характеризували за допомогою MALDI-TOF мас-спектрометрії на Voyager-DE (Applied Biosystems, США). Молекулярна маса пептиду складала 4591 Da, що відповідає фрагменту фібриногену B $\beta$ 1-42. Концентрацію визначали за допомогою спектрофотометра Optizen (POP, Корея). Коефіцієнт екстинції, обчислений за допомогою сервера ExPASy [<sup>148</sup>], складав 0,325 M<sup>-1</sup> · cm<sup>-1</sup>. Зберігали препарат пептиду за температури -20 °C.

### 2.1.13. Пептид A $\alpha$ 505-610

Для отримання пептиду A $\alpha$ 505-610 проводили гідроліз фібриногену протеїназою з культурального середовища *Bacillus thuringiensis* вар. *israelensis* IMV B-7465, як описано у п. 2.1.10. За допомогою гель-проникної хроматографії на Superdex G-75 отримували високомолекулярний продукт гідролізу – фібриноген A $\alpha$ 505-610. Збирали фракції, які елюювалися після зони виходу протеїнази, яку детектували за допомогою хромогенного субстрату S2302, але раніше за бензамідин. Концентрували отримані фракції за допомогою мікроконцентраторів Amicon Ultra 15K (Millipore, США), центрифугуючи їх при швидкості 1000 g. Отриманий препарат пептиду характеризували за допомогою MALDI-TOF мас-спектрометрії на Voyager-DE (Applied Biosystems, США). Молекулярна маса

пептиду складала 11 452 Da, що відповідає фрагменту фібриногену A $\alpha$ 505-610. Концентрацію визначали за допомогою спектрофотометра Optizen (POP, Корея). Коефіцієнт екстинції, обчислений за допомогою сервера ExPASy, складав 0,39 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>. Зберігали препарат пептиду за температури - 20 °C.

#### **2.1.14. Пептид A $\alpha$ 414-610**

Для отримання пептиду A $\alpha$ 414-610 проводили гідроліз фібриногену протеїназою з отрути *Gloydius halys halys*, як описано у п. 2.1.11. За допомогою гель-проникної хроматографії на Superdex G-75 отримували високомолекулярний продукт гідролізу – фібриноген A $\alpha$ 414-610. Збирали фракції, які елюювалися після зони виходу протеїнази, яку детектували за допомогою хромогенного субстрату S2302, але раніше за бензамідин. Концентрували отримані фракції за допомогою мікроконцентраторів Amicon Ultra 15K (Millipore, США), центрифугуючи їх при швидкості 1000 g. Отриманий препарат пептиду характеризували за допомогою MALDI-TOF мас-спектрометрії на Voyager-DE (Applied Biosystems, США). Молекулярна маса пептиду складала 21 109 Da, що відповідає фрагменту фібриногену A $\alpha$ 414-610. Концентрацію визначали за допомогою спектрофотометра Optizen (POP, Корея). Коефіцієнт екстинції, обчислений за допомогою сервера ExPASy, складав 0,218 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>. Зберігали препарат пептиду за температури - 20 °C.

#### **2.1.15. Збагачена тромбоцитами плазма крові**

Донорську кров брали натщесерце з вени катетером-метеликом калібру G21 під'єднаним до шприца з 3,8 % розчином цитрату натрію. Співвідношення крові до цитрату натрію було 9:1. Після забору крові, суміш в шприці обережно перемішували. Далі знявши катетер зі шприца цитратну кров повільно вносили в поліетиленову

пробірку для подальшого центрифугування. Осадження формених елементів крові проводили центрифугуванням протягом 10 хв з прискоренням 280 g. Плазму крові (супернатант) переносили у поліетиленову пробірку. Зберігали плазму крові при температурі -20 °С. Збагачену тромбоцитами плазму крові людини (ЗТПК) отримували із цільної крові шляхом центрифугування при 200 g впродовж 20 хв при температурі 20 °С [149]. Під час центрифугування пробірки не закривали, щоб не обмежувати доступ кисню до тромбоцитів.

## **2.2. Методи**

### **2.2.1. Електрофорез у системі Лемлі**

Електрофорез у поліакріламідному гелі. Електрофорез проводили за методом Лемлі [150], з використанням трис–гліцинової системи. Для приготування розподільних гелів з різною концентрацією акриламід у використовували гелевий буфер (на 250 мл розчину 22,71 г трису, 0,5 г ДСН, 1мл ТЕМЕД, рН 8,8). Для приготування концентруючого гелю (4 %), використовували: гелевий буфер (на 100 мл розчину 3,029 г трису, 0,2 г ДСН, 0,4 мл ТЕМЕД, рН 6,8); 1,4 мл дистильованої води; 0,4 мл 40 % акриламід; 0,2 мл 1,5 % персульфату.

Електродний буфер містив 6 г/л трис, 28,8 г/л гліцину, 1г/л ДСН. Розділення протеїнів проводили при силі струму 19 мА у концентруючому і 35 мА для розподільного гелів. Зразки для електрофорезу готували додаванням до розчину протеїну буферу для зразків, який готувався додаванням до електродного буферу (на 1 л розчину 6 г трис, 28,8 г гліцину, 1 г ДСН, рН 8,5): 5 % сахарози; 2 % ДСН та бромфенол (для забарвлення зразків). Перед нанесенням на гель, зразки нагрівали до кипіння. Проявлення гелю проводили забарвленням у фарбуючому розчині (0,01% Кумасі G-250 в 25 % ізопропанолі та 10 % оцтовій кислоті) протягом 15 хвилин. Для видалення залишків барвника використовували 2-8 % розчин оцтової кислоти. Для встановлення молекулярної маси білків використовували маркерні протеїни («Thermo Fisher Scientific», США).

### 2.2.2. Вестерн-блот аналіз

Електрофорез продуктів гідролізу фібриногену проводили у 10 % ПААГ, та шляхом електропереносу переносили на нітроцелюлозну мембрану в буфері, що містив 0,025 М тріс-НСІ, 192 мМ гліцин; 0,1 % ДСН та 20 % метанол. Перенос проводили за напруги 20 В протягом 1 год. Нітроцелюлозну мембрану з протеїнами інкубували в блокуючому розчині (5 % розчин знежиреного молока в 0,05 М тріс-НСІ буфері, рН 7,4, що містив 0,13 М NaCl та 0,05 % Твін 20) протягом 1 год при 37°C [151]. Відмивали мембрану у 0,05 М тріс-НСІ буфері, рН 7,4, що містив 0,05% Твін 20. Мембрану інкубували у розчині первинних антитіл 2d2a або 1-5A при 37 °С, протягом години. Мембрани повторно відмивали та інкубували у розчині вторинних антитіл, мічених пероксидазою хрому, впродовж години при 37 °С. Проявляли мембрани розчином 0,01 М 4-хлорнафтолу та 0,003 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### 2.2.3. Турбідиметрія

Здатність отриманого фібрину desAB до полімеризації в системі фібриноген-тромбін перевіряли шляхом вимірювання зміни мутності середовища при 350 нм за допомогою спектрофотометра Optizen POP (Корея). До досліджуваного розчину фібриногену в кінцевій концентрації 0,1 мг/мл додавали 0,05 М тріс-НСІ буфер рН 7,4, який містив 0,15 М NaCl. Для ініціації полімеризації фібрину додавали тромбін у концентрації 0,25 НН/мл [152].

### 2.3.4. Електронна мікроскопія

Попередньо утворені згустки полімерного фібрину досліджували за допомогою методу трансмісійної електронної мікроскопії негативно контрастованих зразків, при цьому використовуючи певні модифікації. Зразки для мікроскопії готували так, як і для турбідиметричного методу дослідження полімеризаційних властивостей. Для негативного контрастування використовували 1 % водний розчин уранілацетату. Сітки для електронного мікроскопу вкривали шаром розчину формвару в дихлоретані та закріплювали

розпилим вуглецем за допомогою вакуумного випарювача HUS-5GB. Під час реакції полімеризації відбирали аліквоти із розчину через 30 та 300 секунд. Аліквоти доводили до концентрації протеїну 7 мкг/мл. Отриманий розчин в об'ємі 10 мкл переносили на вкриті вуглецем сітки після чого обробляли 1 % розчином уранілацетату через 2 хвилини. Після інкубації сітку двічі промивали 100 мМ амоній-ацетатним буфером рН 7,9 спочатку та 10 мМ амоній-ацетатним буфером рН 8,5 вдруге. Розчин, що залишився на сітці, видаляли використовуючи фільтрувальний папір. На поверхню тefлонового блоку наносили краплину контрастеру та накладали поверх неї сітку. Контрастер видаляли із використанням водноструменевого насосу через 1 хвилину. Електронно-мікроскопічні зображення були отримані із збільшенням 20000-50000 із використанням електронного мікроскопу H-600 (Hitachi, Японія) при 75 kV [153].

### 2.3.5. Агрегація тромбоцитів

Агрегацію тромбоцитів вивчали в збагаченій тромбоцитами плазмі крові людини людини (200-300 тис тромбоцитів/мкл). Агрегатометрію виконували в перші три години після забору крові на фотооптичному агрегометрі «SOLAR AP2110».

В кювету агрегометра вносили 430 мкл збагаченої тромбоцитами плазми крові людини людини і 20 мкл 0,025 М  $\text{CaCl}_2$  та інкубували *ex tempore* 5 хв при температурі 37 °С. Агрегацію тромбоцитів ініціювали внесенням одного з індукторів агрегації тромбоцитів: ADP (у концентрації 12,5 та 10  $\mu\text{M}$ ) або колагену (2 мкг/мл). Процес агрегації реєстрували протягом 10 хв у режимі роботи без нормування результатів вимірів за початковим рівнем світлопропускання.

Оцінювали ступінь агрегації – максимальний рівень світлопропускання збагаченої тромбоцитами плазми крові людини після внесення індуктора агрегації; швидкість агрегації – швидкість зміни світлопропускання збагаченої тромбоцитами плазми крові людини після внесення індуктора агрегації за перші 30

с; час агрегації – час досягнення максимального ступеню агрегації. Для колаген-індукованої агрегації вимірювали тривалість lag-фази.

### **2.3.6. Денситометрія у програмі ImageJ**

Метод ImageJ призначено для обробки різних типів зображень на багатьох обчислювальних платформах, він був широко прийнятий біологами за його корисність та простоту використання. ImageJ доступний для Macintosh, Windows і Linux, працює як онлайн, так і як додаток для завантаження [154].

ImageJ може відображати, редагувати, аналізувати, обробляти, зберігати та друкувати 8-бітні, 16-бітні та 32-бітні зображення у відтінках сірого або 8-бітні та 24-бітні кольорові зображення. Формати зображень, включаючи TIFF, GIF, JPEG, BMP, DICOM, FITS і «raw», можна імпортувати та читати як окремі зображення. Плагін Bio-Formats дозволяє зчитувати багато додаткових форматів файлів, що стосуються інструменту, а також містить інтуїтивно зрозумілі елементи керування для завантаження та відображення багатовимірних даних. ImageJ містить ряд корисних інструментів для обробки зображень. Наприклад, ImageJ має просту процедуру стирання фону, яка може згладжувати нерівномірний фон зображення і може легко обчислювати площу, статистику значень пікселів, відстані та кути. Програма також може створювати гістограми та графіки. Підтримуються стандартні функції обробки зображень, такі як підвищення контрастності, різкість, згладжування, виявлення країв і фільтрація по середній частині. Він може виконувати геометричні перетворення, такі як масштабування, обертання та гортання. Програма підтримує будь-яку кількість вікон одночасно.

Доступне просторове калібрування, щоб забезпечити вимірювання розмірів і шкали в таких одиницях, як мікрометри.

Функціональність ImageJ розширюється завдяки величезній колекції вільно доступних плагінів, включаючи плагін для розмішування часто використовуваних зондів в імуногістохімії. Термін «розмішування» відноситься до вилучення



окремих спектральних профілів із зображень, які містять суміші поглинаючих барвників, що перекриваються спектром.

Цей блок забезпечує надійне вилучення даних із зображень флуоресцентної та світлопольної мікроскопії. Таким чином, цей блок охоплює імпорт даних, функції обробки зображень та аналітичні інструменти, які можна використовувати для вилучення інформації з невеликих наборів даних мікроскопії за допомогою ImageJ. Доступно кілька платформ, які виконують автоматизований аналіз мікроскопічних зображень для великих наборів даних, включаючи CellProfiler. Невеликі набори даних мікроскопії – це розмір, який можна аналізувати вручну за допомогою ImageJ (наприклад, <100 зображень).

### **2.3.7. Статистичний аналіз**

Математичну обробку та аналіз отриманих експериментальних даних виконували за допомогою пакету програм Excel 2003, Агрегометр 2.01 та TotalLab v2.01. Представлені на рисунках дані є типовими для серії повторюваних дослідів (не менше трьох у кожній серії).

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

### РОЗДІЛ 3. В $\beta$ N-домен

В $\beta$ N-домен фібриногену сформований N-кінцевими амінокислотними залишками В $\beta$ -ланцюга молекули. Вважається, що до цієї структурної одиниці входить фрагмент В $\beta$ 1-66, однак, тоді як фрагмент 1-42 може формувати доменну структуру, фрагмент 43-66 є лінійним на всьому протязі амінокислотного ланцюга аж до дисульфідного кільця. Що ж до N-кінця В $\beta$ N-домену, то він закінчується фібринопептидом В (В $\beta$ 1-14) та містить сайт протеолізу тромбіну, гідроліз якого відщеплює від домену фібринопептид. Оскільки саме фібринопептид зв'язує В $\beta$ N-домен з  $\alpha$ C-регіоном, його відщеплення призводить до дисоціації  $\alpha$ C-регіонів молекули. Хоча ключовим наслідком відщеплення фібринопептиду є експонування центру полімеризації «В». [155]

У ході роботи для дослідження структури та функції В $\beta$ N-домену використовували такі молекулярні ефектори: протеїназу з отрути *Echis multisquamatis*, пептид В $\beta$ 1-42 та моноклональне антитіло 2d2a.

Протеїназа з отрути *Echis multisquamatis* гідролізує пептидний зв'язок В $\beta$ 42-43 з утворенням частково гідролізованої форми фібриногену desВ $\beta$ 1-42. Ця форма, позбавлена N-кінця В $\beta$ -ланцюга не має центрів полімеризації «В» та «С». Окрім того, вона має дисоційовані  $\alpha$ C-регіони.

Пептид В $\beta$ 1-42, отриманий за допомогою протеїнази, зберігає якщо не структурні, то принаймні функціональні особливості В $\beta$ N-домену. Зокрема, він містить центр полімеризації «С», а отже здатен зв'язуватися і з комплементарним йому центром «с» в D-регіоні молекули.

Антитіло 2d2a натомість здатне прямо блокувати В $\beta$ 14-15 сайт, що потенційно може бути розчинений до амінокислотного фрагменту В $\beta$ 14-21. Антитіло здатне взаємодіяти з фібриногеном, а отже зв'язується зі своїм епітопом незалежно від наявності комплексу з  $\alpha$ C-регіонами.

Для досліджень дії ефektorів на процеси, залучені до формування фібриново-тромбоцитарного згустку, застосовували методи турбідиметрії, електронної мікроскопії та агрегатометрії.

### 3.1. Турбідиметричний аналіз.

Для дослідження ролі B $\beta$ N-домену в процесі полімеризації фібрину вивчали зміну мутності середовища в системі фібриноген-тромбін у випадку нативного фібриногену та фібриногену desB $\beta$ 1-42.

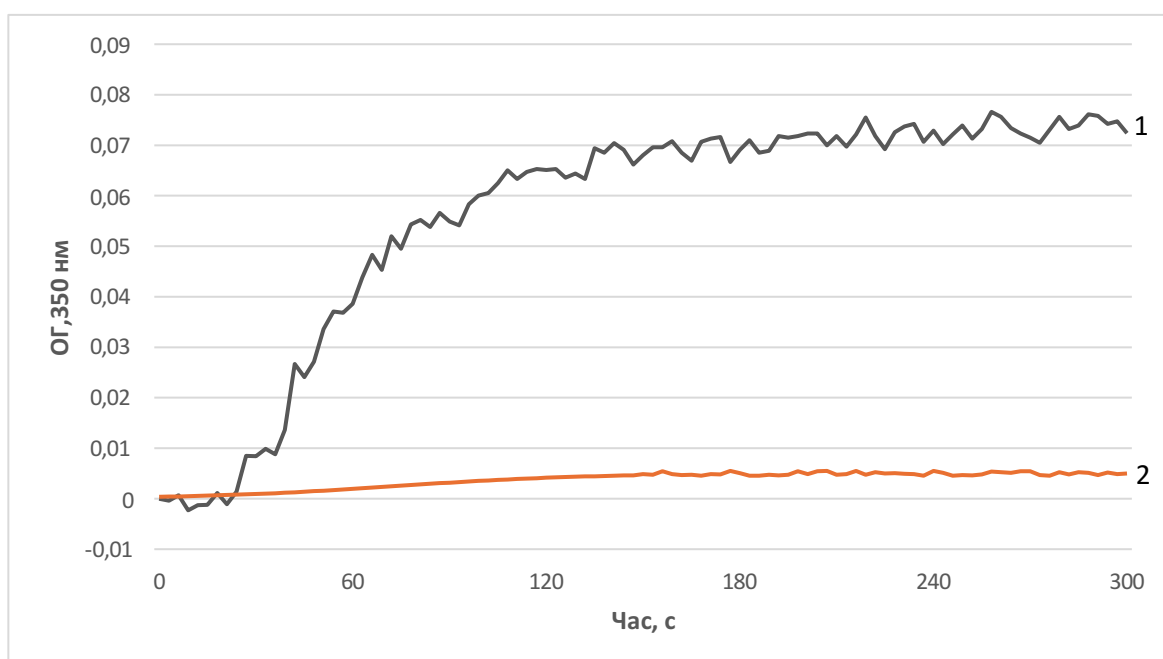


Рис. 3.1. Зміна оптичного поглинання середовища під час формування полімерного фібрину в системі фібриноген+тромбін. Полімеризацію фібрину (0,1 мг/мл) ініціювали внесенням 0,25 NIH/мл тромбіну за присутності 0,001 М CaCl<sub>2</sub> в 0,05 трис-HCl буфері pH 7,4 з 0,13 М NaCl. 1 – нативний фібриноген; 2 – фібриноген desB $\beta$ 1-42.

Показано, що фібриноген desB $\beta$ 1-42 втрачає здатність до полімеризації за фізіологічних умов (Рис. 3.1). Такий ефект спостерігали навіть попри те, що нативними лишалися центри полімеризації «А» та «а». Дослуджувана форма

фібриногену мала нативні  $\alpha$ C-регіони у розгорнутому стані. Імовірно, це було пов'язано з втратою фібриногеном центру полімеризації «C».

Тому важливо було перевірити важливість досліджуваного фрагменту молекули у системі з іншими молекулярними ефекторами – антитілом 2d2a та пептидом B $\beta$ 1-42.

Пептид B $\beta$ 1-42 містив у своєму складі послідовність «C»-центру полімеризації, отже – якщо саме цей центр є визначальним для полімеризації фібрину – поивнен був би інгібувати полімеризацію фібрину. Однак, додавання пептиду B $\beta$ 1-42 у еквімолярній та навіть у більшій удвічі кількості не інгібувало швидкість полімеризації фібрину, не знижувало кінцеву мутність згустку (яка в окремих випадках навіть була дещо вищою) та не подовжувало lag-періоду (Рис. 3.2).

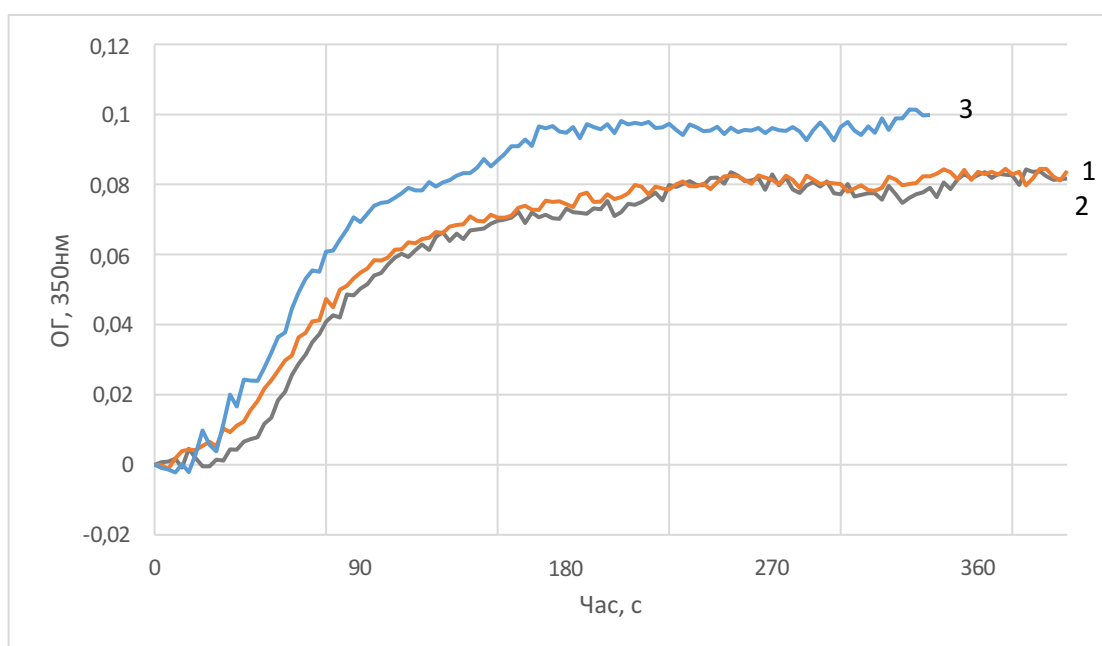


Рис. 3.2. Зміна оптичного поглинання середовища під час формування полімерного фібрину в системі фібриноген+тромбін. Полімеризацію фібрину (0,1 мг/мл) ініціювали внесенням 0,25 NIH/мл тромбіну за присутності 0,001 М CaCl<sub>2</sub> в 0,05 трис-HCl буфері рН 7,4 з 0,13 М NaCl. 1 – контрольна проба; 2, 3 – за присутності пептиду B $\beta$ 1-42 у молярному співвідношенні до фібриногену 1:1, 2:1 відповідно.

Недостовірне підвищення кінцевої мутності згустку ( $0,1 \pm 0,02$  о.о.), виявлене за двократного надлишку пептиду, може пояснюватися порушенням структури фібрил, але не інгібіторною дією ефектора.

Наступним кроком, було використання моноклонального антитіла 2d2a, яке безпосередньо зв'язувалося з фрагментом В $\beta$ 1-42 фібриногену. Внесення антитіла 2d2a у інкубаційне середовище навіть за співвідношення 1:1 до фібриногену майже повністю блокувало полімеризацію фібрину в системі фібриноген-тромбін (Рис. 3.3).

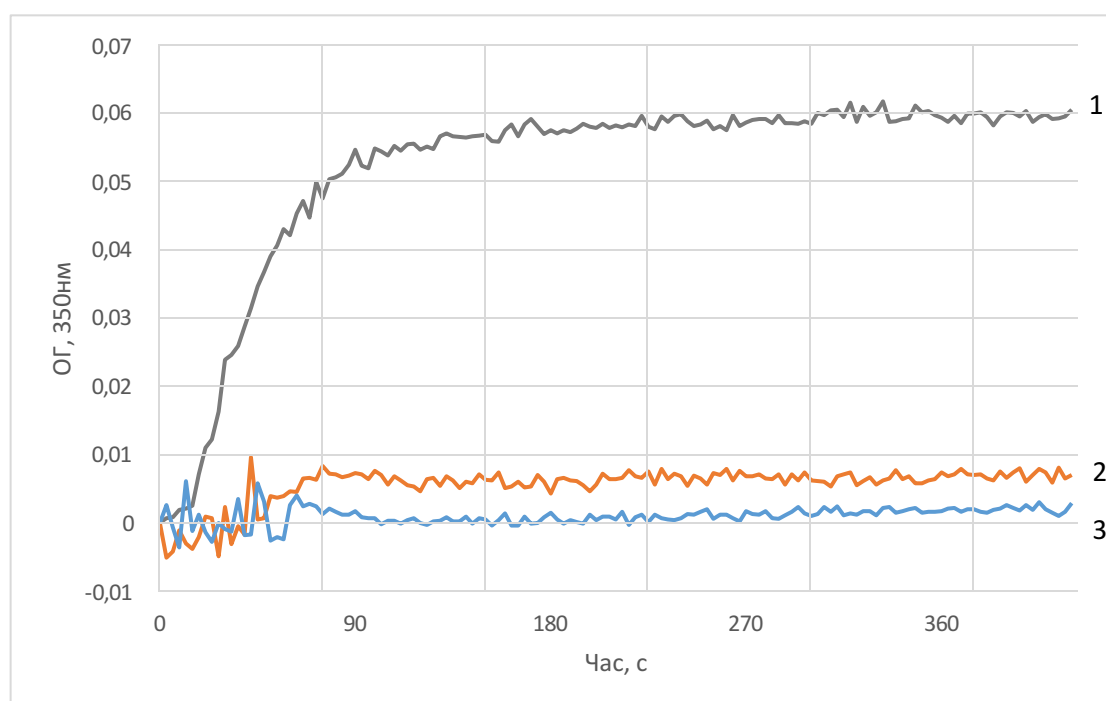


Рис. 3.3. Зміна оптичного поглинання середовища під час формування полімерного фібрину в системі фібриноген+тромбін за присутності моноклонального антитіла 2d2a. Полімеризацію фібрину (0,1 мг/мл) ініціювали внесенням 0,25 NIH/мл тромбіну за присутності 0,001 М CaCl<sub>2</sub> в 0,05 трис-HCl буфері рН 7,4 з 0,13 М NaCl. 1. Контрольний фібриноген. 2, 3 – за присутності моноклонального антитіла 2d2a у молярному співвідношенні до фібриногену 1:1, 2:1 відповідно.

Кінцева мутність контрольної проби складала  $0,06 \pm 0,005$  о.о., тоді як кінцева мутність згустку, утвореного за пристуності антитіла, не перевищувала  $0,008 \pm 0,001$  о.о.

Таким чином, показано, що втрата фібриногеном фрагменту B $\beta$ 1-42 призводить до втрати його здатності до полімеризації. Так само інгібувало полімеризацію фібрину моноклональне антитіло, специфічне до фрагменту B $\beta$ 1-42, хоча сам фрагмент B $\beta$ 1-42 на полімеризацію фібрину впливу не мав. Важливо було переконатися у тому, наскільки дія досліджуваних ефекторів впливає на архітектуру згустку, для чого було використано трансмісійну електронну мікроскопію.

### 3.2. Електронна мікроскопія

Електронна мікроскопія дозволила оцінити, як змінюється структура згустків, утворених під дією різних молекулярних ефекторів. Зокрема, у пробі з фібриногеном desB $\beta$ 1-42 не було виявлено типової картини – сітки полімерного фібрину. Однак, можна було ідентифікувати поодинокі скупчення фібрил, які не займали все поле (Рис. 3.4.Б). Переважно ж у полі дослідження не спостерігали протеїну, зібраного у структурні одиниці (Рис. 3.4.В).

Ми вважаємо, що виявлені поодинокі фібрин-полімерні структури утворені домішками нативних молекул фібрину у препараті фібрину desAB-desB $\beta$ 1-42, які не вносять відчутного вкладу в функціональних тестах та не помітні при електрофоретичному та вестерн-блот-дослідженнях. Під час тривалої інкубації ці поодинокі нативні молекули можуть взаємодіяти, формуючи полімерні структури, настільки нечисленні, що навіть не впливають на кінцеву мутність середовища.

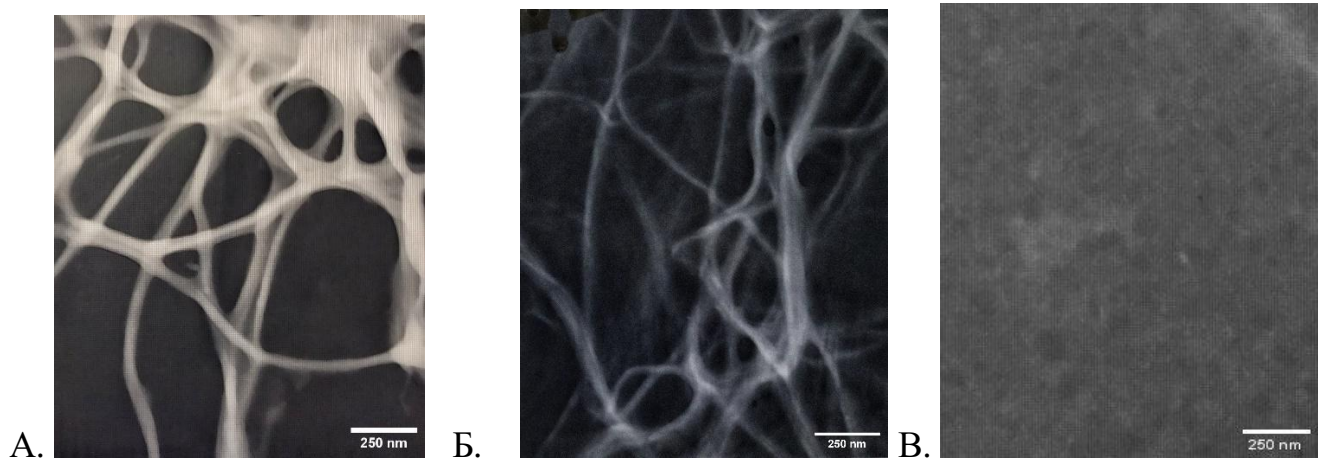


Рис. 3.4. Електронна мікроскопія зрілого фібринового згустку, утвореного в системі фібриноген-тромбін в амоній-форміатному буфері (0,05 М) рН 7,8. Концентрація фібриногену складала 0,05 мг/мл, полімеризацію ініціювали тромбіном (0,25 НН/мл). Згусток для аналізу фіксували у точці досягнення максимальної мутності. Збільшення 1x50000.

А. Згусток нативного фібрину (контроль).

Б. Поодинокий згусток, виявлений у полі з пробєю фібрину desAB-desB $\beta$ 1-42.

В. Типове поле за умов ініціації полімеризації в системі тромбін-фібриноген desB $\beta$ 1-42.

При збільшенні 1x25 000 можна відзначити, що такі полімерні структури складені загалом з тонших фібрил, що може свідчити про те, що фібрин desAB-des $\beta$ 1-42 інтеркалює з нативними молекулами, порушуючи латеральну асоціацію протофібрил та побудову фібрил (Рис. 3.5.Б). Водночас, навіть за такого збільшення не виявлено структур, характерних для фібринової сітки (Рис. 3.4.А, Рис. 3.5А). Кількісні характеристики полімерного фібрину вивчали шляхом аналізу зображень за допомогою програмного забезпечення ImageJ. Проведені обчислення дозволили виявити достовірне потоншення фібрил фібрину desAB-desB $\beta$ 1-42 ( $27 \pm 4$  нм проти  $57 \pm 11$  нм у контролі,  $p \leq 0,05$ ). Це імовірно свідчить про інтеркаляцію частково гідролізованої форми фібрину в склад згустку, утвореного залишками нативного фібрину.

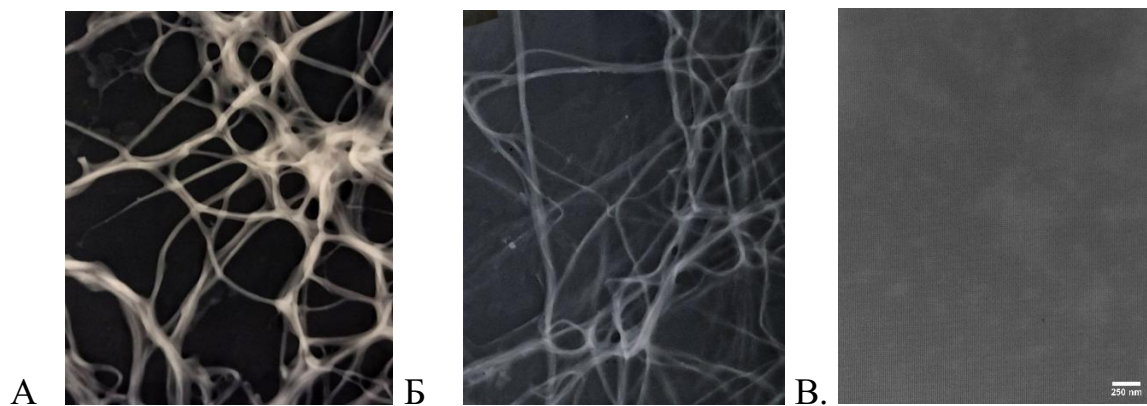


Рис. 3.5. Електронна мікроскопія зрілого фібринового згустку, утвореного в системі фібриноген-тромбін в амоній-форміатному буфері (0,05 М) рН 7,8. Концентрація фібриногену складала 0,05 мг/мл, полімеризацію ініціювали тромбіном (0,25 НН/мл). Згусток для аналізу фіксували у точці досягнення максимальної мутності. Збільшення 1x25 000.

А. Згусток нативного фібрину (контроль).

Б. Поодинокий згусток, виявлений у полі з пробєю фібрину des $\beta$ 1-42.

В. Типове поле за умов ініціації полімеризації в системі тромбін-фібриноген des $\beta$ 1-42.

Наступним етапом досліджень був аналіз структури фібрил, утворених за присутності пептиду  $\beta$ 1-42. Попри те, що пептид не пригнічував фібриноутворення за даними турбідиметрії, він однак впливав на архітектуру згустку (Рис. 3.6). Хоча фібрили зберігали товщину, близьку до контрольної ( $51 \pm 21$  нм), а також спостерігали меншу кількість точок галуження, що, однак, не впливало на загальну побудову тривимірної сітки полімерного фібрину.



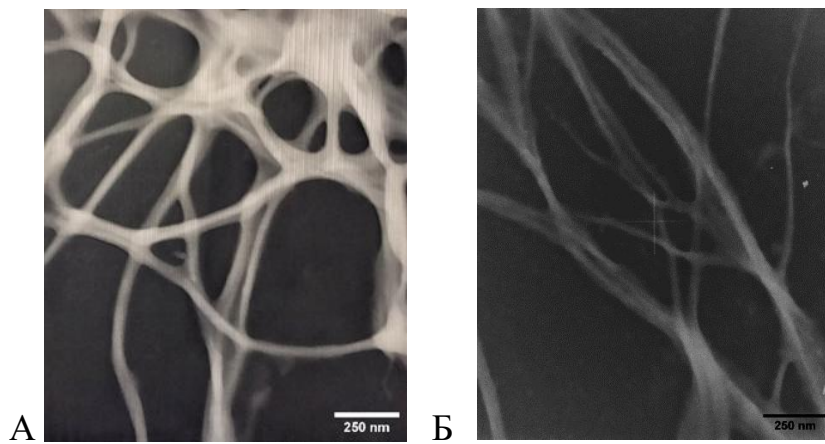


Рис. 3.6. Електронна мікроскопія зрілого фібринового згустку, утвореного в системі фібриноген-тромбін в амоній-форміатному буфері (0,05 М) рН 7,8. Концентрація фібриногену складала 0,05 мг/мл, полімеризацію ініціювали тромбіном (0,25 НІН/мл). Згусток для аналізу фіксували у точці досягнення максимальної мутності. Збільшення 1x50 000.

А. Згусток нативного фібрину (контроль).

Б. Згусток фібрину, утворений за присутності пептиду Вβ1-42.

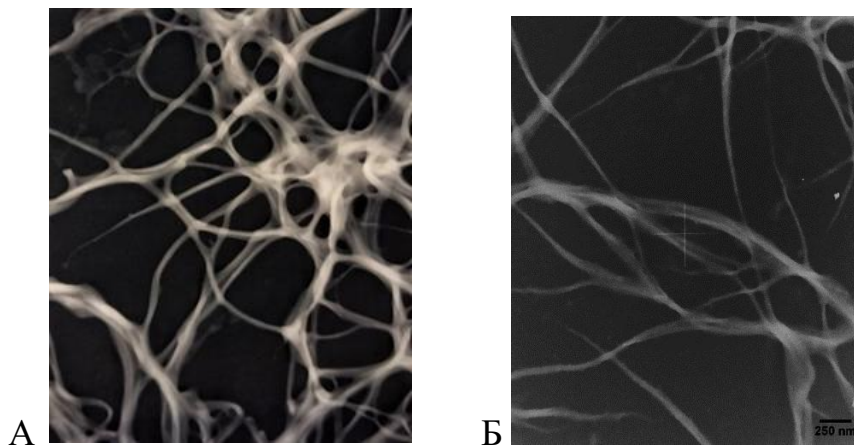


Рис. 3.7. Електронна мікроскопія зрілого фібринового згустку, утвореного в системі фібриноген-тромбін в амоній-форміатному буфері (0,05 М) рН 7,8. Концентрація фібриногену складала 0,05 мг/мл, полімеризацію ініціювали тромбіном (0,25 НІН/мл). Згусток для аналізу фіксували у точці досягнення максимальної мутності. Збільшення 1x25 000.

А. Згусток нативного фібрину (контроль).

Б. Згусток фібрину, утворений за присутності пептиду Вβ1-42.

Як і у випадку турбідиметрії, яка засвідчила повне інгібування полімеризації фібрину моноклональним антитілом 2d2a, електронна мікроскопія не виявила за присутності цього антитіла жодних фібриноподібних структур (Рис. 3.8).

За умов збільшення 1:25 000, вдалося ідентифікувати тонкі бліді структури, які можна вважати несформованими фібрилами (Рис. 3.9). Натомість, провести кількісний аналіз їхніх параметрів за допомогою ImageJ виявилось неможливим.

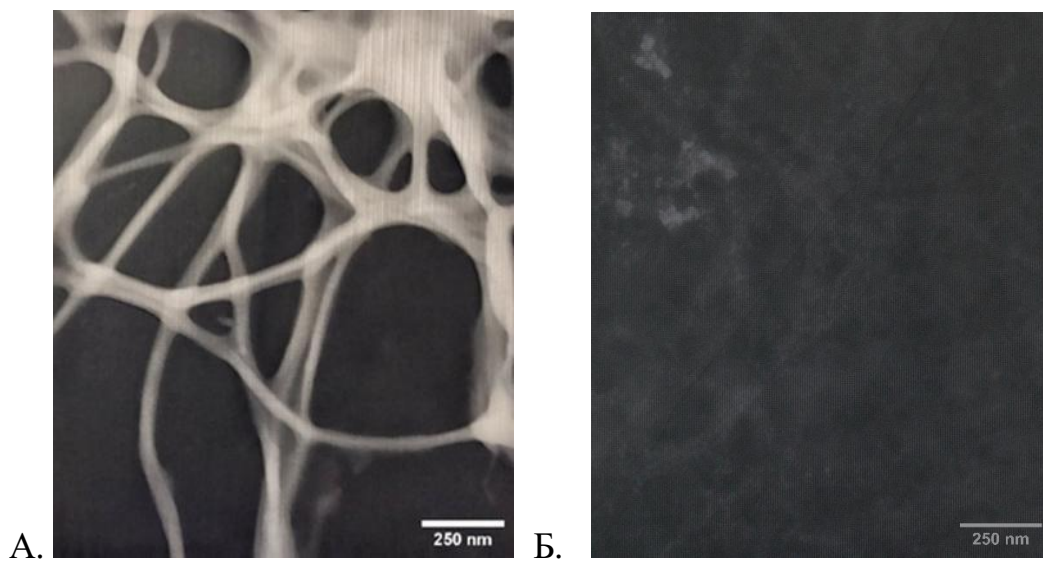


Рис. 3.8. Електронна мікроскопія зрілого фібринового згустку, утвореного в системі фібриноген-тромбін в амоній-форміатному буфері (0,05 М) рН 7,8. Концентрація фібриногену складала 0,05 мг/мл, полімеризацію ініціювали тромбіном (0,25 НН/мл). Згусток для аналізу фіксували у точці досягнення максимальної мутності. Збільшення 1x50 000.

А. Згусток нативного фібрину (контроль).

Б. Згусток фібрину, утворений за присутності антитіла 2d2a.

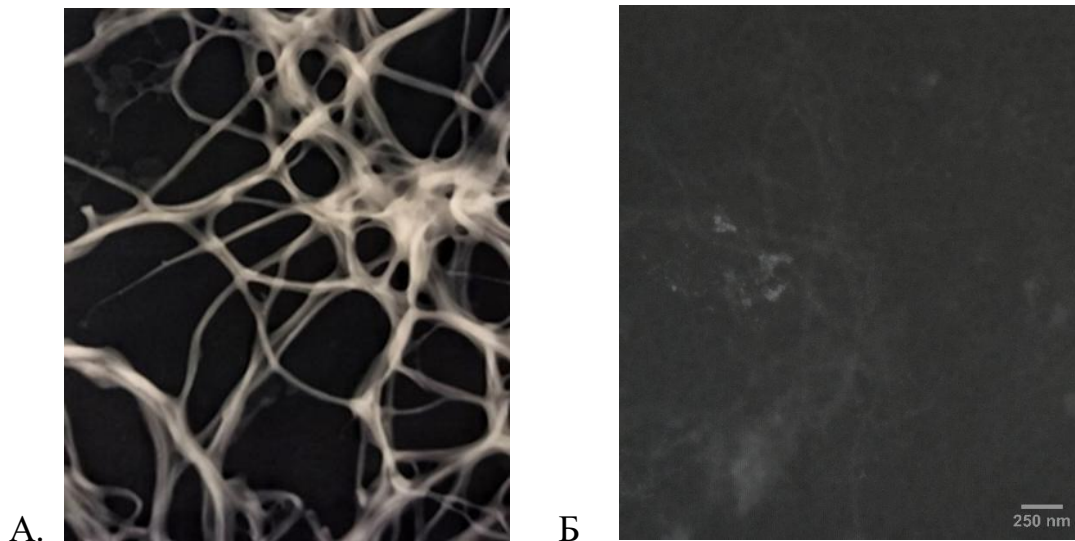


Рис. 3.9. Електронна мікроскопія зрілого фібринового згустку, утвореного в системі фібриноген-тромбін в амоній-форміатному буфері (0,05 М) рН 7,8. Концентрація фібриногену складала 0,05 мг/мл, полімеризацію ініціювали тромбіном (0,25 НН/мл). Згусток для аналізу фіксували у точці досягнення максимальної мутності. Збільшення 1x25 000.

А. Згусток нативного фібрину (контроль).

Б. Згусток фібрину, утворений за присутності антитіла 2d2a.

Кількісні характеристики товщини фібрил частково гідролізованого фібрину, позбавленого В $\beta$ N-доменів, а також зрілого фібрину, утвореного за присутності антитіла 2d2a, пептиду В $\beta$ 1-42, наведено на рисунку 3.10.

Таким чином, електронна мікроскопія підтвердила висновки про ключове значення В $\beta$ N-домену в полімеризації фібрину. Важливим спостереженням є те, що частково гідролізований фібрин, а також фібрин за присутності моноклонального антитіла 2d2a втрачали здатність полімеризуватися. Натомість, пептид В $\beta$ 1-42 істотного впливу на формування фібринової сітки не мав.

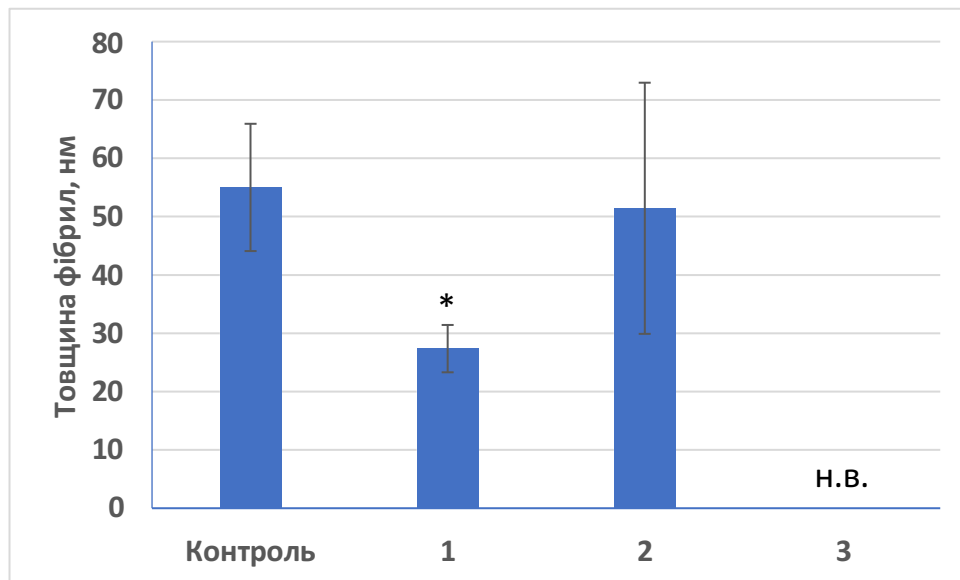


Рис. 3.10. Аналіз товщини фібрил полімерного фібрину, утвореного у системі фібриноген-тромбін за присутності молекулярних ефекторів. 1 – фібриноген desB $\beta$ 1-42; 2 – за присутності пептиду B $\beta$ 1-42; 3 – за присутності антитіла 2d2a. Кількісні показники отримано за допомогою програмного забезпечення ImageJ за даними аналізу серії мікрофотографій (n = 5).

### 3.3. Агрегація тромбоцитів

Оскільки фібриноген, що втратив B $\beta$ N-домен, був не здатним до полімеризації, було важливо дослідити також і його здатність підтримувати агрегацію тромбоцитів – інший ключовий процес формування фібриново-тромбоцитарного тромбу.

До суспензії тромбоцитів, позбавлених компонентів плазми крові, вносили нативний фібриноген або ж фібриноген desB $\beta$ 1-42 та індукували агрегацію за допомогою АДФ. Показано, що швидкість агрегації тромбоцитів лишається незмінною, незалежно від того, чи має молекула нативний B $\beta$ N-домен (Рис.3.11).

Протягом 3 хв агрегація тромбоцитів за присутності фібриногену desB $\beta$ 1-42 відбувалася так само, як і за присутності нативної молекули, з досягненням максимального ступеня агрегації  $25 \pm 4$  %. Однак, надалі спостерігали дезагрегацію

тромбоцитів, за присутності частково гідролізованого фібриногену, яка призводила до зменшення ступеня агрегації на 5-10 %. У контрольній пробі з нативним фібриногеном дезагрегації не спостерігали. [156]

Натомість, внесення у збагачену тромбоцитами плазму крові пептиду B $\beta$ 1-42 не мало жодної дії на агрегацію тромбоцитів – і швидкість і ступінь агрегації лишалися стабільними, незалежно від концентрації пептиду (Рис. 3.12).

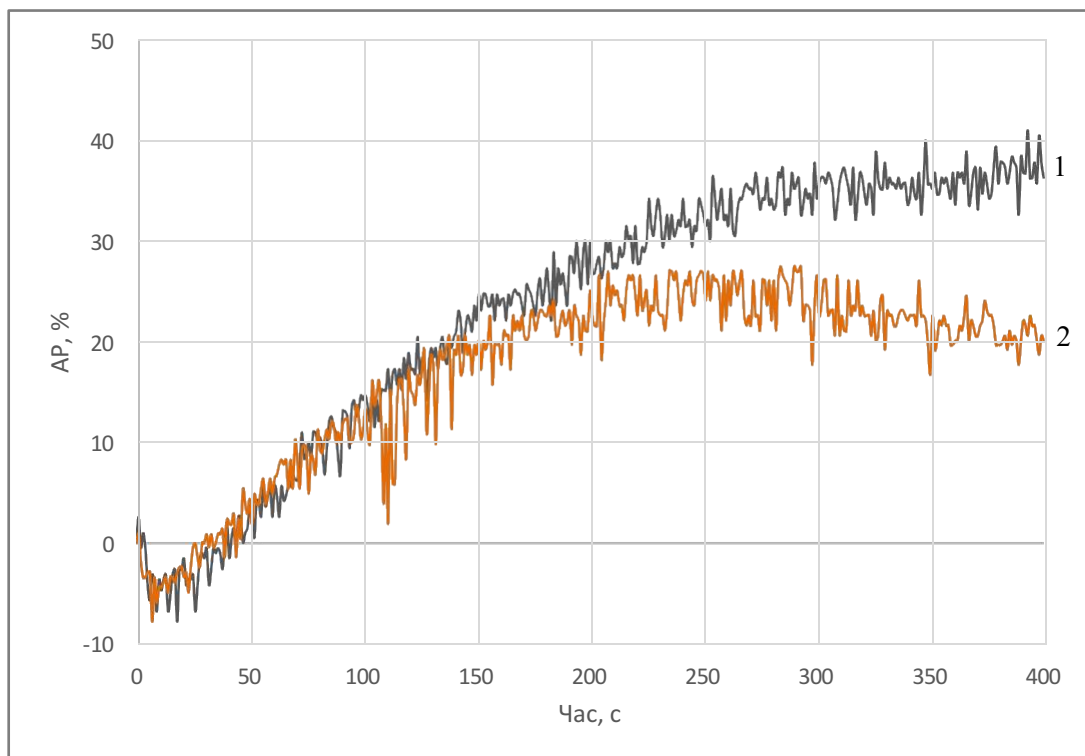


Рис. 3.11. Агрегатограма відмитих тромбоцитів за присутності частково гідролізованої форми фібриногену desB $\beta$ 1-42 (2,5 мг/мл) під дією ADP (12  $\mu$ M). 1 – контроль; 2 – проба з фібриногеном desB $\beta$ 1-42. Дані типового експерименту, n = 5.

Моноклональне антитіло 2d2a не інгібувало початкову швидкість та не знижувало ступінь ADP-індукованої агрегації тромбоцитів за присутності повнорозмірного фібрину. Однак, як і у випадку з протеолітичним відщепленням B $\beta$ N-домену, його блокування моноклональним антитілом викликало значну дезагрегацію тромбоцитів (Рис. 3.13).

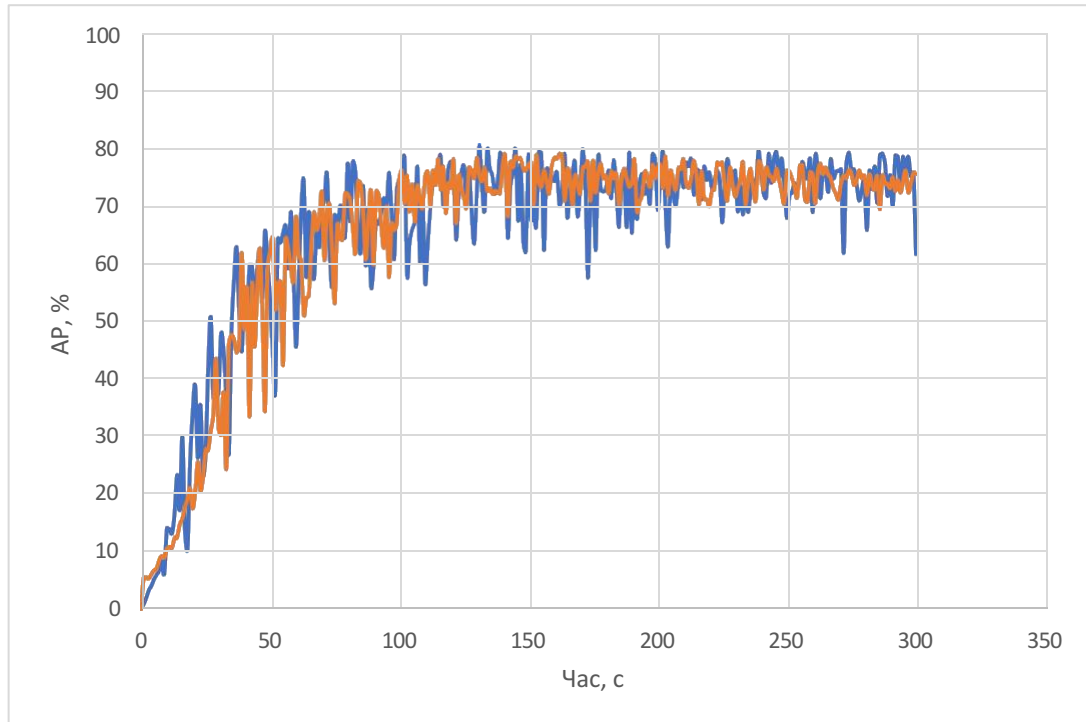


Рис. 3.12. Агрегатограма відмитих тромбоцитів під дією ADP (12  $\mu$ M). 1 – контроль; 2 – проба за присутності пептиду B $\beta$ 1-42. Дані типового експерименту, n = 5.

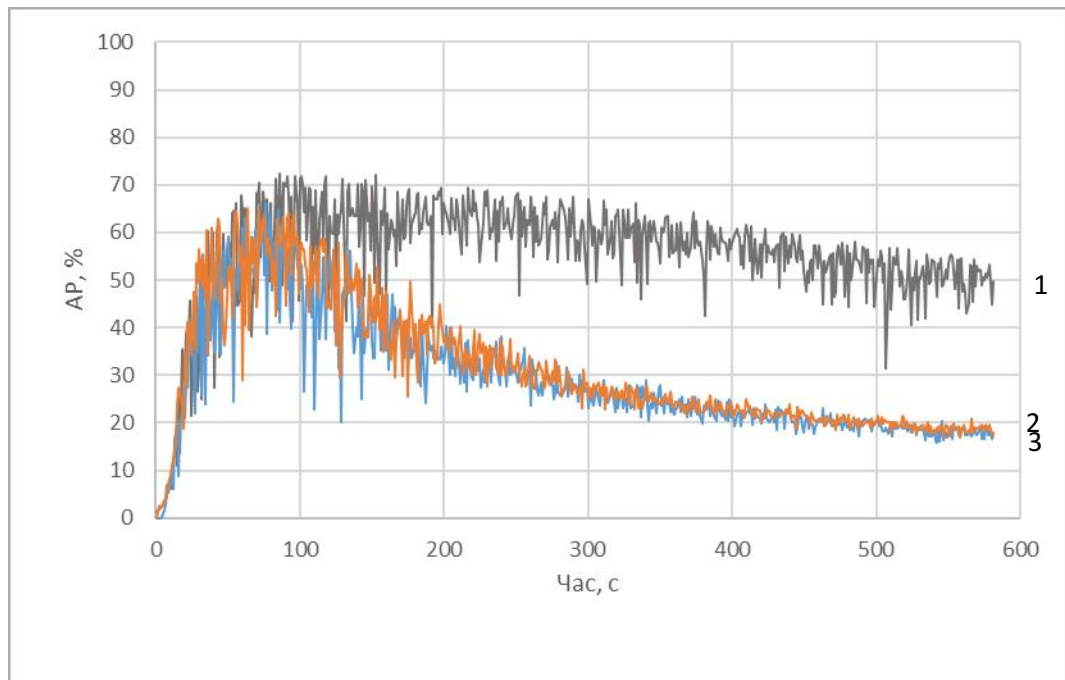


Рис. 3.13. Агрегатограма тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові за присутності антитіла 2d2a (0,06 мг/мл) під дією ADP (12  $\mu$ M). 1 – контроль; 2 – проба з антитілом 0,025 мл; 3 – проба з антитілом 0,05 мл.

У випадку колаген-індукованої агрегації тромбоцитів також не було виявлено зниження ступеня агрегації тромбоцитів за присутності моноклонального антитіла 2d2a (Рис. 3.14).

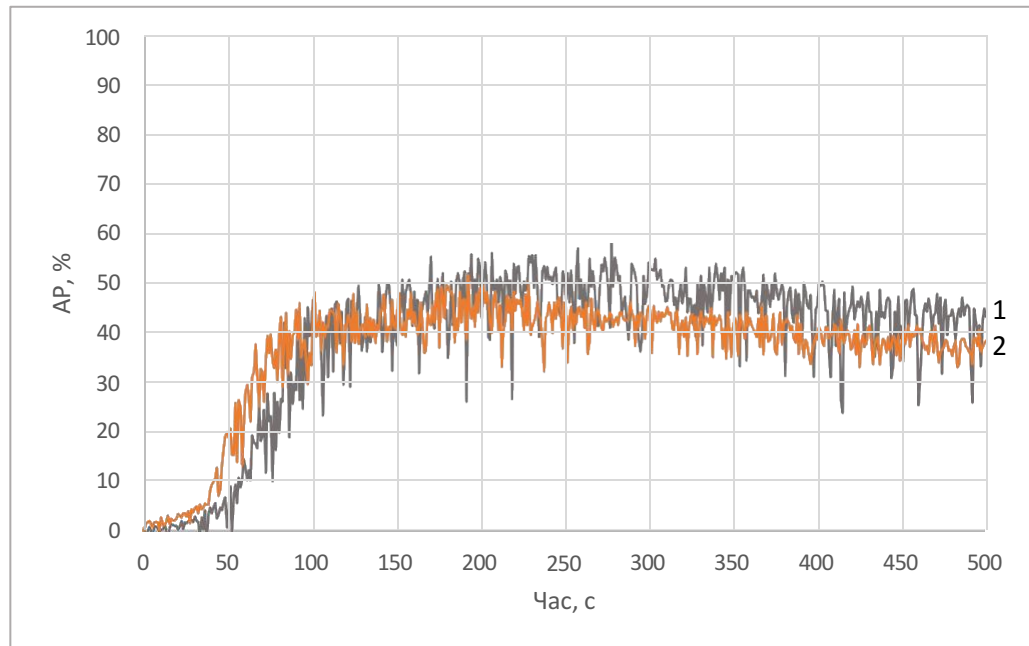


Рис. 3.14. Агрегатограма тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові за присутності антитіла 2d2a (0,06 мг/мл) під дією колагену (10 мг/мл). 1 – контроль; 2 – проба з антитілом 0,05 мл.

Таким чином, втрата фібриногеном  $V\beta N$ -домену, або блокування  $V\beta N$ -домену антитілом не пригнічує агрегаційну функцію тромбоцитів, однак, фібриново-тромбоцитарний згусток має меншу міцність, про що свідчить дезагрегація тромбоцитів. Що ж до пептиду  $V\beta 1-42$ , його внесення в інкубаційне середовище не порушувало процес агрегації тромбоцитів.



## РОЗДІЛ 4. С-кінцевий субдомен $\alpha$ C-регіону

С-кінцевий субдомен є структурно обособленою частиною  $\alpha$ C-регіону, який формує разом з N-кінцевим субдоменом цілісний домен. До складу цього субдомену входить послідовність A $\alpha$ 505-610.

Застосування специфічної протеїнази з культурального середовища *Bacillus thuringiensis* var *israeliensis*, яка гідролізує пептидний зв'язок A $\alpha$ 504-505, дозволяє отримати унікальну частково гідролізовану форму фібриногену desA $\alpha$ 505-610. Вочевидь, у такій формі фібриногену залишок  $\alpha$ C-регіону не формує комплекс з B $\beta$ N-доменом та є вільним. Імовірно також  $\alpha$ C-регіони фібриногену desA $\alpha$ 505-610 не формують зв'язки одне з одним.

Застосування цієї ж протеїнази дає змогу отримати фрагмент A $\alpha$ 505-610. Відкритим лишається питання, чи може цей фрагмент формувати внутрішньомолекулярні комплекси з B $\beta$ N-доменом та  $\alpha$ C-регіоном. Якщо таке зв'язування можливе, то фрагмент конкуруватиме з відповідними регіонами нативної молекули в процесі полімеризації фібрину та інших протеїн-протеїнових взаємодій. [157]

У нашому арсеналі також є моноклональне антитіло I-5A, специфічне до епітопу A $\alpha$ 535-595. Таким чином, воно здатне зв'язуватися з С-кінцевим субдоменом, перешкоджаючи його міжмолекулярним та внутрішньомолекулярним взаємодіям.

Для аналізу ефектів втрати С-кінцевого субдомену, його блокування або ж блокування потенційних сайтів взаємодії, застосовували методи турбідиметрії, електронної мікроскопії та агрегатометрії.



#### 4.1. Турбідиметричний аналіз.

У ході турбідиметричного аналізу процесу полімеризації фібрину, позбавленого С-кінцевого субдомену  $\alpha$ С-регіону нами було виявлено подовження часу формування протофібрил (Рис. 4.1.) Зокрема, lag-період полімеризації подовжувався в 2,5 рази, порівняно з контрольним значенням ( $180 \pm 12$  с проти  $85 \pm 6$  с у контролі).

Не виявлено зниження швидкості латеральної асоціації протофібрил під час полімеризації фібрину desAB-desA $\alpha$ 505-610. Навпаки, відмічено зростання мутності середовища, порівняно з таким для фібрину desAB. Імовірно, останнє пов'язано зі зміною структури згустку, який з тих чи інших причин є більш мутний. Для підтвердження цього припущення надалі проводили електронну мікроскопію.

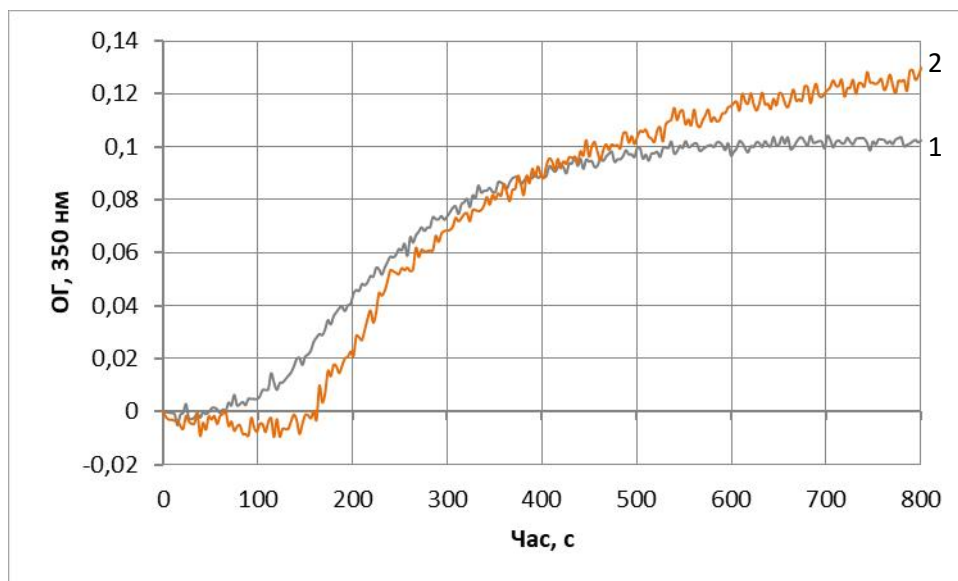


Рис. 4.1. Зміна оптичного поглинання середовища під час формування полімерного фібрину в системі фібриноген+тромбін. Полімеризацію фібрину (0,1 мг/мл) ініціювали внесенням 0,25 NIH/мл тромбіну за присутності 0,001 М CaCl<sub>2</sub> в 0,05 трис-HCl буфері рН 7,4 з 0,13 М NaCl. 1. Контрольний повнорозмірний фібриноген. 2. Фібриноген desA $\alpha$ 505-610.

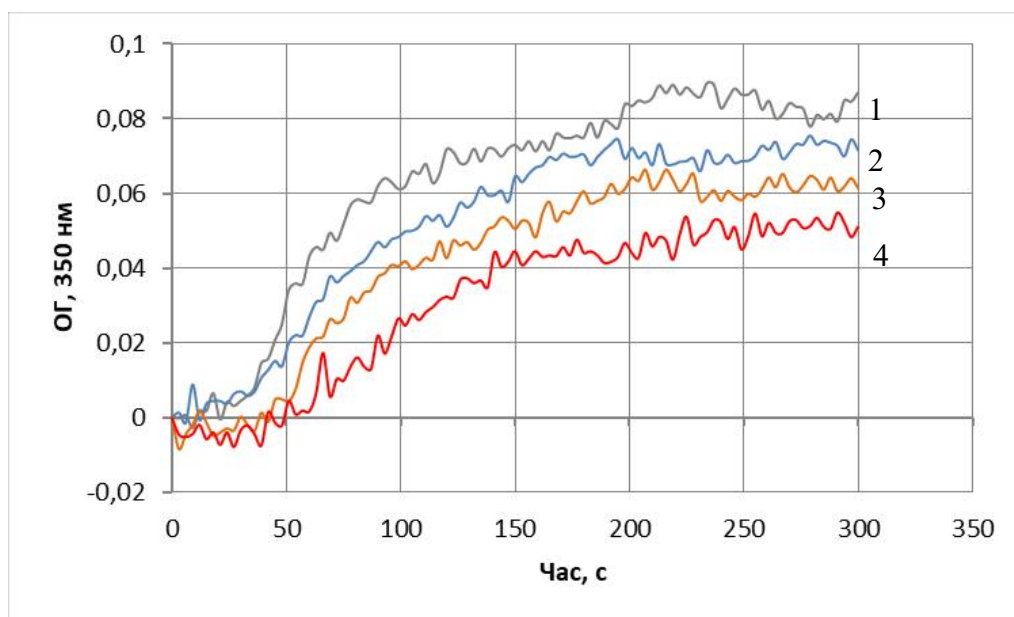


Рис. 4.2. Зміна оптичного поглинання середовища під час формування полімерного фібрину в системі фібриноген+тромбін. Полімеризацію фібрину (0,1 мг/мл) ініціювали внесенням 0,25 NIH/мл тромбіну за присутності 0,001 М  $\text{CaCl}_2$  в 0,05 трис-НСІ буфері рН 7,4 з 0,13 М NaCl. 1 – контрольна проба; 2, 3, 4 – за присутності пептиду Aα505-610 у молярному співвідношенні до фібриногену 1:1, 2:1, 4:1 відповідно.

Водночас, за внесення у середовище інкубації пептиду Aα505-610 не спостерігали значущого подовдження lag-періоду полімеризації фібрину (Рис. 4.2). Натомість, за присутності пептиду виявлено зниження швидкості латеральної асоціації протофібрил та зменшення кінцевої мутності згустку.

У випадку застосування моноклонального антитіла I-5A, яке має епітоп у фрагменті Aα537-595, спостерігали суттєве зниження швидкості фази експоненційного росту мутності, що відображає уповільнення латеральної асоціації протофібрил. Цей ефект мав концентраційно залежний характер – за еквімолярного співвідношення антитіло:фібрин швидкість латеральної асоціації протофібрил знижувалася вдвічі ( $0,06 \pm 0,005$  о.о./хв у контролі проти  $0,025 \pm 0,007$  о.о./хв в дослідній пробі), а за співвідношення 2:1 становила  $0,009 \pm 0,001$  о.о./хв (Рис. 5.3).

Так само, як і у випадку застосування пептиду – похідного фрагменту  $\alpha$ C-регіону 414-610, не спостерігали подовження lag-періоду навіть за значного надлишку антитіла.

Ці результати підтверджують висновок про залучення  $\alpha$ C-регіонів фібрину в комплексі з B $\beta$ N-доменом на стадії побудови протофібрил – саме тому ані антитіло I-5A, ані фрагмент  $\alpha$ C-регіону 414-610 не були ефективні на цьому етапі полімеризації фібрину. Натомість, як антитіло I-5A, так і фрагмент  $\alpha$ C-регіону 414-610 ефективно інгібували фібриноутворення на стадії латеральної асоціації протофібрил, коли  $\alpha$ C-регіони є вільними та здатні підтримувати міжмолекулярні взаємодії  $\alpha$ C: $\alpha$ C. Більш яскравий ефект моноклонального антитіла пов'язано з потенційно більшою специфічністю антитіла, а також з його двовалентністю – кожне антитіло має по два активні центри.

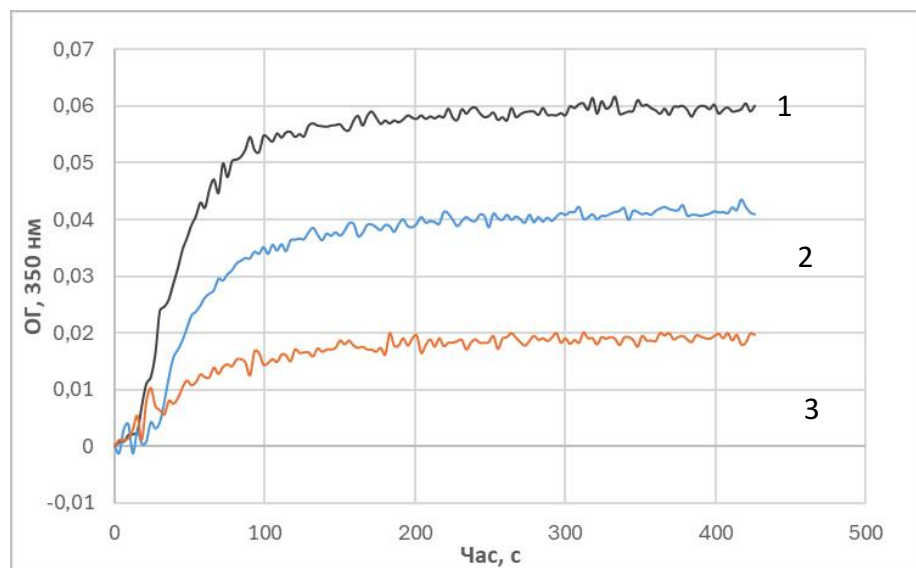


Рис. 4.3. Зміна оптичного поглинання середовища під час формування полімерного фібрину в системі фібриноген+тромбін за присутності моноклонального антитіла I-5A. Полімеризацію фібрину (0,1 мг/мл) ініціювали внесенням 0,25 НН/мл тромбіну за присутності 0,001 М  $\text{CaCl}_2$  в 0,05 трис-НСІ буфері рН 7,4 з 0,13 М  $\text{NaCl}$ . 1. Контрольний фібриноген. 2, 3 – за присутності моноклонального антитіла I-5A у молярному співвідношенні до фібриногену 1:1, 2:1 відповідно.

#### 4.1.2. Електронна мікроскопія

Електронну мікроскопію було застосовано для вивчення архітектури згустку, утвореного за умов дії на фібриноген досліджуваних молекулярних ефекторів: протеїнази (фібриноген desA $\alpha$ 505-610), пептиду та моноклонального антитіла. У кожному випадку електронна мікроскопія дозволяє дослідити структуру згустку в точці його максимальної мутності.

Зокрема, було досліджено структуру згустку, утвореного фібрином desAB-A $\alpha$ 505-610 (рис. 4.4., 4.5). Насамперед, привертає увагу зменшення товщини фібрил, порівняно з контрольними фібрилами (за даними ImageJ  $55 \pm 10$  нм та  $40 \pm 6,8$  нм відповідно;  $p \leq 0,05$ ). Фібрили також є менш конденсованими та формують невпорядковану сітку, завдяки чому і спостерігається підвищення мутності згустку, виявлене в турбідиметричних дослідженнях.

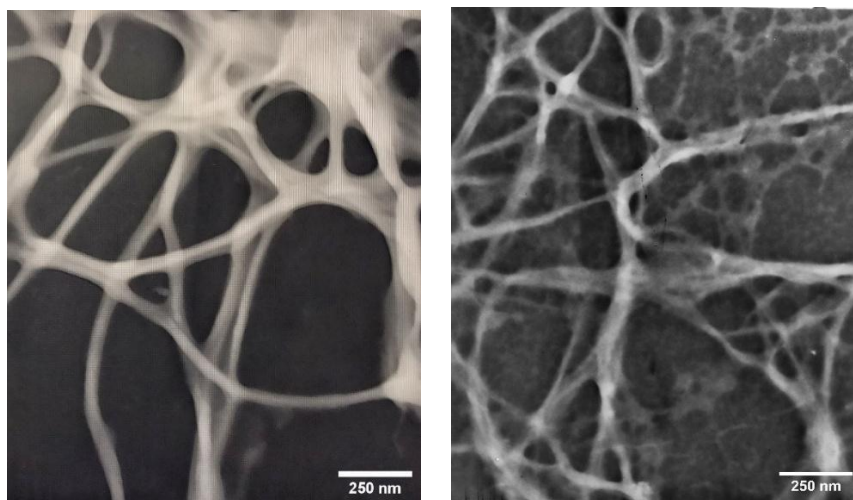


Рис. 4.4. Електронна мікроскопія зрілого фібринового згустку, утвореного в системі фібриноген-тромбін в амоній-форміатному буфері (0,05 М) рН 7,8. Концентрація фібриногену складала 0,05 мг/мл, полімеризацію ініціювали тромбіном (0,25 НН/мл). Згусток для аналізу фіксували у точці досягнення максимальної мутності. Збільшення  $1 \times 50000$ .

А. Згусток нативного фібрину (контроль).

Б. Згусток фібрину desAB-desA $\alpha$ 505-610.

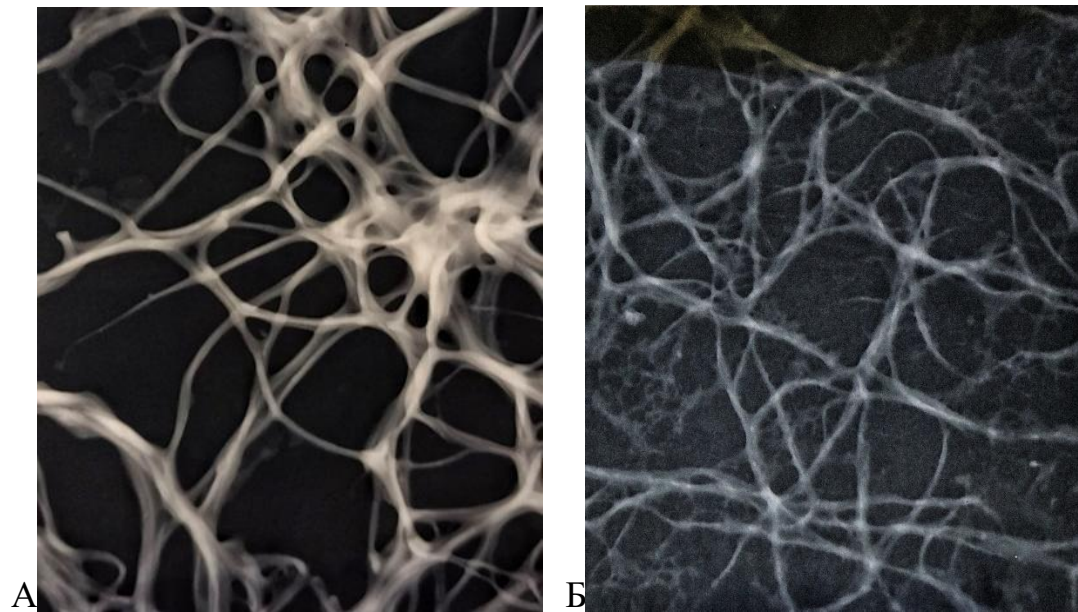


Рис. 4.5. Електронна мікроскопія зрілого фібринового згустку, утвореного в системі фібриноген-тромбін в амоній-форміатному буфері (0,05 М) рН 7,8. Концентрація фібриногену складала 0,05 мг/мл, полімеризацію ініціювали тромбіном (0,25 НІН/мл). Згусток для аналізу фіксували у точці досягнення максимальної мутності. Збільшення 1x25000.

А. Згусток нативного фібрину (контроль).

Б. Згусток фібрину desAB-desAα505-610.

Наступним кроком було вивчення структури фібринового згустку, сформованого за присутності пептиду Aα505-610. Цей пептид не подовжував lag-період полімеризації і дещо зменшував кінцеву мутність згустку в турбідиметричних дослідженнях. Важливо було з'ясувати природу цього ефекту.

Виявлено, що фібрили, сформовані за присутності пептиду Aα505-610, є подібними до фібрил контрольного фібрину (Рис. 4.6, 4.7). Кількісний аналіз за допомогою програмного забезпечення ImageJ підтвердив це спостереження. Можна відзначити лише меншу інтенсивність галуження фібрил за присутності пептиду.

Таким чином, внесення пептиду A $\alpha$ 505-610, що імітує С-кінцевий субдомен  $\alpha$ С-регіону фібрину, не впливає на товщину фібрил, але знижує ступінь їхнього галуження, що можливо впливає на меншу кінцеву мутність згустку.

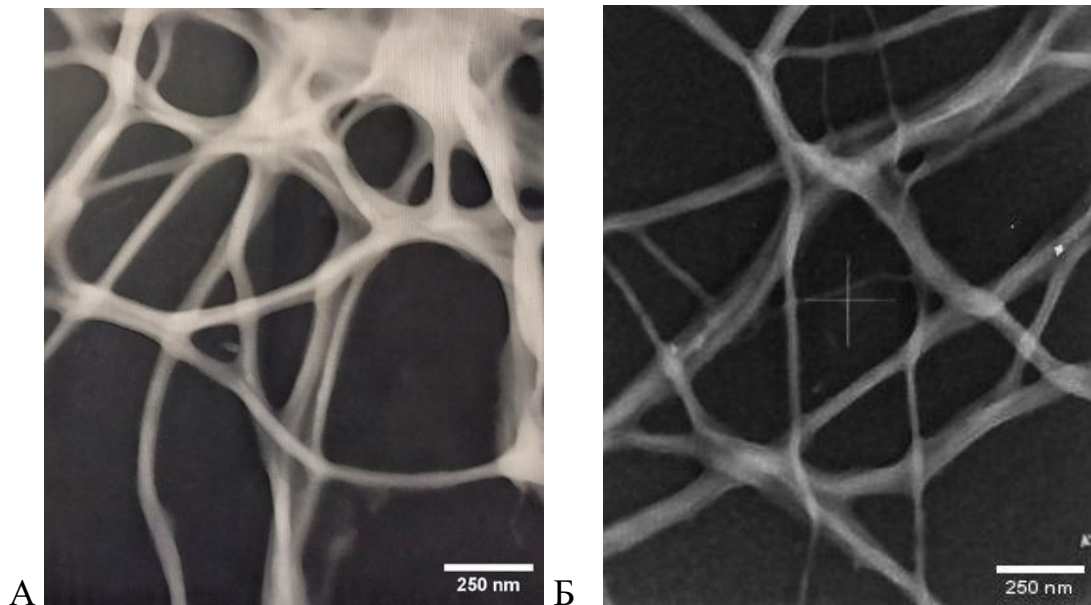


Рис. 4.6. Електронна мікроскопія зрілого фібринового згустку, утвореного в системі фібриноген-тромбін в амоній-форміатному буфері (0,05 М) рН 7,8. Концентрація фібриногену складала 0,05 мг/мл, полімеризацію ініціювали тромбіном (0,25 NIH/мл). Згусток для аналізу фіксували у точці досягнення максимальної мутності. Збільшення 1x50000.

А. Згусток нативного фібрину (контроль).

Б. Згусток фібрину за присутності пептиду A $\alpha$ 505-610.



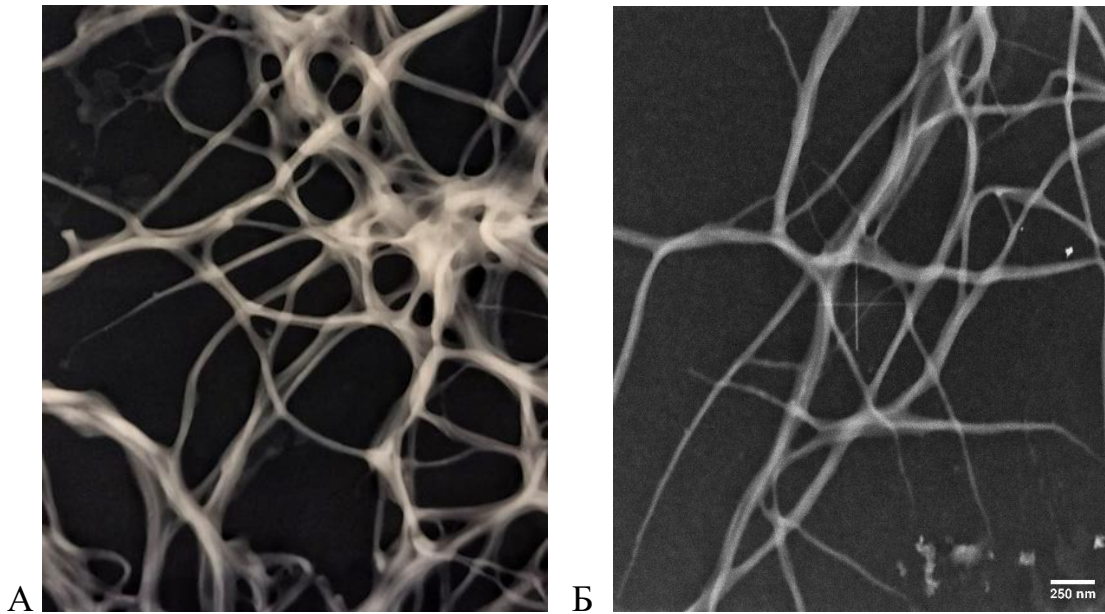


Рис. 4.7. Електронна мікроскопія зрілого фібринового згустку, утвореного в системі фібриноген-тромбін в амоній-форміатному буфері (0,05 М) рН 7,8. Концентрація фібриногену складала 0,05 мг/мл, полімеризацію ініціювали тромбіном (0,25 НН/мл). Згусток для аналізу фіксували у точці досягнення максимальної мутності. Збільшення 1х25000.

А. Згусток нативного фібрину (контроль).

Б. Згусток фібрину за присутності пептиду А $\alpha$ 505-610.

За присутності антитіла І-5А, яке має епітоп у фрагменті А $\alpha$ 537-595, формувалися фібрили, значно тонші за контрольні ( $55 \pm 10$  нм проти  $39 \pm 6,5$  нм відповідно,  $p \leq 0,05$ ). Втім, і галуження фібрил, і загальна будова фібринової сітки була подібною до фібрил контрольних зразків (Рис. 4.8, 4.9). Натомість, фібрили були не лише тоншими, але і менш конденсованими, що свідчить про деяке порушення їх латеральної асоціації.

Таким чином, хоча антитіло і пригнічувало фібриноутворення, виявлено його мінімальний вплив на архітектуру фібринового згустку, який полягав головним чином у потоншанні фібрил.

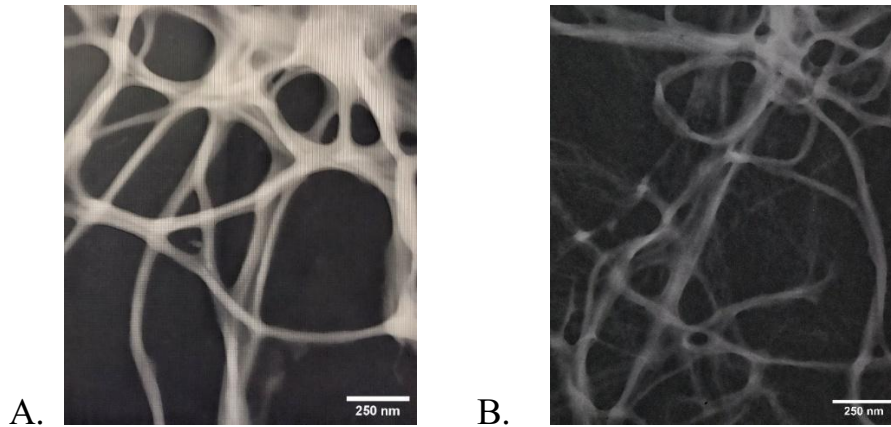


Рис. 4.8. Електронна мікроскопія зрілого фібринового згустку, утвореного в системі фібриноген-тромбін в амоній-форміатному буфері (0,05 М) рН 7,8. Концентрація фібриногену складала 0,05 мг/мл, полімеризацію ініціювали тромбіном (0,25 НН/мл). Згусток для аналізу фіксували у точці досягнення максимальної мутності. Збільшення 1x50000.

А. Згусток нативного фібрину (контроль).

Б. Згусток фібрину за присутності моноклонального антитіла І-5А (0,06 мг/мл).

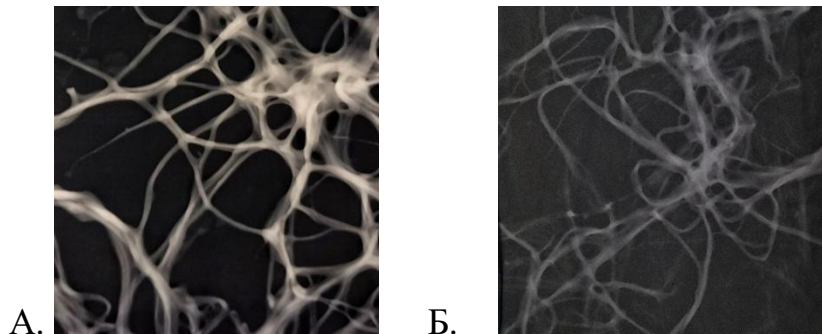


Рис. 4.9. Електронна мікроскопія зрілого фібринового згустку, утвореного в системі фібриноген-тромбін в амоній-форміатному буфері (0,05 М) рН 7,8. Концентрація фібриногену складала 0,05 мг/мл, полімеризацію ініціювали тромбіном (0,25 НН/мл). Згусток для аналізу фіксували у точці досягнення максимальної мутності. Збільшення 1x25000.

А. Згусток нативного фібрину (контроль). Б. Згусток фібрину за присутності моноклонального антитіла І-5А (0,06 мг/мл).



Кількісні характеристики товщини фібрил частково гідролізованого фібрину, позбавленого С-кінцевих субдоменів  $\alpha$ С-регіону, а також зрілого фібрину, утвореного за присутності антитіла I-5A, пептиду A $\alpha$ 505-610, наведено на рисунку 4.10.

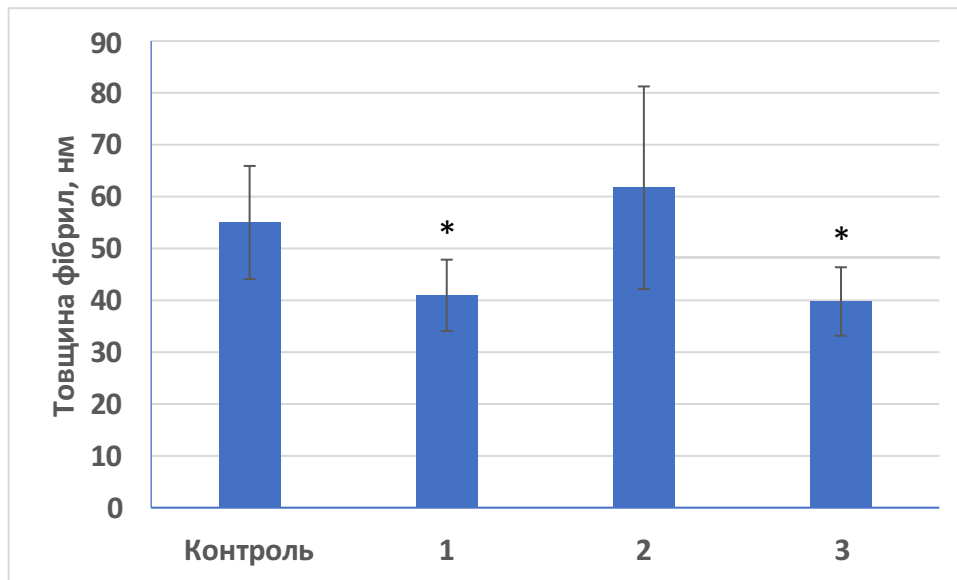


Рис. 4.10. Аналіз товщини фібрил полімерного фібрину, утвореного у системі фібриноген-тромбін, за присутності молекулярних ефекторів. 1 – фібриноген desA $\alpha$ 505-610; 2 – за присутності пептиду A $\alpha$ 505-610; 3 – за присутності антитіла I-5A. Кількісні показники отримано за допомогою програмного забезпечення ImageJ за даними аналізу серії мікрофотографій (n = 5).

## 4.2. Агрегація тромбоцитів

Оскільки С-кінцевий субдомен  $\alpha$ С-регіону фібрин(оген)у виявився важливим для побудови тривимірної сітки фібрил – основи тромбу, слід було очікувати його залучення і до функціонування іншого неодмінного компонента тромбу – тромбоцитів. Тому надалі вивчали агрегацію відмитих тромбоцитів за присутності частково гідролізованого фібриногену desA $\alpha$ 505-610, а також за присутності пептиду A $\alpha$ 505-610 та моноклонального антитіла I-5A.

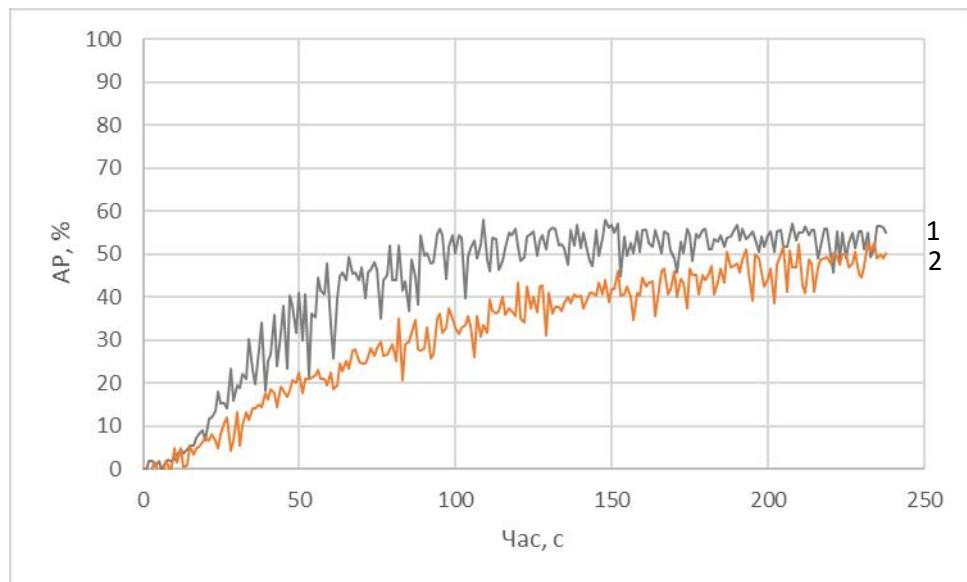


Рис. 4.11. Агрегатограма відмитих тромбоцитів в присутності частково гідролізованої форми фібриногену desAα505-610 (2,5 мг/мл) під дією ADP (12 μM). 1 – контроль; 2 – проба з desAα505-610.

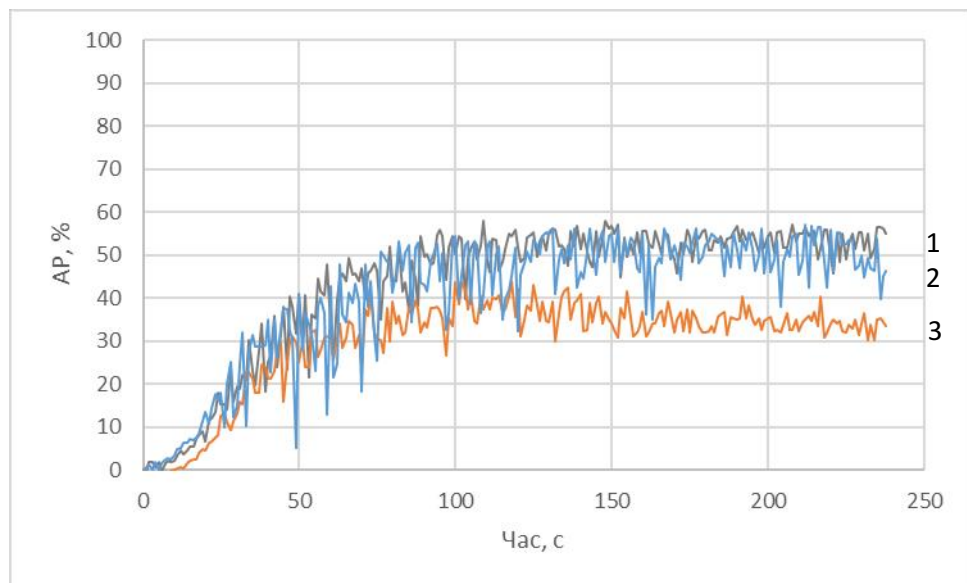


Рис. 4.12. Агрегатограма тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові за присутності пептиду Aα505-610 під дією ADP (12 μM). 1 – контроль; 2 – проба з концентрацією 0,0083 мг/мл; 3 – проба з концентрацією пептиду 0,33 мг/мл.

Було показано зниження швидкості агрегації тромбоцитів за присутності фібриногену desAα505-610, а також більш тривале досягнення максимальної мутності згустку (рис. 4.11). Таким чином, втрата фібриногеном С-кінцевого

субдомену  $\alpha$ C-регіону знижувала його здатність підтримувати агрегацію тромбоцитів.

Водночас, внесення додаткового C-кінцевого субдомену  $\alpha$ C-регіону у вигляді пептиду A $\alpha$ 505-610 не впливало на швидкість агрегації та помірно знижувало ступінь агрегації за високої концентрації (0,33 мг/мл). Загалом же значного ефекту на агрегацію тромбоцитів ані втрата фрагменту A $\alpha$ 505-610, ані його блокування пептидом не мали (рис. 4.12).

Аналогічну закономірність спостерігали і для агрегації тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові за присутності моноклонального антитіла I-5A (Рис. 4.13). Не було виявлено зниження початкової швидкості агрегації чи ступеня агрегації тромбоцитів. Однак, присутність антитіла навіть у невисокій концентрації (0,06 мг/мл) призводила до значної дезагрегації. Ці дані узгоджувалися з результатами, отриманими за присутності пептиду A $\alpha$ 505-610. Однак, антитіло не знижувало ступінь агрегації тромбоцитів, як це було у випадку з пептидом.

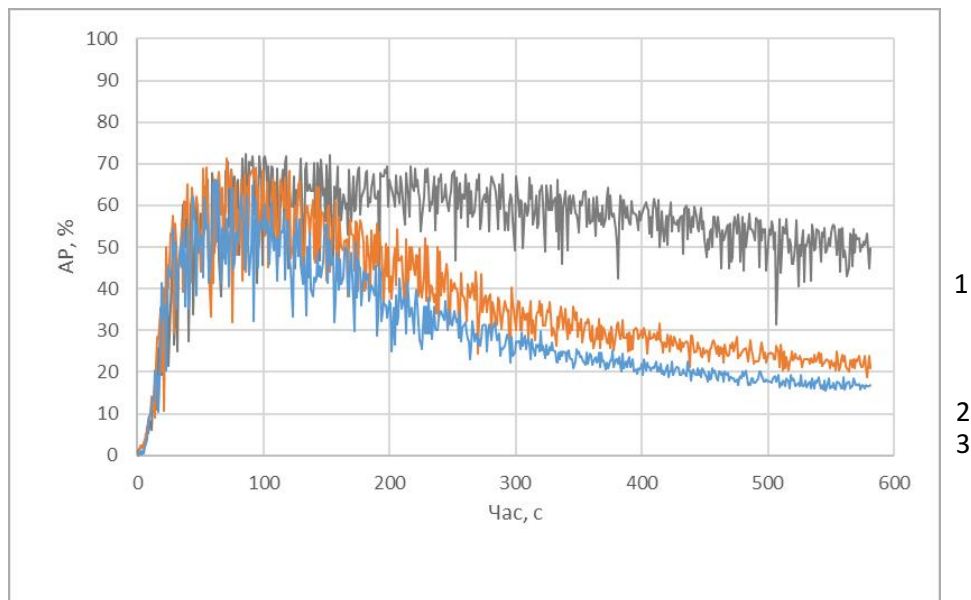


Рис. 5.13. Агрегатограма тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові за присутності антитіла I-5A (0,06 мг/мл) під дією ADP (12  $\mu$ M). 1 – контроль; 2 – проба з антитілом 0,06 мг/мл; 3 – проба з антитілом 0,12 мг/мл. Дані типового експерименту, n = 5.

Для того, щоб більш точно дослідити ефект антитіла I-5A на ступінь агрегації тромбоцитів, було використано колаген, як менш сильний альтерантивний індуктор агрегації тромбоцитів. До збагаченої тромбоцитами плазми крові додавали антитіло I-5A в концентрації 0,06 мг/мл, а також у вищій концентрації – 0,12 мг/мл.

Виявлено зниження ступеня колаген-індукованої агрегації тромбоцитів за присутності антитіла I-5A в концентрації 0,06 мг/мл до  $40 \pm 3$  %, порівняно з  $50 \pm 5$  % у контрольній пробі. Збільшення концентрації антитіла призводило до подальшого зменшення ступеня агрегації тромбоцитів до  $28 \pm 7$  % та дезагрегації (Рис. 4.14).

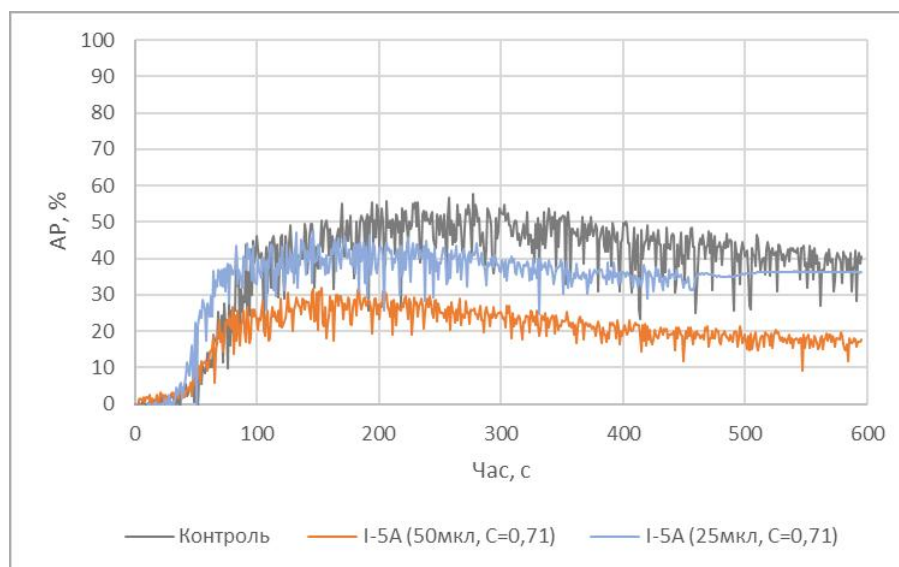


Рис. 4.14. Агрегатограма тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові за присутності антитіла I-5A (0,06 мг/мл та 0,12 мг/мл) під дією колагену (10 мг/мл). А – контроль; Б – проба з антитілом 0,06 мг/мл; В – проба з антитілом 0,12 мг/мл. Дані типового експерименту,  $n = 5$ .

З цього можна зробити висновок, що С-кінцеві субдомени  $\alpha$ С-регіону не є основними частинами молекули фібриногену, залученими під час агрегації тромбоцитів, однак надають фібриново-тромбоцитарному згустку додаткової міцності. Не слід виключати також і ролі зв'язків  $\alpha$ С- $\alpha$ С між сусідніми молекулами фібриногену, які додатково сприяють зближенню та агрегації вже зв'язаних з фібриногеном тромбоцитів.

## РОЗДІЛ 5. Доменна частина $\alpha$ C-регіону

Для дослідження структурно-функціональних особливостей доменної частини  $\alpha$ C-регіону фібрин(оген)у застосовували такі молекулярні ефектори: протеїназу з отрути *Agkistrodon halys halys*, антитіло I-5B та фрагмент A $\alpha$ 414-610.

Протеїназа гідролізує пептидний зв'язок A $\alpha$ 413-414, призводячи до утворення частково гідролізованої форми фібриногену – desA $\alpha$ 414-610. Ця форма має нативні B $\beta$ N-домени, які не поєднуються з  $\alpha$ C-регіонами. Втім, така молекула має обидві пари фібринопептидів A та B, які можуть бути відщеплені з формуванням центрів полімеризації «A» та «B», експоновані центри полімеризації «a» та «b», нативну послідовність, що включає центр полімеризації «C» та комплементарний йому центр «c». Водночас, фібрин(оген) desA $\alpha$ 414-610 не має доменної частини  $\alpha$ C-регіонів, а конекторна частина  $\alpha$ C-регіонів, що не має сайтів між- та внутрішньомолекулярних взаємодій, вільно дисоціює від остову молекули.

Антитіло I-5B специфічне до фрагменту A $\alpha$ 414-492, отже взаємодіє з N-кінцевим субдоменом  $\alpha$ C-регіону, імовірно блокуючи опосередковані ним міжмолекулярні взаємодії. Імовірно, структура та функціональні риси інших фрагментів молекули фібрин(оген)у змін не зазнають.

Фрагмент A $\alpha$ 414-610, отриманий за допомогою обмеженого протеолізу фібриногену протеїназою з отрути *Agkistrodon halys halys*, зберігає сайти міжмолекулярних взаємодій, властиві доменній частині  $\alpha$ C-регіону. Завдяки цьому, він конкурентно зв'язується з сайтами, комплементарними до доменної частини  $\alpha$ C-регіону. Зокрема, імовірне його зв'язування з фібринопептидом B, а також з фрагментами  $\alpha$ C-регіону нативної молекули фібрин(оген)у.

### 5.1. Турбідиметричний аналіз.

Порівняння полімеризації фібрину в системі фібриноген+тромбін показало подовження lag-періоду полімеризації фібрину, позбаченого  $\alpha$ C-регіонів, порівняно з контрольним повнорозмірним фібрином. Зокрема, показано, що для полімеризації фібрину desAB-A $\alpha$ 414-610 характерна тривалість lag-періоду  $200 \pm 14$  с, порівняно з  $100 \pm 10$  с (рис. 5.1). Водночас, зростає швидкість експоненційної фази процесу полімеризації та кінцева мутність фібринового згустку.

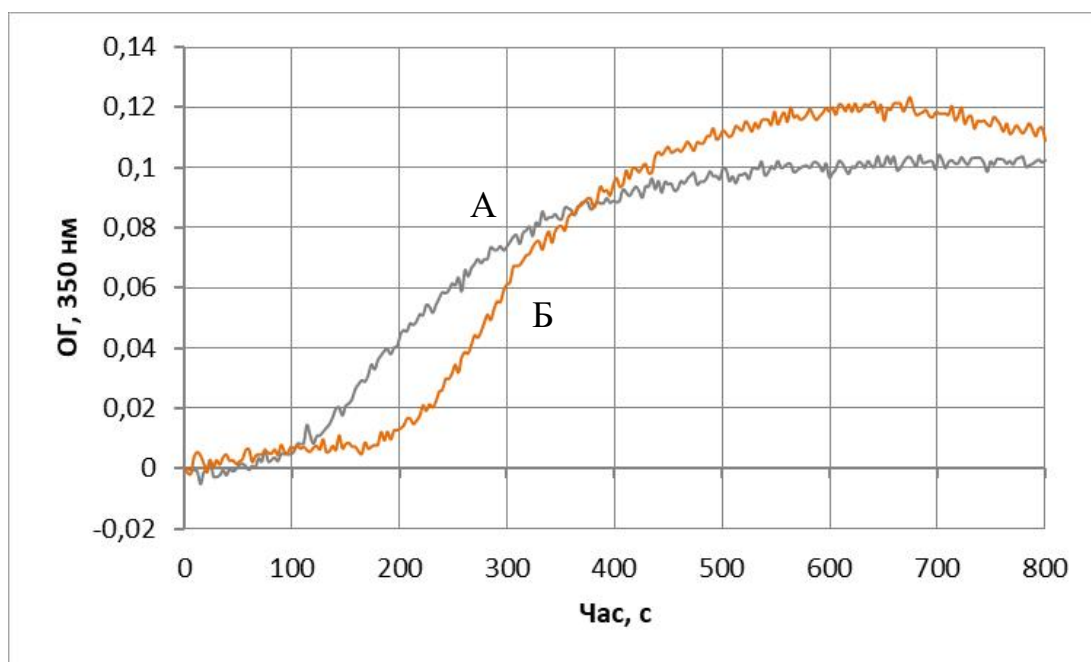


Рис. 5.1. Зміна оптичного поглинання середовища під час формування полімерного фібрину в системі фібриноген+тромбін. Полімеризацію фібрину (0,1 мг/мл) ініціювали внесенням 0,25 НН/мл тромбіну за присутності 0,001 М  $\text{CaCl}_2$  в 0,05 трис-НСІ буфері рН 7,4 з 0,13 М  $\text{NaCl}$ . А. Контрольний повнорозмірний фібриноген. Б. Фібриноген desA $\alpha$ 414-610.

Вважають, що lag-період відображає час, необхідний для формування протофібрил мінімальної довжини (як правило складених з 16 мономерних одиниць), необхідної для початку їхньої латеральної асоціації. Отже, формування протофібрил фібрином, позбавленим  $\alpha$ C-регіонів, триває вдвічі довше. Прискорення латеральної асоціації протофібрил, помітне на турбідиметричному

аналізі, ймовірно є наслідком порушення структури фібринової сітки та не відображає прискорення полімеризації.

Отже, втрата  $\alpha$ C-регіонів та відсутність комплексу B $\beta$ N-домену з  $\alpha$ C-регіонами порушує формування протофібрил фібрину.

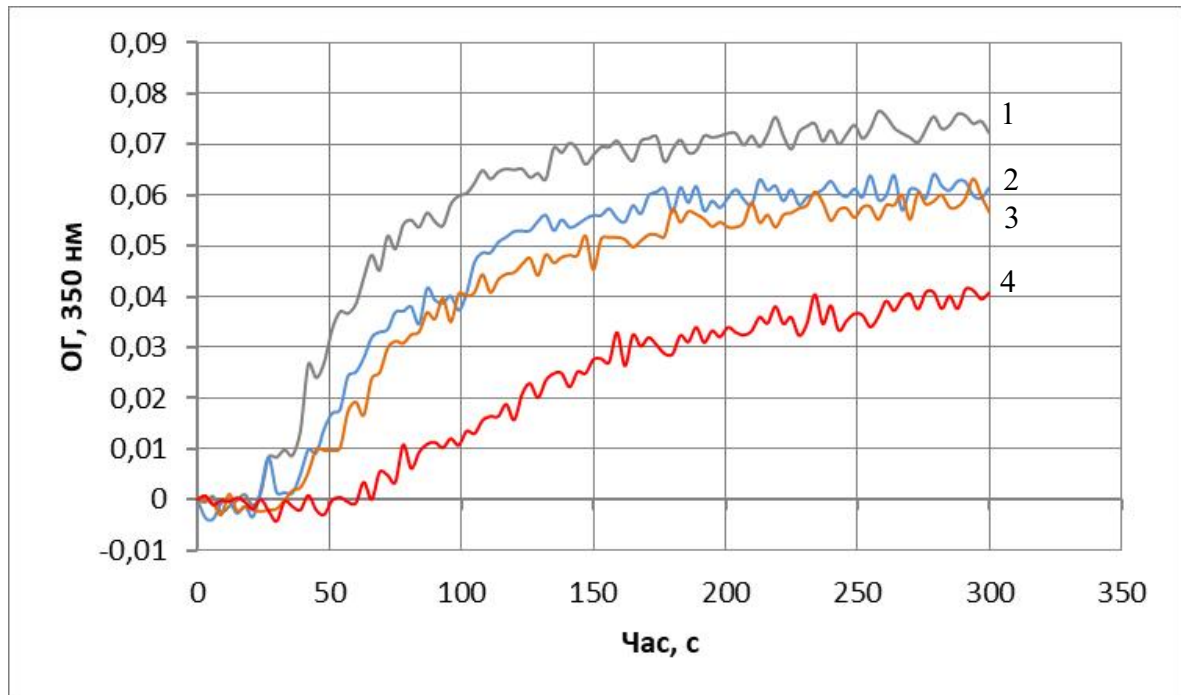


Рис. 5.2. Зміна оптичного поглинання середовища під час формування полімерного фібрину в системі фібриноген+тромбін за присутності пептиду A $\alpha$ 414-610. Полімеризацію фібрину (0,1 мг/мл) ініціювали внесенням 0,25 НН/мл тромбіну за присутності 0,001 М CaCl<sub>2</sub> в 0,05 трис-HCl буфері рН 7,4 з 0,13 М NaCl. 1. Контрольний повнорозмірний фібриноген. 2, 3, 4 – за присутності пептиду A $\alpha$ 414-610 у молярному співвідношенні до фібриногену 1:1, 2:1, 4:1 відповідно.

Виявлено, що внесення у середовище інкубації пептиду A $\alpha$ 414-610, що представляє собою доменну частину  $\alpha$ C-регіону, пригнічує утворення фібрил. Зокрема, знижується швидкість фази експоненційного росту мутності, що відображає уповільнення латеральної асоціації протофібрил. Зокрема, швидкість латеральної асоціації протофібрил у контрольній пробі складає  $0,036 \pm 0,08$  о.о./хв, тоді як за присутності пептиду A $\alpha$ 414-610 у молярному співвідношенні до

фібриногену 1:1 швидкість складає  $0,018 \pm 0,05$  о.о./хв. Збільшення кількості пептиду призводить подальшого до зниження швидкості латеральної асоціації протофібрил (рис. 5.2).

Натомість, не виявлено ефекту досліджуваного пептиду на lag-період полімеризації. Помірне подовження lag-періоду спостерігали лише за присутності пептиду, взятому в молярному співвідношенні до фібриногену 4:1. Отже, внесення пептиду A $\alpha$ 414-610 не впливає на стадію побудови протофібрил, хоча пригнічує їхню латеральну асоціацію.

Важливим є різниця у ефекті втрати  $\alpha$ C-регіону молекулою фібрину (у випадку полімеризації фібрину desAB-A $\alpha$ 414-610) та у випадку внесення додаткового вільного фрагменту  $\alpha$ C-регіону 414-610. Цю різницю можна пояснити таким чином. На етапі побудови протофібрил  $\alpha$ C-регіони переважно знаходяться у комплексі з В $\beta$ N-доменом біля остову молекули і здійснюють свою функцію у побудові протофібрил саме як складова такого комплексу, можливо навіть не безпосередньо, а завдяки стабілізації центру полімеризації «С». Руйнування такого комплексу внаслідок протеолітичного відщеплення  $\alpha$ C-регіону протеїназою порушує побудову протофібрил.

Водночас, внесення екзогенного фрагменту  $\alpha$ C-регіону 414-610 не інгібує lag-періоду полімеризації – стадію побудови протофібрил. На нашу думку, це пов'язано з тим, що екзогенний фрагмент 414-610 не руйнує внутрішньомолекулярний комплекс  $\alpha$ C-регіону з В $\beta$ N-доменом, який на стадії побудови протофібрил функціонує нормально.

З іншого боку, на стадії експоненційного росту мутності – латеральної асоціації протофібрил –  $\alpha$ C-регіони дисоціюють від остову молекули та функціонують окремо одне від одного та від В $\beta$ N-домену. На цій стадії полімеризації  $\alpha$ C-регіони можуть вносити вклад в латеральну асоціацію протофібрил завдяки міжмолекулярним взаємодіям, коли  $\alpha$ C-регіон однієї молекули фібрину в протофібрилі взаємодіє з  $\alpha$ C-регіоном іншої молекули фібрину сусідньої протофібрили, тим самим стимулюючи їхню латеральну асоціацію.



Описана схема участі  $\alpha$ C-регіонів у латеральній асоціації протофібрил пояснює інгібування цього процесу вільним фрагментом A $\alpha$ 414-610. Цей фрагмент, взаємодіючи з  $\alpha$ C-регіонами, перешкоджає їхнім міжмолекулярним взаємодіям, відтак знижуючи швидкість латеральної асоціації протофібрил.

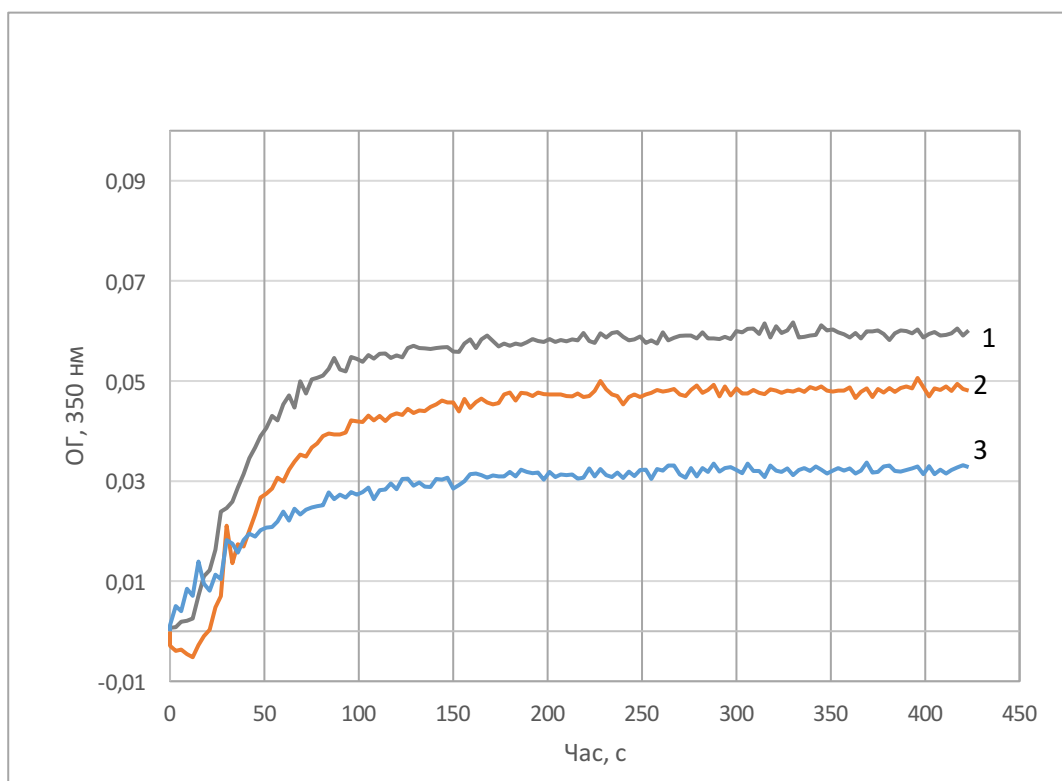


Рис. 5.3. Зміна оптичного поглинання середовища під час формування полімерного фібрину в системі фібриноген+тромбін за присутності моноклонального антитіла I-5B. Полімеризацію фібрину (0,1 мг/мл) ініціювали внесенням 0,25 НН/мл тромбіну за присутності 0,001 М  $\text{CaCl}_2$  в 0,05 трис-НСІ буфері рН 7,4 з 0,13 М  $\text{NaCl}$ . 1. Контрольний фібриноген. 2, 3 – за присутності моноклонального антитіла I-5B у молярному співвідношенні до фібриногену 1:1, 2:1 відповідно.

Окремо слід пояснити більш інтенсивне помутніння середовища інкубації під час полімеризації фібрину, позбавленого  $\alpha$ C-регіонів. Імовірно, прискорення латеральної асоціації протофібрил не відбувається, однак утворений такою формою фібрину полімер значно відрізняється за своєю структурою, порівняно з нативним

фібрином. Для перевірки цієї гіпотези необхідним є проведення електронної мікроскопії.

Аналогічним чином діяло на полімеризацію фібрину і антитіло I-5B, специфічне до епітопу A $\alpha$ 414-492. Поруч із відсутністю дії на формування протофібрил спостерігали значне зниження кінцевої мутності згустку та зниження швидкості латеральної асоціації протофібрил (Рис. 5.3).

## 5.2. Електронна мікроскопія

Важливим завданням для перевірки висловлених припущень та висновків стало застосування електронної мікроскопії, яка дозволяє візуалізувати згустки фібрину, утворені за присутності тих чи інших ефекторів. Важливо, що зразки для аналізу отримували на стадії завершення формування фібрину – тобто в момент досягнення турбідиметричною кривою максимальної мутності. Як видно з рис. 5.1.-5.3., такий час був свій для кожного дослід.

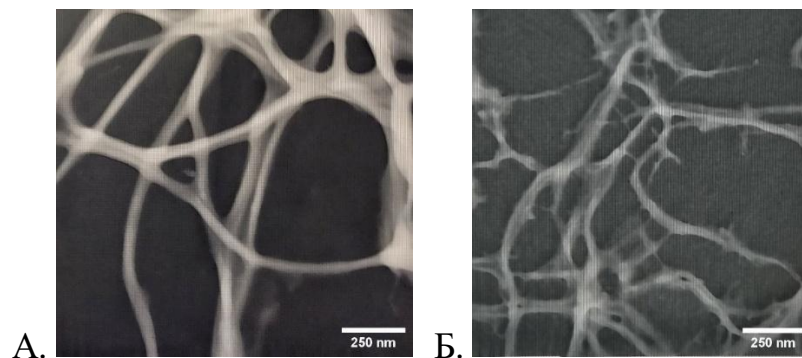


Рис. 5.4. Електронна мікроскопія зрілого фібринового згустку, утвореного в системі фібриноген-тромбін в амоній-форміатному буфері (0,05 М) рН 7,8. Концентрація фібриногену складала 0,05 мг/мл, полімеризацію ініціювали тромбіном (0,25 НН/мл). Згусток для аналізу фіксували у точці досягнення максимальної мутності. Збільшення 1x50000.

А. Згусток нативного фібрину (контроль).

Б. Згусток фібрину desA $\alpha$ 414-610.

Електронна мікроскопія згустків, утворених фібрином desA $\alpha$ 414-610 частково пояснила виявлений у турбідиметричних дослідженнях феномен підвищення мутності згустку. Як видно на рис. 5.4 та на рис. 5.5 (збільшення 1:50000 та 1:25000 відповідно), сітка фібрил, утворена частково гідролізованим фібриногеном, є менш упорядкованою, фібрили загалом тонші, і хоча менше галузяться – формують невпорядковані переплетення, які можуть бути оптично гущіші.

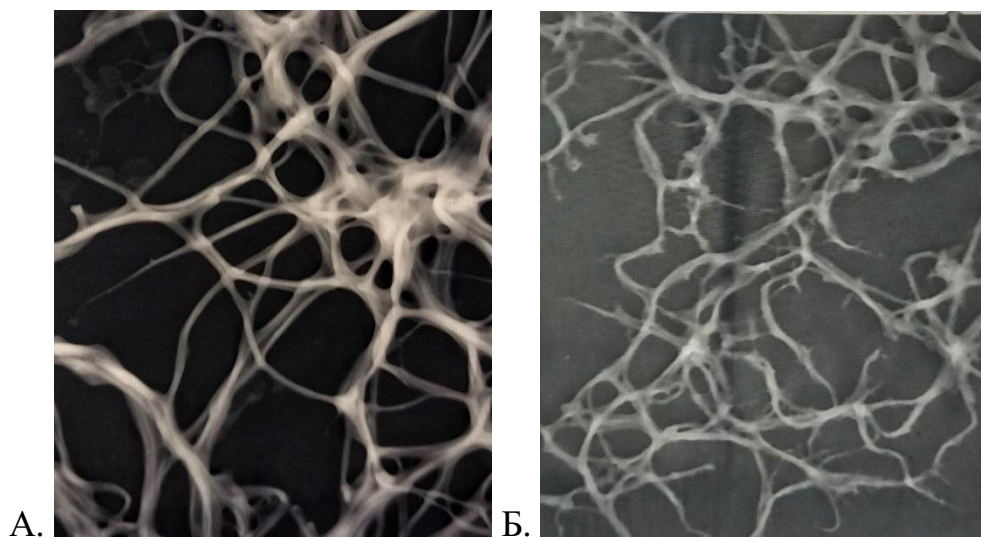


Рис. 5.5. Електронна мікроскопія зрілого фібринового згустку, утвореного в системі фібриноген-тромбін в амоній-форміатному буфері (0,05 М) рН 7,8. Концентрація фібриногену складала 0,05 мг/мл, полімеризацію ініціювали тромбіном (0,25 НН/мл). Згусток для аналізу фіксували у точці досягнення максимальної мутності. Збільшення 1x25000.

А. Згусток нативного фібрину (контроль).

Б. Згусток фібрину desA $\alpha$ 414-610.

Аналіз серії мікрофотографій з використанням програми ImageJ підтвердив висновок про меншу товщину фібрил фібрину desA $\alpha$ 414-610, порівняно з фібрилами нативного фібрину ( $33 \pm 11$  нм проти  $55 \pm 11$  нм відповідно).

Вповільнення формування протофібрил фібрину desA $\alpha$ 414-610 імовірно призводило до латеральної асоціації протофібрил, які були загалом коротшими, ніж у випадку контрольного фібрину. Тому на зображеннях відмічаємо утворення

коротких відгалужень фібринових волокон, які різко уриваються та не продовжуються, як це є характерним для контрольних фібрил (Рис. 5.4, 5.5).

Внесення у середовище інкубації пептиду A $\alpha$ 414-610 не викликало потоншення фібрил фібрину (Рис. 5.6, 5.7), однак кількість фібрил була виразно меншою. Обчислення за допомогою програмного забезпечення ImageJ підтвердили спостереження про схожі параметри протофібрил:  $55 \pm 11$  нм у контролі проти  $62 \pm 13$  нм.

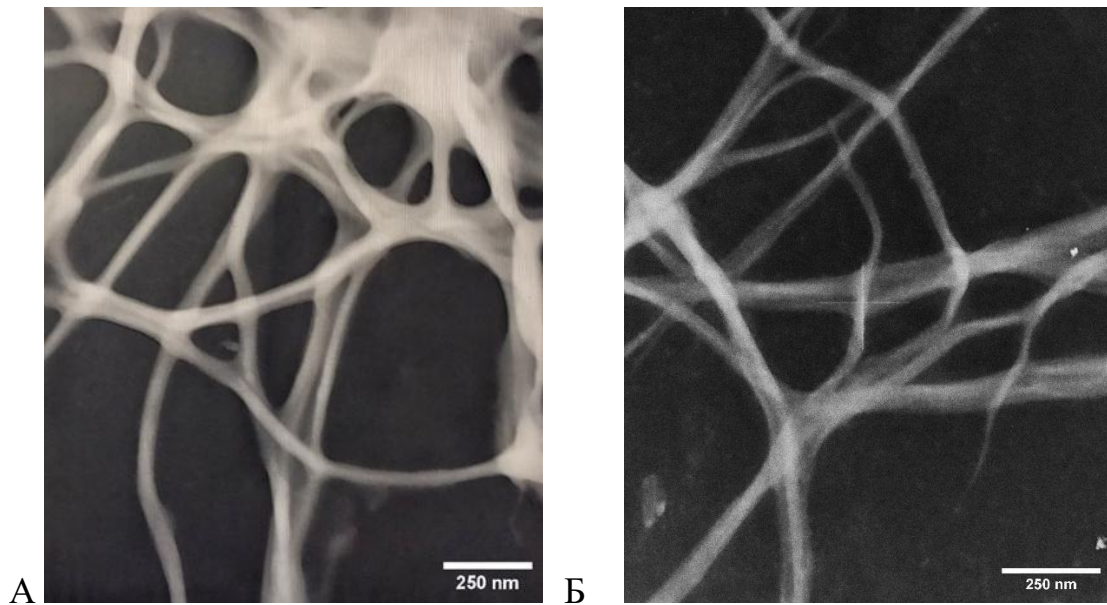


Рис. 5.6. Електронна мікроскопія зрілого фібринового згустку, утвореного в системі фібриноген-тромбін в амоній-форміатному буфері (0,05 М) рН 7,8. Концентрація фібриногену складала 0,05 мг/мл, полімеризацію ініціювали тромбіном (0,25 НН/мл). Згусток для аналізу фіксували у точці досягнення максимальної мутності. Збільшення  $1 \times 50000$ .

А. Згусток нативного фібрину (контроль).

Б. Згусток фібрину за присутності пептиду A $\alpha$ 414-610.

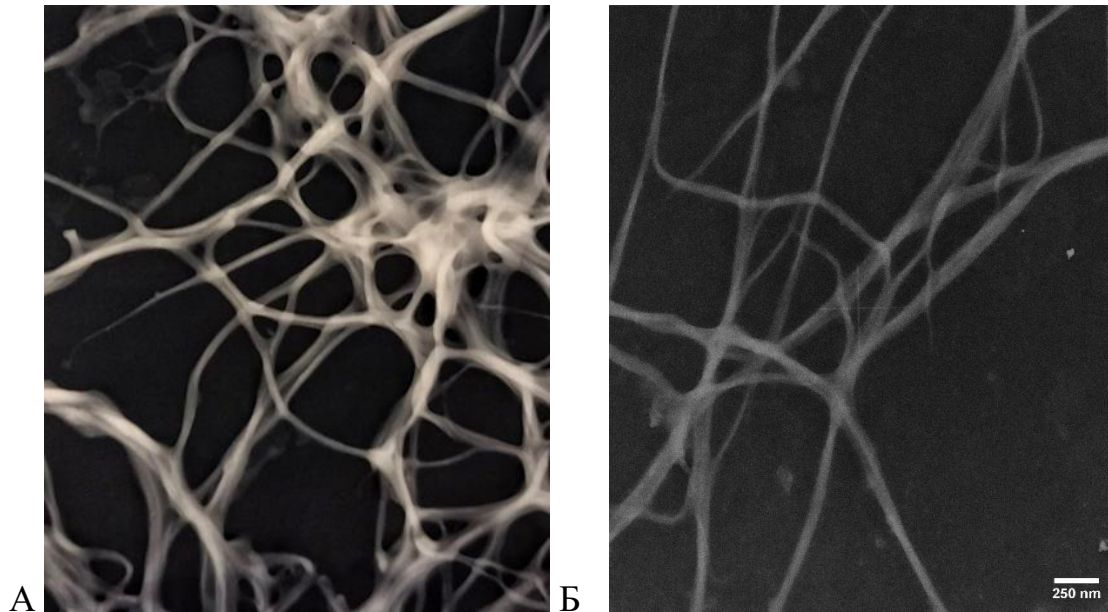


Рис. 5.7. Електронна мікроскопія зрілого фібринового згустку, утвореного в системі фібриноген-тромбін в амоній-форміатному буфері (0,05 М) рН 7,8. Концентрація фібриногену складала 0,05 мг/мл, полімеризацію ініціювали тромбіном (0,25 НН/мл). Згусток для аналізу фіксували у точці досягнення максимальної мутності. Збільшення 1x25000.

А. Згусток нативного фібрину (контроль).

Б. Згусток фібрину за присутності пептиду А $\alpha$ 414-610.

Аналіз мікрофотографій полімерного фібрину, отриманого за присутності моноклонального антитіла І-5В, специфічного до епітопу А $\alpha$ 414-492, виявив незначні відмінності архітектури згустку, порівняно зі згустком, утвореним нативним фібрином.

Водночас, фібрили, утворені за присутності антитіла, є менш конденсованими. Як видно на рис. 5.8, 5.9, фібрили мають співмірну контрольній або навіть трохи меншу товщину (за даними ImageJ  $44,1 \pm 9$  нм проти  $55 \pm 11$  у контролі), але є неконтрасними. Імовірно, це пов'язано з порушенням латеральної асоціації протофібрил.

Це узгоджується із результатами турбідиметричного аналізу, який теж засвідчує ефект антитіла І-5В на латеральну асоціацію протофібрил.



Імовірно, як і пептид A $\alpha$ 414-610, антитіло I-5B не впливає на побудову протофібрил, а лише на їхню латеральну асоціацію.

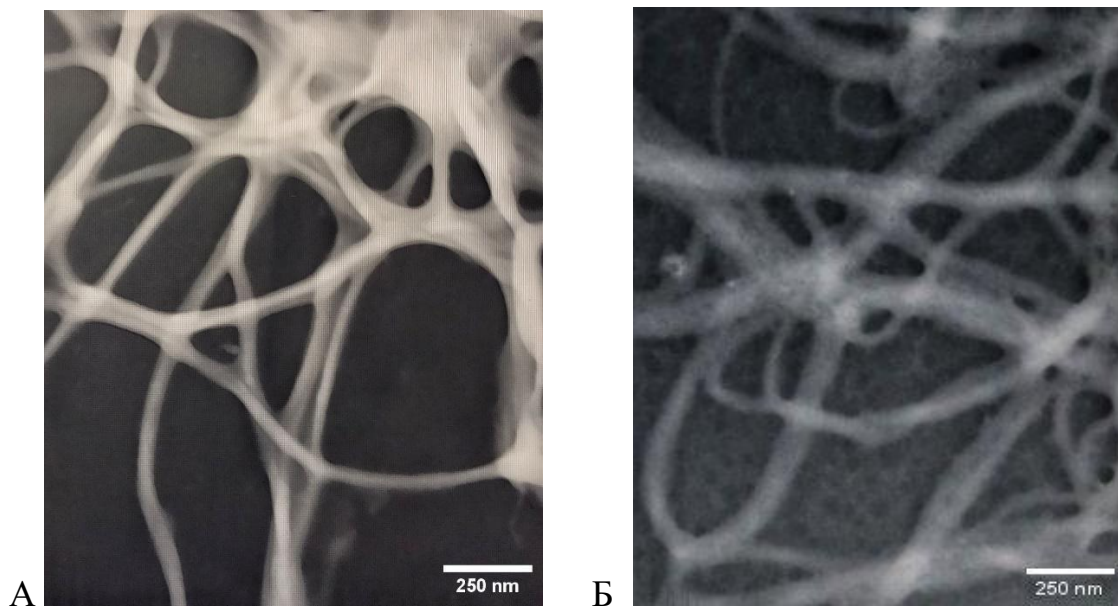


Рис. 5.8. Електронна мікроскопія зрілого фібринового згустку, утвореного в системі фібриноген-тромбін в амоній-форміатному буфері (0,05 М) рН 7,8. Концентрація фібриногену складала 0,05 мг/мл, полімеризацію ініціювали тромбіном (0,25 НІН/мл). Згусток для аналізу фіксували у точці досягнення максимальної мутності. Збільшення 1x50000.

А. Згусток нативного фібрину (контроль).

Б. Згусток фібрину за присутності моноклонального антитіла I-5B (0,06 мг/мл).

Кількісні характеристики товщини фібрил частково гідролізованого фібрину, позбавленого доменної частини  $\alpha$ C-регіону, а також зрілого фібрину, утвореного за присутності антитіла I-5B, пептиду A $\alpha$ 414-610, наведено на рисунку 5.10

Таким чином, N-кінцевий субдомен  $\alpha$ C-регіону виявився важливим елементом побудови тривимірної сітки фібрину – основи тромбу. Видалення  $\alpha$ C-регіону порушувало насамперед стадію побудови протофібрил, а його стеричне блокування – стадію латеральної асоціації протофібрил. Це вказує на різну функцію досліджуваного фрагменту на різних стадіях фібриноутворення.

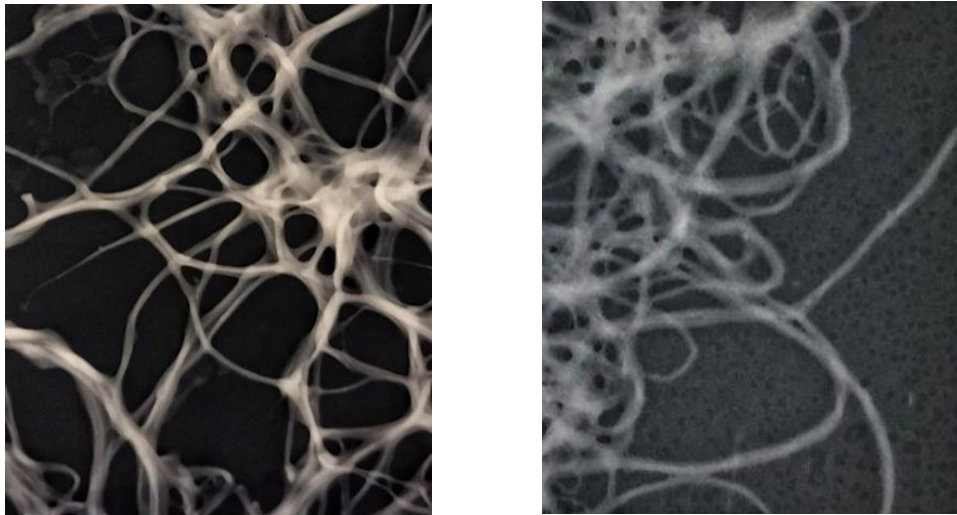


Рис. 5.9. Електронна мікроскопія зрілого фібринового згустку, утвореного в системі фібриноген-тромбін в амоній-форміатному буфері (0,05 М) рН 7,8. Концентрація фібриногену складала 0,05 мг/мл, полімеризацію ініціювали тромбіном (0,25 НН/мл). Згусток для аналізу фіксували у точці досягнення максимальної мутності. Збільшення 1x25000.

А. Згусток нативного фібрину (контроль).

Б. Згусток фібрину за присутності моноклонального антитіла I-5В (0,06 мг/мл).

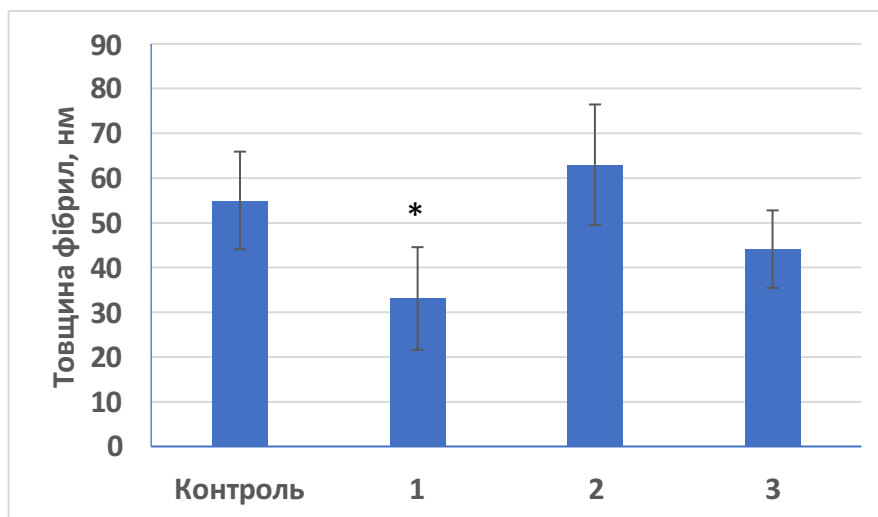


Рис. 5.10. Аналіз товщини фібрил полімерного фібрину, утвореного у системі фібриноген-тромбін, за присутності молекулярних ефекторів. 1 – фібриноген desA $\alpha$ 414-610; 2 – за присутності пептиду A $\alpha$ 414-610; 3 – за присутності антитіла I-5В. Кількісні показники отримано за допомогою програмного забезпечення ImageJ за даними аналізу серії мікрофотографій (n = 5).

### 5.3. Агрегація тромбоцитів

Оскільки N-кінцевий субдомен  $\alpha$ C-регіону приймав участь у полімеризації фібрину, було важливо також перевірити його роль у підтримці агрегації тромбоцитів – іншого важливого процесу, залученого до формування фібриново-тромбоцитарного тромбу. Для аналізу було застосовано аналогічний підхід із застосуванням частково гідролізованої форми фібриногену desA $\alpha$ 414-610, пептиду A $\alpha$ 414-610 та антитіла I-5B, специфічного до фрагменту A $\alpha$ 414-492.

Для вивчення агрегації тромбоцитів за присутності фібриногену desA $\alpha$ 414-610 було отримано «відмиті» тромбоцити, тобто – позбавлені компонентів плазми. Їхню агрегацію було індуковано ADP за присутності екзогенного фібриногену desA $\alpha$ 414-610 у порівнянні з нативним фібриногеном (2,5 мг/мл).

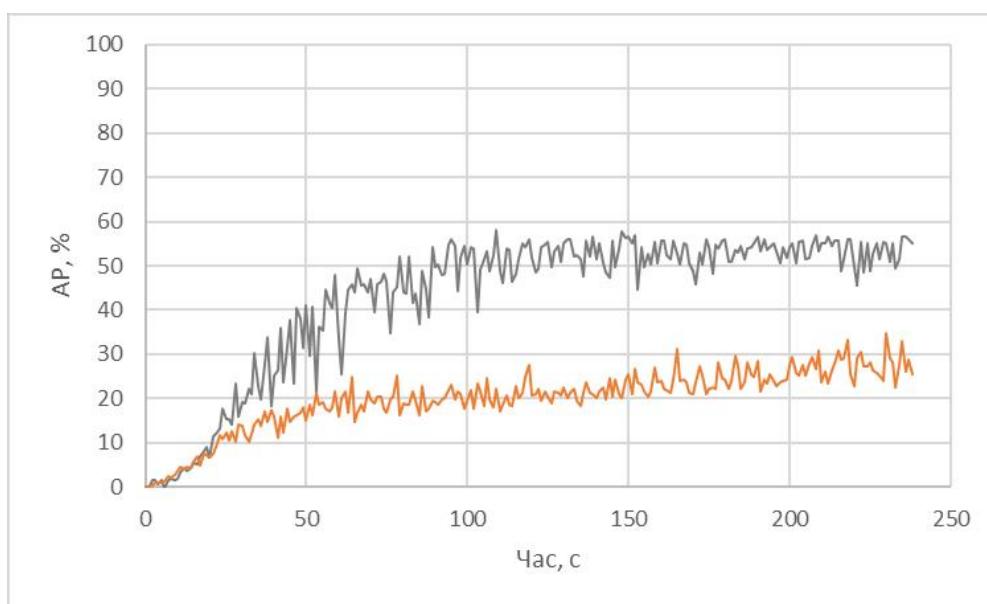


Рис. 5.11. Агрегація відмитих тромбоцитів за присутності частково гідролізованої форми фібриногену desA $\alpha$ 414-610 (2,5 мг/мл) під дією ADP (12  $\mu$ M). 1 – контроль; 2 – проба з desA $\alpha$ 414-610. Дані типового експерименту, n = 5.

Як показано на рисунку 5.11, ступінь агрегації тромбоцитів за присутності фібриногену desA $\alpha$ 414-610 знижувався в 2,5 рази, порівняно зі ступенем агрегації за присутності нативного фібриногену ( $20 \pm 7$  % проти  $50 \pm 8$  %). Зниження початкової швидкості агрегації тромбоцитів не виявлено.



Надалі вивчали агрегацію тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові за присутності пептиду A $\alpha$ 414-610, взятого у концентрації 0,66 мг/мл та 0,0166 мг/мл. Було показано, що внесення пептиду не знижувало початкову швидкість агрегації тромбоцитів та помірно впливало на ступінь агрегації, який становив  $55 \pm 5 \%$ ,  $38 \pm 7 \%$  та  $37 \pm 10 \%$  для агрегації тромбоцитів у контрольній пробі та за присутності 0,66 мг/мл та 0,0166 мг/мл пептиду відповідно (Рис. 5.12).

Однак, за присутності пептиду A $\alpha$ 414-610 спостерігали значну дезагрегацію трмбоцитів, яка прямо залежала від концентрації пептиду і досягала 35 % та 20 %. У контрольній пробі дезагрегації не спостерігали. Це може свідчити про недостатню міцність агрегатів тромбоцитів, утворених за присутності пептиду.

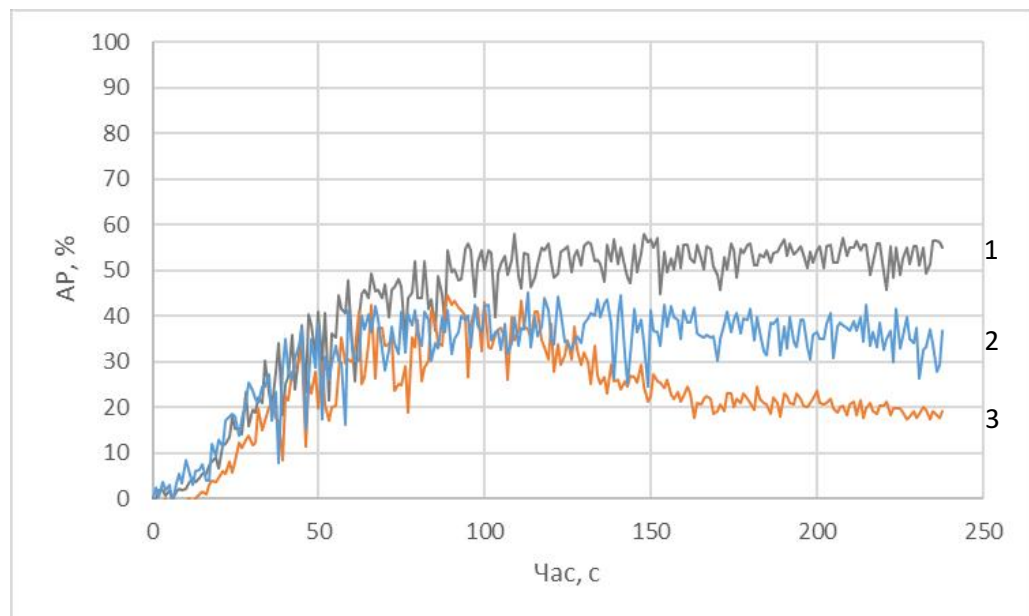


Рис. 5.12. Агрегація тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові за присутності пептиду A $\alpha$ 414-610 під дією ADP (12  $\mu$ M). 1 – контроль; 2 – проба з концентрацією пептиду A $\alpha$ 414-610 0,0166 мг/мл; 3 – проба з концентрацією пептиду A $\alpha$ 414-610 0,66 мг/мл. Дані типового експерименту, n = 5.

Як і у випадку з пептидом A $\alpha$ 414-610, за присутності моноклонального антитіла I-5В не спостерігали ефекту на швидкість агрегації тромбоцитів (Рис. 5.10).

Водночас, антитіло I-5B призводило до значної дезагрегації тромбоцитів. За концентрації антитіла 0,025 мг/мл тромбоцити дезагрегували в 2,5 рази, порівняно з максимальним ступенем агрегації. Ступінь агрегації тромбоцитів за присутності антитіла I-5B становив лише  $20 \pm 4$  % через 10 хв спостережень, тоді як у контролі значення було  $50 \pm 7$  % (рис. 5.13). Цікаво, що максимальний ступінь агрегації при цьому не знижувався.

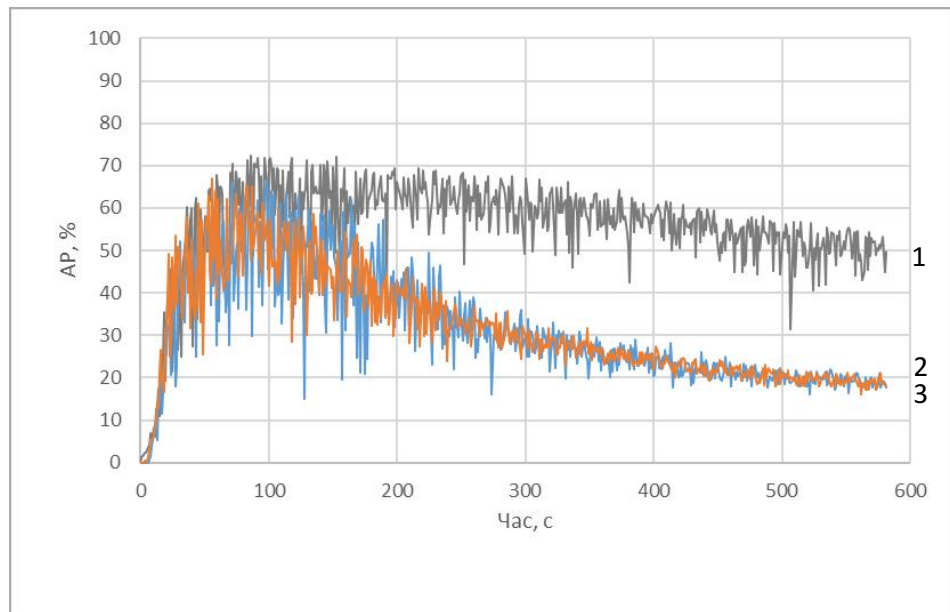


Рис. 5.13. Агрегація тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові за присутності антитіла I-5B (0,06 мг/мл) під дією ADP (12  $\mu$ M). 1 – контроль; 2 – проба з антитілом 0,025 мг; 3 – проба з антитілом 0,05 мг.

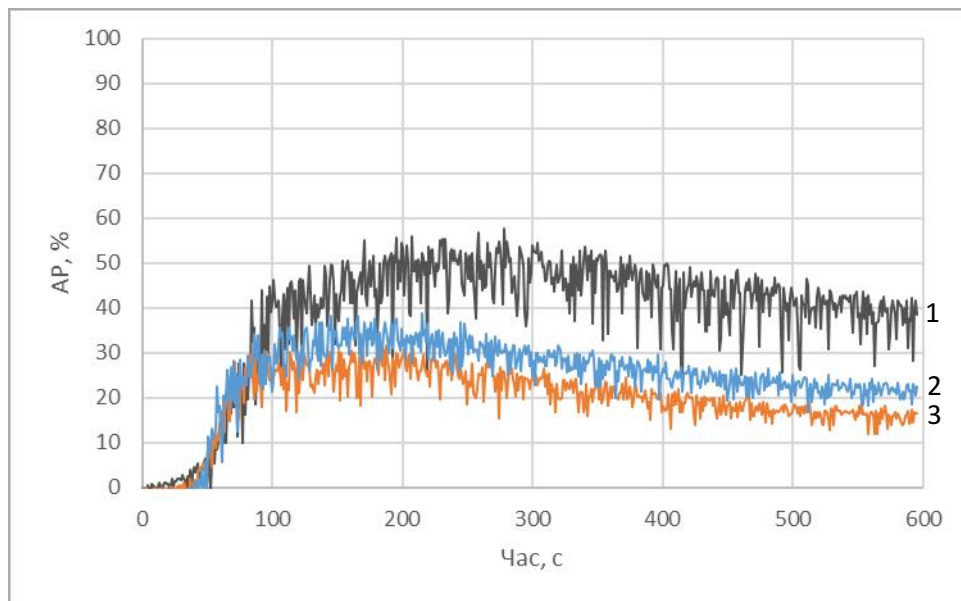


Рис. 5.14. Агрегація тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові за присутності антитіла I-5B (0,06 мг/мл) під дією колагену (10 мг/мл). 1 – контроль; 2 – проба з антитілом 0,025 мл; 3 – проба з антитілом 0,05 мл.

Для більш детального вивчення агрегації тромбоцитів за присутності антитіла I-5B застосували також колаген-індуковану агрегацію. Це дозволило виявити зниження ступеня агрегації за присутності антитіла I-5B, зокрема за концентрації антитіла 0,025 мг/мл ступінь агрегації складав  $35 \pm 3$  %, а за концентрації антитіла 0,05 мг/мл –  $27 \pm 5$  %. Ці значення були достовірно нижчими за максимальний ступінь агрегації у контрольній пробі –  $50 \pm 5$  % (рис. 5.14).

Таким чином, хоча  $\alpha$ C-регіон не є критичним для агрегації тромбоцитів, послідовності A $\alpha$ 414-610 залучені до формування фібриново-тромбоцитарного згустку. Зокрема, втрата згаданого фрагменту знижувала агрегаційну здатність тромбоцитів удвічі, а блокування протеїно-клітинних та протеїно-протеїнових міжмолекулярних зв'язків  $\alpha$ C-регіону пептидом чи моноклональним антитілом послаблювало контакти фібриногену з тромбоцитами, що виявлялося у помірному зниженні ступеня їх агрегації та у значній дезагрегації. Імовірно, це відбувається завдяки присутності у складі фрагменту A $\alpha$ 414-610 мотивів DGH, KGD та RGD, які виконують функцію додаткових центрів зв'язування для рецепторів тромбоцитів.

Відомо, що ключовим для агрегації тромбоцитів є С-кінцевий додекапептид  $\gamma$ -ланцюга молекули фібриногену, однак RGD та подібні до них мотиви також можуть зв'язуватися з тромбоцитарними рецепторами. Ці взаємодії можуть надавати фібриногеново-тромбоцитарним зв'язкам додаткової міцності, а також стимулювати outside-in сигналінг, скерований на посилення активації тромбоцитів та викид компонентів тромбоцитарних гранул, що також прискорює агрегацію.

Отже, застосування молекулярних ефекторів різної природи дозволило підтвердити участь доменної частини  $\alpha$ C-регіону в побудові фібриново-тромбоцитарного згустку – основи тромбу.

## РОЗДІЛ 6. Заключення

Вперше проведено комплексне дослідження функції окремих структурно-функціональних одиниць фібрин(огену) –  $\alpha$ C-регіону та B $\beta$ N-домену – з використанням молекулярних ефекторів, які відрізняються за принципом дії. Порівняння ефектів протеолітичного відщеплення, прямого блокування антитілами або ж конкуренції з пептидами за сайти взаємодій, дозволило зробити висновки щодо особливостей функціонування активних сайтів молекули, розміщених у межах  $\alpha$ C-регіону та B $\beta$ N-домену.

Реалізація запланованого дослідження передбачала суттєвий підготовчий етап, який полягав у отриманні протеїназ, здатних гідролізувати фібриноген, приготування зразків частково гідролізованих форм фібриногену, продукцію моноклональних антитіл, специфічних до чітко визначених епітопів на поверхні молекули фібриногену, а також отримання протеолітичних низькомолекулярних пептидів – похідних фібриногену.

Застосування отриманих молекулярних ефекторів у межах обраного нами підходу з використанням турбідиметрії, трансмісійної електронної мікроскопії та агрегатометрії дало змогу сформулювати такі висновки.

**1. Центр полімеризації «C», розташований у межах B $\beta$ N-домену, працює лише у комплексі з  $\alpha$ C-регіонами.** Показано, що відщеплення B $\beta$ N-домену призводить до повної втрати фібриногену здатності полімеризуватися під дією тромбіну. Схожий ефект виявлено і у випадку застосування моноклонального антитіла 2d2a, яке специфічно блокує послідовності B $\beta$ N-домену. Це свідчить про важливість для формування полімерного фібрину центру полімеризації «C», розміщеного в межах B $\beta$ N-домену.

Натомість, використання пептиду B $\beta$ 1-42 не мало суттєвого впливу на процес полімеризації фібрину. Тобто, блокування пептидом комплементарного до «C» центру полімеризації «с» виявилось неефективним.

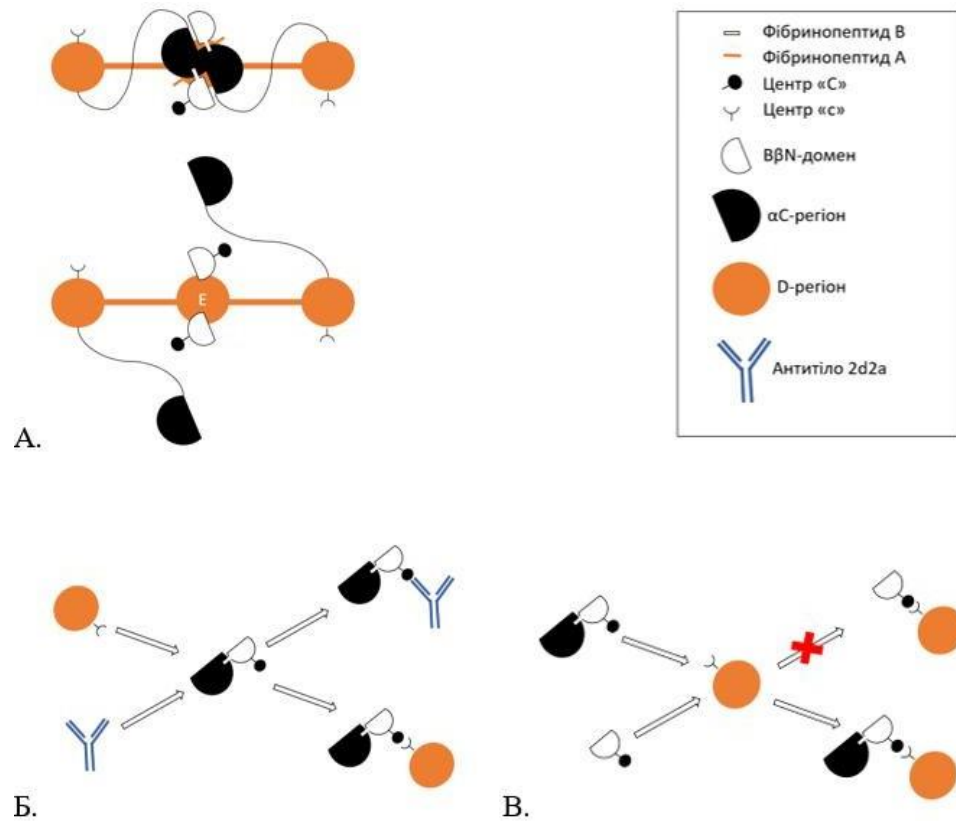


Рис. 6.1. Схематичне представлення конкуренції за взаємодії «С»:«с» між відповідними центрами полімеризації та моноклональним антитілом 2d2a або ж вільним пептидом Вβ1-42, що містить послідовність центру «С».

А. Молекула фібриногену, у якій αC-регіони розташовано біля E-регіону молекули, завдяки взаємодіям з фібринопептидами В; молекула фібрину, у якій αC-регіони знаходяться у розгорнутій конформації після відщеплення фібринопептидів, а ВβN-домен – вільний.

Б. Схематичне зображення взаємодії комплексу αC-регіонів та ВβN-домену, що містить центр «С», з D-регіоном молекули фібрину та формування «С»:«с» зв'язків; схематичне зображення взаємодії комплексу αC-регіонів та ВβN-домену з антитілом 2d2a, що перешкоджає «С»:«с» зв'язків.

В. Схематичне зображення взаємодії D-регіону молекули фібрину з комплексом αC-регіонів та ВβN-домену та формування «С»:«с» зв'язків; схематичне зображення відсутності взаємодії D-регіону молекули фібрину з вільним ВβN-доменом, що не здатне формувати «С»:«с» зв'язки.

Цей феномен можна пояснити тим, що центр полімеризації «С» у нативній молекулі фібриногену знаходиться у комплексі з  $\alpha$ С-регіоном. Моноклональне антитіло, зв'язуючись з центром «С», безпосередньо блокує його взаємодію з центром «с».

Натомість, пептид В $\beta$ 1-42, який містить у своєму складі послідовність центру «С», конкурує за зв'язування з центром «с» з центром «С», що перебуває у складі комплексу з  $\alpha$ С-регіоном. Тобто, спорідненість вільного центру «С» до центру «с» значно нижча, ніж така спорідненість центру «С» у комплексі з  $\alpha$ С-регіоном.

Отже, нами вперше отримано експериментальне підтвердження ключового значення комплексу  $\alpha$ С-регіону з В $\beta$ N-доменом у процесі полімеризації фібрину, зокрема у комплементарних взаємодіях центрів полімеризації «С»:«с» (Рис. 6.1).

**2.  $\alpha$ С-регіони виконують різні функції на різних стадіях полімеризації фібрину: під час побудови протофібрил та під час їх латеральної асоціації.** Застосування різних способів дії молекулярними ефекторами на  $\alpha$ С-регіони молекули фібрин(оген)у дозволило виявити цікаву особливість. Протеолітичне відщеплення субдоменів  $\alpha$ С-регіонів призводило до значного подовження lag-періоду полімеризації, що свідчить про гальмування процесу побудови протофібрил. Водночас, ефекту гальмування швидкості латеральної асоціації протофібрил, яку визначають за кутом нахилу турбідиметричної кривої на фазі експоненційного росту, виявлено не було.

Слід було б очікувати схожого ефекту якщо не пептидів А $\alpha$ 414-610 та А $\alpha$ 505-610, то принаймні антитіл I-5В та I-5А, які специфічні до епітопів у N-кінцевому та С-кінцевому субдоменах відповідно. Однак, як пептиди, так і антитіла не подовжували lag-період полімеризації фібрину – не впливали на процес побудови протофібрил, натомість пригнічували їхню латеральну асоціацію.

Такі результати дозволили зробити висновок про відмінність у залученні  $\alpha$ С-регіонів до полімеризації фібрину на різних її етапах (Рис. 6.2).

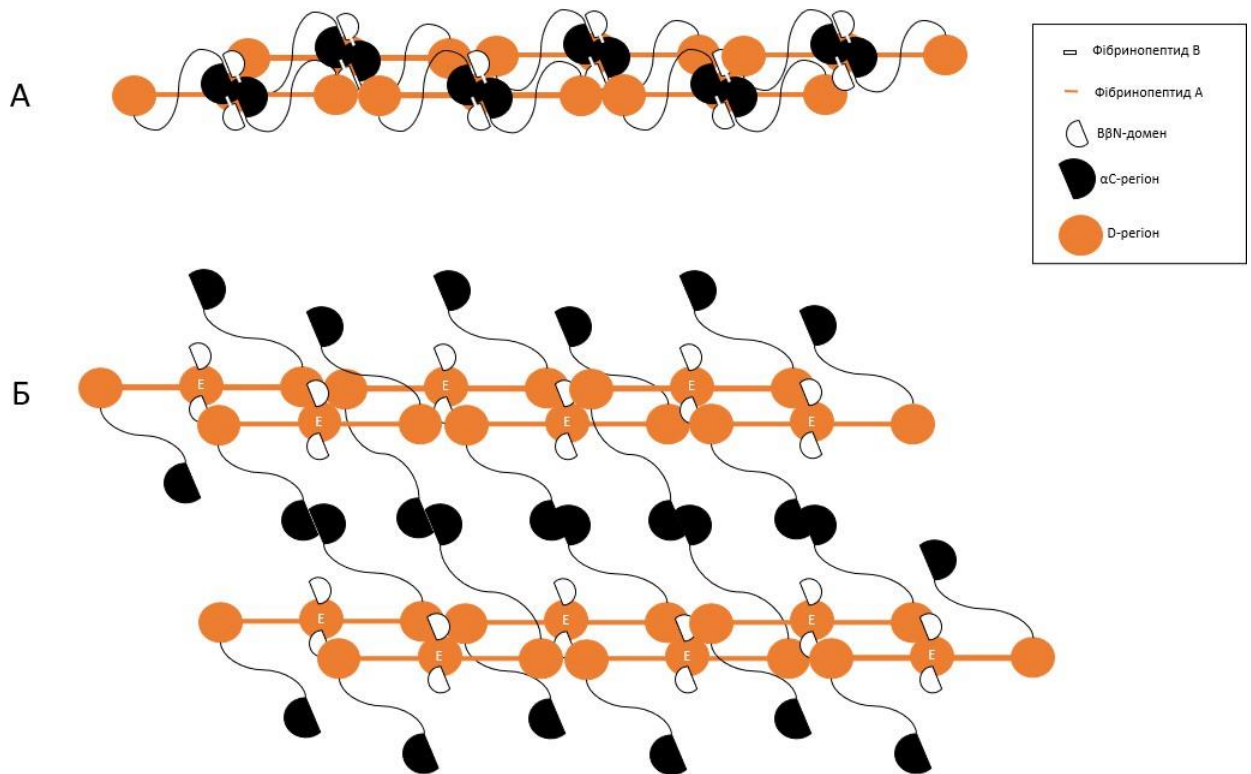


Рис. 6.2. Схематична презентація процесу побудови та латеральної асоціації протофібрил. А. Формування двониткової протофібрили фібрину desA завдяки взаємодіям центрів полімеризації «А»:«а» та «С»:«с». αC-регіони знаходяться у комплексі з ВβN-доменами завдяки взаємодії з фібринопептидами В. Б. Схематичне зображення початкової стадії латеральної асоціації протофібрил, яке здійснюється завдяки міжмолекулярним взаємодіям αC-регіонів.

Відомо, що на початку процесу фібриноутворення тромбін відщеплює від фібриногену фібринопептиди А з утворенням фібрину desA. Такий фібрин здатен полімеризуватися з формуванням протофібрил, а фібрили, утворені ним, дещо тонші за контрольні. На цій стадії полімеризації формування протофібрил здійснюють молекули фібрину desA, у якому αC-регіони перебувають у комплексі з ВβN-доменами.

Це дозволяє пояснити ефект уповільнення процесу побудови протофібрил за відщеплення αC-регіонів руйнуванням комплексу αC:ВβN. Також це пояснює і відсутність дії пептидів чи антитіл на стадію побудови протофібрил – зв'язування



антитіл чи пептидів з  $\alpha$ C-регіонами, поєднаними між собою та з  $B\beta$ N-доменами, не відбувається, або ж – воно не руйнує комплекс  $\alpha$ C: $B\beta$ N.

Натомість, на стадії латеральної асоціації більшість молекул фібрину в протофібрилах втрачають обидві пари фібринопептидів – А та В. Це призводить до дисоціації  $\alpha$ C-регіонів від остову молекули. На цій стадії  $\alpha$ C-регіони вже не потрібні для побудови протофібрил, але безпосередньо залучені до їхньої латеральної асоціації. Тому, внесення моноклональних антитіл або пептидів, які здатні взаємодіяти з  $\alpha$ C-регіонами, призводить до вповільнення цього процесу.

Таким чином, отримані нами експериментальні дані дозволяють запропонувати принципову схему участі  $\alpha$ C-регіонів фібрину в процесі полімеризації. Зокрема,  $\alpha$ C-регіони забезпечують побудову протофібрил, стабілізуючи центр полімеризації «С» у комплексі з  $B\beta$ N-доменом. А на стадії латеральної асоціації протофібрил,  $\alpha$ C-регіони імовірно забезпечують зближення сусідніх протофібрил, завдяки формуванню міжмолекулярних  $\alpha$ C: $\alpha$ C-взаємодій.

**3.  $\alpha$ C-регіони забезпечують додаткові можливості зближення тромбоцитів під час їх агрегації.** Відомо, що фібриноген є ключовим протеїном, який забезпечує агрегацію тромбоцитів. Саме молекула фібриногену формує своєрідні містки, поєднуючи інтегринові рецептори сусідніх тромбоцитів, забезпечуючи їх зближення та агрегацію. На поверхні молекули фібриногену існує низка сайтів зв'язування рецепторів тромбоцитів, однак, для ефективної агрегації достатньо лише двох – С-кінцевих  $\gamma$ -додекапептидів, розміщених на дистальних кінцях D-регіонів. Попри присутність у складі  $\alpha$ C-регіонів потенційних ділянок зв'язування  $IIb/IIIa$ -рецепторів тромбоцитів, їхня функція достеменно не відома.

Використання молекулярних ефекторів різного принципу дії, дозволило встановити основні факти, які дозволяють запропонувати механізм участі  $\alpha$ C-регіонів у формуванні фібриново-тромбоцитарного тромбу.

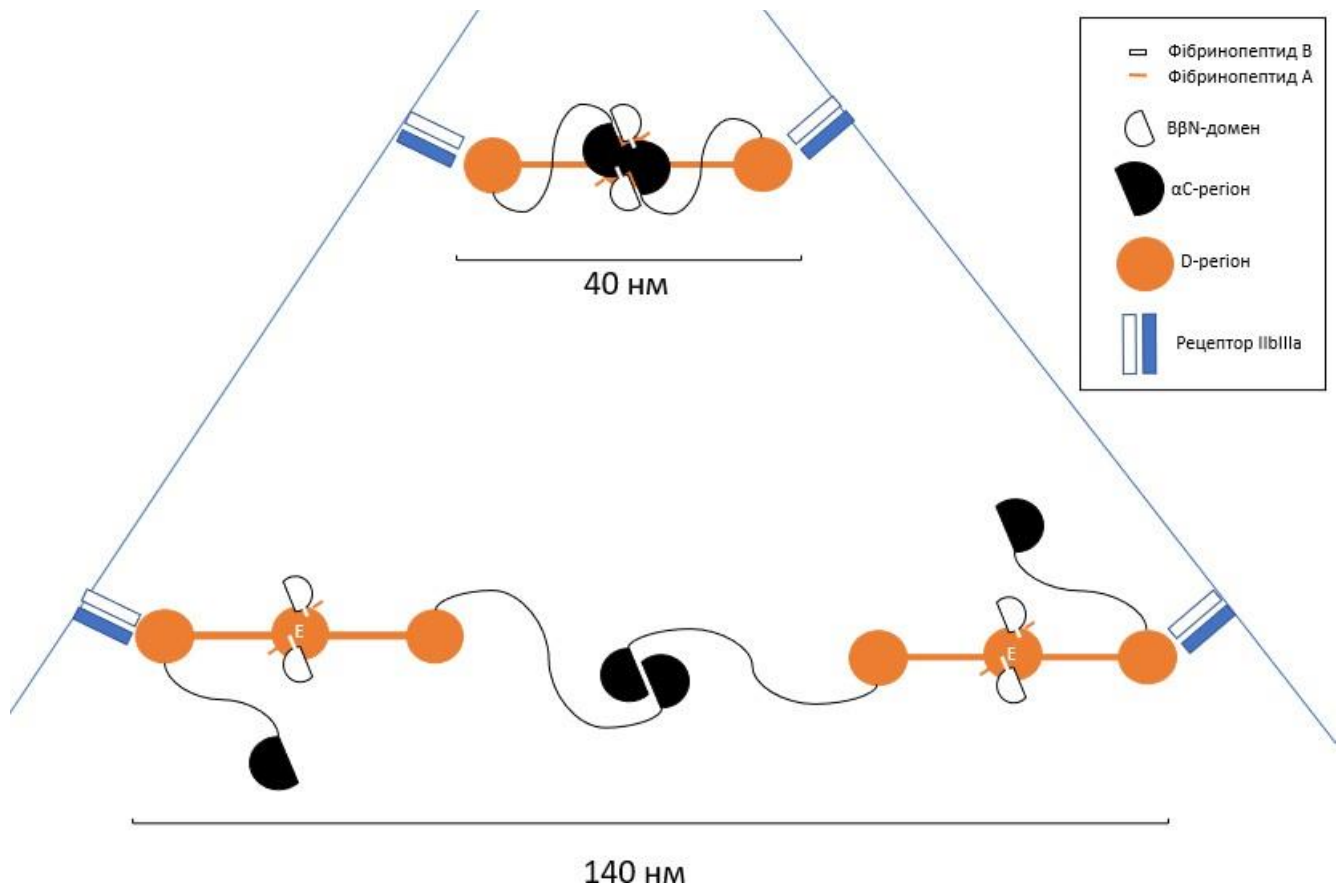


Рис. 6.3. Схематичне зображення опосередкованих взаємодій тромбоцитів, які здійснюються завдяки зв'язуванню С-кінцевих додекапептидів  $\gamma$ -ланцюга фібрин(оген)у та ІІbІІІa-рецепторів тромбоцитів, що формує своєрідні «фібриногенові місточки» між сусідніми клітинами. Дисоціація  $\alpha$ С-регіонів від остову молекули, яка настає одразу після відщеплення фібринопептидів, забезпечує додаткові міжмолекулярні взаємодії молекул фібрин(оген)у, які кратно збільшують протяжність «місточків» та збільшують імовірність реалізації взаємодій між тромбоцитами.

Втрата фібриногеном С-кінцевого субдомену  $\alpha$ С-регіонів знижує швидкість агрегації тромбоцитів, а блокування антитілами чи пептидами, хоча і не впливає на швидкість, знижує ступінь агрегації тромбоцитів та призводить до їхньої подальшої дезагрегації.

Натомість, втрата фібриногеном B $\beta$ N-домену не знижує швидкості та ступеню агрегації, але призводить до подальшої дезагрегації. Тобто, якщо  $\alpha$ C-регіони нативні, то агрегація тромбоцитів відбувається нормально аж до заключних стадій формування фібриново-тромбоцитарного тромбу.

Нами запропоновано схему, яка пояснює цей феномен (Рис. 6.3). Молекула фібриногену, взаємодіючи з IIb/IIIa-рецептором тромбоцитів, сполучає сусідні тромбоцити на відстані, яка дорівнює її довжині – до 40 нм. Поєднання сусідніх молекул фібриногену/мономерного фібрину шляхом міжмолекулярних взаємодій  $\alpha$ C: $\alpha$ C збільшує цю відстань втричі: довжина  $\alpha$ C-регіону з конекторною частиною складає 30 нм. Тому наявність у молекули фібрин(оген)у збільшує імовірність швидких контактів з тромбоцитами, а отже сприяє ефективній агрегації останніх.

## ВИСНОВКИ

У роботі вперше запропоновано дослідження структури та функцій комплексу  $\alpha$ C-регіону та  $V\beta$ N-домену з використанням молекулярних ефektorів, які відрізняються за принципом дії. Пряме порівняння ефектів протеолітичного відщеплення, прямого блокування антитілами або ж конкуренції з пептидами за сайти взаємодій дозволило зробити висновки щодо особливостей функціонування активних сайтів молекули, розміщених у межах  $\alpha$ C-регіону та  $V\beta$ N-домену.

1. Продемонстровано, що фібриноген, позбавлений  $V\beta$ N-домену, втрачає здатність до полімеризації, а антитіло, яке стерично блокує  $V\beta$ N-домен, є ефективним інгібітором цього процесу. Водночас, пептид  $V\beta$ 1-42 не виявив антиполімеризаційної дії.

2. Вперше показано, що центр полімеризації «C», розташований у межах  $V\beta$ N-домену, ефективно сприяє побудові протофібрил лише у комплексі з  $\alpha$ C-регіонами.

3. Виявлено суттєве подовження часу побудови протофібрил фібрину у випадку втрати фібриногеном C- та/або N-кінцевих субдоменів  $\alpha$ C-регіонів. Водночас, ані антитіла, специфічні до окремих субдоменів  $\alpha$ C-регіонів, ані пептиди, що імітують субдомени, не інгібували побудову протофібрил.

4. Підтверджено припущення, що  $\alpha$ C-регіони під час побудови протофібрил стабілізують сайти  $V\beta$ N-домену, а під час латеральної асоціації протофібрил – сприяють утворенню  $\alpha$ C: $\alpha$ C-взаємодій між сусідніми протофібрилами.

5. Виявлено зниження агрегаційної здатності тромбоцитів за втрати фібриногеном C- та/або N-кінцевих субдоменів  $\alpha$ C-регіонів, що імовірно пов'язано зі зниженням міцності фібриново-тромбоцитарного згустку.

6. Запропоновано концепцію участі  $\alpha$ C-регіонів у агрегації тромбоцитів, згідно з якою  $\alpha$ C-регіони забезпечують додаткові можливості зближення тромбоцитів під час їх агрегації завдяки сполученню молекул фібрину шляхом  $\alpha$ C: $\alpha$ C-взаємодій.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Chung D.W., Davie E.W. Gamma and gamma' chains of human fibrinogen are produced by alternative mRNA processing // *Biochemistry*. – 1984. – Vol. 23, No. 18. – P. 4232–4236. – DOI: 10.1021/bi00313a033.
2. Siebenlist K., Brennan S., Holyst T. та ін. The amino acid sequence in fibrin responsible for high affinity thrombin binding // *Thrombosis and Haemostasis*. – 2001. – Vol. 85, No. 3. – P. 470–474. – DOI: 10.1055/s-0037-1615607.
3. Weisel J. Fibrinogen and factor XIII // *The Biomedical & Life Sciences Collection*. – 2007. – No. 10. – DOI: 10.69645/irlk6555.
4. Nieuwenhuizen W., Medved L. Molecular mechanisms of initiation of fibrinolysis by fibrin // *Thrombosis and Haemostasis*. – 2003. – Vol. 89, No. 3. – P. 409–419. – DOI: 10.1055/s-0037-1613368.
5. Weisel J.W., Medved L. The structure and function of the  $\alpha$ C domains of fibrinogen // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2001. – Vol. 936, No. 1. – P. 312–327. – DOI: 10.1111/j.1749-6632.2001.tb03517.x.
6. Blombäck B., Hessel B., Hogg D., Therkildsen L. A two-step fibrinogen–fibrin transition in blood coagulation // *Nature*. – 1978. – Vol. 275, No. 5680. – P. 501–505. – DOI: 10.1038/275501a0.
7. Shainoff J.R., Dardik B.N. Fibrinopeptide B in fibrin assembly and metabolism: Physiologic significance in delayed release of the peptide // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 1983. – Vol. 408. – P. 254–268. – DOI: 10.1111/j.1749-6632.1983.tb23249.x.
8. Laudano A.P., Doolittle R.F. Studies on synthetic peptides that bind to fibrinogen and prevent fibrin polymerization // *Biochemistry*. – 1980. – Vol. 19, No. 5. – P. 1013–1019. – DOI: 10.1021/bi00546a028.
9. Siebenlist K.R., DiOrio J.P., Budzynski A.Z., Mosesson M.W. The polymerization and thrombin-binding properties of DES-(B $\beta$ 1-42)-fibrin // *Journal of Biological Chemistry*. – 1990. – Vol. 265, No. 30. – P. 18650–18655. – DOI: 10.1016/s0021-9258(17)44801-0.

10. Everse S.J., Spraggon G., Veerapandian L. та ін. Crystal structure of fragment double-D from human fibrin with two different bound ligands // Protein Data Bank. – 1998. – DOI: 10.2210/pdb1fzc/pdb.
11. Medved L., Gorkun O.V., Owen S.F. та ін. Electron microscopy of fibrinogen molecules // Thrombosis and Haemostasis. – 1990. – Vol. 63, No. 3. – P. 396–400. – DOI: 10.1055/s-0038-1645563.
12. Doolittle R.F. Fibrinogen and fibrin // Annual Review of Biochemistry. – 1984. – Vol. 53. – P. 195–229. – DOI: 10.1146/annurev.bi.53.070184.001211.
13. Weisel J.W. The mechanical properties of fibrin for basic scientists and clinicians // Biophysical Chemistry. – 2004. – Vol. 112, No. 2–3. – P. 267–276. – DOI: 10.1016/j.bpc.2004.07.029.
14. Gorkun O.V., Henschen-Edman A.H., Ping L.F., Lord S.T. Analysis of A $\alpha$ 251 fibrinogen: The  $\alpha$ C region is not essential for fibrin polymerization // Thrombosis and Haemostasis. – 1998. – Vol. 79, No. 5. – P. 959–962. – DOI: 10.1055/s-0037-1615367.
15. Lord S.T. Fibrinogen and fibrin: scaffold proteins in hemostasis // Current Opinion in Hematology. – 2007. – Vol. 14, No. 3. – P. 236–241. – DOI: 10.1097/MOH.0b013e3280dce3c4.
16. Veklich Y.I., Gorkun O.V., Medved L.V., Weisel J.W. Carboxyl-terminal portions of the  $\alpha$  chains of fibrinogen and fibrin // Biochemistry. – 1993. – Vol. 32, No. 40. – P. 10071–10076. – DOI: 10.1021/bi00089a012.
17. Veklich Y.I., Collet J.P., Bodnar T. та ін. In vitro and in vivo analyses of fibrin clot structure and function using advanced imaging and mechanical testing // Blood. – 2015. – Vol. 126, No. 7. – P. 870–876. – DOI: 10.1182/blood-2015-01-624007.
18. Litvinov R.I., Weisel J.W. Fibrin mechanical properties and their structural origins // Matrix Biology. – 2017. – Vol. 60–61. – P. 110–123. – DOI: 10.1016/j.matbio.2016.08.006.
19. Collet J.P., Shuman H., Ledger R.E., Lee S., Weisel J.W. The elasticity of an individual fibrin fiber in a clot // Proceedings of the National Academy of Sciences

- of the USA. – 2005. – Vol. 102, No. 26. – P. 9133–9137. – DOI: 10.1073/pnas.0500972102.
20. Protopopova A.D., Barinov N.A., Zavyalova E.G. та ін. Visualization of fibrinogen  $\alpha$ C regions and their arrangement during fibrin network formation by high-resolution AFM // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2015. – Vol. 13, No. 4. – P. 570–579. – DOI: 10.1111/jth.12853.
21. Gorkun O.V., Henschen-Edman A.H., Ping L.F., Lord S.T. Fibrinogen fragment X: conformational changes detected by monoclonal antibodies // *Biochemistry*. – 1997. – Vol. 36, No. 21. – P. 6388–6396. – DOI: 10.1021/bi963057i.
22. Veklich Y.I., Gorkun O.V., Medved L.V., Nieuwenhuizen W., Weisel J.W. Carboxyl-terminal portions of the  $\alpha$  chains of fibrinogen and fibrin // *Biochemistry*. – 1993. – Vol. 32, No. 40. – P. 10071–10076. – DOI: 10.1021/bi00089a012.
23. Hethershaw E.L., La Corte A.L.C., Duval C. та ін. The effect of blood coagulation factor XIII on fibrin clot structure and fibrinolysis // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2014. – Vol. 12, No. 2. – P. 197–205. – DOI: 10.1111/jth.12459.
24. Tsurupa G., Hantgan R.R., Burton R.A. та ін. Structure, stability, and interaction of fibrin(ogen)  $\alpha$ C-domains // *Biochemistry*. – 2009. – Vol. 48, No. 50. – P. 12191–12201. – DOI: 10.1021/bi9016849.
25. Tsurupa G., Hantgan R.R., Lord S.T., Medved L. The C-terminal portion of the fibrinogen  $\alpha$  chain contains the binding sites for fibrin polymer, plasminogen, and tissue-type plasminogen activator // *Journal of Biological Chemistry*. – 2005. – Vol. 280, No. 39. – P. 39102–39109. – DOI: 10.1074/jbc.M506567200.
26. Protopopova A.D., Lukin A.V., Polyakova D.S. та ін. Visualization of fibrinogen  $\alpha$ C regions and their arrangement during fibrin network formation by high-resolution AFM // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2015. – Vol. 13, No. 1. – P. 570–579. – DOI: 10.1111/jth.12853.
27. Weisel J.W. Fibrinogen and fibrin // *Advances in Protein Chemistry*. – 2005. – Vol. 70. – P. 247–299. – DOI: 10.1016/S0065-3233(05)70008-5.

28. Weisel J.W., Litvinov R.I. Fibrin formation, structure and properties // *Subcellular Biochemistry*. – 2017. – Vol. 82. – P. 405–456. – DOI: 10.1007/978-3-319-49674-0\_13.
29. Weisel J.W. Structure of fibrin: impact on clot stability // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2007. – Vol. 5, Suppl. 1. – P. 116–124. – DOI: 10.1111/j.1538-7836.2007.02477.x.
30. Weisel J.W., Litvinov R.I. The biochemical and physical process of fibrinolysis and effects of clot structure and stability on the lysis rate // *Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry*. – 2008. – Vol. 6, No. 3. – P. 161–180. – DOI: 10.2174/187152508785909849.
31. Collet J.P., Allali Y., Lesty C. та ін. Altered fibrin architecture is associated with hypofibrinolysis and premature coronary atherothrombosis // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. – 2006. – Vol. 26, No. 11. – P. 2567–2573. – DOI: 10.1161/01.ATV.0000245795.95735.10.
32. Gorkun O.V., Medved L.V., Owen S.F., Galanakis D.K., Lord S.T. Role of the  $\alpha$ C domains of fibrin in clot formation // *Biochemistry*. – 1994. – Vol. 33, No. 12. – P. 3645–3653. – DOI: 10.1021/bi00177a021.
33. Medved L., Tsurupa G., Yakovlev S., Kononova S., Purohit P. Fibrinogen  $\alpha$ C domains in fibrin polymerization and thrombosis // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2008. – Vol. 614. – P. 121–133. – DOI: 10.1007/978-0-387-74911-2\_11.
34. Weisel J.W., Litvinov R.I. Fibrin formation, structure and properties // *Subcellular Biochemistry*. – 2017. – Vol. 82. – P. 405–456. – DOI: 10.1007/978-3-319-49674-0\_13.
35. Litvinov R.I., Weisel J.W. What is the biological and clinical relevance of fibrin? // *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. – 2016. – Vol. 42, No. 4. – P. 333–343. – DOI: 10.1055/s-0036-1572320.
36. Gorkun O.V., Tsurupa G., Hantgan R.R., Lord S.T., Medved L. Structural basis for  $\alpha$ C-region polymerization of fibrin // *Biochemistry*. – 2002. – Vol. 41, No. 17. – P. 5529–5536. – DOI: 10.1021/bi015871z.



37. Wasser M.N., Welling M., Lamers G., Pauwels E.K., Nieuwenhuizen W. Effects of an antifibrin monoclonal antibody and fragments thereof on some properties of fibrin // *Thrombosis and Haemostasis*. – 1990. – Vol. 63, No. 1. – P. 39–43. – DOI: 10.1055/s-0038-1645683.
38. Lugovska N.E., Kolesnikova I.M., Stohnii Ye.M., Chernyshenko V.O., Rebriev A.V., Kostiuchenko O.P. та ін. Novel monoclonal antibody to fibrin(ogen)  $\alpha$ C-region for detection of the earliest forms of soluble fibrin // *The Ukrainian Biochemical Journal*. – 2020. – Vol. 92, No. 3. – P. 58–70. – DOI: 10.15407/ubj92.03.058.
39. Koo J., Rafailovich M.H., Medved L., Tsurupa G., Kudryk B.J., Liu Y. та ін. Evaluation of fibrinogen self-assembly: role of its  $\alpha$ C region // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2010. – Vol. 8, No. 12. – P. 2727–2735. – DOI: 10.1111/j.1538-7836.2010.04072.x.
40. Hui K.Y., Haber E., Matsueda G.R. Monoclonal antibodies to a synthetic fibrin-like peptide bind to human fibrin but not fibrinogen // *Science*. – 1983. – Vol. 222, No. 4628. – P. 1129–1132. – DOI: 10.1126/science.6648524.
41. Cierniewski C.S., Poniatowski J. The effect of anti-beta 43–47 Fab fragments on expression of the polymerization sites in the E domain of fibrinogen // *Acta Biochimica Polonica*. – 1990. – Vol. 37, No. 1. – P. 31–37. – PMID: 2087914.
42. Fuchigami H., Matsumura Y. Characterization of antibody clones that bind exclusively to insoluble fibrin // *Blood Coagulation and Fibrinolysis*. – 2022. – Nov 23. – DOI: 10.1097/mbc.0000000000001171.
43. Koppert P., Koopman J., Haverkate F., Nieuwenhuizen W. Production and characterization of a monoclonal antibody reactive with a specific neoantigenic determinant in degradation products of fibrin and fibrinogen // *Blood*. – 1986. – Vol. 68, No. 2. – P. 437–441. – DOI: 10.1182/blood.v68.2.437.bloodjournal682437.
44. Lugovskoy E.V., Gritsenko P.G., Kolesnikova I.N., Zolotarova E.N., Chernishov V.I., Nieuwenhuizen W. та ін. Two monoclonal antibodies to D-dimer-specific

- inhibitors of fibrin polymerization // *Thrombosis Research*. – 2004. – Vol. 113, No. 3–4. – P. 251–259. – DOI: 10.1016/j.thromres.2004.03.005.
45. Yakovlev S., Makogonenko E., Kurochkina N., Nieuwenhuizen W., Ingham K., Medved L. Conversion of fibrinogen to fibrin: mechanism of exposure of TPA- and plasminogen-binding sites // *Biochemistry*. – 2000. – Vol. 39, No. 51. – P. 15730–15741. – DOI: 10.1021/bi001847a.
46. Mohri H., Tanabe J., Fujita H., Kanamori H., Ohkubo T. Anti-fibrinogen antibody mediates fibrinogen binding to platelet membrane glycoprotein IIb–IIIa // *British Journal of Haematology*. – 1993. – Vol. 85, No. 2. – P. 341–347. – DOI: 10.1111/j.1365-2141.1993.tb03176.x.
47. Sanvictores T. Biochemistry, primary protein structure [Электронный ресурс]. – U.S. National Library of Medicine, 2022. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564343/>
48. Leitner A. Faculty opinions recommendation of discovering cellular protein-protein interactions: technological strategies and opportunities // *Faculty Opinions*. – 2019. – Nov 1. – DOI: 10.3410/f.733534852.793566788.
49. Savinov A., Fernandez A., Fields S. Mapping functional regions of essential bacterial proteins with dominant-negative protein fragments // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2022. – Vol. 119, No. 26. – DOI: 10.1073/pnas.2200124119.
50. Bennett J.S. Platelet-fibrinogen interactions [Электронный ресурс]. – U.S. National Library of Medicine, 2001. – Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11460491>
51. Martino M.M., Briquez P.S., Ranga A., Lutolf M.P., Hubbell J.A. Heparin-binding domain of fibrin(ogen) binds growth factors and promotes tissue repair when incorporated within a synthetic matrix // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2013. – Vol. 110, No. 12. – P. 4563–4568. – DOI: 10.1073/pnas.1221602110.

52. Mihalyi E. Review of some unusual effects of calcium binding to fibrinogen // *Biophysical Chemistry*. – 2004. – Vol. 112, No. 2–3. – P. 131–140. – DOI: 10.1016/j.bpc.2004.07.012.
53. Lominadze D., Dean W.L. Involvement of fibrinogen specific binding in erythrocyte aggregation // *FEBS Letters*. – 2002. – Vol. 517, No. 1–3. – P. 41–44. – DOI: 10.1016/s0014-5793(02)02575-9.
54. Patibandla P.K., Tyagi N., Dean W.L. та ін. Fibrinogen induces alterations of endothelial cell tight junction proteins // *Journal of Cellular Physiology*. – 2009. – Vol. 221, No. 1. – P. 195–203. – DOI: 10.1002/jcp.21845.
55. Zafar H., Shang Y., Li J. та ін. AIIb $\beta$ 3 binding to a fibrinogen fragment lacking the  $\gamma$ -chain dodecapeptide is activation dependent and EDTA inducible // *Blood Advances*. – 2017. – Vol. 1, No. 7. – P. 417–428. – DOI: 10.1182/bloodadvances.2017004689.
56. Stohnii Ye.M. Limited proteolysis of fibrinogen by protease of Gloydius halys halys snake venom // *Biotechnologia Acta*. – 2021. – Vol. 14, No. 6. – P. 37–43. – DOI: 10.15407/biotech14.06.037.
57. Doolittle R.F., Pandi L. Probing the  $\beta$ -chain hole of fibrinogen with synthetic peptides that differ at their amino termini // *Biochemistry*. – 2007. – Vol. 46, No. 35. – P. 10033–10038. – DOI: 10.1021/bi7010916.
58. Laudano A.P., Doolittle R.F. Synthetic peptide derivatives that bind to fibrinogen and prevent the polymerization of fibrin monomers // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1978. – Vol. 75, No. 7. – P. 3085–3089. – DOI: 10.1073/pnas.75.7.3085.
59. How is GLP-1 produced? [Електронний ресурс]. – BloomTechz. – Режим доступу: <https://ua.bloomtechz.com/info/how-is-glp-1-produced-83294195.html>
60. Homandberg G.A., Wai T. Insertion of fibrin peptides into urokinase enhances fibrin affinity // *Thrombosis Research*. – 1990. – Vol. 58, No. 4. – P. 403–412. – DOI: 10.1016/0049-3848(90)90211-t.

61. Zhmurov A., Protopopova A.D., Litvinov R.I. та ін. Structural basis of interfacial flexibility in fibrin oligomers // *Structure*. – 2016. – Vol. 24, No. 11. – P. 1907–1917. – DOI: 10.1016/j.str.2016.08.009.
62. Lugovskoy E.V., Gritsenko P.G., Kapustianenko L.G., Kolesnikova I.N., Chernishov V.I., Komisarenko S.V. Functional role of B $\beta$ -chain N-terminal fragment in the fibrin polymerization process // *FEBS Journal*. – 2007. – Vol. 274. – P. 4540–4549.
63. Watson J.W., Doolittle R.F. Peptide-derivatized albumins that inhibit fibrin polymerization // *Biochemistry*. – 2011. – Vol. 50, No. 45. – P. 9923–9927. – DOI: 10.1021/bi201406c.
64. Szasz R., Dale G.L. Thrombospondin and fibrinogen bind serotonin-derivatized proteins on COAT-platelets // *Blood*. – 2002. – Vol. 100, No. 8. – P. 2827–2831. – DOI: 10.1182/blood-2002-02-0354.
65. Fibrin interaction article [Електронний ресурс]. – ScienceDirect. – Режим доступу: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925819399788>
66. Dobson J.V., Greenberg C.S. Gly-Pro-Arg-Pro modifies the glutamine residues in the alpha- and gamma-chains of fibrinogen // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 1986. – Vol. 872, No. 3. – P. 261–268. – DOI: 10.1016/0167-4838(86)90279-7.
67. Комісаренко С.В., Чернищенко В.О., Макогоненко Є.М. та ін. Спосіб інгібування полімеризації фібрину синтетичними пептидами... – Пат. № 143853. – Заявка № u202002124. – Опубл. 29.12.2020.
68. Basani R.B., D'Andrea G., Mitra N. та ін. RGD-containing peptides inhibit fibrinogen binding to platelet  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 by inducing an allosteric change // *Journal of Biological Chemistry*. – 2001. – Vol. 276, No. 17. – P. 13975–13981. – DOI: 10.1074/jbc.M011511200.
69. Taylor D.B., Gartner T.K. A peptide corresponding to GPIIb  $\alpha$ 300–312 inhibits the adhesion of platelets to adhesive ligands // *Journal of Biological Chemistry*. – 1992. – Vol. 267, No. 17. – P. 11729–11733. – PMID: 1376310.
70. Almeida G.O., de Oliveira I.S., Arantes E.C., Sampaio S.V. Snake venom disintegrins update: insights about new findings // *J. Venom Anim. Toxins Incl.*

- Trop. Dis. – 2023. – Vol. 29. – Article e20230039. – DOI: 10.1590/1678-9199-JVATITD-2023-0039.
71. Ugarova T.P., Kalikhevich V.N., Ardemasova Z.A., Belitser V.A. The role of complementary E2 and D2 centers in the reaction between fibrin and fibrinogen // *Biokhimiia*. – 1987. – Vol. 52, No. 2. – P. 255–263. – Russian. – PMID: 3567249.
  72. Kostelansky M.S., Betts L., Gorkun O.V., Lord S.T. 2.8 A crystal structures of recombinant fibrinogen fragment D with and without two peptide ligands: GHRP binding to the "b" site disrupts its nearby calcium-binding site // *Biochemistry*. – 2002. – Vol. 41, No. 40. – P. 12124–12132. – DOI: 10.1021/bi0261894. – PMID: 12356313.
  73. Yakovlev S., Gao Y., Cao C., Chen L., Strickland D.K., Zhang L., Medved L. Interaction of fibrin with VE-cadherin and anti-inflammatory effect of fibrin-derived fragments // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2011. – Vol. 9, No. 9. – P. 1847–1855. – DOI: 10.1111/j.1538-7836.2011.04438.x. – PMID: 21752185.
  74. Yakovlev S., Cao C., Galisteo R., Zhang L., Strickland D.K., Medved L. Fibrin-VLDL receptor-dependent pathway promotes leukocyte transmigration by inhibiting Src kinase Fyn and is a target for fibrin  $\beta$ 15–42 peptide // *Thrombosis and Haemostasis*. – 2019. – Vol. 119, No. 11. – P. 1816–1826. – DOI: 10.1055/s-0039-1695008.
  75. Yakovlev S., Medved L. Dual functions of the fibrin  $\beta$ N-domains in the VLDL receptor-dependent pathway of transendothelial migration of leukocytes // *Thrombosis Research*. – 2022. – Vol. 214. – P. 1–7. – DOI: 10.1016/j.thromres.2022.04.002.
  76. Lugovskoy E.V., Kolesnikova I.N., Gritsenko P.G. та ін. A neoantigenic determinant in the D-dimer fragment of fibrin // *Thrombosis Research*. – 2002. – Vol. 107, No. 3–4. – P. 151–156. – DOI: 10.1016/S0049-3848(02)00204-9.
  77. Podolnikova N.P., Yakubenko V.P., Volkov G.L., Plow E.F., Ugarova T.P. Identification of a novel binding site for platelet integrins  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 and  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 in the

- $\gamma$ C-domain of fibrinogen // *Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – Vol. 278, No. 34. – P. 32251–32258. – DOI: 10.1074/jbc.M300410200.
78. Rand M.L. та ін. The fibrinogen gamma chain dodecapeptide inhibits agonist-induced aggregation of rabbit platelets and fibrinogen binding to rabbit glycoprotein IIb–IIIa // *Thrombosis and Haemostasis*. – 1999. – Vol. 82, No. 6. – P. 1680–1686. – PMID: 10613655.
79. Bennett J.S. Platelet-fibrinogen interactions // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2001. – Vol. 936. – P. 340–354. – DOI: 10.1111/j.1749-6632.2001.tb03521.x.
80. Standeven K.F. та ін. Functional analysis of fibrin  $\gamma$ -chain cross-linking by activated factor XIII: determination of a cross-linking pattern that maximizes clot stiffness // *Blood*. – 2007. – Vol. 110, No. 3. – P. 902–907. – DOI: 10.1182/blood-2007-01-066837.
81. Achyuthan K.E., Dobson J.V., Greenberg C.S. Gly-Pro-Arg-Pro modifies the glutamine residues in the alpha- and gamma-chains of fibrinogen: inhibition of transglutaminase cross-linking // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 1986. – Vol. 872, No. 3. – P. 261–268. – DOI: 10.1016/0167-4838(86)90279-7.
82. Bacon-Baguley T., Ogilvie M.L., Gartner T.K., Walz D.A. Thrombospondin binding to specific sequences within the A $\alpha$ - and B $\beta$ -chains of fibrinogen // *Journal of Biological Chemistry*. – 1990. – Vol. 265, No. 4. – P. 2317–2323. – PMID: 2298752.
83. Pozniak T.A., Urvant L.P., Gritsenko P.G., Chernishov V.I., Pydiura N.A. The inhibition of fibrin polymerization by the synthetic peptides corresponding to A $\alpha$ 195–205 and  $\gamma$ 69–77 sites of fibrin molecule // *Ukrainian Biochemical Journal*. – 2014. – Vol. 86, No. 4. – P. 119–125.
84. Weisel J.W., Nagaswami C., Vilaire G., Bennett J.S. Examination of the platelet membrane glycoprotein IIb–IIIa complex and its interaction with fibrinogen and other ligands by electron microscopy // *Journal of Biological Chemistry*. – 1992. – Vol. 267, No. 23. – P. 16637–16643. – PMID: 1644841.

85. Bale M.D., Müller M.F., Ferry J.D. Effects of fibrinogen-binding tetrapeptides on mechanical properties of fine fibrin clots // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. – 1985. – Vol. 82, No. 5. – P. 1410–1413. – DOI: 10.1073/pnas.82.5.1410.
86. Yakovlev S. та ін. Interaction of fibrin with VE-cadherin and anti-inflammatory effect of fibrin-derived fragments // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2011. – Vol. 9, No. 9. – P. 1847–1855. – DOI: 10.1111/j.1538-7836.2011.04438.x.
87. Lugovskoy E.V., Gritsenko P.G., Kapustianenko L.G. та ін. Functional role of B $\beta$ -chain N-terminal fragment in the fibrin polymerization process // *FEBS Journal*. – 2007. – Vol. 274, No. 17. – P. 4540–4549. – DOI: 10.1111/j.1742-4658.2007.05983.x.
88. Interaction of fibrinogen with cell systems [Електронний ресурс]. – ScienceDirect. – Режим доступу: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1538783622102631>
89. Lishko V.K. та ін. Multiple binding sites in fibrinogen for integrin  $\alpha$ M $\beta$ 2 (Mac-1) // *Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – Vol. 279, No. 43. – P. 44897–44906. – DOI: 10.1074/jbc.m408012200.
90. Kloczewiak M. та ін. Platelet receptor recognition site on human fibrinogen: synthesis and structure-function relationship of peptides corresponding to the C-terminal segment of the  $\gamma$ -chain // *Biochemistry*. – 1984. – Vol. 23, No. 8. – P. 1767–1774. – DOI: 10.1021/bi00303a028.
91. López-Otín C., Bond J.S. Proteases: multifunctional enzymes in life and disease // *Journal of Biological Chemistry*. – 2008. – Vol. 283, No. 45. – P. 30433–30437. – DOI: 10.1074/jbc.R800035200.
92. Proteolytic enzyme [Електронний ресурс] // *Encyclopedia Britannica*. – 2023. – Режим доступу: <https://www.britannica.com/science/proteolytic-enzyme>
93. Schechter I., Berger A. On the size of the active site in proteases. I. Papain // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 1967. – Vol. 27, No. 2. – P. 157–162.

94. Tyndall J.D., Nall T., Fairlie D.P. Proteases universally recognize beta strands in their active sites // *Chemical Reviews*. – 2005. – Vol. 105, No. 3. – P. 973–999.
95. Hedstrom L. Serine protease mechanism and specificity // *Chemical Reviews*. – 2002. – Vol. 102, No. 12. – P. 4501–4524.
96. Fontana A. та ін. Correlation between sites of limited proteolysis and segmental mobility in thermolysin // *Biochemistry*. – 1986. – Vol. 25, No. 8. – P. 1847–1851.
97. Fontana A. та ін. Probing protein structure by limited proteolysis // *Acta Biochimica Polonica*. – 2004. – Vol. 51, No. 2. – P. 299–321.
98. Hubbard S.J., Beynon R.J., Thornton J.M. Assessment of conformational parameters as predictors of limited proteolytic sites in native protein structures // *Protein Engineering*. – 1998. – Vol. 11, No. 5. – P. 349–359.
99. Carey J. A systematic and general proteolytic method for defining structural and functional domains of proteins // *Methods in Enzymology*. – 2000. – Vol. 328. – P. 499–514.
100. Carey J. A systematic and general proteolytic method for defining structural and functional domains of proteins // *Methods in Enzymology*. – 2000. – Vol. 328. – P. 499–514.
101. Gao X. та ін. High-throughput limited proteolysis/mass spectrometry for protein domain elucidation // *Structural and Functional Genomics*. – 2005. – Vol. 6, No. 2–3. – P. 129–134.
102. Tsai C.-J. та ін. Comparison of protein fragments identified by limited proteolysis and by computational cutting of proteins // *Protein Science*. – 2002. – Vol. 11. – P. 1753–1770.
103. Zappacosta F. та ін. Probing the tertiary structure of proteins by limited proteolysis and mass spectrometry: the case of minibody // *Protein Science*. – 1996. – Vol. 5. – P. 802–813.
104. Castro H.C. та ін. Snake venom thrombin-like enzymes: from reptilase to now // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2004. – Vol. 61, No. 7–8. – P. 843–856. – DOI: 10.1007/s00018-003-3325-z.



105. Wei Q., Jin Y., Lu Q.M., Wei J.F., Wang W.Y., Xiong Y.L. Purification and characterization of alpha-mucrofibrase, a novel serine protease with alpha-fibrinogenase activity from the venom of Chinese Habu (*Trimeresurus mucrosquamatus*) // *J. Nat. Toxins*. – 2002. – Vol. 11, No. 4. – P. 337–343. – PMID: 12503877.
106. Thakur S., Yasmin R., Malhotra A. та ін. Isolation and functional characterization of erythrofibrase: an alfa-fibrinogenase enzyme from *Trimeresurus erythrurus* venom of North-East India // *Toxins*. – 2024. – Vol. 16. – Article 201. – DOI: 10.3390/toxins16040201.
107. Swenson S., Toombs C.F., Pena L. та ін.  $\alpha$ -Fibrinogenases // *Curr. Drug Targets Cardiovasc. Hematol. Disord.* – 2004. – Vol. 4, No. 4. – P. 417–435.
108. Muanpasitporn C., Rojnuckarin P. Expression and characterization of a recombinant fibrinogenolytic serine protease from green pit viper (*Trimeresurus albolabris*) venom // *Toxicon*. – 2007. – Vol. 49, No. 8. – P. 1083–1089. – DOI: 10.1016/j.toxicon.2007.01.015.
109. Evans H.J. Purification and properties of a fibrinogenase from the venom of *Naja nigricollis* // *Biochim. Biophys. Acta*. – 1984. – Vol. 802, No. 1. – P. 49–54. – DOI: 10.1016/0304-4165(84)90032-1.
110. Evans H.J. Cleavage of the A alpha-chain of fibrinogen and the alpha-polymer of fibrin by the venom of spitting cobra (*Naja nigricollis*) // *Biochim. Biophys. Acta*. – 1981. – Vol. 660, No. 2. – P. 219–226. – DOI: 10.1016/0005-2744(81)90163-7.
111. Randolph A., Chamberlain S.H., Chu H.L. та ін. Amino acid sequence of fibrolase, a direct-acting fibrinolytic enzyme from *Agkistrodon contortrix contortrix* venom // *Protein Sci.* – 1992. – Vol. 1, No. 5. – P. 590–600. – DOI: 10.1002/pro.5560010505.
112. Retzios A.D., Markland F.S. Jr. A direct-acting fibrinolytic enzyme from the venom of *Agkistrodon contortrix contortrix*: effects on various components of the human blood coagulation and fibrinolysis systems // *Thromb. Res.* – 1988. – Vol. 52, No. 6. – P. 541–552. – DOI: 10.1016/0049-3848(88)90127-2.

113. Markland F.S., Swenson S. Fibrolase: trials and tribulations // *Toxins*. – 2010. – Vol. 2, No. 4. – P. 793–808. – DOI: 10.3390/toxins2040793.
114. Han S.M., Weaver F.A., Comerota A.J. та ін. Efficacy and safety of alfimeprase in patients with acute peripheral arterial occlusion (PAO) // *J. Vasc. Surg.* – 2010. – Vol. 51, No. 3. – P. 600–609. – DOI: 10.1016/j.jvs.2009.08.053.
115. Stohnii Y.M., Yatsenko T.A., Nikulina V.V. та ін. Functional properties of individual sub-domains of the fibrin(ogen)  $\alpha$ C-domains // *BBA Adv.* – 2023. – Vol. 3. – Article 100072. – DOI: 10.1016/j.bbadv.2023.100072.
116. Retzios A.D., Markland F.S. Jr. Purification, characterization, and fibrinogen cleavage sites of three fibrinolytic enzymes from the venom of *Crotalus basiliscus basiliscus* // *Biochemistry*. – 1992. – Vol. 31, No. 19. – P. 4547–4557. – DOI: 10.1021/bi00134a003.
117. Retzios A.D., Markland F.S. Jr. Purification, characterization, and fibrinogen cleavage sites of three fibrinolytic enzymes from the venom of *Crotalus basiliscus basiliscus* // *Biochemistry*. – 1992. – Vol. 31, No. 19. – P. 4547–4557. – DOI: 10.1021/bi00134a003.
118. Novel monoclonal antibody to fibrin(ogen)  $\alpha$ C-region for detection of the earliest forms of soluble fibrin // *Ukr. Biochem. J.* – 2020. – Vol. 92, No. 3.
119. Chen N., Xu S., Zhang Y., Wang F. Animal protein toxins: origins and therapeutic applications // *Biophys. Rep.* – 2018. – Vol. 4, No. 5. – P. 233–242. – DOI: 10.1007/s41048-018-0067-x.
120. Song P., Zhang X., Wang S. та ін. Microbial proteases and their applications // *Front. Microbiol.* – 2023. – Vol. 14. – Article 1236368. – DOI: 10.3389/fmicb.2023.1236368.
121. Hazare C., Bhagwat P., Singh S., Pillai S. Diverse origins of fibrinolytic enzymes: a comprehensive review // *Heliyon*. – 2024. – Vol. 10, No. 5. – Article e26668. – DOI: 10.1016/j.heliyon.2024.e26668.
122. Grashof D., Zdenek C.N., Dobson J.S. та ін. A web of coagulotoxicity: failure of antivenom to neutralize the destructive (non-clotting) fibrinogenolytic activity of

- Loxosceles and Sicarius spider venoms // Toxins. – 2020. – Vol. 12, No. 2. – Article 91. – DOI: 10.3390/toxins12020091.
123. Matsui T., Sakurai Y., Fujimura Y. та ін. Halystase: a serine protease from *Agkistrodon halys blomhoffii* snake venom that cleaves fibrinogen and kininogen // Eur. J. Biochem. – 1998. – Vol. 252, No. 3. – P. 569–575. – DOI: 10.1046/j.1432-1327.1998.2520569.x.
124. Pandya B.V., Budzynski A.Z. Anticoagulant proteases from western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom // Biochemistry. – 1984. – Vol. 23, No. 3. – P. 460–470. – DOI: 10.1021/bi00298a010.
125. Chernyshenko V., Platonova T., Makogonenko Y., Rebriev A., Mikhalovska L., Chernyshenko T., Komisarenko S. Fibrin(ogen)olytic and platelet modulating activity of a novel protease from the *Echis multisquamatis* snake venom // Biochimie. – 2014. – Vol. 105. – P. 76–83. – DOI: 10.1016/j.biochi.2014.06.015.
126. Aggregation of platelets, proliferation of endothelial cells and motility of cancer cells are mediated by the B $\beta$ 11-5-42 residue of fibrinogen [Електронний ресурс] // Ukr. Biochem. J. – Режим доступу: <http://ukrbiochemjournal.org/2020/04/aggregation-of-platelets-proliferation-of-endothelial-cells-and-motility-of-cancer-cells-are-mediated-by-the-b%CE%B2115-42-residue-of-fibrinogen.html>
127. Chernyshenko V.O. Limited proteolysis of fibrinogen by fibrinogenase from *Echis multisquamatis* venom // Protein J. – 2015. – Vol. 34, No. 2. – P. 130–134. – DOI: 10.1007/s10930-015-9605-2.
128. Ma B., Zhang Y., Wu D. та ін. Affinity-purification of fibrinogenase with high proteolytic activity from *Agkistrodon halys* venom // Arch. Pharm. Res. – 2008. – Vol. 31, No. 9. – P. 1129–1136. – DOI: 10.1007/s12272-001-1279-1.
129. Cortelazzo A., Guerranti R., Bini L. та ін. Effects of snake venom proteases on human fibrinogen chains // Blood Transfus. – 2010. – Vol. 8, Suppl. 3. – P. s120–s125. – DOI: 10.2450/2010.019S.

130. Nolan C., Hall L.S., Barlow G.H. Ancrod, the coagulating enzyme from Malayan pit viper (*Agkistrodon rhodostoma*) venom // *Methods Enzymol.* – 1976. – Vol. 45. – P. 205–213. – DOI: 10.1016/S0076-6879(76)45020-6.
131. Costa J.O., Petri C.B., Hamaguchi A. та ін. Purification and functional characterisation of two fibrinogenolytic enzymes from *Bothrops alternatus* venom // *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* – 2007. – Vol. 13, No. 3. – P. 640–654.
132. Stohnii Ye.M., Rebriev A.V., Hornytska O.V. та ін. Directed proteolysis of fibrinogen by protease of *Gloydius halys halys* venom // *Biotechnol. Acta.* – 2021. – Vol. 14, No. 6. – P. 37–43.
133. Retzios A.D., Markland F.S. Jr. A direct-acting fibrinolytic enzyme from the venom of *Agkistrodon contortrix contortrix*: effects on blood coagulation and fibrinolysis systems // *Thromb. Res.* – 1988. – Vol. 52, No. 6. – P. 541–552.
134. Stohniy E.M., Chernyshenko V.O., Nidialkova N.A. та ін. Mapping of residues of fibrinogen cleaved by protease II of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* IMV B-7465 // *Ukr. Biochem. J.* – 2016. – Vol. 88, Special Issue. – P. 79–86.
135. Shimizu A., Jimenez E.C., Takagi J. та ін. Characterization of a protease that preferentially releases fibrinopeptide B from copperhead (*Agkistrodon contortrix contortrix*) venom // *Toxicon.* – 1987. – Vol. 25, No. 7. – P. 751–757. – DOI: 10.1016/0041-0101(87)90125-5.
136. Kinetics of fibrinogen hydrolysis by *Echis multisquamatis* venom [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://www.researchgate.net/publication/305634684>
137. Pandya B.V., Rubin R.N., Olexa S.A., Budzynski A.Z. Unique degradation of human fibrinogen by proteases from western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom // *Toxicon.* – 1983. – Vol. 21, No. 4. – P. 515–526. – DOI: 10.1016/0041-0101(83)90129-0.
138. Варецька Т.В. Мікрогетерогенність фібриногену. Кріофібриноген // *Укр. біохім. журн.* – 1960. – Т. 32, № 2. – С. 13–24.
139. Lugovska N.E., Kolesnikova I.M., Stohnii Ye.M. та ін. Novel monoclonal antibody to fibrin(ogen)  $\alpha$ C-region for detection of the earliest forms of soluble

- fibrin // Ukr. Biochem. J. – 2020. – Vol. 92, No. 3. – P. 58–70. – DOI: 10.15407/ubj92.03.058.
140. Chernyshenko V.O. та ін. Non-enzymatic activation of prothrombin induced by interaction with fibrin B26–42 region // Acta Biochim. Pol. – 2015. – Vol. 62, No. 3. – P. 517–522. – DOI: 10.18388/abp.2014\_896.
  141. Chernyshenko V., Platonova T., Makogonenko Y. та ін. Fibrin(ogen)olytic and platelet modulating activity of a novel protease from *Echis multisquamatis* snake venom // Biochimie. – 2014. – Vol. 105. – P. 76–83. – DOI: 10.1016/j.biochi.2014.06.015.
  142. Bacillus thuringiensis peptidase with fibrinolytic activity [Електронний ресурс] // Ukr. Biochem. J. – 2016. – Режим доступу: <http://ukrbiochemjournal.org/2016/05/purification...>
  143. Gornitskaia O.V., Rovinskaya I.N., Platonova T.N. Purification and characterization of the fibrinolytic enzyme from *Agkistrodon halys halys* venom // Ukr. Biokhim. Zh. – 2002. – Vol. 74, No. 3. – P. 42–49. – PMID: 12916236.
  144. Stohnii Ye.M., Rebriev A.V., Hornytska O.V. та ін. Limited proteolysis of fibrinogen by protease of *Gloydius halys halys* snake venom // Biotechnol. Acta. – 2021. – Vol. 14, No. 6. – P. 37–43.
  145. Chernyshenko V.O., Platonova T.M., Makogonenko Y.M. та ін. Fibrin(ogen)olytic and platelet modulating activity of a novel protease from *Echis multisquamatis* venom // Biochimie. – 2014. – Vol. 105. – P. 76–83.
  146. Stohnii Ye.M. Limited proteolysis of fibrinogen by protease of *Gloydius halys halys* snake venom // Biotechnol. Acta. – 2021. – Vol. 14, No. 6. – P. 37–43. – DOI: 10.15407/biotech14.06.037.
  147. Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A. та ін. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server // In: Walker J.M. (ed) The Proteomics Protocols Handbook. – Humana Press, 2005. – P. 571–607.
  148. Chernyshenko VO. [PDF] Limited proteolysis of fibrinogen [Електронний ресурс] – Режим доступу: [http://ukrbiochemjournal.org/wp-content/uploads/2019/04/Chernyshenko-1\\_2\\_19.pdf](http://ukrbiochemjournal.org/wp-content/uploads/2019/04/Chernyshenko-1_2_19.pdf)

149. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. – 1970. – Vol. 227. – P. 680–685.
150. Gao X., Bain K., Bonanno J. High-throughput limited proteolysis/mass spectrometry for protein domain elucidation // *Struct. Funct. Genomics*. – 2005. – Vol. 6, No. 2–3. – P. 129–134.
151. Weisel J.W., Nagaswami C. Computer modeling of fibrin polymerization kinetics correlated with EM and turbidity: clot structure and assembly are kinetically controlled // *Biophys. J.* – 1992. – Vol. 63. – P. 111–128. – DOI: 10.1016/S0006-3495(92)81594-1.
152. Müller M.F., Ris H., Ferry J.D. Electron microscopy of fine fibrin clots and fibrin films: observations of fibers in cross-section and deformed states // *J. Mol. Biol.* – 1984. – Vol. 174. – P. 369–384. – DOI: 10.1016/0022-2836(84)90343-7.
153. Hartig S.M. Basic image analysis and manipulation in ImageJ // *Curr. Protoc. Mol. Biol.* – 2013.
154. Nichele L., Persichetti V., Lucidi M., Cincotti G. Quantitative evaluation of ImageJ thresholding algorithms for microbial cell counting // *OSA Continuum*. – 2020. – Vol. 3, No. 6. – P. 1417–1427.
155. Platonova T.M., Hrabovskyi O.O., Chernyshenko V.O., Stohnii Y.M., Kucheryavyi Y.P., Korolova D.S., Komisarenko S.V. (2025). Alternative role of B:b knob-hole interactions in the fibrin assembly. *Biochemistry* 2025, 64, 4, 791 - 800. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.4c00695> (Q1).
156. Zhelavskyi, M.A., Platonov, O.M, Kucheryavyi, Y.P., Stohnii, Y.M. (2023). Aprobaton of platelet aggregation inhibitor from *Echis multisquamatis* snake venom in vitro, in vivo and ex vivo. *Biotechnologia Acta*, 16(5). <https://doi.org/10.15407/biotech16.05>
157. Stohnii, Y.M., Yatsenko, T.A., Nikulina, V.V., Kucheriavyi, Y.P., Hrabovskyi, O.O., Slominskyi, O.Y., Savchenko, K.S., Garmanchuk, L.V., Varbanets, L.D., Tykhomyrov, A.O., & Chernyshenko, V.O. (2023). Functional properties of individual sub-domains of the fibrin(ogen)  $\alpha$ C-domains. *BBA advances*, 1867(3), 100072. <https://doi.org/10.1016/j.bbadv.2023.100072> (Q3).

## ДОДАТОК 1

1. *Platonova T.M., Hrabovskyi O.O., Chernyshenko V.O., Stohnii Y.M., **Kucheryavii Y.P.**, Korolova D.S., Komisarenko S.V. (2025). Alternative role of B:b knob-hole interactions in the fibrin assembly. Biochemistry 2025, 64, 4, 791-*

800. <https://10.1021/acs.biochem.4c00695> (Q1).

*Платонова Т.М. – ідея досліджень, супровід експериментальної роботи, аналіз даних;*

*Грабовський О.О. – комп'ютерне моделювання;*

*Чернишенко В.О. – планування досліджень, підготовка рукопису;*

*Стогній Є.М. – підготовка протеїнових препаратів;*

*Кучерявий Є.П. – електронна мікроскопія, написання статті, редагування;*

*Корольова Д.С. – аналіз та візуалізація даних;*

*Комісаренко С.В. – загальне керівництво роботою, формування висновків.*

2. **Kucheriavii, Y.P.**, Panas, I.D. (2023). Transmission electron microscopy for the direct analysis of fibrin clot structure. *Biotechnologia Acta*, 16(2), 30-31. <https://10.15407/biotech16.02.030>

*Кучерявий Є.П. – електронна мікроскопія, написання статті, редагування;*

*Панас І.Д. – електронна мікроскопія.*

3. Stohnii, Y.M., Yatsenko, T.A., Nikulina, V.V., **Kucheriavii, Y.P.**, Hrabovskyi, O.O., Slominskyi, O.Y., Savchenko, K.S., Garmanchuk, L.V., Varbanets, L.D., Tykhomyrov, A.O., & Chernyshenko, V.O. (2023). Functional properties of individual sub-domains of the fibrin(ogen)  $\alpha$ C-domains. *BBA advances*, 1867(3), 100072. <https://doi.org/10.1016/j.bbadv.2023.100072> (Q3).

*Стогній Є.М. – турбідиметричні та електрофоретичні дослідження;*

*Яценко Т.А. – вивчення функції системи фібринолізу;*

*Нікуліна В.В. – робота з культурами клітин;*

*Кучерявий Є.П. – електронна мікроскопія, турбідиметрія, агрегація тромбоцитів, редагування та написання статті;*

*Грабовський О.О. – молекулярне моделювання;*

*Сломінський О.Ю. – хроматографічні дослідження; Савченко К.С. – робота з культурами клітин;*

*Гарманчук Л.В. – робота з культурами клітин;*

*Тихомиров А.О. – робота з компонентами системи фібринолізу;*

*Комісаренко С.В. – загальне керівництво роботою, формування висновків, підготовка статті до друку.*

4. Zhelavskiy, M.A., Platonov, O.M, **Kucheryavii, Y.P.**, Stohnii, Y.M. (2023). Aprobation of platelet aggregation inhibitor from Echis multisquamatis snake venom in vitro, in vivo and ex vivo. Biotechnologia Acta, 16(5). <https://doi.org/10.15407/biotech16.05>

*Желавський М.А. – агрегація тромбоцитів;*

*Платонов О.М. – хроматографічні дослідження;*

*Кучерявий Є.П. – дослідни на тваринах, редагування та написання статті.*

5. **Kucheriavii Y.**, Hrabovskyi O., Rebriev A.V., Stohnii Y. Limited proteolysis of fibrinogen  $\alpha$ C-region reveals its structure. Biotechnologia Acta T. 15, No. 2, 2022. P. 60-61. <https://doi.org/10.15407/biotech15.02.060>

*Кучерявий Є.П. – електронна мікроскопія, турбідиметрія, редагування та написання статті;*

*Грабовський О.О. – молекулярне моделювання; Ребрієв А.В. – мас-спектрометрія;*

*Стогній Є.М. – електронна мікроскопія.*

6. Iskandarov E., Zinenko O., Tupikov A., Pitishkina A., Platonov O., Gryshchuk V., **Kucheriavii Y.**, Stohnii Y. (2022) Action of venom of Vipera snake of Ukraine on blood coagulation in vitro. Biotechnologia Acta. 15(2):56-57. <https://doi.org/10.15407/biotech15.02.056>

*Іскандаров Е. – підготовка рукопису, хроматографія;*

*Зіненко О. – отримання та характеристика отрути змій;*

*Тупіков А. – отримання та характеристика отрути змій;*

*Пітішкіна А. – підготовка рукопису;*

*Платонов О. – хроматографія;*

*Гришчук В. – ідеологія досліджень, загальне керівництво;*

*Кучерявий Є. – агрегація тромбоцитів, редагування та написання статті;*

*Стогній Є. – електрофоретичні дослідження.*

7. Iskandarov E., Gryshchuk V., Platonov O., **Kucheriavii Y.**, Slominskyi O., Stohnii Y., Vartanov V., Chernyshenko V. Fractionation of Vipera berus berus snake



venom and detection of bioactive compounds targeted to blood coagulation system. Southeastern European Medical Journal. 6 (2022) 20-31. <https://doi.org/10.26332/seemedj.v6i2.256>

*Искандаров Е. – підготовка рукопису, хроматографія;*

*Гришук В. – ідеологія досліджень, загальне керівництво; Платонов О. – хроматографія;*

*Кучерявий Є. – агрегація тромбоцитів, аналіз даних;*

*Сломінський О.Ю. – хроматографічні дослідження; Стогній Є.М. – електронна мікроскопія;*

*Вартанов В.Г. – хроматографічні дослідження;*

*Чернишенко В.О. – ідеологія досліджень, редагування рукопису.*

8. Stohnii Y., Baidakova K., Platonov O., **Kucheryavii Y.**, Iskandarov E., Zinenko O., Gryshchuk V. Fibrinogenases from the animal venoms in the study of fibrinogen structure and fuctions / 26th Congress of the International Society for Fibrinolysis and Proteolysis, October 11-14, 2023, Budapest, Hungary. Plasminogen activation and fibrinolysis workshop of the Hungarian society of thrombosis and haemostasis. Abstracts. P. 55.
9. **Kucheriavyy Y.**, Didkivskyi V., Selikhova A., Tokmakova Y., Cherenok S., Zhminko P., Chernyshenko V. Antithrombotic action of sodium salt of 5,11,17,23-bis(dihydroxyphosphoryl)methylcalix[4]arene in vivo. RECOOP 16th Bridges in Life Sciences Video Conference. 16 April 2021. P. 53.