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

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ТИХОМИРОВ АРТЕМ ОЛЕКСАНДРОВИЧ

УДК 577.112:57.083.3

ДИСЕРТАЦІЯ

ПРОТЕЇНИ ПЛАЗМІНОГЕН/ПЛАЗМІНОВОЇ СИСТЕМИ ЯК РЕГУЛЯТОРИ КЛІТИННИХ ПРОЦЕСІВ ТА МАРКЕРИ ПАТОЛОГІЧНИХ СТАНІВ РІЗНОГО ҐЕНЕЗУ

03.00.04 – біохімія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук

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

Науковий консультант: **Гриненко Тетяна Вікторівна**,
доктор біологічних наук, провідний науковий співробітник Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України

Київ – 2021

АНОТАЦІЯ

Тихомиров А.О. Протеїни плазміноген/плазмінової системи як регулятори клітинних процесів та маркери патологічних станів різного ґенезу. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 «Біохімія». – Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ, 2021.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню механізмів регулювання протеїнами плазміноген/плазмінової системи функціонального стану тромбоцитів та процесів, асоційованих з виживанням та міграцією/інвазією пухлинних клітин, а також визначенню ролі фрагментів плазміногену (ангіостатинів) як маркерів деяких патологій.

Експериментально доведено, що частково деградована форма нативного плазміногену (Lys-плазміноген) залучається до регулювання тромбоутворення, ангіогенезу та репаративних процесів через модулювання функціонального стану тромбоцитів. Показано, що Lys-плазміноген, на відміну від нативного зимогену (Glu-плазміногену) або його кринглвмісних фрагментів, інгібує агрегативну активність тромбоцитів через пригнічення агоніст-індукованої реконструкції актинового цитоскелету та екзоцитозу тромбоцитарних α-гранул.

Вперше встановлено, що Lys-плазміноген обмежує ангіогенну функцію тромбоцитів через інгібування агоніст-стимульованого вивільнення фактору росту ендотелійних клітин (VEGF) й залучаючись до продукування ангіостатинів (фрагментів плазміногену – інгібіторів росту судин). У модельних експериментах *ex vivo* з використанням відмитих тромбоцитів людини було вперше показано, що утворення ангіостатинів внаслідок обмеженого протеолізу плазміногену відбувається на плазматичній мембрані тромбін- та колаген-активованих тромбоцитів, але не тромбоцитів, що знаходяться у стані фізіологічного спокою. На підставі отриманих результатів висунуто постулат

стосовно принципової залежності утворення ангіостатинів від функціонального стану тромбоцитів.

Розкрито механізм генерування ангіостатинів із залученням актину, який експонується на поверхні плазматичної мембрани агоніст-стимульованих тромбоцитів та функціонує як центр зв'язування та процесінгу плазміногену плазміном, що утворюється за участі ендогенних активаторів. Отримані результати розкривають реципрокний характер функціональних взаємодій між компонентами плазміноген/плазмінової системи та тромбоцитами, що суттєво розширює існуючі уявлення про механізми регулювання плазміногеном агрегативної активності тромбоцитів та їхньої участі в тромбоутворенні, ангіогенезі та репаративних процесах.

Встановлено, що плазмін(оген) та його протеолітичні фрагменти – ангіостатини залучаються до регулювання процесів, асоційованих з пухлинним ростом, а саме: виживання, міграцію та інвазію. Показано, що клітини лінії А549 (аденокарцинома легень людини) за умов культивування *in vitro* конвертують екзогенний Glu-плазміноген на плазмін, який здійснює протеоліз адгезивних протеїнів, що призводить таким чином до втрати клітинами адгезивності та їхнього відшарування. Плазмін(оген) за концентрації 0,75 – 1,0 мкМ пригнічує життєздатність нетрансформованих фібробластів 3Т3, але не чинить цитотоксичної дії на клітини аденокарциноми легені А549, які виживають за присутності екзогенного Glu-плазміногену у діапазоні концентрацій 0,005 – 1,0 мкМ. Вперше встановлено множинні механізми резистентності пухлинних клітин до плазмін-індукованого апоптозу/аноікісу та підтримці їхньої рухливості. Активація автофагії, що визначали за рівнями маркерів LC3 та Beclin-1, у клітинах аденокарциноми легені А549 є одним з потенційних механізмів набуття пухлинними клітинами резистентності до плазмін-індукованого апоптозу/аноікісу. Продемонстровано, що вимкнення експресії регуляторного протеїну TIGAR (**T**P53-**i**nducible **g**lycolysis and **a**poptosis **r**egulator) – регулятору гліколізу/пентозофосфатного шунту – за допомогою технології siRNA призвело до гальмування міграційної активності клітин А549.

Встановлено, що плазмін індукує надекспресію TIGAR клітинами A549, що свідчить про залучення цього протеїну до регулювання процесів міграції/інвазії ракових клітин. Розкриття механізмів резистентності пухлинних клітин до плазмін-індукованого апоптозу/аноікісу є важливим для подальшої розробки ефективних підходів таргетної фармакотерапії злоякісних новоутворень та метастазування.

Вперше показано, що адаптерний/риштувальний протеїн Ruk/CIN85 контролює процеси утворення ангіостатинів раковими клітинами. Встановлено здатність сублінії клітин аденокарциноми грудної залози миші 4T1 з пригніченою експресією адаптерного/риштувального протеїну Ruk/CIN85 (RukDown) продукувати ангіостатини, що обернено корелює з їхньою інвазійною активністю. Показано, що ангіостатини К1-3 та К5 достовірно пригнічують здатність до інвазії високоінвазійної сублінії 4T1 (RukUp).

Отримано нові дані стосовно зв'язку між рівнями ангіостатинів та патологічними процесами за розвитку доброякісних новоутворень. Показано, що рівень ангіостатинів у тканинах доброякісних новоутворень міометрію матки (міоми) та грудної залози за фіброаденоматозу обернено корелює з розвитком запальних процесів та високим проліферативним індексом.

Проведено кількісний імунохімічний аналіз ангіостатинів у різних тканинах за розвитку ускладнень цукрового діабету, а саме: хронічних виразках м'яких тканин пацієнтів з цукровим діабетом 2-го типу та сітківці ока щурів з експериментальною гіперглікемією. Показано, що ексудати хронічних ран шкіри пацієнтів з цукровим діабетом характеризуються підвищеним вмістом фрагментів плазміногену (ангіостатинів) у порівнянні з ексудатами гострих (хірургічних) ран. Із застосуванням афінної хроматографії на лізин-сефарозі з ексудатів хронічних ран було ізольовано основний поліпептид-ангіостатин з M_m ~ 50 кДа, що підтверджує специфічність та фізіологічну активність виділеного фрагменту плазміногену. Високі рівні активності MMP, які здійснюють протеолітичне розщеплення плазміногену й відповідають за утворення ангіостатинів, визначаються в ексудатах трофічних діабетичних виразок, та є

одним з ключових факторів хронізації загоєння ран у хворих на цукровий діабет. Встановлено, що елімінація протеїнів-ангіостатинів та колагенолітичних ензимів з пошкоджених тканин в ході вакуум-терапії (VAC-therapy) стимулює репаративний ангіогенез та скорочує терміни загоєння хронічних виразок. Вперше було показано наявність широкого спектру різних за молекулярною масою фрагментів плазміногену та високу протеолітичну активність ММР в ексудатах гіпертонічної хронічної рани нижньої кінцівки за синдрому Марторелла (клінічне спостереження), що доводить провідну роль ангіостатинів та надмірної активації протеолітичних систем у патогенезі хронічних ран різної етіології. На підставі отриманих результатів вперше запропоновано використання ангіостатинів як прогностичних маркерів загоєння ран.

Вперше показано можливість фармакокорекції рівнів ангіостатинів у сітківці ока щурів з стрептозотоцин-індукованою гіперглікемією. Встановлено, що розвиток гіперглікемії призводить до зменшення рівнів поліпептидів-ангіостатинів у сітківці експериментальних тварин, тоді як введення щурам з індукованим цукровим діабетом інгібіторів ензиму полі(АДР-рибоза)-полімерази-1 (PARP-1) (нікотинаміду та 3-амінобензаміду) сприяло відновленню вмісту ангіостатинів у сітківці. Дефіцит ангіостатинів відіграє провідну роль у порушенні локального ангіогенного балансу, що неоваскуляризації сітківки та є патогенетичною ланкою розвитку діабетичної ретинопатії. Надактивація PARP-1 є потужним проапоптотичним фактором, інгібування якого запобігає загибелі ретинальних клітин, у тому числі й тих, що відповідають за продукування ангіостатинів. Встановлено, що тривала гіперглікемія супроводжується розвитком реактивного астрогліозу у сітківці експериментальних тварин. Введення інгібіторів PARP-1 тваринам з цукровим діабетом нормалізує функціональний стан ретиноглії. В експериментах *in vitro* з використанням отриманої первинної культури астроцитів головного мозку щурів було вперше показано, що астрогліальні клітини здатні продукувати та вивільняти ангіостатини. Отже, отримані результати вперше довели ключове значення астроцитів в утворенні ангіостатинів у нервовій тканині, що відкриває

можливість модулювання балансу регуляторів ангіогенезу через фармакокорекцію дисфункції астрогліальних клітин.

Проведено серію досліджень, присвячених кількісному визначенню ангіостатинів у сироватці крові як маркерів серцево-судинних захворювань та оцінки ефективності їхньої терапії. Вперше було встановлено, що механізм кардіопротекторної дії різних за фармакодинамічними властивостями препаратів, а саме, симвастатину та L-аргініну за ішемічної хвороби серця реалізується через зменшення рівня продукування ангіостатину. Вперше показано прямий кореляційний зв'язок між зменшенням концентрації загального холестеролу, ліпопротеїнів низької щільності та С-реактивного протеїну та зниженням рівнів ангіостатину у сироватці крові таких пацієнтів після курсової терапії з використанням симвастатину. Зменшення рівня ангіостатину є ознакою підсилення ангіогенезу як фактора, що сприяє реваскуляризації міокарду, відновленню кровообігу у серцевому м'язі та поліпшенню прогнозу при ішемічній хворобі серця. Вперше визначено зміни рівня ангіостатину в сироватці крові при застосуванні ноотропного препарату цитіколін (CDP-холін) у відновлювальній терапії постінсультного стану на фоні фібриляції передсердь, що є важливим свідченням залучення цих протеїнів до перебігу ключових патофізіологічних процесів, які визначають розвиток різних захворювань серцево-судинної системи.

Отже, дисертаційна робота є комплексним дослідженням, присвяченим з'ясуванню механізмів регулювання протеїнами плазміноген/плазмінової системи функціонального стану тромбоцитів та процесів, асоційованих з виживанням та міграцією/інвазією пухлинних клітин, а також визначення ролі фрагментів плазміногену (ангіостатинів) як маркерів деяких патологій. Вперше встановлено, що зміни рівня ангіостатинів у тканинах та крові відбуваються за розвитку доброякісних новоутворень, ускладнень цукрового діабету та серцево-судинних захворювань, що відкриває перспективи їхнього використання у клінічній діагностиці.

Ключові слова: протеїни плазміноген/плазмінової системи, протеїнази, ангіостатини, ангіогенез, клітинне сигналювання, пухлинні клітини, тромбоцити, серцево-судинні хвороби, ускладнення цукрового діабету.

SUMMARY

Tykhomyrov A.A. Proteins of plasminogen/plasmin system as regulators of cell processes and markers of various pathological conditions. – Manuscript.

Thesis for a scientific degree of a doctor of biological sciences by specialty 03.00.04 «Biochemistry». – Palladin Institute of Biochemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine. Kyiv, 2021.

The thesis is devoted to establishing the role of proteins of plasminogen/plasmin system in the regulation of activity of platelets and cancer cells and evaluating significance of plasminogen fragments (angiostatins) as markers of various diseases.

The present study clarifies for the first time mechanisms of anti-aggregative capacity of partially truncated form of plasminogen, or Lys-plasminogen, which decreases sensitivity of platelets to the main endogenous agonists, such as thrombin or collagen. In contrast to native zymogen (Glu-plasminogen) or its kringle-containing fragments, Lys-plasminogen may modulate functional activity of platelets through inhibiting agonist-induced reconstruction of actin cytoskeleton, suppressing exocytosis of platelet α-granules, and exposure of adhesive protein P-selectin. It was established that Lys-plasminogen-induced inhibition of reorganization of platelet cytoskeletal structures, prevention of platelet degranulation, suppression of platelet metabolic activity and inhibition of generation of reactive oxygen species as secondary messengers of intracellular signaling pathways directly correlate with platelet aggregative failure.

Lys-plasminogen was shown for the first time to restrict angiogenic abilities of platelets through both forming angiostatins (inhibitors of vessel growth) and suppressing agonist-stimulated release of vascular endothelial growth factor

(VEGF). The principal dependence of angiostatin generation from functional activity of platelets has been postulated. In the experimental model *ex vivo* with the use of washed human platelets, it was shown for the first time that angiostatin generation through limiting proteolysis of plasminogen takes place on the plasmatic membrane of thrombin- or collagen-stimulated platelets, but not untreated counterparts. The mechanism of angiostatin generation involves actin, which is exposed on the surface of agonist-stimulated platelets and serves as a site for plasminogen binding, activation, and plasmin-mediated processing. Obtained results describe reciprocal character of the functional interactions between plasminogen and platelets, thus greatly expanding current knowledge on how plasminogen/plasmin regulates mechanisms of aggregative activity of platelets and their involvement in thrombus formation, angiogenesis and reparative processes.

Plasminogen and proteins of activation system are known to regulate processes associated with tumor cell malignization, including migrating and invasive activity of cancer cells, their metastatic potential and survival. It was shown that lung adenocarcinoma cell line A549 are able to convert exogenous Glu-plasminogen into plasmin, which, in a dose-dependent manner, induces morphological changes in cells and loss of their adhesiveness. Multiple mechanisms of cancer cell resistance to plasmin-induced apoptosis/anoikis and support of their motility were explored for the first time, including: 1) overexpression of Beclin-1 and LC3, components of autophagosomes, and induction of reparative autophagy, 2) induction of TP53-inducible glycolysis and apoptosis regulator (TIGAR), a trigger of glycolysis/penthosophosphate shunt, activator of antioxidant system and motogenic regulator, 3) changes in pro- and anti-apoptotic regulators and inhibitors of the cell circle expression (Bax, caspase-9, p21, p53/MDM2, PARP-1), providing survival of tumor cell. Knowledge of the mechanisms of cancer cell resistance to plasmin-induced apoptosis/anoikis is important for development of effective approaches of pharmacotherapy targeting of malignant neoplasms and metastasis.

Novel evidence on an important role of angiostatins in the regulation of neoplastic growth was obtained. It was shown that angiostatin-producing ability of

mammary gland adenocarcinoma cell line 4T1 inversely correlated with their migration activity. It was observed that low levels of angiostatins in tissues of human benign neoplasms of uterus and breast are associated with the negative prognosis of neoplastic progression and malignization of neoplasms, and may serve as prognostic markers of their malignant transformation.

Quantitative immunochemical analysis of angiostatins in various tissues at the development of diabetes complications, including chronic ulcers of soft tissues of patients with diabetes mellitus type II and retinas of rats with experimental hyperglycemia, was performed. It was shown that exudates from chronic skin wounds of diabetic patients are characterized with elevated levels of plasminogen fragments – angiostatins, as compared with exudates from acute (surgical) wounds. The major angiostatic polypeptide with M_m ~ 50 kDa was isolated from exudates of chronic wounds on lysine-sepharose that confirms specificity and physiological activity of isolated angiostatin. Permanently enhanced activity of MMP, which are responsible for plasminogen cleavage and angiostatin formation, was found in exudates from trophic diabetic ulcers and accounted as one of the crucial factors of wound delay healing in diabetes. Elimination of angiostatic proteins and excessive collagenolytic enzymes from the damaged tissues by means of vacuum therapy (VAC therapy) stimulated reparative angiogenesis and shortened healing time for chronic wounds. A variety of plasminogen fragments with different molecular weights and enhanced MMP activity was also found in exudate from hypertonic chronic wound of lower limb at Martorell's syndrome (case report), suggesting pivotal role of angiostatins and overactivation of MMP in pathogenesis of chronic wounds of different ethology. Based on the obtained results, angiostatins were proposed as valuable prognostic markers of wound healing.

The possibility of pharmacocorrection of angiostatin levels in retina of rats with streptozotocin-induced diabetes was shown for the first time. It was demonstrated that prolonged hyperglycemia decreased angiostatin levels in retina of experimental animals, while administration of nicotinamide and 3-aminobenzamide, inhibitors of poly(ADP-ribose)-polymerase-1 (PARP-1), partially restored content

of angiostatins in diabetic retinas. Deficit of angiostatins may significantly contribute to the impairments of local angiogenic balance, thus resulting in enhancing of proangiogenic stimuli, retinal neovascularization, and development of diabetic retinopathy. Overactivation of PARP-1 is a potent pro-apoptotic factor, and its inhibition prevents death of retinal cell, including those responsible for angiostatin production. It was found that chronic hyperglycemia is accompanied by the development of reactive astrogliosis in retina of experimental rats. Injection of PARP-1 inhibitors to diabetic animals improved retinoglia functionality. It was first found in the experiment on the primary culture of astrocytic cells from rat brain that astrocytes are able to produce and release angiostatins. Collectively, obtained primary results highlight a principal significance of astrocytes in angiostatin formation in nervous tissue that has a great perspective for modulating pathological conditions associated with angiogenic imbalance though pharmacocorrection of astroglial dysfunction.

A complex research aimed to quantitatively evaluate circulating angiostatins as regulators and markers of cardiovascular pathologies and their therapeutic efficacy monitoring was performed. It was shown for the first time that the simvastatin and L-arginine, which are pharmacodynamically distinct drugs, exerts their cardioprotective action at atherosclerosis and ischemic (coronary) heart disease through reducing production of angiostatin. Positive correlation between decreasing concentration of total cholesterol, low-density lipoproteins and C-reactive protein and reducing levels of angiostatin was found in serum of such patients after course of lipid-lowering therapy. Enhanced pro-angiogenic signaling due to diminishing angiostatin content facilitates myocardial revascularization, recovering blood circulation in cardiac muscle and improving prognosis in ischemic heart disease. Changes in angiostatin serum levels were first found as a result of rehabilitation therapy after acute ischemic stroke with the use of nootropic drug citicoline (CDP-choline) that affirms participation of this protein in the essential pathophysiological processes, which underlie development of various cardiovascular disorders.

Thus, the present doctoral thesis is a completed scientific research, which significantly expands current opinion in function of plasminogen/plasmin system proteins as regulators of cellular processes. The latter is of great importance for understanding of the cornerstone pathogenetic mechanisms of the most wide-spread disorders, including tumor growth and metastasis, complications of diabetes mellitus, cardiovascular impairments. Obtained experimental data may be considered as a fundamental basis for the application of plasminogen/plasmin proteins as sensitive diagnostic and prognostic tools and development of effective approaches for the pharmaco-correction and target therapy of various pathological conditions, associated with aberrant angiogenesis.

Key words: proteins of plasminogen/plasmin system, proteinases, angiostatins, angiogenesis, cell signaling, cancer cells, platelets, cardiovascular diseases, diabetic complications.

СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковано основні результати дисертації

– статті у наукових періодичних фахових виданнях України, у т.ч., які входять до міжнародних наукометричних баз:

1. **Tykhomyrov AA.** Interaction of actin with plasminogen/plasmin system: mechanisms and physiological role. *Biopolymers and Cell*. 2012;28(6):413-423. doi:10.7124/bc.000130. *(Scopus Q4) (Особисто дисертантом здійснено пошук та аналіз літературних даних, написання статті).*

2. **Tykhomyrov AA**, Yusova EI, Diordieva SI, Korsa VV, Grinenko TV. Production and characteristics of antibodies against K1-3 fragment of human plasminogen. *Biotechnologia Acta*. 2013;6(1):87-97. doi: 10.15407/biotech6.01.086. *(Особисто дисертантом проведено імунізацію тварин, виконано імунохімічний аналіз, статистичну обробку даних та їх інтерпретування, підготовку ілюстративного матеріалу та написання статті).*

3. Петренко ОМ, **Тихомиров АО**. Роль металопротеїназ матриксу в процесах загоєння ран. *Медична хімія*. 2013;15(4):100-106. https://doi.org/10.11603/1681-2557.2013.v15.i4.2819. *(Особисто дисертантом проведено літературний пошук та узагальнення даних, написання та оформлення статті).*

4. **Тихомиров АО**, Жерносєков ДД, Рока-Мойя ЯМ, Діордієва СІ, Гриненко ТВ. Вплив Lys-форми плазміногену на актиновий цитоскелет тромбоцитів. *Фізіологічний журнал*. 2014;60(1):25-33. http://nbuv.gov.ua/UJRN/Fiziol_2014_60_1_6. *(Особисто дисертантом проведено експериментальні дослідження, виконано статистичний аналіз даних та їх інтерпретування, формулювання висновків, підготовку ілюстративного матеріалу та написання статті).*

5. **Tykhomyrov AA**. Dynamics of thrombin-induced exposition of actin on the platelet surface. *Ukrainian Biochemical Journal*. 2014;86(5):74-81.

doi: https://doi.org/10.15407/ubj86.05.074. *(Scopus Q4) (Особисто дисертантом проведено експериментальні дослідження, виконано статистичний аналіз даних та їх інтерпретування, формулювання висновків та основної концепції статті, підготовку ілюстративного матеріалу та написання статті).*

6. **Тихомиров АО**, Жерносєков ДД, Рока-Мойя ЯМ, Діордієва СІ, Гриненко ТВ. Вплив Lys-плазміногену на секрецію тромбоцитів людини. *Фізіологічний журнал*. 2015;61(6):26-34. https://fz.kiev.ua/journals/2015_V.61/2015_6/2015_6-26-34.pdf. *(Особисто дисертантом проведено експериментальні дослідження, виконано статистичний аналіз даних та їх інтерпретування, формулювання висновків, підготовку ілюстративного матеріалу та написання статті).*

7. **Tykhomyrov AA**, Vovchuk IL, Grinenko TV. Plasminogen and angiostatin levels in female benign breast lesions. *Ukrainian Biochemical Journal*. 2015;87(5): 103-112. doi: https://doi.org/10.15407/ubj87.05.103. *(Scopus Q4) (Особисто дисертантом проведено експериментальні дослідження, виконано статистичний аналіз даних та їх інтерпретування, формулювання висновків та основної концепції статті, підготовку ілюстративного матеріалу та написання статті).*

8. Zhernossekov DD, Roka-Moiia YM, **Tykhomyrov AA**, Grinenko TV. Lys-plasminogen stimulates vitronectin exposure on the platelet surface. *Biopolymers and Cell*. 2015;31(2):104-108. http://dx.doi.org/10.7124/bc.0008D3. *(Scopus Q4) (Дисертант особисто брав участь у проведенні експериментальних досліджень, обговоренні результатів та підготовці статті).*

9. **Tykhomyrov AA**, Pavlova AS, Nedzvetsky VS. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): on the 45th anniversary of discovery. *Neurophysiology*. 2016;48(1):54-71. https://doi.org/10.1007/s11062-016-9568-8. *(Scopus Q4) (Особисто дисертантом проведено літературний пошук та узагальнення літературних даних, написання та оформлення статті).*

10. Petrenko OM, Bezrodnyi BH, **Tykhomyrov AA**. Vacuum therapy of diabetic soft tissue wounds: the impact on the matrix metalloproteinase activity.

International Journal of Endocrinology. 2016;1(73):53-57. https://doi.org/10.22141/2224-0721.1.73.2016.71065. *(Особисто дисертантом виконано біохімічний аналіз, проведено інтерпретування та обговорення отриманих даних, формулювання наукової концепції та висновків, написання статті).*

11. **Tykhomyrov AA**, Zhernossekov DD, Grinenko TV. Surface-exposed actin binds plasminogen on the membrane of agonist-activated platelets: a flow cytometry study. *Biopolymers and Cell*. 2017;33(3):172-182. http://dx.doi.org/10.7124/bc.000953. *(Scopus Q4) (Особисто дисертантом проведено експериментальні дослідження, виконано статистичний аналіз даних, їх інтерпретування та обговорення, формулювання висновків, підготовку ілюстративного матеріалу та написання статті).*

12. **Tykhomyrov AA**, Nedzvetsky VS, Ağca CA, Korsa VV, Grinenko TV. Plasminogen and its fragments in rat brain: a plausible role for astrocytes in angiostatin generation. *Ukrainian Biochemical Journal*. 2017;89(2):43-54. doi: https://doi.org/10.15407/ubj89.02.043. *(Scopus Q4) (Особисто дисертантом проведено експериментальні дослідження, виконано статистичний аналіз даних, їх інтерпретування та обговорення, формулювання наукової концепції та висновків, підготовку ілюстративного матеріалу та написання статті).*

13. Zhernossekov D, Roka-Moiia Y, **Tykhomyrov A**, Guzyk M, Grinenko T. Glu- and Lys-forms of plasminogen differentially affect phosphatidylserine exposure on the platelet surface. *Ukrainian Biochemical Journal*. 2017;89 (special issue):102-110. doi:https://doi.org/10.15407/ubj89.si01.102. *(Scopus Q4) (Особисто дисертантом взято участь у плануванні та проведенні експериментальних досліджень, обговоренні результатів та підготовці статті)*.

14. Ağca CA, **Tykhomyrov AA**, Baydas G, Nedzvetsky VS. Effects of propolis ethanol extract on viability and levels of cytoskeletal and regulatory proteins of rat brain astrocytes: an in vitro study. *Neurophysiology*. 2017;49(4):261-271. https://doi.org/10.1007/s11062-017-9680-4. *(Scopus Q4) (Особисто дисертантом взято участь у плануванні експериментальних досліджень, виконано*

статистичний аналіз даних, їх інтерпретування та обговорення, формулювання наукової концепції та висновків, підготовку ілюстративного матеріалу та написання статті).

15. **Tykhomyrov AA**, Zhernosekov DD, Guzyk MM, Korsa VV, Grinenko TV. Plasminogen modulates formation of reactive oxygen species in human platelets. *Ukrainian Biochemical Journal*. 2018;90(6):31-40. doi:https://doi.org/10.15407/ubj90.06.031. *(Scopus Q4) (Особисто дисертантом проведено експериментальні дослідження, виконано статистичний аналіз даних, їх інтерпретування та обговорення, формулювання наукової концепції та висновків, підготовку ілюстративного матеріалу та написання статті).*

16. **Tykhomyrov AA**, Kushnir YS, Nedzvetsky VS, Grinenko TV, Kuryata OV. Citicoline affects serum angiostatin and neurospecific protein levels in patients with atrial fibrillation and ischemic stroke. *Ukrainian Biochemical Journal*. 2019;91(5):34-45. doi: https://doi.org/10.15407/ubj91.05.034. *(Scopus Q4) (Особисто дисертантом виконано імунохімічний аналіз, проведено статистичну обробку даних, їх інтерпретування та обговорення, формулювання наукової концепції та висновків, підготовку ілюстративного матеріалу та написання статті).*

17. Petrenko OM, **Tykhomyrov AA**. Levels of angiogenic regulators and MMP-2, -9 activities in Martorell ulcer: a case report. *Ukrainian Biochemical Journal*. 2019; 91(1):100-107. doi: https://doi.org/10.15407/ubj91.01.100. *(Scopus Q4) (Особисто дисертантом виконано біохімічний аналіз, проведено статистичну обробку даних, їх інтерпретування та обговорення, формулювання наукової концепції та висновків, підготовку ілюстративного матеріалу та написання статті).*

18. **Tykhomyrov AA**, Zhernosekov DD, Grinenko TV. Plasminogen modulates formation and release of platelet angiogenic regulators. *Ukrainian Biochemical Journal*. 2020;92(1):31-40. doi: https://doi.org/10.15407/ubj92.01.031. *(Scopus Q4) (Особисто дисертантом проведено експериментальні дослідження, виконано статистичний аналіз даних, їх інтерпретування та обговорення, формулювання*

наукової концепції та висновків, підготовку ілюстративного матеріалу та написання статті).

19. **Tykhomyrov AA**, Nedzvetsky VS, Ağca CA, Guzyk MM, Korsa VV, Grinenko TV. Plasminogen/plasmin affects expression of glycolysis regulator TIGAR and induces autophagy in lung adenocarcinoma A549 cells. *Experimental Oncology.* 2020;42(4):270-276. DOI: 10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-42-no-4.15253. *(Scopus Q4) (Особисто дисертантом проведено експериментальні дослідження, виконано статистичний аналіз даних, їх інтерпретування та обговорення, формулювання наукової концепції та висновків, підготовку ілюстративного матеріалу та написання статті).*

20. Bilous VL, Kapustianenko LG, **Tykhomyrov AA.** Production and application of angiostatins for the treatment of ocular neovascular diseases. *Biotechnologia Acta*. 2021;14(1):4-15. https://doi.org/10.15407/biotech14.01.005. *(Особисто дисертантом висунуто наукову ідею та проведено узагальнення літературних даних).*

– статті у наукових періодичних виданнях інших держав, в т.ч., що входять до міжнародних наукометричних баз:

21. **Tykhomyrov AA**, Shram SI, Grinenko TV. The role of angiostatins in diabetic complications. *Biochemistry (Supplement Series B Biomedical Chemistry)*. 2014;8(2):94-107. https://doi.org/10.1134/S1990750814020140. *(Scopus Q4) (Особисто дисертантом проведено літературний пошук та узагальнення даних, написання та оформлення статті).*

22. **Tykhomyrov AA**, Nedzvetsky VS, Bardachenko NI, Grinenko TV, Kuryata OV. Statin treatment affects serum angiostatin levels in patients with ischemic heart disease. *Life Sciences*. 2015;134:24-29. doi: 10.1016/j.lfs.2015.05.008. *(Scopus Q1) (Особисто дисертантом проведено експериментальні дослідження, виконано статистичний аналіз даних та їх інтерпретування, формулювання висновків, підготовку ілюстративного матеріалу та написання статті).*

23. Guzyk MM, **Tykhomyrov AA**, Nedzvetsky VS, Prischepa IV, Yanitska LV, Grinenko TV, Kuchmerovska TM. Poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) inhibitors reduce reactive gliosis and improve angiostatin levels in retina of diabetic rats. *Neurochemical Research*. 2016;41(10):2526-2537. https://doi.org/10.1007/s11064-016-1964-3. *(Scopus Q1) (Особисто дисертантом проведено імунохімічні дослідження, інтерпретування та обговорення отриманих даних, формулювання наукової концепції та висновків, написання статті).*

24. **Tykhomyrov A**, Nedzvetsky V, Shemet S, Ağca CA. Production and characterization of polyclonal antibodies to human recombinant domain B-free anti-hemophilic factor VIII. *Turkish Journal of Biology*. 2017;41(6):857-867. DOI: 10.3906/biy-1704-10. *(Scopus Q2) (Особисто дисертантом проведено експериментальні дослідження, їх інтерпретування та обговорення отриманих результатів, формулювання висновків, підготовку ілюстративного матеріалу та написання статті).*

25. **Tykhomyrov AA**, Nedzvetsky VS, Zabida AA, Ağca CA, Kuryata OV. L-arginine treatment improves angiogenic response and reduces matrix metalloproteinase activity in chronic heart failure patients with coronary artery disease. *PharmaNutrition*. 2018;6(4):137-146. https://doi.org/10.1016/j.phanu.2018.06.005. *(Scopus Q2) (Особисто дисертантом проведено експериментальні дослідження, виконано статистичний аналіз даних, їх інтерпретування та обговорення, формулювання наукової концепції та висновків, підготовку ілюстративного матеріалу та написання статті).*

26. Ağca CA, Kırıcı M, Nedzvetsky VS, Gundogdu R, **Tykhomyrov AA**. The effect of TIGAR knockdown on apoptotic and epithelial- mesenchymal markers expression in doxorubicin- resistant non- small cell lung cancer A549 cell lines. *Chemistry & Biodiversity*. 2020;17(9):e2000441. DOI: 10.1002/cbdv.202000441. *(Scopus Q2) (Дисертант особисто брав участь в інтерпретуванні та обговоренні результатів досліджень, написанні статті).*

Наукові праці, які додатково відображають наукові результати дисертації

– монографії:

27. Петренко О.М., Безродний Б.Г., Зубов Д.О., Васильєв Р.Г., **Тихомиров А.О.** Модуляція активності матриксних металопротеїназ як ключової ланки патофізіології хронічних ран / У книзі «Застосування інноваційних технологій в хірургічному лікуванні гнійно-некротичних ран м'яких тканин (монографія)». Київ: LAT & K; 2018; 103-157. *(Особисто дисертантом проведено аналіз джерел літератури, проведення біохімічних досліджень, обробку отриманих результатів, написання та оформлення публікації).*

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

– тези та матеріали конференцій:

28. Тихомиров АО, Юсова ОІ, Корса ВВ, Діордієва СІ. Одержання антитіл до кринглу 1-3 плазміногену (ангіостатину) та перспективи їх біомедичного використання // Фізіологія: від молекул до організму: Матеріали Всеукраїнської наукової конференції молодих учених, м. Київ, 20-21 жовтня 2011 р. – с. 38.

29. Тихомиров АА, Корса ВВ, Диордиева СИ, Лайкова ЕВ. Использование антител к фрагменту плазминогена К1-3 для определения ангиостатинов в биологическом материале // Біологія: від молекули до біосфери: Матеріали VI Міжнародної конференції молодих вчених, Харків, 21-24 листопада 2011 р. – с. 24.

30. Тихомиров АА, Юсова ЕИ, Жерносеков ДД, Диордиева СИ, Рока-Мойя ЯМ, Гриненко ТВ. Ангиостатины: генерация и роль в норме и патологиях, ассоциированных со старением // Біологічні механізми старіння: Матеріали X Міжнародного симпозіуму, Харків, 16-19 травня 2012 р. – с. 21-22.

31. Tykhomyrov AA, Roka-Moya YM, Diordieva SI, Grinenko TV. Towards the mechanism of anti-aggregating activity of plasminogen: disruption of platelet actin cytoskeleton by Lys-form of plasminogen // Experimental and Theoretical

Biophysics: International Conference for Young Scientists, Puschino, Russia, 22-24 October 2012. – с. 34-35.

32. Рока-Мойя ЯМ, Тихомиров АА, Гриненко ТВ. Влияние Лиз-плазминогена на агрегацию и секрецию тромбоцитов // Experimental and Theoretical Biophysics: International Conference for Young Scientists, Puschino, Russia, 22-24 October 2012. – с. 12.

33. Тихомиров АО, Митропан МП, Діордієва СІ, Рока-Мойя ЯМ. Lys-плазміноген інгібує реконструкцію актинового цитоскелету тромбоцитів // Молодь і поступ біології: Матеріали IX Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів, Львів, 2013 р. – с.374.

34. Mytropan MP, Roka-Moya YM, Diordieva SI, Shtal YP, Tykhomyrov AA. Lys-plasminogen, but not Glu-form, inhibits reorganization of actin cytoskeleton in platelets // Experimental and Theoretical Biophysics: International Conference for Young Scientists, Puschino, Russia, 21-26 April 2013. – p. 171-172.

35. Tykhomyrov AA, Diordieva SI, Roka-Moya YM, Grinenko TV. Thrombin-induced exposition of actin on the platelet membrane // Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології: Матеріали Другої Міжнародної наукової конференції, м. Дніпропетровськ, 24-25 вересня 2013 р. – с. 89.

36. Рока-Мойя ЯМ, Діордієва СІ, Горошко АО, Тихомиров АО. Залучення актину, експонованого на поверхні плазматичної мембрани тромбоцитів, у зв'язуванні та процесінгу плазміногену // Актуальні проблеми біохімії та біотехнології: Матеріали Конференції молодих вчених, м. Київ, 29-30 травня 2014 р. – с. 17.

37. Guzyk M, Tykhomyrov A, Kuchmerovska T. Attenuation of reactive gliosis in retinas by PARP-1 inhibitors treatment under diabetes in rats. //50th Meeting of the European Association for the Study of Diabetes, Vienna, Austria, 15-19 September 2014 – p. 126.

38. Гриненко ТВ, Жерносєков ДД, Тихомиров АО, Юсова ОІ. Нові уявлення про фізіологічну та патофізіологічну роль // XI Український біохімічний конгрес: Укр. Біохім. Ж., Київ, 6-10 жовтня 2014 р. – с. 21.

39. Bilous V, Roka-Moiia Y, Zhernossekov D, Tykhomyrov A, Diordieva S, Grinenko T. Lys-plasminogen affects platelet secretion and cytoskeleton rearrangement // 40-th FEBS Congress: FEBS Journal, Berlin, Germany, 4-9 July, 2015 – 282 (Suppl. 1) – p. 103.

40. Guzyk M, Tykhomyrov A, Nedzvetsky V, Prischepa I, Grinenko T, Kuchmerovska T. Poly(ADP-ribose)polymerase-1 (PARP-1) inhibitors alleviate reactive gliosis and recover angiostatin expression in retina of diabetic rats // Current Problems of Biochemistry and Cell Biology: The 3rd International Scientific conference, Dniepropetrovsk, Ukraine, 24-25 September 2015 – p. 28-30.

41. Tykhomyrov A, Zhernosekov D, Roka-Moya Y, Grinenko T. Platelet-induced generation of angiostatins: a putative role for surface-exposed actin // Current Problems of Biochemistry and Cell Biology: The 3rd International Scientific conference, Dniepropetrovsk, Ukraine, 24-25 September 2015. – p. 47-48.

42. Жерносеков ДД, Рока-Мойя ЯМ, Тихомиров АА, Гриненко ТВ. Регуляция функциональной активности тромбоцитов человека компонентами плазминоген/плазминовой системы // Современные проблемы естествознания в науке и образовательном процессе: Матеріали Міжнародної науково-практичної конференції, Мінськ, Республіка Білорусь, 22-23 жовтня 2015 р. – с. 16-17.

43. Рока-Мойя ЯМ, Корса ВВ, Гузик ММ, Тихомиров АО, Жерносєков ДД. Плазміноген модулює зв’язування екзогенного анексину V тромбоцитами людини // Актуальні проблеми біохімії та біотехнології: Матеріали конференції молодих вчених, Київ, 26-27 травня 2016 р. – с. 114.

44. Tykhomyrov AA, Ağca CA, Nedzvetsky VS, Guzyk MM, Korsa VV, Grinenko TV. Plasminogen/plasmin effects on A549 cells: from p53-induced apoptosis to angiostatin generation // Current Problems of Biochemistry and Cell Biology: The IVth International Scientific Conference, Dnipro, 5-6 October, 2017. – p. 80-82.

45. Tykhomyrov A, Nedzvetsky V, Shemet S, Ağca CA. Polyclonal antibodies to domain B-free recombinant anti-hemophilic factor VIII: production, characterization and possible biomedical applications // «Биотехнология:

достижения и перспективы развития»: Матеріали II Міжнародної науково-практичної конференції, Пінськ, РБ, 7-8 грудня 2017 р. – р. 111-113.

46. Tykhomyrov AA, Nedzvetsky VS, Agca CA, Korsa VV, Grinenko TV. Immunohistochemical localization of plasminogen and its fragments in rat brain: the novel role for astrocytes in angiostatin generation // Матеріали VII Конгресу Українського товариства нейронаук, Київ, 7-11 червня 2017 р. – с. 56.

47. Петренко ОМ, Тихомиров АО. Визначення вмісту регуляторів ангіогенезу та активності матриксних металопротеїназ у хронічній виразці шкіри за синдрому Марторелла // Матеріали XVIII конференції «Клініко-технологічні виклики в етапній та реконструктивній хірургії. Вогнепальні та побутові рани, електрозварювання та з'єднання живих тканин, діабетична стопа», м. Київ, 29-30 листопада 2018 р. – с. 44.

48. Horak I, Skaterna T, Gerashchenko D, Tykhomyrov A, Khudiakova O, Drobot L. Knockdown of the adaptor protein Ruk/CIN85 in 4T1 and LLC adenocarcinoma cells results in increased expression levels and activities of MMP-2 and MMP-9, associated with elevated production of angiostatins and suppression of invasion potential // Simposium and Summer School "Fundamental Principles of Cancer Biotherapy", Kyiv, May 21-23, 2018: Experimental Oncology, 40 (2). – p. 162.

49. Tykhomyrov A, Zhernosekov D, Korsa V, Grinenko T. Does Lys-plasminogen make platelets anti-angiogenic? // Simposium and Summer School "Fundamental Principles of Cancer Biotherapy", Kyiv, May 21-23, 2018: Experimental Oncology, 40 (2). – p. 175.

50. Tykhomyrov AA, Nedzvetsky VS, Ağca CA, Guzyk MM, Grinenko TV. Plasminogen/plasmin affects expression of cell circle/apoptosis regulators and induces autophagy in A549 human lung cancer cells // Medical and Clinical Chemistry: XII Ukrainian Biochemical Congress, Ternopil, Sep. 30 – Oct. 4 2019 - Vol. 21, 3(80) – P. 140-141.

51. Tykhomyrov AA, Petrenko OM, Kolosovych IV, Bezrodnyi BG. Angiogenic regulators and MMP activity in trophic diabetic and hypertonic ulcers of

mild tissues // Medical and Clinical Chemistry: XII Ukrainian Biochemical Congress, Ternopil, Sep. 30 – Oct. 4 2019 - Vol. 21, 3(80) – P. 241.

52. Курята ОВ, Кушнір ЮС, Тихомиров АО, Віхрова ТО, Діброва МС. Функціональний стан ендотелію судин та рівень С-реактивного протеїну в пацієнтів з фібриляцією передсердь та гострим порушенням мозкового кровообігу // Український кардіологічний журнал: Матеріали XX Національного конгресу кардіологів, Київ, 25-27 вересня 2019 р. – Т. 26. – с. 146-147.

53. Петренко ОМ, Безродний БГ, Тихомиров АО. Роль матриксних металопротеїназ у процесах загоєння ран // Матеріали XIX конференції «Клініко-технологічні виклики в етапній та реконструктивній хірургії. Вогнепальні та побутові рани, електрозварювання та з'єднання живих тканин, діабетична стопа», Київ, 28-29 листопада 2019 р. – с. 42.

54. Zhovannyk VO, Tykhomyrov AA, Petrenko OM. Angiogenesis regulators and MMP activity in trophic and hypertonic ulcers of mild tissues // Конференція молодих вчених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології», Укр. Біохім. Ж., 91 (2). – с. 87.

55. Воробйов А, Тихомиров А. Вплив плазміноген-плазмінової системи на лінії клітин аденокарцином легень А549 // «Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології»: Матеріали V Міжнародної наукової конференції, Дніпро, 1-2 жовтня, 2020 – с. 152-153.

ЗМІСТ

с.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ…….. 29

ВСТУП…… 31

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ…… 41

1.1. Загальна характеристика протеїнів плазміноген/плазмінової системи…… 41

1.2. Протеїни плазміноген/плазмінової системи як регулятори функціонального стану клітин…….. 67

1.2.1. Рецептори плазміногену…… 68

1.2.2. Регулювання запальних процесів протеїнами плазміноген/плазмінової системи …… 74

1.2.3. Протеїни плазміноген/плазмінової системи в функціонуванні тромбоцитів…… 80

1.2.4. Залучення протеїнів плазміноген/плазмінової системи до регулювання пухлинного росту та метастазування……... 94

1.2.5. Роль протеїнів плазміноген/плазмінової системи в розвитку серцево-судинних захворювань (ССЗ)……. 107

1.2.6. Участь протеїнів плазміноген/плазмінової системи у загоєнні ран……. 113

1.3. Ангіостатини – нові компоненти плазміноген/плазмінової системи……

1.3.1. Відкриття та дослідження властивостей ангіостатинів: історія питання…… 119

1.3.2. Механізми утворення ангіостатинів…….... 122

1.3.3. Механізми біологічної дії ангіостатинів, клітинні мішені та рецептори……... 131

1.3.4. Ангіостатини як маркери патологічних станів…… 142

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ……... 145
2.1. Обладнання……. 145
2.2. Реактиви та матеріали…….. 146
2.3. Визначення кількості загального протеїну…….. 147
2.4. Виділення та очищення плазміногену та його фрагментів…... 149
2.4.1. Отримання Glu-плазміногену людини на Lys-сефарозі 4В 149
2.4.2. Одержання Lys-плазміногену з фракції $III_{2,3}$ плазми крові за Коном…….. 151
2.4.3. Отримання плазміногену щура……. 152
2.4.4. Еластоліз плазміногену людини та очищення його фрагментів (ангіостатинів)…… 153
2.4.5. Синтез імуноафінного сорбенту К1-3-сефарози……. 158
2.5. Продукція та характеристика антитіл…….. 159
2.5.1. Отримання антитіл проти фрагменту плазміногену К1-3 (ангіостатину)…….. 160
2.5.2. Імунохімічна характеристика антитіл проти К1-3…….. 163
2.5.3. Отримання антитіл проти плазміногену щура…… 169
2.5.4. Отримання антитіл проти сироваткового альбуміну людини……. 170
2.6. Визначення амідолітичної активності плазміну……. 171
2.7. Електрофоретичні методи……... 172
2.7.1. Гель-електрофорез у PAAG за присутності SDS…… 172
2.7.2. Електрофорез за низьких значень pH……... 173
2.7.3. Ензим-форез (желатинова зимографія)…… 174
2.8. Імунохімічні методи…….. 175
2.8.1. Імуноензимний аналіз (ІЕА)…….. 175
2.8.2. Імуноблотинг…….. 175
2.8.3. Імуноцитохімія……... 177
2.8.4. Імуногістохімія……... 178

2.8.5. Протокова цитофлуориметрія…… 179
2.9. Дослідження впливу плазміногену на функціональну активність тромбоцитів людини……... 179
2.9.1. Отримання відмитих тромбоцитів людини……. 179
2.9.2. Дослідження стану актинового цитоскелету тромбоцитів 181
2.9.3. Визначення Р-селектину на поверхні тромбоцитів……. 183
2.9.4. Вивчення зв'язування плазміногену з експонованим актином на тромбоцитах (binding assay)…….. 186
2.9.5. Дослідження фрагментації плазміногену тромбоцитами за різного функціонального стану…… 188
2.9.6. Дослідження впливу плазміногену на вивільнення VEGF тромбоцитами……. 190
2.9.7. МТТ-тест (оцінка метаболічної активності тромбоцитів) 191
2.9.8. Визначення рівнів активних форм оксигену (АФО) в тромбоцитах (DCF-тест)…… 192
2.10. Клітини та клітинні лінії…… 193
2.10.1. Отримання первинної культури астроцитів головного мозку щура…….. 193
2.10.2. Дослідження продукування ангіостатинів астроцитами головного мозку щура *in vitro*……... 194
2.10.3. Культивування клітин аденокарциноми легені А549…... 195
2.10.4. Отримання клітинних сублініій зі зміненою експресією протеїну TIGAR та Ruk/CIN85…….. 199
2.10.5. Визначення міграційної активності клітин А549 з різним рівнем експресії протеїну TIGAR (скретч-тест)……. 201
2.11. Отримання зразків сітківки ока щурів з експериментальною СТЗ-індукованою гіперглікемією та за її корекції з використанням інгібіторів PARP-1…… 201
2.12. Клінічний та патологічний матеріал……...…… 203

2.12.1. Зразки доброякісних новоутворень грудної залози та матки…… 203
2.12.2. Тканина та ексудат хронічних ран м'яких тканин…… 204
2.12.3. Сироватка крові пацієнтів за фармакотерапії серцево-судинних захворювань (ССЗ)…… 207
2.13. Методи статистичної обробки результатів……. 213
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ…… 215
3.1. Реципрокні взаємодії протеїнів плазміноген/плазмінової системи з тромбоцитами. Механізми модулювання плазміногеном ангіогенної функції тромбоцитів..... 215
3.1.1. Перебудови актинового цитоскелету тромбоцитів за дії Glu-та Lys-плазміногену…… 215
3.1.2. Вплив плазміногену на екзоцитоз α-гранул тромбоцитів та експонування Р-селектину…… 223
3.1.3. Вплив плазміногену на вивільнення VEGF тромбоцитами……. 230
3.1.4. Експонування актину тромбоцитами……... 240
3.1.5. Участь експонованого актину в зв'язуванні плазміногену тромбоцитами……. 247
3.1.6. Механізм утворення ангіостатинів тромбоцитами……. 254
3.1.7. Вплив плазміногену на метаболічну активність тромбоцитів *ex vivo* та генерування активних форм оксигену (АФО) 264
Висновки до підрозділу 3.1……. 271
Основні праці здобувача, опубліковані за матеріалами підрозділу 3.1…….. 272
3.2. Роль протеїнів плазміноген/плазмінової системи в процесах малігнізації та неопластичного росту…….. 274
3.2.1. Вплив плазміноген/плазміну на апоптоз/автофагію в пухлинних клітинах *in vitro*……...…… 274

3.2.2. Регулювання ангіостатинами міграційної активності пухлинних клітин……... 303

3.2.3. Утворення ангіостатинів за розвитку доброякісних новоутворень матки та грудної залози……. 315

Висновки до розділу 3.2……... 322

Основні праці здобувача, опубліковані за матеріалами підрозділу 3.2…….. 324

3.3. Ангіостатини як регулятори та маркери патологічних станів 325

3.3.1. Ангіостатини за розвитку ускладнень цукрового діабету.. 325

3.3.1.1. Рівень ангіостатинів та активність протеїназ у трофічних виразках м'яких тканин пацієнтів з цукровим діабетом II типу…….. 325

3.3.1.2. Ангіостатини у сітківці ока щурів за експериментальної гіперглікемії та застосування інгібіторів PARP-1 344

3.3.2. Ангіостатини за серцево-судинних захворювань та їхньої фармакокорекції…….. 361

3.3.2.1. Визначення ангіостатинів у сироватці крові пацієнтів з ішемічною хворобою серця за терапії з використанням симвастатину……. 362

3.3.2.2. Вплив L-аргініну на вміст регуляторів ангіогенезу та активність ММР у крові пацієнтів з хронічною серцевою недостатністю та ішемічною хворобою серця (ІХС)……... 369

3.3.2.3. Вплив цитіколіну на рівень ангіостатину в сироватці крові пацієнтів з гострим ішемічним інсультом та фібриляцією передсердь……... 378

Висновки до підрозділу 3.3……. 390

Основні праці здобувача, опубліковані за матеріалами підрозділу 3.3…….. 391

РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ……... 394
ВИСНОВКИ……... 400
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ЛІТЕРАТУРИ……... 403
ДОДАТКИ……... 475

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

6-АГК – 6-аміногексанова кислота;

АФО – активні форми оксигену;

ВООЗ – Всесвітня організація охорони здоров’я;

Г/г – гіперглікемія;

ГЕБ – гематоенцефалічний бар’єр;

ГРБ – гематоретинальний бар’єр;

ДАБ – діамінобензидин;

ДР – діабетична ретинопатія;

ЕДТК – етилендіамінтетраоцтова кислота;

ЕМП – епітелійно-мезенхімний перехід;

ЕЦМ – екстрацелюлярний матрикс;

ІХС – ішемічна хвороба серця;

ПФА – параформальдегід;

САП – система активації плазміногену;

ССЗ – серцево-судинні захворювання;

СТЗ – стрептозотоцин;

ФП – фібриляція передсердь;

α_2AP - α2-антиплазмін;

AGE – кінцеві продукти глікування;

AS – ангіостатини;

BDGF – нейротрофічний фактор мозку;

bFGF – основний фактор росту фібробластів;

BSA – бичачий сироватковий альбумін;

Col – колаген;

CU – казеїнолітична одиниця;

EGF – епідермальний фактор росту;

ELISA – імуноензимний аналіз;

GFAP – гліальний фібрилярний кислий протеїн;

GP – глікопротеїн;

HIF-1 – гіпоксія-індуцибельний фактор росту;

HSA – сироватковий альбумін людини;

HUVEC – ендотелійні клітини пупкової вени людини;

IGF – інсуліноподібний фактор росту;

К – крингл;

LBS – лізинзв'язуючі сайти;

LC3 - microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3;

M_m – молекулярна маса;

MMP – матриксні металопротеїнази;

NF-κb – ядерний фактор κb;

PAAG – поліакриламідний гель;

PAI – інгібітор активатору плазміногену;

PBS – забуферений фізіологічний розчин;

PBST – забуферений фізіологічний розчин, що містить Triton X-100;

PDGF – фактор росту тромбоцитарного походження;

PEDF – пігментний фактор епітеліального походження;

Pg – плазміноген;

PKC – протеїнкіназа С;

Pm – плазмін;

PSA – персульфат амонію;

SDS – додецилсульфат натрію;

TGF-β – трансформуючий фактор росту-β;

TIGAR - TP53 induced glycolysis regulatory phosphatase;

Thr – тромбін;

TIMPs – тканинні інгібітори MMPs;

t-PA – тканинний активатор плазміногену;

u-PA – активатор плазміногену урокіназного типу (урокіназа);

u-PAR – рецептори u-PA;

VEGF – фактор росту судинних ендотелійних клітин.

ВСТУП

Актуальність теми. Глікопротеїн плазміноген є неактивним попередником плазміну (EC 3.4.21.7) – серинової протеїнази широкого спектру дії, канонічною функцією якої є руйнування фібринових згустків [100, 106]. Втім, крім фібринолізу, протеїни плазміноген/плазмінової системи як самостійні сигнальні молекули регулюють цілу низку найважливіших клітинних процесів, а саме: проліферацію, адгезію, міграцію, клітинний цикл та апоптоз, екзо- та ендоцитоз, епітелійно-мезенхімний перехід тощо [265, 378]. Така мультифункціональність плазміноген/плазмінової системи визначає її провідну роль у перебігу широкого кола фізіологічних та патофізіологічних процесів, зокрема, ремоделюванні структури тканин, загоєнні ран, ангіогенезі, заплідненні та ембріогенезі, синаптичній пластичності, запаленні, фіброзі, прогресії пухлин та метастазуванні [153, 191, 202]. Порушення регулювання роботи цієї системи протеїнів призводить до розвитку найбільш загрозливих патологічних станів, передусім, серцево-судинних захворювань, онкологічних хвороб та ускладнень цукрового діабету [36, 493, 496]. Особливої актуальності дослідження плазміноген/плазмінової системи набуває у зв’язку з розвитком всесвітньої пандемії коронавірусної хвороби COVID-19 [9]. Плазмін є одним з протеолітичних ензимів, які забезпечують проникнення вірусу SARS-CoV-2 до клітини-хазяїна, а також бере участь у патогенезі багатьох ускладнень цієї хвороби [295, 420].

Реципрокні взаємодії між протеїнами плазміноген/плазмінової системи і тромбоцитами є «точкою перетину» клітинної та молекулярної ланок гемостазу, що забезпечує регулювання як інтенсивності тромбоутворення, так і швидкості фібринолізу [244]. Значно менше відомо про участь тромбоцитів у регулюванні імунних та репаративних процесів, ангіогенезу та росту пухлин [65], що визначає актуальність з’ясування ролі плазміногену в модулюванні фізіологічних функцій цих формених елементів крові. Зокрема, незрозумілим залишається функціональне значення конвертації нативної (Glu-) форми зимогену на Lys-форму на поверхні плазматичної мембрани клітин, у тому

числі, тромбоцитів, саме в контексті виконання Lys-плазміногеном специфічних регуляторних функцій [689].

Плазмін(оген) відіграє ключову роль у процесах, асоційованих зі злоякісною трансформацією клітин, ростом пухлин та метастазуванням. Так, надекспресія протеїнів системи активації плазміногену, а також відповідних клітинних рецепторів, часто спостерігається в пухлинних клітинах та є несприятливою ознакою перебігу захворювання на рак. Відносний рівень експресії цих протеїнів корелює із прогресією пухлин, здатністю клітин до інвазії та метастатичним потенціалом [266, 407, 533]. Плазмін, що утворюється на поверхні злоякісно трансформованих клітин, є проміграційним фактором, який руйнує адгезивні контакти та розщеплює протеїни позаклітинного матриксу, сприяючи подальшій міграції, інвазії та утворенню метастазів. На відміну від більшості нормальних адгезованих клітин, в яких після втрати адгезивності запускаються механізми апоптозу/аноікісу, клітини солідних пухлин здатні виживати тривалий час за умов існування в неприкріпленому стані [161]. Розкриття механізмів резистентності пухлинних клітин до апоптозу/аноікісу є важливим для розроблення нових ефективних антиметастатичних препаратів.

Окремі продукти обмеженого протеолізу плазмін(оген)у, що містять різну кількість кринглових доменів (К1–3, К2–3, К1–4, К1–4,85, К1–5, К5), відомі під назвою ангіостатини, привертають до себе особливу увагу у зв’язку зі здатністю виконувати специфічні біологічні функції [636]. Показано, що різні варіанти ангіостатинів специфічно інгібують проліферацію та міграцію ендотеліоцитів та запускають апоптоз у цих клітинах [109, 192, 370, 575]. Ангіостатини є одними з найбільш потужних ендогенних супресорів неоваскуляризації й метастазування солідних злоякісних пухлин [466]. Про значно ширшу біологічну роль ангіостатинів свідчить той факт, що утворення цих протеїнів здійснюється не лише клітинами пухлин, але й деякими нормальними клітинами [505]. Однак, недостатньо дослідженим залишається питання про залучення ангіостатинів до змін локального ангіогенного балансу,

які призводять до активації або пригнічення ангіогенезу в тканинах. Наприклад, надмірна неоваскуляризація сітківки ока є ключовою патогенетичною ланкою розвитку діабетичної ретинопатії [500]. Натомість, інгібування ангіогенезу в тканинах міокарду та головного мозку за ішемії може перешкоджати утворенню судин-колатералей [508]. Роль ангіостатинів у розвитку цих та інших патологічних станів залишається нез'ясованою, що зумовлює потребу в розробленні методичних підходів із визначення ангіостатинів у біологічному матеріалі й створенні відповідного концептуального базису. Вирішення цих питань відкриває перспективи використання ангіостатинів як релевантних діагностично-прогностичних маркерів широкого кола патологічних станів, асоційованих із порушеннями ангіогенезу, а також як засобів їхньої корекції.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертація відповідає основному плану науково-дослідних робіт відділу хімії та біохімії ферментів Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України: теми «Молекулярні механізми функціонування ензимів системи гемостазу» (№ державної реєстрації 0110U002701, 01.01.2010–31.12.2012 рр.), «Розробка діагностикумів для тестування стану системи руйнування тромбів» (№ державної реєстрації 0113U00364, 01.01.2012–31.12.2015 рр.), «Механізми регуляції плазміноген/плазміном міжмолекулярних та міжклітинних взаємодій в системі гемостазу за норми та патології» (№ державної реєстрації 0113U003203, 01.01.2013–31.12.2017 рр.), «Механізми регуляції внутрішньоклітинних сигнальних мереж, міжклітинних та міжмолекулярних взаємодій» (№ державної реєстрації 0112U002624, 01.01.2012–31.12.2016 рр.), «Біохімічні механізми контролю системних міжклітинних взаємодій, регулювання сигнальних мереж та клітинних функцій за умов норми та патологічних станів» (№ державної реєстрації 0117U004344, 01.01.2017 – 31.12.2021 рр.), «Молекулярні та клітинні механізми реалізації дії плазміноген/плазмінової системи за норми та патології» (№ державної реєстрації 0118U000377, 01.01.2018–31.12.2022 рр.), «Дослідити протеїни

системи активації плазміногену у контролі малігнізації пухлинних клітин» (№ державної реєстрації 0120U000016, 2020–2021 рр.).

Мета і завдання дослідження. Метою дисертаційної роботи було з'ясувати роль плазмін(оген)у в регулюванні функціональної активності тромбоцитів та злоякісно трансформованих клітин та встановити значення ангіостатинів як діагностичних та прогностичних маркерів різних патологічних станів. Для досягнення поставленої мети в дисертаційні роботі було поставлено наступні завдання:

1. Дослідити вплив різних форм плазміногену на агоніст-індуковані перебудови актинового цитоскелету тромбоцитів та експонування Р-селектину як маркера екзоцитозу α-гранул.

2. З'ясувати регуляторну роль плазміногену в реалізації ангіогенної функції тромбоцитів через його вплив на вивільнення фактора росту ендотелійних клітин (VEGF) та утворення ангіостатинів de novo, визначити залежність цих процесів від функціонального стану тромбоцитів.

3. Вивчити вплив плазмін(оген)у на автофагію та регулювання сигнальних шляхів у пухлинних клітинах як механізмів їхньої резистентності до апоптозу/аноікісу.

4. Дослідити здатність доброякісних новоутворень міометрію матки та грудної залози, а також аденокарциномних клітин продукувати ангіостатини, з'ясувати вплив цих протеїнів на основні ознаки малігнізації.

5. Визначити зв'язок між утворенням ангіостатинів та загоєнням хронічних ран м'яких тканин за цукрового діабету II типу та гіпертонічної хвороби (синдром Марторелла).

6. Проаналізувати кількісні зміни ангіостатинів у сітківці ока щурів за експериментальної гіперглікемії та її корекції із застосуванням інгібіторів ензиму PARP-1.

7. Визначити рівні ангіостатинів у сироватці крові пацієнтів із серцево-судинними захворюваннями та їхньої фармакотерапії й оцінити діагностично-прогностичне значення ангіостатинів.

Об'єкт дослідження – механізми регулювання протеїнами плазміноген/плазмінової системи функціональної активності тромбоцитів, виживання й міграції пухлинних клітин, залучення ангіостатинів до розвитку патологічних станів, асоційованих з неопластичним ростом, ускладненнями цукрового діабету та серцево-судинними захворюваннями.

Предмет дослідження – протеїни плазміноген/плазмінової системи як регулятори клітинних процесів та маркери патологічних станів.

Методи дослідження: фізико-хімічні та молекулярно-біологічні (технологія siRNA, гель-електрофорез, ензим-форез, афінна хроматографія, гель-проникна хроматографія, протокова цитофлуориметрія, конфокальна лазерна сканувальна мікроскопія, спектрофотометрія), ензиматичні методи, методи хімічної модифікації протеїнів, імунохімічні методи (імунізація тварин та отримання імунних сироваток, імуно-ензимний аналіз, імуноблотинг, імуноцитохімія, імуногістохімія), методи клітинної біології (отримання та робота з тромбоцитами ex vivo, культивування клітинних ліній), статистичний аналіз.

Наукова новизна отриманих результатів. У дисертаційному дослідженні отримано нові дані стосовно залучення Lys-плазміногену до регулювання функціонального стану тромбоцитів. Вперше встановлено, що інгібіторні ефекти Lys-плазміногену на агрегацію тромбоцитів реалізуються через порушення агоніст-індукованих перебудов актинового цитоскелету та пригнічення вивільнення α-гранул. Доведено, що Lys-плазміноген послаблює ангіогенну функцію тромбоцитів через інгібування агоніст-індукованого вивільнення VEGF та генерування ангіостатинів. Продемонстровано залежність здатності тромбоцитів утворювати ангіостатини від функціонального стану клітин. Вперше запропоновано механізм генерування ангіостатинів на поверхні плазматичної мембрани активованих тромбоцитів за участі експонованого актину. Отримано оригінальні дані стосовно механізмів залучення плазміноген/плазміну до регулювання виживання та рухливості пухлинних клітин аденокарциноми легені. Вперше показано, що одним з

механізмів набуття пухлинними клітинами резистентності до плазмін-індукованого апоптозу/аноікісу, є індукція репаративної автофагії. Новими є дані щодо індукування плазміном синтезу регуляторного ензиму TP53-inducible glycolysis and apoptosis regulator (TIGAR), який має важливе значення в підтриманні міграційної активності клітин аденокарциноми легені. Визначено зворотну залежність між здатністю клітин аденокарциноми грудної залози продукувати ангіостатини та їхнім міграційним/інвазійним потенціалом. Значно розширено уявлення про участь ангіостатинів у процесах неопластичного росту завдяки новим даним про роль цих протеїнів як негативних регуляторів запальних процесів та проліферації в гіперпластичних тканинах доброякісних новоутворень матки та грудної залози.

Вперше показано асоціацію між змінами рівнів ангіостатинів з розвитком ускладнень цукрового діабету та серцево-судинних хвороб. Встановлено, що стан хронічної гіперглікемії сприяє зниженню рівнів ангіостатинів у сітківці ока щурів, що може робити внесок до розвитку діабетичної ретинопатії. Вперше продемонстровано, що одними з клітин, які відповідають за конститутивне генерування ангіостатинів у нервовій тканині, є астроцити. Показано, що підвищений рівень ангіостатинів та надмірна активність ММР є факторами, що сповільнюють загоєння ран. Новизну роботи також визначають дані стосовно того, що фармакодинамічні властивості деяких кардіо- та нейропротекторних препаратів реалізуються через зміни рівня ангіостатинів у пацієнтів із серцево-судинними захворюваннями (ішемічною хворобою серця, фібриляцією передсердь та гострим порушенням мозкового кровообігу).

Практичне значення отриманих результатів. Отримані експериментальні дані формують підґрунтя для використання Lys-плазміногену з метою створення нових антитромботичних засобів для профілактики та лікування станів, асоційованих з надмірною активацією тромбоцитів. Інгібувальний вплив Lys-плазміногену на секрецію тромбоцитів, зокрема, на вивільнення тромбоцитарного VEGF, може знайти застосування в терапії онкологічних хвороб для обмеження ангіогенезу в солідних пухлинах.

Розроблені й застосовані у дисертаційному дослідженні підходи для визначення ангіостатинів у біологічному матеріалі із використанням імунохімічних методів значно розширюють спектр можливого застосування цих протеїнів як діагностико-прогностичних маркерів різних патологічних станів. Зокрема, ангіостатини можуть бути використані як маркери ступеня малігнізації ракових пухлин та предиктори розвитку доброякісних новоутворень. Кількісний аналіз ангіостатинів може бути корисним для моніторингу загоєння хронічних ран. Визначення вмісту циркулюючих ангіостатинів у сироватці крові може слугувати чутливим показником ефективності фармакотерапії патологій серцево-судинної системи.

Дані стосовно активації автофагії як одного з механізмів набуття пухлинними клітинами стійкості до апоптозу/аноікісу, індукованого плазміном, можуть бути використані для розроблення принципово нових терапевтичних стратегій, спрямованих на обмеження розвитку злоякісних новоутворень та метастазування. З'ясування важливої ролі мотогенного протеїну TIGAR у підтриманні плазмін-індукованої міграції має вагоме прикладне значення, яке полягає в можливості створення високоефективних протипухлинних та антиметастатичних препаратів. Результати дисертаційної роботи можуть бути використані для проведення лекційних курсів та лабораторних практикумів з таких дисциплін, як «Біохімія», «Біомедична хімія», «Молекулярна біологія», «Клітинна біологія» та «Біотехнологія» для студентів природничих факультетів.

Особистий внесок здобувача. Автором самостійно проведено критичний аналіз та узагальнення джерел наукової літератури стосовно функціонування протеїнів плазміноген/плазмінової системи, сплановано дизайн експериментальних досліджень. Дисертантом особисто виконано експериментальну частину роботи, проведено статистичний аналіз та наукову інтерпретацію отриманих результатів, їхнє узагальнення та оформлення висновків, написання наукових статей. Автор щиро вдячний науковому консультанту, пров. н. с., д.б.н. Гриненко Т. В. за допомогу в плануванні

експериментів, організації проведення досліджень, формулюванні основної концепції роботи, плідну дискусію в обговоренні отриманих результатів. Низка експериментальних досліджень проводилася разом зі співавторами опублікованих робіт, зокрема, співробітниками відділу хімії та біохімії ферментів Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАНУ. Отримання Glu-плазміногену людини та його протеолітичних фрагментів (ангіостатинів) та досліди з активації плазміногену пухлинними клітинами було проведено сумісно з к.б.н. Юсовою О.І. та к.б.н. Капустяненко Л.Г. Планування та проведення модельних експериментів з використанням тромбоцитів було виконано сумісно з д.б.н. Жерносєковим Д.Д. та к.б.н. Рока-Мойя Я.М. Генерування ангіостатинів пухлинними клітинами та вплив протеїнів плазміноген/плазмінової системи на міграційну та інвазійну активність пухлинних клітин вивчали сумісно із зав. відділу сигнальних механізмів клітин, проф., д.б.н. Дробот Л. Б. та к.б.н. Горак І. Р. Визначення вмісту ангіостатинів у тканинах доброякісних новоутворень грудної залози та матки проводили сумісно з проф., д.б.н. Вовчук І.Л. (Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова). Дослідження генерування ангіостатинів астрогліальними клітинами головного мозку щурів, а також визначення маркерів апоптозу/автофагії в пухлинних клітинах за умов впливу плазмін(оген)у проведено спільно з проф., д.б.н. Недзвецьким В.С. (Дніпровський національний університет ім. Олеся Гончара) та доцентом, доктором філософії Джан Алі Агджа (Університет Бінгол, Туреччина). Дослідження впливу інгібіторів PARP-1 на утворення ангіостатинів у сітківці ока щурів у моделі експериментальної гіперглікемії виконано сумісно з проф., д.б.н. Кучмеровською Т.М. та к.б.н. Гузиком М.М. (відділ біохімії вітамінів та коферментів Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАНУ). Визначення вмісту регуляторів ангіогенезу та активності матриксних металопротеїназ у хронічних ранах проведено у співпраці з д.м.н. Петренко О.М. (Національний медичний університет ім. О. О. Богомольця). Визначення рівнів ангіостатинів за розвитку серцево-судинних захворювань та їхньої фармакокорекції виконано спільно із

зав. каф. госпітальної терапії № 1 Дніпровського державного медичного університету, проф., д.мед.н. Курятою О. В.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації представлено на вітчизняних та міжнародних наукових конференціях, симпозіумах та конгресах: Всеукраїнській науковій конференції молодих учених «Фізіологія: від молекул до організму» (Київ, 2012), VI Міжнародній конференції молодих вчених «Біологія: від молекули до біосфери» (Харків, 2012), X Міжнародному симпозіумі «Біологічні механізми старіння» (Харків, 2012), Міжнародній конференції молодих учених «Експериментальна та теоретична біофізика» (Пущино, 2012), IX Міжнародній науковій конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2013), XVII Міжнародній Пущинській школі-конференції молодих вчених «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2013), II, III, IV та V Міжнародних наукових конференціях «Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології» (Дніпро, 2013, 2015, 2017, 2000), Конференціях молодих вчених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології» (Київ, 2014, 2016, 2019), 50th Meeting of the European Association for the Study of Diabetes (Відень, 2014), XI та XII Українському біохімічному конгресі (Київ, 2014; Тернопіль, 2019), 40-th FEBS Congress (Берлін, 2015), VII Конгресі Українського товариства нейронаук (Київ, 2017), Симпозіумі та літній школі «Fundamental Principles of Cancer Biotherapy» (Київ, 2018), XX Національному конгресі кардіологів (Київ, 2019), а також на наукових семінарах Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАНУ (2015, 2017).

Публікації. За результатами дисертаційної роботи опубліковано 55 друкованих праць, у тому числі 26 статей, з яких 20 у наукових фахових виданнях України (14 з яких індексуються у базі даних Scopus, квартиль Q4), 6 статей у фахових закордонних виданнях, з яких 2 віднесені до Q1, 3 – до Q2, 1 – до Q4 відповідно до класифікації CImago Journal & Country Rank, 1 розділ монографії та 28 тез доповідей на вітчизняних і міжнародних наукових конференціях, конгресах та симпозіумах.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається з анотації, вступу, основної частини, яка охоплює огляд літератури, методичну частину, результати власних досліджень (три підрозділи), узагальнення, висновків, переліку використаних джерел літератури (695 найменувань) та додатки. Роботу викладено на 488 сторінках друкованого тексту, проілюстровано 124 рисунками та 12 таблицями.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Загальна характеристика протеїнів плазміноген/плазмінової системи

До складу багатокомпонентної мультифункціональної системи плазміноген/плазміну входять серинова протеїназа плазмін (EC 3.4.21.7) – ключовий ензим фібринолітичного каскаду, його каталітично неактивний попередник-зимоген плазміноген, активатори плазміногену тканинного типу (t-PA), урокіназа (u-PA) та її клітинний рецептор (u-PAR), інгібітори активаторів плазміногену (PAI-1, PAI-2, PAI-3, нексин, нейросерпін), інгібітори плазміну (α_2-антиплазмін, α_2-макроглобулін, ТАФІ). Останнім часом протеолітичні фрагменти плазмін(оген)у, відомі як ангіостатини, також розглядаються як повноправні компоненти цієї системи, що здатні виконувати самостійні біологічні функції. Система плазміноген/плазміну активно досліджується у контексті функціонального взаємозв'язку її протеїнів та їхньої взаємодії між собою та іншими молекулярними системами та клітинами організму. Канонічна функція плазміногену та системи його активації – розчинення фібринових згустків, спрямована на перешкоджання внутрішньосудинного тромбозу та підтримку гемостатичного балансу (рис. 1.1) [10, 377]. Проте, протягом останніх десятирічь активно досліджується роль цих протеїнів не лише у фібринолізі, але й за інших фізіологічних та патофізіологічних процесів, в яких фібрин не бере безпосередньої участі або не відіграє домінувальної ролі: деградації екстрацелюлярного матриксу (ЕЦМ) та ремоделюванні тканин, запаленні та імунній відповіді, міграції клітин та загоєнні ран, ангіогенезі, заплідненні та ембріогенезі, синаптичній пластичності, атеросклерозі та інші серцево-судинних захворюваннях (ССЗ), пухлинному рості та метастазуванні, автоімунних захворюваннях, тощо [94, 376, 407, 409, 493, 498, 626]. Цілком природно, що через своє залучення до

регулювання цілої низки життєво важливих функцій ця «всюдисуща» система протеїнів стала об'єктом пильної уваги фахівців фундаментальних та прикладних галузей біохімії та біомедицини (кількість публікацій на червень 2021 року у науковій базі Pubmed за пошуковими словами 'plasminogen' становить 61153 посилань, 'plasmin' – 15527, 'angiostatin' – 989).

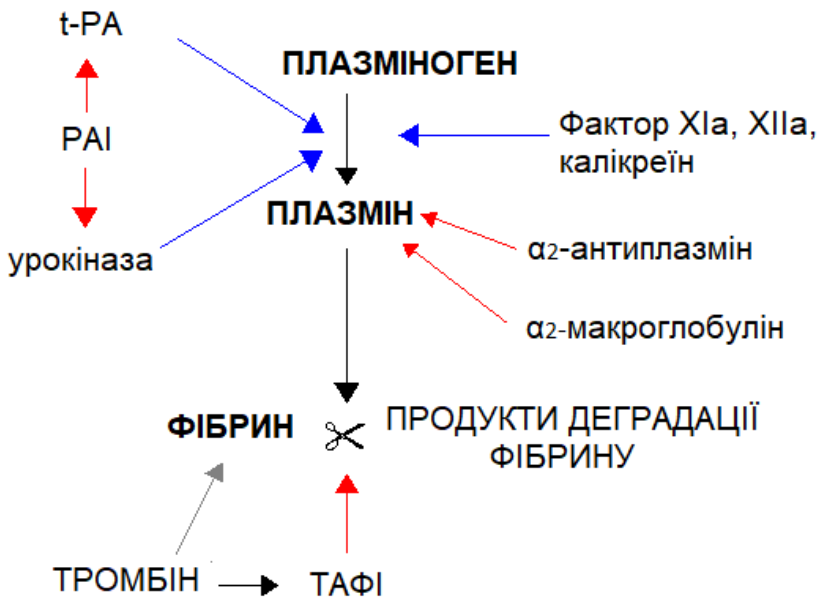

Рисунок 1.1 – Класична схема функціональних зв'язків між компонентами плазміноген/плазмінової системи у фібринолізі (синіми стрілками позначено активацію, червоними – інгібування) [104].

Плазміноген та його природні активатори належать до великої родини ензимів, які, як вважається, еволюційно походять від трипсиноподібної протеази широкого спектру субстратної специфічності, яка функціонувала у травному тракті хордових. Активний центр, розташований у серин-протеїназному домені (SPD) плазміну, сформований тріадою амінокислотних залишків His603, Asp646 та Ser741, та є гомологічний структурі активного центру трипсину. Спорідненість між плазміном та трипсином базується на подібності їхньої ензиматичної дії, а саме, здатності розщеплювати пептидні зв'язки, утворені карбоксильними групами L-Arg та L-Lys [649]. В основі еволюційної диверсифікації протеїнів плазміноген/плазмінової системи, як

вважається, лежить набуття трипсиноподібною протеазою декількох типів додаткових гомологічних структур, які, головним чином, кодуються окремими екзонами. Такі ензими набули здатності виконувати спеціалізовані функції у складі фібринолітичної системи. Поява в протеази п'яти доменів-кринглів дала початок еволюційного виокремлення плазміногену, тоді як структура з двома кринглами, одним пальцеподібним (finger-) доменом та одним EGF-доменом започаткувала тканинний активатор плазміногену. Вважається, що аналогічним чином виник й активатор урокіназного типу, який містить один крингловий та один EGF-домен [106].

Вперше у науковій літературі існування природної речовини-фібринолітика постулював Dastre у 1893 р., який описав фібриноліз як кінцеву стадію коагуляції, фізіологічною метою якої є розчинення полімеризованого фібрину. Але лише через 40 років після дослідження явища спонтанного фібринолізу було показано, що руйнування фібринового згустку прискорює невідомий агент, виділений з гемолітичного стрептококу. Автори відкриття дали йому назву «фібринолізин» (пізніше відомий як стрептокіназа), але молекулярний механізм його дії залишався загадкою до середини 40-х років, коли стало зрозумілим, що для прояву своєї фібринолітичної дії він потребує певної речовини з плазми. Такий плазмовий кофактор або зимоген мав активуватися фібринолізином для утворення протеолітично активного ензиму. Christensen у 1945 р. вперше ідентифікував профібринолізин (з 1946 р. отримав сучасну назву «плазміноген»), який пізніше був виділений у чистому вигляді Kline (1953 р.). Todd у 1959 р. виявив фібринолітичну активність у серозних клітин, ізольованих з перитонеальної та плевральної рідини людини. Наявність складної структури плазміногену, в основі будови якої лежать п'ять кільцевих, так званих кринглових (К) доменів, вперше довів Magnussen у 1975 р. (назва «kringle» походить від різновиду данського печива-кренделя). Astrup та Allbrechtsen у 1957 р. ізолювали активатори плазміногену з екстрактів серозної рідини фаллопієвих труб людини, перитонеальної рідини матки щурів та інших

джерел. У 1969 р. Pugatch та Poole відкрили речовини – інгібітори фібринолізу у перитонеальній рідині бика (див. огляд Keragala, 2021 [315]).

Розвиток сучасних технологій генного нокауту, дослідження на трансгенних тваринах та клітинних лініях дозволили встановити, що плазміноген/плазмінова система виконує цілу низку функцій та бере участь у низці процесів, еволюція, механізми та біологічне значення яких залишаються наразі вивченими недостатньо. Крім того, отримано значну кількість експериментальних даних, які доводять важливу модуляторну роль інших протеїназ, гормонів, цитокінів, змін концентрації внутрішньоклітинного пулу йонів кальцію та інших факторів у модулюванні синтезу плазміногену, зв'язування його з рецепторами на поверхні клітин та активації. Останній факт підкріплюється спостереженнями про участь плазмін(оген)у в регулюванні активності клітин (рухливості, міграції, адгезії, проліферації, диференціації, виживанні та апоптозу), що реалізується через специфічні шляхи внутрішньоклітинного сигналювання. Всебічне дослідження цих питань необхідне для розкриття молекулярних механізмів залучення плазмін(оген)у до низки патофізіологічних станів (пухлинного росту, запальних та інфекційних процесів, серцево-судинних патологій та їхніх ускладнень, автоімунних та ендокринних розладів, нейродегенеративних хвороб тощо), що може дозволити розробити нові підходи для їх фармакокорекції шляхом таргетингу окремих компонентів системи активації плазміногену або модулювання їхньої активності, а також використання протеїнів цієї системи як прогностично-діагностичних маркерів [231, 265, 329, 354, 379, 669, 685].

Функціонування плазмін(оген)у як ключового протеїну системи фібринолізу, так і регулятору клітинної активності, визначається фізико-хімічними особливостями молекул зимогену та ензиму та будовою їхніх окремих складових частин. Унікальні особливості молекулярної структури цих протеїнів забезпечують виконання ними життєво важливих біологічних функцій, які реалізуються через їхні взаємодії з молекулами фібрину та

іншими позаклітинними субстратами, активаторами, інгібіторами, а також клітинними рецепторами.

Плазміноген. Ген плазміногену локалізований у 6-й хромосомі у позиції q26-q27, довжина гену, що складається з 19 екзонів, становить 53,5 кб. Основне місце синтезу плазміногену – печінка, хоча його мРНК та власно транскрипт виявлені в клітинах інших органів та структур, зокрема, нирки, рогівки та міжклітинній рідині. У вигляді проензиму Glu-плазміноген циркулює в плазмі крові у відносно високій концентрації, що становить близько 2 μM (150 – 200 мг/л) (у новонароджених концентрація плазміногену є нижчою). Час напівжиття плазміногену складає 2,2 доби [421].

Нативна молекула плазміногену людини (Glu1-плазміноген – назва походить від N-термінальної амінокислоти) є одноланцюговим β-глобуліном з M_m 92 кДа, що складається з 791 амінокислотних залишків і містить 24 дисульфідних зв'язків і близько 2 % вуглеводів. На рисунку 1.2 наведено принципову схему будови молекули Glu-плазміногену, яка складається із семи головних доменів: N-термінального Pan-apple (PAp)-домену (Glu1–Lys77), п'яти послідовно розташованих гомологічних кринглових (K) доменів, побудованих з 80 амінокислотних залишків і з'єднаних між собою конекторними ділянками поліпептидної молекули Кринглові домени містять у своєму складі лізин-зв'язувальні сайти (LBS), які відповідають за взаємодію плазмін(оген)у з субстратом та клітинними рецепторами [354].

Специфічне розщеплення зв'язка Arg561-Val562 активаторами плазміногену з одночасним відщепленням N-термінального домену призводить до утворення дволанцюгової молекули плазміну, в якій «важкий» A-ланцюг (60 кДа) та «легкий» B-ланцюг (25 кДа) сполучені двома дисульфідними зв'язками. Важкий ланцюг протеїну (Glu1–Arg561) за допомогою двох дисульфідних зв'язків взаємодіє з легким ланцюгом (Ala562–Asn791), який містить каталітичну тріаду канонічних залишків His603, Asp646 та Ser741, яка відповідає залишкам His57, Asp102 та Ser195 в активному центрі молекули хімотрипсину [100]. N-термінальний PAp-домен

має два дисульфідні зв’язки, складається з α- та β-структур та є гомологічним N-термінальному пальцеподібному (фінгер) домену фактору росту гепатоцитів (HGF). У молекулі плазміногену PAp-домен взаємодіє з K5, регулюючи конформацію та швидкість активації зимогену [353].

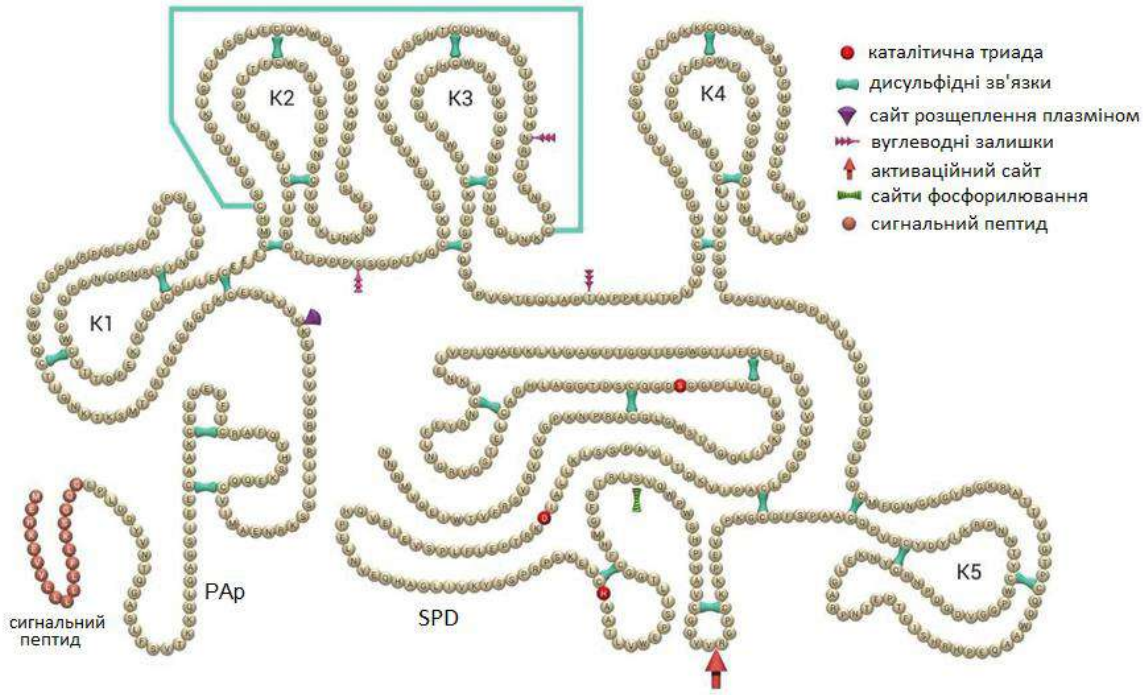

Рисунок 1.2 – Будова молекули Glu-плазміногену: SPD – серин-протеїназний домен (залишки Val562-Asn791), K1 – K5 – кринглові домени, PAp – Pan-apple-домен (залишки 1-77), стрілкою позначено сайт розщеплення поліпептидного ланцюга активаторами плазміногену (зв’язок Arg561-Val562) [629].

Плазміноген циркулює у вигляді нативної глобули (Glu-форма), яка характеризується «закритою», максимально компактною α-конформацією, що стабілізується за рахунок множинних міждоменних нековалентних взаємодій: між LBS на K5 та PAp-доменом, а також між LBS K4 та лігандом на K3. Проте, молекулі плазміногену притаманна конформаційна лабільність: у залежності від умов, молекула зимогену може набувати альтернативних конформацій. За присутності лігандів, специфічних до LBS K5, Glu-плазміноген переходить до «напіввідкритої» витягнутої β-конформації, коли

зберігається лише одна з внутрішньомолекулярних взаємодій. За умов дисоціації К3 та К4, яка супроводжується порушенням обох лізин-залежних внутрішньомолекулярних взаємодій, Glu-плазміноген набуває повністю «відкритої» й максимально витягнутої у просторі γ-конформації. Glu-плазміноген може змінювати конформацію на відкриту, коли зв'язується з фібрином або поверхнею клітини. Крім того, відщеплення PAp-домену за зв'язками Arg68-Met69, Lys-77-Lys-78 або Lys78-Val79 слідовими кількостями плазміну призводить до появи нової форми зимогену, N-термінальною амінокислотою якої найчастіше є Lys (**Lys-плазміноген**, M_m ~ 84 кДа). LBS K1 є експонованим як у закритій, так і у відкритій конформаціях молекули зимогену. Вважається, що через таку конфігурацію К1 забезпечує первинний докінг плазміногену з молекулами-мішенями [353, 675].

«Важкий» А-ланцюг молекули плазміногену містить п'ять гомологічних кринглових доменів, кожен з яких складається у середньому з 80 амінокислотних залишків та стабілізований за допомогою трьох дисульфідних зв'язків. Кринглові домени зв'язуються з кінцевими залишками Lys або Arg на молекулах субстрату або клітинних рецепторах через свої LBS (мотиви DXD/E). LBS також зв'язуються з аналогами лізину, наприклад, 6-аміногексановою кислотою (6-АГК) та транексамовою кислотою. К3 у молекулі плазміногену людини не зв'язується з лізинами, оскільки він має іншу послідовність – DXK. Таким чином, на кожний К-домен приходиться один LBS, за винятком К3, який не містить жодної такої ділянки. LBS представляє собою біполярну щілину на поверхні кринглового домену. Аніонний сайт LBS K1 складається з Asp137 та Asp139, катіонний – з Arg115 та Arg153. Між двома зарядженими ділянками знаходиться гідрофобна порожнина, яку утворюють радикали двох ароматичних амінокислотних залишки Trp144 і Tyr154, які підтримують метіленовий бічний ланцюг амінокислоти, що взаємодіє з LBS. К-домени сполучені один з одним за допомогою шарнірних ділянок, котрі забезпечують

внутрішньомолекулярну рухливість молекули зимогену та зміни просторового розташування кринглів [99].

Слід зазначити, що усі крингли відрізняються за афінністю до своїх лігандів. За афінністю по відношенню до 6-АГК крингли плазмін(оген)у розташовуються наступним чином: К1 > К4 > К5 > К2, а величини K_d для К1, К4 та К5 становлять 12, 26 і 140 мкМ відповідно. К5 проявляє найбільш високу афінність до центрів зв'язування на поверхні ендотеліоцитів, забезпечуючи таким чином взаємодію плазміногену з цими клітинами. У зв'язку з цим варто зауважити, що у К5 в положенні, яке відповідає позиції Arg71 К1, знаходиться залишок Leu71, а залишок Arg32, який є аналогічним Arg34 К1, знаходиться у просторовій орієнтації, яка не підходить для зв'язування карбоксильної групи лізину (примітка: нумерація амінокислотних залишків для кринглів надана, починаючи з першого дисульфідного зв'язку кринглового домену). Таким чином, катіонний центр у К5 відсутній, і цей крингл з більшою афінністю зв'язує не С-термінальні залишки лізину, а ті, що розташовані усередині поліпептидного ланцюга. У К3 у положенні, аналогічному Asp57 аніонного центру К1, знаходиться залишок Lys57. За цієї причини К3 практично не взаємодіє з залишками лізину [122]. Важливо зазначити, що LBS, розташовані у К1, можуть також взаємодіяти з С-кінцевими залишками аргініну, а К5 – лише із залишком аргініну усередині ланцюга, К4 не взаємодіє із С-кінцевими залишками аргініну. У К1 та К4 два залишки Asp та два Arg в катіонному та аніонному центрах знаходяться в однакових положеннях, якщо нумерацію вести від першого дисульфідного зв'язку [46].

Таким чином, кринглові домени беруть участь у специфічному розпізнаванні та взаємодії молекул плазмін(оген)у з різними протеїнами плазми крові: фібрино(гено)м, α_2-антиплазміном (α_2-АР), гістидинбагатим глікопротеїном, тромбоспондином-1, тетранектином, а також з рецепторами клітинної поверхні та протеїнами ЕЦМ. У цьому переліку особливе місце займає тетранектин – плазміноген-зв'язувальний лектин С-типу, який

проявляє спорідненість лише до К4, як до ізольованого, так і до того, що знаходиться у структурі молекули плазміногену. Тетранектин не містить С-кінцевого залишку лізину, що відповідає структурним вимогам К4, але має послідовність, ідентичну тій, що знаходиться у структурі К3 і відповідає за взаємодію останнього з LBS К4 [272]. Цікаво, що крім плазміногену, кринглові домени зустрічаються у складі деяких інших протеїнів: t-PA, u-PA, фактору XII, протромбіну, HGF, аполіпопротеїну А (apoA), де вони аналогічним чином функціонують як протеїн-розпізнавальні модулі [99, 163, 277]. Більш того, виявилося, що крингл-вмісні продукти обмеженого протеолізу плазмін(оген)у виконують специфічні біологічні функції, відмінні від функцій протеїнів-попередників, а отже, займають особливе місце серед усіх компонентів цієї системи протеїнів. Ці поліпептиди були відкриті у 1994 році O'Reilly та колегами в ході пошуків причин інтенсивної неоваскуляризації та росту метастазів після хірургічного видалення первинної пухлини [464]. Ізольовані крингл-вмісні фрагменти плазмін(оген)у виявилися потужними інгібіторами росту судин (ангіогенезу), тому й отримали назву «ангіостатини». Відкриття ангіостатинів, вивчення їхніх унікальних фізико-хімічних властивостей та з'ясування біологічної ролі надало потужного поштовху для досліджень нових функцій протеїнів плазміноген/плазмінової системи та їхньої участі у різних фізіологічних та патофізіологічних процесах [94, 465, 671, 677], що буде детально розглянуто у підрозділі 1.3.

Особливу увагу в дисертаційній роботі приділено дослідженню біологічної активності Lys-плазміногену. Попри накопичення все більшого об'єма даних стосовно того, що ця форма плазміногену може брати участь у модулюванні функціональної активності клітин, його специфічні біологічні властивості залишаються практично недослідженими. На відміну від нативної форми зимогену, молекула частково гідролізованого, або Lys-плазміногену, в якій відсутній N-термінальний домен, має відкриту конформацію. Ця обставина визначає більшу доступність активаційної петлі

для дії активаторів, а також центрів зв'язування з субстратом та молекулами-мішенями на поверхні клітин, зумовлюючи унікальні біологічні властивості. Lys-плазміноген значно швидше конвертується на плазмін за нативний зимоген. Наприклад, на поверхні ендотелійних клітин лінії HUVEC Lys-плазміноген перетворюється на протеїназу у 20 разів швидше за Glu-форму [229, 255]. Ці та інші спостереження вказують, у першу чергу, на залучення Lys-плазміногену як проміжної форми протеїнази до регулювання утворення плазміну, формування профібринолітичного комплексу на поверхні згустку або клітин [205]. Зокрема, Lys-плазміноген проявляє виражену антиагрегативну активність, пригнічуючи агоніст-індуковану агрегацію тромбоцитів, як це показано у попередніх дослідженнях співробітників відділу хімії та біохімії ферментів ІБХ НАНУ [13, 520, 521]. Вважається, що Lys-плазміноген не циркулює у кровотоці у вільному стані, а утворюється лише на фібрині або поверхні клітин (рис. 1.3). Якщо час напівиведення Glu-плазміногену (T1/2) становить близько 50 годин, то для Lys-форми цей термін є значно коротшим (T1/2 становить 20 годин) [113]. Імовірно, що конформаційна мінливість плазміногену, яка визначає можливість його додаткової взаємодії з різними лігандами, виникла в ході еволюції і визначає гетерогенність функціонального значення плазмін(оген)у.

Активація плазміногену. За фізіологічних умов перетворення попередника плазміну на активну протеїназу вимагає імобілізації зимогену на поверхні фібринової матриці або на клітинній поверхні через взаємодію з рецепторними молекулами. Цей процес призводить до конформаційних змін, які полягають у переході від закритої до відкритої конформації молекули плазміногену, що супроводжується експонуванням активаційної петлі [229]. Отже, набуття молекулою зимогену «відкритої» конформації є необхідною передумовою для розщеплення зв'язку Lys77-Lys78, яке здійснює плазмін.

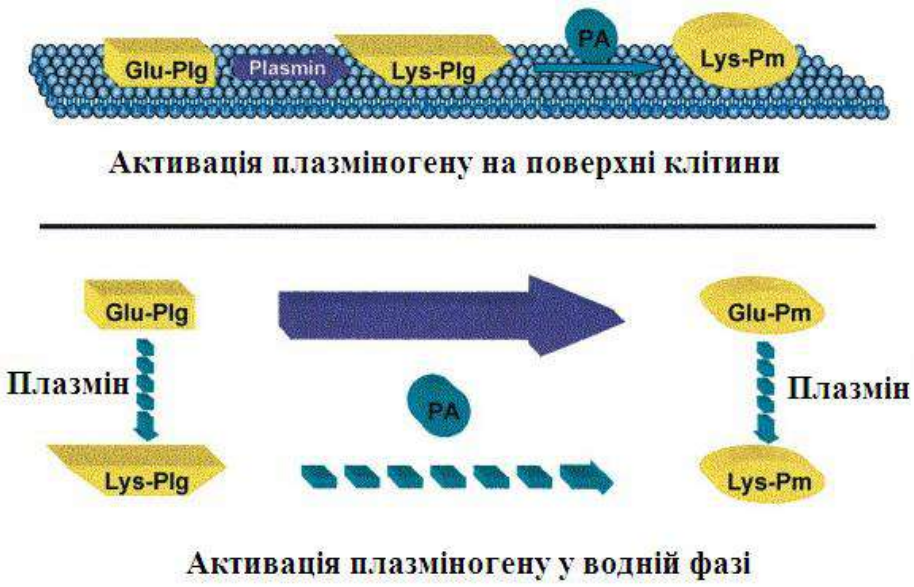

Рисунок 1.3 – Схема активації Glu-плазміногену через стадію утворення Lys-плазміногену (PA – активатори плазміногену) [229].

Перейшовши від компактної конформації до «відкритої» форми, Glu-плазміноген може перетворитися на Lys-форму (за участі плазміну) або на Glu-плазміноген (під дією активаторів) (рис. 1.4). Структурні зміни молекули зимогену мають важливе значення для пришвидшення його активації різними типами активаторів та появі активного плазміну на фібрині та клітинній поверхні. Встановлено, що 6-аміногексанова кислота (АГК), бензамідин (аналог аргініну), моноклональні антитіла проти К4 та К5, а також деякі протеїни плазми та ЕЦМ (ламінін, фрагменти фібрин(оген)у, фібронектину, тромбоспондин, тетранектин, актин), які взаємодіють з крингловими доменами плазміногену з високою афінністю, змінюють конформацію його молекули, впливаючи на швидкість активації та фібриноліз [153, 354, 675].

Активація плазміногену за участі t-PA або u-PA, співлокалізованими з плазміногеном на відповідному сайті молекули-мішені, полягає в ензиматичному гідролізі ними пептидного зв’язка Arg561-Val562 в одноланцюговій молекулі зимогену, внаслідок чого формується активний центр і з’являється дволанцюгова молекула плазміну. Існують дані про те, що крім цих двох основних фізіологічних активаторів плазміногену, деякі інші

протеази, такі як калікреїн, фактори XIa та XIIa, також здатні активувати зимоген [550].

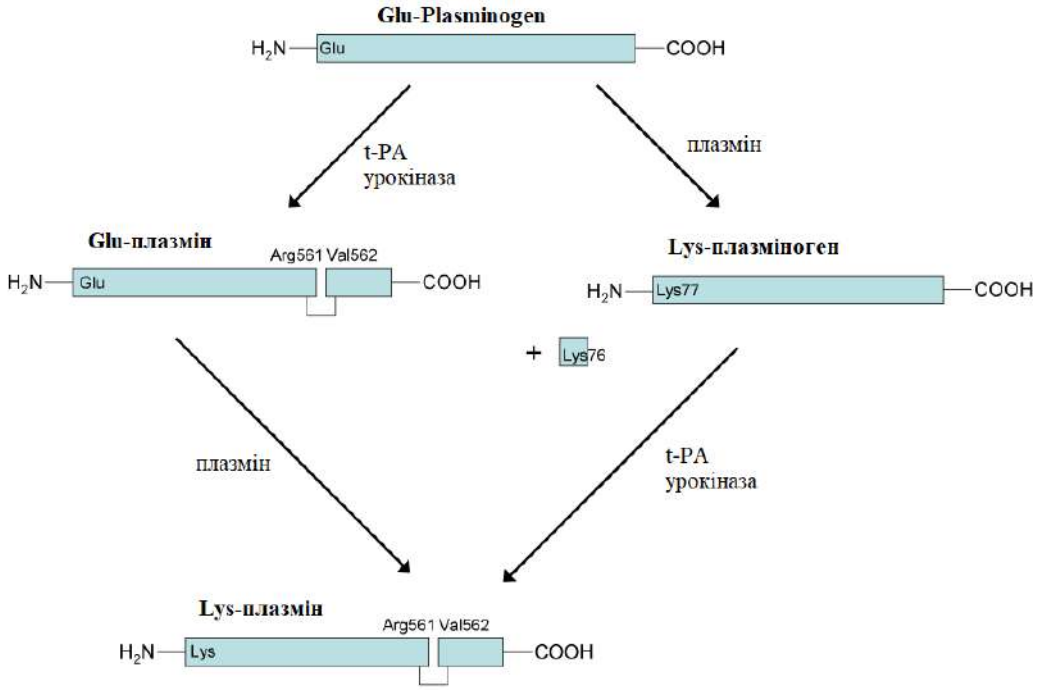

Рисунок 1.4 – Схема перетворення Glu-плазміногену на Lys-плазміноген та різні форми плазміну.

Функціональні властивості плазміногену визначаються не лише специфічністю LBS його кринглових доменів по відношенню до відповідних лігандів і конформацією молекули, але й типом глікозилювання. Вперше докази того, що глікозилювання плазміногену модулює функціональну активність молекули, були отримані Davidson та Castellino (1993) [142], які продемонстрували, що різні глікозильовані форми плазміногену відрізняються за кінетичними параметрами активації урокіназою. В організмі плазміноген присутній у вигляді двох глікоформ, які не відрізняються за амінокислотною послідовністю: глікоформа I (~92 кДа) містить O-зв'язаний та N-зв'язаний вуглеводні ланцюги і становить близько 40 % від загального пулу плазміногену плазми, а глікоформа II (~89 кДа) – лише O-зв'язаний вуглеводний ланцюг. Диглікозильована форма несе вуглеводний залишок манозного типу, який складається з 10 або 11 мономерних залишків,

з'єднаних з протеїном через N-глікозидний зв'язок з Asn289, а вуглеводні групи з 3 та 4 моноцукрів приєднані до молекули плазміногену через O-глікозидний зв'язок з Thr346. Моноглікозильована ізоформа містить вуглеводну групу лише у положенні Thr346 [145]. Різні глікоформи плазміногену відрізняються не лише за кінетичними величинами активації, але й демонструють функціональну гетерогенність. Вважається, що глікоформа I є домінантною у процесах внутрішньосудинного фібринолізу [602], тоді як глікоформа II володіє у 10 разів більшою афінністю по відношенню до клітинної поверхні, ніж плазміноген I типу [232]. Ступінь глікозилювання молекули плазміногену визначає не лише функціональні особливості власно зимогену, але й його протеолітичних фрагментів – ангіостатинів. Показано, що фрагмент плазміногену K1-3, який відповідає послідовності Val79 – Thr346, демонструє потужні ангіостатичні ефекти та протипухлинну активність у глікозильованій формі, тоді як видалення N-глікозидних залишків призводить до значної втрати біологічної активності такої молекули [537].

Плазмін. Молекула плазміну складається з «важкого» (~60 кДа) A-ланцюга та «легкого» (~25 кДа) B-ланцюга, які сполучені за допомогою двох дисульфідних зв'язків [517]. Wiman і Wallén у 1977 році [660] та Sottrup-Jenssen з колегами роком пізніше [577] вперше встановили структуру «важкого» та «легкого» ланцюгів плазмін(оген)у. Плазмін є трипсиноподібним протеолітичним ензимом з широкою субстратною специфічністю, який гідролізує пептидні зв'язки, утворені карбоксильними групами L-лізину та L-аргініну, в молекулах протеїнів та пептидів [461]. Основною функцією плазміну є розщеплення фібринового полімеру, яке супроводжується появою низки розчинних продуктів деградації (FDPs), які конкурентно інгібують тромбін (FIIa), у такий спосіб пригнічуючи перетворення фібриногену на фібрин. Отже, плазмін відповідає не лише за руйнування фібринового згустку, але й опосередковано уповільнює його утворення за механізмом негативного зворотного зв'язку. Розщепленню

фібрину передує зв'язування плазміногену та t-PA з поверхнею фібринової матриці та перетворення зимогену на активну протеїназу. Утворення потрійного комплексу сприяє збільшенню каталітичної здатності t-PA по відношенню до зимогену в декілька сотень разів, відбувається зсув інгібіторно-активаторного балансу у бік активації фібринолізу [392]. Крім того, плазмін перетворює одноланцюгові молекули t-PA та u-PA на дволанцюгові, які у свою чергу починають швидше генерувати плазмін, замикаючи таким чином петлю позитивного зворотного зв'язку. З іншого боку, поява тромбу призводить до більш інтенсивного продукування ензимів фібринолітичної системи ендотелійними клітинами судин, що також сприяє прискоренню фібринолізу. Деградація фібрину під дією плазміну починається з С-кінця Aα-ланцюга, що призводить до збільшення кількості С-кінцевих лізинів, з якими зв'язуються інші молекули плазмін(оген)у. Частково деградований фібрин зв'язує Glu-плазміноген на порядок ефективніше у порівнянні з інтактним полімером [292, 638].

Крім фібринолізу, перицелюлярний плазмін відіграє провідну роль у процесах, пов'язаних з деградацією ЕЦМ та регулюванням активності цілої низки біологічно активних протеїнів та шляхів внутрішньоклітинного сигналювання. Завдяки цьому плазмін модулює процеси, пов'язані з міграцією та інвазією клітин: запалення, ремоделювання тканин, загоєння ран, ембріогенез, ангіогенез, прогресію пухлин та метастазування та ін. [56, 71, 97, 354, 368]. Функціональне значення плазміну в організмі та найважливіші субстрати цієї протеїнази схематично наведено на рисунку 1.5.

Після розщеплення фібринового згустку вільний плазмін негайно інактивується α_2-AP з утворенням ковалентного комплексу. Локалізація плазмін(оген)у на поверхні різних клітин призводить до формування клітинних поверхонь, на яких плазмін захищений від інгібування α_2-AP [669]. Саме наявність активної протеїнази, асоційованої з плазматичною мембраною, визначає феномен «озброєних» клітин (*armed cells*), наявність на

яких плазміну й забезпечує процеси перицелюлярного протеолізу [437] (рис. 1.6).

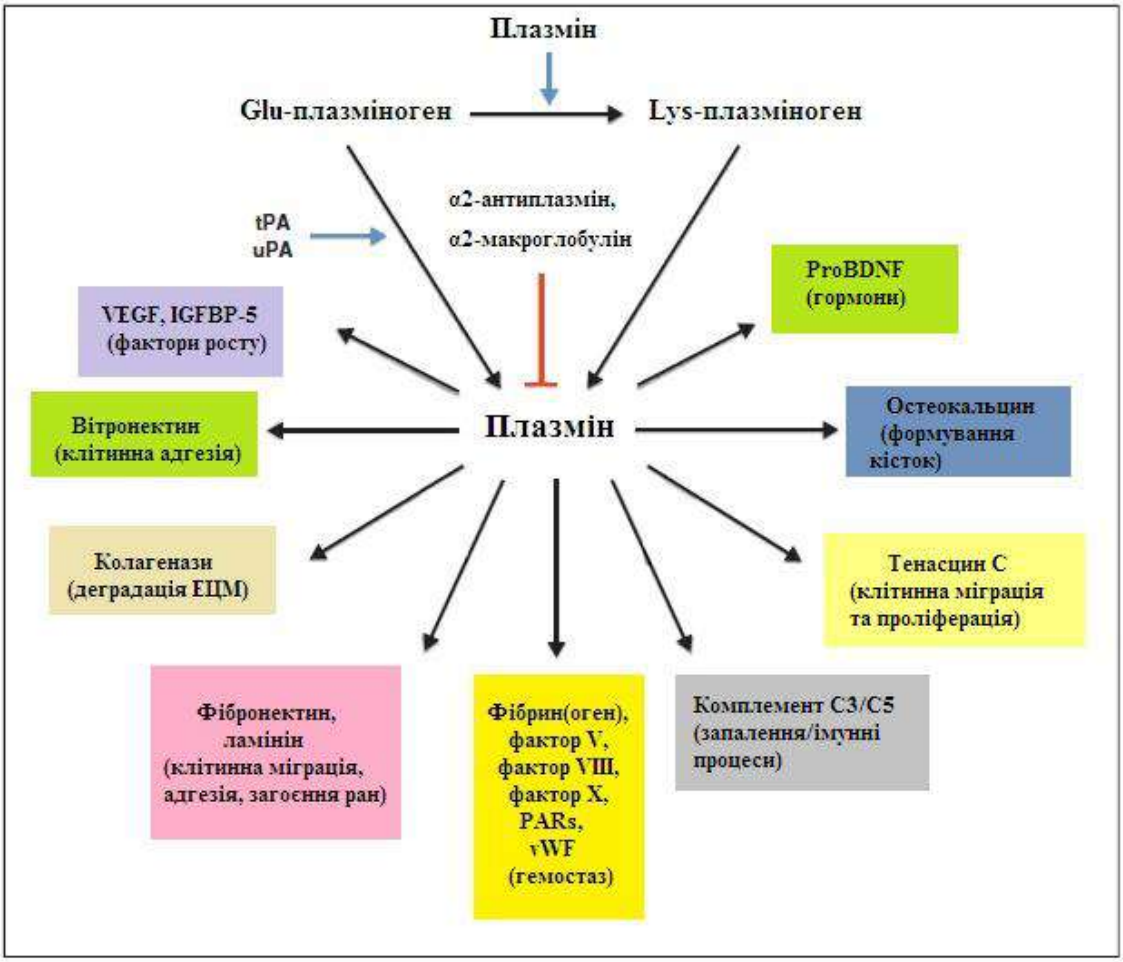

Рисунок 1.5 – Субстрати плазміну та функціональне значення його активності (VEGF – фактор росту ендотеліоцитів судин, MMP – матриксні металопротеїнази, IGFBP-5 – протеїн, що зв'язує інсуліноподібний фактор росту-5, PARs – рецептори, що активуються протеазами, vWF – фактор фон Вілебранда, ЕЦМ – екстрацелюлярний матрикс, proBDNF – попередник нейротрофічного фактору мозку) [354].

Мутації гена плазміногену можуть призвести до розвитку так званих псевдомембранних захворювань, таких як фіброзний (лігнеозний) кон'юктивіт, у людей та мишей, що успішно лікується за допомогою введення екзогенного протеїну. У мишей з генетичним дефіцитом плазміногену, крім фіброзного кон'юктивіту, також спостерігаються

розвиток тромбозів, відкладання фібрину в інтра- та екстраваскулярному просторі багатьох тканин [674].

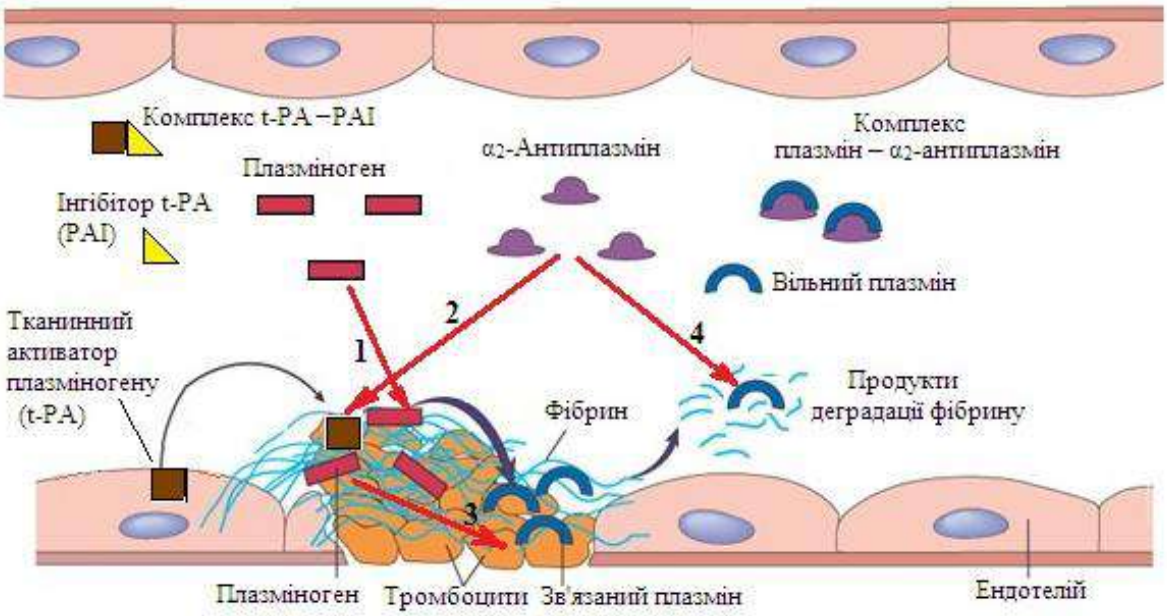

Рисунок 1.6 – Етапи фібринолізу за участі активаторів плазміногену, плазміну та його інгібіторів.

Зниження функціональної активності плазміногену спостерігається у представників деяких етнічних груп країн Азії, однак, асоціації з підвищеним ризиком тромбозів у них не виявлено [549]. Навіть у випадку гомозиготної недостатності плазміногену у таких хворих не спостерігалися виражені тромботичні патології [606]. Відсутність коагулопатій у такій групи пацієнтів, імовірно, пов'язано з тим, що навіть низькі концентрації плазміногену (від 4 до 51 %) є достатніми для нормального функціонування системи фібринолізу. Вкрай рідкісні прояви плазміногенового дефіциту у ранньому віці проявляються у вигляді гідроцефалії (1,6 випадки на 1 млн.) [650].

Активатори Pg. Утворення активного плазміну з плазміногену відбувається під дією фізіологічних активаторів, головними серед яких є активатор тканинного (t-PA) та урокіназного (u-PA) типу, або урокіназа. Активацію плазміногену також можуть здійснювати активатори екзогенного походження: стрептокіназа (продукується гемолітичним стрептококом),

аністрептлаза (плазміноген-стрептокіназний комплекс, неактивна форма стрептокінази), стафілокіназа (секретується деякими штамами золотистого стафілокока) [100].

Відомо, що фізіологічним активаторам плазміногену притаманна функціональна компартменталізація: t-PA, головним чином, відіграє ключову роль у деградації фібринового згустку, тоді як u-PA, якому не властива значна афінність до фібрину, відповідає за перицелюлярну активацію зимогену в ЕЦМ та на поверхні клітин. Обидва фізіологічні активатори плазміногену мають яскраво виражену доменну будову [26] (рис. 1.7).

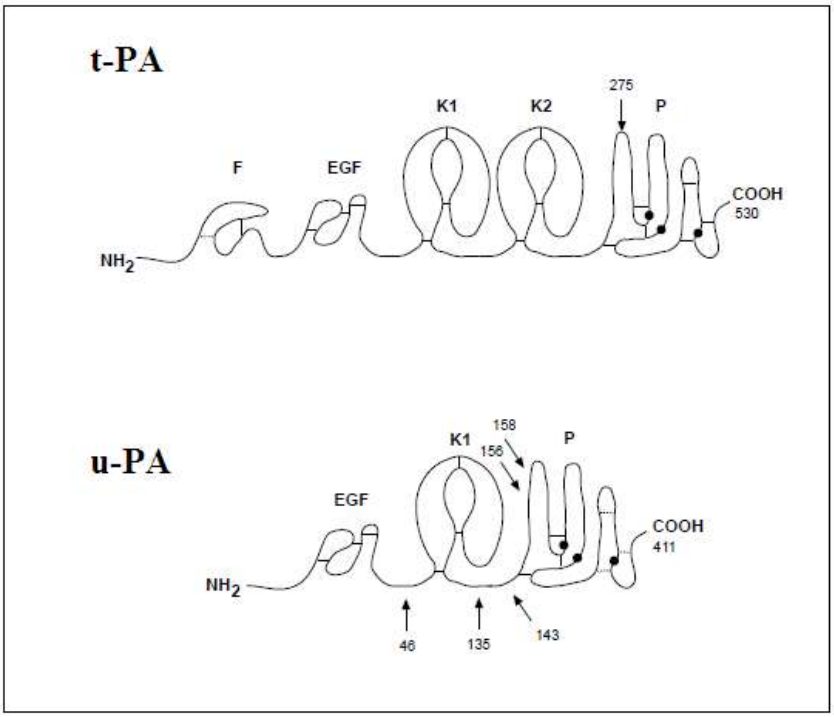

Рисунок 1.7 – Доменна будова молекул активаторів плазміногену.

Різниця в особливостях функцій t-PA та u-PA у складі плазмінергічної системи визначається особливостями структурних модулів їхніх «важких» А-ланцюгів. Молекула t-PA складається з п’яти головних доменів: N-термінального пальцеподібного (finger-)домену, EGF-подібного домену, двох кринглових доменів та протеолітичного домену. Молекула u-PA містить у своєму складі EGF-подібний домен, один крингловий та протеолітичний домен. Активатори плазміногену синтезуються у вигляді своїх

одноланцюгових попередників – t-PA-1 та scu-PA, які під дією плазміну та калікреїну відповідно перетворюються на дволанцюгові молекули t-PA та u-PA [354].

Активатор Pg тканинного типу (t-PA) є сериновою протеїназою (EC 3.4.21.68) – продуктом гену *PLAT*, продукується до крові, головним чином, ендотеліоцитами. При цьому його вивільнення відбувається перманентно або у гострому режимі за рахунок стимуляції специфічних рецепторів, розташованих на поверхні ендотелійних клітин. Концентрація t-PA у плазмі крові становить 70 пМ. Більш того, не дивлячись на таке невелике значення, у вільному стані знаходиться лише 20 % цієї кількості – більшість молекул t-PA знаходиться у зв'язаному з інгібіторами-серпінами (PAI-1, C1-інгібітором) стані [582]. Час напівжиття t-PA у крові становить 3-5 хв. Основним органом, який бере участь у кліренсі цього протеїну, є печінка, ендотелійні та паренхімальні клітини якої містять гетерогенні рецептори, що розпізнають різні ділянки t-PA. При взаємодії з плазміном або калікреїном, які розщеплюють пептидний зв'язок Arg275–Ile276, t-PA перетворюється на дволанцюгову форму. Цікаво, що ензиматична активність дволанцюгового t-PA усього у 5-10 разів перевищує активність одноланцюгової форми, але у тисячу разів зростає за умов взаємодії з фібрином [240]. У K2 молекули t-PA розташований LBS, аналогічний LBS молекули плазміногену. Молекула t-PA через пальцеподібний домен (F) зв'язується з нативним, а через домен K2 – з частково деградованим фібрином, що сприяє конформаційним перебудовам молекули активатору та його оптимальній орієнтації по відношенню до плазміногену. Домен EGF у молекулі t-PA відповідає за її зв'язування з клітинними рецепторами. Рецептори t-PA, які містяться на поверхні клітин різних гістотипів, виконують або профібринолітичну функцію, або функцію виведення активатору з циркуляції. Клітини судинного ендотелію багаті рецепторами, які локалізують t-PA на своїй поверхні. Деякі центри зв'язування на поверхні клітин є спільними для t-PA та плазміногену, зокрема, анексин II, що сприяє підвищенню швидкості активації зимогену та

відіграє важливу роль у підтримці рідкого стану крові. Важливо зауважити, що здатність t-PA активувати плазміноген значно збільшується при його взаємодії з протеїнами ЕЦМ, такими як колаген IV, ламінін-1 та тромбоспондин, що може сприяти протеолізу сполучної тканини [518].

Активатор Pg урокіназного типу, або урокіназа, (u-PA) є сериновою протеїназою (EC 3.4.21.73), яка теж кодується геном *PLAU*, розташованим у 10-й хромосомі. Урокіназа синтезується паренхимними клітинами нирок, а також фібробластами, моноцитами, макрофагами та ендотеліоцитами, визначається у сечі, сім'яній рідині та ЕЦМ багатьох тканин, а також циркулює у крові у концентрації 40-80 мкг/л. У плазмі час напівжиття урокінази становить приблизно 15 хв., вона швидко метаболізується та виводиться печінкою із жовчу та сечею. Активатор урокіназного типу секретується у вигляді одноланцюгового протеїну (scu-PA, або проурокіназа), який може перетворюватися на дволанцюгову молекулу (tcu-PA), що проявляє у 250 разів більш високу активність у порівнянні з вихідною формою. Молекула u-PA не містить пальцеподібного домену, а через EGF-домен вона зв'язується з клітинними рецепторами. При зв'язуванні з урокіназним рецептором (u-PAR) активність scu-PA зростає на два порядки [26, 354]. Припускається, що завдяки цьому моноцити можуть мігрувати досередини тромбу [419]. Єдиний крингловий домен u-PA, на відміну від кринглів t-PA та плазміногену, не має спорідненості до фібрину. Тому фібрин практично не впливає на здатність u-PA активувати зимоген (активність scu-PA істотно збільшується по відношенню до плазміногену, зв'язаного з C-термінальними залишками лізину, які з'являються у молекулах фібрину в процесі фібринолізу). Ця властивість дозволяє дійти до висновку, що не менш важливою за фібриноліз фізіологічною функцією u-PA є участь у ремоделюванні позаклітинного матриксу, що створює умови для клітинної міграції, яка має критичне значення в запальних процесах, за загоєння ран, інвазії ракових клітин та метастазуванні. У цьому полягає фундаментальна

функціональна відмінність урокінази від t-PA, основною функцією якого є забезпечення внутрішньосудинного фібринолізу [382].

Згідно із сучасними уявленнями, реалізація регуляторної функції u-PA по відношенню до різних клітин не обмежується її ензиматичною дією. Припускається, що широкий спектр ефектів урокінази на клітинному рівні визначається двома ключовими подіями: 1) конформаційними змінами рецептору, які призводять до його взаємодії з іншими регуляторними протеїнами, 2) клітинним сигналюванням, яке модулює експресію генів-регуляторів апоптозу [132]. Комплекс u-PA/u-PAR взаємодіє з іншими протеїнами, асоційованими з поверхнею клітини, такими як EGFR, PDGFR, деякі інтегрини, що забезпечує регулювання широкого кола внутрішньоклітинних сигнальних шляхів, зокрема, MAPK, Jak-Stat, FAK [138]. Крім того, комплекс u-PA/u-PAR через функціональну взаємодію з PAI-1 залучається до модулювання клітинної адгезії та спричиняє відшарування клітин завдяки порушенню їхньої взаємодії з протеїном ЕЦМ вітронектином [135].

Ключовою подією у сигнальному каскаді, який запускає урокіназа, є розпізнавання та селективне зв'язування її зі специфічним рецептором u-PAR, локалізованим на поверхні клітин. Молекули u-PAR, або CD87, є глікопротеїнами з M_m 50-60 кДа, які складаються з 313 амінокислотних залишків, заякорені на плазматичній мембрані через взаємодію з глікозил-фосфатидилінозітолом (GPI). Різні ізоформи цих рецепторів ідентифіковані на поверхні плазматичних мембран моноцитів/макрофагів, тромбоцитів, ендотеліоцитів, астроцитів та деяких інших клітин, де вони беруть участь у реалізації низки фізіологічних функцій (рис. 1.8) [49].

Рецептор u-PAR є ключовим компонентом перицелюлярної системи активації плазміногену, у складі якої в здоровому організмі він залучається до процесів, пов'язаних з ремоделювання тканин, зокрема, за інволюції грудної залози та загоєння ран. u-PAR регулює процес перицелюлярного

протеолізу, обмежуючи локалізацію активного плазміну в безпосередній близькості до клітинної мембрани.

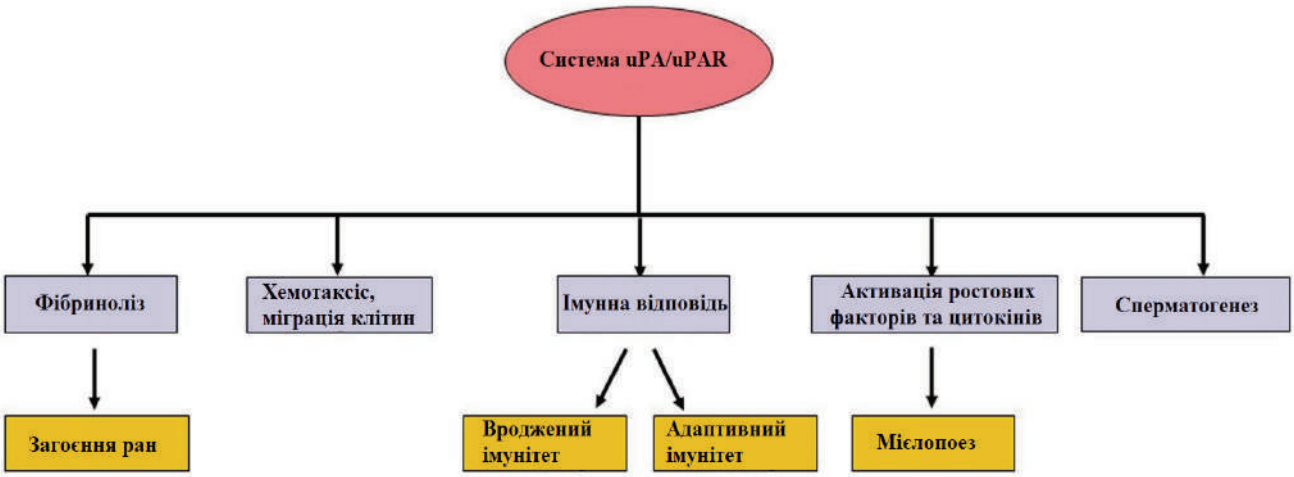

Рисунок 1.8 – Участь урокінази (u-PA) та її рецептора (u-PAR) у регулюванні нормальних фізіологічних процесів [49].

Урокіназа на поверхні мікрочасток моноцитів, макрофагів, ендотеліоцитів та малігнізованих клітин здатна активувати зимоген, асоційований з фібрином та протеїнами ЕЦМ, і в такий спосіб призводити до значного підвищення протеолітичної активності, що веде до змін активності цих клітин, зокрема, за патологічних станів [150, 345, 346]. Система u-PA/u-PAR показує протуморогенні властивості. Після зв'язування u-PA з рецептором відбувається розщеплення зв'язку між GPI-якорем та u-PAR, що супроводжується вивільненням suPAR. Активація плазміногену в ЕЦМ під дією u-PA, асоційованого з u-PAR на поверхні клітин, відіграє ключову роль у процесах деградації протеїнів міжклітинного матриксу, клітинної проліферації та міграції, запаленні та ангіогенезі [607]. У цьому процесі, крім u-PA/u-PAR, активну участь беруть й інші протеолітичні системи, зокрема, колагенолітичні ензими ММР (рис. 1.9).

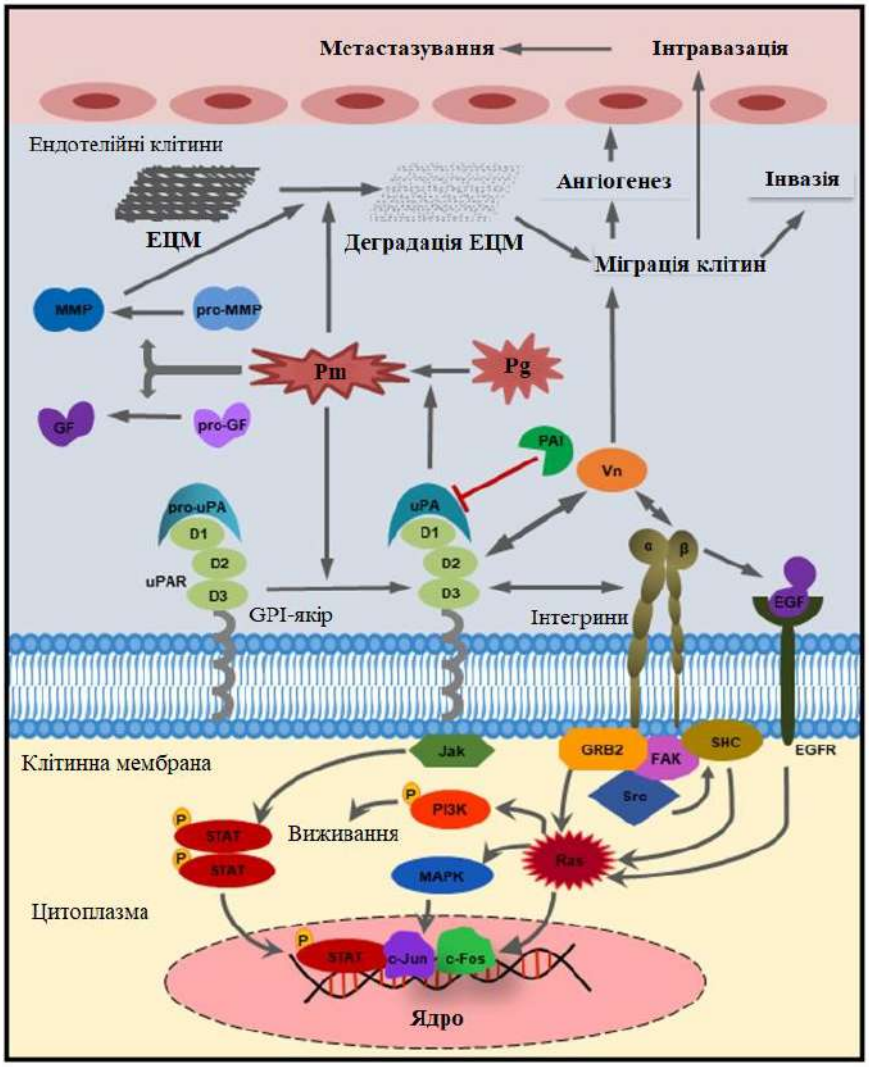

Рисунок 1.9 – Загальна схема функціонування системи урокінази (u-PA) та її рецептора (u-PAR) та асоційованих з нею сигнальних шляхів у регулюванні проліферації, виживання, міграції та інвазії ракових клітин, ангіогенезу, ремоделюванні ЕЦМ та метастазування: Pg – плазміноген; Pm – плазмін, MMP – матриксні металопротеїнази, PAI – інгібітор активатору плазміногену, Vn – вітронектин, D1,D2, D3 – домени u-PAR) [407].

<u>Інгібітори плазміну та активаторів плазміногену.</u> Інгібітори протеїназ плазміноген/плазмінової системи поділяються на три групи: 1) інгібітори активаторів зимогену (PAI-1, -2 та -3), 2) інгібітори власно плазміну (α_2-AP, α_2-макроглобулін, низка тканиноспецифічних інгібіторів-серпінів), 3) ТАФІ, дія якого пов’язана з видаленням у молекулах фібрину сайтів зв’язування

плазмін(оген)у та t-PA. PAI та α_2-AP відносяться до протеїнів класу серпінів. Інгібування серпінами активаторів та плазміну відбувається через взаємодію активного центру протеаз з експонованою мобільною реактивною петлею інгібіторів. α_2-AP інгібує плазмін за незворотним «суїцидальним» механізмом, формуючи ковалентний комплекс. α_2-AP може зв'язуватися з фібрином: близько 20% плазменного інгібітору включається до тромбу [669].

α_2-AP є основним фізіологічним інгібітором плазміну в організмі. M_m α_2-AP – 70 кДа, концентрація у плазмі становить 70 мг/л (1 мкМ), що відповідає приблизно половині концентрації плазміногену у молярному еквіваленті. Взаємодія між плазміном та α_2-AP є однією з найбільш швидких з відомих реакцій між ензимом та інгібітором: K_d інгібіторного комплексу становить 2×10^{-10} М. Таким чином, α_2-AP негайно інактивує та видаляє вільний плазмін з циркуляції, однак, молекули протеїнази, що зв'язані з фібриновою матрицею або клітинними рецепторами, є менш досяжним для дії інгібітору. Час напівжиття плазміну, зв'язаного з фібрином, становить 10-100 секунд, тоді як вільної протеїнази – усього 6 секунд. Час напіввиведення вільних молекул α_2-AP складає три доби (комплекс плазмін-α_2-AP виводиться за 12 год.) [101, 669].

Дефіцит α_2-AP у людей часто супроводжується розвитком гострих кровотеч, що узгоджується з його головною фізіологічною функцією, яка полягає у відновленні гемостазу після ушкодження. Підвищений рівень комплексів плазмін-α_2-AP, як і α_2-AP-гіпосерпінопатія, характеризує гіперфібринолітичний стан, який може бути викликаним травмами, ДВС, гострим промієлоцитарним лейкозом. Підвищена концентрація α_2-AP спостерігається за цукрового діабету, стрептококової інфекції, у післяопераційний період [98].

У випадку, коли запаси вільного α_2-AP у плазмі вичерпуються, роль основного інгібітору плазміну переходить до α_2-макроглобуліну, який починає чинити помітний ефект на систему фібринолізу. α_2-Макроглобулін є високомолекулярним протеїном (M_m 720 кДа), який синтезується клітинами

печінки, а також локально продукується макрофагами, фібробластами та адренокортикальними клітинами, циркулює у плазмі у концентрації 3 мкМ. Він виконує роль запасного інгібітору для низки ензимів, у тому числі плазміну: його ефективність по відношенню до цієї протеїнази у 10 разів нижча, ніж у α_2-АР [578]. Інгібуючи тромбін, α_2-макроглобулін може функціонувати як негативний регулятор коагуляції, хоча за певних умов, наприклад, у новонароджених, він діє як прокоагулянт, пригнічуючи формування антикоагулянтного комплексу між активованим протеїном С та протеїном S (APC/PS) [133].

На сьогодні ідентифіковано близько 1000 різних протеїнів, які складають суперсімейство серпінів (Serpin – **Ser**ine **p**roteinase **in**hibitors). Разом з α_2-АР, в організмі людини синтезуються 37 різних серпінів, більшості з яких притаманна виражена тканиноспецифічність [51]. Наприклад, ключову роль у регулюванні активності плазміноген/плазмінової системи в нервовій тканині відіграє нервовоспецифічний протеїн нейросерпін, який секретується конусами росту нейронів та інактивує t-PA. Головна функція цього серпіну – запобігання цитотоксичності, індукованої плазміном, який утворюється в нервовій тканині у відносно великих кількостях [685]. З іншого боку, надекспресія нейросерпіну деякими типами пухлинних клітин є одним з чинників їх виживання у тканині мозку після проникнення через ГЕБ, який захищає мозок від колонізації раковими клітинами. Таким чином, нейросерпін, будучи інгібітором плазмінергічної системи, у цьому випадку відіграє патофізіологічну роль, забезпечуючи виживання пухлинних клітин. Показано, що знижений рівень експресії SerpinB2 у клітинах аденокарцином легені, є фактором виживання ракових клітин та метастазування [507].

Інгібування ендогенних активаторів плазміногену відбувається, в основному, за рахунок дії **PAI-1**, відомого як серпін E1. Молекула PAI-1 є одноланцюговим глікопротеїном з M_m 52 кДа, що складається з 379 амінокислотних залишків. Концентрація PAI-1 у плазмі крові людини варіює

у межах 1 – 40 нг/мл, час напівжиття становить 5-10 хв. Крім плазми PAI-1 присутній в ЕЦМ. PAI-1 синтезується клітинами різних типів, включаючи ендотелійні клітини, гепатоцити, адипоцити, клітини гладеньких м'язів судин, нейтрофіли, моноцити і макрофаги [569]. За таких патологічних умов, як тромбози, запальні та автоімунні процеси, синтез PAI-1 різними клітинами може стимулюватися цитокінами, ангіотензином-II, факторами росту, гормонами, ліпідами, альдостероном, інтерлейкіном-1, фактором некрозу пухлин та іншими, що призводить до зростання локальної концентрації інгібітора [683]. Проте, головним джерелом PAI-1 у крові є тромбоцити. У складі тромбоцитарних α-гранул міститься близько 90% усієї кількості циркулюючого інгібітору. Активовані тромбоцити в ході дегрануляції вивільняють молекули PAI-1 в активній формі, які ефективно інактивують t-PA. Цей факт пояснює відносну резистентність до лізису артеріальних тромбів, особливо багатих на тромбоцити [446]. Крім участі в регулюванні фібринолітичних процесів, PAI-1 виконую важливу роль у моделюванні адгезивних властивостей клітин, блокуючи адгезію, опосередковану u-PAR та інтегринами. Протеїн PAI-1 циркулює у плазмі у трьох формах: активній, неактивній та латентній. Секретуючись в активній формі, молекула PAI-1 легко переходить до латентної форму завдяки конформаційним змінам, в результаті яких відбувається маскування його активного центру. Латентна форма може реактивуватися під дією негативно заряджених фосфоліпідів. Третя, неактивна форма PAI-1 утворюється в результаті розщеплення його протеазами по «субстратному» шляху. У плазмі у вигляді комплексу з вітронектином, а також локалізований в ЕЦМ, PAI-1 залишається активним значно довше, ніж у вільному стані [6].

PAI-1 залучається до розвитку широкого кола патофізіологічних станів, тому все більше використовується як діагностично-прогностичний маркер різних розладів та хвороб [103]. Дефіцит PAI-1 – рідкісна патологія, яка супроводжується тривалими та відтермінованими крововиливами, а оральний прийом транексамової кислоти нормалізує стан гемостазу у таких пацієнтів

[359]. Підвищений рівень PAI-1 асоціюється з широким спектром тромботичних станів та є одним з патогенетичних факторів розвитку різних ССЗ, у тому числі інфаркта міокарду, ішемічного інсульту, периферичної артеріальної хвороби, тромбозу глибоких вен, десімінованого внутрішньосудинного згортання [304]. Драматичне збільшення концентрації PAI-1 розглядається як один з факторів негативного прогнозу у пост-інфарктних хворих та короткого терміну виживання таких пацієнтів [127]. Підвищення концентрації PAI-1 спостерігається за цукрового діабету та є однією з типових ознак розвитку діабетичних ускладнень [29]. На сьогодні накопичився значний об'єм фактичних даних, які свідчать про важливу роль PAI-1 у розвитку онкологічних хвороб як фактор інвазії та метастазування. PAI-1 сприяє розсіюванню ракових клітин через модулювання їхніх адгезивних властивостей, підтримання ангіогенезу, стимуляцію проліферації клітин та пригнічення апоптозу [490]. Підвищення концентрації PAI-1 є невтішною прогностичною ознакою за розвитку широкого кола злоякісних новоутворень [302, 452].

Інший інгібітор активаторів плазміногену, **PAI-2**, секретується, переважно, плацентою, тому тривалий час він вважався плацентарним інгібітором u-PA [45]. У плазмі цей серпін виявляється лише у період вагітності, чим пояснюється відносно високий рівень тромбозів у вагітних. Циркулює у концентрації, на порядок нижче за рівень PAI-1 та є менш ефективним інгібітором за PAI-1. PAI-2 існує у двох формах: 60 кДа екстрацелюлярний глікозильований поліпептид (бере участь у регулюванні фібринолізу) та 43 кДа внутрішньоклітинний протеїн (превалююча форма). Зважаючи на превалювання у дорослому організмі внутрішньоклітинної форми, останнім часом накопичується все більше аргументів на користь того, що регулювання активності фібринолітичної системи не є основною функцією цього інгібітору, однак, його роль у внутрішньоклітинних процесах залишається до кінця незрозумілою (*Is PAI-2 really a PAI after all?* [214]). Роль PAI-2 у пухлинному рості неоднозначна й залежить від типу пухлини та

її локалізації. Продукування PAI-2 деякими типами ракових клітин пригнічуює метастатичний потенціал пухлини [547]. За іншими відомостями PAI-2 (часто у синергізмі з нейросерпіном) захищає ракові клітини від плазмін-індукованої загибелі шляхом апоптозу/аноікісу, сприяючи їхній інсемінації до головного мозку, виживанню та метастазуванню [450].

Ще один протеїн родини PAI (**PAI-3**), відомий також як інгібітор активованого протеїну С та тромбін-тромбомодулінового комплексу, є унікальним й мультифункціональним серпіном. мРНК PAI-3 експресується у печінці, нирках, селезінці, підшлунковій залозі та репродуктивних органах. Встановлено, що PAI-3 людини залучається до регулювання згортання та фібринолізу, загоєння ран, фертилізації. Через інгібування u-PA, PAI-3 бере участь у процесах, що супроводжують метастазування раку нирок [593].

1.2. Протеїни плазміноген/плазмінової системи як регулятори функціонального стану клітин

В основі регулювання компонентами плазміноген/плазмінової системи функціональної активності клітин лежать три механізми: 1) пряме та опосередковане через активацію ММР ремоделювання поверхні клітин, деградація ЕЦМ, базальної мембрани та сполучнотканинного матриксу, що має ключове значення в індукції та підтриманні рухливості клітин; 2) вивільнення та активація низки біологічно активних регуляторних молекул, що модулюють сигнальні шляхи, асоційовані з проліферацією, апоптозом, адгезією, ростом та міграцією клітин; 3) виконання протеїнами цієї системи функцій самостійних сигнальних молекул.

Ще у середині 80-х років XX ст. було з’ясовано, що плазміноген здатний зв’язуватися не лише з фібрином, але й з молекулами, асоційованими з поверхнею плазматичної мембрани різних клітин [256, 432]. Зв’язування зимогену з поверхнею клітини, його акумуляція на нерозчинній поверхні, конформаційні зміни молекули та присутність молекулярних ансамблей його

активаторів сприяють більш ефективній його активації в порівнянні з водною фазою та збільшенню локальної протеолітичної активності плазміну [184]. Вважається, що зв'язаний з клітинною поверхнею плазмін захищений від інактивації α_2-АР, що дозволяє протеїназі проявляти свою протеолітичну активність у мікрооточенні, багатому на інгібітори [669]. Тривалий час вважалося, що роль плазміну, асоційованого з клітинами, які беруть участь у процесах згортання та фібринолізу, зокрема, тромбоцитами та нейтрофілами, полягає в регулюванні розщеплення фібрину. Однак, відкриття здатності клітин різних типів експонувати молекули, з якими зв'язується плазміноген, та поява активного плазміну на поверхні плазматичної мембрани, дозволило висунути гіпотезу про залучення клітинноасоційованої протеїнази до виконання цілої низки функції поза системою гемостазу [437]. Молекули, які зв'язують плазмін(оген) з поверхнею клітини, отримали колективну назву «рецептори плазміногену» [436, 494]. Показано, що молекули, які зв'язують плазміноген, експонуються на тромбоцитах, нейтрофілах, моноцитах та моноцитоїдних клітинах, макрофагах, ендотелійних та епітелійних клітинах, фібробластах, адіпоцитах, клітинах мозкового шару наднирників, сперматозоїдах та ооцитах, астроцитах, клітинах карцином та багатьох інших інших пухлин, а також клітинних мікровезикулах [231, 315, 346, 627, 658]. Перицелюлярне функціонування плазмінергічної системи забезпечує реалізацію механізмів найважливіших фізіологічних та патофізіологічних процесів, в основі яких лежить міграція клітин, а саме: запалення [139], загоєння ран [191], ангіогенез [202], фіброз тканин [312], ріст пухлин та метастазування [341], міогенез та м'язова регенерація [393], запліднення та ембріогенез [181], відростання нейритів [252], тощо.

1.2.1. Рецептори плазміногену

Протеїни-партнери плазміногену були ідентифіковані на поверхні багатьох типів клітин, у тому числі, клітин крові, інших нормальних,

трансформованих, у тому числі, й ракових клітин. Найбільшу кількість рецепторів плазміногену несуть ендотелійні клітини (10^7 на клітину), тоді як лімфоцити – 490 тис., а тромбоцити – приблизно 37 тис. Однак, щільність експонованих сайтів зв'язування плазміногену з поверхнею різних клітин може збільшуватися після їхньої активації або зміни клітинного циклу, що вказує на залучення перицелюлярного пулу плазмін(оген)у до регулювання ним клітинних функцій [436, 437, 463]. Клітинними рецепторами плазміногену є гетерогенна група поліпептидних молекул [226], а також деякі молекули небілкової природи, зокрема, гангліозіди [197]. У сучасній науковій літературі існують декілька варіантів класифікації плазміногенових рецепторів. Зокрема, за функціональним значенням такі рецептори розділяють на «активаційні» та «утилізаційні». Перший тип рецепторів, разом з активаторами плазміногену, входить до складу молекулярних ансамблів, які забезпечують утворення плазміну (табл. 1.1), тоді як рецептори другого типу беруть участь в елімінації плазміну та активаторів зимогену з плазми крові або клітинного мікрооточення [256].

Таблиця 1.1

Активаційні рецептори плазміногену на різних типах клітин

Рецептор	**Тип клітини**	**С-кінцевий Lys**	**Субклітинна локалізація**	**Секреторний шлях**
Анексин А2	Ендотелійні клітини, моноцитоїдна лінія	Відсутній (потребує розщеплення для зв'язування плазміногену)	Цитозоль або ядро	Транслокація, залежна від p11 та фосфорилювання; активність, подібна до L-типу Ca^{2+}-каналів та Ca^{2+}; асоційований з плазматичною мембраною через фосфатидилсерин.
Актин	Ендотелійльні клітини, тромбоцити, катехоламінергічні клітини, карцинома, PC-3, HT1080 та ін.	Відсутній (може з'являтися після розщеплення плазміну)	Цитоскелет, експонований на плазматичній мембрані	Не відомий

продовження таблиці 1.1

Амфотерин	Нейрональні клітини	Відсутній	Цитоплазма, екстрацелюлярно	Не відомий
Інтегрин $\alpha V\beta_3$	Ендотелійльні клітини	Відсутній	Інтегральний мембранний протеїн	Ендоплазматичний ретикулум, комплекс Гольджі
Інтегрин $\alpha M\beta_2$	Нейтрофіли, моноцити, макрофаги	Відсутній	Інтегральний мембранний протеїн	Ендоплазматичний ретикулум, комплекс Гольджі
Інтегрин $\alpha IIb\beta_3$	Тромбоцити, синовіальні фібробласти	Відсутній	Інтегральний мембранний протеїн	Ендоплазматичний ретикулум, комплекс Гольджі
Цитокератин 8	Гепатоцелюлярна карцинома, рак грудної залози	Присутній	Цитоскелет	Невідомий
α-енолаза	Моноцити, нейтрофіли, карцинома, лімфоїдні клітини, міобластні нейрони	Присутній	Цитозоль	Активність, подібна до L-типу Ca^{2+}-каналів та Ca^{2+}
Гістон 2B	Нейтрофіли, моноцитоїдні клітини, ендотелійні клітини	Присутній	Ядро	Активність, подібна до L-типу Ca^{2+}-каналів та Ca^{2+}; асоційований з плазматичною мембраною через фосфатидилсерин та гепаринсульфат
p11	Ендотелійні клітини, клітини HT1080	Присутній	Цитозоль та/або ядро	Активність, подібна до L-типу Ca^{2+}-каналів та Ca^{2+}; асоційований з плазматичною мембраною через велику кількість посередників, включаючи аннексин 2
Plg-R_{KT}	Моноцити, макрофаги, нейрональні клітини	Присутній	Інтегральний мембранний протеїн	Ендоплазматичний ретикулум, комплекс Гольджі
TATA-зв'язувальний протеїн	Моноцитоїдні клітини	Присутній	Ядро	Невідомий

Головним «утилізаційним» рецептором, який забезпечує ендоцитоз комплексів t-PA-PAI-1, є LDL receptor-related protein (LRP) [87]. Цікаво, що функціонування LRP відіграє велике значення в функціонуванні нервової тканини, зокрема, він задіяний до реалізації механізмів довготривалої потенціації у гіпокампі [693].

Експресія клітинних рецепторів плазміногену та зв'язування з ними молекул зимогену регулюється низкою факторів: іншими протеазами, гормонами, цитокінами, внутрішньоклітинною концентрацією Ca^{2+}, афінністю рецептора до ліганду, впливом модуляторних протеїнів на ділянки зв'язування молекул. Так, експонування рецепторів плазміногену є одним з механізмів регулювання клітиною кількості плазміну, що утворюється на її поверхні. Ремоделювання клітинної поверхні сериновими протеазами (еластазою, тромбіном, плазміном) або катепсином призводило до експонування раніше недосяжних для плазміногену зв'язувальних ділянок. Протилежним чином, після обробки клітин карбоксипептидазою B (CpB) клітини втрачали 60% сайтів зв'язування зимогену та 95% своєї здатності прискорювати його активацію [267]. Цей факт вказує на ключову роль мембраноасоційованих протеїнів, які містять C-термінальні залишки лізинів, у розпізнаванні та зв'язуванні плазміногену. Спираючись на ці та інші спостереження, Miles та ін. [433] запропонували класифікацію рецепторів плазміногену, яка базується на здатності таргетних протеїнів експонувати C-кінцеві залишки лізинів:

1) протеїни, які містять у своєму складі C-кінцеві лізини, що сприяють активації плазміногену (α-енолаза, TATA-зв'язуючий протеїн (TIP49a), цитокератин 8, p11 та гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа;

2) протеїни, що стимулюють активацію плазміногену, але первинно не синтезуються з C-кінцевими лізинами, які пізніше експонуються на поверхні клітин після посттрансляційної модифікації цих протеїнів (анексин II, актин);

3) протеїни, що залучаються до активації зимогену, але не містять C-кінцеві лізини навіть після посттрансляційної модифікації (інтегрини αIIbβ3

та αMβ2, амфотерин, протеїн GP330); цей пул рецепторів плазміногену становить менше 5% від їхньої загальної кількості на клітині;

4) молекули, які зв'язують плазміноген, що не призводить до його активації (тканинний фактор, гангліозіди), функціональне значення цього класу рецепторів залишається невідомим;

5) особлива група рецепторів, які зв'язують лише імобілізований плазміноген. Зокрема, інтегрин α5β1 взаємодіє з імобілізованим на пластику Glu-плазміноген за механізмом, до якого не задіяні LBS, але не розпізнає Lys-форму та плазмін [387].

Пізніше Das та ін. [139] запропонували класифікацію рецепторів плазміногену відповідно до наявності або відсутності в їхній структурі цитоплазматичних доменів («хвостів»). Більшість «безхвостих» рецепторів (α-енолаза, p11, амфотерни, гістон H2B, TIP 49a, Plg-RKT) мають у своїй структурі С-кінцеві лізини, за виключенням анексину 2. Рецептори з цитоплазматичними доменами не мають С-кінцевих лізінів і представлені, головним чином, сімейством інтегринових протеїнів (αIIbβ3, αVβ3, α4β1, α5β1, αMβ2).

Взаємодія плазміногену з рецепторним комплексом анексин A2-S100A10 пов'язана з розвитком запальних процесів, тромбозів, злоякісного росту та автоімунних розладів [226]. Гістон H2B забезпечує зв'язування плазміногену з моноцитоїдними клітинами через взаємодію з фосфатидилсерином під час їхньої диференціації або апоптозу [268]. Плазміноген може зв'язуватися з енолазою-1 на поверхні моноцитоїдних клітин, що сприяє утворенню плазміну та подальшій міграції клітин [670]. Рецептор Plg-R_{KT} залучається до плазміноген-залежного регулювання інвазії макрофагів, хемотаксис-спрямованої міграції та рекрутингу клітин під час запалення [375]. Важливу роль у проведенні сигналу досередини клітини відіграє стимулювання плазміном PAR-рецепторів (PAR-1 та PAR-4) [548]. Слід зазначити, що деякі рецептори плазміногену експонуються клітинами, переважно, в активованому або трансформованому стані. Наприклад,

тромбоцити, стимульовані тромбіном або колагеном, експонують актин – один з найбільш афінних рецепторів плазміногену, тоді як тромбоцити у стані фізіологічного спокою практично не презентують цей цитоскелетний протеїн на поверхні мембрани [221, 615, 620]. Можливе функціональне значення взаємодії плазміногену з поверхнево експонованим актином залишається наразі нез'ясованим. Припускається, що актин, локалізований на поверхні пухлинних клітин та ендотеліоцитів, може слугувати центром зв'язування зимогену, необхідним для його подальшої активації та можливого утворення ангіостатинів в результаті автопротеолізу плазміну [174, 434].

Накопичується дедалі більше інформації про безпосереднє залучення протеїнів плазмінергічної системи до регулювання експресії генів. Значний інтерес у цьому аспекті привертає до себе система u-PA/u-PAR, яка розглядається наразі як потужний драйвер пухлинного росту [288]. Було встановлено роль u-PAR в епітелійно-мезенхімному переході (ЕМП) у клітинах раку грудної залози лінії MDA- MB- 468. Встановлено, що uPAR сприяє ЕМП за умов гіпоксії через активацію сигнальних шляхів за участі екстрацелюлярної сигнал-регульованої кінази 1/2 (ERK1/2) та фосфоінозітид-3-кінази (PI3K) [107]. Групою дослідників під керівництвом акад. Ткачука В.А. вперше було показано здатність урокінази транспортуватися до ядра та взаємодіяти з транскрипційними факторами, які регулюють проліферацію фібробластів та їхню трансформацію в міофібробласти [586]. Зокрема, було встановлено, що uPA після зв'язування з цитоплазматичною мембраною інтерналізується досередини клітини і швидко транслокується до ядра завдяки взаємодії з нуклеоцитоплазматичним протеїном-переносником нуклеоліном. За допомогою технології CRISPR/Cas9 було показано, що нокаут гену uPAR гальмує проліферацію клітин нейробластоми Neuro2a *in vitro*.

Фізіологічний сенс існування великої кількості різних типів рецепторів плазміногену, їхньої відносно високої щільності розташування на поверхні

клітини, залишаються до кінця незрозумілими. Традиційно вважається, що рецептори плазміногену несуть на своїй поверхні усі клітини крові, за виключенням еритроцитів. Тим не менш, слід звернути увагу на поодинокі повідомлення, які свідчать, що еритроцити хворих на малярію є здатними сорбувати та інтерналізувати значні кількості плазміногену з плазми крові [425].

1.2.2. Регулювання запальних процесів протеїнами плазміноген/плазмінової системи

Плазміноген, протеїни системи його активації та інгібітори, активна протеїназа плазмін, а також клітинні рецептори цих протеїнів, визначають перебіг запальних процесів, прямо або опосередковано залучаючись до регулювання їхніх ключових етапів (рис. 1.10). Присутність порівняно великої кількості копій рецепторів плазміногену на імунних/запальних клітинах є свідченням активної участі плазмін(оген)у в імунних реакціях та запаленні як сигнальних молекул. Плазмін(оген) та інші протеїни цієї протеолітичної системи беруть участь в усіх стадії запалення, а саме, фібринолізі, деградації ЕЦМ, базальної мембрани судин та ремоделювання тканин, регулюванні системи комплементу, рекрутингу й адгезії активованих лейкоцитів на ендотелійних клітинах та подальшій міграції запальних/імунних клітин, ескалації та резолюції запалення. Моноцити та макрофаги презентують значну кількість плазміногенових рецепторів та uPAR, які визначають здатність цих клітин ефективно активувати зимоген. У свою чергу, плазмін-індуковане сигналювання лежить в основі формування функціональної відповіді запальних клітин через продукування різних цитокінів, АФО та інших медіаторів [56, 597]. Беручи участь у вищезазначених подіях, протеїни плазміноген/плазмінової системи відіграють провідну роль як у перебігу нормальних захисних процесів, так і залучаються до патогенезу цілої низки розладів та хвороб, асоційованих із запаленням: загоєння ран, інфекційного процесу, сепсису, фіброзу, ССЗ,

пухлинного росту, нейрозапалення, нейродегенеративних хвороб, артриту, астми, псоріазу та інших [265, 266, 382].

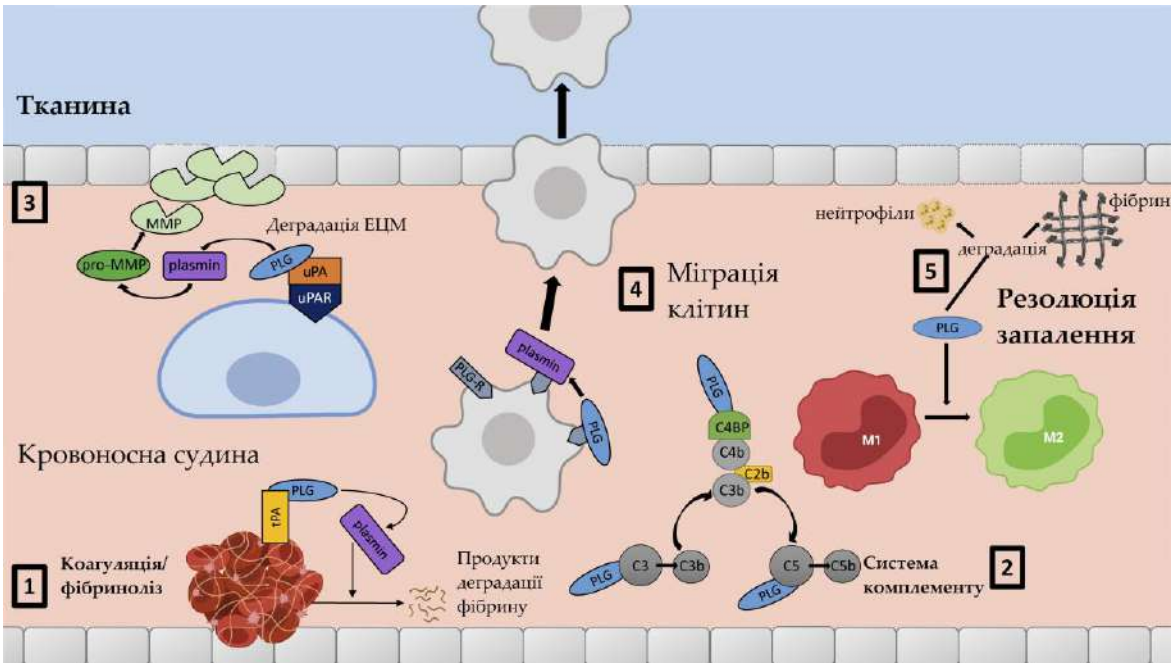

Рисунок 1.10 – Узагальнена схема участі плазміноген/плазміну в регулюванні запальних процесів [56].

Примітки до рис. 1.10: 1 – фібриноліз: під дією активатору плазміноген перетворюється на плазмін на поверхні полімеризованого фібрину, розщеплює згусток з утворенням продуктів деградації фібрину; 2 – плазміноген взаємодіє з низкою протеїнів системи комплементу, зокрема, C3, C3b, C5 та C4BP, залучаючись до модулювання запалення; 3 – асоційований з клітинною поверхнею плазмін сприяє деградації ЕЦМ через активацію MMP, які гідролізують колаген та інші протеїни судинної стінки; 4 – плазмін взаємодіє з рецепторами на поверхні клітин, запускаючи каскад реакцій, які активують міграцію лейкоцитів, нейтрофілів, моноцитів та макрофагів; 5 – плазміноген бере участь у загоєнні ран, руйнуючи фібринові згустки та видаляючи нейтрофіли з ділянки ураження. Плазміноген також сприяє набуттю прозапальними (M1) макрофагами протизапального фенотипу (M2) у ході резолюції запалення.

Рекрутинг лейкоцитів з кровотоку до сайту запалення характеризує ексудативну фазу запального процесу та потребує участі певних розчинних факторів-хемоатрактанів, зокрема, хемокінів [485]. Плазмін, що утворюється в результаті контактної активації фібринолітичного шляху, індукує синтез

лейкотриєнів у периферійних моноцитах, беручи таким чином участь у регулюванні та розповсюдженні запального процесу. Плазмін індукує хемотаксис, залежний від PKC та cGMP, а також полімеризацію актину в моноцитах [647]. Було з'ясовано, що хемотаксис, опосередкований плазміном, а також вивільнення лейкотрієнів та експресія деяких генів залежать від взаємодії плазміну з клітинними рецепторами, що реалізуються як через взаємодію з лізин-зв'язувальними ділянки, так і завдяки його протеолітичній активності. Так, взаємодія плазміну з моноцитами та запуск внутрішньоклітинного сигналювання пов'язані з протеолітичним розщепленням та дисоціацією гетеротетрамеру анексину А2 – комплексу, ідентифікованому на поверхні моноцитів, макрофагів та ендотелійних клітин [352].

Стимулювання моноцитів плазміном активує в них експресію прозапальних генів: тканинного фактору (TF), цитокінів (TNF-α, IL-6, IL-1α/β, CD40, MCP-1), а також релізінг ліпідних медіаторів (рис. 1.11).

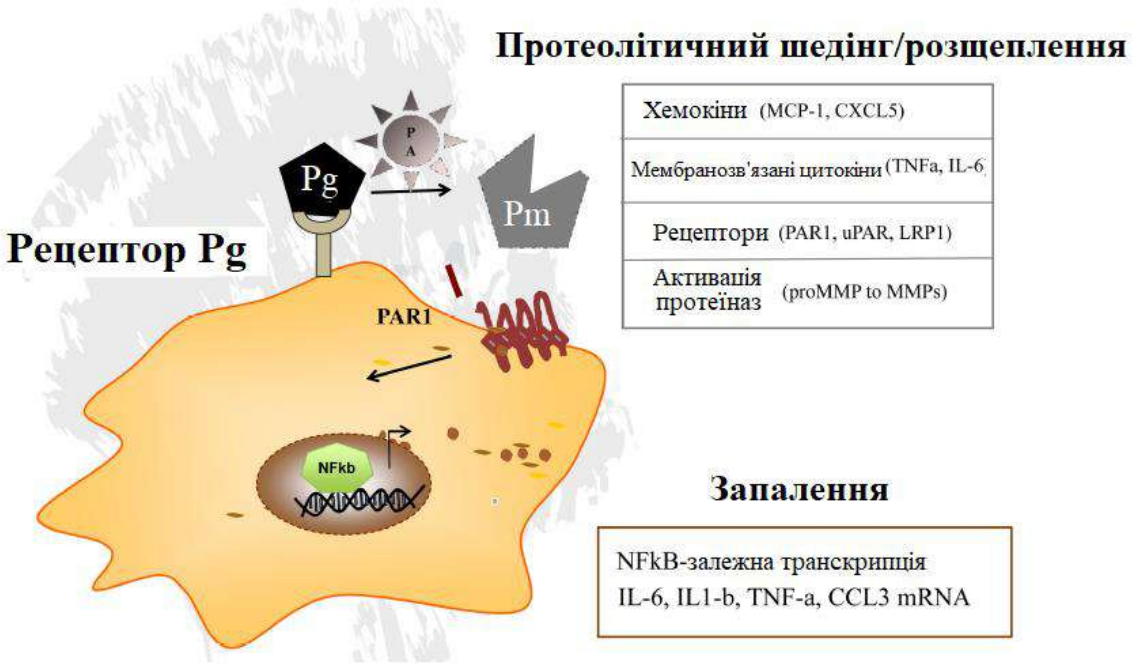

Рисунок 1.11 – Реалізація плазмін-опосередкованого сигналювання через активацію рецептору PAR1 та експресію NF-κB-залежних генів [265].

Деякі з цих ефектів реалізуються внаслідок активації транскрипційного фактору NF-κB та активувального протеїну-1 (AP-1) [595]. Вважається, що NF-κB відіграє центральну роль у координуванні генної експресії у моноцитах/макрофагах та забезпечує молекулярну основу клітинної відповіді на різні стимули [166]. Ділянки зв'язування NF-κB виявлені у промоторних послідовностях цілої низки генів, зокрема, тих, що кодують IL-1, IL-6, TNF-α, MCP-1, TF. Ідентифіковано п'ять членів цієї групи факторів транскрипції, найбільш розповсюдженим з яких є гетеродимер NF-κB, який складається з субодиниць p65 та p50/p52. У цитоплазмі нестимульованих клітин NF-κB знаходиться у комплексі з інгібіторними протеїнами IκB-α и IκB-β. Встановлено, що плазмін здійснює швидку деградацію IκB-α й одночасну активацію NF-κB, а також розщеплює інший цитоплазматичний інгібітор NF-κB – p105. Протеоліз інгібіторних протеїнів NF-κB є результатом їхнього фосфорилювання специфічними кіназами – IKK-α та IKK-β [595]. Плазмін також відіграє роль тригера, який запускає такі сигнальні шляхи, як JAK/STAT, p38 MAPK та ERK1/2 [579].

Важливу роль у регулюванні запальних реакцій за участі плазмін(оген)у відіграє рецептор Plg-R_{KT}. Структура Plg-R_{KT} унікальна: цей одноланцюговий поліпептид (17 кДа), що складається з 147 амінокислотних залишків, є єдиним відомим на сьогодні трансмембранним рецептором плазміногену, який експонує С-кінцевий залишок лізину на поверхні клітини, що забезпечує зв'язування зимогену [435] (рис. 1.12).

Plg-R_{KT} ідентифіковано на мембранах нормальних моноцитів периферичної крові людини, лімфоцитах та гранулоцитах, а також нейронах [438]. Макрофаги нокаутованих за Plg-R_{KT} -/- мишей демонстрували знижену здатність зв'язувати плазміноген, а за тіогліколь-індукованого перитоніту в Plg-R_{KT} -/- мишей спостерігалося зниження ступеня рекрутингу макрофагів до черевної порожнини на 80% [38].

Наразі остаточно нез'ясованим залишається питання стосовно залучення рецепторів PAR до хемотаксису, опосередкованому плазміном.

Тривалий час вважалося, що хемотаксис не залежить від активації PAR-1. Проте, Carmo та ін. [97] показали, що плазмін здатний індукувати рекрутинг моноцитів *in vivo* через розщеплення PAR-1 та активацію шляху MEK/ERK/NF-κB, що у свою чергу стимулює релізінг CCL2 та IL-6 до плевральної порожнини мишей.

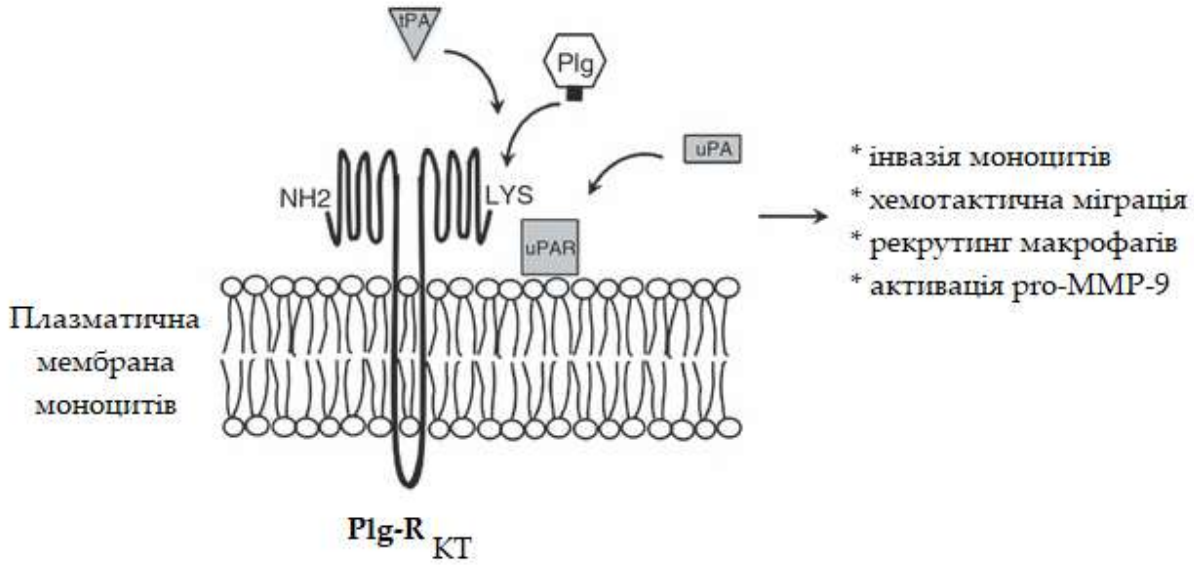

Рисунок 1.12 – Участь рецептору Plg-R_{KT} у рекрутингу моноцитів/макрофагів [226].

Плазмін стимулює моноцити/макрофаги, однак, безпосередньо не активує нейтрофіли [597]. Тим не менш, ця протеїназа опосередковано впливає на нейтрофіли, зокрема, активуючи периваскулярні тучні клітини та запускаючи вторинне генерування ліпідних медіаторів. Інгібітори плазміну (апротінін, транексамова кислота, 6-АГК) ефективно пригнічують активацію тучних клітин/нейтрофілів, запобігаючи таким чином акумуляції нейтрофілів в ішемізованій тканині та ремоделюванню судинної стінки [512]. Плазмін-індукований релізінг нейтрофільних факторів, що активують тромбоцити, опосередковується через активацію плазміном каскаду системи комплементу, що слугує додатковим доказом існування виключно непрямих шляхів активації нейтрофілів плазміном [401].

Сучасні дані наукової літератури свідчать про прояв самостійних прозапальних ефектів PAI-1, які безпосередньо не пов'язані з інгібуванням активаторів плазміногену. Локальна концентрація PAI-1 підвищується у сайтах запалення внаслідок двох причин: 1) вивільнення PAI-1 з α-гранул тромбоцитів під час їхньої активації тромбіном та 2) підсилення генетичної експресії різними прозапальними цитокінами [514]. Показано, що дефіцит PAI-1 істотно пригнічував інтенсивність гострої фази в ендотоксин-індукованій моделі сепсису [250]. У моделі сепсису, індукованого ліпополісахаридом (LPS) у мишей, а також при пошкодженні легені, спричиненому етанолом, пригнічення синтезу PAI-1 запобігало розвитку запалення та відкладанню фібрину у пошкоджених органах [499].

Важливо зауважити, що протеолітичні фрагменти плазмін(оген)у (ангіостатини), на відміну від своїх протеїнів-прекурсорів, демонструють потужну протизапальну активність [110]. Показано, що ангіостатини інгібують активацію та міграцію нейтрофілів [47], а також пригнічують рекрутинг лейкоцитів [483].

Крім провідної ролі, яку відіграє плазмін(оген) у прогресії запалення, ці протеїни також регулюють ключові стадії його резолюції: апоптоз нейтрофілів, репрограмування макрофагів та ефероцитоз (кліренс мертвих клітин макрофагами) [589]. Термінація запалення необхідна для відновлення гомеостазу після впливу ушкоджуючого чинника або патогену і має обов'язковий характер, унеможливлюючи розвиток хронічних запальних процесів (емфізема, фіброз, трофічні виразки тощо). Резолюція запалення досягається за рахунок зниження концентрації хемокінів та пригнічення активності нейтрофілів у травмованій тканині, а механізми резолюції запускаються відразу після ініціації запальної реакції [552]. Макрофаги, в яких запускаються механізми апоптотичної загибелі, у великих кількостях експонують рецептори плазміногену, зв'язують плазміноген, який перетворюється на плазмін, котрий забезпечує кліренс мертвих клітин [463]. Das та ін. [140] показали, що макрофаги мишей з генетичним дефіцитом

плазміногену характеризуються зниженою фагоцитарною активністю. У дослідженнях Vago та ін. [627] показано важливість рецептору Plg-R_{KT} для перебігу адекватної резолюції запалення. Цей плазміногеновий рецептор виявився задіяним до регулювання поляризації макрофагів, переходу макрофагів з прозапального (M1) до протизапального фенотипу (M2) та ефероцитозу, що має вирішальне значення для резолюції запалення.

1.2.3. Протеїни плазміноген/плазмінової системи в функціонуванні тромбоцитів

Тромбоцити людини – без'ядерні клітинні фрагменти мегакаріоцитів, що мають розмір 2-4 мкм, й здатні до активації та переходу зі стану фізіологічного спокою до нового функціонального стану. Тромбоцити з'являються в кістковому мозку, відшнуровуючись від мегакаріоцитів, циркулюють у плазмі в нормі у кількості 180–360×10^9/л й відіграють ключову роль у гемостазі, виконуючи дві основні функції: по-перше, перешкоджають втраті крові за рахунок адгезії до стінки пошкодженої судини та міжтромбоцитарної агрегації, а по-друге, за рахунок експозиції фосфатидилсерину (PS) в активованому стані тромбоцити забезпечують негативно заряджену поверхню, необхідну для прискорення ключових реакцій плазмового згортання і генерування тромбіну – головного ензиму згортання крові [85, 278]. Більш того, тромбоцити, крім виконання прокоагулянтних функцій, залучаються до регулювання низки інших процесів, а саме: запалення, загоєння ран, модулювання імунної відповіді, клітинної міграції та ангіогенезу, підтримання росту судин [225, 316] (рис. 1.13). Крім того, тромбоцити є джерелом ензимів та субстратів, які доповнюють можливості нейтрофілів та ендотелію продукувати протизапальні ліпідні медіатори, які визначають перехід до процесів відновлення тканини після гострої фази запалення [412]. Таким чином, залучення тромбоцитів до різних фізіологічних та патофізіологічних процесів

є можливим завдяки присутності в цих клітинах широкого спектру біологічно активних молекул, а також особливими властивостям тромбоцитарної поверхні, яка забезпечує реалізацію численних взаємодій тромбоцитів з протеїнами та іншими клітинами.

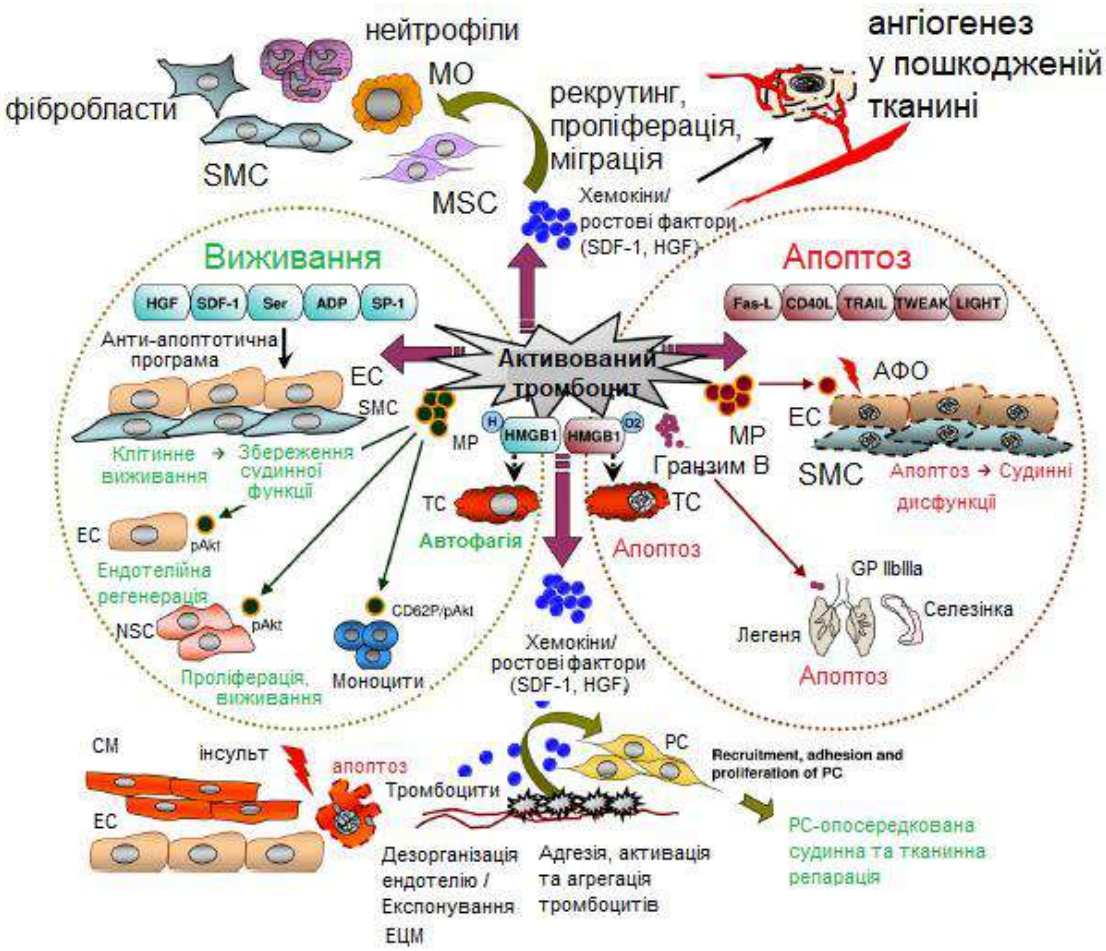

Рисунок 1.13 – Залучення тромбоцитів до регулювання репаративних процесів та апоптозу клітин (SMC – клітини гладеньких м’язів, MSC – мезенхімні стовбурові клітини, МО – макрофаги, EC – ендотелійні клітини, NSC – нейрональні стовбурові клітини, TC – пухлинні клітини, MP – мікрочастинки, АФО – активні форми оксигену [218].

Значну увагу дослідників у царині біології тромбоцитів прикуто до вивчення тромбоцитарного протеому, який налічує більше 4000 різних протеїнів [90]. До складу тромбоцитарного цитозолю входять три типи специфічних гранул (α-гранули, щільні гранули та лізосоми), які є сховищем

різних біологічно активних молекул. Серед усіх гранул, α-гранули (300-500 нм, 50-80 на тромбоцит людини) є найбільш численними. Вони акумулюють великорозмірні протеїни, які необхідні для адгезії та агрегації. Ідентифіковано близько 200 протеїнів, які зберігаються в тромбоцитарних α-гранулах та вивільняються під час активації. Щільні, або β-гранули (250-350 нм, 3-8 на тромбоцит людини) зберігають непротеїнові молекули та містять незначну кількість факторів, які впливають на активність та рекрутинг інших тромбоцитів в ході секреції. Функції лізосом, або γ-гранул, тромбоцитів охарактеризовано недостатньо, проте, відомо, що вони містять гідролази, які забезпечують елімінацію тромбоцитарних агрегатів [33].

Тромбоцити містять плазміноген у складі своїх α-гранул, який, як вважається, секвеструється клітинами з плазми, оскільки мРНК плазміногену не виявляється в мегакаріоцитах [523]. Реципрокні взаємодії плазміногену з тромбоцитарною мембраною мають принципово важливе значення для виконання тромбоцитами своїх функцій як у гемостатичних процесах, так і в регулюванні функціональної відповіді інших клітин. Мембрана активованих тромбоцитів здатна сорбувати у п’ять разів більшу кількість плазміногену, ніж мембрана інтактних клітин: 190000 ± 45000 молекул цього протеїну проти 37000 ± 10000 відповідно (Miles, 2001). Можливість тромбоцитів здійснювати активацію зимогену була показана ще у середині 80-х років минулого сторіччя й активно досліджується донині [431, 432, 629, 657]. Baeten та ін. [52] встановили, що плазмін, який утворюється на тромбоцитах, перетворює одноланцюгову молекулу u-PA на дволанцюгову молекулу, яка, у свою чергу, активує плазміноген за реципрокним механізмом, а також підсилює активність t-PA [469]. Whyte та ін. [657] показали, що активація тромбоцитів тромбіном/конвульксином підсилює не лише зв’язування зимогену з поверхнею тромбоцитів, але й сприяє появі активної протеїнази навіть за відсутності екзогенних активаторів. Цей факт є важливим свідченням функціонування власної системи активації зимогену на нативних тромбоцитах. Наступним важливим спостереженням тих самих авторів було

те, що плазміноген зв'язується з тромбоцитами ще до формування фібринової матриці, а полімеризований фібрин лише підсилює сорбцію зимогену. Таким чином, аналіз даних літератури дозволяє припустити існування двох принципових механізмів зв'язування плазміногену з тромбоцитами: зимоген може зв'язуватися як ліганд з рецепторними молекулами та/або через фібрин(оген)-залежний спосіб.

Продемонстровано [657], що після впливу потужних агоністів на поверхні тромбоцитарної мембрани акумулюється функціонально активний пул плазміногену, що в різній кількості локалізується на тромбоцитах різних популяцій. З використанням експериментальної моделі фізіологічних умов току крові було встановлено, що плазміноген зв'язується безпосередньо з тромбоцитами, однак, на фосфатилилсерин (PS)-позитивних тромбоцитах він візуалізувався переважно на нитках фібрин(огену), що асоційовані з поверхнею клітин, причому кількість плазміногену змінювалася в ході фібринолізу. Таким чином, за особливостями зв'язування плазміногену активовані тромбоцити цитометрично розшаровуються на дві популяції. Розпластані тромбоцити (PS-негативна популяція) акумулюють плазміноген і фібриноген у центральному регіоні поблизу грануломеру, причому зв'язування відбувається в αIIbβ3-залежний спосіб. На противагу ним, PS-позитивні тромбоцити, які формують серцевину («кор») тромбу, зв'язують плазміноген на поверхні виступаючих «шапок» через фібрин(оген) тромбоцитарного походження і відрізняються вираженою здатністю генерувати плазмін на своїй поверхні [137]. Визначення локалізації плазміногену на тромбоцитах має безперечний прикладний інтерес, оскільки відкриває нові перспективи для ефективного та безпечного таргетингу активованих тромбоцитів під час тромболітичної терапії. У цьому контексті важливим є повідомлення про запуск фібринолізу через активацію плазміногену із застосуванням рекомбінантного scu-PA, злитого з антитілом до активованого αIIbβ3 [211]. Таким чином, субпопуляція «закутаних» (*coated*) тромбоцитів може слугувати мішенню для новітніх тромболітиків,

що розробляються з метою підсилення локального фібринолізу. Подальші дослідження функціональних особливостей гетерогенних субпопуляцій тромбоцитів та їхньої взаємодії з протеїнами плазміноген/плазмінової-системи дозволять наблизитися до розуміння тонких механізмів регулювання коагуляції та фібринолізу.

Lenich та ін. [364] вперше продемонстрували активацію плазміногену тромбоцитами, стимульованими тромбіном, і довели вирішальне значення тромбоцитарного u-PA в появі мембраноасоційованого плазміну, який бере участь у регулюванні фібринолізу. Пізніше Dejouvencel та ін. [150] детально описали альтернативний механізм утворення плазміну в ході реалізації перехресних взаємодій (*cross-talk*) між системою фібринолізу та протеолітичними системами клітин крові та ендотелію судин. Згідно із таким запропонованим «перехресним» механізмом, плазміноген, зв'язаний із фібрином, протеїнами ЕЦМ (фібрин(оген)ом, ламініном, вітонектином, фібронектином) або активованими тромбоцитами, може ефективно активуватися урокіназою, асоційованою з поверхнею моноцитів або мікрочасток ендотеліоцитів та моноцитів (рис. 1.14). Крім того, u-PA може експонуватися мігруючими ендотелійними клітинами капілярів, запальними клітинами (моноцитами/макрофагами, фібробластами), а також різними типами пухлинних клітин [200]. Таким чином, описаний «перехресний» механізм генерування плазміну може мати першочергове значення не лише для фібринолізу, але й для міжклітинного протеолізу, відіграючи провідну роль у забезпеченні міграції клітин за запалення та пухлинного росту. В одній з останніх робіт було ідентифіковано рецептор Plg-R_{KT} (типовий для макрофагів) на поверхні мишачих тромбоцитів, активованих тромбіном, та його роль в регулюванні фібринолізу [658].

Дані, які наводяться у науковій літературі стосовно ефектів плазміну на функціональний стан тромбоцитів, є вкрай суперечливими. З одного боку, плазмін у відносно низьких кількостях (< 1.0 CU/мл) та пролонгованої

інкубації призводить до зниження агрегативної активності та чутливості тромбоцитів до тромбіну, колагену або ADP [22, 323, 544].

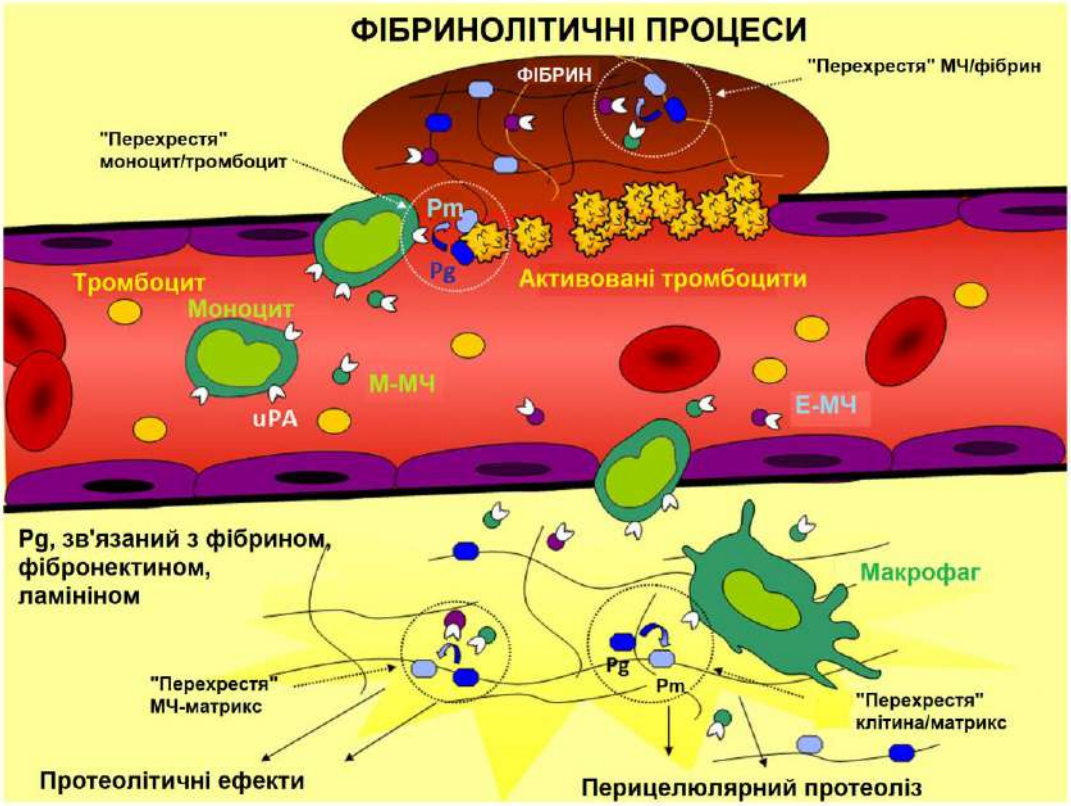

Рисунок 1.14 – Утворення плазміну за механізмом «перехресної» взаємодії між фібринолітичною системою та системою клітинного протеолізу за участі тромбоцитів, лейкоцитів та мікрочасток: МЧ – мікрочастинки, М-МЧ – моноцитарні мікрочастинки, Е-МЧ – ендотелійні мікрочастинки [150].

Плазмін, який утворюється на тромбоцитарній поверхні і залишається зв’язаним з нею, за низьких концентрацій спричинює дисфункцію тромбоцитів, селективно розщеплюючи інтегрин GPIIIa за присутності зв’язаного фібриногену. Припускається, що в ході тривалої інкубації плазмін розщеплює фібриноген, який необхідний для утворення містків між окремими тромбоцитами в процесі агрегації. Інгібувальні ефекти плазміну по відношенню до агрегації тромбоцитів можуть бути також результатом активації ММР, асоційованою с плазматичною мембраною. Встановлено, що активна ММР-9 пригнічує агоніст-індуковану агрегацію тромбоцитів через

інгібування активації фосфоліпази С [561]. З іншого боку, за більш високих концентрацій (≥ 1,0 CU/мл) плазмін здатний до прямої активації тромбоцитів. Одним з можливих шляхів активаційної дії плазміну є його вплив на тромбоцитарне сигналювання через стимуляцію тромбінових PAR-рецепторів, які на тромбоцитах людини представлені ізоформами -1 та -4. Існують експериментальні докази, що стимулювання тромбоцитів людини плазміном реалізується через повільне розщеплення рецептору PAR-4, який відповідає за підтримку хвилі активації та її розповсюдження. Тромбоцити, оброблені антагоністом PAR-4, виявлялися нездатними до агрегації у відповідь на плазмін-індуковану активацію [188].

На відміну від впливу на функціональну активність тромбоцитів плазміном, ефекти зимогену та його різних форм на функціональний стан цих клітинних утворювань залишалися тривалий час поза увагою. Втім, у попередніх дослідженнях, проведених у відділі хімії та біохімії ферментів ІБХ НАНУ, було встановлено, що частково деградована форма плазміногену (Lys-плазміноген), на відміну від нативної молекули зимогену, проявляє виражену антиагрегативну активність, ефективно пригнічуючи у концентрації 1,2 мкМ агоніст-індуковану агрегацію тромбоцитів людини [13, 520, 521]. Доведено, що антиагрегативна дія Lys-плазміногену не обумовлена каталітичною активністю його SPD, оскільки проявляється за присутності в середовищі агрегації апротиніну – інгібітора серинових протеїназ. Дані, отримані в експериментах з 6-АГК, вказують на те, що для забезпечення інгібувального ефекту Lys-форми зимогену визначальною є високоспецифічна взаємодія проензиму з протеїнами на поверхні тромбоцитів, яка опосередкована LBS його кринглових структур. Беручи до уваги отримані результати, було зроблено висновок про те, що зв’язування Lys-плазміногену з його рецепторами на тромбоцитарній поверхні відбувається із залученням LBS К1, 4 або 5 молекули зимогену. Конкурентна здатність кринглвмісних фрагментів плазміногену є свідченням тотожності їхніх сайтів зв’язування з такими для Lys-плазміногену. Отримані дані дають

підстави вважати, що інгібування Lys-плазміногеном, але не нативним зимогеном, агрегації тромбоцитів обумовлене мультицентровим характером його взаємодії з рецепторами на тромбоцитах із залученням кількох кринглових доменів [520, 521].

Було розпочато серію експериментальних робіт з метою визначення ключових механізмів анти-агрегативних ефектів Lys-плазміногену. Зокрема, було показано, що попередня інкубація тромбоцитів з Lys-плазміногеном, що передує дії агоністів, запобігає адекватній перебудові актинового цитоскелету клітин [15] та пригнічує секрецію α-гранул, рівень якої визначався за експонуванням P-селектину [16]. Доведено модулювальний вплив Lys-плазміногену на експонування адгезивного протеїну вітронектину – одного з адгезивних лігандів інтегрину αIIbβ3 – на поверхні активованих тромбоцитів [691]. Не виключено, що у комплексі [вітронектин – Lys-плазміноген], вітронектин не здатний зв'язуватися з інтегрином αIIbβ3 через стеричні перешкоди. Відповідно, це буде впливати на ефективність агрегації та утворення міжклітинних контактів, оскільки зв'язок вітронектину з інтегрином αIIbβ3 є умовою для формування стабільного міжтромбоцитарного контакту за участю фібриногену. Всупереч результатам, що вказують на відносну інертність нативної форми зимогену щодо впливу на агрегативну здатність тромбоцитів, встановлено, що Glu-плазміноген потенціює дію тромбіну та колагену, спрямовану на інтенсифікацію експонування PS на тромбоцитарній поверхні та появі PS-позитивної субпопуляції тромбоцитів [692]. Тим не менш, тонкі механізми інгібувальної дії Lys-плазміногену залишаються нерозкритими, зокрема, вплив цього протеїну на утворення активних форм оксигену (АФО) як важливу ланку внутрішньотромбоцитарного сигналювання [623]. Детального дослідження потребують також можливі ефекти кринг-вмісних фрагментів плазміногену (ангіостатинів) на реорганізацію цитоскелету тромбоцитів [625].

Порушення дегрануляції тромбоцитів Lys-плазміногеном за їхнього стимулюання тромбіном та колагеном дає підстави припускати, що ця форма зимогену модулює вивільнення не лише гемостатичних та адгезивних факторів, але й регуляторів ангіогенезу, які містяться у складі α-гранул. Роль тромбоцитів у регулюванні росту нових судин активно досліджується з огляду на ключове значення цих клітин як у репаративній неоваскуляризації (загоєння виразок та ран), так і патологічному ангіогенезі [515, 639]. У зв'язку з цим запропоновано та впроваджено до наукової літератури новий термін «тромбоцитарний ангіогенний протеом» (*platelet angiogenic proteome*) [325]. Експериментально доведеною є здатність тромбоцитів до стимулювання ангіогенезу, що набуває особливого значення в контексті підтримки ними пухлинного росту, утворення метастазів та захисту малігнізованих клітин від імунної системи організму [65, 661].

Відомо, що в тромбоцитах проангіогенні та ангіостатичні фактори локалізовано в різних субпопуляціях α-гранул, вміст яких вивільняється диференційно у відповідь на стимуляцію, чим забезпечується чітке координування ініціації та термінації репаративного ангіогенезу за участі тромбоцитів [64, 285, 325]. Ідентифіковано сигнальні шляхи, які задіяні до дискретизації релізінгу ангіогенних регуляторів тромбоцитами людини. Так, активація тромбінового рецептору PAR-1 (найбільш важливий шлях), рецепторів АДФ (P2Y1/P2Y12) та рецептору колагену GPVI призводить до вивільнення фактору стромальних клітин 1α (SDF-1α) та VEGF, що значною мірою визначає проангіогенні властивості тромбоцитів. Активація іншого рецептору тромбіну (PAR-4) стимулює секрецію ендостатину та тромбоспондину-1 – потужних інгібіторів ангіогенезу [403] (рис. 1.15).

Так, тромбоцити накопичують (у деяких випадках у концентраціях, що у 400 разів перевищують рівні у плазмі!) і вивільняють цілий набір різних цитокінів та факторів росту (VEGF, PDGF, bFGF, EGF, HGF, IGF-1 та -2, ангіопоетини), протеїназ та інших ензимів (система активації Pg, MMP-1, -2, -3 та -9, гепаріназа) та інших біологічно активних молекул (сфінгозин-1-

фосфат, ліганд CD40, серотонін, ліпопротеїн А, дезоксирибозо-1-фосфат), які відіграють вирішальну роль в активації репаративного ангіогенезу за загоєння ран або підтримці ангіогенезу в пухлинах [218, 528]. Порівнюючи ці два процеси через призму концепції ангіогенезу, в науковій літературі пухлини образно описуються як «рани, що не загоюються» (*"tumors are wounds that do not heal"*) [546].

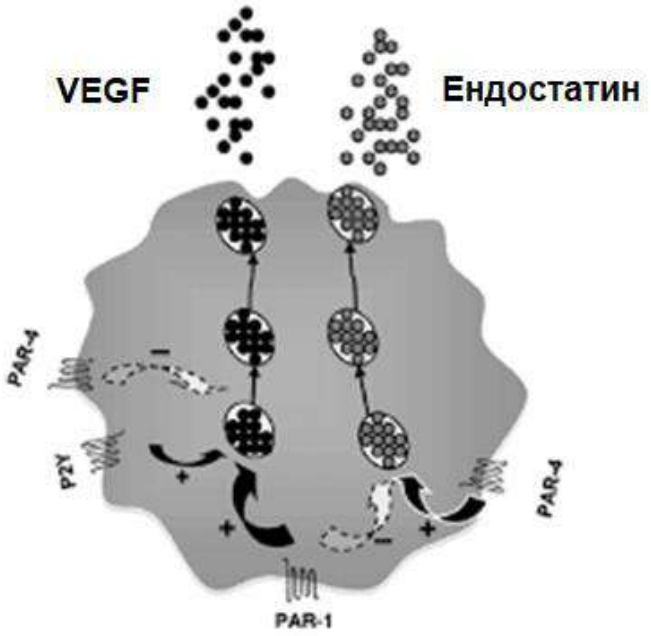

Рисунок 1.15 – Вивільнення регуляторів ангіогенезу тромбоцитами через активацію різних сигнальних шляхів [403].

Головну роль у формуванні проангіогенного фенотипу тромбоцитів відіграє VEGF, відомий як найбільш потужний мітоген ендотелійних клітин та фактор проникності судин [532]. VEGF синтезують та продукують клітини різних гістотипів, у тому числі стромальні та пухлинні клітини епітелійного походження, однак, головним джерелом цього протеїну в плазмі крові є тромбоцити. Показано, що тромбоцити та клітини-попередники (мегакаріоцити) містять як мРНК VEGF, так і власно протеїнові молекули-транскрипти [42]. У літературі описано застосування VEGF або клітин, що його продукують, в ангіогенній терапії з метою лікування хронічних ран, у

тому числі трофічних виразок шкіри пацієнтів з цукровим діабетом. Використання збагаченої тромбоцитами плазми у комплексному лікуванні венозних виразок створює сприятливі умови для перебігу репаративних процесів у виразці, що впливає на якість дозрівання і диференціювання сполучнотканинних регенератів та прискорює крайову епітелізацію [151].

З іншого боку, VEGF активно залучається до розвитку низки патофізіологічних процесів, пов'язаних зі стимулюванням активності ендотеліоцитів та надмірним ангіогенезом (пухлинний ріст та метастазування, діабетична ретинопатія, псоріаз та ін.) [454]. Вивільнення ростових факторів активованими тромбоцитами у пухлинному мікрооточенні значною мірою пояснює асоціацію між венозним тромбоемболізмом та раком – феноменом, описаним Armand Trousseau ще у 1865 р. Значною мірою це пов'язано зі здатністю тромбоцитів пацієнтів з онкологічними хворобами накопичувати (дедалі більше в ході прогресії пухлини) та вивільняти значну кількість VEGF у порівнянні із здоровими донорами [324]. Встановлено, що розвиток пухлин підшлункової залози, сечового міхура та легені корелює зі станом венозної тромбоемболії на 20, 8 та 5 % відповідно [116] та асоційований з негативним прогнозом виживання пацієнтів [254]. Виявилося, що концентрація VEGF у сироватці крові онкологічних хворих корелює з кількістю тромбоцитів [633]. Сироватка крові онкохворих показувала здатність стимулювати проліферацію ендотелійних клітин HUVEC та сприяти утворенню капіляроподібних структур *in vitro* [531]. Існування зв'язку між тромбоцитарним пулом VEGF та пухлинним ростом безпосередньо встановлено у дослідженні Di Vito та ін. [157], автори якого описали механізм «експлуатації» тромбоцитів клітинами гліобластоми, які безпосередньо рекрутують тромбоцити та стимулюють секрецію їхніх проангіогенних α-гранул за рахунок утворення та вивільнення значної кількості АДФ.

Результати експериментальних досліджень останніх років значно розширили уявлення про регуляторну роль VEGF в організмі. Встановлено, що VEGF виступає хемоатрактантом для моноцитів, тучних клітин та

періцитів, функціонуючи таким чином як прозапальний цитокін. Реципрокне підсилення експресії VEGF спостерігається під дією таких факторів росту, як EGF, TGF-β та IL-1β та Il-6 [332]. Крім пухлинного ангіогенезу, тромбоцитарний пул VEGF робить внесок до підвищення проникності судин за загоєння ран та сепсису, який супроводжується розсіяним внутрішньосудинним згортанням, а також розвитку ендотелійної проліферативної хвороби у пацієнтів з первинною легеневою гіпертензією та бронхолегеневою дисплазією [408]. Патогенез діабетичної ретинопатії та ретинопатії новонароджених також включає ланку, до якої задіяні VEGF та інші проангіогенні фактори тромбоцитарного походження [328, 694]. Отже, пригнічення надмірної активності тромбоцитів за патологічних станів можна розглядати не лише з позицій зниження ризику тромбоутворення, але й зменшення ступеня їх ангіогенності як одного з ключових факторів прогресії та підтримки пухлинного росту, а також патогенезу низки патологій, асоційованих з надмірним судиноутворенням. У цьому контексті перспективними виглядають дослідження впливу на вивільнення тромбоцитарного VEGF Lys-форми плазміногену як протеїну, що зменшує ступінь агрегації тромбоцитів та пригнічує агоніст-індуковану секрецію їхніх α-гранул.

На відміну від функціонального значення проангіогенних регуляторів, набагато менше відомо про ефекти ангіостатичних протеїнів тромбоцитарного походження (тромбоспондину-1, ангіостатинів, ендостатинів, тромбоцитарного фактору-4 (PF-4), TGF-β, TIMPs, PAI-1 та ін.) [285, 505]. Наявність у тромбоцитах власного пулу плазміногену (а також можливість додаткового зв’язування зимогену активованими тромбоцитами), функціонування ензимів системи його активації та низки ізоформ MMP дають підстави припускати здатність тромбоцитів утворювати ангіостатини через обмежений протеоліз плазміногену власними протеїназами *de novo*. Jurasz та ін. у 2003 р. експериментально довели можливість утворення ангіостатинів тромбоцитами. Дослідники зробили декілька важливих

спостережень, а саме: генерування ангіостатинів шляхом обмеженого протеолізу плазміногену є u-PA-залежним процесом, фрагменти плазміногену, що утворилися, були функціонально активними молекулами, здатними інгібувати проліферацію та міграцію ендотелійних клітин [305, 306].

На сьогоднішній день не розкритим залишається питання стосовно природи центру зв'язування плазміногену на поверхні тромбоцитів як необхідної умови утворення ангіостатинів. На роль такого рецептору плазміногену може претендувати цитоскелетний протеїн актин, який експонується на мембрані активованих тромбоцитів [221, 615]. Експонування актину у такій «незвичній» локації притаманне й деяким іншим клітинам, зокрема, низці пухлинних клітин, гормон-секретувальним клітинам, ендотеліоцитам, клітинам гладеньких м'язів, сперматозоїдам тощо [570, 614]. Показано, що експонований актин залишається фізично асоційованим з внутрішньоклітинними мікрофіламентами, а його поява на поверхні клітини залежить від їхнього функціонального стану [470]. Проте, механізми транслокації протеїну мікрофіламентів на клітинну поверхню та фізіологічне значення цього феномену залишаються практично невідомими. Припускається, що «поверхневий» актин може функціонувати як високоафінна матриця для зв'язування (K_d 70-140 нМ) та активації плазміногену за участі u-PA, зв'язаного з власним рецептором (u-PAR) [174]. Потенційне значення цього процесу полягає у подальшій можливості автопротеолізу плазміну з утворенням ангіостатину K1-4,85, який вивільняється до середовища, оскільки втрачає здатність утримуватися на мембрані через розщеплення K5 [642]. Механізм утворення ангіостатинів тромбоцитами в ході мембранозалежних процесів залишається до кінця не зрозумілим, також ще належить встановити функціональне значення ангіостатинів тромбоцитарного походження. Не викликає сумніву, що розведення процесів вивільнення активаторів та супресорів ангіогенезу тромбоцитами як у просторі, так і у часі, є надзвичайно важливим з точки

зору локального координування активності ендотелійних клітин в ході неоваскуляризації у зоні формування тромбу. З цього приводу принципово важливими є дані Radziwon-Balicka та ін. [506], згідно з якими генерування ангіостатинів тромбоцитами, а також вивільнення цих протеїнів з тромбоцитарних α-гранул, відбувається у часі пізніше за релізінг молекули-антагоніста – VEGF – з іншої субпопуляції α-гранул. Той факт, що пригнічення генерування ангіостатинів тромбоцитами за присутності ацетилсаліцилової кислоти відновлювало здатність ендотеліоцитів до міграції, свідчить про важливість стадії активації тромбоцитів для утворення фізіологічно значимих кількостей ангіостатинів. Отримані дані доводять, що утворення тромбоцитами ангіостатинів *de novo* може відбуватися паралельно їхньому вивільненню і становити альтернативне секреції джерело утворення цих інгібіторів судинного росту. Отримана інформація може бути цінною для розуміння ролі, яку відіграють тромбоцити за нормальних процесів (зокрема, репарації тканин), а також за патофізіологічних станів (пухлинний ріст, ішемічна хвороба серця, атеросклероз, тощо). Jurasz та ін. [307] довели можливість залучення тромбоцитарних ангіостатинів до патогенезу ідіопатичної легеневої артеріальної гіпертензії. Було показано, що у пацієнтів з цією патологією кількість активованих/апоптотичних тромбоцитів та рівень утворення тромбоцитарних ангіостатинів значно перевищували ці показники у контрольній групі.

Отже, модулювання утворення ангіостатинів тромбоцитами може дозволити регулювати перебіг широкого кола патофізіологічних процесів, патогенетичною ланкою яких є порушення балансу між активаторами та супресорами судинного росту. У проведеному дисертаційному дослідженні перевірялася, зокрема, гіпотеза стосовно регуляторної функції Lys-плазміногену по відношенню до тромбоцитів. Крім його потенційної ролі як молекули, що обмежує секрецію проангіогенних факторів тромбоцитами, Lys-плазміноген може безпосередньо слугувати субстратом для утворення

ангіостатинів, сприяючи набуттю тромбоцитами антиангіогенних властивостей.

1.2.4. Залучення протеїнів плазміноген/плазмінової системи до регулювання пухлинного росту та метастазування

Плазміноген, компоненти системи його активації (t-PA, u-PA, PAI-1, PAI-2), асоційовані з ними рецептори (u-PAR, LRP1) та плазмін відіграють провідну роль у процесах, пов'язаних з малігнізацією, пухлинним ростом та метастазуванням [266]. Ці протеїни модулюють функціонування ключових сигнальних шляхів, які контролюють усі ознаки злоякісної трансформації: 1) резистентність пухлинних клітин до апоптозу/аноікісу, 2) індукція ангіогенезу через репрограмування М2-макрофагів, 3) підтримання реплікативного безсмертя клітин, 4) активація інвазії та метастазування через утворення екзосом, 5) підтримання проліферативного сигналювання, 6) уникнення впливу супресорів росту [258].

Розвиток та прогресія пухлинного росту, а також набуття раковими клітинами метастатичного потенціалу, у значній мірі залежить від їхньої здатності експонувати рецептори плазміногену на поверхні плазматичної мембрани [344]. Найбільш дослідженими рецепторами плазміногену, які асоційовані з пухлинним ростом й використовуються як діагностичні маркери та потенційні фармакотерапевтичні мішені, є енолаза-1, анексин-2, цитокератин-8 та β-актин [102]. Проведення порівняльного аналізу протеїнів клітинної поверхні надінвазійних та неінвазійних сублініій ракових клітин дозволило встановити, що клітини з високим інвазійним індексом експресують значно більшу кількість рецепторів плазміногену. Зокрема, високометастатичні клітини лінії раку грудної залози MDA-MB-231 показують підвищену здатність зв'язувати та активувати зимоген у порівнянні з клітинами з меншим метастатичним потенціалом MCF-7 і T-47D [509]. Серед гліом експресія специфічних рецепторів плазміногену корелює

зі ступенем прогресії пухлинного росту. За інших онкологічних захворювань, зокрема, гліобластоми та раку печінки, підвищена експресія α-енолази та анексину-А2 асоційована з несприятливим прогонозом [231]. Отже, висока інтенсивність перицелюлярного протеолізу є характерною рисою ракових клітин.

У разі порушення плазміном адгезивних та міжклітинних контактів запускається механізм апоптотичної загибелі за механізмом, який отримав назву аноікіс (від грецького *anoikis* – бездомність). Ключовий біологічний сенс аноікісу – підтримання гомеостазу тканин через унеможливлення їхньої колонізації «чужими» клітинами (аберантної реадгезії) [601]. Порушення регулювання аноікісу є важливою ланкою у розвитку низки патологічних станів [327]. Зокрема, в основі механізмів інвазії та утворення метастазів злоякісних пухлин лежить набуття трансформованими клітинами здатності до відокремлення від мікрооточення та міграції. Порушення механізмів апоптозу/аноікісу створює передумови для виживання передракових епітелійних клітин. Резистентність до аноікозу робить значний внесок до утворення метастазів, оскільки дозволяє раковим клітинам вижити після відокремлення від матриксу та у подальшому успішно колонізувати будь-яку тканину [93]. Однак, захисні механізми, які забезпечують виживання ракових клітин після їх відокремлення від субстрату або клітинного середовища, спричиненого плазміном, залишаються недосліудженими. Показано, що синтез та секреція специфічних інгібіторів плазмінергічної системи, таких, як α_2-АР, нейросерпін, серпін В2, PAI-1/PAI-2 та інших, запобігають плазмін-опосередкованому проапоптотичному сигналюванню [628]. До інших механізмів резистентності до аноікісу відносять зміни патернів експресії інтегринів, створення власного позаклітинного матриксу, використання ЕМП, перманентну активацію сигнальних шляхів клітинного виживання (шляхи PKB-Akt та ERK), синтез мутованих й функціонально неактивних форм регуляторних протеїнів, генерування активних форм оксигену (АФО) та окиснення/активацію ними тирозинкінази Src та запуск сигнальних шляхів

виживання, дерегулювання та адаптацію метаболізму (перехід на аеробний гліколіз – ефект Варбурга – або запуск автофагії) [246]. З цього приводу особливу увагу привертає автофагія як потенційний механізм, який дозволяє раковій клітині виживати певний час у неприкріпленому стані, допоки клітина не відновить адгезивні зв'язки у дистальній тканині та не запустить інтегрин-опосередковане сигналювання. Автофагія, або клітинний канібалізм, становить еволюційно консервативний і генетично детермінований клітинний процес, спрямований на повну або часткову деградацію клітинних органел та макромолекул в автофагосомах. У залежності від ситуації, автофагія призводить або до самознищення клітини, або до її виживання (репаративна автофагія) [111, 451]. Відомо, що послаблення інтегринового сигналювання через втрату адгезивних контактів інгібує фосфоінозитол-3-фосфат-кіназний-Akt-шлях, що негативно позначається на транспорті глюкози та загальному енергетичному метаболізмі, призводить до зменшення рівня синтезу АТФ, внаслідок такої депривації запускається апоптоз [31]. За образним висловом авторів роботи [236] існування трансформованої клітини у відокремленому стані є «ахілесовою п'ятою» раку. Тому дослідження молекулярних механізмів, які забезпечують здатність злоякісних клітин уникати апоптозу/аноікісу, спричиненими плазмін(оген)ом, є надзвичайно актуальними.

Деградація медіаторів апоптозу в автофагосомах є ще одним шляхом, який робить істотний внесок до набуття раковими клітинами резистентності до дії проапоптотичних факторів. До найбільш важливих регуляторів цього процесу належить Beclin-1 – протеїн, який модулює антиапоптичну активність Bcl-2, Bcl-$_{XL}$ та MAPK. Експресія Beclin-1 прямо корелює з формування автофагосом, а пригнічення рівня експресії Beclin-1 інгібує автофагію [95]. Інший протеїн, який бере участь у процесах автофагії, LC3 (microtubule-associated protein light chain 3), відіграє важливу роль у біогенезі автофагосом. LC3 є поліпептидом, асоційованим з мікротрубочками, головною функцією якого є регуляція взаємодії мембран автофагосом з

лізосомами і цитоскелетом. При формуванні автофагосом цитозольна форма LC3 (LC3-I) частково деградує та кон'югує з фосфатидилетаноламіном с утворенням відповідного ліпокон'югату (LC3-II), який вбудовується до автофагосомальної мембрани [604].

Провідну роль у набутті клітинами малігнізованого фенотипу та підтримці пухлинного росту та метастатичного потенціалу відіграє система u-PA/u-PAR [288, 407] (рис. 1.16).

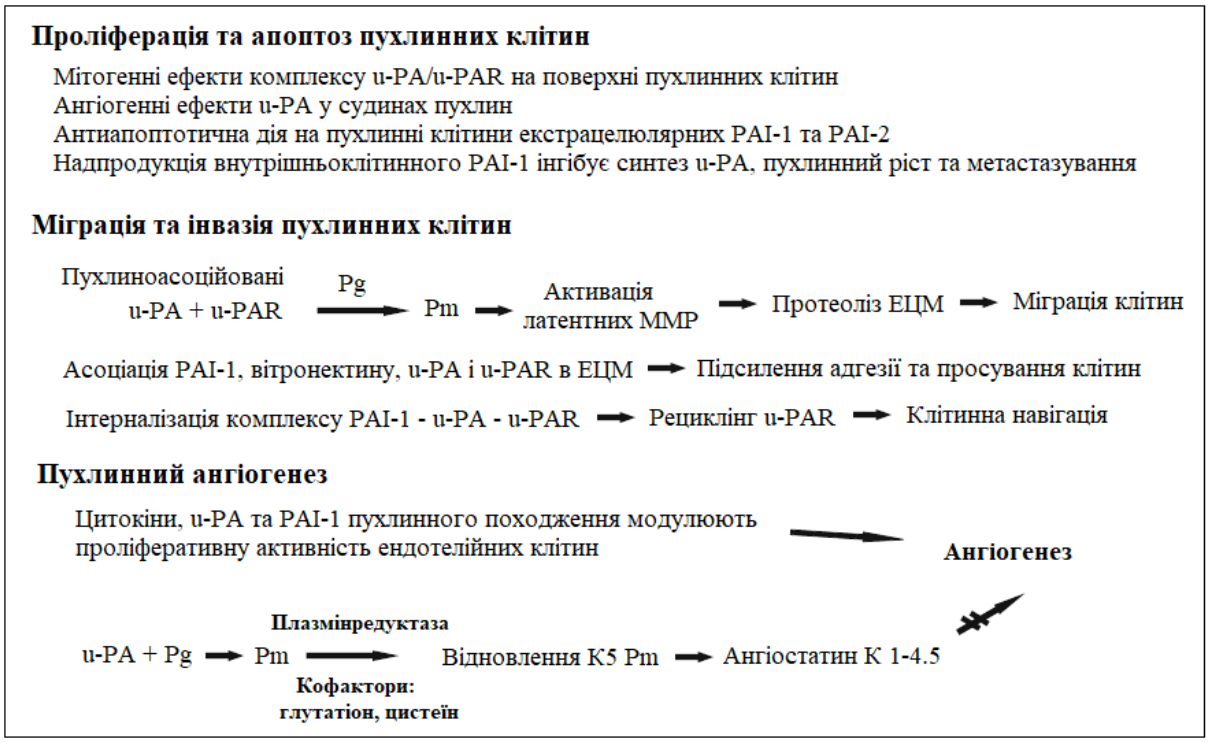

Рисунок 1.16 – Участь протеїнів системи плазміноген/плазміну в процесах пухлинного росту та метастазування.

Експресія гену *PLAU*, що кодує u-PA, підтримується на мінімальному рівні у нормальних клітинах, тоді як в онкотрансформованих клітинах активність цього гену зростає у декілька разів. Тригерами, що активують експресію *PLAU* в пухлинних клітинах, є різні ростові фактори, цитокіни, гормони, морфологічні зміни клітини, а також епігенетичні чинники, зокрема, гіпометилювання промоторної ділянки гену [471]. Аналогічним чином підсилення експресії *PLAUR* – гену, що кодує u-PAR, спостерігається

у малігнізованих тканинах й не притаманне нормальними тканинам, що робить протеїни системи uPA/u-PAR потенційними мішенями фармакотерапії раку [230]. Такі транскрипційні фактори, як Sp1, NF-κB, TCF та HIF-1α, а також кооперативні взаємодії з геном рецептору епідермального ростового фактору (EGF) *HER2*, визначають високий рівень експресії *PLAUR* [284]. Встановлено позитивну кореляцію між концентрацією uPA та метастатичним потенціалом різних ліній ракових клітин. Надекспресія/надактивація протеїнів плазмінергічної системи у тканині злоякісних новоутворень корелює з негативним прогнозом для пацієнтів, хворих на рак грудної залози, легені, стравоходу, шлунку, прямої кишки, печінки, нирки, яєчнику, ендометрію, простати та мозку (гліобластома) [61, 167].

Результати досліджень останніх років дають підстави стверджувати, що протеїни системи u-PA/u-PAR на пухлинних клітинах функціонують не лише як молекулярний «скрепер», що розчищає міжклітинний простір, полегшуючи та спрямовуючи їхню міграцію за мезенхімним типом, але й виконують низку регуляторних функцій як сигнальні молекули, визначаючи основні властивості малігнізованих клітин. Зв’язування урокінази з її рецептором є ключовою подією, що запускає множинні каскади сигнальних механізмів, які контролюють проліферацію, виживання, адгезію, рухливість та інвазію ракових клітин [141] (рис. 1.17).

Передача сигналу досередини клітини забезпечується через взаємодію u-PA/u-PAR з різними трансмембранними протеїнами, зокрема, сімейством інтегринів, рецепторами тирозинкіназ та рецепторами, що відповідають за хемотаксис [288]. Асоціація u-PA з u-PAR разом з протеолітичною активністю u-PA є необхідними умовами генерування промітотичного сигналу, що разом з активацією рецептору EGF, сприяють надекспресії проліферативних факторів [374]. Не лише урокіназа, але й плазмін також відіграє роль промітотичного фактору, активуючи латентні фактори росту, що акумулюються в перицелюлярному просторі (FGF-2, IGF-1, HGF, PDGF, VEGF-C, VEGF-D), запускаючи проліферацію як пухлинних клітин, так і

ендотеліоцитів, що є ключовою ланкою підтримання ангіогенезу, асоційованому з ростом солідної пухлини [530]. Виявилося, що функціонування системи u-PA/u-PAR підтримує пухлинний ріст ще й через залучення цих протеїнів до цитопротекторних механізмів, що дозволяє раковим клітинам уникати апоптозу [372]. Рецептор урокінази бере участь у регулюванні такого феномену, як дормантність пухлини (стан спокою, у якому пухлина може перебувати десятиріччя, після чого активуються і можуть давати фатальний рецидів).

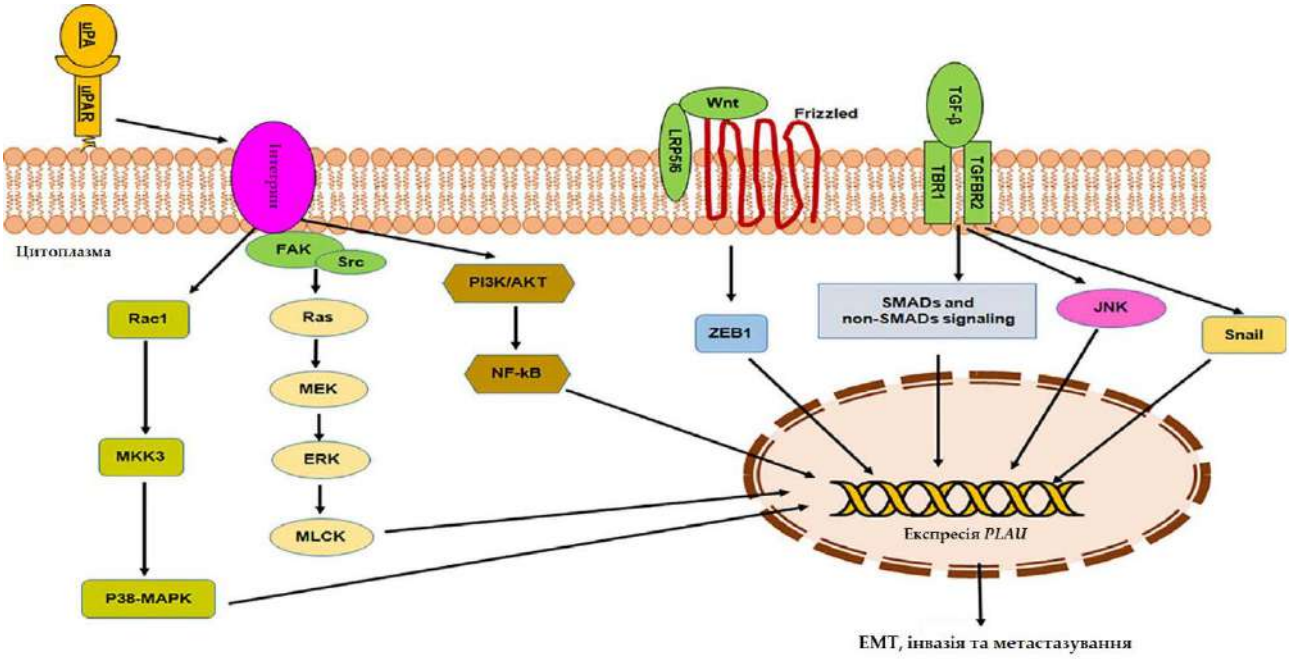

Рисунок 1.17 – Схема функціонування сигнальних шляхів у пухлинних клітинах за участі u-PA/u-PAR, що регулюють епітелійно-мезенхімний перехід, інвазію та метастазування [141, 288].

Примітка: комплекс u-PA/u-PAR взаємодіє з корецептором інтегрином, що запускає клітинне сигналювання. Така кооперація рецепторів активує різні сигнальні шляхи, зокрема, RAC1, FAK та PI3K. Експресія гену *PLAU* регулюється двома шляхами: шлях Wnt/β-catenin активує синтез u-PA через ZEB1, тоді як TGF-β підсилює експресію гену uPA через SMAD-залежне та SMAD-незалежне сигналювання, а також JNK- та snail-сигналювання.

Дормантні пухлинні клітини відрізняються вкрай низьким рівнем метаболізму, екстремальною стійкістю до ушкоджуючих впливів та зниженою експресією протеїнів клітинної поверхні. Одним з механізмів виведення пухлини із «сплячого» стану є її взаємодія з мікрооточенням через зв'язування u-PAR з інтегринами [25].

Крім участі в регулюванні проліферації та апоптозу, протеїни u-PA/u-PAR беруть участь у модулюванні інвазійних властивостей ракових клітин. Здатність ракових клітин до інвазії та хомінгу у віддалених тканинах та органах визначає потенціал неоплазій утворювати осередки вторинного росту. Відомо, що більше 90% усіх фатальних випадків від онкологічних хвороб спричинені поширенням та прогресію метастазів [193]. У механізмах набуття раковими клітинами прометастатичного потенціалу ЕМП відіграє вирішальну роль. ЕМП – це фундаментальний біологічний процес, що полягає у трансформуванні поляризованих клітин епітелійного фенотипу у високоінвазивні мезенхімні клітини, які володіють підвищеною міграційною активністю, проявляють резистентність до апоптозу та здатність синтезувати значні кількості протеїни ЕЦМ. Різні транскрипційні фактори, такі як Twist1/2 та Six, Snail 1/2, TGF-β та Wnt/β-сигналювання, задіяні до регулювання програми ЕМП. При цьому індукується експресія мезенхімних факторів (N-кадхерин, віментин) та відбувається пригнічення маркерів епітелійного фенотипу, зокрема, Е-кадхерину [536]. Підвищення рівнів uPAR за умов гіпоксії сприяє активації Akt та Rac1-сигнальних шляхів, що стимулює ЕМП та клітинну інвазію [366]. Отримано експериментальні дані щодо здатності пухлинних клітин секретувати екстрацелюлярні везикули, що володіють прометастатичною активністю. Як виявилося, такі мікрочастки, які здатні утворювати клітини різних типів пухлин, є навантаженими u-PA та PAI-1, що є додатковим доказом ролі урокіназної системи в процесах туморогенезу та метастазування, опосередкованих екзосомами [72].

Роль u-PA/u-PAR у мезенхімному (фібробластоподібному) типі клітинної рухливості, який забезпечується перицелюлярним протеолізом та

деструкцією ЕЦМ, що відкриває шлях для міграції пухлинних клітин за градієнтом речовин-хемоатрактантів та факторів росту, детально охарактеризовано [300]. Однак, крім мезенхімного типу міграції, що відбувається як результат ЕМТ, пухлинні клітини здатні також рухатися в амебоїдний спосіб, який стає можливим внаслідок так званого мезенхімно-амебоїдного переходу (МАП) [473]. Margheri та ін. [411] продемонстрували, що повноланцюгова форма u-PAR регулює перемикання міграційного патерну клітини з мезенхімного на амебоїдний. Таким чином, мезенхімний та амебоїдний типи міграції можуть доповнювати один одного в ході пересування клітини, однак, принциповою відмінністю амебоїдного руху від мезенхімного є те, що він не потребує протеолітичної деструкції ЕЦМ та взаємодії з інтегринами. Пухлинні клітини використовують різні сигнальні шляхи для u-PA/u-PAR-опосередкованої міграції, що дозволяє їм максимально повно використати увесь апарат локомоторної машинерії. Мезенхімна рухливість залежить від Rac-залежного скорочення актинового цитоскелету, тоді як модулювання амебоїдної міграції виконує актиновий кортекс, що регулюється Rho-ROCK-залежним сигнальним шляхом, внаслідок чого клітина набуває здатність повзти по підложці та прослизати крізь структурні бар'єри [475]. У роботі Gondi та ін. [228] показано, що пригнічення синтезу u-PA та його рецептору інгібує інвазію клітин гліоми, зменшуючи рівень фосфорилювання FAK, p38 MAPK, JNK та ERK1/2 та активності PI3K, AKT та шляху mTOR, а також пригнічує пухлинноасоційований ангіогенез.

Протеїни плазмінергічної системи контролюють «стовбурові» властивості ракових клітин (*stemness)* [40]. Згідно з концепцією клітинної гетерогенності пухлини, серед усіх клітин, що складають новоутворення, ракові стовбурові клітини (РСК) становлять невелику популяцію клітин, здатних до необмеженої проліферації та постійного самовідтворювання. На сьогоднішній день відкрито та описано РСК у більшості злоякісних новоутворень, з існуванням цих клітин пов'язують основні клінічні проблеми

в онкології. Саме РСК відрізняються резистентністю до дії цитотоксичних чинників та відрізняються високою резистентністю до апоптозу [681].

Подібно до урокінази, надекспресія t-PA також була показана у клітинах гліобластоми, печінки, меланоми, карциноми протоків підшлункової залози та злоякісних лімфоцитах [141]. Показано, що t-PA стимулював проліферацію ракових клітин за механізмом, до якого залучені ERK1/2, рецептор EGF та ANX2 [468]. Зв'язування t-PA з рецептором-скавенджером LRP-1, який регулює дисемінацію пухлинних клітин, ендоцитоз та ліпідний метаболізм, індукувало продукцію клітинами MMP-9 у MEK1- та ERK1/2-залежний спосіб, сприяючи деградації ЕЦМ та прогресії пухлини [280].

У сучасній науковій літературі плейотропні ефекти PAI-1 у модулюванні малігнізації пухлинних клітин описуються у рамках концепції «*PAI-1 cancer paradox*» [337], оскільки його участь у канцерогенезі не може бути описаною виключно з позицій «канонічних» функцій цього серпіну, які він виконує у фібринолітичній системі. Разом з цим, не можна применшувати значення PAI-1 у процесах малігнізації саме як інгібітору утворення плазміну.

Нещодавно було показано, що локальне інгібування фібринолізу високими концентраціями PAI-1 у мікросудинах сприяє екстравазації циркулюючих пухлинних клітин до оточуючих тканин та підтримують метастазування через формування так званих нейтрофільних позаклітинних пасток (*neutrophil extracellular traps*, NET) [270]. PAI-1-опосередковане сигналювання через подальшу активацію шляху Akt - ERK1/2 підсилює проліферацію пухлинних клітин, інгібує апоптоз та сприяє їхньому виживанню, що є важливими умовами для метастазування та утворення вторинних осередків пухлинного росту [239]. Отже, потужні протуморігенні властивості PAI-1 реалізуються через множинні механізми із залученням його до регулювання міграційної та інвазійної активності пухлинних клітин. Крім модулювання рухливості пухлинних клітин та їхнього метастатичного потенціалу, PAI-1 визначає перебіг процесів, що сприяють виживанню пухлинних клітин після втрати ними адгезивності, зумовлюючи набуття

ними стійкості до апоптозу/аноікісу та хеміорезистентності. Завдяки своїй здатності пригнічувати утворення плазміну, цей серпін інгібує внутрішньоклітинну каспазу 3, захищючи пухлинні клітини від апоптозу, індукованого хеміотерапевтичними агентами [347]. Позаклітинний PAI-1 також інгібує розщеплення та шедінг FasL плазміном на поверхні онкотрансформованих клітин, захищаючи їх від FasL-опосередкованого апоптозу за дії цитотоксичних речовин [628]. Через взаємодію з рецептором LRP-1 PAI-1 підсилює c-Jun/ERK-опосередкований шлях сигналювання, що призводить до збільшення рівнів антиапоптотичних регуляторів Bcl 2 та Bcl-X_L [58]. PAI-1 також бере участь у підтримці ангіогенезу, який є необхідною умовою прогресуванню багатьох типів солідних пухлин. Показано, що цей протеїн стимулює неоваскуляризацію шляхом активації міграції, виживання та проліферації ендотелійних клітин [54]. Проангіогенні властивості PAI-1 зумовлені його здатністю захищати ендотеліоцити від розвитку FasL-залежного зовнішнього шляху апоптозу. Ефекти PAI-1 на ангіогенез мають чітку концентраційну залежність. Так, у мікромолярних концентраціях PAI-1 інгібує ангіогенез, тоді як наномолярні концентрації цього протеїну чинять проангіогенні ефекти [155]. Kubala та ін. [337] показали, що PAI-1 сприяє рекрутингу та міграції макрофагів до пухлини, що може робити значний внесок до розвитку запальних процесів та інтенсифікації пухлинного росту. Описано механізм регулювання адгезивних властивостей пухлинних клітин за участі протеїну ЕЦМ вітронектину, який зв’язується з u-PAR і в такий спосіб регулює розподілення рецепторної молекули на клітинній поверхні. Потрійний комплекс u-PA/u-PAR/PAI-l взаємодіє з вітронектином, модулюючи морфологію клітини та її адгезивні властивості: ендоцитоз такого асоціату протеїнів призводить до втрати клітиною адгезивності. Після рециклінгу u-PAR та його експонування на клітинній поверхні адгезивність відновлюється, що надає раковій клітині можливість успішно колонізувати іншу тканину, утворивши вторинний осередок пухлинного росту [134].

Серпін PAI-2, який є продуктом експресії гену *serpinb2*, також залучається до процесів пухлинного росту. Встановлено обернений зв'язок між підсиленням інвазивності та метастазування деяких типів пухлин зі змінами рівня експресії PAI-2. У 50 % мишей віком більше 18 місяців, які мали генетичний дефект PAI-2, спостерігалося спонтанне пухлиноутворення. Більш того, підсилення пухлинного росту відбувалося у мишей з дефіцитом PAI-2, яких інокулювали клітинами меланоми B16 або карциноми легені Л'юіса [654]. Отже, спираючись на увесь наведений фактичний матеріал, можна стверджувати, що компоненти системи uPA/uPAR та її ендогенні інгібітори можуть використовуватися не лише як маркери ступеня малігнізації пухлин, але й бути релевантними молекулярними мішенями для фармакотерапії пухлинного росту та метастазування.

Наразі пильна увага у дослідженні сигнальних механізмів пухлинних клітин прикута до так званих адаптерних протеїнів, які взаємодіють з регуляторними молекулами з утворенням крупних сигнальних модулей, що інтегрують у такий спосіб різні сигнальні шляхи [400]. Одним з таких адаптерних/риштувальних протеїнів є Ruk/CIN85, який контролює міграцію та інвазію ракових клітин, а також модулює їхні стовбурові властивості та метастатичний потенціал. Показано, що агресивність онкотрансформованих клітин, що полягає у набутті ними високоінвазійного фенотипу та резистентності до дії ушкоджуючих факторів, корелює з підвищеною експресією цього протеїну [276, 534]. Samoylenko та ін. [533] показали, що одним з можливих механізмів реалізації адапторної функції протеїном Ruk/CIN85 є його залучення до регулювання активності компонентів плазміноген/плазмінової системи. Авторами вперше встановлено, що Ruk/CIN85 індукує синтез PAI-1 у клітинах MCF-7 (аденокарцинома грудної залози людини) через механізм, до якого залучено фактор HIF-1α. Припускається, що Ruk/CIN85, сприяючи надекспресії PAI-1, може посилювати та підтримувати агресивний фенотип малігнізованих клітин.

Метаболічна пластичність є важливою властивістю ракових клітин й відіграє надзвичайно важливу роль у прогресії злоякісних новоутворень. Протеїн TIGAR (**T**P53-**i**nduced **gl**ycolysis and **a**poptosis **r**egulator) вважається одним з найбільш важливих регуляторних протеїнів, які визначають резистентність ракових клітин до метаболічних стресів та дії цитотоксичних факторів. TIGAR володіє фруктозо-2,6-дифосфатазною активністю і функціонує як регулятор обміну глюкози, «перемикаючи» її метаболізм з окиснення у гліколізі на розщеплення в гексозомонофосфатному шунті. За рахунок цього клітина отримує додаткову кількість NADPH, необхідну, зокрема, для відновлення глутатіону, знешкодження АФО та зменшення інтенсивності окисного стресу [362]. Роль TIGAR у підсиленні антиоксидантного захисту є одним з факторів підтримки малігнізації ракових клітин. Разом із залученням до антиоксидантного захисту клітини, TIGAR відіграє цілу низку регуляторних функцій, зокрема, бере участь у репарації ДНК, апоптозі та автофагії, модулюванні клітинного циклу [68]. Показано, що підсилена експресія TIGAR є характерною ознакою високоінвазивних типів раку грудної залози [662]. Наразі серед плейотропних функцій протеїну TIGAR активно досліджується його мотогенна активність, яка полягає у підтриманні та забезпеченні клітинної рухливості, інвазії пухлинних клітин та метастазування, які реалізуються через запуск ЕПМ. У клітинах недрібноклітинного раку легені TIGAR контролює експресію Met-рецептору та залучається до реалізації ЕМП: надекспресія TIGAR є фактором, що забезпечую міграційну активність ракових клітин та їхній високий інвазійний та метастатичний потенціал [560].

Існує зв’язок між протеїнами плазміноген/плазмінової системи та TIGAR, до якого залучений механізм HGF/Met-сигналювання. Показано, що Met, який кодується протоонкогеном *c-met*, функціонує як трансмембранний тирозинкіназний рецептор для фактору росту гепатоцитів (HGF), відомого як фактор розсіювання (*scatter factor*). HGF/Met-опосередковане сигналювання регулює низку біологічних процесів, таких як проліферація та міграція клітин,

інвазивність, ангіогенез, морфогенез, апоптоз та енергетичний метаболізм [484]. Підсилена активація HGF та його рецептора Met робить внесок до розвитку та прогресування багатьох типів раку людини, відіграючи важливу роль у пухлинному рості та метастазуванні [291]. Зокрема, надекспресія HGF/Met спостерігається в карциномних клітинах легені та грудної залози [247, 279]. Важливо зазначити, що протеїн HGF за особливостями будови своєї молекули відноситься до плазміногенового підсімейства S1-пептидаз, оскільки має у своїй структурі чотири N-кінцеві кринглові домени, гомологічні таким у молекулі плазміногену [164]. Ansell та ін. [39] показали, що ізольований фрагмент плазміногену К5 конкурує з HGF за зв'язування з Met-рецептором. Інгібування фрагментом К5 фосфорилювання Met та Akt, що є ознаками пригнічення HGF-опосередкованого сигналювання, можливо, є ключовим механізмом супресії К5 проліферації та міграції клітин ендотелійного походження. Схема, що узагальнює наведену інформацію щодо залучення протеїнів плазміноген/плазмінової системи до малігнізації та пухлинного росту, представлено на рисунку 1.18.

Рисунок 1.18 – Участь протеїнів плазміноген/плазмінової системи у процесах, що визначають основні ознаки злоякісного росту: схема-узагальнення [258, 266].

1.2.5. Роль протеїнів плазміноген/плазмінової системи в розвитку серцево-судинних захворювань (ССЗ)

Протеїни плазмінергічної системи відіграють провідну роль у ґенезі патологій серцево-судинної системи, зокрема, атероклерозу, тромботичних станів, інфаркту міокарда, ішемічної хвороби серця (ІХС), інсульту головного мозку, аневризми аорти, фібриляції передсердь (ФП) тощо. Відомо, що ризики виникнення тромбозів зростають з віком і стають причинами оклюзії судин, що призводить до розвитку найбільш поширених у сучасному світі життєвонебезпечних патологій, а саме, ІХС, або коронарної хвороби, інсультів головного мозку та легеневого емболізму. Венозний тромбоемболізм є причиною пошкодження нирок, нижніх кінцівок та шлунково-кишковий тракту [242, 493].

Одним з механізмів залучення плазміногену до патогенезу гострого інфаркту міокарду є ковалентна модифікація молекул зимогену окисненими фосфоліпідами (OxPL), концентрація яких у плазмі зростає за запальних процесів. Рівень модифікованого ліподеривату зимогену (OxPL-Pg) відображає перебіг патології, при цьому за присутності OxPL-Pg скорочується час лізису фібринових згустків, а концентрація модифікованого зимогену повертається до базального рівня лише через декілька місяців у постінфарктний період [363]. Слід зауважити, що кількість OxPL-Pg, що утворюється після гострого інфаркту міокарду, залежить від ґенезу патології. Так, у пацієнтів з інфарктом атеросклеротичного походження концентрації плазміногену та його окисненого деривату є значно меншими за цей показник у хворих, в яких інфаркт виник незалежно від атеросклерозу [144]. Цей факт свідчить про особливу роль OxPL-Pg, яку він відіграє у фібринолізі за гострих інфарктів різного походження. Не виключено, що відносно низькі концентрації плазміногену та OxPL-Pg можуть бути одними з факторів ризику негативного прогнозу в пацієнтів з інфарктом. Не менш небезпечним фактором у патогенезі серцевої недостатності та інфаркту міокарду є

перицелюлярна активація зимогену, яка супроводжується появою активного плазміну та індукцією апоптозу/аноікісу кардіоміоцитів через розщеплення адгезивних протеїнів та відшарування клітин. Показано, що вплив плазміногену на неонатальні міоцити шлуночків серця щурів *in vitro* супроводжувався його конвертацією на плазмін, дія якого, на відміну від впливу MMP-9, негативно позначилася на адгезивності клітин внаслідок розщеплення інтегрину β_1, що у подальшому призвело до індукції аноікісу. Якщо інгібітор металопротеїназ GM6001 не впливав на виживання кардіоміоцитів, то інгібітор протеаз широкого спектру дії доксоциклін покращував виживання міоцитів за присутності плазміногену, а також зменшив на 37% площу інфаркта міокарду в щурів з експериментальною оклюзією коронарних судин [243]. Патологічне ремоделювання тканин серцево-судинної системи відбувається також внаслідок плазмін-індукованого аноікісу та втраті клітин гладеньких м’язів за аневризми артерій/аорти та венозного варикозу, при цьому деендотелізація та руйнування бляшки є головними причинами розвитку ускладнень атеросклерозу [525].

У сучасній науковій літературі міститься значний об’єм інформації стосовно атерогенних ефектів плазміну, яка, втім, не позбавлена певної долі контроверсійності. Так, за атеросклерозу спостерігається надекспресія генів, які забезпечують синтез протеїнів фібринолітичної системи в аорті [596], а підсилена активність плазміну в каротидних бляшках корелює зі ступенем пошкодження коронарних судин [357]. Локальне запалення за атеросклеротичного ураження судини індукує такі фенотипічні зміни ендотелію, які сприяють збільшенню його афінності до лейкоцитів та стимулюють утворення прозапальних медіаторів, що робить стінку судини одночасно тромбогенною та проникною для клітин. У такий спосіб імунні клітини, зокрема моноцити/макрофаги, мігрують до локації атеросклеротичної бляшки та ініціюють формування петлі позитивного зворотного зв’язку між ремоделюванням судини та запаленням, що у

підсумку призводить до некрозу тканин судини, нестабільності бляшки та її відриву [62]. Описано механізм активації плазміногену урокіназою, яка надекспресується макрофагами, рекрутованими до локусу бляшки [334]. Отже, хоча активація протеїназ, у тому числі плазміну, в місці атеросклеротичного ураження розглядається переважно як фактор дестабілізації бляшки, стимуляція та рекрутинг макрофагів плазміном має не менш драматичне значення для патогенезу ССЗ. Описано клінічний випадок розвитку атеросклерозу та ішемії міокарду у пацієнта з гетерозиготним дефіцитом α2-АР, що вказує на важливість надактивації плазміну як фактора ризику патологій серцево-судинної системи [83].

Результати більшості досліджень, проведених з використанням генетично модифікованих тварин з “вимкненим” геном плазміногену свідчать про безпосереднє залучення плазмінергічної системи до патогенезу атеросклерозу. Так, утворення атеросклеротичних бляшок значно уповільнюється у генетично модифікованих мишей з дефіцитом плазміногену в порівнянні з контрольними тваринами [402]. Як підтвердження цього феномену, Moons та ін. [444] продемонстрували, що у мишей дикого типу (Pg +/+) плазмін сприяв більш інтенсивіній деградації еластину, ремоделюванню міжклітинного матриксу, інфільтрації макрофагів, міграції клітин гладеньких м’язів та формуванню неоінтими в моделі алотрансплантаційного артеріосклерозу, ніж у тварин, мутантних за геном плазміногену. Нокаут гену α_2-АР призвів до очикуваного підвищення активності тканинного плазміну *in vivo*, але натомість у таких нокаутованих мишей не спостерігалося змін у формуванні неоінтіми. Ці протилежні ефекти цієї протеїнази, що спостерігалися у дослідах на тваринних моделях, можна пояснити дією протеїнази на різні субстрати, такі як TGF-β1, MMP та інші [195], а також різноспрямованим впливом на різні типи клітин, задіяних до ремоделювання та репарації тканин. Не виключено, що означені ефекти були наслідком генних модифікацій, які вимикали роботу низки протеїнів фібринолітичної системи, призводячи до неконтрольованих наслідків.

Останнє припущення підтверджується результатами досліджень, які показали, що підсилення експресії макрофагального u-PA сприяє прогресії атеросклерозу, на противагу даним, отриманим на генетично модифікованих тваринах, які свідчать на користь антиатерогенної ролі активаторів плазміногену та власно плазміну [131]. Крім того, застосування інгібітору серинових протеїназ Serp-1, що блокує як активатори плазміногену, так і плазмін, призвело до пригнічення формування атеросклеротичного ушкодження та стабілізувало бляшки у мутантних ApoE−/− мишей [82]. Отже, розробка терапевтичних заходів корекції атеросклерозу з використанням молекулярного таргетингу плазміногену або протеїназ системи його активації, пов'язана з певними труднощами саме через плейотропність та різноспрямованість ефектів, про що свідчать отримані контроверсійні результати на різних моделях з використанням генетично нокаутованих експериментальних тварин.

На сьогодні активно досліджується роль протеїну PAI-1 у патогенезі атеросклерозу. Припускається, що PAI-1 залучається до модулювання усіх процесів за участі активаторів плазміногену, які формують ключові патерни атерогенезу, а саме: міграцію клітин, регулювання активності факторів росту (особливо TGF-β), активацію MMP та протеоліз компонентів ЕЦМ (колагену, фібронектину, ламініну) [377]. У роботі Eitzman та ін. [183] було показано, що у мишей, дефіцитних за геном PAI-1 (- / -), збільшується час оклюзії сонної артерії у моделі фотохімічного ушкодження атеросклеротичної бляшки. Зростання рівнів PAI-1 спостерігається за атеросклерозу і розглядається як один з ризик-факторів атерогенезу [631]. PAI-1 також володіє антиадгезивними властивостями, порушуючи адгезивність ендотеліоцитів та клітин гладеньких м'язів через модулювання контактів, опосередкованих вітронектином. PAI-1 зв'язується з вітронектином та u-PA, локалізованому на своєму рецепторі. Такий комплекс може взаємодіяти з різними інтегринами. Внаслідок конкуренції між u-PAR та PAI-1 за сайти зв'язування на NH_2-термінальному домені вітронектину відбувається

інгібування інтегрин-опосередкованої адегзії за участі вітронектину. Було запропоновано альтернативне пояснення зазначеного ефекту. Формування комплексу між u-PA, u-PAR та PAI-1 залучає також молекули інтегринів з подальшим кліренсом такого ансамблю з клітинної поверхні шляхом ендоцитозу, внаслідок чого відбувається втрата контактів між інтегринами та протеїнами ЕЦМ і, зрештою, відшарування клітин [135]. Як відомо, у плазмі здорових донорів співвідношення концентрацій PAI-1/t-PA становить 4:1 [148], а його підвищення асоційовано з порушеннями функціонування фібринолітичної системи і може бути причиною гострих інсультів та розвитку коронарної хвороби серця [568]. Цікаво, що підвищення рівня протеїну t-PA у плазмі крові є доведеним фактором ризику виникнення інфаркту міокарду [152]. Ці автори показали, що до зростання концентрації t-PA у хворих з інфарктом робить значний внесок підвищення рівня комплексу t-/PA/PAI-1, в якому t-PA знаходить в заінгібованому стані. Концентрація PAI-1 та його активність у плазмі також збільшується за цукрового діабету II типу, гіперінсулінемії та інсулінорезистентності [422, 682] – патологій, які безпосередньо пов’язані з ризиком гострих проявів ССЗ, що призводять до летальних випадків.

ФП займає чільне місце серед патологій серцево-судинної системи, оскільки є найбільш частим різновидом порушень серцевого ритму (аритмії), а її прогресія є фактором ризику інсульту головного мозку та тромбоемболії [386]. Разом з цим, у науковій літературі міститься обмаль даних стосовно залучення компонентів плазміноген/плазмінової системи до патогенезу ФП, а поодинокі повідомлення містять вкрай неоднозначну інформацію, що не дає можливості скласти повну картину участі протеїнів плазмінергічної системи в патогенезі ФП та можливості їхнього використання як маркерів цього розладу серцево-судинної системи. Так, Freynhofer та ін. [207] показали, що розвиток ФП супроводжується зростанням концентрації t-PA у плазмі, що може свідчити про активацію фібринолітичної системи. На користь цих даних свідчать також результати роботи Feinberg та ін. [196], які

демонструють підвищення концентрації комплексу плазмін-α_2АР у пацієнтів з ФП. Дослідження останніх років приділяють значну увагу змінам активності протеолітичних систем у пацієнтів з ФП, які припадають на перші 24 години після прояву хвороби (параксизмів). Загалом, для раннього періоду перебігу захворювання притаманна активація плазміноген/плазмінової системи (зростання плазмової концентрації плазміногену й t-PA, зниження рівнів α_2-АР), що може бути компенсаторною відповіддю організму на розвиток гіперкоагулянтного стану за ФП (на фоні високого рівня D-димеру) [319, 655]. Так, збільшення плазмової концентрації PAI-1 є однією з причин формування у крові пацієнтів з ФП більш щільних тромбів, гідроліз яких ускладнений [168]. Слід зазначити, що плазмін бере участь в активації ММР, які синтезують фібробласти, кардіоміоцити та лейкоцити, залучаючись до протеолітичної деградації протеїнів ЕЦМ та базальної мембрани, ремоделювання тканини міокарду передсердь та розвитку фіброзу. Зазначені зміни призводять до порушень електрофізіологічних властивостей клітин серцевого м’язу та розвитку аритмії [209].

Потребує детальних досліджень питання, пов’язані із залученням ангіостатинів як локальних регуляторів ангіогенезу до розвитку ССЗ. Показано зростання вмісту ангіостатину в стінці аорти та тканинах міокарду в пацієнтів з серцевою недостатністю та ІХС на фоні діабету II типу або метаболічного синдрому, що асоціювалося з пригніченням формування компенсаторних судин-колатералей [159]. Доведено участь ангіостатинів у процесах, пов’язаних з розвитком атеросклеротичних ускладнень. Встановлено, що введення екзогенного ангіостатину (фрагмент плазміногену К1-5) інгібувало проростання судин у ділянці атеросклеротичної бляшки, тим самим сприяючи її стабілізації (Chang, 2010). З іншого боку, підвищений рівень ангіостатинів у сироватці крові корелював з розвитком серцевої недостатності. Ангіостатини були ідентифіковані як одні з головних факторів, що інгібують проліферацію/міграцію та індукують апоптоз автологічних мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку після

їхньої трансендокардіальної трансплантації пацієнтам із серцевою недостатністю. Було показано зростання рівня ангіостатину й активності ММР у щурів за експериментальної серцевої недостатності, при цьому введення інгібітора ММР сприяло нормалізації рівня циркулюючого ангіостатину [677]. Отже, патофізіологічне значення змін рівня ангіостатинів у тканинах міокарду та судинної стінки можна оцінювати лише у контексті зсуву локального балансу регуляторів ангіогенезу.

1.2.6. Участь протеїнів плазміноген/плазмінової системи у загоєнні ран

Загоєння ран є складним, чітко скоординованим процесом, в якому провідну роль відіграють протеолітичні ензими, зокрема, MMPs та протеїни плазміноген/плазмінової системи, які продукуються різними клітинами (кератиноцитами, ендотеліоцитами, фібробластами, нейтрофілами) до пошкодженої ділянки. Загоєння гострих ран відбувається за низки етапів: коагуляції, запалення, синтезу речовин міжклітинного матриксу, ангіогенезу, фіброплазії, епітелізації, контракції та ремоделювання рубця. Ендогенні протеїнази беруть активну участь у кожній з цих стадій, а саме, зумовлюють протеолітичне очищення рани та лізис фібринового згустку, забезпечують ремоделювання ЕЦМ та рекрутинг прозапальних клітин, міграцію кератиноцитів та фібробластів, що, в цілому, є необхідним для адекватного перебігу загоєння [418].

Під терміном «хронічна рана» розуміють дефект тканин, який не епітелізувався протягом восьми тижнів на фоні лікувальних заходів. Вважається, що хронічна рана «застигає» на одній із стадій загоєння, зазвичай це є стадія запалення. Порушення активаторно-інгібіторного балансу протеолітичних систем, яке спостерігається у хворих на цукровий діабет, вважається однією з найголовніших причин пролонгування загоєння та, як наслідок, переходу рани до хронічного стану. Результати клінічних та експериментальних досліджень свідчать, що мікробна колонізація ран та стан

хронічного запалення індукують надактивацію клітин імунної системи, що продукують ММР, які в комплексі з протеїназами екзогенного походження здійснюють перманентну деградацію протеїнів ЕЦМ та інактивацію молекул ростових факторів та їхніх клітинних рецепторів [48, 590]. Не менш важливу патогенетичну роль у цих процесах відіграє й еластаза нейтрофілів, рівень якої в хронічних ранах у 10-40 разів вищій, ніж у гострих хірургічних ранах [659].

У дослідах *in vitro* встановлено, що ранова рідина (ексудат) трофічних виразок шкіри пригнічує проліферацію ендотелійних клітин, показуючи виражені антиангіогенні властивості [171]. Ексудат – це багата на протеїн та клітини рідина гематогенної або гістогенної природи, що виділяється через судинну стінку до ураженої тканини при запаленні. Для гострого запалення характерне переважання в ексудаті нейтрофілів, для хронічного – лімфоцитів і моноцитів, для алергічного – еозинофілів [3]. Важливо зауважити, що потужні ангіостатичні властивості ексудатів хронічних ран проявляються навіть за наявності в них високих кількостей проангіогенних факторів, зокрема, VEGF. Видалення надлишкової кількості ексудату з хронічних виразок шкіри діабетичних хворих за допомогою вакуум-терапії або колагенових пов’язок стимулює репаративні процеси та значно покращує перебіг загоєння [210]. Припускається, що надмірна активація протеолітичних систем у хронічних ранах спричинює обмежений протеоліз високомолекулярних протеїнів, який супроводжується появою значної кількості фрагментів, що володіють ангіостатичними ефектами. Серед них провідна роль належить ендостатинам (фрагменти гепарансульфатпротеоглікану колагену XVIII типу) та, можливо, ангіостатинам, які здатні специфічно й ефективно інгібувати проліферацію та міграцію ендотеліоцитів і запускати апоптоз цих клітин. ММР-2 та -9, які є найбільш масовими протеїназами ексудату, разом з еластазою нейтрофілів та автопротеолізом плазміну, можуть відповідати за утворення ангіостатинів [172]. Визначення активності протеїназ ендогенного та екзогенного

походження, а також детекція біологічно активних продуктів деградації протеїнів у хронічних ранах, можуть використовуватися як релевантні молекулярні маркери для використання з метою підбору адекватних лікувальних заходів для поліпшення прогнозу в пацієнтів з порушеннями репаративних процесів.

Плазмін(оген) відіграє провідну роль у загоєнні ран, проявляючи низку плейотропних ефектів у ході процесів, які лежать в основі репарації тканин після пошкодження різними чинниками (***Plasminogen is a master regulator*** *and a potential drug candidate for the healing of radiation wounds*; Fallah та ін., [191]. Участь плазмін(оген)у у загоєнні ран полягає не лише в очищенні рани від фібринової плівки, але й у тонкому регулюванні активності клітин, що забезпечує адекватний перебіг усіх стадій загоєння. Безпосереднім доказом залучення плазміногену до загоєння слугують дані про акумуляцію зимогену в ділянці пошкодження, де він перетворюється на плазмін активаторами, локалізованими на поверхні клітин. Встановлено, що плазміноген доставляється до місця пошкодження запальними клітинами ще на початкових етапах загоєння [558], де він, перетворюючись на активну протеїназу, забезпечує очищення рани від фібрину та нейтрофілів, а також залучається до активації факторів росту та ММР, ремоделювання та формування нової сполучної тканини та судин [592]. Показано, що у мишей, нокаутованих за геном плазміногену, терміни загоєння ран шкіри значно пролонгуються [522, 627]. Дослідження з використанням генетично нокаутованих тварин дозволили встановити, що, на відміну від t-PA, активатор урокіназного типу має вирішальне значення для процесу загоєння [558]. Згідно з результатами попередніх досліджень, у мишей з дефіцитом плазміногену спостерігається затримка загоєння через слабку міграційну здатність кератиноцитів [522]. Встановлено, що плазмін безпосередньо впливає на кератиноци, які здатні зв’язувати зимоген та ініціювати його перетворення на активну протеїназу. Перицелюлярний плазмін індукував міграцію свіжоізольованих епідермальних кератиноцитів людини та клітин

HaCaT в агарозному гелі, яка повністю блокувалася α_2-АР разом з інгібуванням проліферації кератиноцитів. Отже, описані властивості плазміну можуть мати істотне значення для реепітеліалізації шкіри після травмування [598].

Фібробласти є клітинами сполучної тканини, які відіграють важливу роль у загоєнні ран завдяки здатності синтезувати та продукувати компоненти міжклітинного матриксу. Участь фібробластів у відновленні ЕЦМ має особливе значення для перебігу фази ремоделювання тканин в ході загоєння гострих ран. Показано, що в хронічних ранах фібробласти продукують аберантний набір компонентів ЕЦМ, внаслідок чого міжклітинний простір має дефектну структуру та не досягається потрібна величина стискання країв рани, і розвивається фіброзний рубець [287]. У роботі Mandal та ін. [410] показано, що плазмін підсилює експресію *Cyr61* – гену, який контролює проліферацію та міграцію фібробластів. Крім того, плазмін дозозалежним чином стимулює синтез ДНК у фібробластах легені миші, причому цей ефект повністю блокується антитілами до продукту експресії *Cyr61*, а також не спостерігається у мишей, дефектних за геном рецептора PAR-1, але не PAR-2. Слід зауважити, що плазмін виявився більш потужним мітогеном та міграційним агентом по відношенню до фібробластів, ніж тромбін. Більш того, плазмін сприяв вивільненню протеїну Cyr61 до культурального середовища або ЕЦМ, що робило його доступним для інших клітин. Автори іншої роботи [462] запропонували використання плазміну як нового терапевтичного засобу для контролювання відкладання колагену фіброзними фібробластами.

Отже, плазмін виконує важливу роль при загоєнні ран, регулюючи запальні процеси через сприяння інфільтрації імунних клітин та модулювання їх активності, залучаючись до контролювання запалення як на початкових стадіях загоєння, так і на термінальному етапі процесу [592]. Введення плазміногену мутантним мишам з дефіцитом цього протеїну прискорює загоєння як гострих ран шкіри, так і хронічних ран у мишей з

експериментальним цукровим діабетом [558]. В одній з останніх робіт Fallah та ін. [191] встановлено, що плазміноген покращує загоєння виразок шкіри, спричинених радіаційним опроміненням мишей. Наведені дані мають беззаперечний прикладний інтерес, оскільки становлять теоретичний базис для використання плазміногену з метою лікування радіаційного пошкодження шкіри онкохворих після сеансів радіотерапії. Транскриптомний аналіз, проведений у вищезазначеній роботі, дозволив встановити, що введення плазміногену нормалізувало вміст важливих регуляторних протеїнів на рівні експресії відповідних генів, порушення якої спостерігалося у ранах, спричинених радіацією. Припускається, що плейотропні ефекти плазміногену на транскриптом клітин опосередковують його позитивні ефекти на загоєння ран, що проявляється у хронологічно своєчасній резорбції грануляційної тканини, реепітелізації, резолюції запалення та формуванні нових тканин. Крім того, плазміноген впливає на метаболізм клітин, які беруть участь у загоєнні, а саме: підсилює біосинтез ліпідів та гальмує швидкість гліколізу, високий рівень якого, як відомо, притаманний клітинам за розвитку запалення. Локальне введення плазміногену призводило також до зниження синтезу TGF-β – головного позитивного регулятору фіброзу. Оскільки плазміноген пригнічує продукування TGF-β та інших профібротичних факторів, ця обставина дозволила підтвердити важливість функціонування цього протеїну як модулятору утворення фіброзної тканини [312]. Надзвичайно важливою є інформація стосовно ролі в загоєнні ран трансмембранного рецептору Plg-R_{KT}, який відповідає за зв'язування плазміногену макрофагами та є необхідним для подальшої активації зимогену [439]. Ny та ін. [459] продемонстрували, що плазмін-залежне вивільнення цитокінів макрофагами, яке опосередковується Plg-R_{KT}, відіграє важливу роль у загоєнні ран, регулюючи процеси на стадіях запалення, проліферації та ремоделювання через модулювання функціональної активності мієлоїдних клітин та кератиноцитів.

Наразі залишаються нез'ясованими питання стосовно внеску ангіостатинів до порушення репаративного ангіогенезу й патогенезу хронічних ран, у тому числі трофічних виразок м'яких тканин за цукрового діабету та хронічних виразок за синдрому Марторелла (ішемічна виразка шкіри за гіпертонічної хвороби) [380]. З цих позицій, адекватне лікування пацієнтів з хронічними рановими дефектами кінцівок – актуальна медико-біологічна й соціальна задача, для успішного вирішення якої важливою умовою є розкриття молекулярних механізмів розвитку патології та визначення факторів і процесів, які призводять до хронізації рани.

1.3. Ангіостатини – нові компоненти плазміноген/плазмінової системи

Обмежений протеоліз плазмін(оген)у *in vivo* низкою протеїназ або автопротеоліз плазміну призводять до утворення поліпептидних фрагментів важкого ланцюга, котрі складаються з різної кількості крингл-доменів: К1–К3, К1–К4 або К1–К4,85, що відомі під назвою «ангіостатин» [464]. Виділений вперше ангіостатин виявився здатним інгібувати ангіогенез та пригнічувати ріст метастазів. Наявність антиангіогенної активності показана також й для деяких ізольованих кринглів: найбільш потужну дію як інгібітор неоваскуляризації *in vivo* демонструє К5 [482].

У ході подальших досліджень було встановлено, що ангіостатини модулюють активність різних типів клітин, беручи участь у перебігу низки нормальних процесів та розвитку патологічних станів. За допомогою високочутливих імунохімічних методів ангіостатини виявлені в різних рідинах організму людини: плазмі та сироватці крові, сечі, асцитній та очній рідині. Доведено, що патогенез захворювань, асоційованих з активацією запальних процесів, зокрема, ревматоїдного артрита, псоріаза, атеросклерозу, виразкової хвороби, ускладнень цукрового діабету, супроводжується

різноспрямованими змінами рівнів ангіостатинів у крові та тканинах (див. огляд Tykhomyrov et al., 2014 [617]). Результати досліджень останніх років визначають перспективи використання ангіостатинів як маркерів патологічних станів різної етіології, а також як платформа для розробки нових фармакологічних засобів.

1.3.1. Відкриття та дослідження властивостей ангіостатинів: історія питання

Ангіостатини як біологічно активні протеолітичні фрагменти, що виконують самостійні функції, становлять приклад протеїнів, відкриття та подальше дослідження котрих проводилося за принципом «від активності до структури». Відкриття цих крингл-вмісних фрагментів плазмін(оген)у в 1994 р. стало потужним поштовхом для дослідження принципово нових функцій протеїнів плазміноген/плазмінової системи, зокрема, в контексті їхньої участі в регулюванні ангіогенезу [464]. Термін «ангіогенез» вперше запропонував американський хірург Дж. Фолкман у 1971 р. для позначення процесу утворення нових кровоносних судин з тих, що існували [201]. В основі концепції ангіогенезу Фолкмана було припущення того, що ріст більшості солідних пухлин, розміри яких не перевищують 2-3 мм у діаметрі, неможливий без утворення ними власної мережі кровоносних судин. Було висунуто припущення, що у разі припинення росту нових судин ріст пухлини гальмується. Відкриття ангіостатинів стало важливою подією для підтвердження теорії Фолкмана та розуміння такого феномену, як «ангіогенний баланс».

Відкриття ангіостатинів тісно пов’язане з дослідженнями таких феноменів, як пригнічення росту вторинних пухлинних осередків первинними пухлинами та стрімка активація пухлинного росту й метастазування після хірургічного видалення первинної пухлини. Причина цих явищ довго залишалася невідомою, допоки Дж. Фолкман не висунув

припущення стосовно того, що первинна пухлина може утворювати та виділяти речовину, що стримує проростання пухлини судинами й, таким чином, пригнічує утворення власних метастазів. У 1994 р. групою американських дослідників під керівництвом М. О'Рейлі із сечі, а згодом й з сироватки крові мишей-пухлиноносіїв з карциномою легені Льюїса було виділено протеїн з M_m 38 кДа, який отримав назву «ангіостатин», тобто речовина, що стабілізує судини [464]. Для отримання ангіостатину в кількості, необхідній для з'ясування його природи, було використано 100 л мишачої сечі. Аналіз послідовності дозволив визначити, що отримана речовина є внутрішнім фрагментом плазміногену (N-термінальна послідовність 98-102: Val-Tyr-Leu-Ser-Glu, C-термінальний залишок – у положенні 440). Цей фрагмент містив крингл-домени плазміногену з першого по четвертий або частину п'ятого. Продукція ангіостатину в організмі мишей залежала від розвитку карциноми, однак, на той час залишалося незрозумілим питання, чи здатні пухлинні клітини самостійно утворювати ангіостатини або вони лише продукують молекули, що сприяють появі цих поліпептидів. У подальшому було встановлено, що вплив ангіостатину на ендотеліоцити був специфічним, оскільки вихідна молекула, плазміноген, не чинила такої дії по відношенню до ендотелійних клітин. На мишах з видаленою карциномою Льюїса було показано, що системне введення екзогенного ангіостатину, отриманого шляхом еластолізу плазміногену, стримувало утворення та прогресію метастазів [679].

У 1997 р. О'Рейлі в ході дослідження культури клітин злоякісної гемангіоендотеліоми виділив ще один потужний блокатор формування кровоносних судин – ендостатин, який виявився протеолітичним фрагментом молекули колагену [467]. Ендостатин також індукував апоптоз ендотелійних клітин і гальмував їхню активацію, проліферацію та міграцію. Після відкриття ангіостатину та ендостатину в світі розпочався справжній бум на дослідження структури та протипухлинної активності цих молекул та їхніх ізоформ, а також отримання рекомбінантних аналогів. Ці варіанти

ангіостатинів відрізняються від «канонічних» молекул за NH_2- та COOH-термінальними амінокислотними залишками та складом крингл-доменів. Роботи декількох дослідницьких груп остаточно підтвердили висновки піонерських досліджень стосовно інгібувальної дії ангіостатину та його ізоформ на проліферацію та міграцію ендотелійних клітин, а також формування судинного трубки, стимульованих різними індукторами *in vitro*, та проростання нових судин *in vivo* у модельних експериментах на кармані рогівки, утворення ембріональної судинної системи, кільця аорти [55, 57]. Протипухлинна активність ізоформ ангіостатинів була показана на деяких типах новоутворень людини та тварин: гемангіоендотеліомі, гліомі, раці печінки, легені, яєчнику, грудної залози та прямої кишки [162, 680]. Подальші дослідження та розвиток уявлень про ангіогенез за різних фізіологічних та патофізіологічних станів сприяли проведенню клінічних випробувань ангіостатинів як потенційних засобів для терапії деяких патологічних станів, асоційованих з порушенням ангіогенезу. Так, К1-3 та К1-4 інгібували ріст метастатичних колоній на 80 % у порівнянні з нелікованим контролем. Більш того, дослідження росту ендотелійних клітин показало, що їх кількість зменшувалася в сайтах метастазування у тварин, яким вводили ангіостатини. Важливо зазначити, що термін напівжиття К1-4 в організмі мишей складав 9,1 годину, тоді як К1-3 – 4,8 годин [405]. На сьогоднішній день проведено клінічні випробування препаратів з потенційними антиангіогенними властивостями на основі різних ізоформ нативних, модифікованих та рекомбінантних аналогів [342, 575]. Нажаль, найчастіше істотного інгібування пухлинного росту в пацієнтів з онкологічними захворюваннями виявлено не було. За введення ангіостатинів пухлини переходили до «сплячого» стану, коли кількість проліферуючих клітин знаходилася у рівновазі з кількістю клітин, що гинуть [465]. Однак, такий неактивний (дормантний) стан пухлини підтримувався лише за умов безперервного введення ангіостатинів: у разі припинення терапії рівень VEGF зростав, що сприяло поновленню ангіогенезу й подальшої прогресії

пухлини. Крім того, внаслідок короткого часу напівжиття ангіостатинів в організмі та високих доз для досягення позитивного терапевтичного ефекту, підходи щодо застосування цих протеїнів у терапії онкологічних хвороб потребують подальшого вдосконалення. У жодному з доклінічних випробувань не було зафіксовано випадків токсичності ангіостатинів навіть за їх введення у відносно високих дозах. Разом з цим, перспективними виглядають позитивні терапевтичні ефекти ангіостатинів на моделях загоєння ран рогівки, неоваскуляризації сітківки ока, індукованої лазером, колаген-індукованому артриті, ендометріозі, тощо [32, 136, 173, 321,].

1.3.2. Механізми утворення ангіостатинів

У науковій літературі накопичується дедалі більше інформації стосовно клітин, що виконують функцію джерела ангіостатинів в організмі, та протеаз, які відповідають за продукування ангіостатинів через фрагментацію плазміногену (табл. 1.2).

Таблиця 1.2

Протеїнази, які здійснюють лімітований протеоліз плазміногену з утворенням різних варіантів ангіостатинів [94, 575].

Протеолітичний ензим	**Ангіостатин (кринглові домени)**
Панкреатична еластаза, еластаза нейтрофілів	К1-3, К4
Еластаза + пепсин	К2-3, К5
Еластаза + хімотрипсин	К1
ММР-2 (желатиназа А), ММР-3 (стромелізин 1), ММР-7 (матрилізин), ММР-9 (желатиназа В), ММР-12 (металоеластаза),	К1-4 К5 (ММР-3)

MMP-19, простатоспецифічний антиген (ПСА), катепсин D, ендопептидаза 24 кДа (*Chyseobacterium*) бацилолізин МА (металопротеїназа *B. megaterium*) металопротеїнази та серинові протеїнази отрути змій (*Bothrops jararaca, B. moojeni*)	---
uPA-активований Pm	K1-4,85
Серинова протеїназа 13 кДа з клітин гліоми BT325	K1-5
Протеаза V8 (*S. aureus*) (розщеплення K1-3)	K1

Класичним підходом в отриманні ангіостатинів є обмежений протеоліз плазміногену панкреатичною еластазою. Продуктами еластолізу плазміногену людини є K1-3, K4 та мініплазміноген. За допомогою модифікованого методу часткового розщеплення плазміногену еластазою можна отримати також K1-4 та окремо K5 [313] (рис. 1.19).

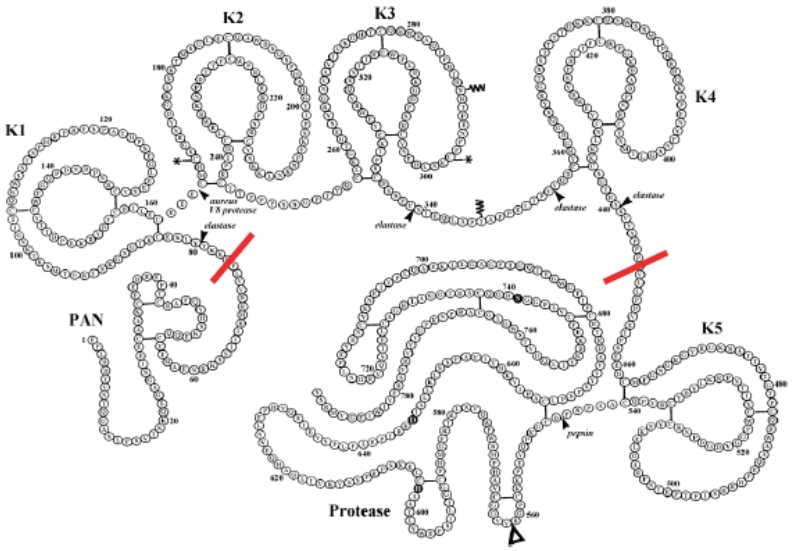

Рисунок 1.19 – Молекулярна структура плазміногену людини з позначеними сайтами гідролізу при утворенні ангіостатину K1-4 (позначено рисками) [26].

Якщо на початку досліджень ангіостатинів вважалося, що головним джерелом цих поліпептидів є ракові клітини, то наразі показана можливість утворення цих протеїнів й нормальними клітинами (нейтрофіли, моноцити/макрофаги, тромбоцити, астроцити, кардіоміоцити та ін.) [115, 130, 305, 543, 621]. Більшість з цих клітин здатні фрагментувати плазміноген перманентно, що свідчить про залучення ангіостатинів до підтримання ангіогенного балансу в тканинах за нормального фізіологічного стану. Згідно з даними [575] ангіостатини циркулюють у крові клінічно здорових донорів у наномолярних концентраціях (6-12 нМ) або у кількостях, що є нижчими за поріг чутливості методу. Ангіостатин, маючи більший термін напівжиття у кровотоці, ніж проангіогенні молекули, досягає віддалених мікрометастазів й переводить їх у дормантний стан, втім не накопичується у значних кількостях у сайті первинного пухлинного росту, що не дає змоги нівелювати її потужний проангіогенний сигнал.

У дослідженнях [216] уперше було показано, що безсироваткове кондиційне середовище, у якому культивувалися клітини ліній раку передміхурової залози людини (PC-3, LNCaP, DU145), містило протеїнази, здатні конвертувати плазміноген на ангіостатини. Найбільший внесок до утворення ангіостатинів раковими клітинами належить сериновим протеїназам. Авторами запропоновано гіпотетичний механізм генерування ангіостатинів за участі серинових протеїназ, що складається з двох стадій. На першому етапі u-PA, що секретується клітинами до середовища, перетворює зимоген на плазмін. Активна протеїназа за присутності донору вільних сульфгідрильних груп (L-цистеїн, N-ацетил-L-цистеїн, D-пеніциламін, каптопріл, відновлений глутатіон) розщеплюється з утворенням ангіостатинів в ході автопротеолізу плазміну. Безпосередня роль плазміну та донорів вільних сульфгідрильних груп була показана згодом й у дослідах *in vivo*. На моделі пухлинного росту з використанням лінії ракових клітин MDA-MB-435 було встановлено, що введення N-ацетил-L-цистеїну тваринам-пухлиноносіям сприяло утворення ангіостатинів в їхньому

організмі та істотно гальмувало пухлинний ріст [23]. Імуноблот-аналіз виділених ангіостатинів дозволив встановити, що ними є ізоформи К1-4 і К1-5, таким чином, підтверджуючи припущення, що різні типи пухлинних клітин здатні утворювати гетерогенні за ізоформним складом ангіостатини. На підставі даних більш точного аналізу складу К-доменів ангіостатинів пухлинного походження було уточнено, що одним з ангіостатинів є фрагмент К1-4, який містив 85% К5. Він отримав назву К1-4,5, або К1-4,85 [575].

Migita та ін. [429] вивчали механізми утворення та ізоформний склад ангіостатинів у клітинах карциноми передміхурової залози людини (лінії PC-3, DU-145, LNCAP, PPC-1, ALVA 41, ALVA 101) та тканинах карциноми простати. У лізатах клітин раку простати усіх шести досліджуваних ліній були ідентифіковані три поліпептидні зони, які відповідали AS з M_m 35, 40 та 50 кДа. Авторами було зроблено вкрай важливе спостереження стосовно того, що пухлинні клітини, хоча й містять ангіостатини в цитоплазмі, однак не синтезують їх *de novo* як продукти генної експресії. Більш того, клітини PC-3 виявилися нездатними продукувати ангіостатини за відсутності екзогенного плазміногену, оскільки не експресують мРНК плазміногену. Було висунуто гіпотезу, що плазміноген може зв’язуватися з певними молекулами-рецепторами на поверхні ракових клітин і протеїназами конвертуватися на ангіостатини, які транспортуються до цитоплазми шляхом ендоцитозу або за допомогою іншого невідомого механізму. Згодом гіпотеза про механізми перицелюлярного утворення ангіостатинів знайшла своє підтвердження у цілій серії дослідів. У пацієнтів з карциномою простати було показано часткову колокалізацію LBS-1 та протеїнази простатспецифічного антигену у 33,3 % випадків. Це спостереження вказує на залучення цієї серинової протеїнази до утворення ангіостатинів. Heidtmann та ін. [264] встановили, що простатспецифічний антиген здатний перетворювати Lys-плазміноген на ангіостатин К1-4, який інгібує проліферацію HUVEC та формування ними трубчатих структур. На підставі цих результатів було зроблено припущення, що ця калікреїн-подібна

протеїназа, яка синтезується виключно клітинами епітелію передміхурової залози, відіграє роль антиангіогенного фактору саме через генерування ангіостатинів.

Stathakis та співавт. [583] в ході дослідів на клітинах яєчника китайського хом'ячка CHO та HT1080 запропонували трьохстадійну модель утворення різних ізоформ ангіостатинів за участі плазміну, відновлювальних агентів агентів та ММР. У ній, зокрема, передбачається, що на першому етапі відбувається відновлення дисульфідних зв'язків у структурі К5 плазміну невідомою плазмінредуктазою, яка використовує відновлений глутатіон або цистеїн як кофактор. Цією редуктазою, залученою до процесінгу плазмін, виявився ензим гліколізу фосфогліцераткіназа. На другому етапі відбувається протеолітичне розщеплення зв'язку в складі К5 сериновою протеїназою або в ході автолізу плазміну, що призводить до утворення К1-4,85. Зрештою, цей фрагмент підлягає протеолізу за участі різних ММР, що дає в результаті К1-3 та К1-4. Як підтвердження цей схемі можуть слугувати отримані дані про те, що у крові мишей з перивитою фібросаркомою було виявлено підвищені рівні фосфогліцераткінази, а введення рекомбінантного інгібітору цього ензиму пригнічувало ріст пухлини на 50-70% [355].

Подальшим кроком в еволюції поглядів на механізм утворення ангіостатинів в організмі слугували дані Wang та ін. [641, 642], отримані в ході експериментів на клітинах фібросаркоми HT1080 та раку грудної залози MDA-MB231. Авторами встановлено, що генерування ангіостатину К1-4,85 відбувається на поверхні клітин та не залежить від наявності донору вільних сульфгідрильних груп. Важливим спостереженням був той факт, що у безклітинній системі функцію донору вільних сульфгідрильних груп при утворенні ангіостатинів був здатний виконувати β-актин. Нормальні фібробласти та ендотелійні клітини мікросудин також генерують ангіостатин К1-4,85, але у кількостях, значно менших за пухлинні клітини. Імовірно, що ця різниця може бути обумовлена різною кількістю u-PA або/та актину, що експонуються.

У роботі [505] було показано, що інтактні тромбоцити конвертують екзогенний плазміноген у фізіологічній концентрації на ангіостатини у кількості 20-25 мкг/мл протягом 1 години інкубування. Враховуючи, що вміст K1-4 у крові за норми становить приблизно 30 мкг/мл, авторами було зроблено припущення, що саме тромбоцити є основним джерелом ангіостатинів у крові. У сучасній науковій літературі точиться дискусія стосовно природи пулу тромбоцитарних ангіостатинів та механізмів їхнього утворення. Ключовими постають наступні питання, які підлягають експериментальної перевірки: 1) походження тромбоцитарного пулу ангіостатинів; 2) здатність тромбоцитів утворювати ангіостатини *de novo*; 3) залежність утворення ангіостатинів від функціонального стану тромбоцитів; 4) субклітинна локалізація процесу та роль у ньому плазматичної мембрани тромбоцитів. На ці та інші питання існують гіпотетичні відповіді, що мають фрагментарний й часто суперечливий характер. Можливо, що плазміноген та ангіостатини інтерналізуються досередини тромбоциту, потрапляють до відкритої каналікулярної системи, де відбувається їхній перерозподіл до різних пулів α-гранул. Між тим, низка протеїнів, які акумульовані в гранулярному апараті тромбоцитів, ведуть своє походження від мегакаріоцитів [325]. З іншого боку, припускається, що крім наявності ендогенного пулу ангіостатинів, тромбоцити здатні конвертувати екзогенний плазміноген на ангіостатини. Важливу роль в утворенні ангіостатинів тромбоцитами *de novo* відводили MMP, однак, у дослідженнях з використанням PAI-1 та інших інгібіторів активаторів плазміногену було зроблено висновок, що генерація ангіостатинів тромбоцитами залежить від активності u-PA [305, 306]. Наступним важливим спостереженням був той факт, що тромбоцити виявилися здатними продукувати ангіостатини навіть у стані фізіолоігчного спокою [506]. Вважається, що ангіостатини, які продукуються тромбоцитами, є важливими для регулювання функціонального стану ендотелійних клітин за нормального функціонального стану організму. Проте, результати, наведені у цитованих

роботах, містять низку критичних аспектів. Так, утворення ангістатинів тромбоцитами у стані спокою в експериментах *in vitro* могло бути наслідком спонтанної активації, яка відбувається з різним ступенем інтенсивності в ході процедур ізолювання тромбоцитів з плазми. Крім того, при роботі з мембранами тромбоцитів активатори плазміногену можуть вивільнятися до інкубаційного середовища внаслідок лізису клітин і бути причиною хибнопозитивних результатів. В ході активації тромбоцити експонують на власній поверхні активатори плазміногену та інші молекули – потенційні центри зв'язування зимогену, у більших кількостях у порівнянні з клітинами, що знаходяться у стані фізіологічного спокою.

Крім тромбоцитів, важливу роль в утворенні ангіостатинів в організмі відіграють макрофаги, проте, їхня участь як ангіостатин-продукуючих клітин обмежується процесами запалення. У роботі Cornelius та ін. [130] показано, що ММР-12 (металоеластаза) макрофагів миші та людини ефективно конвертує плазміноген на функціонально активні фрагменти – ангіостатини. У дослідженнях *in vitro* було показано, що продуктами обмеженого протеолізу плазміногену людини металоеластазою є три основні фрагменти, які було ідентифіковано як К1-4 (38 кДа), К1-3 (35 кДа) та К4 (14 кДа). Структуру одного з них, а саме, фрагменту К1-4, наведено на рисунку 1.20.

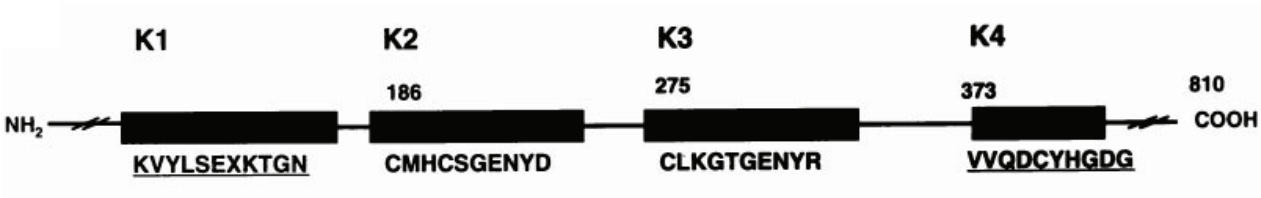

Рисунок 1.20 – Схема будови ангіостатину К1-4, який утворюється в результаті сайт-специфічного протеолізу плазміногену людини металоеластазою (ММР-12) макрофагів [130].

У дослідженні Dong та ін. [165] показано, що співкультивування макрофагів з клітинами 3LL або з культуральним середовищем, що містило

гранулоцитарно-макрофагальний колоніестимулювальний фактор, супроводжувалося секрецією металоеластази та продукуванням ангіостатинів. Відомо, що макрофаги залучаються до процесів пухлинного росту та метастазування [358]. Інфільтровані до пухлини активовані макрофаги здатні селективно лізувати ракові клітини, тоді як неактивовані макрофаги, продукуючи ростові та ангіогенні фактори і протеїнази, підсилюють пухлинний ріст. Враховуючи складну й неоднозначну роль, яку відіграють макрофаги у пухлинному рості, роль ангіостатинів макрофагального походження за неопластичних процесів ще належить визначити. У роботі [190] була показана можливість утворення ангіостатинів перітонеальними макрофагами миші та макрофагами RAW264.7, активованими тіогліколатом. Встановлено, що поліпептиди-ангіостатини утворюються як продукти розщеплення мембранозв'язаного плазміну. За допомогою афінної хроматографії з інкубаційного середовища було ізольовано мажорний ангіостатин (48 кДа) та два мінорні поліпептиди (42 та 50 кДа), причому кожний ланцюг містив Lys88 як N-термінальний залишок. Авторами цього дослідження зроблено два принципово важливих спостереження: по-перше, відкрито ММР-незалежний механізм утворення ангіостатинів макрофагами, і по-друге, встановлено можливість продукування ангіостатинів прозапальними клітинами за відсутності неопластичних процесів. Не виключено, що генерування ангіостатинів на поверхні моноцитів може проходити через стадію перетворення Glu-плазміногену на Lys-форму, яка швидко перетворюється на плазмін ендогенними активаторами Zhang та ін. [689]. Отримані в ході розщеплення плазміногену макрофагальною металоеластазою фрагменти продемонстрували високу біологічну активність, інгібуючи bFGF-індуковану проліферацію ендотеліоцитів та формування ними капіляроподібних структур. Припускається, що потужні антиангіогенні ефекти ангіостатинів, що утворюються макрофагами, зумовлені синергізмом дії різних ізоформ, спрямованої одночасно на пригнічення проліферації та міграції ендотелійних

клітин. Цікаві дані з цього приводу отримано Tsuji та ін. [611], які показали, що MMP-12 може визначати здатність макрофагів продукувати ангіостатини та ендостатини у жировій тканини курців. Відомо, що паління спричинює запальні процеси у легенях, які передують системному запаленню, що супроводжується активацією макрофагів та індукуванням у них синтезу MMP-12 [678]. На підставі отриманих результатів автори припускають, що локальне утворення інгібіторів ангіогенезу внаслідок тютюнопаління сприяє блокуванню росту судин у жировій тканині, та є однією з причин втрати ваги у курців.

Ще одним джерелом ангіостатинів є поліморфноядерні нейтрофіли, які здійснюють обмежений протеоліз плазміногену за участі еластази [543]. Авторами показано, що еластаза активованих нейтрофілів розщеплює плазміноген з утворенням фрагментів, ідентичних продуктам гідролізу плазміногену панкреатичною еластазою. Після ізолювання та аналізу компонентів реакційної суміші було з'ясовано, що головним продуктом еластолізу плазміногену є поліпептид, ідентичний фрагменту К1-3. Цей ангіостатин продемонстрував високу біологічну активність, інгібуючи VEGF-індуковану проліферацію ендотеліоцитів *in vitro*, а також FGF2-стимульований ангіогенез у модельному експерименті на куриних ембріонах. Генерування ангіостатинів поліморфноядерними нейтрофілами може мати широке біомедичне застосування, враховуючи залучення цих клітин до різних фізіологічних процесів та патологічних станів, асоційованих із запаленням та ангіогенезом: загоєння ран, ССЗ, ревматоїдний артрит, псоріаз, діабетична ретинопатія, тощо.

Продемонстровано утворення і встановлено важливу роль ангіостатинів у функціонуванні різних структур ока [73]. Показано, що рогівка ока людини містить загалом 1,1 мкг плазміногену, що відповідіє його концентрації 0,12 мкМ. Теоретично, цієї концентрації плазміногену достатньо для продукування ангіостатинів у фізіологічно активних кількостях, оскільки IC_{50} для інгібування ендотелійних клітин становить приблизно 40 нМ. Встановлено, що стромальні фібробласти, але не

міофібробласти, генерують ангіостатини в тканині рогівки. Ще одним типом клітин, які здатні конвертувати плазміноген на ангіостатини, виявилися епітеліоцити рогівки [645]. Крім MMP-2, u-PA та плазміну, в утворенні ангіостатинів у рогівці беруть участь цистеїнові протеїнази. Авторами роботи [129] встановлено, що катепсини S та V відіграють важливу роль у регулюванні ангіогенезу у рогівці, й у тому числі, за рахунок розщеплення плазміногену з утворенням ангіостатинів. У нормі ангіостатини виконують важливу регуляторну функцію у рогівці, пов'язану з особливістю її фізіології, а саме, необхідністю функціонувати за умов заплющеного ока, що наближаються до гіпоксичних, під час сну. У зв'язку з цим, значний інтерес становить робота [529], в якій показано, що у рогівці ока людини неоваскуляризація не відбувається навіть тоді, коли око залишалося заплющеним тривалий проміжок часу, достатній для синтезу значних кількостей проангіогенних факторів. Дослідники пов'язують цей ефект з появою ангіостатинів у сльозовій рідині. У сльозі, зібраній після нічного сну, визначено високі рівні плазміногену, а також різних варіантів ангіостатинів: К1-3, К1-4 та ізольованого К5, який володіє потужною антиангіогенною активністю. На підставі отриманих даних було зроблено висновок стосовно протекторної ролі плазміногену, яка полягає у запобіганні неоваскуляризації та розвитку запальних процесів у рогівці ока за умов вимушеної гіпоксії.

1.3.3. Механізми біологічної дії ангіостатинів, клітинні мішені та рецептори

Хоча термін «ангіостатин» застосовується по відношенню до цілої групи крингл-вмісних фрагментів плазміногену (К1-3, К2-3, К1-4, К1-4.85, К1-5), а також до окремих кринглів, різні варіанти ангіостатинів демонструють різну активність по відношенню до ендотелійних клітин (табл. 1.3). Важливу роль у прояві антиангіогенних властивостей ангіостатинів відіграють такі фактори, як специфіка протеолітичного процесінгу плазмін(оген)у, конформація К-

доменів, міжкринглові взаємодії, а також ступінь глікозилювання цих протеїнів. Як видно з таблиці 1.3, найбільшу активність проявляє К1-5 та продукт автопротеолізу плазміну, який містить перші чотири К-домени і 85 % амінокислотної послідовності К5 (К1-4,85). Ці поліпептиди інгібують проліферацію та міграцію ендотеліоцитів у пікомолярних концентраціях. Для порівняння, фрагмент К1-3, який утворюється внаслідок еластолізу плазміногену (послідовність Cys84-Cys333 вихідної молекули), демонструє виражену антипроліферативну активність і натомість має помірні антиміграційні ефекти.

Таблиця 1.3

Вплив фрагментів плазминогену (ангиостатинів) на проліферацію та міграцію ендотеліоцитів [575, 617]

Фрагменти плазминогену (ангіостатини)	Проліферація ендотеліоцитів		Міграція ендотеліоцитів	
	Ступінь ефективності	IC_{50}, нМ	Ступінь ефективності	IC_{50}, нМ
К1	+	320	+/-	> 1000
К2	+	< К1, К3	+	> 100
К3	+	460	+	> 100
К4	-	-	+	500
К5	+++	50	+++	50
К1-3	+++	70	+/-	> 1000
К2-3	+	≈ К2	++	100
К1-4	++	135	+++	50
К1-4,85	+++	10	+++	0,05
К1-5	+++	0,05	+	600

Порушення структурної цілісності перших чотирьох крингл-доменів відновленням дисульфідних зв’язків призводить до втрати ними активності, тоді як відновлення К5 – стимулює її [293]. Наведені дані свідчать, що біологічна активність фрагментів плазмін(оген)у залежить від індивідуальної структури К-доменів, а їхні ефекти можуть бути реалізовані через різні молекулярні механізми. Наприклад, глікозилювання може мати вплив на

властивості цих антиангіогенних протеїнів та їхніх рекомбінантних аналогів через зміни фолдінгу протеїнових молекул та стабільності, швидкості кліренсу, резистентності до протеолізу, а також біологічних функцій, таких як взаємодія з рецепторами. Видалення вуглеводного фрагменту, зв'язаного через аміногрупу, що знаходиться у положенні Asn289, призводить до значного послаблення антиангіогенної та протипухлинної дії ангіостатину. Припускається, що глікозилювання за С-термінальному сайті у положенні Thr346 змінює афінність молекули ангіостатину до рецепторів, збільшуючи її активність [537]. Таким чином, доведено, що присутність усіх трьох вуглеводних залишків у молекулі К1-3 є важливим для прояву фізіологічної активності цієї форми ангіостатину. Більш того, наявність залишків сіалової кислоти є обов'язковою умовою для прояву його антиангіогенних властивостей.

На поверхні плазматичної мембрани ендотеліоцитів ідентифіковано принаймні сім протеїнів, з якими зв'язуються різні форми ангіостатинів: F_1F_oATP-синтаза, ангіомотин, інтегрин $\alpha_v\beta_3$, анексин II, HGF-рецептор (c-met), протеоглікан NG2, β-актин [175, 615, 636]. Однак, якщо зв'язування ангіостатинів з ATP-синтазою асоційовано з індукцією апоптозу, то події, які відбуваються внаслідок їх взаємодії з іншими молекулярними мішенями та до яких залучаються різні сигнальні шляхи, потребують подальшого детального дослідження. Крім безпосереднього впливу ангіостатинів на клітини, пригнічення активації ендотеліоцитів *in vivo* під дією ангіостатинів може опосередковуватися антагоністичними взаємодіями з VEGF. Показано, що ангіостатини пригнічують синтез VEGF та інгібують VEGF/bFGF-індуковану активацію кіназ (ERK-1 та -2) [114]. У клітинах капілярів сітківки фрагмент К5 спричинював зниження рівня VEGF та одночасно стимулював утворення ще одного потужного суперсору ангіогенезу – PEDF [212].

З усіх перелічених молекул-мішеней ангіостатину найбільш дослідженою є **F_1F_oATP-синтаза**, яку раніше вважали розташованою виключно на внутрішній мембрані мітохондрій. Однак, у 1999 р. Moser та ін.

[447] з'ясували, що АТР-синтаза відіграє роль рецептору для ангіостатинів К1-3 та К1-4 саме на поверхні плазматичної мембрани ендотелійних клітин. У подальшому «незвична» локація АТР-синтази була підтверджена у низці досліджень. Більш того, АТР-синтазу було ідентифіковано на поверхні багатьох типів ракових клітин [449]. АТР-синтаза забезпечує клітини енергією, синтезуючи АТР з ADP, для чого використовує трансмембранний градієнт протонів. Інгібування цієї помпи пригнічує вихід протонів до навколоклітинного середовища, що відбивається у зменшенні внутрішньоклітинного pH та зниженні рівня продукування АТР й супроводжується наступною загибеллю ендотеліоцитів. Унікальною характеристикою ангіостатинів є їхня здатність зв'язуватися з АТР-синтазою за низьких значень pH позаклітинного середовища та неспроможність взаємодіяти з АТР-синтазою за високих значень pH [651] (рис. 1.21).

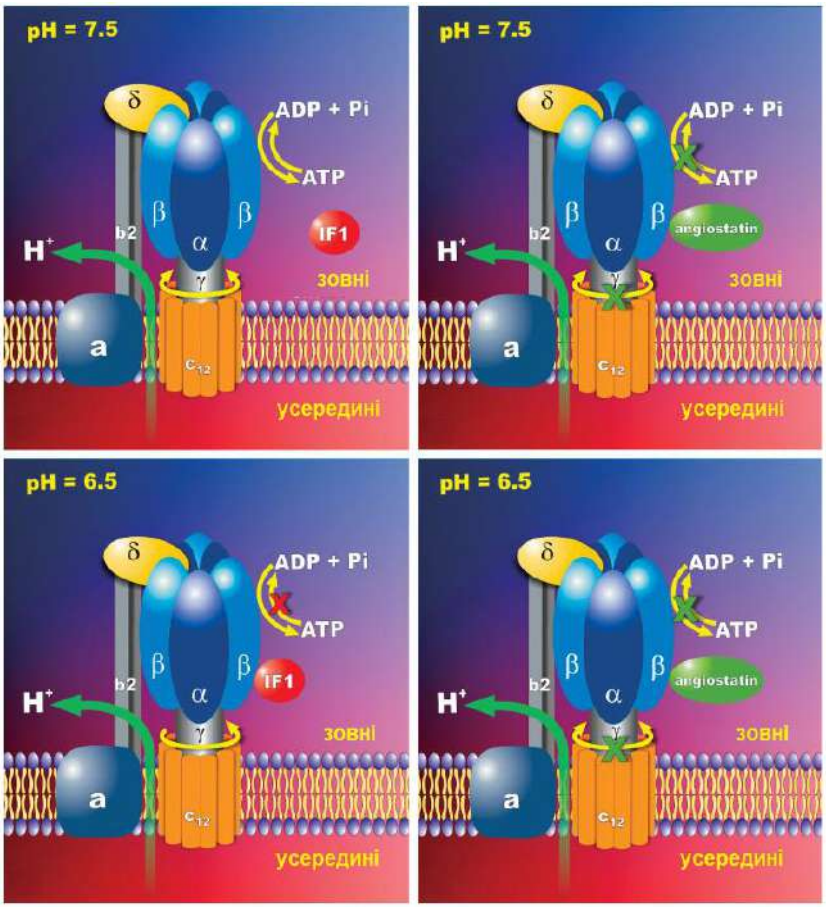

Рисунок 1.21 – pH-залежні механізми інгібування ангіостатином роботи F_1F_oАТР-синтази [636].

У тканинах за нормальних фізіологічних умов значення pH зазвичай становить 7,2 – 7,6, тоді як пухлинне оточення має pH у діапазоні 5,6 – 7,6, а пухлинний ацидоз є типовою ознакою новоутворень, оскільки ракові клітини утилізують глюкозу переважно через гліколітичний шлях, що є адаптацією до умов гіпоксії. Лактат, що утворюється у значних кількостях, сприяє закисленню позаклітинного середовища. Ці умови значно полегшують pH-залежне зв'язування ангіостатинів з ATP-синтазою, що порушує енергозабезпечення клітини й провокує її загибель. Зниження рівня проліферації клітин та їхня загибель шляхом некрозу спостерігається як у випадку ендотеліоцитів, фібробластів, гепатоцитів, так і деяких пухлинних клітин [117]. Показано, що здатність ангіостатинів пригнічувати активність ракових клітин значно залежить від типу пухлини або клітинної лінії, яка походить з неї, оскільки різні типи ракових клітин характеризуються різною кількістю та щільністю експонованої ATP-синтази на їх поверхні. Наприклад, Chi та Pizzo [118] встановили, що клітини аденокарциноми презентують більші кількості цього ензиму, ніж клітини раку передміхурової залози. Більш того, серед двох ліній раку простати PC-3 та 1-LN експресія ATP-помпи також різниться. Цікаво, що клітини найбільш небезпечного раку простати (PC-3) експонують менші кількості ATP-синтази. Цей феномен може, принаймні частково, пояснити, чому клітини PC-3 володіють більш високою здатністю потрапляти до системної циркуляції та утворювати високометастатичні пухлинні осередкию. Не виключено, що вони є менш чутливими до дії ангіостатинів. Цілком логічно, що пухлини, які характеризуються більш низькими значеннями pH позаклітинного середовища, схильні до мутацій та зниження ступеня резистентності до хеміотерапії. Отже, ангіостатин може чинити пряму цитотоксичну дію на деякі типи ракових клітин, інгібуючи активність мембраноасоційованої F_1F_oATP-синтази.

Ще однією мішенню ангіостатинв є **ангіомотін**, однак, його роль як протеїну-партнеру в регулюванні міграції та морфогенезу ендотелійних клітин не є остаточно доведеною. Непрямим доказом функціональної

взаємодії цих двох протеїнів є відсутність ефектів ангіостатинів по відношенню до клітин, що не експресують ангіомотін. Однак, вплив ангіостатинів на ангіомотін-трансфіковані ендотелійні клітини призводить до зростання активності FAK та інгібуванню міграції та формування судинної трубки [609]. Дослідження із застосуванням ПЛР у реальному часі дозволили встановити, що експресія ангіомотіну відбувається у більшості типів клітинних ліній, але найвищих рівнів вона досягає в ендотелійних клітинах мікросудин та пупкової вени [86, 91].

Значну увагу до себе як до партнерів ангіостатинів на поверхні ендотелійних судин привертають **рецептори-інтегрини**. У дослідженнях Tarui та ін. [605] було встановлено, що клітини CHO, трансфіковані різними комбінаціями рекомбінантних інтегринів (переважно субодиниці $\alpha_v\beta_3$ і $\alpha_9\beta_1$, і у меншому ступені $\alpha_4\beta_1$), виявилися здатними зв'язувати ангіостатини. Такі міжпротеїнові взаємодії були дозозалежними, з досягненням насичення, блокувалися специфічними до інтегринів антитілами та RGD-пептидом. Важливе спостереження стосується того, що клітини, які експресували інтегрини, виявилися здатними зв'язувати різні фрагменти плазміногену (K1-3, K1-4, K1-5), але не інтактну молекулу зимогену [636]. Порушення формування стрес-фібрил у таких клітинах свідчить про те, що ангіостатини діють як антагоністи відомих ангіогенних лігандів $\alpha_v\beta_3$. Було доведено, що взаємодії компонентів ЕЦМ з інтегрином $\alpha_v\beta_3$ є необхідним для підтримки мітоген-активованої протеїнкінази (MAPK) проангіогенними факторами, а також для супресії апоптозу. Ангіостатин безпосередньо пригнічував сигналювання, спрямоване на підсилення проліферації та виживання ендотелійних клітин, що експонують інтегрини [477]. Крім того, ангіостатин специфічно інгібує плазмін-індуковану міграцію клітин, зв'язуючись з інтегрином $\alpha_v\beta_3$ (рис. 1.22).

Іншою специфічною мішенню ангіостатинів на поверхні клітин є рецептор фактору росту гепатоцитів (HGF, *scatter factor*) **c-met**, який є

тирозинкіназним проонкогенним рецептором, що бере участь у проліферації клітин, забезпеченні їхнього виживання та міграції/інвазії (див. п. 1.2.4).

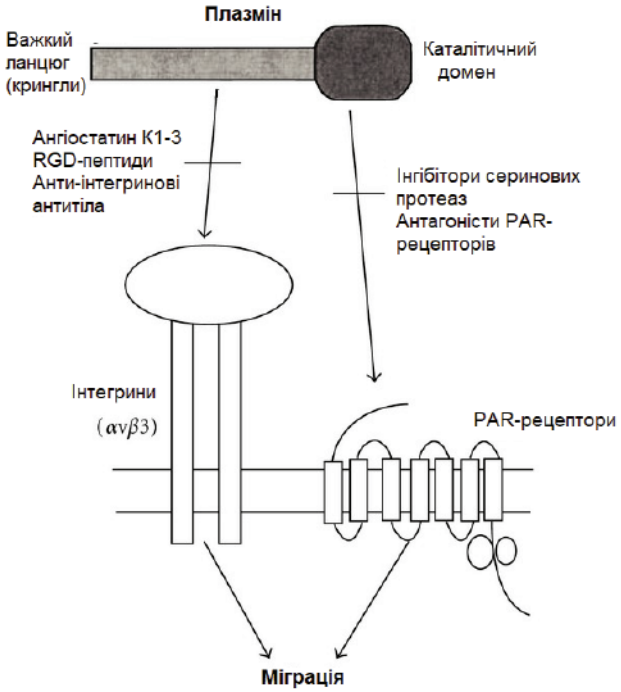

Рисунок 1.22 – Механізм інгібування ангіостатином міграції ендотелійних клітин через зв'язування з інтегриновим рецептором інтегрином $\alpha_v\beta_3$ [605].

Таким чином, вісь сигналювання HGF/c-met відіграє ключову роль у процесах регенерації тканин, ангіогенезі та пухлинному рості. Цей цитокін належить до плазміногенового сімейства S1пептидаз, однак, він не проявляє протеолітичної активності. Взаємодія з гепарансульфатом дозволяє HGF утворювати комплекс із c-met-рецептором, який здатний до проведення сигналу, що підсилює проліферацію та міграцію клітин. HGF залучається до розвитку та метастазування різних типів злоякісних пухлин, таких як рак легені, підшлункової, щитоподібної та грудної залоз, кишечника. HGF-стимульований ангіогенез також відбувається через активацію ним тирозинкінази c-met на ендотеліоцитах та клітинах гладеньких м'язів [223]. У 2003 р. Wajih та Sane встановили, що ангіостатини можуть інгібувати HGF-індуковане сигналювання, і цей ефект реалізується завдяки структурній

гомології між ангіостатином та молекулою цього ростового фактору. Обидва протеїни мають у своїй структурі К-домени і мають гомологічний амінокислотний склад, впливають на проліферацію та рухливість ендотелійних клітин, проте, протилежним чином. Було показано, що рекомбінантний K1-3 інгібує HGF-індуковане фосфорилювання рецептору c-met, а також медіаторів сигнальних шляхів Akt та ERK1/2 у клітинах HUVEC [637]. Механізм інгібувальної дії ангіостатинів по відношенню до HGF-індукованого сигналювання, вочевидь, реалізується за конкурентним механізмом: надлишок HGF нівелює інгібування фосфорилювання Akt, спричинене ангіостатином. На специфічний характер взаємодії ангіостатинів з c-met-рецептором вказує той факт, що інші тирозинкіназні рецептори клітини (VEGF, bFGF, IGF-1) не блокуються ним і при цьому не порушується залежне від їхньої активації фосфорилювання Akt та ERK1/2. Ці ефекти були притаманні виключно ангіостатинам, але не батьківським протеїнам. Зв'язування ангіостатину *in vitro* із c-met-рецептором у розчині відбувалося у дозозалежний спосіб і характеризувалося насиченням. Величина K_d зв'язування ангіостатину з цим рецептором ~ 5 nM, кількість його сайтів зв'язування на клітину лінії HUVEC становило 12044. Пізніше Ansell та ін. [39] продемонстрували антиангіогенні ефекти ізольованого K5, які також реалізовувалися через конкуренцію з HGF за зв'язування із c-met-рецептором. У дослідженні Sharma та ін. [555] було показано, що ангіостатини впливають на сигналювання ендотелійних клітин BAE, що проліферують, пригнічуючи активність циклін-залежної кінази-5 (cdk5) у час- та дозозалежний спосіб. Пригнічення функції cdk5 корелює з інгібуванням проліферації та запуском апоптозу в ендотелійних клітинах, що призводить до гальмування bFGF-індукованого ангіогенезу.

Ще одним кандидатом на роль мішені ангіостатину на клітинній поверхні є **протеоглікан NG2**. Goretzki та ін. (2000) продемонстрували, що молекула NG2 може бути центром зв'язування як для ангіостатину, так і для плазміногену. NG2 представляє собою протеоглікан хондроїтинсульфат,

експресія якого регулюєьться в ході онтогенезу. Було встановлено, що різні фрагменти плазміногену, включаючи К1-3, зв'язуються з імобілізованим NG2, демонструючи насичення та дозозалежну кінетику. Величина K_d зв'язування ангіостатину з цим протеогліканом сягала діапазону 12-75 нМ. Анти-ангіогенні ефекти ангіостатину інгібувалися нівелювалися NG2. Цікаво, що розчинний NG2 суттєво прискорював активацію плазміногену u-PA. Хоча NG2 не опосередковує ангіостатин-індуковане сигналювання, можливо, що він відіграє важливу роль у регулюванні позаклітинної активності ангіостатину в асоційованій з пухлиною судинній мережі. Підвищений вміст NG2 спостерігається у стінці пухлинних судин. Було показано, що NG2 задіяний до зв'язування та інтерналізування ангіостатинів, завдяки чому їхня концентрація в кровотоці зменшується, що сприяє прогресії пухлини [112].

В експериментах [612] було встановлено, що ангіостатин зв'язується з молекулою **анексину II** (35 кДа), виділеного з ендотелійних клітин аорти бика (BAE). Розчинний анексин II, а також (частково) специфічне моноклональне антитіло, ефективно інгібували зв'язування ангіостатину з ізольованим аннексином II. Взаємодія ангіостатин-анексин II з клітинами BAE мало дозозалежний характер і досягало насичення. Величина K_d зв'язування ангіостатину з анексином II BAE сягала 83 нМ, тоді як з розчинним анексином II – 101 нМ. Ангіостатини конкурували з плазміногеном та зменшували кількість молекул зимогену, що зв'язується з анексином II, на 40%. Зрештою, було показано, що попередня інкубація клітин BAE з надлишковою кількістю плазміногену запобігала ангіостатин-індукованій загибелі клітин на 90%, що свідчить на користь залучення анексину II до реалізації ефектів ангіостатину на клітинному рівні. Була запропонована модель ангіостатин-опосередкованого сигналювання через анексин II, що відбивається у зростанні рівня вільного внутрішньоклітинного кальцію, зниженню проліферативного потенціалу ендотелійних клітин та запуску в них апоптозу [594].

На сьогоднішній день особливу увагу прикуто до механізмів реалізації антиангіогенних властивостей фрагменту К5 плазміногену. Вважається, що головною мішенню К5 є протеїн **VDAC** (**V**oltage-**D**ependent **A**nion **C**hannel, потенціал-залежний аніонний канал), який спершу ідентифікували на зовнішній мембрані мітохондрій, а згодом визначили й на плазматичних мембранах деяких клітин. Вважається, що основною функцією цього протеїну, що утворює пору, є регулювання вивільнення АТР, транспорту йонів та метаболітів, підтримка об'єму мітохондрій та регулювання окисно-відновної рівноваги. Взаємодіючи з про- та анти-апоптотичними факторами, VDAC відіграє роль регулятора опосередкованих мітохондріями сигнальних шляхів, спрямованих на загибель або виживання клітини. Таким чином VDAC залучається до канцерогенезу та розвитку нейродегенеративних станів [564]. Показано амінокислотну гомологію між активатором плазміногену стрептокіназою та VDAC. Виявилося, що сайт зв'язування К5 у молекулі стрептокінази розташований між залишками Tyr_{252}-Lys_{283}, і є гомологічним ділянці у первинній структурі VDAC Tyr_{224}-Lys_{255}. Антитіла проти цих послідовностей взаємодіють з VDAC та розпізнають цей протеїн на плазматичній мембрані ендотелійних клітин людини. К5 зв'язується з високою афінністю (K_d = 28 nM) з ендотеліоцитами, і ця взаємодія блокується специфічними антитілами. Очищений VDAC зв'язується з К5, але виключно у вигляді ліпосомної форми. Припускають, що К5 порушує механізми, які контролюють внутрішньоклітинні рівні Ca^{2+} саме через взаємодію із VDAC. Зв'язування К5 з ендотелійними клітинами також індукує зменшення внутрішньоклітинного значення pH та величини гіперполяризації мітохондрійної мембрани. Важливо зауважити, що анексин II та гангліозид GM1 зв'язуються з молекулою плазміногену через LBS, локалізований у К1, а VDAC взаємодіє через сайт, розташований у К5 [233, 370]. Крім цього, із VDAC, експонованому на поверхні клітин, зв'язуються як молекула зимогену через свій К5, так і t-PA через фінгер-домен. Така опосередкована взаємодія зимогену та його активатору призводить до

зменшення величини K_m та зростанні значення K_{max} для реакції конвертації плазміногену на плазмін [234]. К5 сприяв зростанню співвідношення Bak/Bcl_{xl} на мітохондрійній мембрані, що призводило до її деполяризації, витоку цитохрому с та активації каспаз 7, 8 та 9 в ендотелійних клітинах, що призводило до їхнього апоптозу [245]. Не виключено, що проапоптотичні властивості К5, які реалізуються через його зв'язування з VDAC, визначають протипухлинну активність цього кринглу плазміногену, як це було показано на деяких типах раку шлунку [192]. Було показано, що домен К5 молекули плазміногену є субстратом для NADH-залежної редуктазної активності VDAC. Виявилося, що такий потрійний комплекс є ефективною протеолітичною машиною, яка здійснює видалення відкладень β-пептиду у головному мозку, а також утилізацію клітинного дебрісу з пошкодженої тканини [234].

Отже, накопичені експериментальні дані дозволяють розглядати ангіостатини як біологічно активні молекули з широким спектром з широким спектром фізіологічних та патофізіологічних властивостей. Крім залучення ангіостатинів до процесів судиноутворення, значний науково-практичний інтерес становить з'ясування механізмів їхньої протизапальної дії, які наразі досліджені недостатньо. Chavakis та ін. [110] вперше описали протизапальні/антиадгезивні ефекти ангіостатинів, які полягали в інгібуванні ними інтегрин-опосередкованої адгезії лейкоцитів на протеїнах ЕЦМ та ендотелію, а також трансендотелійної міграції лейкоцитів. Ти ж самі автори встановили, що ангіостатини пригнічують активацію ядерного фактору NF-κB, а також асоційовану з ним експресію тканинного фактору (TF) – потужного індуктора тромбоутворення. Показано, що фрагменти плазміногену К1-4 та К1-3 пригнічують міграцію нейтрофілів, індуковану деякими хемокінами та HIV-Tat-протеїном [67]. Рекомбінантний К1-3 людини зменшував ступінь інфільтрації макрофагів у моделі експериментального атеросклерозу [448]. К1-3 дозозалежним чином блокував хемоатрактант-індуковану міграцію макрофагів та моноцитів миші, порушуючи процеси реорганізації актинового цитоскелету, які визначають

формування філоподій/ламелоподій і, зрештою, локомоторну активність клітин [483]. Крім ендотелійних клітин та макрофагів, ангіостатини інгібують HGF-індуковану проліферацію та міграцію клітин гладеньких м'язів *in vitro* та *in vivo* [640]. Показано, що ангіостатини інгібують метастазування пухлин грудної залози до кісток та пригнічують активність остеокластів, інгібуючи тим самим резорбцію кісткової тканини [486]. Ангіостатини підтримують ангіогенний баланс у тканині сітківки ока, запобігаючи її надмірній васкуляризації, зокрема при корекції зору із застосуванням лазерної фотокоагуляції [173]. Порушення продукування ангіостатинів у сітківці може бути одним з тригерів розвитку діабетичної ретинопатії [581].

1.3.4. Ангіостатини як маркери патологічних станів

Наявні дані літератури, а також власні результати, отримані у представленому дисертаційному дослідженні, визначають перспективи використання ангіостатинів як маркерів патологічних станів різного генезу.

Відомо, що за низки онкологічних захворювань (але не всіх) вміст ангіостатинів у крові зростає, що залежить, головним чином, від ступеня прогресії пухлини [466, 575]. Крім того, зростання концентрації циркулюючих ангіостатинів може вказувати на рецидив пухлинного росту або на перебіг метастатичного процесу [162]. Soff та ін. [575] показали відсутність різниці між вмістом ангіостатинів у плазмі крові здорових донорів та пацієнтів із злоякісними новоутвореннями. Проте, підвищена концентрація K1-4,85 визначалася в асцитній рідині пухлин яєчника, а також асцитах пацієнтів з абдомінальним раком. Sten-Linder та ін. [585] аналізували вміст ангіостатинів у сечі 117 пацієнтів з онкологічними хворобами та здорових добровольців, застосовуючи для детекції цих протеїнів вестерн-блот (антитіла проти K1-3) з наступним денситометричним аналізом. Показано, що концентрація ангіостатинів у сечі онкохворих значно перевищує цей показник у здорових людей (27 ± 75 проти 3±3 мкг/мл відповідно). У дослідженні Drenberg та ін.

[170] було встановлено, що рівні ангіостатинів у сечі онкохворих жінок з епітелійним раком яєчника більше, ніж у 5 разів перевищують цей показник у здорових осіб та в жінок з доброякісними новоутвореннями цього органу. Причому, підвищення вмісту ангіостатинів у сечі відбувалося незалежно від стадії онкозахворювання, розмірів пухлини, гістологічного субтипу, рівнів креатиніну, перебігу менопаузи, віку пацієнток.

Після встановлення ролі ангіостатину в етіопатогенезі ретинопатії та нефропатії, які є частими ускладненнями цукрового діабету, наразі досліджується можливість використання цих протеїнів як маркерів розвитку патологічних станів, асоційованих з діабетом. Ertürk та ін. [187] вперше показали наявність прямого зв'язку між важкістю гіперглікемії в пацієнтів з цукровим діабетом та вмістом ангіостатину в сироватці крові. Встановлено, що використання метформіну в лікуванні таких хворих сприяє зменшенню концентрації циркулюючого ангіостатину в порівнянні з цим показником у пацієнтів, що не отримували метформін.

Важливими є даними декількох досліджень, які доводять релевантність використання ангіостатинів як маркерів дисфункції нирки. Показана залежність між ступенем тяжкості та розвитком IgA-нефропатії, яка є найбільш розповсюдженим типом гломерулонефриту, та зростанням рівня ангіостатину в сечі пацієнтів. При цьому, найвищий вміст ангіостатинів визначався в сечі хворих з атрофією клубочків та інтерстіціальним фіброзом [671]. Не виключено, що підсилення продукування ангіостатину в тканинах нирки відбувається через активацію катепсину D, тригером для чого слугує пригнічення утворення NO [540].

Протилежний результат був отриманий Gerlicz-Kowalczuk та ін. [222], які показали, що у сироватці крові хворих із системним склерозом рівень ангіостатину є нижчим за цей показник у здорових донорів. Автори припустили, що за цієї патології, яка супроводжується розвитком мікроангіопатій, зменшення вмісту ангіостатину може бути важливим для компенсації аберантного ангіогенезу.

Відносне зростання рівня ангіостатину в крові є типовою біохімічною ознакою автоімунних захворювань. Keskin та ін. [317] показали, що розвиток запального процесу за хвороби Бехчета супроводжується підвищенням вмісту ангіостатину в сироватці крові. Більш того, встановлено пряму кореляційну залежність концентрації циркулюючого ангіостатину від розвитку тромбозів глибоких вен, увеїту та артриту у пацієнтів з цим захворюванням. Wu та ін. [667] запропоновано використання ангіостатину як малоінвазивного маркеру розвитку червоного системного вовчака. Як з'ясувалося, існує зв'язок між підвищенням рівня ангіостатину в сечі таких пацієнтів та хронізацією патологічного процесу, в першу чергу, хронічної ниркової недостатності.

Залучення ангіостатину до патогенезу ССЗ, передусім, ішемічної хвороби серця та хронічної серцевої недостатності [677] становить підгрунтя для його використання як маркеру цієї групи хвороб та ефективності їхнього лікування. Так, у модельному експерименті було показано, що аеробне фізичне навантаження в комплексі зі споживанням L-аргініну сприяло сниженню рівня ангіостатину та покращення артеріогенезу в щурів за експериментального інфаркту міокарда [508]. Результати власних досліджень, які увійшли до представленої дисертаційної роботи, роблять значний внесок до сучасних уявлень про значення ангіостатинів як маркерів ССЗ та показників ефективності їхньої фармакотерапії [616, 622, 624].

Таким чином, плазміноген/плазмінова система є інтегральною протеїновою системою організму, які відіграє ключову роль у забезпеченні реалізації життєво важливих процесів в організмі через участь у фібринолізі та регулюванні функціональної активності клітин. Робота плазміноген/плазмінової системи в нормі та за патологічних станів має загальнобіологічне значення і становить актуальну науково-прикладну проблему, що вимагає всебічного і невідкладного дослідження в контексті структурно-функціонального взаємозв'язку її протеїнів та їхньої взаємодії між собою та з іншими молекулами та клітинами організму.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Обладнання

Для виконання експериментальних досліджень у дисертаційній роботі використовували наступне лабораторне обладнання: камери для вертикального гель-електрофорезу BioRad (США) і Helicon VE-10 (РФ), камера для імуноблотингу Bio-Rad Mini-PROTEAN (США), джерела живлення SPN300-03C (ФРН) та Ельф-4 (РФ), спектрофотометр СФ-2000 (РФ), спектрофотометр DeNovix (DeNovix Inc., США), рідер Multiscan EX Thermo Electron Corporation (Фінляндія), терези електронні Radwag XAS160/C (Польща), pH-метр Eutech Instruments pH 510 (Сінгапур), ультразвуковий дезінтегратор Labsonic M (Sartorius, ФРН), центрифуга з охолодженням Eppendorf 5415R (ФРН), вортекс Biosan FVL-2400N Combi-Spin (Латвія), шейкер-термостат ES-20 (BIOSAN, РФ), ультрацентрифуга центрифуга УЦП-2-85, центрифуга ОПн-3, центрифуга РС-6, шейкер Лаб-ПУ-01, колектор фракцій FCC 60, перистальтичний насос НП-1М, магнітна мішалка ММ-5, термобаня EL-20, термобаня BioMark T1, термостат ТВ-3, холодильники Snaige, холодильна камера Liebherr, центрифужні фільтри з різним діаметром пор (Amicon Ultra, Millipore, Ірландія), 96-лункові мікропланшети Multi-Sorp для твердофазного імуноензимного аналізу (NUNC, Данія), сито з діаметром пор 100 мкм (Falcon, Franclin Laces, США), пластикові 175-см^3 флакони (Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, ФРН), скляні хроматографічні колонки, автоматичні піпетки Biohit на різні об’єми. Підрахунок кількості тромбоцитів та оцінка їх агрегативної активності проводилися за допомогою оптичного агрегометра «SOLAR AT 02» (Білорусь). Культивування клітин проводилося у ламінарних шафах біологічної безпеки ESCO 2-го рівня біобезпеки (Сінгапур) з використанням автоматичного лічильника клітин Thermo Fisher Countess FL II з Invitrogen EVOS GFP світловим кубом. Вимірювання інтенсивності

флуоресценції тромбоцитів проводили на протоковому цитофлуориметрі Coulter Epics XL (Beckman Coulter, США). Імунофлуоресцентний аналіз фіксованих препаратів клітин та тканин проводили на конфокальному мікроскопі Zeiss LSM 510 Meta (Carl Zeiss, Йєна, ФРН).

2.2. Реактиви та матеріали

У роботі були використані наступні реактиви та субстанції: BrCN-активована сефароза 4B (Pharmacia, Швеція); специфічний хромогенний субстрат для визначення амідолітичної активності плазміну S-2251 (H-D-Val-Leu-Lys-pNA·2HCl) (Ренам НПО, Москва, РФ); бичача ембріональна сироватка (fetal bovine serum, FBS), суміш антибіотики-антимікотик (Thermo Scientific, США); розчин для дисоціації клітин (Millipore, США); нітроцелюлозна мембрана з діаметром пор 0,45 мкм, полівінілідиндифлюридна (PVDF) мембрана для блотингу, Lys-сефароза 4B, сефадекс G-75 (GE Healthcare, Amersham, Велика Британія); тріс(гідроксіметил)амінометан, HEPES-натрієва сіль, хлорид натрію (Helicon, РФ); гліцин (Fisher Scientific, США); акриламід, N,N'-метилен-біс-акриламід, персульфат амонію, сечовина (Merck Millipore, ФРН); протеїн А-сефароза із *Staphylococcus aureus*, азид натрію, L-лізин-гідрохлорид, амінокапронова кислота, ЕДТК, хлорид цинку, хлорид кальцію, хлорид калію, калій фосфорнокислий, β-меркаптоетанол, Triton X-100, Tween-20, п-НФГБ, параформальдегід, желатин, люминол 97%, р-кумарова кислота, пероксид водню, 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразолій бромід (МТТ-реагент), фенілізотіоцианат (FITC), флуоресцентний ядерний барвник Hoechst 33342, H_2DCF-DA, 100×суміш інгібіторів протеїназ та фосфатаз, бензамідин, лейпептин, фенілметилсульфонілфлуорид (PMSF), ванадат натрію, соєвий інгібітор трипсину, стрептозотоцин, 3-амінобензамід, нікотинамід, панкреатична еластаза підшлункової залози свині, желатин із шкіри свині, сироватковий альбумін людини, повний та неповний ад’юванти Фрейнда (Sigma-Aldrich, США); поживні середовища для клітин евкаріот RPMI 1640,

RPMI/F12 та DMEM (Gibco, США); малі інтерферуючі РНК (siRNA) (siControl та siTIGAR) (Dharmacon, USA); реагент для трансфекції (Lipo RNAiMax, Lipofectamine® RNAiMAX, InvitrogenTM), протеїнові маркери молекулярної маси в діапазоні від 10 до 270 кДа (PageRuler Prestained Protein Ladder, Fermentas, Литва); натрій-фосфорнокислий двозаміщений 12-водний, натрій-фосфорнокислий однозаміщений 2-водний, діамінобензидин тетрагідрохлорид (ДАБ), карбонат натрію, бікарбонат натрію (Shanghai Synnad Chemical Co., Китай); натрію додецилсульфат (AppliChem, ФРН); сухе знежирене молоко (Carnation, США або ApexTM, Bioresearch Products, США); барвник кумасі діамантовий синій-R-250 (Serva, США); барвник SERVA Blau R (Fluka, ФРН); пара-нітрофенілфосфат (п-НФФ) (Sigma Diagnostics, США); метанол (Macron Avantor, США); бичачий сироватковий альбумін (BSA) (Amresco, США); амоній сірчанокислий (CFL, ФРН); тетраметилендиамін (ТЕМЕД), трипсин (Reanal, Угорщина); колаген («Технология стандарт», РФ); ДМСО (Lab-Scan, Ірландія); тромбін (Каунас, Литва); бичачий панкреатичний інгібітор трипсину апротинін (ін'єкційний препарат «Контривен», Біофарма, Україна); ксилол, оцтова кислота, ацетон (ТОВ «НВП «Альфарус», Україна); трихлороцтова кислота, гліцерин (ВАТ «АО «Реахім», РФ); рентгенівська плівка (Konica Minolta Medical & Graphic, Inc., Японія); розчини проявника та фіксажу для обробки рентгенівських плівок (Kodak, США або ОНІКО, Україна); інші солі та розчинники аналітичного ступеня чистоти різних виробників. Перелік комерційних антитіл, що використовували у роботі для проведення різних видів імунохімічного аналізу, наведено у таблиці 2.1.

2.3. Визначення кількості загального протеїну

Вміст протеїну в елюатах, що отримували в ході афінної та гель-проникної хроматографії для побудови профілю елюції, контролювали спектрофотометрично, вимірюючи величину оптичного поглинання при довжині хвилі 280 та 320 нм. Отриману різницю між величинами поглинання

використовували для розрахунку концентрацій з урахуванням значень молярних коефіцієнтів абсорбції (1%, 1 см) та молекулярної маси досліджуваних протеїнів, які наведені у таблиці 2.2.

Таблиця 2.1

Препарати комерційних антитіл

Антитіло	*Вид*	*Виробник*	*Кат. номер*
Первинні			
Anti-actin, polyclonal	Кріль	Sigma-Aldrich (США) Abcam (США)	A2066 ab20272
Anti-neurofilament 200, polyclonal	Кріль	Sigma-Aldrich (США)	N4142
Anti-GFAP, polyclonal	Кріль	Santa Cruz Biotechnology (США)	sc-9065
Anti-p21, polyclonal	Кріль	Santa Cruz Biotechnology (США)	sc-397
Anti-LC3, polyclonal	Кріль	Santa Cruz Biotechnology (США)	Sc-134226
Anti-Bax, polyclonal	Кріль	Abcam (США)	ab7977
Anti-PARP-1, polyclonal	Кріль	Abcam (США) Cell Signaling Technology (США)	ab6079 9542
Anti-MBP, polyclonal	Кріль	Abcam (США)	ab40390
Anti-PAR polymer	Кріль	Trevigen Inc. (США)	4335-MC-100
Anti-VEGF, monoclonal	Миша	Abcam (США) Merck Millipore	ab1316 05-1117
Anti-p53, monoclonal	Миша	Santa Cruz Biotechnology (США)	sc-126
Anti-caspase-9, monoclonal	Миша	Santa Cruz Biotechnology (США)	sc-81663
Anti-Akt, monoclonal	Миша	Santa Cruz Biotechnology (США)	sc-271149
Anti-beclin-1, monoclonal	Миша	Santa Cruz Biotechnology (США)	sc-48341
Anti-vimentin, monoclonal	Миша	Santa Cruz Biotechnology (США)	sc-6260
Anti-fibronectin (E5), monoclonal	Миша	Santa Cruz Biotechnology (США)	sc-8422
Anti-MDM2, monoclonal	Миша	Abcam (США)	ab16895
Anti-GAPDH, monoclonal	Миша	Abcam (США)	ab8245
Anti-RPA70, monoclonal	Миша	Sigma-Aldrich (США)	NA-13
Anti-tubulin, monoclonal	Щур	Homemade (д-р Can Ali Agca, Bingol University, Туреччина)	
Вторинні			
Anti-rabbit IgG, HRP-conjugated	Коза	Sigma-Aldrich (США) Abcam (США)	A0545 ab6721
Anti-rabbit IgG, alkaline phosphatase-conjugated	Коза	Sigma-Aldrich (США)	A3687
Anti-mouse IgG, HRP-conjugated	Коза	Abcam (США)	ab197767
Anti-rat IgG, HRP-conjugated	Коза	Abcam (США)	ab97057
Флуоресцентно мічені			
Anti-P-selectin (CD62), PE-conjugated	Коза	Acris Antibodies, Inc., Сан-Дієго, США	AM26020RP-N
Anti-rabbit IgG, FITC-conjugated	Коза	Sigma-Aldrich (США)	F9887
Anti-mouse IgG, Alexa Fluor-488-conjugated	Коза	Sigma-Aldrich (США)	16-240
Anti-rabbit IgG, Alexa Fluor-594-conjugated	Коза	Sigma-Aldrich (США)	SAB4600321

Концентрацію загального протеїну у зразках сироватки крові, екстрактах тканин та лізатах клітин вимірювали спектрофотометрично за Stoscheck [587], проводячи розрахунок величин вмісту протеїну за формулою:

$$C_{мг/мл} = 1{,}55A_{280} - 0{,}76A_{260},$$

або за допомогою мікрометоду Бредфорд, використовуючи комерційні набори Micro BCA™ Protein Assay Kit (ThermoFisher, США).

Таблиця 2.2

Величини молярних коефіцієнтів абсорбції деяких протеїнів плазміноген/плазмінової системи

Протеїн	Молекулярна маса, кДа	$E_{1\%,1см}$
Glu-плазміноген	92	1,7
Lys-плазміноген	84	1,7
Плазмін	84	1,7
Мініплазміноген	38	1,4
Крингл 1-3	36	2,25
Крингл 4	10	2,5

2.4. Виділення та очищення плазміногену та його фрагментів

2.4.1. Отримання Glu-плазміногену людини на Lys-сефарозі 4B

Glu-плазміноген людини одержували із свіжої цитратної плазми крові здорових донорів методом афінної хроматографії на Lys-сефарозі за присутності інгібітора серинових протеїназ апротиніну (10 мг/мл) [154]. Об’єм колонки становив 150 см^3. Відмивку колонки від неспецифічно зв’язаних протеїнів крові проводили 0,1 М Na-PBS, pH 7,4. Елюцію плазміногену проводили 0,2 М 6-АГК, розчиненої у 50 мМ Na-PBS, pH 7,4 (рис. 2.1).

Для інактивації можливих домішок плазміну до одержаних препаратів плазміногену вносили інгібітор п-НФГБ у кінцевій концентрації 10^{-4} М, витримували протягом 30 хв. за 20°С, після чого препарати плазміногену

діалізували протягом 6 год. проти 50 мМ трис-HCl буфера (pH 7,4), що містив 0,15 М NaCl (TBS).

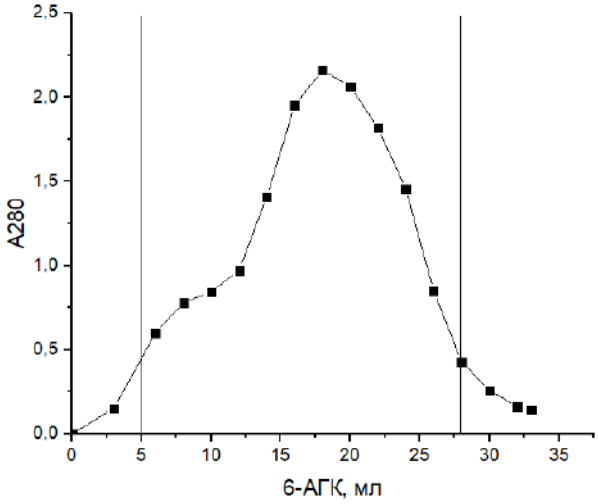

Рисунок 2.1 – Профіль елюції Glu-плазміногену донорської плазми з афінного сорбенту Lys-сефарози 4В 0,2 М 6-аміногексановою кислотою.

Концентрацію протеїну у препаратах плазміногену визначали спектрофотометрично, як описано вище. Чистоту одержаних препаратів плазміногену оцінювали за допомогою гель-електрофорезу у 10 % PAAG за присутності 0,1 % SDS (рис. 2.2), а також електрофорезу за кислих значень pH.

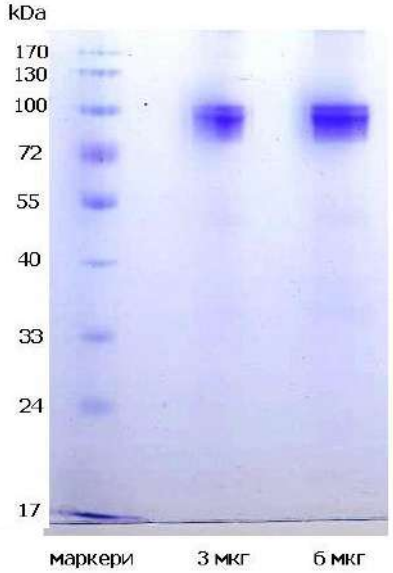

Рисунок 2.2 – Електрофореграма препарату плазміногену, ізольованого з плазми крові донорів за допомогою афінної хроматографії на Lys-сефарозі-4В.

Результати гель-електрофорезу свідчать, що препарати ізольованого з плазми крові донорів Glu-плазміногену були електрофоретично гомогенними.

Одержані препарати плазміногену перевіряли на наявність спонтанної амідолітичної активності за допомогою фотометричного методу з використанням специфічного хромогенного субстрату S_{2251} [517]. До експериментів з тромбоцитами та пухлинними клітинами брали лише ті препарати плазміногену, які не проявляли спонтанну амідолітичну активність. Препарати плазміногену зберігали при –20°С.

2.4.2. Одержання Lys-плазміногену з фракції $III_{2,3}$ плазми крові за Коном

Lys-плазміноген виділяли з фракції донорської крові III2,3 за Коном на лізин-сефарозі без додавання інгібітора, відокремлюючи домішки Glu-форми іонообмінною хроматографією на DEAE-сефадексі А-50, або Glu-плазміноген, одержаний з плазми крові людини, перетворювали на Lys-форму, обробляючи плазміном при ваговому співвідношенні ензим : субстрат – 1:50 протягом 30 хв. при кімнатній температурі з наступним інгібуванням ензиму п-НФГБ та ДФФ (кінцеві концентрації становили 10^{-4} та 10^{-2} М відповідно). Після діалізу та концентрування препарат Lys-плазміногену зберігали при -20 ^{o}С відповідно. Для ідентифікації Lys- та Glu-форми плазміногену застосовували електрофорез за низьких значень pH (рис. 2.3).

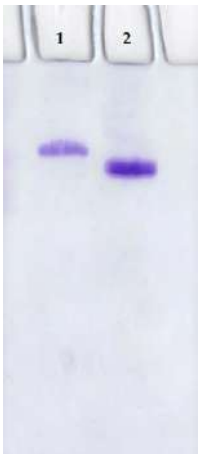

Рисунок 2.3 – Електрофореграма препаратів Glu- (1) та Lys (2)-плазміногену.

2.4.3. Отримання плазміногену щура

Цитратну плазму крові п’яти статевозрілих білих лабораторних щурів-самців, що використовувалися як контрольні тварини в експерименті по індукуванню СТЗ-гіперглікемії, отримували після декапітації, додавали апротінін та ЕДТК у кінцевих концентраціях 10 мг/мл та 0,001 М відповідно, наносили на колонку з Lys-сефарозою 4В та проводили очистку плазміногену, як описано у п. *2.4.1.* Профіль елюції протеїнів, що специфічно зв’язалися з Lys-сефарозою, представлено на рис. 2.4.

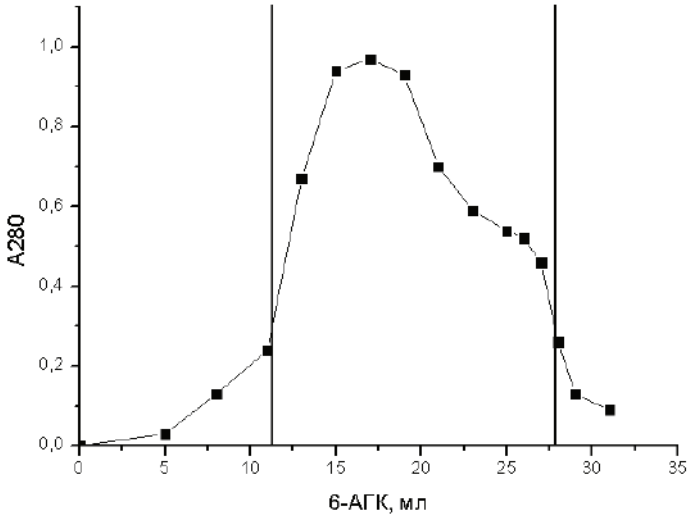

Рисунок 2.4 – Профіль елюції протеїнів плазми крові щурів з афінного сорбенту Lys-сефарози 4В 0,2 М 6-аміногексановою кислотою.

Елюати з величиною оптичного поглинання не менше 0,4 збирали, висолювали сульфатом амонію, розчиняли у трис-лізиновому буфері та видаляли залишки солей та 6-АГК в ході діалізу проти TBS так, як описано вище. Склад протеїнів, що специфічно зв’язалися з афінним сорбентом, визначали за допомогою електрофорезу у 10 % ПААГ (рис. 2.5).

Результати електрофорезу показали, що крім мажорного поліпептиду з M_m ~ 90 кДа, який відповідає за молекулярною масою молекулам плазміногену, елюати містили незначну кількість більш низькомолекулярних поліпептидів (діапазон M_m 48-15 кДа), що специфічно зв’язалися з Lys-сефарозою. Ці

поліпептиди – продукти обмеженого протеолізу плазміногену плазми щурів, який міг мати місто в ході процедури декапітації тварин. У подальшому отриманий препарат плазміногену, що містив суміш його деградованих поліпептидів, використовувався для імунізації кролів з метою отримання антитіл. Для цього застосовувався метод імунізації, згідно якого кролям підшкірно вводили заполімеризований акриламід із включеним антигеном (плазміногеном), який отримували в ході попередньо проведеного електрофоретичного розділення протеїнів препарату плазміногену.

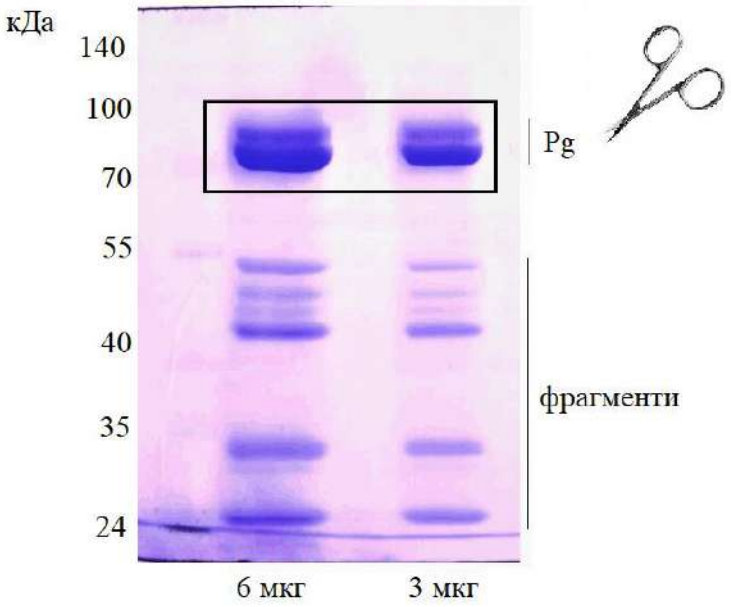

Рисунок 2.5 – Електрофореграма препаратів щурячого плазміногену та його фрагментів, отриманих за допомогою афінної хроматографії на Lys-сефарозі-4В.

2.4.4. Еластоліз плазміногену людини та очищення його фрагментів (ангіостатинів)

Отримання фрагментів плазміногену (К1-3, міні-плазміногену, К4) проводили за методикою Sottrup-Jensen та ін. з модифікаціями [577], основні етапи якої наведено на рисунку 2.6. Сутність модифікації методу полягала у тому, що спочатку виконувалося розділення продуктів гідролізу плазміногену

на колонці з сефадексом G-75, а потім – очистка отриманих фрагментів на афінному сорбенті Lys-сефарозі. Оскільки фрагменти, що зв'язуються з Lys-сефарозою – К1-3 і К4, виходять у різних піках елюції за гель-фільтрації, то завдяки попередньому їх розділенню можна досягти більш високого ступеня очистки К1-3 в ході афінної хроматографії.

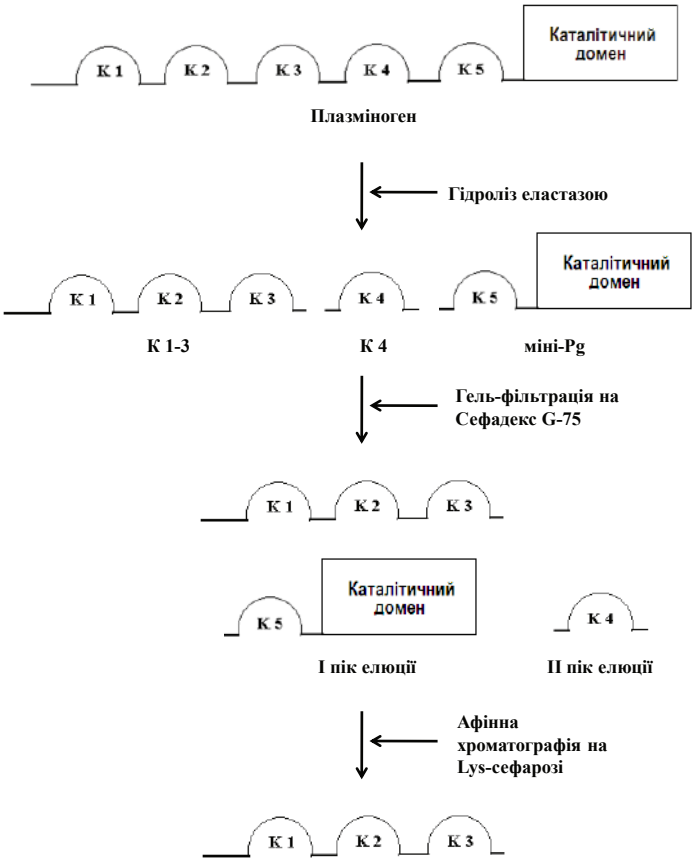

Рисунок 2.6 – Схема отримання фрагментів плазміногену людини за допомогою обмеженого протеолізу панкреатичною еластазою.

Лімітований протеоліз плазміногену проводили з використанням панкреатичної еластази свині. Плазміноген інкубували з еластазою у масовому співвідношенні 50:1 у 50 мМ трис-HCl-буфері (pH 8,5), що містив 0,13 М NaCl (TBS), протягом 5 год. при 37 ^{o}C.

Для підбору умов проведення процесу безпосередньо перед препаративним одержанням фрагментів проводили аналітичний гідроліз з невеликими кількостями плазміногену і еластази у тому ж співвідношенні.

Інтенсивність та глибину гідролізу при цьому контролювали за допомогою гель-електрофорезу. Типова електрофореграма продуктів гідролізу плазміногену панкреатичною еластазою представлена на рисунку 2.7. Результати електрофорезу продемонстрували, що головними продуктами гідролізу зимогену еластазою є наступні крингл-вмісні фрагменти: К1-3, К4 та Val442-плазміноген (мініплазміноген). Спираючись на результати аналітичного гідролізу плазміногену, у подальших дослідах для напрацювання препаративних кількостей фрагментів цього протеїну протеоліз проводили протягом 5 годин.

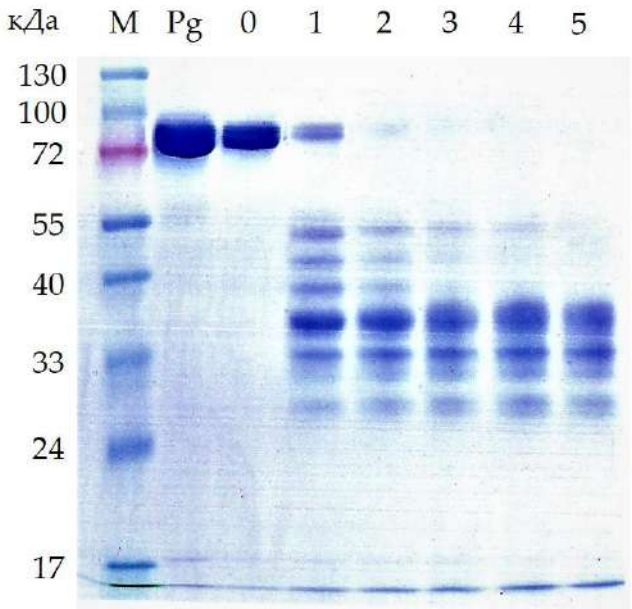

Рисунок 2.7 – Електрофореграма (10 % PAAG) плазминогену та продуктів його обмеженого протеолізу панкреатичною еластазою: М – маркери молекулярної маси, Pg – плазміноген, 0-5 – гідролізати плазміногену, отримані в ході еластолізу за різні проміжки часу (0-5 годин).

Наприкінці терміну гідролізу до суміші додавали інгібітор p-NPGB до кінцевої концентрації 5×10^{-4} М. Розділення продуктів гідролізу проводили методом гель-фільтрації на сефадексі G-75. Елюцію протеїнів проводили з використанням розчину TBS (pH 8,5), швидкість елюції складала 30 мл/год. Для побудови графіку профілю елюції, наведеного на рисунку 2.8, концентрацію протеїну в елюаті оцінювали спектрофотометрично на приладі СФ-2000 при λ =

280 нм. Елюат, що містив фрагменти плазміногену К1-3 і Val442-плазміноген (або мініплазміноген), висолювали сульфатом амонію при t +4 ºС протягом 12-16 год. Далі осад відділяли від рідкої фази центрифугуванням при 10 тис. об./хв. протягом 45 хв. Отриманий осад розчиняли у трис-лізиновому буфері, pH 9,0, наступного складу: 50 мМ трис-HCl, 20 мМ лізин, 0,13 М NaCl, 1 мМ ЕДТК.

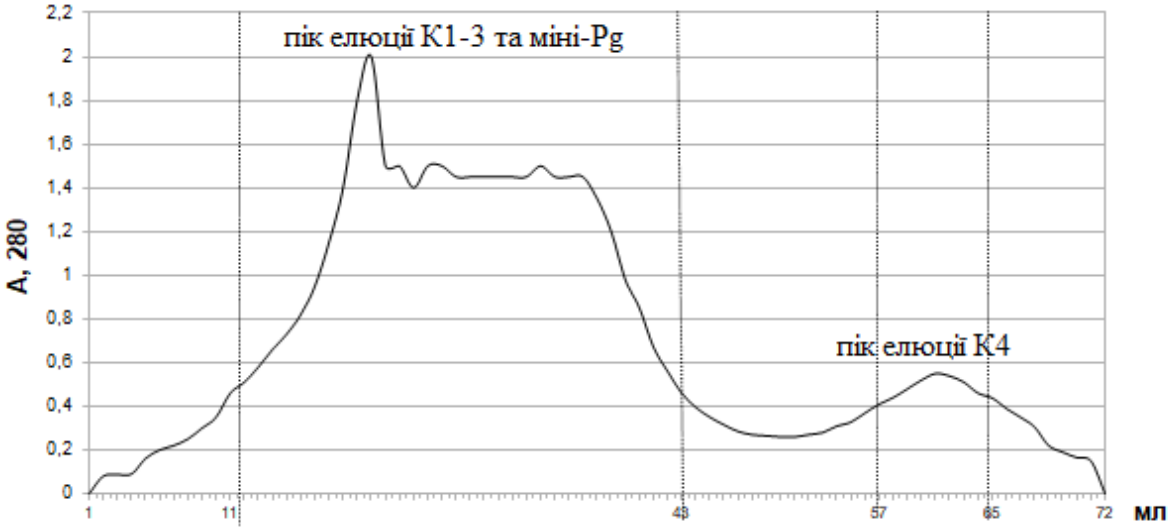

Рисунок 2.8 – Профіль елюції продуктів еластолізу плазміногену в ході гель-проникної хроматографії на сефадексі G-75.

Подальше очищення фрагментів плазміногену базувалося на різній афінності функціональних груп у складі кринглових доменів по відношенню до зв'язування з лізином. Для розділення К1-3 і міні-плазміногену, що мають приблизно однакову молекулярну масу і виходять одним піком на сефадексі G-75, їхню суміш, розчинену в ТЛБ, наносили на колонку з Lys-сефарозою, врівноважену 50 мМ Na-фосфатним буфером (pH 7,4), що містив 0,13 М NaCl (Na-PBS). Міні-плазміноген виходив у вільному об'ємі (промивній фракції), оскільки К5 не зв'язується з Lys-сефарозою. Елюцію К1-3 з носія проводили 0,1 М розчином 6-АГК (рис. 2.9). Очищення ізольованого К4, що вийшов окремим піком на сефадексі G-75, проводили аналогічним чином із застосуванням хроматографії на Lys-сефарозі (рис. 2.10). Після очищення на афінному

сорбенті препарати фрагментів плазміногену діалізували проти TBS і концентрували за допомогою центрифужних фільтрів Amicon®Ultra (Millipore, Ірландія) з діаметром пор 30 кДа (для К1-3 та міні-Pg) і 10 кДа (для К4).

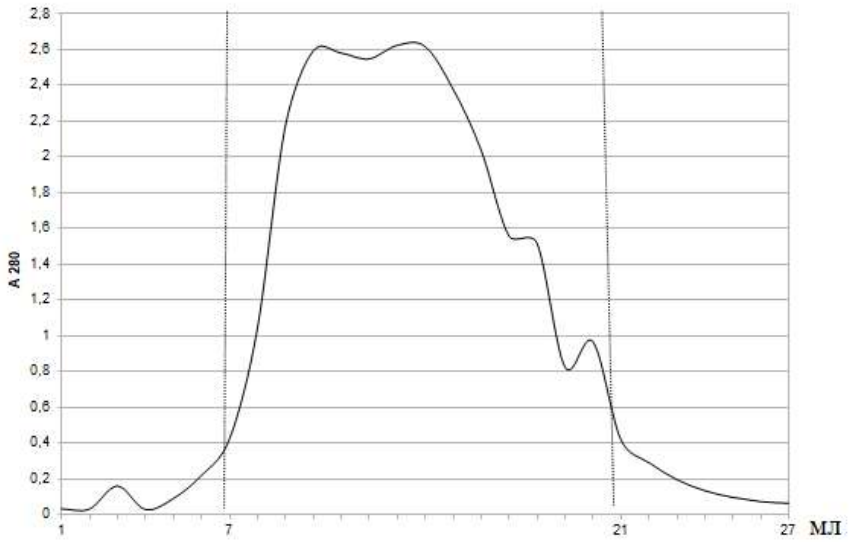

Рисунок 2.9 – Профіль елюції фрагменту плазміногену К1-3 з афінного сорбенту Lys-сефарози 4В 0,1 М 6-аміногексановою кислотою.

Масовий вихід продуктів обмеженого протеолізу плазміногену склав 33% для мініплазміногену, 28% – К1-3 та 6,5% – К4 від початкової кількості плазміногену, взятого для гідролізу.

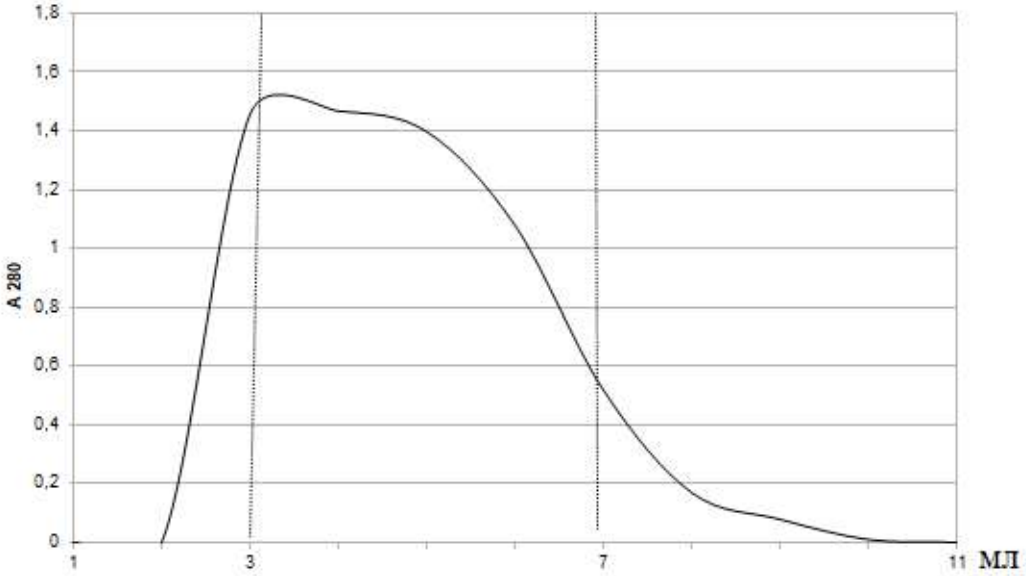

Рис. 2.10 – Профіль елюції фрагменту плазміногену К4 з афінного сорбенту Lys-сефарози 4В 0,1 М 6-аміногексановою кислотою.

Гомогенність препаратів фрагментів плазміногену перевіряли електрофоретично (рис. 2.11). Слід зазначити, що очищений на Lys-сефарозі К1-3 виявлявся у вигляді декількох поліпептидних зон у діапазоні Mm 36-26 кДа. Дане спостереження пояснюється рівновірогідним гідролізом еластазою пептидних зв'язків Val338-Ser339 та Val354-Val355 між К3 та К4, а також наявністю різних глікозильованих ізоформ фрагменту, оскільки у плазмі людини приблизно у рівних кількостях присутні дві глікоформи плазміногену: тип I (глікозильований як за Asn289, так і за Thr346) та тип II (глікозильований лише за Thr346).

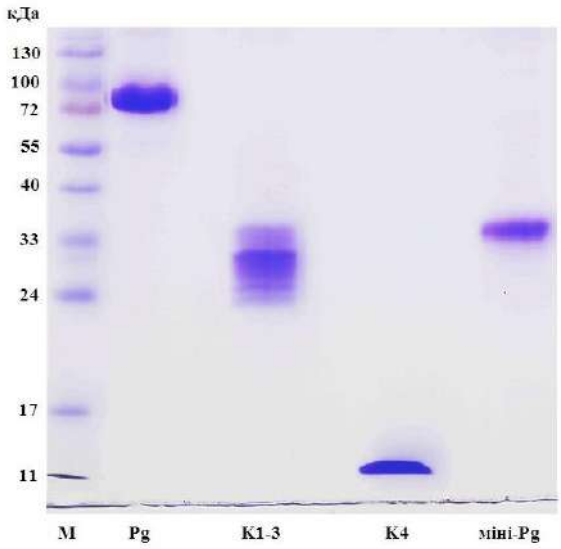

Рисунок 2.11 – Електрофореграма очищених фрагментів плазміногену.

Одержані препарати чистих протеїнів зберігали при -20 ^{o}C і використовували у подальшому для імунохімічних досліджень. Фрагмент К1-3 застосовували як антиген для імунізації кролів задля отримання антитіл, а також для синтезу імуноафінного сорбенту.

2.4.5. Синтез імуноафінного сорбенту К1-3-сефарози

На підготовчому етапі 1 г сухого порошку BrCN-сефарози перемішували у 1 мМ розчині HCl протягом 15 хв. і промивали на скляному фільтрі тим

самим розчином (загальний об'єм – 200 мл на 1 г порошку). Набухання гелю відбувалося у невеликому об'ємі HCl (10-15 мл), при цьому 1 г сухого препарату BrCN-сефарози при повному набуханні дає 3,5 мл гелю. Після набухання у кислоті гель промивали буфером для зв'язування (0,1 М $NaHCO_3$ з 0,5 М NaCl, pH 8,3) в об'ємі 50 мл на 1 г сухого препарату.

Підготовку протеїну К1-3 для його імобілізації проводили у буфері для зв'язування. На колонку з BrCN-сефарозою, що набухла, наносили розчин К1-3 у розрахунку 5-10 мг на 1 мл гелю. Зв'язування протеїну з носієм проводили протягом 2-3 год. при кімнатній температурі або 10-12 год. за 4 ^{o}C при обережному перемішуванні. Після імобілізації сорбент віджимали на скляному фільтрі й відмивали 0,1 М $NaHCO_3$ з 0,5 М NaCl, pH 8,3 (загальний об'єм 100 мл). Вільні групи на BrCN-сефарозі, що не зв'язали протеїн, блокували 1 М етаноламіном, pH 8,0, протягом 10-12 год. за 4 ^{o}C при постійному перемішуванні. Залишки етаноламіну відмивали п'ять разів 0,1 М $NaHCO_3$, pH 8,3, бідистильованою водою та 0,1 М натрій-ацетатним буфером (pH 4,0). Останню промивку суспензії сорбенту проводили розчином TBS (0,05 М трис-буфер, pH 7,4, з 0,15 М NaCl). Об'єм афінного сорбенту К1-3-сефароза становив 12 см^3. Визначали відсоток протеїну, що зв'язався з BrCN-сефарозою. Для цього відбирали 0,3 мл суспензії й проводили гідроліз у 0,9 мл 1 М NaOH. Концентрацію протеїну вимірювали на спектрофотометрі при λ = 280 та 320 нм. Для синтезованого афінного сорбенту ступінь зв'язування складала 90%. У подальшому афінний сорбент К1-3-сефароза використовувався для виділення пулу специфічних IgG з імунної сироватки.

2.5. Продукція та характеристика антитіл

У роботі було отримано препарати поліклональних антитіл проти К1-3-фрагменту плазміногену людини (ангіостатину), плазміногену щура та сироваткового альбуміну людини. Очищені антитіла або фракції IgG, виділені з імунних сироваток, використовувалися в імунохімічному аналізі

(імуноблотинг, імуноцитохімія, імуногістохімія) для детекції відповідних протеїнів у біологічному матеріалі.

2.5.1. Отримання антитіл проти фрагменту плазміногену К1-3 (ангіостатину)

Одержання поліклональних антитіл проти фрагменту плазміногену К1-3 проводили за схемою, наведеною на рисунку 2.12. Для імунізації використовували двох дорослих кролів масою 3,5 – 4 кг, яких утримували у віварії Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України на стандартному раціоні.

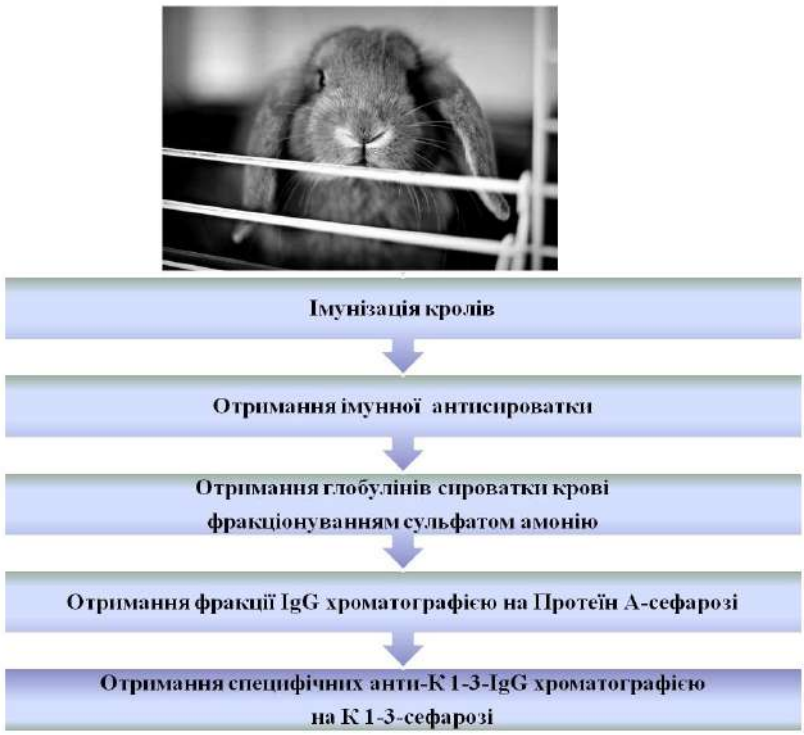

Рисунок 2.12 – Схема продукції поліклональних антитіл проти фрагменту плазміногену К1-3.

Антиген у кількості 0,75 мг, який містився у 0,75 мл TBS, pH 7,4, емульгували з рівним об’ємом повного ад’юванта Фройнда. Отриману емульсію вводили у шість точок уздовж парахребетної області тварин. Повторну імунізацію (І буст) проводили через два тижні за тих самих умов, але

з використанням неповного ад'юванта Фройнда. Забір крові (блідінг) проводили на 12-у добу після попереднього введення антигену. Кров з вушної вени в об'ємі, що не перевищував 40 мл з кожної тварини, збирали до скляних центрифужних пробірок та давали утворитися згустку, утримуючи пробірки при 4 ^{o}C протягом 12 год. Сироватку відділяли від згустку і центрифугували для видалення формених елементів при 1000 g протягом 15 хв.

У подальшому глобулінову фракцію імунної сироватки отримували висолюванням протеїнів у 50 %-му за насиченням розчині сульфату амонію при 4 ^{o}C протягом 16 год. Осаджені протеїни відділяли центрифугуванням за 3000 g при 4 ^{o}C протягом 30 хв. Супернатант зливали, осад розчиняли у TBS, pH 7,4. Для видалення залишків сульфату амонію розчин глобулінів діалізували проти тієї ж буферної системи за 4 ^{o}C при постійному перемішуванні (200 мл по 30 хв. × 5 разів). Після діалізу до розчину глобулінів додавали інгібітор протеаз p-NPGB до кінцевої концентрації 10^{-5} M

Фракцію IgG отримували за допомогою афінної хроматографії на протеїн А-сефарозі. Об'єм колонки становив 2 см^3, колонку врівноважували 10-кратним об'ємом TBS, pH 7,4. Розчинений осад глобулінової фракції наносили на колонку у співвідношенні 0,8-1,0 мл/мл носія і промивали TBS (pH 7,4) для видалення протеїнів, що не зв'язалися. Елюцію IgG, що специфічно зв'язалися з протеїном А, імобілізованому на носії, проводили з використанням 0,1 M гліцинового буферу, pH 2,8. Фракції збирали по 1 мл й відразу нейтралізували 1 M розчином трису-HCl, pH 8,5. Концентрацію протеїну у фракціях контролювали спектрофотометрично при λ = 280 нм. Фракції, що містили IgG, об'єднували й діалізували проти TBS, pH 7,4 (200 мл по 30 хв. × 3 рази) при 4 ^{o}C. Концентрування препарату IgG перед нанесенням на колонку з імуноафінним сорбентом проводили з використанням центрифужних фільтрів Amicon®Ultra M_m 30 кДа. Далі зконцентрований таким чином розчин IgG наносили на колонку з К1-3-сефарозою у співвідношенні 1,2-1,4 мл на 1 мл гелю і промивали PBS, pH 7,2, для видалення протеїну, що не зв'язався. Елюцію специфічних IgG, що зв'язалися з імуносорбентом, проводили 0,2 M

гліциновим буфером, pH 2,8. Фракції збирали по 1 мл й відразу нейтралізували 1 М розчином трису, pH 8,5. Концентрацію протеїну у фракціях контролювали спектрофотометрично при λ = 280 нм. Фракції, що містили пул IgG, який специфічно зв'язався з К1-3-сефарозою, об'єднували й діалізували проти TBS, pH 7,4 (200 мл по 30 хв. × 5 разів) при 4 ºС. Для зменшення об'єму розчину, в якому знаходилися антитіла, перед їх зберіганням проводили концентрування з використанням центрифужних фільтрів Amicon®Ultra M_m 50 кДа. Чистоту препаратів антитіл перевіряли за допомогою гель-електрофорезу у 10 % PAAG, результати якого наведено на рисунку 2.13.

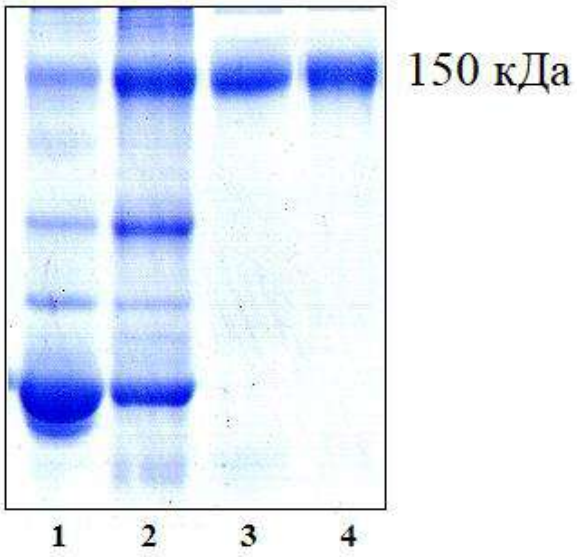

Рисунок 2.13 – Електрофореграма протеїнів імунної сироватки (1), глобулінової фракції (2), загальної фракції IgG (3) та препарату IgG, очищених на афінному сорбенті К1-3-сефароза (4); поліпептидна зона M_m 150 кДа відповідає молекулам IgG.

За допомогою денситометричного аналізу електрофореграм встановлено, що ступінь чистоти отриманих на афінному сорбенті К1-3-сефарозі поліпептидів IgG складає приблизно 99,5%. Питомий вихід пулу специфічних анти-К1-3-IgG склав 2,8 % від кількості загальної фракції IgG, що становило 0,45 % від вмісту загального протеїну у сироватці. Антитіла зберігали у суміші з гліцерином (1:1) при -20 ^{0}С.

2.5.2. Імунохімічна характеристика антитіл проти К1-3

За допомогою твердофазного ІЕА встановлювали наявність і титр антитіл у сироватці крові імунізованих кролів, а також оцінювали перехресну взаємодію очищених антитіл з гомологічними протеїнами (молекулами плазміногену та їх крингл-вмісними фрагментами). Для цього до лунок 96-луночного мікропланшету Multi-Sorp вносили Glu-плазміноген, Lys-плазміноген, К1-3, К4 та міні-плазміноген, розчинені у Na-PBS, у кількості 1 мкг в об'ємі 100 мкл на лунку, або 3%-й розчин BSA у тому ж об'ємі як контроль неспецифічного зв'язування досліджуваних антитіл. Кожний антиген наносився у двох паралелях, аналіз проводили у трьох повторах. Сорбція протеїнів на поверхні лунок тривала 14-16 год. при 4 ^{o}C. Після імобілізації антигени, що не зв'язалися, видаляли, промиваючи плашку 5 разів дистильованою водою і 5 разів Na-PBS, pH 7,4. Далі до лунок вносили 3%-й розчин BSA в об'ємі 200 мкл/лунка та інкубували протягом 1 год. при 37 ^{o}C для блокування неспецифічного зв'язування антитіл. Імунну сироватку у серії розведень (1:100 – 1:200000) або очищені анти-К1-3 антитіла у кількості від 10 до 0,1 мкг/мл вносили в об'ємі 100 мкл/лунка. Для контролю специфічності імунної відповіді паралельно використовували сироватку неімунізованого кроля. Інкубацію з первинними антитілами здійснювали при 37 ^{o}C протягом 1 год. Видалення антитіл, що не зв'язалися, проводили 10-разовим промиванням Na-PBS, pH 7,4. Вторинні антитіла проти IgG кроля, кон'юговані з лужною фосфатазою, розводили у Na-PBS, pH 7,4, що містив 0,025% Tween-20 (Na-PBST) у співвідношенні 1:10000, вносили до лунок мікропланшета в об'ємі 100 мкл та інкубували при 37 ^{o}C протягом 1 год. Для контролю неспецифічного зв'язування вторинних антитіл, анти-IgG кроля, мічені лужною фосфатазою, вносили відразу до лунок з антигенами без попереднього додавання антисироватки або антитіл проти К1-3. Відмивку від вторинних антитіл, що не зв'язалися, проводили у 10 змінах дистильованої води, 5 змінах Na-PBST, pH 7,4, і двох змінах карбонат/бікарбонатного буферу, pH 9,6 (КББ). Виявлення

комплексів антиген-антитіло проводили з використанням субстрату лужної фосфатази дінатрієвої солі пара-нітрофенілфосфату (п-НФФ). Для цього одну таблетку (5 мг) п-НФФ розчиняли у 10 мл КББ, pH 9,6, і отриманий розчин вносили до лунок в об'ємі 100 мкл. Оптичну густину вимірювали при λ = 405 і 492 нм на рідері Multiscan EX з використанням відповідного програмного забезпечення через 20 хв. після внесення розчину субстрату.

Результати ІЕА сироватки кролів, імунізованих К1-3, представлено на рисунку 2.14. Отримані дані свідчать про наявність імунної відповіді на повторне введення антигену і присутність антитіл, які специфічно реагують як з нативною молекулою плазміногену, так і його фрагментами, у такому порядку: Glu-Pg > Lys-Pg > К1-3 > міні-Pg > К4. Зв'язування неімунної сироватки кроля, що використовувалася для контролю специфічності імунної відповіді, з даними антигенами не відбувалося.

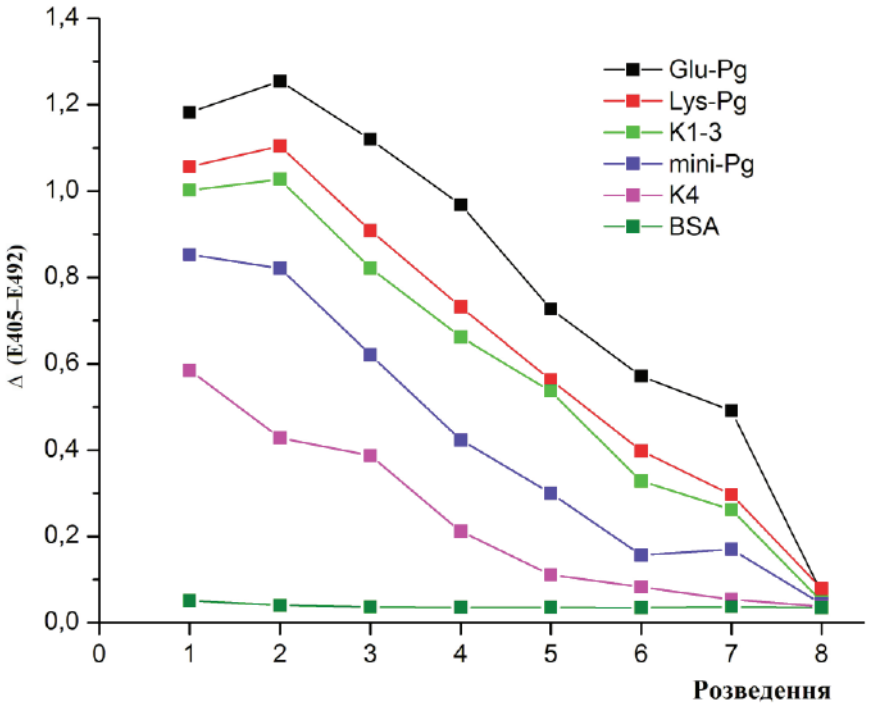

Рис. 2.14 – Взаємодія антисироватки кролів, імунізованих К1-3, з плазміногеном та його фрагментами (розведення: 1 – 1:100; 2 – 1:1000; 3 – 1:5000; 4 – 1:10000; 5 – 1:50000; 6 – 1:100000; 7 – 1:200000; 8 – без антисироватки).

Сироваткові антитіла за максимального розведення, обраного у даному експерименті (1:200000), реагують з усіма антигенами, за виключенням К4. У діапазоні розведень від 1:1000 до максимального значення спостерігається лінійна залежність між ступенем розведення сироватки та імунореактивністю. При внесенні антисироватки у найменшому розведенні (1:100) значення оптичної густини лунок з Glu-, Lys-плазміногеном та К1-3 є нижчими за такі для більшого розведення (1:1000), що свідчить про присутність надлишку сироваткових протеїнів у реакційній суміші й маскування місць взаємодії вторинних антитіл з IgG, які зв'язалися з молекулами плазміногену та його фрагментами, або наявністю в антисироватці антиідіотипічних антитіл.

Як видно з рисунку 2.15, у залежності від їхньої кількості, очищені антитіла зберігають аналогічну тенденцію до перехресної взаємодії з вихідними молекулами плазміногену та їх фрагментами, демонструючи найбільшу афінність до Glu-плазміногену і найменшу – до фрагменту К4.

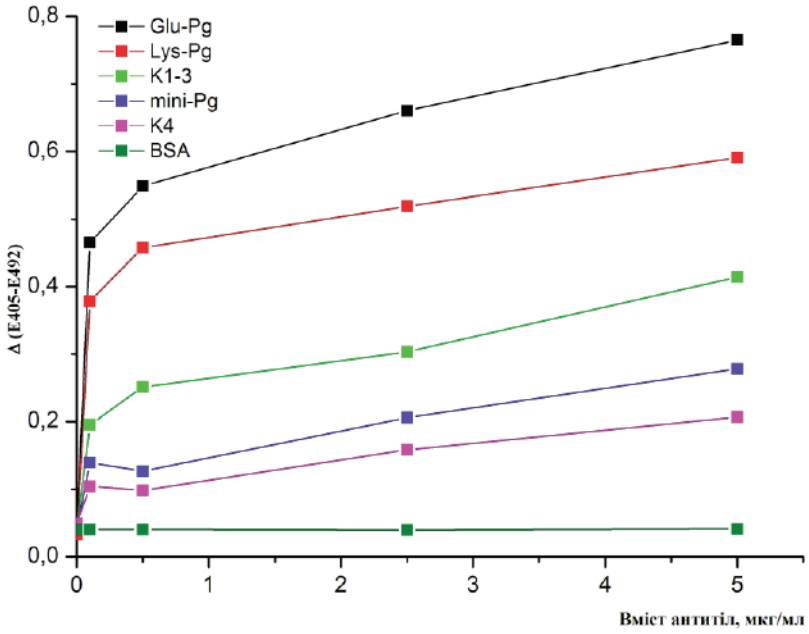

Рисунок 2.15 – Взаємодія очищених на К1-3-сефарозі антитіл (0,1-5 мкг/мл) з плазміногеном та його фрагментами.

Слід зауважити, що очищеним антитілам притаманна дещо менша афінність до антигену К1-3, ніж відповідним специфічним IgG у складі імунної

антисироватки. Цей факт можна пояснити отриманням пулу антитіл на колонці з К1-3-сефарозою, які сорбувалися на імобілізованому антигені, що міг зазнати конформаційних змін внаслідок ковалентної імобілізації. Дані, отримані за допомогою ІЕА, демонструють, що при збільшенні концентрації антитіл криві відхиляються від прямої лінії та виходять на плато, оскільки має місце ефект насичення ділянок зв'язування, що вказує на перевищення стехіометричного співвідношення «антиген/антитіло».

Детально проаналізовано зв'язування антитіл за їх максимальної (10 мкг/мл) та мінімальної кількості (0,5 мкг/мл), при якій вже не спостерігається статистично вірогідної різниці у взаємодії їх з одним із досліджуваних фрагментів (у даному випадку – К4) у порівнянні з BSA, взятим як імунологічно нейтральний контроль (рис. 2.16).

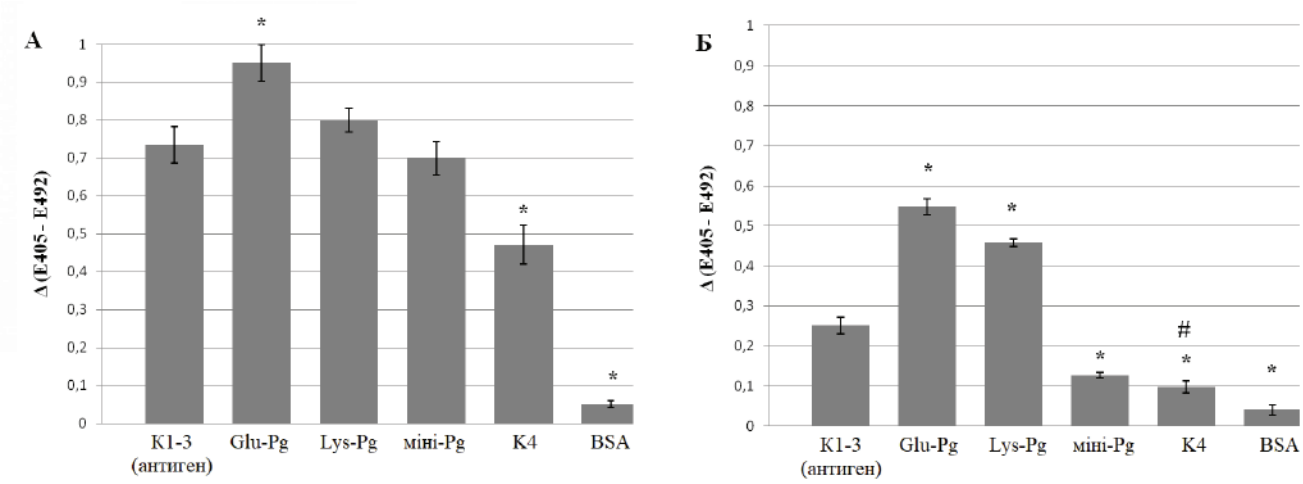

Рисунок 2.16 – Взаємодія очищених антитіл у кількості 10 (А) та 0,5 мкг/мл (Б) з плазміногеном та його фрагментами: * - вірогідна різниця по відношенню до К1-3 (P < 0,05); # - відсутність вірогідної різниці по відношенню до BSA (P > 0,05).

Слід зауважити, що зв'язування антитіл з антигеном (К1-3), міні-плазміногеном та К4 зменшується при зниженні кількості антитіл у реакційному середовищі відносно даного показника для Glu- та Lys-

плазміногеном. Так, за кількості антитіл, що складає 10 мкг/мл (рис. 2.16, А), зв'язування анти-К1-3-IgG з антигеном у 1,3 ($P < 0,05$) та 1,1 рази нижче, ніж з Glu- та Lys-плазміногеном відповідно. З іншого боку, взаємодія К1-3 з отриманими антитілами знаходиться на одному рівні з даним показником для мініплазміногену та перевищує його для К4 у 1,6 рази ($P < 0,05$). Найменш афінним з досліджуваних антигенів, що містять гомологічні епітопи, виявився К4, який при кількості антитіл 0,5 мкг/мл, проявив реактивність у 2,2 ($P < 0,05$) рази нижчу у порівнянні з цим показником для К1-3, в той час, як мініплазміноген зв'язувався з даними антитілами у 1,7 ($P < 0,05$) рази менш ефективно, ніж власно антиген (рис. 2.16, Б). Встановлено, що взаємодія даних антитіл за їх вмісту 0,5 мкг/мл з Glu- і Lys-плазміногеном відносно даного показника для К1-3 зростає у 2,6 ($P < 0,05$) та 2,1 ($P < 0,05$) рази відповідно.

Узагальнюючи опис характеристик отриманих антитіл, слід підкреслити, що реактивність анти-К1-3-IgG по відношенню до обох форм плазміногену перевищувала таку щодо усіх досліджуваних фрагментів, у тому числі до власно антигену. Це зумовлено наявністю у складі вихідної молекули нативного плазміногену ділянок (К4 і К5), структурно та імунологічно гомологічних таким у фрагменті К1-3, які роблять адитивний внесок у загальну імунореактивність молекули плазміногену. Відомо, що Lys-формі плазміногену притаманна більш розгорнута конформація, ніж Glu-формі, з потенційно більш відкритими і доступними для взаємодії з антитілами антигенними детермінантами. Отже, можна було припустити, що специфічні антитіла у сироватці імунізованих тварин, будуть взаємодіяти з Lys-плазміногеном з більшою афінністю у порівнянні з нативним зимогеном. Проте, достатньо несподівано, результати ІЕА продемонстрували, що антитіла сироватки кролів, а також очищені на імуноафінному сорбенті антитіла, краще розпізнавали саме Glu-форму. Дане спостереження можна пояснити особливостями просторового розташування саме тих антигенних детермінант у складі ізольованого К1-3, які розпізнаються імунокомпетентними клітинами та є конформаційно й

імунологічно більш гомологічними ділянці К1-3 у складі молекули Glu-, ніж Lys-плазміногену.

Оскільки антитіла, виділені із сироваток крові кролів, імунізованих фрагментом К1-3, перехресно взаємодіють як з гомологічними крингл-вмісними фрагментами плазміногену, так і з самими вихідними молекулами зимогену, то ця обставина унеможливлює кількісний аналіз окремих протеолітичних похідних плазміногену (у тому числі ангіостатинів) у біологічному матеріалі за допомогою ІЕА. Тому практично єдиним доступним імунохімічним методом, який дозволяє виконувати аналіз якісного складу плазміногену та його фрагментів, а також проводити напівкількісне визначення ангіостатинів у зразках, у яких одночасно присутній плазміноген, є імуноблотинг. Результат імуноблот-аналізу протеїнів, які використовували в ІЕА, наведено на рисунку 2.17.

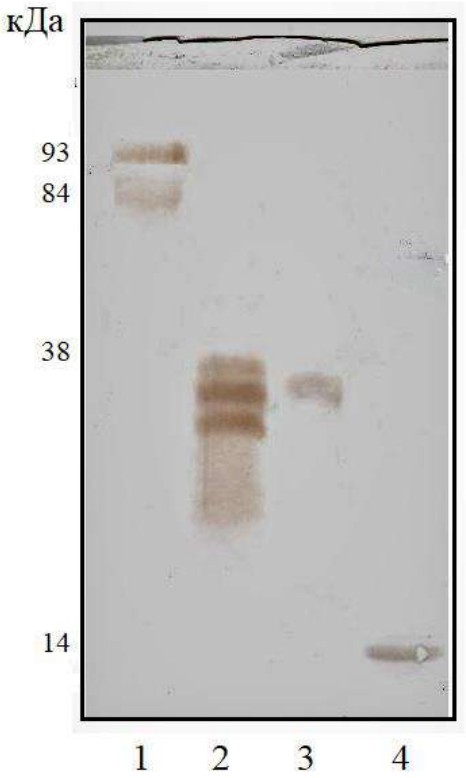

Рисунок 2.17 – Імуноблотинг плазміногену та його фрагментів з використанням антитіл проти К1-3 (попереднє електрофоретичне розділення у градієнті 7-18 % PAAG): 1 – суміш Glu- та Lys-форм плазміногену; 2 – К1-3; 3 – міні-плазміноген; 4 – К4.

Результати імунохімічної детекції плазміногену та його фрагментів, отримані за допомогою імуноблотингу, збігаються з результатами електрофоретичного розділення очищених фрагментів плазміногену, представлених на електрофореграмі, наведеної на рисунку 2.11. Отже, отримані та детально охарактеризовані антитіла проти фрагменту К1-3 використовували у роботі для імунохімічного аналізу плазміногену/ангіостатинів у зразках біологічного матеріалу здорових донорів та пацієнтів.

Однак, через певну імунологічну видоспецифічність молекули плазміногену антитіла до фрагменту плазміногену людини демонстрували низьку афінність до відповідних протеїнів тваринного походження, що зумовило необхідність отримання антитіл проти цілої молекули плазміногену щура для досліджень на експериментальних моделях.

2.5.3. Отримання антитіл проти плазміногену щура

Ділянку гелю, що містила електрофоретично розділені молекули плазміногену, які було отримано за допомогою афінної хроматографії плазми щурів на Lys-сефарозі 4B, вирізали (п. *2.4.3.*, рис. 2.5), подрібнювали, поступово додаючи фізіологічний розчин (0,9 % NaCl) до об'єму 1 мл. Отриману суспензію вводили підшкірно кролям, як описано нами раніше [619]. Кількість плазміногену, що одноразово вводився тваринам, складала 30 мкг на тварину. Після повторного бусту проводили блідінг та виділяли фракцію IgG, як описано вище. Застосована методика імунізації з використанням імобілізованого антигену дозволяє вводити електрофоретично чистий антиген, що міститься у суміші з іншими протеїнами, без його попереднього очищення, що є зручним у разі наявності невеликих кількостей цільового протеїну. До переваг такого підходу також належить можливість використання порівняно низьких кількостей антигену для отримання високоімунних сироваток, оскільки PAAG одночасно слугує ад'ювантом і депо антигену, підсилюючи імунну відповідь. Зв'язування антитіл з антигенами щура різної тканинної локалізації

перевіряли за допомогою імуноблотингу, результат якого представлено на рисунку 2.18.

За допомогою імуноблотингу було показано, що антитіла, отримані в результаті імунізації кролів плазміногеном щура, зв'язуються власно з антигеном плазми крові та розпізнають фрагменти плазміногену, які співочищуються з плазміногеном на Lys-сефарозі. Важливо зауважити, що отримані антитіла в імуноблоті демонстрували також значну перехресну реактивність з гомологічними протеїнами миші (не показано).

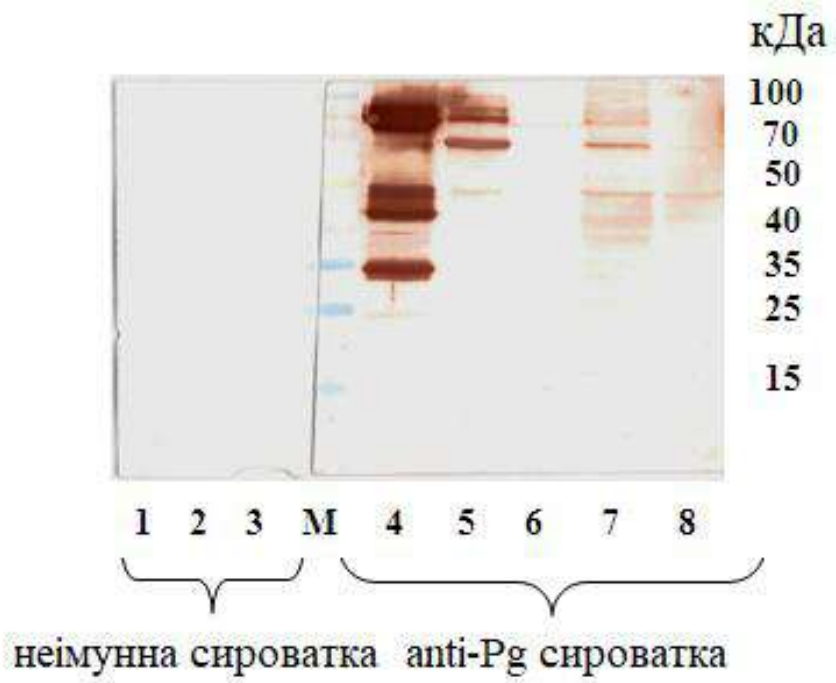

Рисунок 2.18 – Зв'язування антитіл проти плазміногену щура з антигенами різного походження: 1 та 4 - елюат плазми крові з Lys-сефарози, 2 та 5 – сироватка крові, 3 та 6 – лізат тканини печінки, 7 – лізат серцевого м'язу, 8 – лізат тканини нирки.

2.5.4. Отримання антитіл проти сироваткового альбуміну людини

Антитіла проти сироваткового альбуміну людини отримували з кролів, імунізованих комерційним препаратом HSA (> 98%, human serum albumin, Sigma-Aldrich, USA, cat. no. SRP6182). З отриманої імунної сироватки

ізолювали фракцію IgG за допомогою афінної хроматографії на протеїн А-сефарозі, як описано вище. Очищені IgG тестували на зв'язування з альбуміном сироватки крові донорів за допомогою імуноблотингу, результати якого наведено на рисунку 2.19. Отримані антитіла використовували у серії дослідів для нормалізації рівнів протеїнів-маркерів у сироватці крові пацієнтів з різними серцево-судинними захворюваннями.

Рисунок 2.19 – Імуноблотинг сироваткового альбуміну людини з використанням IgG, виділених з імунної сироватки кролів: зразки сироватки крові 28 донорів.

2.6. Визначення амідолітичної активності плазміну

Метод визначення активності плазміну в біологічних зразках заснований на здатності протеїнази специфічно розщеплювати хромогенний субстрат S-2251 (H-D-Val-Leu-Lys-pNA·2HCl. Амідолітична активність плазміну еквівалентна кількості р-нітроаніліну (р-NA), який вивільнюється в ході розщеплення хромогенного субстрату. Реакцію проводили у 50 мМ трис-HCl буфері (pH 7,4), що містив 0,15 М NaCl, при 37 ^{o}C у 96-лунковому мікропланшеті для ІЕА. До інкубаційного середовища послідовно вносили

робочий буфер (205 мкл), досліджуваний зразок (елюати плазміногену, ексудати ран, лізати клітин) (10 мкл) та субстрат (25 мкл), сумарний об'єм суміші становив 240 мкл. Поглинання р-нітроаніліну вимірювали на мікрорідері у двопроменевому режимі (405 нм – довжина робочої хвилі, 492 нм – довжина референсної хвилі) протягом 90-120 хв. через певні проміжки часу. Відлік часу починався з моменту внесення S-2251 (кінцева концентрація 0,3 мМ). Швидкість розщеплення субстрату плазміном виражали у вигляді кінетичних кривих як залежність зміни поглинання ΔA(405 – 492)nm у часі. Швидкість реакції розраховували по формулі $V = 1/t_{1/2}$, де $t_{1/2}$ – швидкість реакції, що становить ½ від максимальної.

2.7. Електрофоретичні методи

2.7.1. Гель-електрофорез у PAAG за присутності SDS

Електрофоретичне розділення протеїнів у представленому дослідженні проводили з метою контролю ступеня гідролізу плазміногену панкреатичною еластазою, оцінки чистоти препаратів отриманих фрагментів, перевірки гомогенності препаратів антитіл після їхньої очистки на імуноафінному сорбенті. Крім того, електрофорез проводили для попереднього розділення протеїнів перед їхнім переносом на нітроцелюлозну мембрану з подальшою імунодетекцією із застосуванням специфічних антитіл (імуноблот-аналіз).

Електрофорез у PAAG у присутності 0,1% SDS проводили за класичною методикою, описаною раніше [349]. У залежності від цілей аналізу електрофорез проводили у гелях з фіксованою концентрацією акриламіду (8 або 10%) або у градієнті концентрації мономеру (7-18%), який готували за допомогою перистальтичного насосу та змішувача. Для проведення електрофорезу використовували камери для вертикального гель-електрофорезу виробництва BioRad (США) і Helicon VE-10 (РФ). Зразки протеїнів для нанесення на пластину гелю готували з використанням буферу Леммлі, що мав

наступний склад: 62,5 мМ Tris-HCl, pH 6,8, 0,1% SDS, 10% β-меркаптоетанол, 10% гліцерол 0,001% бромфеноловий синій. Зразки, у яких проводили детекцію плазміноген/плазміну або ангіостатинів, готували із використанням невідновлюючого буферу, що не містив β-меркаптоетанол. Зразки прогрівали у хітері або на водяній бані до 95 ºС протягом 5 хв. для солюбілізації та денатурації протеїнів.

Для полімеризації акриламіду при формуванні гелів для концентрування (pH 6,8) та розділення зразків (pH 8,8) використовували ТЕМЕД та 10%-й розчин персульфату амонію. Концентрація протеїнів не перевищувала 100 мкг на доріжку. Буферний розчин, який містив 25 мМ трис-HCl (pH 8,3), 0,192 М гліцин та 0,1% SDS, використовували як катодний електродний буфер. Концентрування зразків проводили при напрузі 30-35 В (15-18 мА), розділення – 45-50 В (30-35 мА).

Для візуалізації поліпептидних зон після проведення електрофорезу гелі забарвлювали у 0,1% розчині Coomassi R-250 або його аналогу Blau-R, розчинених у суміші 25 % етанолу, 15% оцтової кислоти та 5% формальдегіду. Знебарвлення проводили у розчині етанолу та оцтової кислоти. Молекулярну масу протеїнів у зразках визначали, порівнюючи їхню міграцію з розташуванням маркерів Pre-stained Page Ruler у діапазоні 10-230 кДа. Гелі висушували між двома целофановими плівками і сканували для отримання цифрового зображення. Денситометричний аналіз треків проводили з використанням програми TotalLab TL120 (Nonlinear Inc, США). Гелі, які у подальшому застосовували для проведення імуноблот-аналізу, після закінчення електрофорезу обережно виймали з камери та промивали у буфері для переносу, що містив 20% метанолу.

2.7.2. Електрофорез за низьких значень pH

Для ідентифікації Glu- та Lys-форм плазміногену застосовували електрофорез за низьких значень pH, який виконували згідно з методикою,

запропонованої Panium і Chalkey [472], в основі якої лежить розділення протеїнів за різницею заряду. Зразки для електрофорезу готували наступним чином: до розчину протеїну додавали рівний об'єм розчину 10 М сечовини, що містив 1,8 М оцтову кислоту, та розчин барвнику піроніну. Електрофоретичне розділення проводили в 11,5% PAAG, що містив 6,25 М сечовину та оцтову кислоту (pH 3,2). Для формування 11,5% гелю змішували три заздалегідь приготованих розчини (A, B та C) у співвідношенні A:B:C – 3:3:10. Розчин «A»: 60% акриламід, розчин «B»: 43,2 % оцтова кислота, 4 % ТЕМЕД у дистильованій воді (0,864 мл льодяної оцтової кислоти розчиняли у 1,06 мл дистильованої води та додавали 80 мкл ТЕМЕД), розчин «C»: 0,2% персульфат амонію у 10 М сечовині (20 мг персульфату амонію розчиняли у 9,98 мл 10 М сечовини). Як електродний розчин використовували 0,9 М оцтову кислоту. Суміш 40% ізопропанолу та 10% оцтової кислоти використовували для фіксування гелів. Для забарвлення протеїнів готували 0,015% розчин Coomassi R-250 у 50% ізопропанолі та 10% оцтовій кислоті. Для відмивки гелів використовували 7% розчин оцтової кислоти.

2.7.3. Ензим-форез (желатинова зимографія)

Желатинова зимографія як різновид ензим-форезу використовувалася у роботі для детекції активних колагенолітичних ензимів (MMP) у зразках ранової поверхні ран шкіри, ексудатів хронічних та гострих ран, а також сироватці крові пацієнтів з ССЗ, за методикою, запропонованою раніше [573] з мінорними модифікаціями. Зразки для нанесення готували аналогічним чином, як описано у п. *2.7.1*, використовуючи для цього невідновлюючий буфер Леммлі. Безпосередньо перед нанесенням зразки нагрівали при 37 ^{o}C протягом 5 хв. Електрофоретичне розділення протеїнів в ході зимографії проводили у пластині сополімеру 8 % PAAG та розчинного желатину (3 мг/мл) у присутності 0,1% SDS за умов, описаних вище. Концентрація протеїну у залежності від походження зразків становила 25-100 мкг на лунку. Після

закінчення електрофорезу гель двічі відмивали в охолодженому 2,5% розчині Triton X-100 для видалення SDS та ренатурації протеїнів, а потім – у п'яти змінах холодної бідистильованої води. Для розвитку колагенолітичної активності проводили інкубацію гелю при 37 ^{o}C протягом 16 год. у розчині наступного складу: 0,05 мМ трис-HCl (pH 7,6), 0,15 M NaCl, 0,01M $CaCl_2$, 0,05 M $ZnCl_2$, 0,05% Tween-20 та 0,02% NaN_3. В ході термостатування желатинази, що знаходяться у гелі, розщеплювали субстрат. Далі гелі забарвлювали у розчині барвнику Coomassie Brilliant Blue R-250, розчиненого у водному розчині 10% оцтової кислоти та 30% етанолу. Знебарвлення гелів проводили у розчині, що не містив барвника. Присутність активних ММР, їхніх комплексів та активованих проензимів (pro-ММР) визначали за наявністю світлих смуг на темнозабарвленому тлі, при цьому інтенсивність та площа смуг вважалися пропорційними активності ензимів. Молекулярну масу ММР визначали за допомогою паралельно розділених стандартних маркерів молекулярної ваги. Денситометричний аналіз зимограм проводили з використанням програми TotalLab TL120 (Nonlinear Inc, США).

2.8. Імунохімічні методи

2.8.1. Імуноензимний аналіз (ІЕА)

ІАЕ застосовували для характеристики поліклональних антитіл проти фрагменту К1-3 плазміногену людини, як детально описано у п. *2.5.2*.

2.8.2. Імуноблотинг

Метод імуноблот-аналізу використовувався для перевірки імунної відповіді імунізованих тварин, вивчення перехресної реактивності отриманих антитіл, а також визначення рівнів протеїнів-маркерів у біологічних зразках різного походження. Імуноблотинг проводили за методикою Towbin та ін. [608]

з мінорними модифікаціями. Після електрофоретичного розділення протеїни з гелю переносили на нітроцелюлозну або PVDF мембрану шляхом електроблоту у буферному розчині, що містив 0,025 М Tris-HCl, 0,192 М гліцин та 25% метанол. Напруга при переносі складала 35-45 В при силі струму 200-230 мА, тривалість переносу – 90 хв.

Після переносу мембрани блокували у 5% розчині знежиреного сухого молока у забуференому фізіологічному розчині (PBS), що містив 0,05% Triton X-100 (PBST) протягом 90 хв. при 37 ^{o}C, після чого їх інкубували з відповідними первинними антитілами, взятими у розведеннях згідно з рекомендаціями виробника або підібраними експериментально, протягом 16 год. при 4 ^{o}C. Антитіла проти K1-3 використовували у кількості 10 мкг/мл робочого розчину. Мембрани відмивали 6 разів по 5 хв. PBST для видалення неспецифічно зв'язаних антитіл та інкубували з відповідними вторинними антитілами, кон'югованими з пероксидазою хрону, 120 хв. за 37 ^{o}C. Усі антитіла розводили у 5% розчині протеїнів молока або 3 % розчині BSA у PBST. Після інкубації мембрану промивали PBST у режимі, зазначеному вище. Імунореактивні зони візуалізували за допомогою методу підсиленої хемілюмінесценції (ECL), використовуючи 0,25 М розчин люмінолу у ДМСО, 0,09 М розчин кумарової кислоти у ДМСО, 0,1 М трис-HCl (pH 8,5) та 0,0035% H_2O_2, авторадіографією на рентгенівських плівках, як описано раніше [28]. У залежності від інтенсивності сигналу хемілюмінісценції час експозиції мембрани на плівці становив від 1 с. до 10 хв. (у випадку детекції мінорних протеїнів системи клітинного сигналювання та інших регуляторних протеїнів). Для проявлення блотів плівку обробляли комерційними розчинами проявнику та фіксажу. Альтернативним способом проявлення блотів слугував метод з використанням як субстрату та хромогену відповідно H_2O_2 (0,01%) та ДАБ (0,05%), розчинених у 0,05 М Tris-HCl (pH 7,4). Після проявлення плівки або мембрани сканували, кількісний аналіз отриманих результатів проводили денситометрично, використовуючи програмне забезпечення TotalLab (TL120, Nonlinear Inc, США).

2.8.3. Імуноцитохімія

Імуноцитохімічне забарвлення клітин із застосуванням флуоресцентно мічених антитіл використовувалося для візуалізації локалізації плазміногену в пухлинних клітинах, маркера астрогліальних клітин GFAP, а також встановлення внутрішньоклітинної локалізації протеїну p53 та LC3 у клітинах аденокарциноми легені лінії A549.

Астроцити головного мозку новонароджених щурів (первинна культура, п. *2.10.1.*) фіксували у 4% забуференому розчині ПФА у PBS, що містив 4% сахарози, протягом 25 хв. при кімнатній температурі та пермеабілізували в охолодженому 20 mM PBS, що містив 0,3% розчині Triton X-100, 0,135 M NaCl та 16,7% телячої ембріональної сироватки. Після процедури пермеабілізації клітини промивалися PBS тричі по 5 хв. Неспецифічне зв'язування блокували шляхом інкубації з 5% BSA у PBS протягом 30 хв. при 37 ^{o}C. Після блокування клітини інкубували з первинними анти-GFAP антитілами у розведенні 1:100 протягом 16 год. при 4 ^{o}C. Після цього клітини промивали PBS тричі по 5 хв. та інкубували із вторинними антитілами, кон'югованими з Alexa Fluor-594 (1:200) протягом 1 год. у темряві при кімнатній температурі. Клітини відмивали 5 разів по 5 хв. PBS та досліджували за допомогою конфокального сканувального лазерного мікроскопу LSM510.

З метою імуноцитохімічного дослідження локалізації протеїнів p53 та LC3 клітини лінії A549 вирощували на покривних скельцях у 6-лунковому планшеті за умов, описаних у п. *2.10.4*. Після 24-годинної інкубації з плазміногеном, який вносили до вільного від FBS середовища у концентраціях 0,1 або 1,0 мкМ, середовище видаляли, скельця промивали PBS та поміщали для фіксації клітин до 4% розчину забуференого ПФА (pH 7,4) на 20 хв. при кімнатній температурі. Після промивки PBS скельця ретельно висушували та обробляли холодним ацетоном для пермеабілізації клітин. Після видалення решти ацетону та промивки PBS на холоду клітини блокували у 5% розчині BSA у PBS протягом 90 хв. при 37 ^{o}C та інкубували з первинними антитілами

проти p53 або LC3, взятими у розведенні 1:100, протягом 16 год. при 4 ºС. Після закінчення інкубації клітини відмивали від незв'язаних антитіл у трьох змінах PBS та обробляли відповідними анти-мишачими або анти-кролячими вторинними антитілами, кон'югованими з флуорофором, розведеними у 3% BSA у PSA 1:250, протягом 3 год. за 37 ºС у темряві. Після промивки скелець PBS клітини інкубували з барвником ядер Hoechst-33342 (1 мкг/мл PBS) протягом 5 хв. при кімнатній температурі у темряві. Після останньої промивки скельця висушували та досліджували субклітинну локалізацію специфічного забарвлення за p53 та LC3 у клітинах A549 за допомогою конфокального сканувального лазерного мікроскопу LSM510.

2.8.4. Імуногістохімія

Імуногістохімічне дослідження проводили для детекції GFAP на зрізах сітківки ока щурів. Парафінові зрізи (товщина 5-6 мкм) фіксованої у ПФА тканини сітківки ока статевозрілих білих лабораторних щурів-самців обробляли охолодженими ксилолом та сумішшю ксилолу з етанолом (1:1). Після депарафінизації зрізів проводили регідратацію тканини з використанням водних розчинів етанолу (96, 75 та 50%), залишки спирту видаляли промивкою у дистильованій воді. Для демаскування антигенів зрізи занурювали у буферний розчин наступного складу: 25 мМ Tris-HCl, pH 7,4, який містив 5 мМ ЕДТК та 0,25% Triton X-100, кип'ятили протягом 1 хв. у режимі 600 W. Після промивки у PBS проводили блокування місць неспецифічного зв'язування антитіл, інкубуючи зрізи у 3 %-му розчині BSA у PBS. Далі зрізи інкубували у розчині антитіл проти GFAP (1:250) протягом 16 год. при 4 ºС. Після відмивки зрізів від неспецифічно зв'язаних антитіл проводили їх обробку вторинними антитілами, кон'югованими з FITC (1:550), протягом 60 хв. при 37 ºС. Після триразової промивки зрізів у PBS проводили забарвлення ядер за допомогою флуоресцентного барвника Hoechst 33258 (1 мкг/мл PBS) протягом 5 хв. за кімнатної температури. Зрізи ретельно промивали водою, висушували та

аналізували за допомогою конфокального скануючого лазерного мікроскопу LSM510. Отримані зображення імунореактивних ділянок тканини та забарвлення ДНК обробляли з використанням пакету програм Zeiss ZEN 2009 Light Edition. Усі маніпуляції з флуоресцентно міченими субстанціями проводили у темряві. В якості контролю неспецифічного зв'язування флуоресцентно мічених антитіл використовували зрізи, оброблені за наведеною схемою, але без використання первинних антитіл.

2.8.5. Протокова цитофлуориметрія

Дослідження з використанням методу протокової цитофлуориметрії з використанням флуоресцентно мічених антитіл проводили в експериментах на відмитих тромбоцитах з метою визначення рівнів експонованого актину та Р-селектину на поверхні плазматичної мембрани тромбоцитів. Усі вимірювання виконувалися на приладі Coulter Epics XL (Beckman Coulter, США). Побудову графічного зображення та аналіз результатів проводили за допомогою програми FCS Express V3 («De Novo Software», США). Застосування протокової цитометрії для вимірювання рівнів інших протеїнів описано нижче.

2.9. Дослідження впливу плазміногену на функціональну активність тромбоцитів людини

2.9.1. Отримання відмитих тромбоцитів людини

Венозну кров для виділення тромбоцитів отримували від клінічно здорових донорів-чоловіків віком 20-41 років, які не приймали будь-яких антитромботичних препаратів протягом 14 днів до забору крові. Протоколи експериментів було узгоджено на засіданні комісії з біоетики та біобезпеки Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України (протокол № 10 від 3-го листопада 2014 р.). Для експериментів використовували препарати відмитих

тромбоцитів, отриманих за методом Gear та ін. [219] з модифікаціями. Відмиті тромбоцити одержували шляхом поетапного центрифугування крові, до якої попередньо був доданий цитратний буфер (100 мМ цитрат натрію, 80 мМ лимонна кислота, 110 мМ глюкоза) в якості антикоагулянту у співвідношенні кров : буфер – 9 : 1. Збагачену тромбоцитами плазму (ЗТП) отримували після центрифугування крові при 160 *g* протягом 20 хв. за кімнатної температури. Далі ЗТП центрифугували (340 *g*, 20 хв.), осад тромбоцитів ресуспендували в буфері для відмивки тромбоцитів (20 мМ HEPES, pH 6,8, 137 мМ NaCl, 4 мМ KCl, 0,2 мМ $MgCl_2$), з додаванням 0,2% глюкози та 0,2% BSA. Суспензію клітин повторно центрифугували за тих самих умов і ресуспендували у буфері, об'єм якого складав 1/2 об'єму ЗТП. Видалення залишків протеїнів плазми з препарату відмитих тромбоцитів проводили шляхом гель-фільтрації суспензії клітин на колонці з Сефарозою-2В, використовуючи для їхньої елюції HEPES-буфер. Кількість тромбоцитів в елюатах та загальну кількість клітин оцінювали за допомогою оптичного агрегометру «SOLAR AT-02» (Республіка Білорусь) з використанням пакета програм «Агрегометр 2.01», як описано раніше [8]. Агрегометричні показники визначали для перевірки життєздатності тромбоцитів та адекватності клітинної відповіді на дію агоністів на тому ж приладі не пізніше трьох годин з моменту забору крові. Додатково для оцінки життєздатності тромбоцитів проводили МТТ-тест. Усі процедури з пробопідготовки тромбоцитів виконували за температури, що не перевищувала 22-25°С, для запобігання спонтанної активації тромбоцитів.

Для активації тромбоцитів застосовували тромбін у концентраціях, що не перевищували 1,0 од. NIH/мл та колаген I типу (1,25 мг/мл), згідно методики, описаної раніше [1]. Отримані відмиті тромбоцити використовували в експериментах *ex vivo* по дослідженню ефектів різних форм плазміногену на перебудови актинового цитоскелету, дегрануляцію, експонування та релізінг гранулярних протеїнів (Р-селектину та VEGF), утворення внутрішньоклітинних активних форм оксигену (АФО), генерування ангіостатинів та залучення експонованого актину у зв'язуванні та процесінгу плазміногену на

тромбоцитарній мембрані. Очищені Glu- та Lys-плазміноген вносили до суспензії тромбоцитів у діючій концентрації 1,2 мкМ, яку було обрано згідно з даними, отриманими раніше [13].

2.9.2. Дослідження стану актинового цитоскелету тромбоцитів

Для дослідження ефектів Glu- і Lys-плазміногену та його фрагменту К1-3 (ангіостатину) на реконструкцію актинового цитоскелету тромбоцитів за різних функціональних станів цих клітин було створено експериментальну модель, що складалася з наступних груп:

- інтактні тромбоцити (контроль);
- тромбоцити, активовані тромбіном (1,0 од. NIH/мл) або колагеном (1,25 мг/мл);
- тромбоцити, інкубовані з досліджуваними протеїнами (окремо кожний, 1,2 мкМ);
- тромбоцити, попередньо інкубовані з досліджуваними протеїнами та активовані тромбіном або колагеном.

Кількість тромбоцитів у кожній пробі становила 350 тис./мкл, загальна кількість клітин у кожному досліді становила $4,5\times10^8$. Інкубацію тромбоцитів з протеїнами плазміноген/плазмінової системи та/або з агоністами проводили у кюветі агрегометру при 37 ^oC за постійного перемішування. Для дослідження ефектів Glu-, Lys-плазміногену та фрагменту К1-3 тромбоцити інкубували з кожним з цих протеїнів окремо протягом 3 хв. для забезпечення їхнього зв’язування з поверхнею клітин. Вплив агоністів на тромбоцити тривав 5 хв. Одночасно проводили вимірювання агрегаційного профілю тромбоцитів за допомогою оптичного агрегометру. Після інкубації суспензію клітин негайно змішували з рівним об’ємом охолодженого лізуючого буфера наступного складу: 0,1 М Tris-HCl (pH 7,4), 2% Triton X-100, 10 мМ етиленглікольтетраоцтова кислота, 2 мкг/мл лейпептин, 0,1 М бензамідин, 2 мМ фенілметилсульфонілфлуорид, 2 мМ ванадат натрію. Оскільки різні пули

актину неоднаково ефективно солюбілізуються у Triton X-100-вмісному буфері, їх можна розділити за допомогою диференціального центрифугування [158], принципова схема якого наведена на рис. 2.20.

Відразу після лізису тромбоцити центрифугували при 15,6 тис. g за температури 4 ºС протягом 4 хв. на центрифузі Eppendorf 5415R для отримання фракції Triton X-100-нерозчинного філаментного матеріалу (осад – F-актин). Осадження актину, що входить до складу коротких філаментів мембранного кортексу (М-актин), від Triton X-100-солюбілізованих мономерів актину (глобулярного G-актину) проводили за допомогою високошвидкісного центрифугування за 100 тис. g при температурі 4 ºС протягом 2 год. на центрифузі УЦП-2-85.

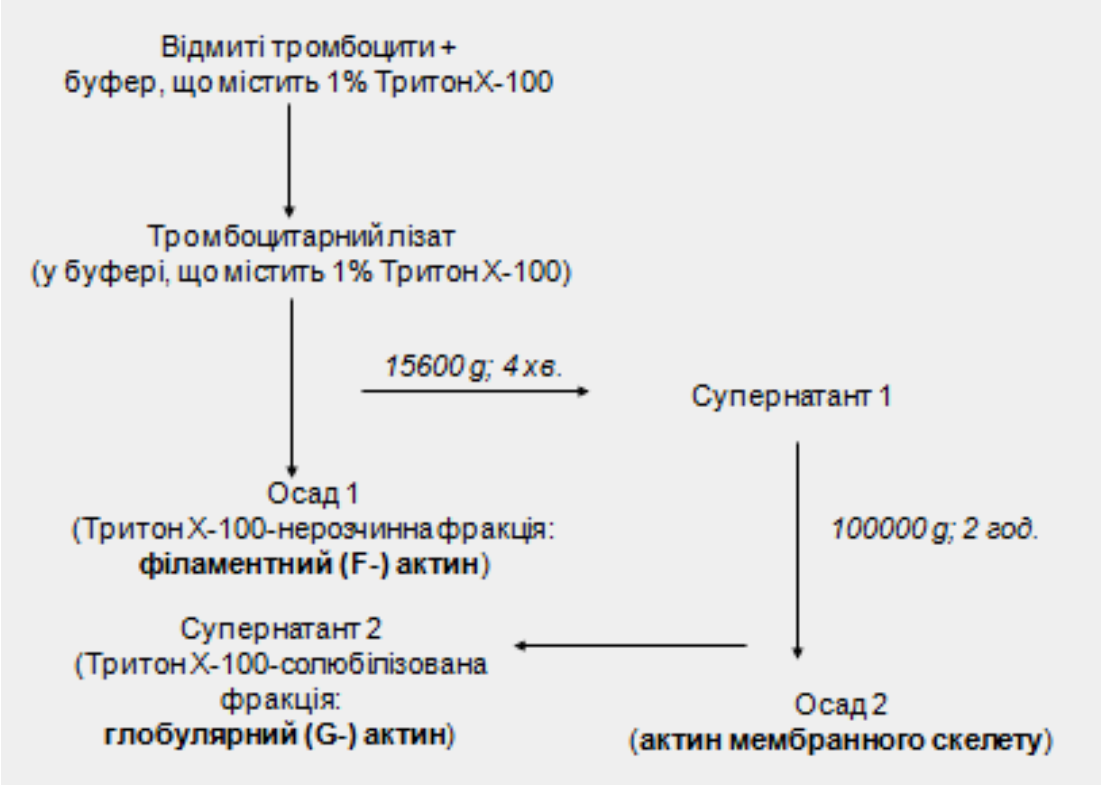

Рисунок 2.20 – Схема отримання різних фракцій актину тромбоцитів.

До осадів, отриманих після центрифугувань за різних швидкісних режимів, вносили Tris-HCl буфер (62,5 мМ, pH 6,8), що містив 0,1% SDS, 1% β-меркаптоетанолу, 10 % гліцерину та 0,001% бромфенолового синього, в об’ємі 75 мкл/осад і кип’ятили на водяній бані протягом 15 хв. Проби, що містили G-

актин, змішували із зазначеним буфером у співвідношенні проба : буфер – 2:1 і кип'ятили в такому самому режимі. Електрофоретичне розділення протеїнів проводили у пластині 10% PAAG з 0,1% SDS. Детекцію актину у зразках, що містили різні субфракції тромбоцитарного актину, проводили за допомогою імуноблотингу, як описано вище. Для візуалізації комплексу антиген-антитіло (поліпептидна зона 42 кДа) проводили кольорову реакцію з використанням розчину, що містив перекис водню та ДАБ. Співвідношення різних пулів актину у зразках тромбоцитів кожної групи оцінювали денситометрично.

2.9.3. Визначення Р-селектину на поверхні тромбоцитів

За допомогою протокової цитофлуориметрії досліджували ефекти різних форм плазміногену на рівень експонованого Р-селектину як показник секреторної активності (дегрануляції) тромбоцитів. Крім того, детекція Р-селектину проводилася для оцінки функціонального стану тромбоцитів в ході експериментів з агоністами. Для проведення дослідження використовували відмиті тромбоцити у кількості 2,5-3 млн. з їхнього концентрату та переносили до 100 мкл HEPES-буферу. Вимірювання рівня флуоресценції у кожному зразку проводили у двох паралелях, умови інкубації (концентрація агоністів, досліджуваних протеїнів та час інкубації) зазначено вище.

Відразу після завершення інкубації до тромбоцитів, оброблених досліджуваними протеїнами, а також до проб інтактних клітин, які правили за контроль, вносили 20 мкл антитіл до Р-селектину, кон'югованих з фікоеритрином (PE). Інкубацію тромбоцитів з флуоресцентно міченими антитілами проводили протягом 30 хв. за кімнатної температури у темряві. Перед вимірюванням величини флуоресцентного сигналу середовище з тромбоцитами та антитілами розводили додаванням до суміші 1,5 мл PBS. Усі процедури з використанням антитіл виконувалися згідно з рекомендацій виробника.

Рівень Р-селектину на поверхні тромбоцитів визначали на протоковому цитофлуориметрі Coulter Epics XL, який оснащено аргоновим лазером ($\lambda_{збудж.}$ = 488 нм). Кількісну оцінку перерозподілу тромбоцитів між різними популяціями проводили з використанням двох параметрів протокового цитометра: гранулярністю (за логарифмом величини бічного світлорозсіювання SS) (гейт 1 – Р-селектин-негативні клітини, гейт 2 – Р-селектин-позитивні клітини) та за інтенсивністю флуоресценції, яку детектували за каналом FL3 (620-630 нм). В кожній серії дослідів виставляли відповідні маркери (М1 і М2) відносно величини специфічної флуоресценції інтактних тромбоцитів. Кількісні зміни Р-селектину на поверхні тромбоцитів виражали у вигляді десятинного логарифму величини інтенсивність флуоресценції (Log FL3). Оскільки інтенсивність екзоцитозу у тромбоцитів, отриманих від різних донорів, має індивідуальні відмінності [367], то експресію Р-селектину на тромбоцитарній поверхні виражали у відсотках, приймаючи кількість Р-селектин-позитивних подій (гейт 2) у контрольних зразках за 100%. Для отримання статистично вірогідних результатів було проаналізовано не менше 10 тис. подій для кожного зразка. Графічне зображення результатів отримували за допомогою програми FCS Express V3, числові показники досліджуваних параметрів представлені як середні значення ± стандартна похибка середнього.

Експонування актину. Кількість тромбоцитів у кожному зразку складала 5×10^6. Для оцінювання залежності інтенсивності експонування актину від концентрації агоністу до суспензії відмитих тромбоцитів додавали тромбін у кількості 0,1, 0,5 та 1,0 од. NIH/мл або колаген у концентрації 1,25, 0,6 та 0,125 мг/мл, інкубували протягом 5 хв. при 37 ^{o}C. Неактивовані тромбоцити, взяті у тій самій кількості, використовували як контроль. Після завершення інкубації тромбоцити фіксували за допомогою 1% розчину забуференого ПФА, pH 7,0, протягом 60 хв. при 4 ^{o}C для запобігання інтерналізації молекул імуноглобулінів перед подальшою інкубацією клітин з антитілами проти актину [634]. З метою визначення динаміки експонування актину тромбоцити інкубували з тромбіном у кількості 0,2 од. NIH/мл протягом 0,5, 5, 30 або 60 хв.,

негайно додаючи після кожного періоду інкубації розчин ПФА. Для оцінки внеску до загального сигналу імунофлуоресценції актину, що з'являється внаслідок руйнування клітин, неактивовані тромбоцити підлягали тим самим процедурам, що й клітини, оброблені стимуляторами активації.

Перед проведенням цитофлуориметрії фіксовані тромбоцити промивали 3,8% Na-цитратним буферним розчином, що додатково містив 1% BSA для блокування місць неспецифічного зв'язування антитіл з плазматичною мембраною тромбоцитів. Для проведення імунохімічної детекції актину готували суміш антитіл у PBS, що містив 1% BSA. Суміш первинних антитіл та відповідних вторинних антитіл, кон'югованих з флуоресцентною міткою (FITC), взятих у розведенні 1:80 та 1:200 відповідно, інкубували перед додаванням до суспензії тромбоцитів при 37 ^{o}C протягом 30 хв. для утворення імунних комплексів. Інкубацію тромбоцитів з коктейлем антитіл проводили протягом 30 хв. при 4 ^{o}C. Як контроль на неспецифічне зв'язування антитіл використовували тромбоцити, які обробляли тільки вторинними антитілами, міченими FITC. Антитіла, що не зв'язалися, вилучали шляхом дворазового центрифугування при 1000 g протягом 3 хв. при 4 ^{o}C. Відмиті таким чином тромбоцити ресуспендували у 1 мл PBS і проводили вимірювання рівня імунофлуоресценції на протоковому цитофлуориметрі. Для кожного аналізу приладом автоматично відбиралося 10 тис. клітин (подій), режим швидкості току клітин – середній або низький, довжина хвилі збудження флуорофору – 488 нм. Реєстрація інтенсивності імунофлуоресценції проводилася за логарифмічною шкалою за каналом FL1, що характеризувався наступними параметрами: напруга 1594 V, Gain – 1,0. Інтенсивність флуоресценції FITC для оцінки різниці сигналу між різними групами тромбоцитів виражали в умовних одиницях, при цьому рівень флуоресценції контрольної групи тромбоцитів був обраний за 100%.

2.9.4. Вивчення зв'язування плазміногену з експонованим актином на тромбоцитах (binding assay)

Для проведення дослідів щодо взаємодії плазміногену з актином, експонованим на поверхні тромбоцитів, здійснювали синтез похідного Glu-форми зимогену з флуоресцентним зондом FITC за методикою, детально описаною Magalhães V. та ін. [406]. Для цього проводили реакцію кон'югації між молекулами протеїну та флуорофору: 0,5 мг FITC, попередньо розчиненого у ДМСО, змішували з 5 мг плазміногену, розчиненого у 0,5 М карбонатному буфері, pH 9,5. Суміш інкубували протягом 60 хв. при 30 ºС. Надлишок FITC, що не зв'язався, видаляли шляхом зміни буферу на 10 мМ Tris-HCl з 150 мМ NaCl, pH 8,2, використовуючи центрифугування у фільтрах Millipore на 30 кДа (buffer change). Отриманий препарат флуоресцентно міченого кон'югату плазміногену (Pg-FITC) зберігали при температурі -20 ºС до використання.

Для дослідження зв'язування Pg-FITC з тромбоцитами клітини у кількості $2,5 \times 10^6$ інкубували з тромбіном (1,0 од. NIH/мл) або колагеном (1,25 мг/мл) у HEPES-буфері протягом 5 хв. при температурі 37 ºС, двічі відмивали у PBS, що містив 1% BSA, центрифугуванням при 1000 *g* протягом 3 хв. Необроблені стимуляторами тромбоцити, взяті у тій самій кількості, підлягали центрифугуванню у зазначеному вище режимі та використовувалися як контроль. Після промивки тромбоцити ресуспендували у PBS з 1% BSA та інкубували з Pg-FITC (100 мкг/мл, або 1,09 мкмоль/л) протягом 30 хв. при температурі 37 ºС у темряві. Концентрація плазміногену була підібрана експериментально як така, що забезпечує повне насичення місць зв'язування з тромбоцитарною поверхнею. Після інкубації тромбоцити відмивали від флуоресцентних кон'югатів, що не зв'язалися, шляхом повторного центрифугування/ресуспендування та проводили вимірювання флуоресцентного сигналу за каналом FL1 цитофлуориметра. Вимірювання кожної групи клітин проводили у трьох повторах, для отримання статистично вірогідних результатів було проаналізовано не менше 10 тис. подій з кожного зразка.

Для перевірки гіпотези стосовно ролі експонованого актину як одного з можливих центрів зв'язування плазміногену з поверхнею плазматичної мембрани тромбоцитів, клітини після інкубації з тромбіном обробляли кролячими антитілами проти актину, взятими у розведенні 1/40 (згідно з рекомендаціями виробника для їх використання в імуноцитохімічних дослідженнях) у PBS з 1% BSA, для блокування актину, презентованого на зовнішній поверхні тромбоцитів. Інкубацію з інгібіторними антитілами проводили протягом 30 хв. за кімнатної температури. Після відмивки від анти-актинових антитіл, що не зв'язалися, тромбоцити інкубували за тих самих умов з Pg-FITC. В якості контролю на специфічність зв'язування плазміногену з експонованим актином використовували тромбоцити, оброблені IgG кролів, не імунізованих актином. Після інкубації суспензію тромбоцитів відмивали від Pg-FITC, що не зв'язався, шляхом центрифугування у PBS за 1000 g при 4 ^{o}C. Далі тромбоцити ресуспендували у 1 мл PBS й аналізували відсоток FITC-позитивних тромбоцитів за допомогою цитофлуориметрії, вимірюючи сигнал флюоресценції FITC за каналом FL1 (515-535 нм). Інтенсивність сигналу спонтанної флуоресценції від необроблених тромбоцитів було обрано для встановлення порогового значення (гейту). У випадку інтактних тромбоцитів контрольної групи та тромбін-активованих тромбоцитів кількість подій, що аналізувалася для кожного вимірювання, становила 15 тис., тоді як для колаген-стимульованих тромбоцитів ця кількість становила 3 тис. подій через тенденцію таких клітин утворювати асоціати й зменшення кількості індивідуальних тромбоцитів у суспензії. Визначення цитометричних параметрів у кожній групі проводилося у двох паралелях, величини інтенсивності флуоресценції FITC, кон'югованого з плазміногеном, з тромбоцитарної поверхні, виражали в умовних одиницях, розраховуючи середні значення (M) та стандартну похибку середньої (m).

2.9.5. Дослідження фрагментації плазміногену тромбоцитами за різного функціонального стану

Для визначення можливості фрагментації Glu-форми плазміногену та генерації ангіостатинів тромбоцитами, відмиті інтактні та тромбін-стимульовані клітини інкубували з досліджуваним протеїном, взятим у концентрації, наближеній до фізіологічної (1,45 мкмоль/л). Тромбоцити осаджували центрифугуванням через 3 та 16 год. після внесення плазміногену, осад промивали PBS, лізували у буфері Леммлі та визначали інтактний поліпептид та склад його протеолітичних фрагментів методом імуноблотингу. Нестимульовані тромбоцити, що використовувалися в якості контролю, були взяті у тій самій кількості та підлягали усім процедурам інкубування з плазміногеном і відмивки, що й активовані клітини.

З метою перевірки гіпотези стосовно мембраноасоційованої генерації ангіостатинів отримували фракцію плазматичних мембран тромбінактивованих тромбоцитів ($1{,}3\times10^8$ клітин у кожному зразку) шляхом гіпотонічного шоку клітин у 0,2 %-у крижаному розчині NaCl, як описано у Jurasz та ін. [306]. Лізис клітин проводили протягом 60 хв. при температурі 4 ^{o}C, осад мембран ретельно промивали у PBS, що містив 1% BSA, та наступним центрифугуванням при 13 тис. g/хв. протягом 10 хв. за кімнатної температури. Після цього до суспензії мембран стимульованих тромбоцитів вносили Glu-плазміноген у концентрації 1,45 мкМ. Реакцію проводили в об’ємі 0,2 мл 50 мМ Tris-HCl-буферу, pH 7,4, інкубували при 37 ^{o}C та відбирали аліквоти через 3 та 16 годин інкубації. Паралельно з тим самим матеріалом проводився дослід з метою встановлення можливої участі експонованого актину у протеолітичному процесінгу плазміногену тромбоцитами. Для стеричного блокування актину до суспензії мембран активованих тромбоцитів вносили кролячі антитіла проти актину у кількості 8 мкг/мл та інкубували 15 хв. при кімнатній температурі. Разом з цим аліквоту з мембранами активованих тромбоцитів інкубували з такою самою кількістю IgG, виділених з кроля, не імунізованого актином, та

використовували як контроль. Після цього до обох аліквот вносили плазміноген у концентрації 0,54 мкмоль/л та інкубували при 37 ^{o}C, відбираючи зразки у рівних об'ємах через 5, 30 і 60 хв. Для визначення ролі плазміну у фрагментації плазміногену до аліквоти, що містила мембрани тих самих тромбоцитів, додавали інгібітор серинових протеїназ п-НФГБ до кінцевої концентрації 5×10^{-4} моль/л та інкубували 60 хв. з плазміногеном за умов, описаних вище. Електрофоретичне розділення протеїнів плазматичних мембран тромбоцитів, що інкубували з Glu-плазміногеном, проводили у пластині 10 ‰ PAAG за невідновлювальних умов, наносячи на доріжки гелю зразки в об'ємі, у якому містилося 2 мкг доданого плазміногену. Детекцію інтактного протеїну та продуктів його протеолізу проводили методом імуноблотингу із застосуванням поліклональних антитіл проти К1-3 із подальшою детекцією імунореактивних зон за допомогою хромогенного субстрату ДАБ.

З метою визначити можливість протеолітичної деградацій Lys-плазміногену, який використовувався у дослідах, що описані у попередніх підрозділах, у концентрації 1,2 мкМ, тромбоцити у кількості 2×10^{8} інкубували з цим протеїном окремо (8 хв.) або преінкубувалися з ним перед активацією тромбіном (1,0 од. NIH/мл) або колагеном (1,25 мг/мл) за умов, описаних вище. Клітини були відокремлені від релізатів центрифугуванням при 1,8 тис. g протягом 10 хв. при кімнатній температурі. Релізати переносили до пластикових пробірок та змішували з електрофоретичним буфером Леммлі, що не містив відновлювальних агентів. Осаджені тромбоцити двічі промивали 50 мМ TBS, pH 7,4, центрифугуванням та лізували у нередукуючому буфері Леммлі. Протеїни, що містилися у зразках тромбоцитарних лізатів та релізатів, розділяли електрофоретично у 5÷15 % PAAG та переносили на нітроцелюлозну мембрану електроблотом з метою подальшої імунохімічної детекції плазміногену та його фрагментів (ангіостатинів) з використанням антитіл проти К1-3. Специфічне імунозабарвлення проявляли, використовуючи розчин ДАБ та H_2O_2.

2.9.6. Дослідження впливу плазміногену на вивільнення VEGF тромбоцитами

Інкубацію тромбоцитів з індукторами активації та плазміногеном проводили у пластикових пробірках типу “Eppendorf” у кінцевому об’ємі HEPES-буферу 0,4 мл за температури 37 ºС. Аліквоти суспензії тромбоцитів, кожна з яких містила $1{,}52\times10^8$ клітин, інкубували з Glu- або Lys-формами плазміногену, взятими у кінцевій концентрації 1,2 мкмоль/л, протягом 3 хв. Для активації нативних тромбоцитів та тромбоцитів, оброблених плазміногеном, додавали тромбін у кількості 0,1 або 1,0 од. NIH/мл або колаген у концентрації 0,125 або 1,25 мг/мл та інкубували протягом 5 хв. Після інкубації з досліджуваними протеїнами тромбоцити центрифугували при 1500 *g* за 25 ºС протягом 15 хв. для відокремлення клітин від протеїнів, що вивільнилися в ході дегрануляції (релізатів). Супернатант, що містив тромбоцитарні релізати, переносили до окремих пластикових пробірок, а отримані осади клітин відмивали двічі у PBS, pH 7,4, шляхом центрифугування за тих самих умов. Зразки релізатів змішували з відновлювальним буфером Леммлі (5:1). Зразки нагрівали у хітері до температури 95 ºС протягом 5 хв. для солюбілізації та денатурації протеїнів. Для отримання зразків лізатів тромбоцитів до осаду клітин вносили буфер Леммлі в об’ємі 75 мкл, ретельно ресуспендували та кип’ятили. Інтактні тромбоцити, що використовували як контроль, підлягали тим самим процедурам пробопідготовки, як і оброблені досліджуваними протеїнами клітини.

З метою імунохімічного визначення VEGF протеїни тромбоцитарних лізатів та релізатів розділяли в ході денатуруючого електрофорезу у пластинах 12% PAAG. Після проведення електрофорезу протеїни переносили з гелю на нітроцелюлозні мембрани, які обробляли відповідними антитілами проти VEGF, та проводили візуалізацію імунореактивних зон за допомогою методу ECL. Після проведення реакції плівку висушували і сканували для отримання цифрового зображення.

2.9.7. МТТ-тест (оцінка метаболічної активності тромбоцитів)

Метод заснований на здатності внутрішньоклітинних дегідрогеназ відновлювати водорозчинні солі тетразолію на нерозчинний формазан, кількість якого можна вимірювати спектрофотометрично (рис. 2.21).

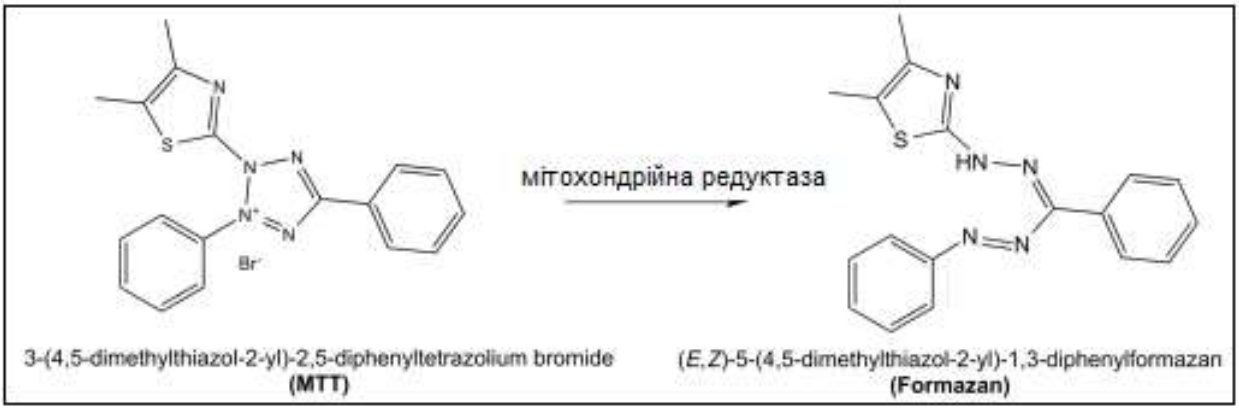

Рисунок 2.21 – Реакція перетворення солі тетразолію на формазан.

Активність NADP(H)-залежних оксидоредуктаз часто використовують як критерій життєздатності клітин. Тетразолієві барвники рутинно застосовуються для вимірювання цитотоксичності або цитотоксичної активності досліджуваних сполук [70].

Для проведення МТТ-тесту аліквоти суспензії тромбоцитів, кожна з яких містила 10×10^6 клітин, інкубували з Glu- або Lys-формами плазміногену у кінцевій концентрації 1,2 мкмоль/л протягом 3 хв. Для активації тромбоцитів додавали тромбін (1,0 од. NIH/мл) або колаген (1,25 мг/мл) та інкубували протягом 5 хв. Для дослідження модифікувальної дії різних форм плазміногену на метаболічну активність тромбоцитів перед додаванням агоністів їх преінкубували з Glu- або Lys-плазміногеном протягом 3 хв.

Після інкубації з досліджуваними протеїнами тромбоцити відмивали двічі у PBS, pH 7,4, центрифугуванням при 1000 g за 25 ^{o}C протягом 10 хв. Інтактні тромбоцити підлягали усім процедурам відмивки так само, як і оброблені протеїнами клітини. Після другого центрифугування осад тромбоцитів ресуспендували у розчині МТТ (1 мг/мл PBS). Тромбоцити, ресуспендовані

лише у PBS, використовували як контроль. Після 60 хв. інкубації за 37 °С суспензії тромбоцитів відмивали від надлишку МТТ, що не прореагував, центрифугуванням при 16000 g протягом 20 хв. Супернатанти зливали, кристали формазану, акумульовані в клітинах, розчиняли в 1 мл ДМСО. Інтенсивність поглинання визначали спектрофотометрично при λ = 500 та 630 нм. Усі паралельні вимірювання виконували не менш, ніж у трьох повторах, результати виражали як Δ(500 – 630) нм.

2.9.8. Визначення рівнів активних форм оксигену (АФО) в тромбоцитах (DCF-тест)

Внутрішньоклітинне утворення активних форм оксигену (АФО) тромбоцитами визначали із застосуванням флуоресцентного зонду H_2DCF-DA, який є мембранотропною речовиною, що проникає до клітини, де під дією АФО (переважно, H_2O_2 та O_2^-) перетворюється на 2´,7´-дихлорофлуоресцин (DCF), що флуоресціює (рис. 2.22). У роботі H_2DCF-DA використовували для вимірювання інтенсивності утворення АФО тромбоцитами із застосуванням протокової цитофлуориметрії [41].

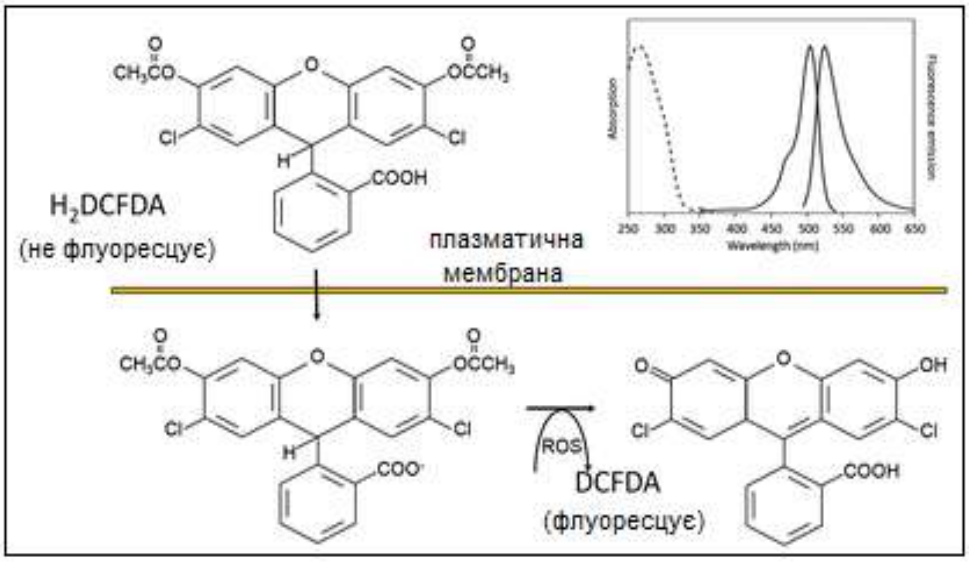

Рисунок 2.22 – Перетворення H_2DCF-DA на флуоресцентний зонд 2´,7´-дихлорофлуоресцин (DCF).

Для визначення модулювальних ефектів плазміногену на агоніст-індуковану генерацію АФО були взяті відмиті тромбоцити людини у тій самій кількості й оброблені так, як описано у підрозділі *2.9.7*. Після останньої відмивки тромбоцитів від досліджуваних протеїнів клітини ресуспендували у 0,4 мл розчину H_2DCF-DA (12,5 мкМ у PBS) та інкубували при 23 ^{o}C протягом 30 хв. у темряві. Після інкубації тромбоцити осаджували центрифугуванням, ресуспендували у 1 мл охолодженого PBS та утримували на льоду перед проведенням аналізу. Цитометричні вимірювання інтенсивності флуоресценції тромбоцитів, навантажених H_2DCF-DA, проводили на протоковому цитофлуориметрі, реєструючи сигнал за каналом FL2. Кількість тромбоцитів (подій), що відбиралося приладом для вимірювання, становила не менше 15 тис./зразок. Аналітичні гейти виставлялися за показниками тромбоцитів, не оброблених флуорофором. При цьому рівень спонтанної флуоресценції не перевищував 1%. Усі досліджувані зразки аналізували не менш, ніж у 3 паралельних вимірюваннях. Величини інтенсивності флуоресценції DCF виражали в умовних одиницях.

2.10. Клітини та клітинні лінії

2.10.1. Отримання первинної культури астроцитів головного мозку щура

Первинну культуру клітин астроцитів одержували з новонароджених щурів за методикою, описаною раніше [481] з мінорними модифікаціями. Півкулі головного мозку 1- або 2-денних щурів лінії Wistar були вилучені до холодного стерильного PBS та механічно розділені шприцом, з’єднаним з 1-мм калібрувальною голкою, та відфільтровані через сито з діаметром пор 100 мкм. Дисоційовані клітини ресуспендували у культуральному середовищі з додаванням 10% FBS. Астроцити висіяли у 175-см^3 флакони з початковою щільністю 2×10^5 клітин/мл (або 20 мл/флакон), з використанням середовища

DMEM з додаванням 10 % (v/v) FBS та інкубували при 37 °C в атмосфері, що містила 5 % CO_2.

Імуноцитохімія. Виділені клітини морфологічно характеризували за експресією маркеру астроцитів – протеїну GFAP [618]. Для підготовки зразків для імуноцитохімічного аналізу клітини відмивали за допомогою PBS та відокремлювали від пластику, використовуючи буфер для дисоціації клітин, вільний від ензимів. Після цього клітини центрифугували при 500 *g* протягом 5 хв., для досліджень розсіювали у DMEM без FBS, щільність культури – 3×10^5 клітин/мл. Астроцити на предметному склі фіксували 4% розчином PFA у PBS, що містив 4% сахарозу, протягом 25 хв. при кімнатній температурі та пермеабілізували в охолодженому 0,3% розчині Triton-X-100, що містив 20 мМ PBS та 16,7 % FBS. Після процедури пермеабілізації клітини промивалися PBS тричі по 5 хв. Сайти неспецифічного зв'язування блокували шляхом інкубації з 5% BSA у PBS протягом 30 хв. при 37 °C. Після блокування клітини інкубували з первинними анти-GFAP антитілами у розведенні 1:100 протягом 16 год. при 4 °C. Після цього клітини тричі промивали PBS по 5 хв. та інкубували зі вторинними антитілами, кон'югованими з Alexa Fluor-594 (1:200) протягом 60 хв. у темряві при кімнатній температурі. Клітини відмивали 5 разів по 5 хв. PBS та досліджували за допомогою конфокального сканувального лазерного мікроскопу.

2.10.2. Дослідження продукування ангіостатинів астроцитами головного мозку щура in vitro

Інкубація первинних астроцитів з плазміногеном проводилися на 11-12-денних культурах клітин диференційованих астроцитів (*п. 2.10.1*). Перед додаванням плазміногену кондиційне середовище змінювали на DMEM, що не містило FBS, а потім додавали до клітин плазміноген у кількості 10 мкг/мл (кінцева концентрація 0,11 мкмоль/л) та інкубували при 37 °C. Аліквоти середовища відбирали перед додаванням плазміногену (нульова точка) та через

20, 60 та 120 хв. після внесення протеїну. Після закінчення часу інкубації, клітини тричі відмивали PBS, додавали RIPA-буфер, що містив коктейль інгібіторів протеїназ та фосфатаз, знімали шкребком та переносили до пластикових пробірок типу Епендорф. Клітини центрифугували при 500 *g* протягом 10 хв. за 4 ºС. Осад обережно ресуспендували інсуліновим шприцом в RIPA-буфері та центрифугували при 500 *g* протягом 15 хв. за 4 ºС. Зразки культурального середовища та лізатів клітин перемішували з невідновлюючим буфером Леммлі та кип'ятили 5 хв. Об'єми зразків інкубаційного середовища вносили до електрофоретичного гелю у розрахунку на 0,25 мкг плазміногену, доданого до клітин. Кожний зразок лізатів клітин для електрофоретичного розділення містив 50 мкг загального протеїну. Протеїни зразків інкубаційного середовища первинної культури астроцитів та клітинних лізатів розділяли за допомогою денатуруючого електрофорезу в 10 % або 5-15 % градієнтному PAAG та переносили на PVDF-мембрану електроблотом. Детекцію плазміногену та його фрагментів проводили за допомогою імуноблоту.

2.10.3. Культивування клітин аденокарциноми легені А549

Для дослідження ефектів плазмін(оген)у на регулювання апоптотичних шляхів та автофагії у малігнізованих клітинах використовували клітини аденокарциноми легені людини (лінія А549). Клітини культивували при 37 ºС в атмосфері 5% CO_2 у поживному середовищі DMEM у 100 $см^3$ чашках або 6- та 96-лункових пластикових планшетах у залежності від подальшої мети експерименту. Інкубацію досліджуваних клітин з плазміногеном або ангіостатином, взятим як контроль, розпочинали за умов досягнення ними не менш, ніж 80% конфлюентності. Для вивчення впливу плазміногену на протеїни сигнальних шляхів та можливості генерації клітинами А549 ангіостатинів клітини вирощували у 6-лункових планшетах. Перед дослідом середовище видаляли, клітини відмивали стерильним PBS та переводили на DMEM, що не містив FBS, додаючи плазміноген (0,1–1,0 мкМ). Інкубацію

клітин з плазміногеном проводили протягом 24 год. за умов, зазначних вище. Після закінчення терміну експерименту досліджували морфологію клітин за допомогою світлового мікроскопу, відбирали кондиційне середовище та тричі промивали адгезовані клітини за допомогою стерильного PBS. Клітини, що відокремились від поверхні пластика, осаджували центрифугуванням при 500 *g* 10 хв. за 4 ºС. Клітини лізували у RIPA-буфері, який містив 50 мМ Tris-HCl (pH 7,4), 0,15 М NaCl, 0,1% SDS, 1% Triton X-100, 1% NP-40, 5 мМ ЕДТК та коктейль інгібіторів фосфатаз та протеаз. Клітини знімали шкребком, лізати переносили до пластикових пробірок типу Епендорф та центрифугували при 16000 g протягом 45 хв. за 4 ºС. Вміст загального протеїну визначали за методом Stoscheck [587]. Супернатанти лізатів клітин та зразки культурального середовища змішували з буфером для нанесення на електрофорез (5×буфер Леммлі). Буфер, який використовувався для приготування зразків, призначених для детекції плазміногену та його фрагментів, не містив β-меркаптоетанолу або інших відновлювальних агентів. Отримані зразки нагрівали при 95 ºС протягом 5 хв. та зберігали за температури –80 ºС до аналізу.

Для оцінки цитотоксичного впливу плазміногену клітини лінії A549, а також 3T3 (умовно нормальні ембріональні фібробласти миші), які використовували як контроль, культивували у 96-лунковому планшеті (5×10^5) клітин/мл у поживному середовищі DMEM з додаванням 10 мМ HEPES-буферу, 1/100 мл суміші антибіотиків-антимікотиків та 10% FBS. Клітини інкубували у вологій атмосфері у CO_2-інкубаторі при 37 ºС і вмісті CO_2 5% протягом 24 год. Після досягнення культурою не менш, ніж 80% конфлюентності, клітини промивали стерильним PBS, замінювали середовище на свіже, що не містило FBS, та вносили у відповідні лунки планшета розчини плазміногену у різних концентраціях в об’ємі 10 мкл. У контрольні лунки, які не містили досліджуваного протеїну, додавали 0,15 М NaCl у кількості 10% від об’єму інкубаційного середовища. Після внесення плазміногену клітини поміщали до CO_2-інкубатору і культивували 24 год. за умов, зазначених вище.

МТТ-тест. Для оцінки життєздатності клітин проводили тест на відновлення ними 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразолій броміду (МТТ-тест) так, як описано раніше [96]. Для цього планшет центрифугували на цитоспіні для осадження клітин, що відокремились під час культивування в результаті порушення їхньої адгезивності плазміном. Супернатант видаляли, лунки обережно промивали PBS від залишків інкубаційного середовища і до кожної лунки вносили по 100 мкл розчину МТТ (1 мг барвника на 1 мл поживного середовища DMEM). Під впливом мітохондрійних дегідрогеназ живих клітин сіль тетразолію відновлюється до нерозчинного формазана, який у кристалічній формі накопичується усередині клітин. Планшет з клітинами А549 та 3Т3 інкубували у CO_2-інкубаторі за 37 ^oC протягом 4 год. Після закінчення терміну інкубування з лунок видаляли середовище, а кристали формазана розчиняли у 100 мкл ДМСО. Поглинання формазана, розчиненого у ДМСО, вимірювали колориметрично за допомогою мультилункового спектрофотометра при довжині хвиль 550/620 нм. Ефекти плазміногену для кожної концентрації визначали у 6 паралельних лунках. Результат виражали в умовних одиницях різниці величини поглинання (550-620) нм.

Визначення активності плазміну. До моношару клітин лінії А549, які нарощували у 96-лунковому планшеті, вносили 200 мкл середовища DMEM з додаванням плазміногену у концентраціях 0,1, 0,5 та 1,0 мкМ. За контролі правили клітини, які знаходилися у відповідному об’ємі середовища DMEM, що не містило плазміногену або містило ангіостатин (фрагмент К1-3) (1,0 мкМ). Після перемішування до лунок додавали 25 мкл розчину субстрату S-2251 і вимірювали поглинання р-нітроаніліну за допомогою мікрорідера у двопроменевому режимі: 405 нм – робоча хвиля, 492 нм – референсна хвиля. Вимірювання проводили протягом 90 хв. Швидкість розщеплення плазміном виражали у вигляді кінетичних кривих як залежність зміни поглинання Δ(405-492) нм у часі.

Імуноцитохімія. З метою імуноцитохімічного дослідження локалізації протеїну р53 клітини лінії А549 вирощували на покривних скельцях у 6-

лунковому планшеті за умов, описаних вище. Після 24-х годинної інкубації з плазміногеном, який вносили до вільного від FBS середовища у концентраціях 0,1 або 1,0 мкМ, середовище видаляли, скельця промивали у PBS та поміщали для фіксації клітин до 4% розчину забуференого ПФА (pH 7,4) на 20 хв. при кімнатній температурі. Після промивки PBS скельця ретельно висушували та обробляли холодним ацетоном для пермеабілізації клітин. Після видалення решти ацетону та промивки крижаним PBS клітини блокували у 5% розчині BSA у PBS протягом 90 хв. при 37 ^{o}C та інкубували з первинними антитілами проти p53 або LC3, взятими у розведенні 1/100, протягом 16 год. при 4 ^{o}C. Після закінчення інкубації клітини відмивали від незв'язаних антитіл у трьох змінах PBS та обробляли відповідними вторинними анти-мишиними або анти-кролячими антитілами, кон'югованими з флуорофором (Alexa Fluor-488 та FITC відповідно), розведеними у 3 % BSA у PBS 1/250, протягом 3 год. за 37 ^{o}C у темряві. Після промивки скелець PBS клітини інкубували з барвником ядер Hoechst 33342 (1 мкг/мл PBS) протягом 5 хв. при кімнатній температурі у темряві. Після останньої промивки скельця висушували та досліджували локалізацію імунофлуоресцентного сигналу від анти-p53 або анти-LC3 антитіл-кон'югатів у клітинах A549 з використанням конфокального сканувального лазерного мікроскопу.

Визначення регуляторних протеїнів імуноблот-аналізом. У лізатах клітин A549, інкубованих з плазміногеном або інтактних клітин (контроль), імуноблотом визначали рівні регуляторів апоптозу та клітинного циклу (p53, MDM2, p21, каспази-9, Akt, Bax, PARP-1, RPA70, TIGAR), автофагії (LC3, Beclin-1), адгезії (фібронектин), проміжних філаментів цитоскелету (віментин). Детекцію фрагментів плазміногену (ангіостатинів) проводили у лізатах клітин A549 та в зразках культурального середовища з використанням антитіл проти K1-3. Як контроль адекватності нанесення зразків у різних серіях дослідження використовували α-тубулін, β-актин або GAPDH. Дані кількісних вимірювань представлено у процентах від контрольної величини або в умовних одиницях у вигляді середньої та її стандартної похибки (M ± m).

2.10.4. Отримання клітинних сублініій зі зміненою експресією протеїну TIGAR та Ruk/CIN85

Для отримання сублінії клітин A549 з пригніченою експресією гену TIGAR проводили нокдаун, використовуючи технологію малих інтерферуючих РНК (siRNA). Трансфекцію клітин siRNA виконували відповідно з інструкцією виробника. Перед початком процедури трансфекції середовище та реагент для трансфекції, препарати siRNA (siControl або siTIGAR, спрямовану до послідовності, що кодує TIGAR: 5`-GAUAUGACGGUAAAGUAUG-3`) та основне безсироваткове середовище RPMI/F12 були змішані та термостатовані протягом 15 хв. Для утворення комплексу між реагентом для трансфекції з молекулами siRNA ці реактиви інкубували протягом 60 хв., потім проводили трансфекцію, змішуючи суспензію клітин з отриманою сумішшю. Трансфекційне середовище було замінено на повне середовище RPMI-F12 через 6 год. після трансфекції. Через 48 год. клітини збирали для подальших експериментів. Адекватність проведеної процедури перевіряли за допомогою імуноблотингу, визначаючи рівні протеїну TIGAR у контрольних клітинах, трансфікованих порожнім вектором (Scramble), та клітинах, нокаутованих за експресією TIGAR (siTIGAR) (рис. 2.23). Експеримент з нокдауном TIGAR було проведено у трьох повторах, що повністю відтворювалися.

В експериментах по дослідженню генерування ангіостатинів пухлинними клітинами використовувалися також мишачі клітини аденокарциноми грудної залози лінії 4T1 та їх сублінії зі стабільною надекспресією або пригніченою експресією адаптерного/риштувального протеїну Ruk/CIN85, які були отримані раніше у відділі сигнальних механізмів клітини ІБХ НАНУ й надані для роботи д.б.н., проф. Дробот Л.Б (рис. 2.24). Клітини аденокарциноми грудної залози миші лінії 4T1 та їхні сублінії з різним рівнем експресії Ruk/CIN85 культивували в середовищі RPMI 1640 (Gibco®), що містило 10% ембріональної телячої сироватки (FCS, HyClone), 50 од./мл пеніциліну, 100

мкг/мл стрептоміцину та 2 мМ L-глутаміну, при температурі 37 °C та 5% CO_2 у зволоженій атмосфері.

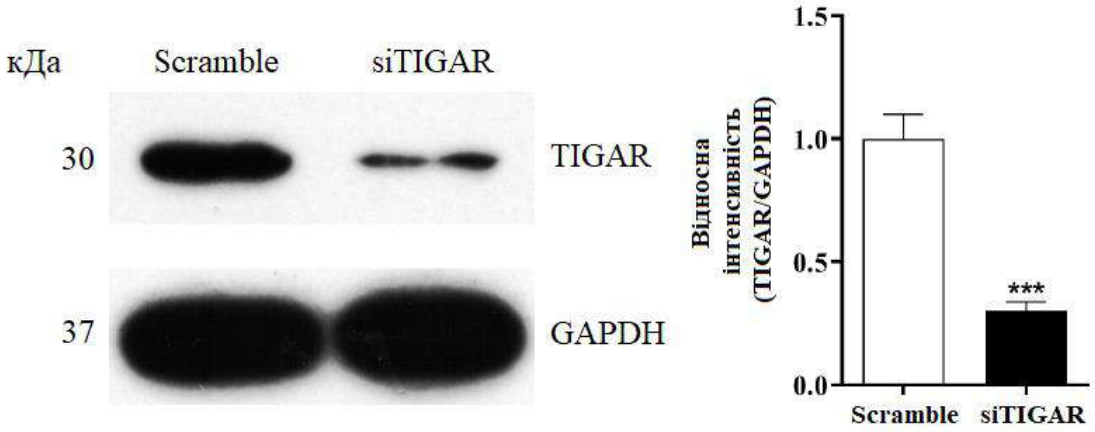

Рисунок 2.23 – Імуноблотинг субліній клітин A549 з нормальним ступенем експресії протеїну TIGAR (Scramble) та нокаутованих за допомогою трансфекції siRNA (*** - P < 0,001 у порівнянні із Scramble, n = 3).

Клітини пасажували у співвідношенні 1:3-1:5 кожні 2-3 дні при досягненні 70-80% конфлюенту. Було обрано сублінії клітин 4T1, які стабільно надекспресували Ruk/CIN85 та сублінії з пригніченням експресії Ruk/CIN85 (RukDown). Відповідні клітини, трансфіковані плазмідою без вставки (Mock і Scr), правили за контроль.

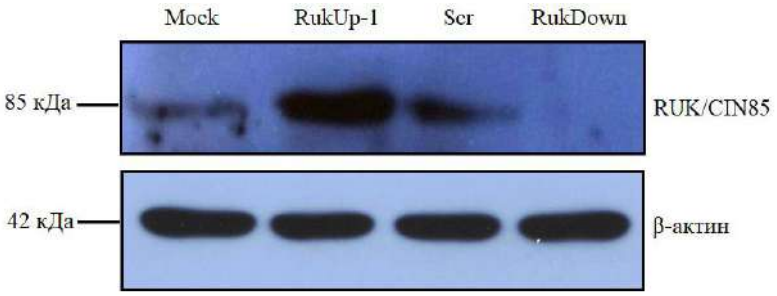

Рисунок 2.24 – Оцінювання рівнів адаптерного протеїну Ruk/CIN85 в отриманих сублініях клітин 4T1 (результат вестерн-блот аналізу).

2.10.5. Визначення міграційної активності клітин A549 з різним рівнем експресії протеїну TIGAR (скретч-тест)

Клітинна міграція відіграє ключову роль у процесах інвазії та метастазування злоякісних пухлин. Зміни міграційної активності клітин з різним ступенем експресії TIGAR досліджували за допомогою різновиду скретч-тесту (wound healing assay). Для цього клітини розсіювали у 12-лункових планшетах та культивували до досягнення конфлюентності. Через 24 год. інкубації моношар клітин промивали DPBS та робили у ньому вертикальну подряпину однакової ширини за допомогою пластикового наконечника на об'єм 200 мкл. Клітинний дебріс та відшаровані клітини видаляли промиванням DPBS, потім до культури вносили середовище DMEM. Площу подряпин різних сублініій клітин A549 вимірювали за допомогою інвертованого мікроскопа і фотографували через проміжки часу: 0, 16, 32 та 48 год.

Вплив ангіостатинів на інвазійну активність клітин 4T1 оцінювали трансвелл-аналізом з використанням камери Бойдена, як описано раніше [275].

2.11. Отримання зразків сітківки ока щурів з експериментальною СТЗ-індукованою гіперглікемією та за її корекції з використанням інгібіторів PARP-1

Усі експериментальні дослідження з використанням тварин проведено із дотриманням вимог Закону України № 3447-IV від 21.02.06 р. «Про захист тварин від жорстокого поводження» та узгоджуються з основними принципами «Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та наукових цілей» (Страсбург, 1986), декларації «Про гуманне ставлення до тварин» (Гельсінкі, 2000) і Національного конгресу з біоетики «Загальні етичні принципи експериментів на тваринах» (Київ, 2001).

Експериментальна модель стрептозотоцин (СТЗ)-індукованої гіперглікемії створювалась з використанням дорослих щурів-самців лінії Wistar

(маса 270-350 г), котрі утримувалися за стандартних умов та харчування віварію Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України. Усі процедури виконувалися у відповідності із Заявою ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology) для використання тварин в офтальмологічних дослідженнях. Через один тиждень після акліматизації стан гіперглікемії індукували одноразовим внутрішньочеревинним введенням щурам свіжоприготованого розчину СТЗ у цитратному буфері, pH 4,5, у дозі 70 мг/кг маси тіла. Концентрацію глюкози у крові, що відбирали з хвостової вени щурів, вимірювали за допомогою глюкометру Precision Xtra Plus (MediSense UK Ltd., Oxon, Велика Британія). Тварин, у яких рівень цукру був не нижче за 20,2 ± 2,1 ммоль/л, брали в експеримент.

Щури були розділені на наступні групи (по п'ять тварин у кожній групі): 1) контроль; 2) СТЗ-гіперглікемія (Г/г); 3) СТЗ-Г/г + введення 3-амінобензаміду (3-АВ); 4) СТЗ-Г/г + введення нікотинаміду (NAm). Щурам через вісім тижнів після розвитку стабільної гіперглікемії вводили внутрішньочеревинно інгібітори PARP-1 (3-АВ або NAm) у дозі відповідно 30 та 100 мг/кг маси тіла щодня протягом двох тижнів. Величини доз підбиралися згідно з літературними даними як такі, що не викликають токсичних ефектів [326]. Через десять тижнів після початку експерименту тварин терміналізували через цервікальну дислокацію під діетиловим наркозом.

Свіжоізольовані сітківки одного ока, взяті з кожної тварини (n = 5 у кожній групі), подрібнювали у скрапленому нітрогені та гомогенізували у RIPA-буфері наступного складу: 25 мМ Tris-HCl, pH 7,4, 0,15 М NaCl, 1% SDS, 1 мМ ЕГТК, 2,5 мМ ЕДТК, 6,5 мкМ апротінін, 1,5 мкМ пепстатин А, 23 мкМ лейпептин, 1 мМ PMSF, 5 мкг/мл соєвого інгібітору трипсину, 1 мкМ ортованадату натрію. Співвідношення тканина : буфер становило 1 : 5 (w/v). Гомогенати обробляли ультразвуком тричі по 30 сек за допомогою дезінтегратору Sartorius та центрифугували за 16 тис. *g* протягом 30 хв. при 4 ^{o}C. Супернатанти відбирали та після вимірювання кількості загального протеїну змішували у рівних об'ємах із буфером Леммлі, який містив

дітіотрейтол (0,1 ммоль/л), та кип'ятили протягом 5 хв. Зразки протеїнових екстрактів сітківки, в яких визначали ангіостатини та інші цільові протеїни методом імуноблотингу, готували з використанням невідновлювального буферу Леммлі. Зразки заморожували та зберігали до аналізів при –20 ºС. Сітківки другого ока фіксували у 4% забуференому ПФА, робили парафінові блоки для виготовлення зрізів, які далі використовували для проведення імуногістохімічних досліджень.

2.12. Клінічний та патологічний матеріал

2.12.1. Зразки доброякісних новоутворень грудної залози та матки

Об'єктами досліджень були резектовані зразки доброякісних новоутворень грудної залози та матки жінок різного віку, які не отримували медикаментозного дооперативного лікування, та резектовані зразки прилеглої до новоутворення нетрансформованої (фенотипово незміненої) тканини, в яких за результатами гістологічного дослідження не було встановлено наявності атипових клітин. Матеріал для дослідження було надано фахівцями сертифікованої та ліцензованої патоморфологічної лабораторії обласного онкологічного диспансеру м. Одеси з дотриманням етичних норм. Патоморфологічні діагнози були верифіковані за міжнародною класифікацією ВООЗ (Женева, 2003) із визначенням морфологічного стану і ступеня диференціації трансформованих клітин пухлинної тканини (World Health Organization Classification of Tumors, 2003, [78]). Пацієнтки були проінформовані та дали згоду на використання хірургічного матеріалу в біохімічних дослідженнях. Наважки тканин доброякісних новоутворень подрібнювали в скрапленому нітрогені, гомогенізували у RIPA-буфері та центрифугували для отримання зразків для електрофорезу. Рівні плазміногену та ангіостатинів визначали методом імуноблоту.

2.12.2. Тканина та ексудат хронічних ран м'яких тканин

Імунохімічну детекцію ангіостатинів та активність ММР виконували у біоптатах або постопераційному матеріалі, а також в ексудативній рідині, відібраних з ранової поверхні хронічних виразок шкіри пацієнтів з цукровим діабетом, та хронічної гіпертензивної виразки пацієнта із синдромом Марторелла (клінічний випадок, *case report*). Дослідження проводили у рамках договору про науково-технічне співробітництво між Національним медичним університетом ім. О.О. Богомольця МОЗ України та Інститутом біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України (№ 01/10-54 від 03.02.2016).

Хронічні виразки шкіри пацієнтів з цукровим діабетом.

У дослідження було залучено 16 пацієнтів із цукровим діабетом II типу, що мали гнійні хронічні рани кінцівок, 9 осіб з нормоглікемією, в яких були гострі хірургічні рани, сформували контрольну групу (табл. 2.3).

Таблиця 2.3

Демографічні та клінічні відомості про пацієнтів,
що брали участь у дослідженні

Група пацієнтів	***n***	**Вік, роки**	**Стать**	**Концентрація глюкози, ммоль/л**
Діабет (II тип)	16	60,4 ± 3,2	чоловіки – 8 жінки – 8	13,7 ± 3,12
Гострі рани (контроль)	9	58,6 ± 6,2	чоловіки – 5 жінки – 4	4,3 ± 1,36*

* - P < 0,05 у порівнянні з групою пацієнтів з діабетом

Обстежені пацієнти з хронічними та гострими (операційними) ранами проходили лікування у відділенні гнійної хірургії Київської міської клінічної лікарні (КМКЛ) № 4. Ведення пацієнтів протягом періоду лікування та відбір біоматеріалу відповідали етичним нормам, усі пацієнти дали письмову згоду на участь у дослідженні. За віком, статтю та супутніми патологіями групи були репрезентативними. Усім пацієнтам було проведено комплексну нейротропну,

дезагрегатну та поліантибактеріальну терапію за деескалаційним типом, а також адекватну медикаментозну терапію, спрямовану на підтримку функціонального стану основних органів та систем організму, корекцію хронічної ішемії тканин нижніх кінцівок.

В ході лікування пацієнтів другої групи під час місцевої терапії ран застосовувались мазеві пов'язки, проводились перев'язки з використанням антисептичних розчинів. Пацієнти цієї групи мали прості негнійні рани верхніх або нижніх кінцівок. Для відбору ексудатів з хронічних ран пацієнтів з цукровим діабетом застосовували вакуум (VAC)-терапію (рівень негативного тиску складав від -50 до -200 мм рт. ст.). Вакуумні пов'язки представляли собою гідрофільні поліуретанові губки з розміром пор 400-2000 мкм, виконані з прозорого адгезивного матеріалу, з'єднані дренажною трубкою з апаратом-джерелом негативного тиску, що містить контейнер для збирання ранового ексудату. У дослідженні використовували V.A.C.®-систему виробництва "KCI" (США). Перед відбором зразків для біохімічного аналізу з рани видаляли некротичні тканини та залишки лікарських засобів. Дослідження гострих ран проводили у гостру фазу ранового процесу, відбір зразків ексудатів здійснювали з поверхні рани методом відбору середньої проби до спеціальних пробірок з кришкою. Зразки ексудатів зберігали за температури -80 ^{o}C до початку лабораторних досліджень. В отриманих зразках визначали вміст ангіостатинів методом імуноблотингу та проводили детекцію активних форм ММР за допомогою желатинової зимографії.

Хронічні виразки за синдрому Марторелла.

Синдром Марторелла, або гіпертензійно-ішемічна виразка нижніх кінцівок, асоційована з артеріальною гіпертензією, є відносно рідкісним захворюванням, яке важко діагностувати. Дослідження виконано з використанням біоптатного матеріалу, взятого в пацієнта з клінічно встановленим випадком виразки Марторелла (табл. 2.4). Перед початком експерименту пацієнт надав письмовий дозвіл на проведення дослідження та публікацію його результатів. Усі етапи дослідження та протоколи

експериментів були схвалені комісією з біоетики, як такі, що відповідають останній версії Гельсінської декларації. П'ять зразків, масою приблизно 100 мг кожний, були відібрані з різних ділянок рани в ході проведення пластичної хірургії виразки розміром 3,3×4,7 см (рис. 2.25).

Таблиця 2.4

Загальні відомості про пацієнта із синдромом Марторелла

Стать	Чоловік
Вік (роки)	56
Маса тіла (кг)	110
Історія хвороби	Гіпертензивна виразка лівої ноги, 2 роки
Кров'яний тиск, *мм Hg*	220/100
Концентрація глюкози, *ммоль/л*	4,6
Бактеріальна інфекція	Відсутня
Лікування	Антибіотики, перев'язки, пластична хірургія

Рисунок 2.25 – Гіпертонічна виразка (синдром Марторелла).

Як контроль використовували п'ять зразків біопсійного матеріалу, відібраного з гістологічно нормального тканинного оточення виразки,

переважна більшість якого становила грануляційна тканина. Усі зразки біоптатів зберігалися при температурі –80 ºС до початку проведення біохімічних досліджень.

Для отримання протеїнових екстрактів біоптати подрібнювали у скрапленому нітрогені та гомогенізували в охолодженому 50 мМ Tris-HCl-буфері, pH 7,4, що містив 0,15 М NaCl, 0,1% SDS та коктейль інгібіторів протеаз та фосфатаз (RIPA-буфер). Співвідношення тканина :буфер становило 1:5 (m/v). Після гомогенізації зразки додатково дезінтегрували ультразвуком та центрифугували при 16 тис. *g* протягом 45 хв. при 4 ºС. Супернатанти відбирали, вимірювали в них концентрацію загального протеїну та змішували з буфером Леммлі. В отриманих зразках визначали кількість ангіостатинів та VEGF й вимірювали рівні активних ММР.

2.12.3. Сироватка крові пацієнтів за фармакотерапії серцево-судинних захворювань (ССЗ)

Для проведення досліджень щодо визначення рівнів ангіостатинів за розвитку деяких ССЗ були використані сироватки крові пацієнтів, які були залучені до наступних клінічних спостережень: 1) використання симвастатину для лікування ішемічної хвороби серця, 2) використання L-аргініну для лікування ішемічної хвороби серця на фоні серцевої недостатності, 3) використання цитіколіну (CDP-холіну) для відновлювальної терапії пацієнтів з гострим ішемічним інсультом на фоні фібриляції передсердь.

Дослідження проводили у рамках договору про науково-технічне співробітництво між ІБХ НАНУ, ДЗ «Дніпропетровська медична академія» МОЗУ та Дніпропетровським національним університетом ім. Олеся Гончара від 29.10.2015 р. (№ 1443) та договором про співпрацю між ІБХ НАНУ та ДЗ «Дніпропетровська медична академія» (№ 1/10-96 від 15.04.2019 р.). Письмова згода була отримана від кожного пацієнта перед початком дослідження. Усі експериментальні процедури та протоколи відповідали вимогам Гельсінської

декларації та були розглянуті та затверджені Комітетом з біоетики ДУ «Дніпропетровська медична академія» МОЗ України (протокол № 637/16-2 від 5.12.2016).

Кров пацієнтів отримували з ліктьової вени натщесерце до початку лікування та на наступну добу після останнього прийому лікувальних препаратів. Згусток формувався за кімнатної температури протягом 30-60 хв. Сироватку відділяли центрифугуванням, усі зразки сироваток негайно заморожували до початку аналізів. Клінічні біохімічні параметри визначали у свіжій сироватці. Формували дві групи порівняння: основну групу складали пацієнти, які отримували препарат, що тестувався, як засіб ад'ювантної терапії, до контрольної групи набирали пацієнтів, що отримували лікування за стандартним протоколом. Головними критеріями виключення пацієнтів в усіх трьох серіях досліджень були: гострий інфаркт міокарду (< 6 місяців), неконтрольований цукровий діабет, ниркова та печінкова недостатність та онкологічні хвороби.

Визначення рівнів ангіостатину у сироватці крові пацієнтів з ішемічною хворобою серця (ІХС) за лікування симвастатином

У випробуванні брали участь 26 пацієнтів (20 жінок та 6 чоловіків), середній вік – 58,7 ± 1,64 роки, з клінічно підтвердженою ІХС на фоні гіперхолестеролемії. Усі пацієнти надали письмову згоду щодо проведення досліджень. Серед усіх пацієнтів 11 чоловік (42 %) перенесли інфаркт міокарда не пізніше, ніж за 6 місяців перед початком випробувань, у 5 пацієнтів (19 %) був контрольований цукровий діабет. Критерії виключення при відборі пацієнтів були наступними: 1) онкологічні хвороби; 2) гострі або хронічні захворювання печінки, включаючи вірусний гепатит; 3) тяжкі розлади мозкового кровообігу; 4) тромбоз судин; 5) серцева аритмія; 6) гострий інфаркт міокарду раніше 6 місяців перед початком дослідження; 7) прийом препаратів, що знижують рівень ліпідів крові, у період 6 місяців перед початком випробування. Пацієнтам, які задовольняли критеріям відбору, призначали статинову терапію у дозі 40 мг симвастатину на добу щоденно протягом 8

тижнів. Згідно з рекомендаціями Європейської асоціації атеросклерозу (European Atherosclerosis Society, EAS), обрана лікувальна стратегія відповідала статиновій терапії середньої інтенсивності [513]. Для лікування пацієнтів використовували препарат симвастатину Vabadin® виробництва «Berlin-Chemie Menarini Group» (ФРН).

Зразки периферичної крові перед початком та через 8 тижнів після завершення статинової терапії відбиралися зранку натщесерце. Усі зразки центрифугували 10 хв. при 1500 g для відділення сироватки, яку зберігали за −70 °C до аналізу.

Вміст загального холестеролу (TC), холостеролу ліпопротеїнів дуже низької щільності (VLDL-C), холестеролу ліпопротеїнів високої щільності (HDL-C) та триглицеридів (TG) у сироватці крові пацієнтів вимірювали за допомогою напівавтоматичного біохімічного аналізатору «RT-1904C» (ФРН). Вміст холестеролу ліпопротеїнов низької щільності (LDL-C) розраховували за формулою Фрайдевальда [208]:

$$[LDL\text{-}C] = [TC] - ([HDL\text{-}C] + [VLDL\text{-}C]).$$

Сироватковий рівень С-реактивного протеїну (CRP), високочутливого маркеру запалення [75], визначали у тесті латексної аглютинації із застосуванням тест-системи Humatex CRP kit® (Human GmbH, ФРН).

Ефекти лікування гіперхолестеринемії у пацієнтів з ІХС за допомогою симвастатину на рівень циркулюючого ангіостатину оцінювали методом імуноблотингу з використанням кролячих антитіл проти фрагменту плазміногену К1-3. Аліквоти сироваток змішували з невідновлювальним буфером Леммлі, зразки наносили на пластину градієнтного 5÷18 % PAAG у кількості 100 мкг на трек. Після проведення імуноблотингу імунореактивні зони на мембранах проявляли з використанням розчину ДАБ та H_2O_2. Інтенсивність імунозабарвлення плазміногену та ангіостатину вимірювали за допомогою денситометричного аналізу. Імунореактивні зони з різною

молекулярною масою на нитроцелюлозній мембрані ідентифікували шляхом екстраполяції довжини пробігу забарвлених протеїнів-маркерів (PageRuler Prestained Protein Ladder, Fermentas, ФРН, кат. № 26616). Результати представлені у вигляді групової середньої величини ± стандартної похибки середньої (M ± m).

Визначення рівнів регуляторів ангіогенезу та активності ММР у сироватці крові пацієнтів з ішемічною хворобою серця (ІХС) на фоні хронічної серцевої недостатності (ХСН) за лікування L-аргініну

Пацієнти (n = 33) з діагнозом ХСН зі збереженою фракцією викиду були розділені на дві групи: 1) отримували стандартне лікування (контрольна група), n = 13 (10 чоловіків, 3 жінки, середній вік 69,5 ± 3.5 років); 2) пацієнти разом зі стандартним курсом лікування додатково отримували L-аргінін аспартат («Тівортін»®, "Юрія-Фарм", Київ, Україна) у дозі 4,2 г у 100 мл внутрішньовенно щоденно протягом 7 днів з наступним отриманням у пероральному режимі у дозі 6 г на добу протягом 3 місяців згідно з рекомендаціями [497] (дослідна група), n = 20 (16 чоловіків, 4 жінки, середній вік 67 ± 10 років). Пацієнти з гострим інфарктом міокарду (< 6 місяців), цукровим діабетом I типу, нирковою та печінковою недостатністю та онкологічними хворобами не включали до експерименту. Письмова згода була отримана від кожного пацієнта перед початком дослідження. Усі експериментальні процедури та протоколи відповідали вимогам Гельсінської декларації та були розглянуті та затверджені Комітетом з біоетики ДУ «Дніпропетровська медична академія» МОЗ України (протокол № 637/16-2 від 5.12.2016).

Кров було отримано з ліктьової вени натщесерце до початку лікування та на наступну добу після останнього прийому «Тивортину». Згусток формувався за кімнатної температури протягом 30-60 хв. Далі сироватку відділяли центрифугуванням за 3 тис. g протягом 10 хв. за 15 ºС. Усі зразки сироваток негайно заморожували та зберігали за – 20 ºС до початку аналізів.

Стандартні лабораторні тести (швидкість осідання еритроцитів та інші гематологічні параметри, концентрація холестеролу, тригліцеридів і глюкози) були виконані на початку дослідження та наприкінці курсу лікування для пацієнтів обох груп. Концентрацію С-реактивного протеїну у сироватці вимірювали за допомогою імунотурбодіметричного методу.

Рівні циркулюючих ангіостатину, VEGF та продуктів деградації фібронектину визначали із застосуванням відповідних антитіл з метою визначення ефектів L-аргініну на вміст цих протеїнів у сироватці крові, а отже, їх потенційної маркерної ролі. Сироватку крові розводили у SDS-вмісному буфері Леммлі у співвідношенні 1:5 (сироватка:буфер), та нагрівали до 90 ^{o}C протягом 5 хв. Усі зразки містили 10% β-меркаптоетанол, окрім тих, в яких визначали вміст ангіостатину. Зразки наносили на пластину градієнтного PAAG у кількості 100 мкг/лунка та розділяли електрофоретично. Після проведення електрофорезу протеїни переносили на PVDP або нітроцелюлозні мембрани шляхом електроблоту, блоти проявляли методом ECL. Результати виражали у вигляді умовних одиниць.

Визначення активності ММР (желатинова зимографія). Колагенолітичну активність у сироватках крові, яка зумовлена наявністю активних ММР, визначали методом ензим-форезу у сополімері 7,5% PAAG та желатину (3 мг/мл). Кількість протеїну на лунку становила 100 мкг. Зимографію проводили за методикою, детально описаною у *п. 2.7.3*. Наявність колагенолітичних ензимів визначали як оптично прозорі зони, до яких мігрували активні ММР та розщеплювали субстрат, на однорідному синьому фоні після забарвлення гелю. Гелі сканували, цифрове зображення конвертували у чорно-білий режим та проводили денситометричний аналіз за допомогою програми TL120. Усі кількісні дані виражали у вигляді середньої величини ± стандартної похибки середньої (M ± m).

Визначення рівнів ангіостатинів та нервовоспецифічних протеїнів у сироватці крові хворих з фібриляцією передсердь та гострим ішемічним інсультом за лікування цитіколіном (CDP-холіном)

Пацієнти основної та контрольної груп були рандомно включено до експерименту, групи пацієнтів були репрезентативні за основними демографічними та клінічними показниками. Основну групу складали постінсультні пацієнти з клінічно підтвердженою фібриляцією передсердь в анамнезі (n = 33: 20 чоловіків та 13 жінок, середній вік 76 років [67÷79 років]). Пацієнти цієї групи крім стандартного лікування із застосуванням антикоагулянтних та антиагрегативних препаратів, отримували натрієву сіль CDP-холіну (препарат “Ronocit”, World Medicine, Велика Британія). Цитіколін призначався у вигляді внутрішньовенних інфузій (40-60 крапель на хвилину), 1000 мг на добу щоденно протягом 14-денного періоду. Контрольну групу складали 25 пацієнтів з фібриляцією передсердь (13 чоловіків та 12 жінок, середній вік 67 років [64÷77]), що перенесли інсульт, і лікувалися за стандартною схемою. За гендерною та віковою ознакою між групами не було вірогідної різниці (P > 0,05). Критеріями виключення при залученні пацієнтів до експерименту було обрано нещодавно перенесений гострий інфаркт міокарду (< 3 місяців), гострий коронарний синдром, гематологічні та онкологічні хвороби. Письмова згода була отримана від кожного пацієнта перед початком дослідження. Усі експериментальні процедури та протоколи відповідали вимогам Гельсінської декларації та були розглянуті та затверджені Комітетом з біоетики ДУ «Дніпропетровська медична академія» МОЗ України (протокол № 637/16-2 від 5.12.2016).

Кров було отримано з ліктьової вени за допомогою BD Vacutainer, що містив активатор згортання, натщесерце до початку лікування та на наступну добу після останнього введення цитіколіну. Згусток формувався за кімнатної температури протягом 30-60 хв. Далі сироватку відділяли центрифугуванням за 3 тис. g протягом 10 хв. за 15 ^{o}C. Отриману сироватку відбирали по 1 мл, переносили до пластикових пробірок типу «Епендорф», негайно заморожували та зберігали за –20 ^{o}C до початку імунохімічного аналізу.

Стандартні лабораторні тести (кількість тромбоцитів, швидкість зсідання еритроцитів та інші гематологічні параметри, концентрація загального

протеїну, холестеролу, тригліцеридів, глюкози, тощо) були виконані на початку дослідження та наприкінці курсу лікування для пацієнтів обох груп.

Рівні циркулюючих ангіостатину, GFAP та NF визначали із застосуванням відповідних антитіл з метою визначення ефектів цитіколіну на вміст цих протеїнів у сироватці крові, а отже, тестування їхньої потенційної маркерної ролі. Сироватку крові розводили буфером Леммлі у співвідношенні 1:5 (сироватка:буфер) та нагрівали до 90 ^{o}C протягом 5 хв. Усі зразки містили 10% β-меркаптоетанол, окрім тих, у яких визначали вміст ангіостатину. Зразки наносили на пластину 10% PAAG у кількості 100 мкг/лунка і розділяли електрофоретично. Після проведення електрофорезу протеїни переносили на нітроцелюлозні мембрани шляхом електроблоту, блоти проявляли методом ECL. Час експонування мембран на рентгенівській плівці залежав від інтенсивності сигналу хемілюмінісценції та тривав не більше 30 с. Після промивки у воді та висушуванні блотограми сканували та обробляли у програмі TL120 (TotalLab Ltd., США). Молекулярні маси імунореактивних зон верифікували, порівнюючи довжину їх електрофоретичного пробігу з протеїнами-стандартами з відомою молекулярною масою. Результати виражали у вигляді умовних одиниць (у.о.) як функції інтенсивності оптичної густини та площі зони імунозабарвлення. Усі кількісні дані виражали у вигляді середньої величини ± стандартної похибки середньої (M ± m).

2.13. Методи статистичної обробки результатів

Одержані в експериментальній частині роботи кількісні дані виражали у вигляді середньої величини (M) та її стандартної похибки (m). В експерименті щодо визначення плазміногену/ангіостатинів у тканинах доброякісних новоутворень середній рівень протеїнів виражали у медіанах. Розраховані середні величини представлено на гістограмах або у вигляді «боксів з вусами» (*‘box with whiskers’*), які одночасно відображають середню арифметичну, медіану, крайні величини (*min*, *max*), середнє квадратичне відхилення (SD) та

середню квадратичну похибку середньої (SEM). Для оцінки вірогідності міжгрупової різниці у випадку незалежних вибірок використовували непарний *t*-критерій Ст'юдента або непараметричний *U*-критерій Манна-Уітні. У випадку зв'язаних вибірок (експерименти по дослідженню впливу фармакологічних препаратів на вміст ангіостатинів у сироватці крові хворих із ССЗ) вірогідність змін між вибірковими величинами до та після лікування оцінювали з використанням парного *t*-критерію Ст'юдента. Для перевірки вірогідності різниці між груповими середніми статистичного комплексу, у якому кількість груп $\geq$ 3, використовували дисперсійний аналіз (ANOVA) з парним порівнянням середніх за допомогою *post-hoc* *U*-критерію Манна-Уітні. Щільність зв'язку між змінами рівнів ангіостатинів та показників ліпідного обміну і концентрацією С-реактивного протеїну визначали за допомогою коефіцієнту кореляції Пірсона *r*. В усіх експериментах статистичні показники, а також різницю між ними, вважали вірогідною при $P<0,05$. Статистичну обробку отриманих результатів та побудову ілюстративного матеріалу виконували із застосуванням ліцензійного пакету програм «OriginPro 8.6» (OriginLab Corp., США) або програми «Microsoft Office Excel 2016».

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Реципрокні взаємодії протеїнів плазміноген/плазмінової системи з тромбоцитами. Механізми модулювання плазміногеном ангіогенної функції тромбоцитів

3.1.1. Перебудови актинового цитоскелету тромбоцитів за дії Glu-та Lys-плазміногену

Результати агрегометричного аналізу, наведені на рисунку 3.1, свідчать, що попередня інкубація відмитих тромбоцитів з Lys-плазміногеном (1,2 мкМ) зменшує ступінь їхньої агрегації, стимульованої тромбіном (1,0 од. NIH/мл) або колагеном (1,25 мг/мл).

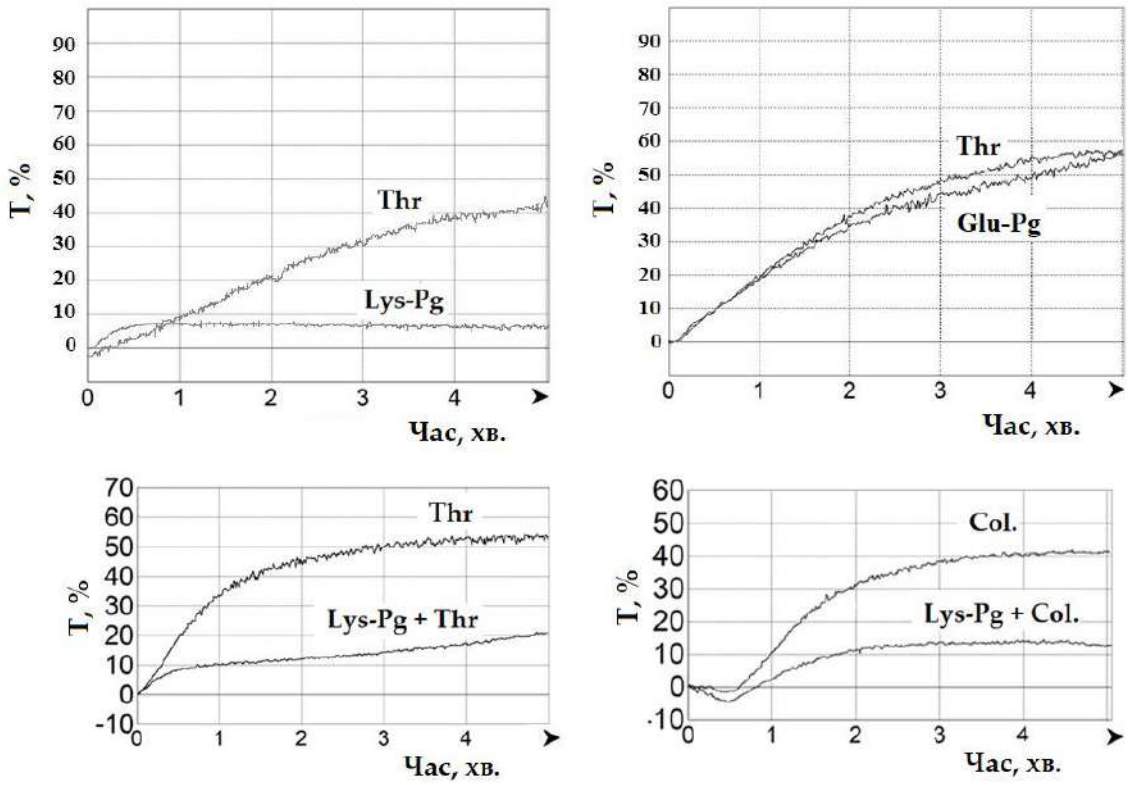

Рисунок 3.1 – Вплив Lys-плазміногену на тромбін- (Thr) та колаген (Col)-індуковану агрегацію відмитих тромбоцитів людини (типовий результат агрегатометричного аналізу, n = 3).

Максимальна амплітуда агрегатограми за активації тромбоцитів тромбіном становила у середньому 52,2 ± 7,8 %, тоді як у випадку попередньої інкубації тромбоцитів з Lys-плазміногеном ця величина знижувалася до 20,8 ± 3,5 % (P < 0,05). Максимальна величина амплітуди агрегації тромбоцитів за активації колагеном становила 41,1 ± 4,3 %, при цьому величина амплітуди зменшувалася до 12,8 ± 2,6 % (P < 0,05) після попередньої обробки тромбоцитів Lys-плазміногеном. Натомість, ані Glu-плазміноген, ані окремі його крингл-вмісні фрагменти істотно не впливали на агоніст-індуковану агрегацію тромбоцитів. Слід зазначити, що ізольований вплив жодної з форм плазміногену не спричиняв агрегацію відмитих тромбоцитів.

Відомо, що активація тромбоцитів індукує полімеризацію мономерних глобул G-актину та формування мембранного кортексу (МС) з утворенням єдиної філаментної мережі, що підтверджується нашими даними електрофоретичного розділення тромбоцитарних протеїнів, отриманих в результаті центрифугування за різних значень *g* (рис. 3.2).

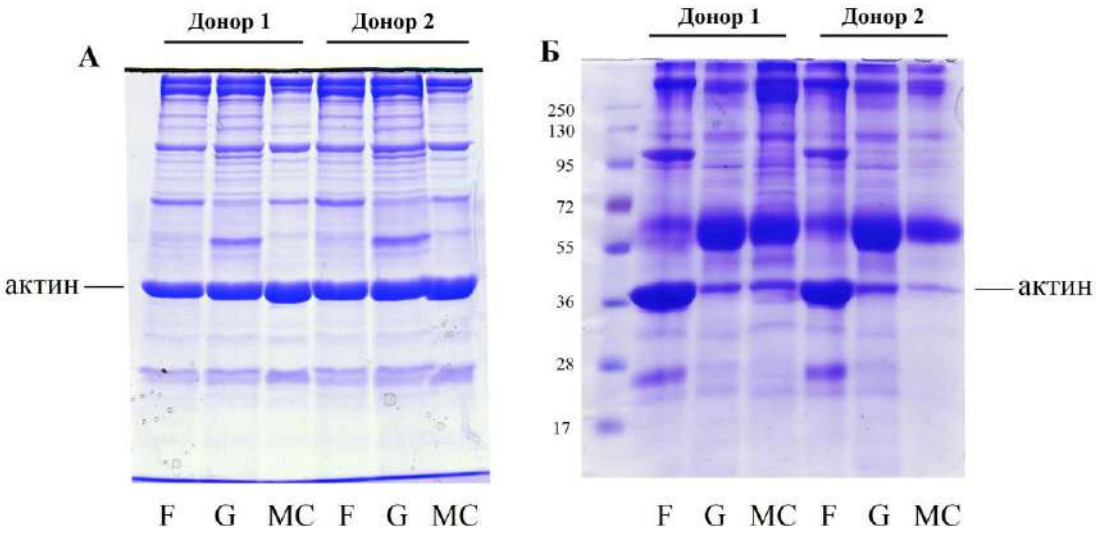

Рисунок 3.2 – Типові електрофореграми лізатів тромбоцитів, що містять різні фракції актину (F – філаментний актин, G – глобулярний актин, МС – актин мембранного кортексу): А – електрофореграма лізатів тромбоцитів, що знаходилися в стані фізіологічного спокою; Б – електрофореграма лізатів тромбоцитів, активованих 1,0 од. NIH/мл тромбіну.

Поліпептидна смуга 42 кДа відповідає молекулярній масі актину.

Співвідношення різних пулів актину було запропоновано для використання як чутливий показник, що характеризує стан цитоскелету клітини [158]. За допомогою імуноблот-аналізу різних фракцій актину відмитих тромбоцитів, що знаходяться в стані фізіологічного спокою (контроль), було показано, що філаментна (F) форма актину складає у середньому 55% від загальної кількості актину, тоді як на долю глобулярного (G) актину та актину мембранного кортексу (MC) приходиться 31 та 14 % відповідно (рис. 3.3).

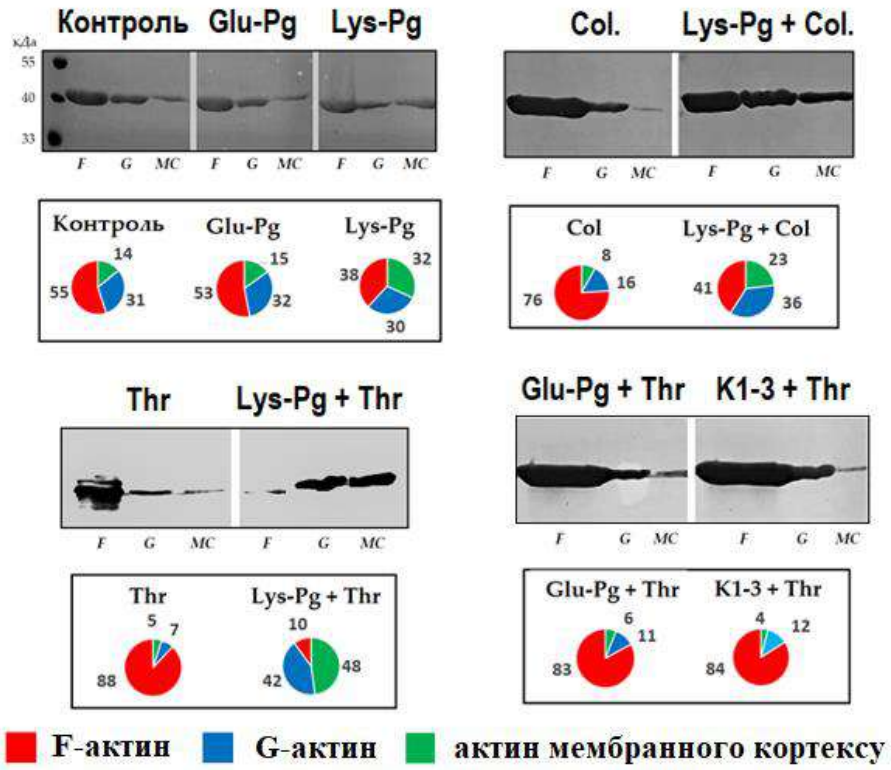

Рисунок 3.3 – Порушення Lys-плазміногеном перерозподілення пулів актину тромбоцитів, активованих тромбіном (Thr) або колагеном (Col) (F – філаментний актин, G – глобулярний актин, MC – актин мембранного кортексу, у відсотковому відношенні від загальної кількості актину): усереднені результати імуноблотингу, n = 3.

Ізольований вплив нативного зимогену в концентрації 1,2 мкМ не спричинив істотних змін співвідношення F -, G - та MC-форм актину (53, 32 та 15 % відповідно) у порівнянні з контролем. Натомість, Lys-плазміноген

спричинив статистично достовірні зміни співвідношення пулів актину в інтактних тромбоцитів: F - 38%, G - 30 та МС - 32% (P < 0,05, *U*-тест Манна-Уітні, n = 3).

Для дослідження впливу різних форм плазміногену на реорганізацію актинового цитоскелету тромбоцитів в експерименті використовувалися тромбін і колаген – найбільш потужні фізіологічні індуктори, дія яких викликає незворотну агрегацію тромбоцитів. Активація тромбоцитів як тромбіном, так і колагеном, призвела до суттєвого зменшення відносної кількості пулів G- и МС-актину за рахунок їхньої інкорпорації до власно філаментної складової цитоскелету. Так, у тромбоцитах, активованих колагеном, доля F-актину зросла до 76%, кількість G-актину становила 16%, а МС-актину – 8%. Тромбін спричинив ще більш глибоке перерозподілення різних пулів тромбоцитарного актину: F – 88, G – 7 та МС – 5%.

Отримані дані узгоджується з результатами, описаними авторами раніше [18, 203]: активація тромбоцитів індукує фібрилогенез, який супроводжується полімеризацією G-актину з формуванням філаментів і асоціацією МС з актиновими фібрилами. Фібрилогенез вважається однією з ранніх ознак активації тромбоцитів, у цитоплазмі яких вміст F-форми може сягати 90% від загальної кількості актину клітини [656]. Результати денситометричного аналізу блотограм, наведені на рис. 3.2, демонструють, що Lys-форма плазміногену перешкоджає адекватній агоніст-індукованій реорганізації актинового цитоскелету, інгібуючи полімеризацію мономерного (G) актину та включення актину мембранного кортексу (МС) до філаментного матеріалу тромбоцитів. Після дії стимуляторів на тромбоцити, що були попередньо інкубовані з Lys-плазміногеном, перерозподілу пулів актину, характерного для активованих тромбоцитів, не відбувається. У тромбоцитах, попередньо інкубованих з Lys-плазміногеном й далі активованих колагеном, відносний вміст F-актину становив усього 41%, натомість кількість G- та МС-форм актину зросла до 36 та 23% відповідно (P < 0,05 у порівнянні з тромбоцитами, активованими колагеном, *U*-тест Манна-

Уітні, n = 3). У тромбоцитах, попередньо оброблених Lys-плазміногеном та активованих тромбіном, на долю F-актину приходиться усього 10% від загального вмісту цього цитоскелетного протеїну, тоді як кількість G- та МС-актину складає 42 та 48% відповідно (P < 0,01 у порівнянні з тромбоцитами, активованими тромбіном, *U*-тест Манна-Уітні, n = 3). Отримані дані свідчать про більшу чутливість сигнальних шляхів, залежних від тромбіну, ніж механізмів активації тромбоцитів, асоційованих з дією колагену, до впливу Lys-плазміногену.

На відміну від Lys-форми, Glu-плазміноген та фрагмент його А-ланцюга К1-3 не впливали на реорганізацію актинового цитоскелету тромбоцитів, що свідчить про специфічні регуляторні ефекти саме Lys-форми плазміногену на процеси, що опосередковують сигналінг та подальшу агрегацію тромбоцитів. Як відомо, Lys-плазміноген, на відміну від нативного зимогену, має відкриту конформацію молекули, яка визначає його здатність ефективно зв'язуватися з адгезивними протеїнами тромбоцитів (фібронектином, тромбоспондіном, вітронектином), перешкоджаючи тромбоцитарній агрегації [691]. Більш виражені інгібувальні ефекти Lys-плазміногену на реконструкцію цитоскелету тромбоцитів за їхнього стимулювання тромбіном можуть також бути пов'язаними з десенситизацією PAR-рецепторів плазміном, який може утворюватися на поверхні плазматичної мембрани в результаті активації зимогену [340]. Раніше було показано, що плазмін здатний повільно розщеплювати рецептор PAR-4, головною функцією якого є забезпечення підтримання активного стану тромбоцитів за присутності надлишків тромбіну, що розглядається як один з найбільш важливих шляхів тромбоцитарного гемостазу [504]. Передача сигналів з PAR-рецепторів на $G_{12/13}$-протеїн активує RhoA-кіназу, яка стимулює фосфорилювання легких ланцюгів міозину MCL і таким чином бере участь у змінах форми цитоскелету. Крім того, RhoA безпосередньо залучається до секреції тромбоцитарних гранул [44]. Як відомо, цитоскелетні структури виконують не лише опорно-механічну функцію, але й виступають як

модулятори багатьох клітинних процесів, забезпечуючи інтегрин-опосередкований сигналінг. Інгібування процесів полімеризації актину та реорганізації актинового цитоскелету порушує адгезивні властивості інтегринів, що призводить до втрати тромбоцитами агрегативної здатності [158].

Результати визначення різних форм актину тромбоцитів свідчать про порушення Lys-плазміногеном адекватної реорганізації їхнього цитоскелету й корелюють з даними агрегометричного аналізу. Згідно з класичними уявленнями, послідовність біохімічних і клітинних процесів, які складають основу функціонування тромбоцитів у первинному гемостазі, включає чотири стадії: адгезію, активацію, секрецію й агрегацію [491]. Незважаючи на наявність великої кількості активаторів та їхніх рецепторів, тромбоцити мають обмежену кількість сигнальних шляхів та ефекторних механізмів. Зокрема, тромбін активує тромбоцити людини, зв'язуючись зі специфічними PAR-рецепторами (protease activated receptors) 1 та 4, відщеплюючи від них N-кінцеві пептиди. Це викликає активацію рецепторів і подальшу передачу сигналу через фосфоліпазу Cβ, котра, у свою чергу, розщеплюючи фосфатидилінозитол, призводить до утворення інозитол-3-фосфату та діацилгліцеролу. Обидва компоненти, що утворилися, є стимуляторами наступних реакцій, кінцевим результатом яких є активація протеїнтирозинкіназ, що відносяться до родин Src, FAK і Syk, вивільнення Ca^{2+} з ендоплазматичного ретикулуму та реорганізація актинового цитоскелету [84]. У випадку колаген-індукованої агрегації відбувається зв'язування активатору зі специфічним рецептором GPVI на плазматичній мембрані тромбоцитів. Активований рецептор передає сигнал на фосфоліпазу Cγ, а подальший шлях є подібним до описаного вище тромбін-залежного механізму [194]. Особливу роль у процесах активації і агрегації відіграє мережа мембранного кортексу (МС), яка сформована з коротких актинових філаментів, що знаходяться у комплексі з актинасоційованими протеїнами (спектрином, вінкуліном, таліном, α-актиніном, кіндліном та ін.). При активації сигнальних шляхів тромбоцитів актинові фібрили цитоплазми

асоціюють з МС з утворенням єдиної філаментної мережі. МС опосередковує взаємодію мембранних рецепторів з цитоскелетом клітини, утворюючи, з одного боку, стабільний комплекс з інтегрином GP IIb/IIIa, а з іншого – з філаментами цитоплазми. Передача сигналу через цитоскелетні протеїни, асоційовані з GP IIbIIIa (талін, кіндлін), призводить до активації інтегрину, який з більшою афінністю зв'язує адгезивні ліганди (фібриноген, фібронектин, вітронектин, фактор фон Вілебранда), що стабілізує агрегацію. Крім того, що цитоскелет регулює адгезивні властивості GP IIbIIIa, філаментні структури також контролюють кластеризацію молекул інтегрину у плазматичній мембрані [556]. У роботі [158] показано, що вплив на тромбоцити агентів-інгібіторів полімеризації актину (цитохалазін B, латрункулін A), тромбоцити втрачають здатність розпізнавати адгезивні ліганди та агрегувати навіть за присутності потужних індукторів. У свою чергу, взаємодія GP IIbIIIa з адгезивними лігандами стабілізує цитоскелет тромбоцитів і сприяє організації філаментів у стрес-фібрили, характерні для фокальних контактів [299].

Раніше в науковій літературі висловлювалося припущення про те, що зв'язування Glu- і Lys-плазміногену з тромбоцитами здійснюється завдяки їхній взаємодії з адгезивними протеїнами (головним чином, фібриногеном, тромбоспондином, вітронектином), які вивільняються тромбоцитами в ході їхньої активації, або конкуренції з цими лігандами за сайти зв'язування на мембранних рецепторах активованих тромбоцитів [431]. Показано, що сорбція плазміногену на поверхні тромбоцитів, стимульованих тромбіном, забезпечується фібрином, який утворюється з фібриногену внаслідок дії тромбіну. У той самий час припускається, що взаємодія плазміногену з неактивованими тромбоцитами не залежить від фібрин(оген)у, і потребує наявності додаткових центрів зв'язування [432]. Результати представленої дисертаційної роботи щодо самостійного впливу Lys-плазміногену на цитоскелет неактивованих тромбоцитів також свідчать на користь існування альтернативних механізмів взаємодії між плазміногеном та тромбоцитом.

Необхідні подальші дослідження з метою ідентифікації специфічних рецепторів Lys-плазміногену на плазматичній мембрані інтактних й стимульованих тромбоцитів, активація котрих впливає на функціонування ключових сигнальних шляхів клітини, що регулюють динаміку актинового цитоскелету. Індуковані Lys-плазміногеном зміни можуть спричиняти аберантну зборку мембранного кортексу, перешкоджаючи інтеграції останнього з філаментною мережею актинового цитоскелету. Раніше було показано, що цитоскелет деяких клітин є чутливим до впливу фрагментів плазміногену, що складаються з декількох кринглових доменів (ангіостатинів). Так, у роботі [483] було показано, що ангіостатин К1-3 ефективно пригнічує міграцію моноцитів/макрофагів саме через дезорганізацію актинового цитоскелету цих клітин. Автори припускають, що К1-3 може індукувати дисоціацію актинових філаментів внаслідок взаємодії на поверхні моноцитів/макрофагів з протеїном ангіомотином, який відповідає за формування актинових фібрил і клітинну рухливість. Ще одним протеїном, який претендує на роль рецептору плазміногену, може бути власно β-актин, який експонується на поверхні плазматичної мембрани деяких клітин, у тому числі й активованих тромбоцитів [221, 615]. Існують дані про те, що «поверхневий» актин є фізично асоційованим з внутрішньоклітинним філаментним апаратом цитоплазми, а його поява не пов’язана з клітинною загибеллю [470]. Отже, не виключено, що до зв’язування плазміногену з поверхнею тромбоцитів задіяний актин, і ця взаємодія стимулює сигналювання, яке призводить до дезорганізації внутрішньоклітинної цитоархітектоніки тромбоцитів. Можливо, що визначений у нашій роботі вплив Lys-плазміногену на цитоскелет є одним з механізмів регулювання клітинної активності, спільним для цілої молекули та для деяких його крингл-вмісних похідних. У подальших дослідженнях у рамках представленої роботи було підтверджено факт залучення експонованого актину до зв’язування плазміногену з тромбоцитами [620].

Заслуговує на увагу той факт, що актиновий цитоскелет тромбоцитів людини виявився не чутливим до дії нативної форми зимогену. Як припускалося раніше [13], відсутність антиагрегативної активності Glu-плазміногену може пояснюватися його більш закритою у порівнянні з Lys-формою конформацією, внаслідок чого центри міжмолекулярного розпізнавання, що знаходяться у кринглових доменах, опиняються недоступними для взаємодії зі специфічними лігандами. Не дивлячись на те, що плазміноген циркулює у плазмі виключно у вигляді Glu-форми [433], представлені дані демонструють виконання Lys-плазміногеном важливої біологічної функції як регулятора клітинних процесів. Встановлено, що Lys-плазміноген регулює агрегативну активність тромбоцитів через модулювання стану актинового цитоскелету, а отже, виступає регулятором функціонального стану цих форменних елементів крові.

3.1.2. Вплив плазміногену на екзоцитоз α-гранул тромбоцитів та експонування Р-селектину

Секреція, або дегрануляція, тромбоцитів є ключовим етапом, необхідним для їхньої подальшої активації та індукції другої (незворотної) хвилі агрегації. До того ж, речовини, що містяться в складі α-гранул, визначають участь тромбоцитів не лише у процесах згортання крові, але й в регулюванні ними функціонального стану інших клітин крові та ендотелійних клітин, що відіграє ключове значення у репаративних процесах [64]. Як відомо, в результаті агоніст-індукованої активації тромбоцитів, що супроводжується екзоцитозом їхніх α-гранул, відбувається експонування глікопротеїну Р-селектину (CD62) на поверхні плазматичної мембрани [35]. Тому цей протеїн використовується як чутливий і специфічний маркер активації тромбоцитів, а його детекція методом протокової цитофлуориметрії застосовується для точної оцінки впливу різних речовин на функціональний стан тромбоцитів *in vitro* та *in vivo* [428]. Завданням наступної частини

роботи було оцінити вплив різних форм плазміногену на вивільнення α-гранул тромбоцитів *ex vivo* за змінами експонування Р-селектину на поверхні їхньої плазматичної мембрани. Нами продемонстровано вплив Lys-форми плазміногену на секреторну активність тромбоцитів та можливість модулювання цим протеїном агоніст-індукованого екзоцитозу (рис. 3.4).

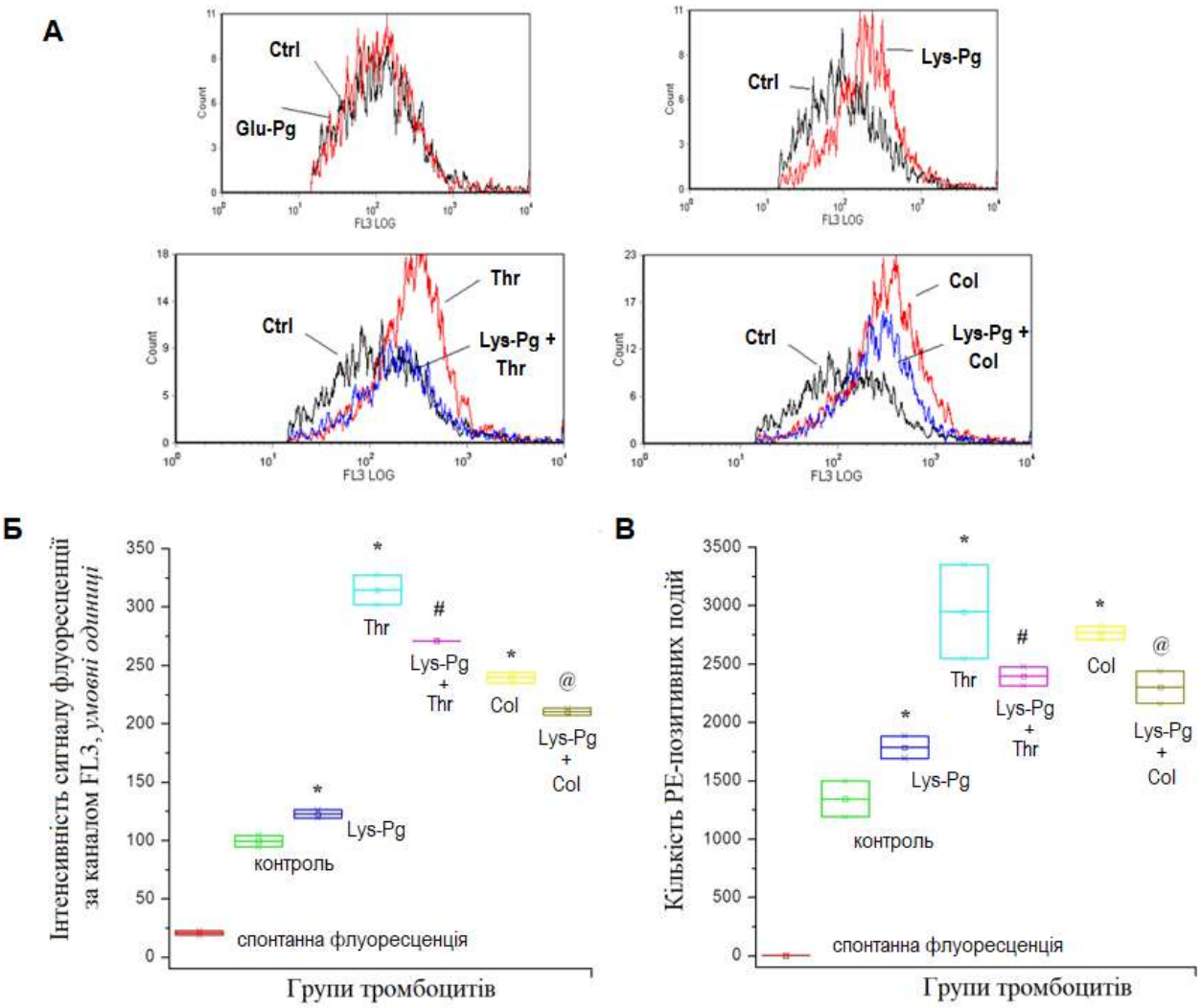

Рисунок 3.4 – Вплив Lys-плазміногену на секрецію α-гранул відмитими тромбоцитами людини (за даними цитофлуориметричного визначення рівня експонованого Р-селектину, канал FL3, PE-кон'юговані антитіла): А – гістограми величини сигналу флуоресценції за каналом FL3, Б – рівень інтенсивності флуоресценції PE-позитивних тромбоцитів, В – кількість Р-селектин-позитивних подій. * – $P < 0,05$ порівняно з контролем; # – $P < 0,05$ порівняно з тромбоцитами, активованими тромбіном (Thr); @ – $P < 0,05$ порівняно з тромбоцитами, активованими колагеном (Col), $n \geq 3$).

Значну інформативну цінність має вимірювання величини інтенсивності флуоресцентного сигналу, яка відображає рівень експонування досліджуваного маркеру екзоцитозу. У разі стимулювання тромбоцитів тромбіном (1,0 од. NIH/мл) спостерігається істотний зсув піку кривої флуоресценції праворуч від контрольної кривої (рис. 3.4А), що відповідає підсиленню сигналу флуоресценції у 3,5 рази у порівнянні з цим показником для інтактних клітин (P < 0,05) (рис. 3.4Б). Вплив колагену (1,25 мг/мл) призвів до підсилення експонування Р-селектину у 2,5 рази у порівнянні з інтактними тромбоцитами (P < 0,05). Інтенсивність флуоресценції PE-позитивної популяції тромбоцитів за умов впливу Lys-плазміногену перевищувала контрольне значення в 1,4 рази (P < 0,05). На відміну від Lys-форми, нативний зимоген не викликав статистично достовірних змін секреторної активності тромбоцитів. Отримані результати збігаються з попередніми даними, які свідчать, що нативна форма плазміногену не впливає на стан актинового цитоскелету тромбоцитів і не змінює їхньої агрегативної активності (висвітлено у підрозділі 3.1.1). Попередня інкубація тромбоцитів з Lys-плазміногеном частково пригнічувала агоніст-стимульовану секрецію α-гранул, про що свідчить статистично достовірне зменшення флуоресцентного сигналу порівняно з цим показником у клітин за ізольованої дії тромбіну або колагену (P < 0,05).

За результатами цитофлуориметричного аналізу, частка Р-селектин-позитивних клітин у зразках інтактних тромбоцитів (контроль) становила 48±4,6% від їхньої загальної кількості (рис. 3.4В). Згідно з даними літератури, кількість спонтанно активованих тромбоцитів залежить від способу їхнього отримання та варіює від 50 до 92% [367], тому одержані за нашою методикою клітини були придатні для подальшої роботи з ними. Інкубація відмитих тромбоцитів з тромбіном (1,0 од. NIH/мл) протягом 5 хв. призвела до практично повного перерозподілу тромбоцитів до популяції Р-селектин-позитивних клітин (97±2,3%, P < 0,05 порівняно з контролем). Активація тромбоцитів колагеном (1,25 мг/мл) спричинила секрецію 82±0,8%

тромбоцитів, P < 0,05 порівняно з контролем). Інкубація тромбоцитів з Glu-плазміногеном не призвела до істотних змін секреторної активності досліджуваних клітин (51±5,2 %, P > 0,05 порівняно з контролем). Натомість, ізольований вплив Lys-плазміногену (1,2 мкМ) викликав статистично вірогідне зростання пулу тромбоцитів, що презентують P-селектин (78±2,1%, P < 0,05 порівняно з контролем). Останнє спостереження свідчить про те, що, порівняно з дією тромбіну, вплив Lys-плазміногену спричиняє лише часткове вивільнення α-гранул чутливими популяціями тромбоцитів. Важливий результат отримано в ході експериментів з тромбоцитами, попередньо інкубованими з Lys-плазміногеном та стимульованими тромбіном або колагеном. Показано, що попередня інкубація тромбоцитів з Lys-плазміногеном призводить до зменшення чутливості клітин до дії тромбіну й, відповідно, зменшення долі P-селектин-позитивних клітин у середньому до 85±1,6% (P < 0,05, у порівнянні з тромбіном). Попередня інкубація тромбоцитів з Lys-плазміногеном призвела до зменшення секреторної активності внаслідок впливу колагену (74±1,4%, P > 0,05, у порівнянні з колагеном). В усіх паралельних експериментах після впливу Glu-плазміногену (1,2 мкМ) кількість P-селектин-позитивних тромбоцитів залишалася на рівні контролю. Glu-плазміноген також не впливав на вивільнення α-гранул тромбоцитів після їхньої активації тромбіном або колагеном [15]. Отже, на підставі даних, отриманих за допомогою протокової цитофлуориметрії, встановлено, що Lys-форма плазміногену пригнічує агоніст-індуковану дегрануляцію тромбоцитів, зменшуючи як кількість P-селектин-позитивних клітин, так і рівень експонування маркерного протеїну P-селектину.

Раніше було показано [562], що плазміноген здатний інгібувати плазмін-індуковану активацію та секрецію тромбоцитів, однак, повного їхнього інгібування не спостерігалося навіть за присутності зимогену у кількості, що у чотири рази перевищує концентрацію ензиму. Цей факт свідчить про те, що плазмін та Lys-плазміноген впливають на різні механізми

тромбоцитарного сигналювання. Нами встановлено, що інгібувальні ефекти Lys-плазміногену по відношенню до секреторної активності тромбоцитів корелюють з порушенням ним реконструкції актинового цитоскелету, індуковану тромбіном [615]. Відомо, що актинові мікрофіламенти контролюють трафік гранул усередині тромбоциту, їхню централізацію, фузію та релізінг [664]. Можливо, що аберантна реорганізація цитоскелету, індукована Lys-плазміногеном, перешкоджає екзоцитозу тромбоцитів за присутності таких потужних індукторів активації, як тромбін та колаген. Можливо, що саме зрушення цитоскелетних структур, викликане Lys-плазміногеном, спричинює лише часткову секрецію α-гранул, але водночас зменшує чутливість тромбоцитів до дії агоністів.

Можливо, що модулювальні ефекти Lys-плазміногену на вивільнення α-гранул тромбоцитів визначається особливостями конформації цієї молекули, насамперед, її кринглових доменів, а для реалізації ефектів Lys-плазміногену необхідна цілісність молекули. На відміну від нативного зимогену, який вільно циркулює у плазмі, Lys-плазміноген здатний утворюватися на поверхні деяких клітин крові, і цей процес суворо регулюється клітиною у залежності від її функціонального стану [689]. За допомогою антитіл, специфічних до Lys-плазміногену, цю форму протеїну вперше виявлено в плазмі крові пацієнтів, що проходили тромболітичну терапію [273]. Пізніше було доведено, що генерування Lys-плазміногену відбувається локально на поверхні фібринового згустку або плазматичній мембрані клітин, саме тому він не циркулює у вільному стані у системному кровотоці здорових донорів. Тромбоцити – не єдині клітини крові, на яких відбувається конвертація Glu-плазміногену в Lys-форму. Досліджено механізм перицелюлярної активації плазміногену на поверхні моноцитів [689] та ендотеліоцитів [229, 255] через стадію утворення Lys-форми. Автори цитованих робіт підкреслюють важливість того, що генерування Lys-плазміногену забезпечує високу ефективність перицелюлярної активації зимогену з утворенням плазміну. Показано, що плазмін у кількості 0,8 CU/мл індукував секрецію та агрегацію відмитих тромбоцитів, які

пригнічувалися за присутності 50 IU/мл апротиніну, що вказує на провідну роль у цих процесах протеолітичної активності плазміну [562]. З'ясовано, що плазмін здатний активувати тромбоцити через повільне розщеплення рецептора PAR-4 [504]. Однак, інкубація тромбоцитів за присутності меншої кількості плазміну (0,2 CU/мл) призвела до практично повного пригнічення агрегації. При цьому плазмін інгібував внутрішньоклітинні процеси, індуковані тромбіном, а саме: вивільнення серотоніну та зростання вмісту цитозольного Ca^{2+} [323]. Множинний характер ефектів плазміну на функціональний стан тромбоцитів свідчить про існування різних шляхів внутрішньоклітинного сигналювання, на які можуть впливати плазміноген й плазмін. Очевидно, що різні структурно-функціональні частини цих протеїнів визначають специфіку відповіді тромбоцитів. Раніше нами було показано, що апротинін не впливає на кількість P-селектин-позитивних клітин та сигналу флуоресценції тромбоцитів, попередньо оброблених Lys-плазміногеном та стимульованих тромбіном [16]. Отримані результати дозволяють припустити, що вплив Lys-плазміногену на механізми тромбоцитарної секреції обумовлений не появою протеїназної активності, а, більш вірогідно, опосередковується його крингловими доменами.

Отримані результати становлять значний інтерес у контексті біологічних функцій P-селектину (CD62). Цей глікопротеїн, що експонується активованими тромбоцитами, є основним компонентом, який бере участь у взаємодії тромбоцитів з нейтрофілами та моноцитами і, таким чином, відповідає за утворення тромбоцитарно-лейкоцитарних агрегатів [426]. Крім того, як рецептор, P-селектин відіграє значну роль у стабілізації тромбоцитарних агрегатів, а також залучається до ролінгу тромбоцитів на поверхні активованих ендотелійних клітин [206]. Надзвичайно інтригуючими виглядають нещодавно опубліковані результати, які описують гетерогенність популяцій тромбоцитів, які входять до складу тромбу, саме за експонуванням на їхній поверхні P-селектину [143]. Згідно з цими даними, серцевину (кор) тромбу складають щільно упаковані P-селектин-позитивні тромбоцити, які оточені оболонкою, побудованої з P-селектин-негативних, дифузно розташованих, тромбоцитів.

Отримані нами результати свідчать про те, що один зі шляхів обмеження Lys-плазміногеном агрегативної активності тромбоцитів та їхніх адгезивних властивостей реалізується через модулювання цим протеїном вивільнення тромбоцитарних α-гранул та пригнічення агоніст-індукованого експонування Р-селектину.

Отже, результати дисертаційного дослідження розширюють уявлення про механізми дії та фізіологічне значення Lys-плазміногену в регулюванні функціональної активності тромбоцитів. Очевидно, що біологічне значення цього протеїну полягає не лише в участі у процесах, пов'язаних з утворенням плазміну, але й виконанням ролі молекули-модулятору функціональної активності тромбоцитів, яка не властива ані Glu-формі плазміногену, ані плазміну. Отже, у представленому дослідженні встановлено, що Lys-форма плазміногену інгібує агоніст-стимульовану агрегацію тромбоцитів через блокування перебудови актинового цитоскелету, що корелює з пригніченням вивільнення α-гранул й експонування Р-селектину. Отримані дані можуть бути корисними для розроблення принципово нових підходів для корекції низки патологій, асоційованих з надактивністю тромбоцитів та надмірним тромбоутворенням (рис. 3.5).

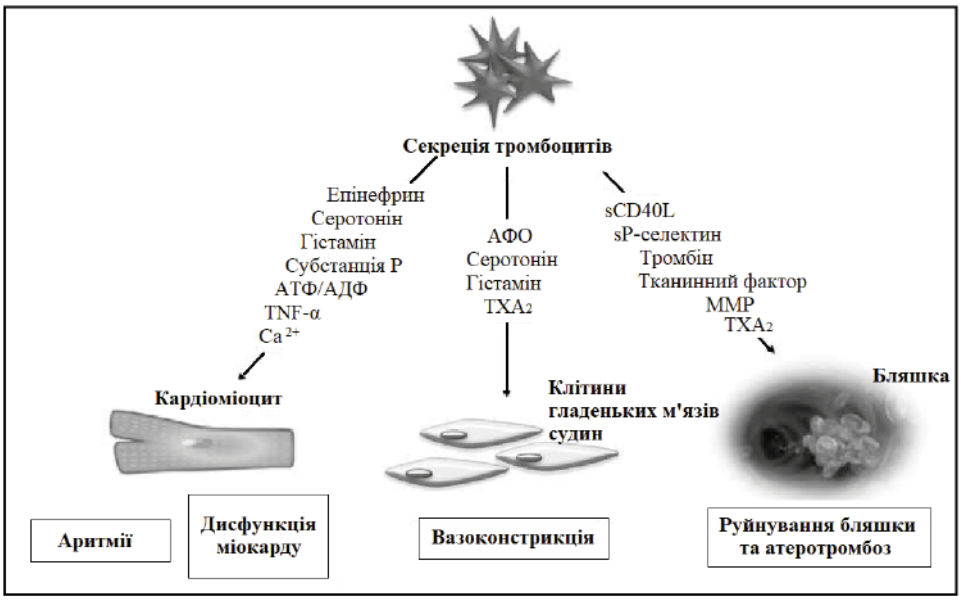

Рисунок 3.5 – Участь протеїнів тромбоцитарного секретому в розвитку серцево-судинних хвороб [516].

3.1.3. Вплив плазміногену на вивільнення VEGF тромбоцитами

Наступним завданням дисертаційної роботи було дослідити вплив різних форм плазміногену на вивільнення фактору росту ендотелійних клітин (VEGF) тромбоцитами людини. Як відомо, в ході екзоцитозу α-гранул активовані тромбоцити вивільняють фактори росту, цитокіни, медіатори та інші регуляторні протеїни, які регулюють різні фізіологічні та патофізіологічні процеси, зокрема, ангіогенез, проникність капілярів, запалення, імунну відповідь, загоєння, тощо [85, 218]. Тромбоцити є головним джерелом VEGF у плазмі крові, вивільнення якого у місці пошкодження судини має вирішальне значення для активації ендотеліоцитів та активації репаративного ангіогенезу [532]. VEGF тромбоцитарного походження також залучається до підтримання ангіогенезу, індукованого пухлинами [661]. Потенційні модулювальні ефекти Lys-плазміногену на агоніст-індуковане вивільнення VEGF у представленій роботі досліджували за допомогою його імунохімічної детекції у релізатах та лізатах тромбоцитів, які знаходилися у стані фізіологічного спокою (контроль), або стимульованих фізіологічними індукторами, відповідно до схеми, представленої на рисунку 3.6.

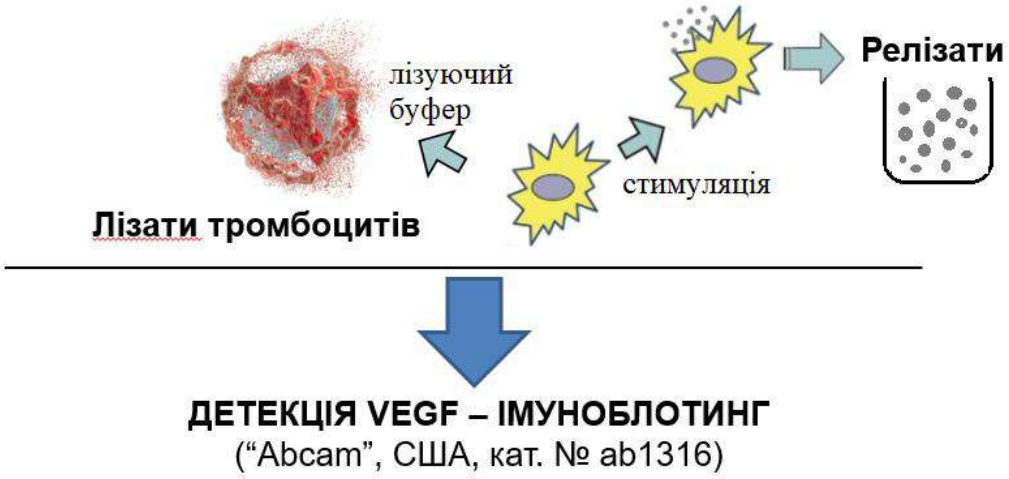

Рисунок 3.6 – Дизайн експерименту щодо дослідження впливу плазміногену на вивільнення VEGF тромбоцитами людини.

Результати імунохімічного визначення VEGF у зразках лізатів та релізатів інтактних й оброблених різними формами плазміногену тромбоцитів представлено на рисунку 3.7. Тромбоцитарний VEGF визначався імуноблотингом, головним чином, як димер з M_m 45 кДа (рис. 3.7А). Показано, що у зразках інтактних тромбоцитів (контроль) практично весь VEGF знаходився у лізатах клітин, тоді як VEGF в інкубаційному середовищі (релізатах) виявлявся лише у слідових кількостях. Появу незначної кількості VEGF у релізатах інтактних тромбоцитів (контроль) можна пояснити їхньою спонтанною активацією в ході маніпуляцій, пов'язаних з пробопідготовкою (величина розподілення вмісту VEGF у релізатах та лізатах дорівнює 0,04, рисунок 3,7Б). Вивільнення VEGF з тромбоцитів за дії Glu- та Lys-плазміногену можна пояснити перетворенням зимогену на поверхні тромбоцитарної мембрани на плазмін, який повільно розщеплює PAR-рецептори, сприяючи частковій секреції фактору росту.

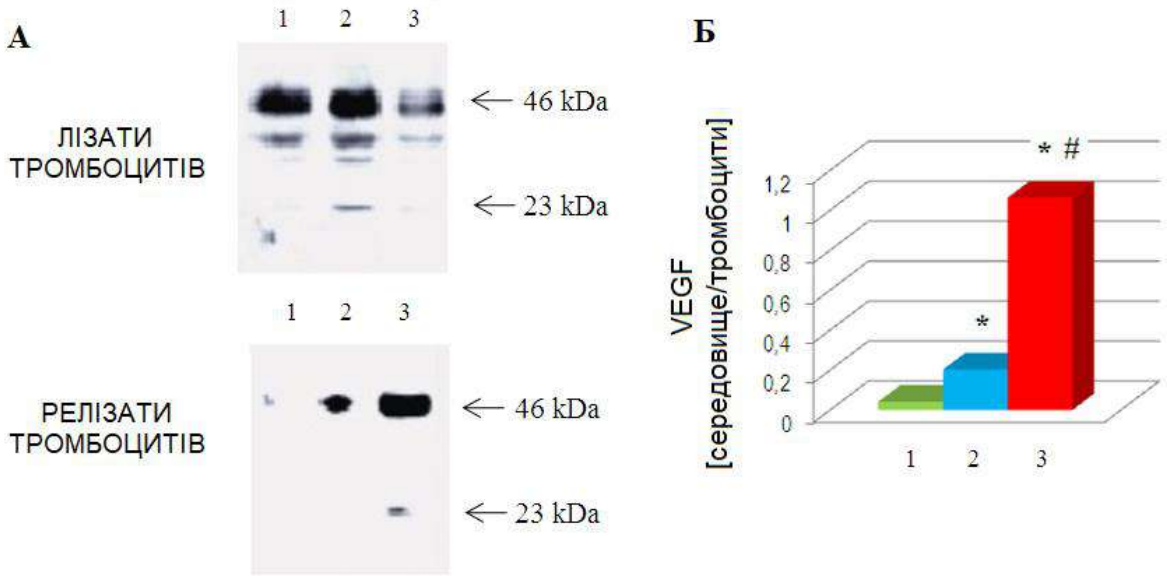

Рисунок 3.7 – Вплив Glu- та Lys-форм плазміногену на вивільнення VEGF відмитими тромбоцитами людини: А – типові блотограми VEGF лізатів та релізатів тромбоцитів; Б – результати денситометричного аналізу рівнів VEGF (медіани): 1 – контроль, 2- Glu-плазміноген, 3 – Lys-плазміноген.

* – $P < 0,05$ порівняно з контролем, # – $P < 0,05$ порівняно з Glu-плазміногеном (*U*-тест Манна-Уітні).

Більш інтенсивне вивільнення VEGF тромбоцитами під впливом Lys-плазміногену (величина співвідношення рівнів VEGF дорівнює 1,06) у порівнянні з нативним зимогеном (величина співвідношення рівнів VEGF становить 0,2) може свідчити про більш швидке перетворення Lys-форми протеїну на плазмін або на існування специфічних механізмів впливу на вивільнення VEGF-вмісних α-гранул тромбоцитів. Існують дані, які свідчать про утворення плазміну з плазміноген, що значно прискорюється на поверхні активованих тромбоцитів [364].

Результати імунохімічної детекції VEGF у зразках агоніст-стимульованих тромбоцитів, наведені на рисунку 3.8, свідчать про активацію секреції VEGF фізіологічними агоністами, інтенсивність якої має концентраційну залежність. Так, вплив тромбіну, взятого у кількості 0,1 та 1,0 од. NIH/мл, дозозалежним чином сприяє вивільненню VEGF (величини співвідношення рівнів VEGF між середовищем та тромбоцитами в середньому становлять 0,86 та 8,75). На блотограмі, представленій на рисунку 3.8А, у випадку дії високої кількості тромбіну (1,0 од. NIH/мл) спостерігалося практично повне вивільнення VEGF з активованих тромбоцитів, про що свідчить відсутність відповідної імунореактивної смуги в лізаті активованих клітин та її поява в інкубаційному середовищі. Попередня інкубація тромбоцитів з Lys-плазміногеном (1,2 мкМ) частково запобігала тотальній дегрануляції тромбоцитів, внаслідок чого значна доля VEGF залишилася в тромбоцитах навіть після їхньої активації 1,0 од.NIH/мл тромбіну (величина співвідношення рівнів VEGF у цьому випадку становить 0,54).

Привертає увагу також той факт, що у зразках лізатів тромбоцитів цієї групи, разом з поліпептидом M_m ~ 45 кДа, що відповідає поліпептиду-димеру VEGF, виявляється група більш низькомолекулярних імунореактивних поліпептидів з M_m близько 20 кДа. Ці поліпептиди можуть бути продуктами деградації VEGF, яку здійснює плазмін, що утворився з Lys-плазміногену на поверхні активованих тромбоцитів.

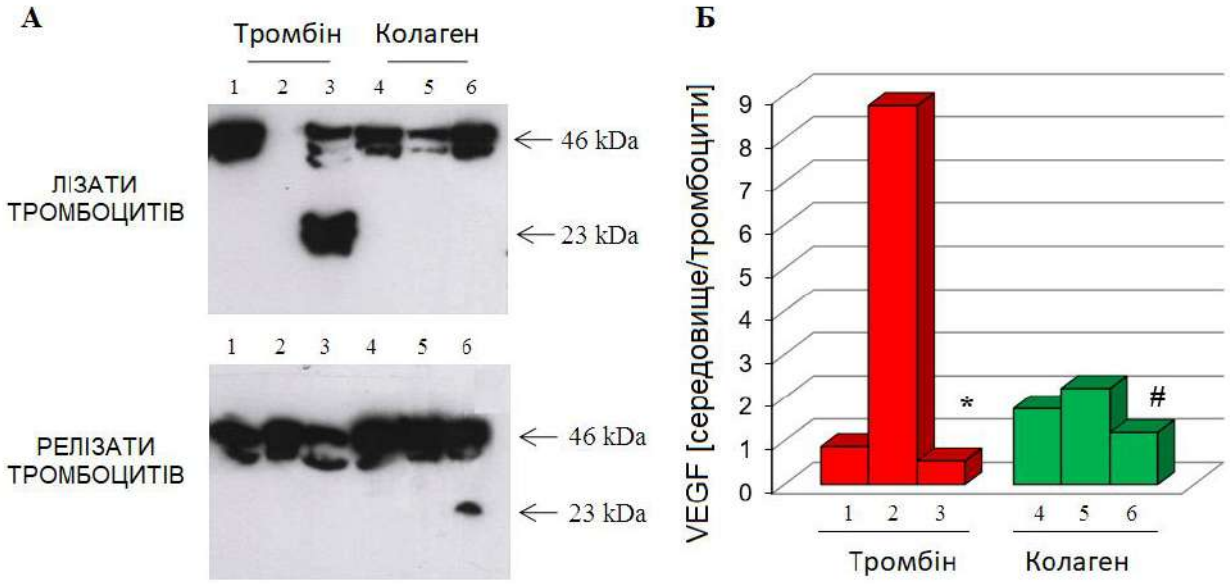

Рисунок 3.8 – Пригнічення Lys-плазміногеном агоніст-стимульованого вивільнення VEGF тромбоцитами: А – типовий результат імуноблот-аналізу VEGF у лізатах та релізатах тромбоцитів (1 – тромбін 0,1 од. NIH/мл, 2 – тромбін 1,0 од. NIH/мл, 3 – Lys-плазміноген 1,2 мкМ + тромбін 1,0 од. NIH/мл, 4 – колаген 0,125 мг/мл, 5 – колаген 1,25 мг/мл, 6 – Lys-плазміноген 1,2 мкМ + колаген 1,25 мг/мл; Б – рівень VEGF у лізатах та релізатах тромбоцитів (середні величини представлено у вигляді медіан).

* – $P < 0,05$ порівняно з групою тромбін (1,0 од. NIH/мл), # – $P < 0,05$ порівняно з групою колаген (1,25 мг/мл), $n = 3$.

На відміну від стимулювання тромбіном, активація тромбоцитів колагеном викликала лише часткове вивільнення VEGF навіть за використання цього агоністу в субмаксимальній концентрації 1,25 мг/мл (величина співвідношення рівнів VEGF становила 2,22). Рівень VEGF у релізатах тромбоцитів, активованих колагеном у кількості 0,125 мг/мл, лише в 1,75 рази перевищував вміст фактору росту, що залишився у клітинах. Попередня інкубація тромбоцитів з Lys-плазміногеном призвела до затримки вивільнення VEGF під час їхньої подальшої стимуляції колагеном у кількості 1,25 мг/мл (величина співвідношення рівнів VEGF зменшилася до 1,89). Отримані результати вказують на більш виражені інгібіторні ефекти Lys-

плазміногену на вивільнення VEGF у випадку стимулювання клітин тромбіном (пригнічення секреції у 16,2 рази), ніж колагеном (у 1,17 рази), що вказує на чутливість саме тромбін-залежних механізмів екзоцитозу тромбоцитів до дії Lys-плазміногену. Тим не менш, Lys-плазміноген сприяв вивільненню низькомолекулярної форми VEGF з колаген-стимульованих тромбоцитів, на відміну від клітин, активованих тромбіном, у яких деградований VEGF залишався у зв'язаному з ними вигляді. З джерел літератури відомо, що плазмін здатний відщеплювати гепаринзв'язувальний пептид, який міститься на С-кінці основної ізоформи VEGF-A (VEGF165), що призводить до втрати біологічної активності ростового фактору [526]. Деградація VEGF плазміном може мати негативні наслідки, зокрема, для процесів, що супроводжують загоєння ран. У дослідах *in vivo* показано, що маскування плазмін-специфічного сайту протеолізу в молекулі VEGF (Arg110-Ala111) сприяло збереженню біологічної активності ростового фактору та значно поліпшувало перебіг репаративного ангіогенезу та регенерації тканин у ранах піддослідних тварин навіть за умов підвищеної протеолітичної активності у рановому ложі [526]. З іншого боку, інгібування біологічної активності VEGF може проявляти терапевтичні ефекти за патофізіологічних станів, асоційованих з надмірним ангіогенезом. Wu та ін. [666] показали, що введення плазміну до склоподібної порожнини ока тваринам за моделі відшарування скловидного тіла сприяє швидкому кліренсу VEGF, запобігаючи таким чином неоваскуляризації ока та сприяючи кращому світлопропусканню.

Тромбоцити виступають активними учасниками процесів згортання крові, а також беруть безпосередню участь у репарації пошкоджень ендотелію судин. В ході адгезії та активації тромбоцити вивільняють вміст гранул, які, крім агоністів та адгезивних лігандів, містять велику кількість біологічно активних сполук, у тому числі, цитокінів та факторів росту. Основними цитокінами, які входять до складу тромбоцитарних α-гранул, є трансформуючий фактор росту β (TGF-β), тромбоцитарний фактор росту

(PDGF), інсуліноподібний фактор росту (IGF-I, IGF-II), фактор росту фібробластів (FGF), епідермальний фактор росту (EGF) та інші. Фактори росту та мітогени відіграють ключову роль у проліферації та диференціації ендотеліоцитів, фібробластів та клітин гладеньких м'язів, хемотаксисі та ангіогенезі [227].

Зокрема, фактор росту ендотеліоцитів судин (VEGF), відомий ще як «фактор проникності ендотелію судин» (VPF), або васкулотропін, є найбільш потужним мітогеном по відношенню до ендотеліоцитів. VEGF є протеїном з M_m ~ 34-42 кДа, що існує у вигляді гомодимерів. Поліпептиди ізоформ VEGF є продуктами альтернативного сплайсингу та складаються з 121, 165, 189 та 206 амінокислотних залишків. В організмі людини найголовнішу роль відіграє ізоформа VEGF-A. Крім цього, до родини VEGF відносяться такі протеїни, як VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D та гомологічний VEGF плацентарний фактор росту (PGF). VEGF індукує та контролює проліферацію, диференціацію та виживання ендотеліоцитів через взаємодію з трьома типами рецепторів, що проявляють тирозинкіназну активність й розташовані на поверхні плазматичної мембрани: flt-1 (VEGFR-1), flk-1 (VEGFR-2) та flt-4 (VEGFR-3). VEGF стимулює проліферацію ендотеліоцитів навіть за наномолярних концентрацій та є більш потужним індуктором проникності судин за гістамін. Відомо також, що VEGF є хемоатрактантом для моноцитів, тучних клітин та періцитів, функціонуючи таким чином як прозапальний цитокін. Підсилення експресії мРНК VEGF спостерігається за дії таких факторів росту, як EGF, TGF-β та IL-1β та Il-6 [198].

VEGF синтезують та продукують клітин різних гістотипів, у тому числі стромальні та епітелійні пухлинні клітини, однак, найголовнішим джерелом цього протеїну в крові є тромбоцити. Показано, що тромбоцити та їхні клітини-попередники (мегакаріоцити) містять як мРНК VEGF, так і власно молекули-транскрипти [532]. Miyazono та ін. [441] у 1985 р. вперше припустили можливу участь певного тромбоцитарного фактора в процесах регулювання активності ендотеліоцитів. Виділений ними та очищений

хроматографічно протеїн відрізнявся за властивостями як від PDGF, так і від PD-ECGF, і був гомологічний VEGF-A, активуючи проліферацію ендотеліоцитів, але не фібробластів. Пізніше Maloney та співавтори [408] у дослідах на ізольованих тромбоцитах людини показали принципову можливість вивільнення VEGF у відповідь на стимуляцію тромбіном. У тромбоцитах VEGF локалізований у складі специфічних α-гранул і секретується в ході адгезії й агоніст-індукованої активації у місці пошкодження інтими кровоносної судини [42]. Втім, механізми синтезу, інтерналізації, акумуляції в α-гранулах та вивільнення VEGF тромбоцитами досліджено недостатньо, так само потребують детального вивчення залучення тромбоцитарного пулу VEGF до патогенезу хвороб, асоційованих з порушенням ангіогенезу.

Таким чином, з одного боку тромбоцити, є джерелом анаболічних цитокінів, які забезпечують активацію компенсаторного ангіогенезу за умов гіпоксії/ішемії та репаративного ангіогенезу за загоєння ран. VEGF бере участь у васкулогенезі за ембріонального розвитку та виконує функцію регулятору репаративного ангіогенезу за пошкодження тканин [218, 505]. У літературі описано застосування VEGF або клітин, що його синтезують, в ангіогенній терапії з метою лікування хронічних ран, у тому числі трофічних виразок шкіри пацієнтів з цукровим діабетом. Використання збагаченої тромбоцитами плазми у комплексному лікуванні венозних виразок створює сприятливі умови для перебігу репаративних процесів у виразці, що впливає на якість дозрівання і диференціювання сполучнотканинних регенератів та прискорює крайову епітелізацію [151]. З іншого боку, VEGF активно залучається до розвиткунизки патофізіологічних процесів, пов’язаних із стимуляцією активності ендотеліоцитів та надмірним ангіогенезом (пухлинний ріст та метастазування, діабетична ретинопатія, псоріаз та ін.) [454]. Відомо, що тромбоцити пацієнтів з онкологічними хворобами містять більшу кількість VEGF у порівнянні зі здоровими донорами [324]. Існування зв’язку між тромбоцитарним пулом VEGF та пухлинним ростом

безпосередньо встановлено у дослідженні [249], автори якого описали механізм «експлуатації» тромбоцитів клітинами пухлин, спрямований на запуск секреції гранул, навантажених індукторами ангіогенезу. Таким чином, функціонально необґрунтована активація секреції тромбоцитів асоційована з пухлинним ростом та метастазуванням (особливо за раку грудної залози, колоректального раку, гліом III-IV ступеня злоякісності), ревматоїдним артритом та вітреоретинальною патологією. Інгібування індукованої пухлинами неоваскуляризації становить значну фармакологічну проблему, в першу чергу, через набуття неопластичними клітинами резистентності до більшості антиангіогенних препаратів [19]. Ці та інші дані дають змогу припустити, що пригнічення надмірної активності тромбоцитів за патологічних станів можна розглядати не лише з позицій зниження ризику тромбоутворення, але й з метою обмеження про-ангіогенних властивостей тромбоцитів як однієї з ключових ланок, що контролюють ріст пухлин, їхню прогресію та метастазування. Беручи до уваги отримані нами результати, пригнічення агоніст-індукованій дегрануляції тромбоцитів Lys-плазміногеном може бути одним з альтернативних підходів анти-ангіогенної терапії, спрямованих на запобігання патологічного ангіогенезу.

Крім тромбіну секрецію VEGF стимулюють колаген, ADP та епінефрин. Нещодавно встановлено, що MMP-2 (желатиназа A), яка продукується тромбоцитами, епітелійними та ендотелійними клітинами, макрофагами та фібробластами, діє як синергіст в ході агоніст-індукованого релізінгу VEGF [542]. Встановлено, що дія кожного типу агоністу на вивільнення VEGF реалізується дозозалежним чином та характеризується певними пороговими величинами, що свідчить про існування множинних механізмів, які здійснюють тонке регулювання вивільнення ростового фактору. Важливо зауважити, що активатори та інгібітори ангіогенезу в тромбоцитах сегрегуються в різних типах α-гранул, а їхнє вивільнення відбувається диференційовано та реалізується через активацію різних сигнальних шляхів. Radziwon-Balicka та співавтори [506] продемонстрували, що VEGF та

ендостатин/ангіостатин не співлокалізовані в тромбоцитах, а їхнє вивільнення в ході стимульованої секреції розмежовано у часі, що, можливо, має фізіологічне значення, дозволяючи здійснювати координоване регулювання проліферативної активності та міграції ендотеліоцитів у місці пошкодження судини. Так, активація рецептору PAR1 призводить до вивільнення VEGF, тоді як активація PAR4 – ендостатинів [189]. Існує думка, що екзоцитоз VEGF є ранньою відповіддю на дію агоністів і навіть передує стадії агрегації тромбоцитів [227]. Автори згаданої роботи [506] припускають, що активаторна дія VEGF по відношенню до ендотеліоцитів врівноважується більш пізнім викидом та/або утворенням *de novo* супресорів ангіогенезу – ендостатинів та ангіостатинів. Цікаво, що тромбоцити здатні інтерналізувати циркулюючий у плазмі VEGF в ході енергозалежного процесу, що реалізується через утворення інвагінацій тромбоцитарної мембрани з подальшим утворенням ендосом, навантажених захопленими протеїнами [584]. Не виключено, що завдяки підвищеній ендоцитозній активності тромбоцитів, що спостерігається у пацієнтів із злоякісними новоутвореннями, ці форменні елементи крові здатні акумулювати велику кількість VEGF та брати участь в активації та підтримці ангіогенезу в пухлинах [324]. У літературі описано здатність клітин раку грудної залози MCF-7 та MDA-MB-231 стимулювати секрецію VEGF та вивільнення інших проангіогенних факторів з тромбоцитів [296]. Клітини гліобластоми людини, секретуючи ADP та тромбін, рекрутують та активують тромбоцити, локальна активація котрих супроводжується вивільненням факторів росту та посиленим ростом судинної мережі пухлини [157]. Слід зазначити, що при цьому пухлинні клітини запускають механізми, наразі невідомі, що інгібують утворення та вивільнення з тромбоцитів як ендостатинів, так і ангіостатинів. Визначення концентрації тромбоцитарного VEGF може мати прогностичне значення при діагностиці злоякісних новоутворень. Встановлено позитивну кореляцію між вмістом тромбоцитарного VEGF та негативним прогнозом виживання пацієнтів з різними онкологічними хворобами [360].

Результати, висвітлені у цьому підрозділі дисертаційної роботи, значною мірою узгоджуються з нашими даними стосовно модулювальних ефектів Lys-плазміногену на експонування специфічного маркеру екзоцитозу тромбоцитів Р-селектину [16]. Хоча існуютчі відомості, що ефекти Lys-плазміногену на експонування Р-селектину не залежать від активності серинпротеїназного домену, утворення плазміну та його вплив на тромбоцитарні рецептори, що відповідають за дегрануляцію тромбоцитів, не можна виключати. Показано, що плазмін у кількості 0,8 CU/мл здатний повільно розщеплювати рецептор PAR-4 (низькоафінний тромбіновий рецептор), спричиняючи активацію тромбоцитів та вивільнення вмісту частини α-гранул [504], що підтверджується й нашими даними про індукцію Lys-плазміногеном неповного екзоцитозу як Р-селектину, так і VEGF. За більш низьких концентрацій (0,2 CU/мл) плазмін викликає десенситизацію PAR-1 – високоафінного тромбінового рецептору [340]. Цим можна пояснити зменшення чутливості тромбоцитів до дії тромбіну й, як наслідок, інгібувальний ефект на екзоцитоз та вивільнення VEGF. Не виключено, що супресорна дія Lys-плазміногену по відношенню до колаген-індукованої секреції VEGF також може мати місце завдяки впливу плазміну на рецептори, що відповідають за екзоцитоз. У роботі [544] продемонстровано, що плазмін у кількості 0,1-0,5 CU/мл пригнічував агрегацію тромбоцитів, індуковану колагеном у концентрації 12,5 мкг/мл. Відомо, що колаген-індукована активація тромбоцитів відбувається завдяки його взаємодії з інтегриновим рецептором α2β1 та глікопротеїном GPVI [125], які можуть у свою чергу також слугувати мішенями для плазміну. Оскільки процеси тромбоцитарної дегрануляції регулюються через взаємодію сигнальних протеїнів та мембранних рецепторів з цитоскелетом [664], то перешкоджання Lys-плазміногеном агоніст-індукованій реорганізації актинових мікрофіламентів може робити вагомий внесок до пригнічення секреторної активності тромбоцитів. Оскільки утворення Lys-плазміногену в субпорогових кількостях не відбувається на поверхні неактивованих тромбоцитів, то

фізіологічний сенс його антитромботичних ефектів може полягати у модулюванні функціональної відповіді клітин після їхньої активації. Таким чином, Lys-плазміноген, утворення якого на плазматичній мембрані може контролюватися клітиною та залежить від її функціонального стану, залучений до регулювання ангіогенних властивостей тромбоцитів. На існування множинних механізмів модулювальної активності Lys-плазміногену вказують результати наших попередніх досліджень, а також дані літератури стосовно того, що тромбоцити можуть використовувати плазміноген й для утворення *de novo* інгібіторів росту судин – ангіостатинів [306, 625]. Отже, інгібувальний вплив Lys-плазміногену на агоніст-індуковану секрецію VEGF тромбоцитами є одним з механізмів, за яким ця форма плазміногену може обмежувати ангіогенний потенціал тромбоцитів у місці їхньої локальної активації та агрегації.

3.1.4. Експонування актину тромбоцитами

Наступним завданням роботи було визначити здатність тромбоцитів експонувати актин на поверхні плазматичної мембрани та з'ясувати його роль як можливого сайту зв'язування та процесінгу плазміногену з утворенням ангіостатинів. Рівні експонованого актину на поверхні тромбоцитів визначали за допомогою протокової цитофлуориметрії, результати вимірювань наведено на рисунку 3.9. Дані цитофлуориметричного аналізу свідчать, що близько 12% інтактних тромбоцитів (контроль) від їхньої загальної кількості, презентують актин на поверхні плазматичної мембрани. Стимуляція тромбоцитів тромбіном супроводжується драматичним зростанням рівня експонування цього протеїну: за впливу тромбіну вже у кількості 0,1 од. NIH/мл актин презентують 88% тромбоцитів, а за дії 0,5 та 1,0 од. NIH/мл тромбіну – 94 та 98% клітин (рис. 3.9А). Кількість тромбоцитів, що презентують актин, зросла до 80, 85 та 90 % за умов стимуляції колагеном у кількості 0,125, 0,6 та 1,25 мг/мл відповідно.

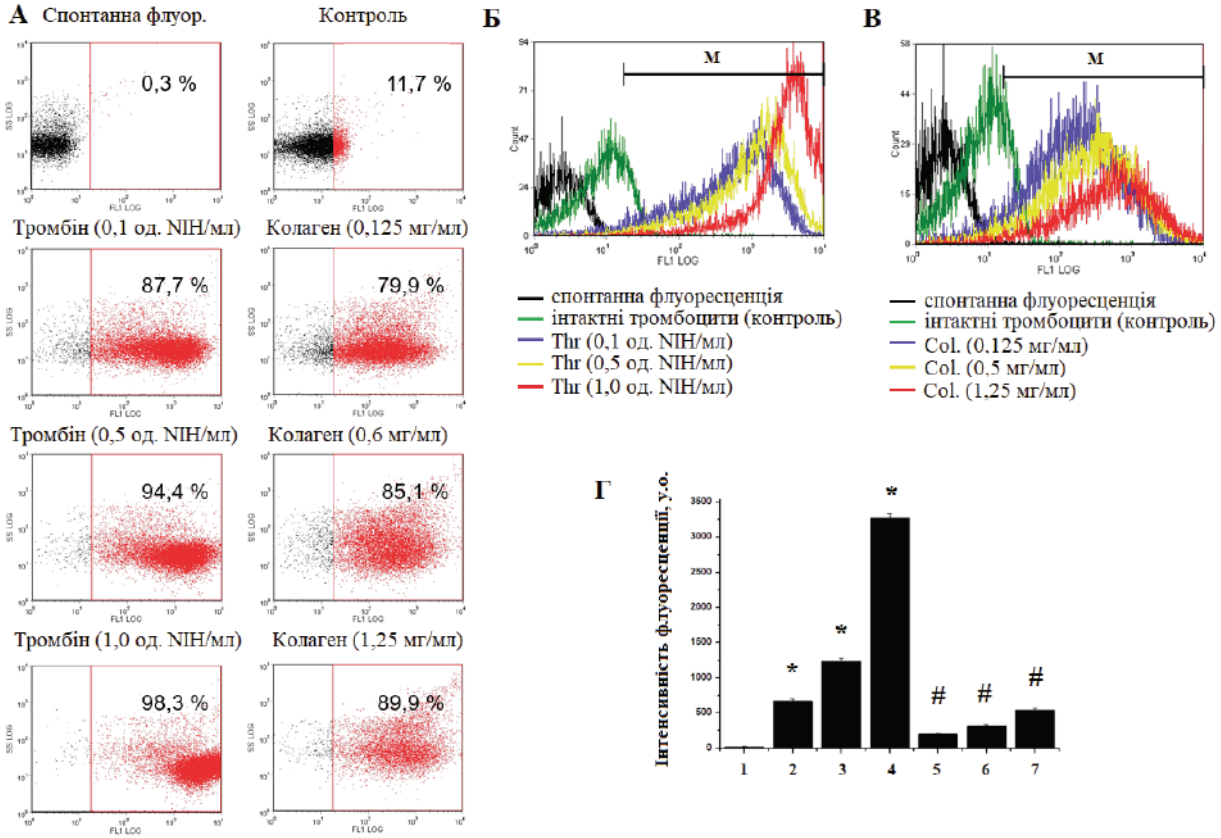

Рисунок 3.9 – Експонування актину на поверхні плазматичної мембрани тромбоцитів (дані протокової цитофлуориметрії): А – репрезентативні точкові гістограми розподілення популяцій тромбоцитів за експонуванням актину (тромбоцити, що презентують актин, позначено червоним кольором); Б – інтенсивність сигналу флуоресценції FITC-мічених антитіл проти актину, що зв'язалися з тромбоцитами, активованими тромбіном (детекція за каналом FL1); В – інтенсивність сигналу флуоресценції FITC-мічених антитіл проти актину, що зв'язалися з тромбоцитами, стимульованими колагеном (детекція за каналом FL1); Г – рівень інтенсивності флуоресценції FITC-мічених антитіл до актину, що зв'язалися з тромбоцитами: 1 – контроль, 2 – тромбін 0,1 од. NIH/мл, 3 – тромбін 0,5 од. NIH/мл, 4 - тромбін 1,0 од. NIH/мл, 5 – колаген 0,125 мг/мл, 6 – колаген 0,6 мг/мл, 7 – колаген 1,25 мг/мл. М – гейт, що обмежує популяцію тромбоцитів з FITC-позитивним сигналом.

* – $P < 0,001$, # – $P < 0,01$ порівняно з контролем ($n = 3$).

Результати вимірювання рівнів сигналу актин-позитивної флуоресценції демонструють, що тромбін є значно потужнішим активатором експонування актину тромбоцитами, ніж колаген (рис. 3.9Б,Г). Вплив тромбіну в кількості 0,1, 0,5 та 1,0 од. NIH/мл підсилює специфічний сигнал флуоресценції тромбоцитів у 30, 54 та 143 рази відповідно у порівнянні з контролем ($P < 0,001$). Натомість найбільша кількість колагену, взята для стимуляції тромбоцитів (1,25 мг/мл), спричиняє збільшення рівнів експонування актину в 24 рази порівняно з інтактними клітинами ($P < 0,01$). Ці відмінності в інтенсивності дії двох фізіологічних агоністів по відношенню до здатності тромбоцитів експонувати актин, імовірно, пов'язані з активацією різних сигнальних шляхів, які відповідають за перебудови актинового цитоскелету та фазових переходів плазматичної мембрани. Отриманий результат свідчить про здатність тромбоцитів швидко змінювати склад експонованих протеїнів під час стимулювання навіть низькими кількостями агоністів (зростання кількості актин-позитивних тромбоцитів). Залежне від концентрації агоністу підсилення сигналу флуоресценції у популяції актин-позитивних тромбоцитів вказує на зростання рівня експонованого актину в залежності від концентрації стимуляторів.

Для дослідження динамічних особливостей експонування актину на поверхні тромбоцитів їх активували тромбіном у кількості 0,2 од. NIH/мл, оскільки відомо, що цей агоніст у низькій кількості здатний викликати активацію тромбоцитів, що не супроводжується при цьому істотною агрегацією клітин [688]. Тому використання тромбіну у низькій концентрації дозволяє провести детекцію змін складу поверхневих протеїнів, що не пов'язана з явищем агрегації. Результати протокової цитофлуориметрії, наведені на рисунку 3.10, демонструють зростання рівня експонованого актину в ході інкубації з агоністом у період з 0,5 по 60 хв. після внесення агоніста.

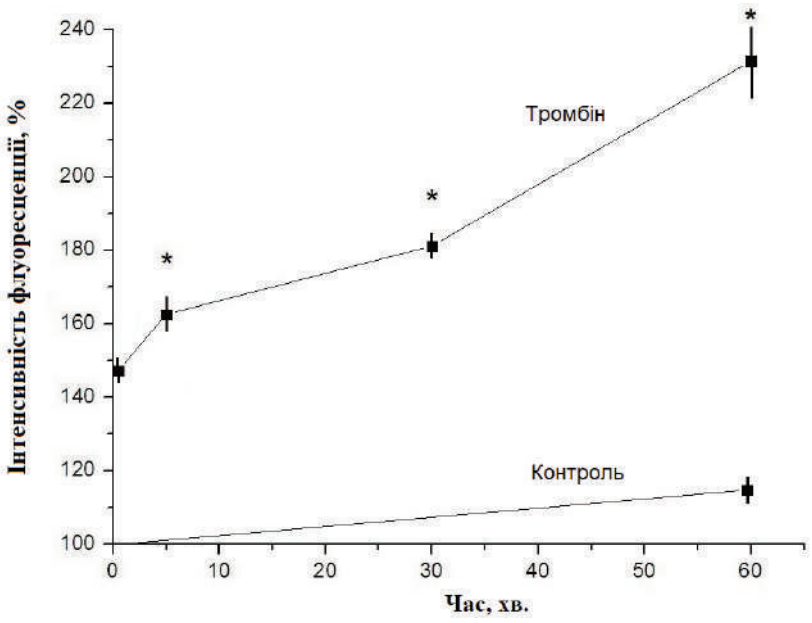

Рисунок 3.10 – Динаміка експонування актину на поверхні тромбоцитів, активованих 0,2 од. NIH/мл тромбіну: * - P < 0.05 у порівнянні з попередньою часовою точкою (*U*-тест Манна-Уітні, n = 3).

Слід звернути увагу на той факт, що найбільш інтенсивне зростання рівня експонованого актину (на 48% від початкового значення) спостерігалося протягом перших 0,5 хв. після внесення тромбіну до суспензії відмитих тромбоцитів. Спираючись на це спостереження, можна зазначити, що максимальна інтенсивність тромбін-індукованого експонування актину співпадає у часі із секреторною активністю стимульованих тромбоцитів. Однак, на більш пізніх етапах, що досліджувалися, інтенсивність актин-позитивного сигналу продовжувала зростати, сягаючи 230% через 60 хв. після ініціації активації, тоді як в інтактних тромбоцитах ця величина збільшувалася у межах 10-15% від початкового рівня. Тому можна припустити, що секреція не є основним процесом, що забезпечує появу цього протеїну цитоскелета на поверхні тромбоцитарної мембрани. Крім того, використання в експерименті тромбоцитів, фіксованих ПФА, унеможливлювало отримання хибнопозитивних результатів, пов’язаних з інтерналізацією молекул антитіл-імуноглобулінів тромбоцитами.

Актин є найбільш масовим протеїном тромбоцитів, у яких він представлений переважно β- та γ-ізоформами, як й у випадку більшості нем'язових клітин. Концентрація актину в тромбоцитах становить 0,55 мМ, кількість копій молекул актину – 2 млн. на клітину. З цих молекул 800 тис. асоціюють з утворенням 2-5 тис. лінійних актинових полімерів, які формують мікрофіламенти тромбоцитарного цитоскелету [203, 261]. Стимуляція тромбоцитів тромбіном або колагеном через активацію PAR-рецепторів та рецептору GPVI відповідно супроводжується перебудовами актинового цитоскелету, які опосередковують зміни морфології тромбоцитів, їхню адгезивність, експонування прокоагулянтної мембрани, секрецію щільних та α-гранул й появу на поверхні мембрани деяких цитоплазматичних протеїнів [11]. Імовірно, що експонування актину є однією зі стадій реорганізації тромбоцитарного цитоскелету – процесу, необхідного для виконання тромбоцитами своєї функції як у системі гемостазу, так і для залучення до репаративних процесів.

Різноманіття пулів актину у клітині не обмежується мономерною, полімеризованою та асоційованою з плазматичною мембраною формами. З'являється все більше експериментальних робіт, результати яких свідчать, що різні ізоформи актину можуть експонуватися на зовнішньому боці плазматичної мембрани клітин. Само по собі явище локалізації цитоскелетного та скоротливого протеїну, який до того ж не має специфічної сигнальної послідовності, притаманної трансмембранним протеїнам, на поверхні клітини є біологічним феноменом [588]. До перших повідомлень про актин, розташований на екстрацелюлярному боці плазматичної мембрани, віднеслися з великою долею скепсису, вважаючи, що дослідники мають справу з артефактами, пов'язаними з недосконалістю та недостатньою специфічністю застосованих методів [570]. Зокрема, критичні припущення стосувалися можливості неспецифічної сорбції антитіл до актину на поверхні мембрани або їхньої перехресної взаємодії з іншими протеїнами, пошкодження мембрани клітин у ході аналізу й візуалізації

цитоплазматичних актинових структур. Висувалися думки, що поява актину на поверхні клітин, що культивуються, відбувається внаслідок сорбції тих молекул актину, які потрапили до поживного середовища внаслідок загибелі та руйнування клітин. Джерелами позаклітинного актину, який міг сорбуватися на поверхні клітин *in vitro*, могли бути деякі компоненти самого кондиційного середовища, зокрема, сироватка крові [527]. Однак, згодом, за допомогою високочутливих методів та підходів з використанням специфічних антитіл та мічених молекул (протокової цитометрії, конфокальної та імуноелектронної мікроскопії тощо) було беззаперечно доведено, що «неоантиген», який з'являється на поверхні плазматичної мембрани, імунохімічно та структурно тотожний різним ізоформам актину [570]. Більш того, встановлено, що поверхневий актин зберігає фізичний зв'язок з актиновими мікрофіламентами цитоплазми клітини [50]!

Механізми транслокації актину – протеїну, у складі якого відсутня класична сигнальна послідовність, притаманна секреторним протеїнам, на поверхню тромбоцитов, а також механізми асоціації актину з компонентами плазматичної мембрани, залишаються невідомими. Можливо, що поява актину на зовнішньому боці плазматичної мембрани асоційована зі змінами фосфоліпідного складу останньої та формуванням ліпідних рафтів, індукованим дією агоністу [238]. Автори роботи [369] припускають існування спеціального механізму транспорту актину у комплексі з іншими протеїнами, які виконують функцію переносників. Наприклад, гельзолін, будучи актинзв'язувальним протеїном, є можливим кандидатом на роль такого транспортеру актину, оскільки цей протеїн здатний проникати крізь ліпідний бішар плазматичної мембрани завдяки наявності специфічного сигнального пептиду. Отже, можна припустити, що експонування актину асоційовано з формуванням ліпідних рафтів та блеббінгу плазматичної мембрани тромбоцитів під час їхньої активації [79]. Наприклад, клітини медулярної карциноми грудної залози експонують актин, максимальна щільність якого приходиться на ділянки апоптотичних блеббів [259].

Експонований актин, залишаючись інтегрованим з внутрішньоклітинною цитоскелетною мережею, може виконувати певні рецепторні функції, які наразі залишаються недослідженими. Присутність актину на поверхні плазматичної мембрани активованих тромбоцитів є феноменом, пов'язаним зі змінами мембранного протеому та появі «неоантигенів» (серед яких актин є одним з найбільш масових), було раніше описано в двох публікаціях [221, 610], однак, основні характеристики цього процесу та його функціональне значення на певний час залишалися поза увагою. Отримано вагомі докази того, що експонування актину залежить від фізіологічного стану клітини. Так, трансформовані або стимульовані мітогенами лімфоцити експонують на своїй поверхні значно більшу кількість актину, ніж інтактні лімфоцити, причому екстрацелюлярна локалізація актину є притаманною лише В-, але не Т-лімфоцитам На противагу цим клітинам, активація моноцитів U-937, які у спокійному стані презентують актин, призводить до зникнення (втягування) цього протеїну з поверхні мембрани [470]. Отже, експонування актину тромбоцитами є ознакою їхньої агоніст-індукованої активації.

У представленому дисертаційному дослідженні вперше за допомогою методу протокової цитофлуориметрії було встановлено достовірне зростання кількості тромбоцитів, що презентують актин, а також збільшення рівня експонованого актину на поверхні плазматичної мембрани після стимуляції тромбоцитів фізіологічними агоністами. Тромбін виявився більш потужним індуктором експонування актину тромбоцитами у порівнянні з колагеном. За допомогою МТТ-тесту було показано, що експонування актину не було пов'язано із загибеллю тромбоцитів (розділ *3.1.7*). Роль «поверхневого» актину в функціонуванні тромбоцитів у системі згортання або інших фізіологічних процесах потребує детального дослідження. У літературі існують лише поодинокі повідомлення стосовно цього питання. За даними авторів [290], локалізований на поверхні тромбоцитів актин може зв'язувати полімеризований фібрин, чим забезпечується додаткова механічна напруга,

необхідна для ретракції тромбоцитарного згустку. На важливість експонованого актину для процесу агрегації тромбоцитів вказують результати експериментів з клітинами хворих на тромбастенію Гланцмана (за цього розладу тромбоцити характеризуються низьким агрегаційним потенціалом). Разом з дефіцитом інтегринового рецептору GPIIbIIIa, який відповідає за зв'язування тромбоцитів з адгезивними субстратами, у таких клітин спостерігаються низькі рівні експонованого актину [221]. Припускається, що актин тромбоцитарної поверхні разом з інтегринами виконують роль сайтів зв'язування ефекторів, залучаючись, таким чином, до регулювання клітинної машинерії тромбоцитів. Як з'ясувалося, актин з високою афінністю взаємодіє з деякими протеїнами плазми крові, серед яких особливу увагу привертають компоненти плазміноген/плазмінової системи [88, 642]. Не виключено, що актин, локалізований на поверхні тромбоцитів, забезпечує їхню взаємодію з плазміногеном та його активаторами, виконуючи роль сайту зв'язування, активації та процесінгу зимогену, що супроводжується утворенням біологічно активних фрагментів цього протеїну.

3.1.5. Участь експонованого актину в зв'язуванні плазміногену тромбоцитами

Спираючись на дані літератури стосовно того, що різні ізоформи актину взаємодіють з плазміногеном з утворенням стабільних комплексів (K_d = 70-140 нМ) [642], було сформульовано наступне завдання дисертаційної роботи, яке полягало у перевірці гіпотези про здатність актину, експонованого на поверхні плазматичної мембрани тромбоцитів, зв'язувати плазміноген. Результати протокової цитофлуориметрії, представлені на рисунку 3.11, свідчать, що активація тромбоцитів сприяє збільшенню кількості FITC-міченого похідного плазміногену, яке зв'язується з клітинами. Кількість інтактних тромбоцитів (контроль), які володіли здатністю

зв’язувати плазміноген, становила, у середньому, 35% від загальної кількості клітин, що було проаналізовано (рис. 3.11А).

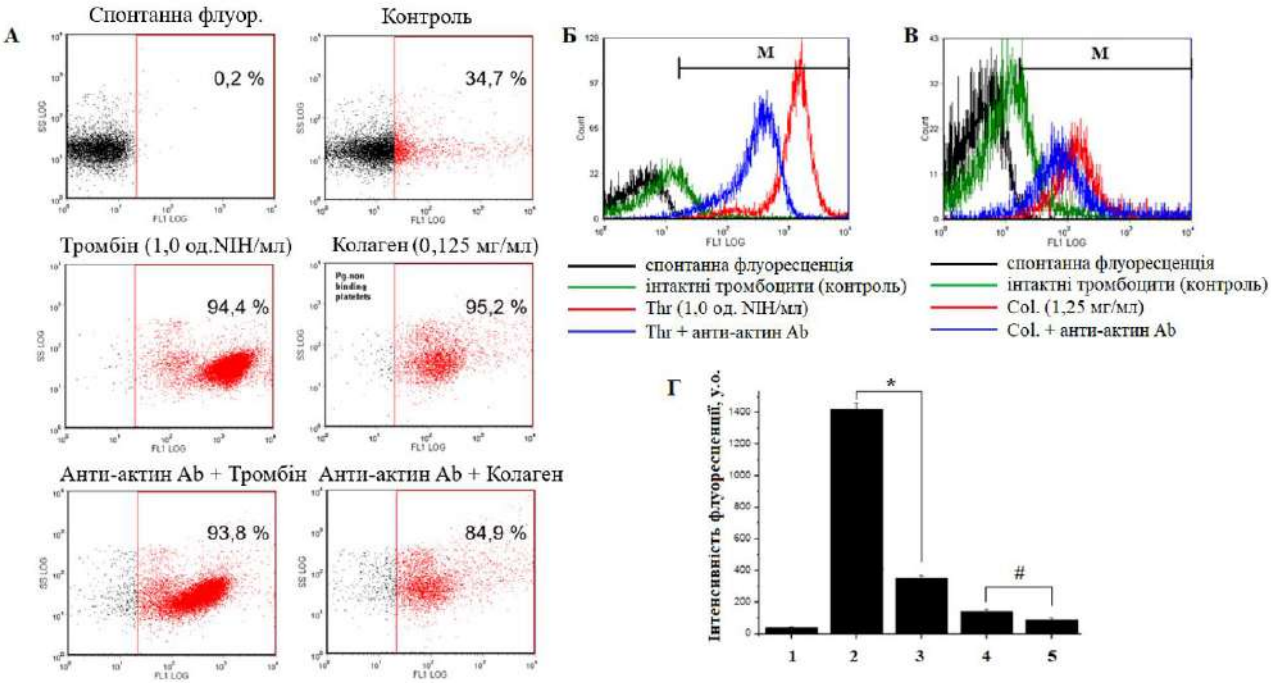

Рисунок 3.11 – Участь експонованого актину в зв’язуванні плазміногену з плазматичною мембраною тромбоцитів (результати протокової цитофлуориметрії): А – репрезентативні точкові гістограми розподілення популяцій тромбоцитів за зв’язуванням FITC-міченого плазміногену (позначено червоним кольором); Б – інтенсивність сигналу флуоресценції FITC-міченого плазміногену, що зв’язався з тромбоцитами, активованими тромбіном (детекція за каналом FL1); В – інтенсивність сигналу флуоресценції FITC-міченого плазміногену, що зв’язався з тромбоцитами, стимульованими колагеном (детекція за каналом FL1); Г – рівень інтенсивності флуоресценції FITC-міченого плазміногену, що зв’язався з тромбоцитами: 1 – контроль, 2 – тромбін 1,0 од. NIH/мл, 3 – антитіла до актину + тромбін, 4 – колаген 1,25 мг/мл, 5 – антитіла до актину + колаген. М – гейт, що обмежує популяцію FITC-позитивних тромбоцитів.

* – $P < 0,01$ порівняно з тромбіном, # – $P < 0,05$ порівняно з колагеном ($n = 3$).

Після стимуляції тромбоцитів агоністами, взятими у субмаксимальних кількостях (1,0 од. NIH/мл тромбіну та 1,25 мг/мл колагену), практично усі тромбоцити виявили здатність зв'язувати досліджуваний протеїн (не менше 94% від загальної кількості тромбоцитів у зразку). Інтенсивність сигналу FITC-позитивної флуоресценції, що є пропорційною кількості зв'язаного з тромбоцитами міченого плазміногену, драматично зростала після стимуляції тромбоцитів. Слід зазначити, що тромбін виявився більш потужним активатором, що сприяє зв'язуванню плазміногену з тромбоцитами, ніж колаген, що відповідає результатам стосовно експонування актину стимульованими тромбоцитами. Інтенсивність сигналу флуоресценції від тромбінактивованих тромбоцитів, інкубованих з FITC-міченим похідним плазміногену, виявилася у 8,2 рази вищою за цю величину, показану у випадку колагенстимульованих клітин (рис. 3.11Б).

З метою визначення участі експонованого актину в зв'язуванні плазміногену з поверхнею тромбоцитів активовані клітини перед внесенням FITC-плазміногену обробляли антитілами проти актину. Важливо зауважити, що обробка тромбоцитів відповідними антитілами істотно не вплинула на кількість актин-позитивних клітин у разі стимуляції тромбіном (93,8%) або колагеном (85%). Натомість блокування актину за допомогою специфічних антитіл істотно зменшило кількість FITC-міченого похідного плазміногену, що зв'язалося з поверхнею тромбін-стимульованих тромбоцитів у 4 рази ($P < 0,05$) та з поверхнею колаген-активованих клітин у 2,5 рази ($P < 0,05$) у порівнянні з активованими тромбоцитами, що інкубувалися з тією ж кількістю неспецифічних до актину IgG. Отримані дані вказують на те, що експонований актин входить до групи молекул, які забезпечують зв'язування плазміногену на поверхні тромбоцитів. Раніше було показано, що до числа тромбоцитарних плазмін-зв'язувальних протеїнів належать інтегрини (αMβ2, α5β1, αVβ3, αIIbβ3), фібриноген, фібронектин, вітронектин, тромбоспондин та ламінін [614]. Отже, результати протокової цитофлуориметрії свідчать, що актин, який експонується на мембрані тромбоцитів у результаті їхньої

активації, виконує роль одного із сайтів зв'язування плазміногену з тромбоцитарною поверхнею.

Усі ізоформи актину характеризуються високим ступенем структурної гомології та здатністю взаємодіяти з плазміногеном. Встановлено, що амінокислотні залишки Lys61, 68 та 113, які є висококонсервативними і зустрічаються у складі усіх ізоформ актину, відповідають за розпізнавання молекули плазміногену. Залишок Lys61 є найбільш важливим для взаємодії з плазміногеном, оскільки він розташований на поверхні актинової глобули. Протеолітичний процесінг С-термінальної ділянки молекули актину призводить до експонування залишку Lys373, що підвищує афінність міжпротеїнової взаємодії актин-плазміноген та посилює опосередковану клітинною поверхнею активацію зимогену. У свою чергу, Lys-зв'язувальні сайти кринглових доменів плазміноген/плазміну залучаються до взаємодії з молекулами актину, яка може порушуватися лізином та його аналогами [434, 642].

У науковій літературі накопичується дедалі більше даних, що підтверджують фізіологічне значення взаємодії між протеїнами плазміноген/плазмінової системи й актином як в аспекті регулювання активності фібринолітичної системи, процесінгу біологічно активних молекул, так і модулювання ефекторної дії зазначених протеїнів на клітини [614]. Спираючись на дані, отримані Miles та ін. [434], можна висунути припущення, що експоновані на клітинах молекули актину залучаються до процесів перицелюлярної активації плазміногену та появі на клітинній поверхні плазміну. Не виключено, що такий механізм утворення та появи перицелюлярного плазміну робить внесок до «перемикання» властивостей тромбоцитів з тромбоутворення на тромболізис. Як підтвердження цього слугують дані, які свідчать про підсилення розщеплення фібринового згустку тромбоцитами з локалізованим на їхній фосфатидилсерин-позитивній поверхні плазміногеном [657]. Залучення експонованого актину до активації плазміногену на поверхні клітин підтверджується даними, що демонструють інгібувальні ефекти специфічних антитіл до актину на перицелюлярну

конвертацію плазміногену на плазмін [434]. Встановлено, що крім плазміногену, з актином ефективно взаємодіють молекули обох його активаторів – t-PA та uPA, прискорюючи перетворення зимогену на плазмін (K_d комплексу актин-tPA дорівнює 0,55 мкМ) [383, 642]. Описані результати вочевидь вказують на існування різних механізмів активації тромбоцитарного плазміногену фізіологічними активаторами із залученням експонованих протеїнів, забезпечуючи тонке регулювання фібринолізу, а також інших фізіологічних процесів за участі тромбоцитів та протеїнів плазміноген/плазмінової системи.

Встановлено, що зв'язування мономерного актину з плазміном призводить до інгібування каталітичної активності протеїнази або «переналаштування» її субстратної специфічності внаслідок конформаційних змін активного центру [383]. З іншого боку, актин стимулює tPA-опосередковане утворення плазміну як з Glu-, так і, з ще більшою швидкістю, Lys-плазміногену. Зв'язування плазміноген/плазміну та t-PA з актином відбувається через LBS цих протеїнів. Відомо, що, на відміну від полімеризованого фібрину, який гідролізується плазміном, що утворюється на його поверхні, мономерний актин або актин у складі філаментних полімерів не підлягає тотальному розщепленню плазміном. У дослідах *in vitro*, в яких досліджували особливості гідролізу актину чистим препаратом плазміну, встановлено, що ензим здатний здійснювати лише обмежений протеоліз актину за пептидним зв'язком у положенні Lys373-Cys374. Частково деградований актин порівняно з нативною молекулою з більшою афінністю зв'язує Glu-плазміноген. Припускається, що такий ефект має місце внаслідок зміни конформації молекули актину після її гідролізу плазміном, зокрема, змінам орієнтації залишків лізину та появи додаткового центра зв'язування – С-кінцевого залишку Lys, з яким ефективно взаємодіють кринглові домени молекули плазміногену [384, 434]. Фізіологічне значення взаємодії між протеїнами системи плазміноген/плазміну та актином, як вважається, може бути достатньо вагомим, враховуючи, що актин присутній

у плазмі крові людини та тварин як у нормі, так і за різних патологій, що супроводжуються пошкодженням тканин і деструкцією клітин, а його концентрація може сягати декількох мкмоль/л [289]. Отже, обумовлена циркулюючим в плазмі актином модифікація протеолітичної активності плазміну може призводити до дисфункції фібринолітичної системи і робити суттєвий внесок до порушень гемостазу, які мають місце при сепсисі, запаленні або травмуванні тканин. Яскравим прикладом механізму перицелюлярної активації плазміногену за участі експонованого актину може стати утворення плазміну на поверхні катехоламін-продукувальних клітин, де протеїназа бере участь у регулюванні релізінгу гормонів (рис. 3.12) [434].

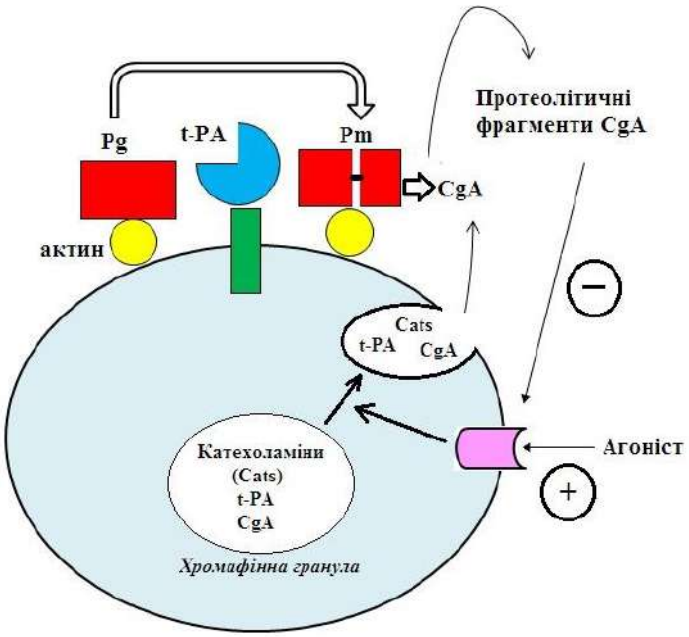

Рисунок 3.12 – Механізм процесінгу хромограніну А (CgA) плазміном (Pm) на поверхні катехоламін-продукувальних клітин за участі експонованого актину. Циркулюючий плазміноген (Pg) зв’язується з «поверхневим» актином клітини та конвертується на плазмін за участі t-PA, розташованим на мембранному рецепторі. Плазмін розщеплює CgA, який входить до складу хромафінних гранул разом з t-PA та катехоламінами, й секретується клітинами у відповідь на стимуляцію ацетілхоліном. Протеолітичні фрагменти CgA за принципом негативного зворотного зв’язку інгібують вивільнення катехоламінів [434, 474].

Встановлено, що за взаємодію плазміногену з мембраною цих клітин відповідають β- та γ-ізомери актину, розташовані в екстрацелюлярній локації й кількість копій котрих становить $9{,}8\times10^4$ на клітину (K_d = 77 нМ). Інгібіторні ефекти 6-АГК свідчать про участь у міжмолекулярному розпізнаванні лізинзв'язувальних центрів кринглових доменів плазміногену й залишку лізину у молекулі актину. Той факт, що обробка клітин карбоксипептидазою С на 90% зменшує рівень активації плазміногену, вказує на залучення С-кінцевого залишку лізину (Lys373) у складі частково деградованого актину до взаємодії з молекулою зимогену. Остання перетворюється на плазмін за участі t-PA, розташованому на мембранному рецепторі [434]. У свою чергу плазмін частково деградує протеїн хромагранін А з утворенням цілої групи тканиноспецифічних пептидів, які модулюють секреторну функцію клітин. Таким чином, функціонування молекулярного ансамблю протеїнів, що складається з компонентів системи активації плазміногену та екстрацелюлярного актину, на поверхні катехоламінергічних клітин, ймовірно, відіграє провідну роль у модулюванні релізінгу гормонів та нейромедіаторів. З огляду на описане вище явище, не виключено, що подібна взаємодія протеїнів системи плазміноген/плазміну з експонованим актином є універсальним механізмом регулювання нейросекреторної активності адренергічних клітин як у центральній, так і периферичній нервовій системі. Протеїни системи активації плазміногену знайдено у великій кількості нейроендокринних структур, зокрема, нейронах кори головного мозку, мозочку, гіпокампу, а також у клітинах периферичної нервової системи. Нещодавно Briens та ін. [88] відкрили принципово новий механізм регулювання балансу між активацією плазміногену та кліренсу плазміну в нервовій тканині за участі астрогліальних клітин. Автори цитованої роботи вперше показали, що експонований на астроцитах актин виконує провідну роль в ендоцитозі плазмін(оген)у клітинами, виконуючи функцію рецепторного протеїну. Доведено, що крім канонічного клатрин- та динамін-опосередкованого ендоцитозу, астроцити здатні активно

інтерналізувати як плазмін, так і плазміноген, за рахунок взаємодії цих протеїнів з експонованим актином. Цікаво, що транспортування плазміну досередини клітини відбувається у півтора рази швидше, ніж плазміногену (відповідно 29,9 проти 18,8 везикул на хвилину). Ці дані є першим експериментально доведеним свідченням безпосередньої участі експонованого актину як рецепторної молекули в процесах ендоцитозу. Подальша доля плазмін(оген)у в астроцитах полягає в його утилізації шляхом деградації через утворення ранніх та пізніх ендосом. Остаточне розщеплення інтерналізованих протеїнів відбувається в лізосомальному компартменті астроцитів.

Цікаво, що актин – не єдиний цитоскелетний протеїн тромбоцитів, знайдений у такій «незвичній» локації. Було показано, що активовані тромбоцити експонують на своїй поверхні, крім актину, ще й протеїн проміжних філаментів цитоскелету віментин. Припускається, що віментин, розташований на тромбоцитарній поверхні, може забезпечувати локалізацію комплексу [вітронектин–PAI-1] на мембрані тромбоцитів та тромбоцитарних мікрочастинок, причому взаємодіючи тільки з активною формою інгібітора [495]. Отже, протеїни цитоскелету, локалізовані на клітинній поверхні, виконують функції протеїнів-партнерів плазміноген/плазмінової системи, залучаючись до регулювання фібринолізу та функціональної активності клітин.

3.1.6. Механізм утворення ангіостатинів тромбоцитами

Представлений підрозділ дисертаційної роботи присвячений з’ясуванню механізмів утворення ангіостатинів – інгібіторів ангіогенезу та антагоністів VEGF – тромбоцитами за умов *ex vivo*. Основні завдання, які було поставлено при виконанні цієї частини роботи, полягали в наступному: 1) з’ясувати залежність утворення ангіостатинів від функціонального стану тромбоцитів, 2) встановити субклітинну локалізацію утворення ангіостатинів

тромбоцитами, 3) визначити участь експонованого актину в генеруванні ангіостатинів тромбоцитами.

Для встановлення залежності ангіостатин-продукувальної активності тромбоцитів від їхнього функціонального стану, ступінь фрагментації Lys-плазміногену визначали в лізатах та релізатах інтактних тромбоцитів (контроль) та клітин, активованих тромбіном або колагеном. Зразки для аналізу отримували в ході експерименту, описаного у п. *3.1.3*. На блотограмі, представленої на рисунку 3.13, видно, що в лізатах і релізатах неактивованих тромбоцитів, які інкубували з Lys-плазміногеном протягом 8 хв., ангіостатин-подібні поліпептиди виявляються лише в слідових кількостях.

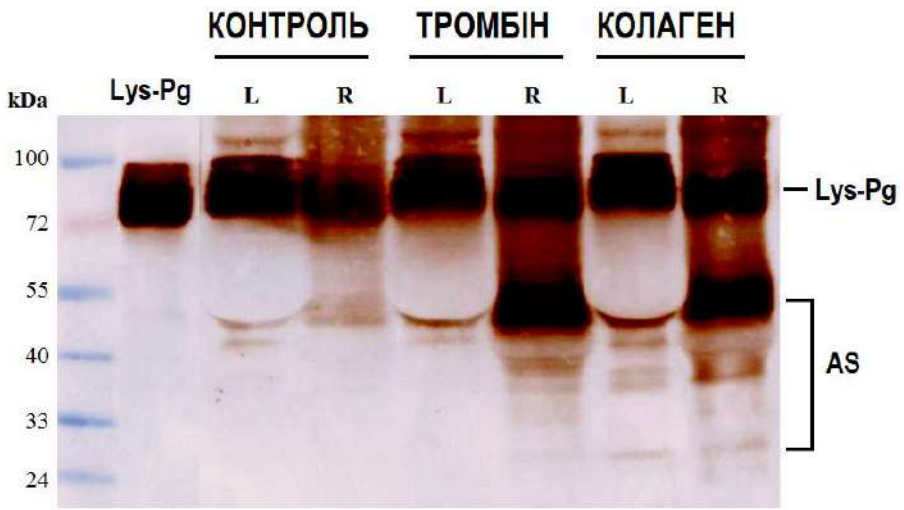

Рисунок 3.13 – Утворення ангіостатинів через обмежений протеоліз Lys-плазміногену за присутності інтактних або агоніст-стимульованих тромбоцитів (А): 1 – лізати тромбоцитів, 2 – релізати тромбоцитів. Тромбоцити стимулювали 1,0 од. NIH/мл тромбіну або 1,25 мг/мл колагену окремо або за попередньої інкубації з Lys-плазміногеном (1,2 мкМ).

Натомість, тромбоцити в активованому стані виявилися здатними продукувати значні кількості ангіостатинів за інкубації з Lys-плазміногеном. Слід зазначити, що в найбільшій кількості продукти обмеженого протеолізу плазміногену визначалися в зразках середовища, ніж у лізатах тромбоцитів. Ангіостатин-подібні фрагменти виявлялися у вигляді декількох

імунореактивних зон, серед яких превалювали поліпептиди з M_m ~ 45-50 кДа, що відповідають ангіостатинам К1-4 та К1-4,85. У релізатах тромбоцитів, активованих колагеном, але не тромбіном, були присутні більш низькомолекулярні поліпептиди (38-25 кДа), що відповідають мінорним продуктам обмеженого протеолізу плазміногену.

З метою перевірки гіпотези щодо можливості утворення ангіостатинів в результаті перицелюлярного протеолізу плазміногену зимоген інкубували з цілими тромбоцитами та за присутності ізольованих плазматичних мембран агоніст-активованих тромбоцитів. Продукти лімітованого протеолізу плазміногену визначали за допомогою вестерн-блоту аналізу, результати якого наведено на рисунку 3.14.

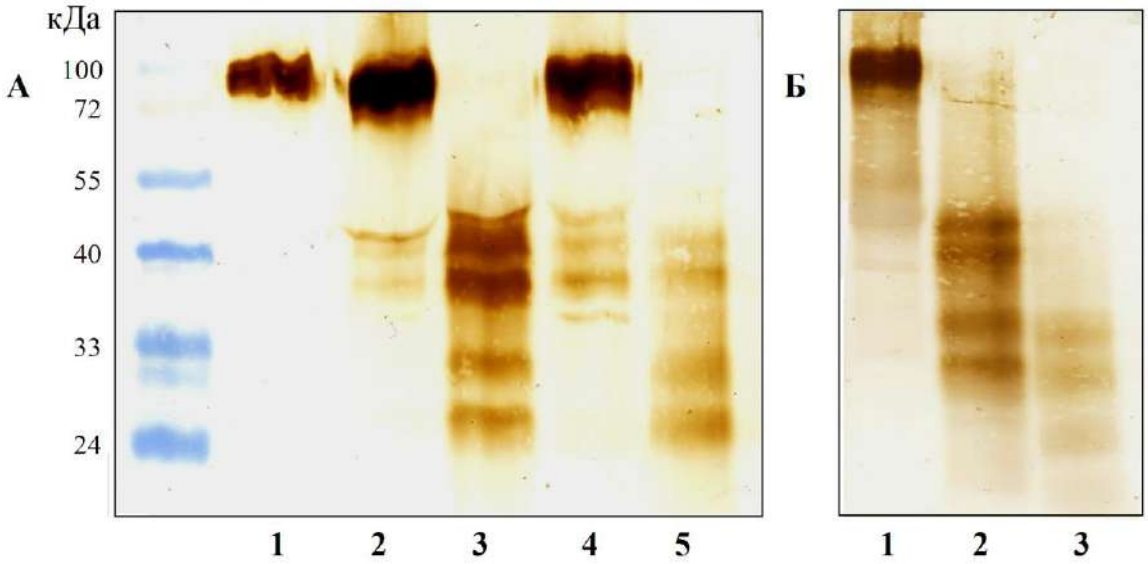

Рисунок 3.14 – Фрагментація плазміногену за присутності тромбоцитів (А) та ізольованих плазматичних мембран тромбоцитів, активованих тромбіном (Б): 1 – Glu-плазміноген (1,2 мкМ); 2 – неактивовані тромбоцити, 3 год. інкубації; 3 – тромбоцити, стимульовані тромбіном (1,0 од. NIH/мл), 3 год. інкубації; 4 – неактивовані тромбоцити, 16 год. інкубації; 5 – тромбоцити, стимульовані тромбіном (1,0 од. NIH/мл), 16 год. інкубації) та ізольованих плазматичних мембран тромбін-активованих тромбоцитів (Б): 1 – 1 хв. інкубації; 2 – 3 год. інкубації; 3 – 16 год. інкубації (результати імуноблот-аналізу).

Показано, що Glu-плазміноген, так само як і Lys-форма, більш активно розщеплювався тромбоцитами, що знаходилися в активованому стані, ніж клітинами у стані фізіологічного спокою (рис. 3.14А). Зникнення зони плазміногену на блотограмах спостерігалося через 3 год. з початку інкубації з активованими клітинами. Більша частина продуктів протеолізу цього протеїну в ході SDS-PAGE-електрофорезу мігрувала в діапазон M_m 50-25 кДа. В ході більш тривалої інкубації Glu-плазміногену з тромбоцитами спостерігалося зменшення рівнів імунореактивних ангіостатин-подібних поліпептидів, що свідчить про перебіг протеолізу за блочним механізмом. Аналогічний профіль фрагментації плазміногену було показано у зразках, в яких проводили інкубацію зимогену за присутності ізольованих плазматичних мембран тромбоцитів (рис. 3.14Б). Отримані дані свідчать про локалізацію процесів, що забезпечують генерування ангіостатинів тромбоцитами, на плазматичних мембранах цих форменних елементів крові. Отже, отримані результати імуноблот-аналізу вказують на здатність тромбоцитів генерувати ангіостатини, що принципово залежить від функціонального стану клітин та відбувається за участі компонентів плазматичної мембрани.

У продовження наших досліджень, подальшим завданням роботи було перевірити припущення про залучення експонованого актину до механізму утворення ангіостатинів активованими тромбоцитами. Задля блокування актину до суспензії мембран активованих тромбоцитів вносили специфічні антитіла до актину перед їхньою інкубацією з плазміногеном. Результати імуноблотингу, наведені на рисунку 3.15, демонструють, що попередня інкубація суспензії плазматичних мембран тромбоцитів з антитілами проти актину частково, але статистично достовірно, зменшувала інтенсивність фрагментації плазміногену. Розщеплення досліджуваного протеїну можна було чітко спостерігати вже через 5 хв. після приготування реакційної суміші (рис. 3.15А). В ході подальшої інкубації найбільш масовими виявилися ангіостатин-подібні поліпептиди з M_m 45-50 кДа, що відповідають

фрагментам K1-4 і K1-4,5. Кількісно інтенсивність розщеплення плазміногену оцінювали із застосуванням денситометричного аналізу блотограм (рис. 3.15Б).

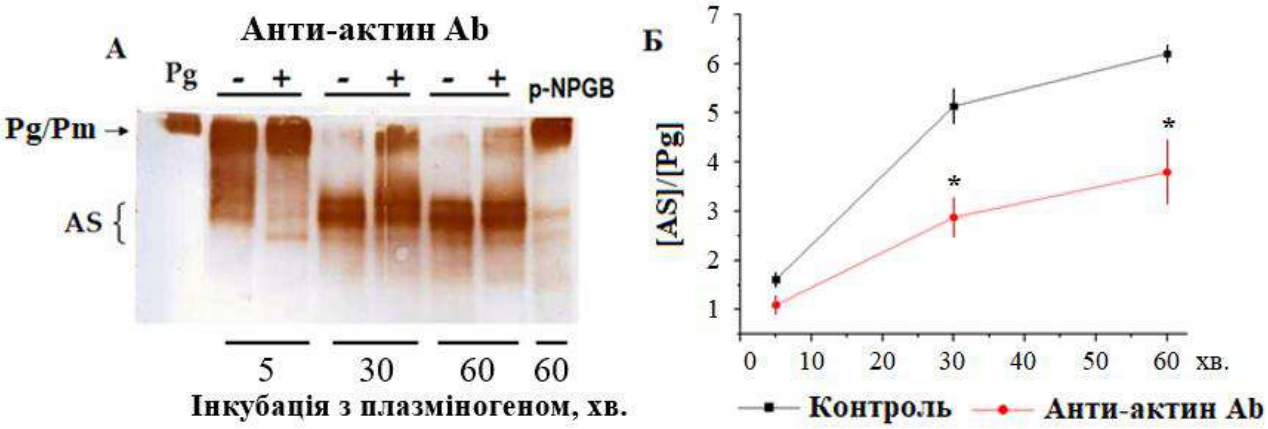

Рисунок 3.15 – Участь актину, експонованого на плазматичній мембрані тромбоцитів, в утворенні ангіостатинів. Типова блотограма плазміногену та його фрагментів, що утворюються за присутності фракції плазматичних мембран тромбоцитів, активованих тромбіном (1,0 од. NIH/мл; 1,3 × 10^8 клітин у кожній експериментальній точці): А – плазміноген (1,45 мкМ) та продукти його обмеженого протеолізу, Б – динаміка конвертації плазміногену на ангіостатини за умов блокування актину специфічними антитілами.

p-NPGB – пара-нітрофелінгуанідинбензоат (5 × 10^{-4} М). * – $P < 0,05$.

У зразках інкубаційної суміші, що містили мембрани з незаблокованим актином, через 5 хв. після початку інкубації з Glu-плазміногеном розщепилося 36% від загальної кількості зимогену, а через 30 та 60 хв. – 90 та 97%, відповідно. Натомість, за умов блокування актину протеоліз плазміногену відбувався значно повільніше: через 5 хв. виявилося розщепленими лише 8% від початкової кількості плазміногену, доданого до інкубаційного середовища, через 30 хв. – 62%, через 60 хв. – 82%. Отже, отримані результати свідчать про участь експонованого актину не лише в

зв'язуванні плазміногену з тромбоцитарною мембраною, але й в його фрагментації, що супроводжується утворенням ангіостатинів.

Для перевірки можливої наявності домішок протеїназ у препаратах протеїнів, які використовували в експерименті, як потенційного джерела хибнопозитивних результатів, усі протеїни, а саме, тромбін, колаген, анти-актинові антитіла та неспецифічні IgG, окремо витримували з плазміногеном за 37 ^{o}C протягом 60 хв. Результати імуноблот-аналізу, наведені на рисунку 3.16, свідчать про відсутність протеолітичної активності в препаратах агоністів та антитіл, що доводить безпосередню роль протеолітичних систем тромбоцитів у фрагментації плазміногену.

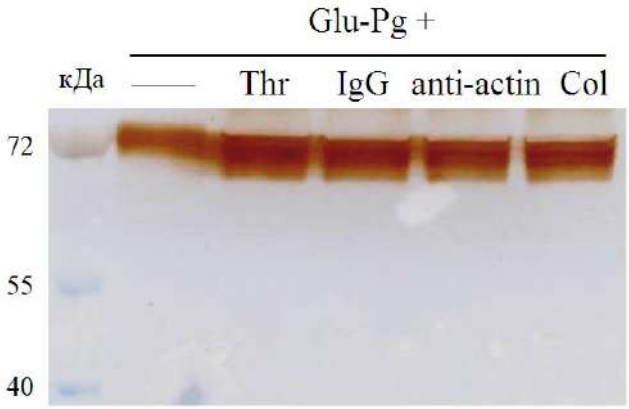

Рисунок 3.16 – Контроль на відсутність домішок протеаз у препаратах протеїнів, що використовували в експерименті щодо утворення ангіостатинів тромбоцитами (Thr – тромбін, IgG – імуноглобуліни G, anti-actin – антитіла до актину, Col – колаген) (результат імуноблот-аналізу).

Було зроблено наступне важливе спостереження, що стосувалося протеолітичної активності, яка забезпечує розщеплення плазміногену за присутності плазматичних мембран тромбоцитів. За умов інкубування плазміногену із суспензією ізольованих плазматичних мембран активованих тромбоцитів у присутності інгібітора серинових протеїназ p-NPGB спостерігалася практично повне блокування фрагментації досліджуваного протеїну (рис. 3.15А). Це спостереження вказує на провідну роль плазміну, який утворюється внаслідок активації зимогену ендогенними активаторами, у

генеруванні ангіостатинів. Поява плазміну може пояснюватися агоніст-індукованим експонуванням/вивільненням ендогенного u-PA, який, утворюючи комплекс зі своїм рецептором uPAR, ефективно конвертує зимоген на активну протеїназу [52].

Отже, на підставі отриманих результатів та даних літератури нами вперше описано двоетапний механізм генерування ангіостатинів активованими тромбоцитами за участі молекулярного «конвеєра», до складу якого входять експонований актин як центр зв'язування плазміногену та урокіназа, асоційована з uPAR (рис. 3.17). Плазмін, зв'язаний з актином на поверхні мембрани, забезпечує розщеплення плазміногену з подальшим вивільненням ангіостатинів до середовища.

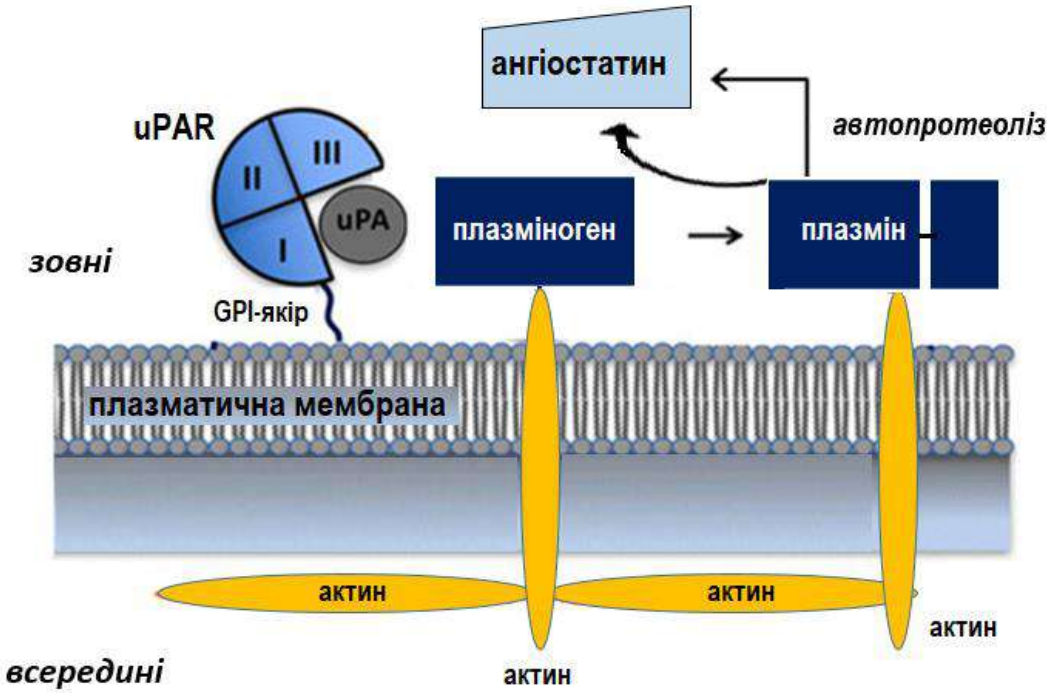

Рисунок 3.17 – Механізм процесінга плазміногену та генерування ангіостатинів на поверхні плазматичної мембрани активованих тромбоцитів за участі плазміну та експонованого актину.

Як відомо, однією з функцій тромбоцитів є регулювання ними ангіогенезу та репаративних процесів. Ця функція реалізується за рахунок здатності тромбоцитів селективно секвеструвати з плазми та/або утворювати

цілий набір індукторів та інгібіторів ангіогенезу. При цьому індуктори та супресори ангіогенезу зберігаються в тромбоцитах у різних пулах α-гранул, вивільнення яких відбувається через активацію різних сигнальних шляхів. Таким чином, секреція та утворення регуляторів ангіогенезу тромбоцитів чітко регулюється та розмежована у часі та просторово [325]. Цілком імовірно, що здатність тромбоцитів утворювати та продукувати протеїни, які пригнічують неоваскуляризацію, зокрема, ангіостатини, є одним зі шляхів гальмування надмірного ангіогенезу, що є необхідною умовою адекватного регулювання репаративних процесів.

У літературі не існує єдиної думки щодо шляхів надходження плазміногену та ангіостатинів до тромбоцитів. Результати попередніх досліджень свідчать, що тромбоцити зв'язують та селективно інтерналізують плазміноген та ангіостатини з плазми, проте, не можна виключати походження цих протеїнів з батьківських клітин-мегакаріоцитів [325]. Результати, отримані у дисертаційному дослідженні, підтверджують та значно розширюють існуючі уявлення про механізми утворення ангіостатинів тромбоцитами. Як відомо, генерування ангіостатинів в організмі найбільш активно здійснюється цілою низкою протеїназ сімейства ММР, зокрема ММР-1, ММР-2, ММР-3, ММР-7, ММР-9 та ММР-12, а також серинових протеїназ, головним чином, плазміном та еластазою нейтрофілів [636]. Тромбоцити містять протеїнази та їхні зимогени, які потенційно можуть брати участь у процесах утворення ангіостатинів, насамперед, активатори плазміногену (t-PA, u-PA) та металопротеїнази (ММР-1, -2, -3, -9) [305]. Встановлено, що цитозольні ММР-1, -2 та -9 транслокуються з цитозолю до плазматичної мембрани та інтегруються з нею під час активації тромбоцитів [542]. Проте, найбільшу увагу привертає той факт, що стимуляція тромбоцитів тромбіном за присутності плазміногену супроводжується появою плазмінової активності. Доведено, що активація зимогену має місце на мембрані саме активованих тромбоцитів, причому перетворення зимогену на протеїназу каталізується ендогенним u-PA,

локалізованому на своєму мембранному рецепторові (uPAR) [364]. Отже, наведені дані літератури та результати власних досліджень свідчать, що основним місцем генерування ангіостатинів тромбоцитами є зовнішня поверхня плазматичної мембрани. Інгібувальний ефект p-NPGB по відношенню до фрагментації плазміногену, показаний у нашому дослідженні (рис. 3.15А), узгоджується з даними щодо ключової ролі плазміну, що утворюється на поверхні активованих тромбоцитів, у генеруванні ангіостатинів. На підставі цих спостережень ми висунули гіпотезу про те, що тромбін запускає сигнальні шляхи, активація яких призводить до появи на поверхні тромбоцитів ансамблю протеїнів, що складається з експонованого актину як центру зв'язування плазміногену та активаторів плазміногену, перш за все, u-PA, асоційованому зі специфічним рецептором. Аналіз даних літератури стосовно міжпротеїнових взаємодій дозволяє припустити, що внаслідок зв'язування зимогену з актином відбуваються зміни третинної структури плазміногену, внаслідок чого його нативна конформація переходить до більш відкритої конформації, що полегшує подальшу активацію зимогену. Крім того, актин може слугувати відновлювальним агентом, необхідним для утворення плазміну, як це показано раніше на прикладі взаємодії плазміногену з фосфогліцераткіназою [81].

Тромбоцити – не єдині клітини, що здатні експонувати актин на поверхні плазматичної мембрани, котрий може виконувати рецепторні функції, взаємодіючи з протеїнами плазми крові [37]. Встановлено, що понад 50% від загальної кількості плазміногену, асоційованого з поверхнею клітин, локалізується саме на актині [174]. Значний інтерес становлять дані роботи [643], у якій показано, що актин, експонований на поверхні деяких типів пухлинних клітин, також може бути потенційним центром генерування ангіостатинів. Встановлено, що екстрацелюлярний актин відповідає за генерування ангіостатинів на поверхні клітин деяких типів пухлин (рак передміхурової залози PC-3, фібросаркома HT1080, рак грудної залози MDA-MB231), опосередковуючи автопротеоліз плазміну навіть за відсутності

донору сульфгідрильних груп. В експериментах із використанням зазначених онкотрансформованих клітин було показано, що з усіх кринглових доменів плазміногену, К5 може відігравати ключову роль у зв'язуванні молекули зимогену з актином. Про це свідчить той факт, що розщеплення К5, яке здійснює плазмін в ході автопротеолізу, призводить до порушення його взаємодії з експонованим актином, втраті зв'язку більшої частини А-ланцюга з поверхнею клітини й вивільнення ангіостатину до середовища/кровоносного русла [643]. Цей механізм значною мірою пояснює, чому за пухлинного росту плазмін функціонує локально, а ангіостатини чинять антиметастатичну дію, циркулюючи в кровообігу, дістаючись таким чином дистальних пухлинних осередків.

Ангіостатини – продукти обмеженого протеолізу плазміноген/плазміну, які проявляють потужні ангіостатичні та протизапальні ефекти, пригнічуючи патологічну неоваскуляризацію, пухлинний ріст та метастазування [162]. Представлені в підрозділі результати свідчать про те, що, крім пухлинних клітин, активну участь в утворенні ангіостатинів в організмі беруть й нормальні клітини, зокрема, тромбоцити, забезпечуючи реалізацію регуляторних і компенсаторних механізмів організму. Дані щодо молекулярних механізмів генерування ангіостатинів тромбоцитами за описаним вище механізмом можуть бути корисними для розробки підходів, спрямованих на модулювання функціональної відповіді тромбоцитів за нормальних фізіологічних процесів та патологічних станів, асоційованих з порушенням ангіогенного балансу, зокрема, при хронічному загоєнні ран, пухлинному рості, серцево-судинних захворюваннях, запаленні. Подальші дослідження, спрямовані на встановлення механізмів взаємодії компонентів плазміноген/плазмінової системи з експонованим актином та встановлення специфічної ролі різних кринглових доменів у регулюванні міжпротеїнових взаємодій та їхнього функціонального значення, мають не лише фундаментальне значення, але й містять важливу прикладну складову, необхідну для розробки нових діагностичних та терапевтичних підходів.

3.1.7. Вплив плазміногену на метаболічну активність тромбоцитів ex vivo та генерування активних форм оксигену (АФО)

МТТ-тест використовувався як додатковий, альтернативний агрегатометрії, підхід для оцінки життєздатності тромбоцитів за визначенням впливу досліджуваних протеїнів на рівень клітинного метаболізму. Метод заснований на вимірюванні світлопоглинання формазану, який утворюється внутрішньоклітинно в результаті відновлення МТТ-реактиву (солі тетразолію) дегідрогеназами. Кількість формазану, яка вимірюється спектрофотометрично, вважається пропорційною рівню обмінних процесів у клітинах та є характеристикою їхнього метаболічного потенціалу [70]. МТТ-тест активно використовується для оцінки життєздатності та функціональної активності ізольованих тромбоцитів або тромбоцитарної маси [563].

На рисунку 3.18 представлені результати МТТ-тесту, які демонструють вплив двох форм плазміногену на метаболічну активність тромбоцитів. Показано, що ізольований вплив Glu- та Lys-форм зимогену спричиняє незначне зменшення рівня відновлення тетразолію тромбоцитами протягом 60 хвилин інкубації. Проте, у випадку дії Lys-плазміногену, на відміну від Glu-форми, ці зміни не виявилися статистично вірогідними ($P > 0,05$).

В ході дослідження метаболічної активності тромбоцитів за умов впливу агоністів (тромбіну або колагену) було отримано протилежні результати. Якщо у випадку стимуляції тромбоцитів тромбіном спостерігалося практично дворазове зростання метаболічної активності клітин, то вплив колагену протягом 60 хв. призвів до пригнічення метаболічних процесів порівняно з тромбоцитами контрольної групи на 60% від контрольної величини ($P < 0,05$). Важливий результат отримано в ході дослідження впливу агоністів на метаболічну активність тромбоцитів, попередньо інкубованих з різними формами плазміногену. Встановлено, що інкубація тромбоцитів з Glu- або Lys-плазміногеном, яка передувала дії тромбіну, призводила до пригнічення агоніст-індукованих метаболічних

процесів, причому у випадку попередньої інкубації з Lys-плазміногеном досліджуваний параметр не перевищував відповідної величини в контролі.

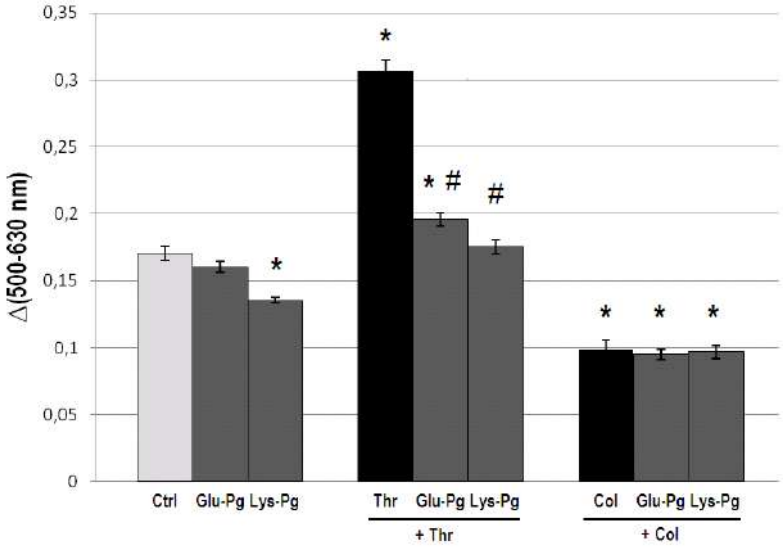

Рисунок 3.18 – Вплив Glu- та Lys-форм плазміногену (1,2 мкМ) на метаболічну активність тромбоцитів (результати МТТ-тесту): Ctrl – контроль, Thr – тромбін (1,0 од. NIH/мл), Col – колаген (1,25 мг/мл). * – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем, # – $P < 0,05$ у порівнянні з тромбіном.

Попередня інкубація тромбоцитів з плазміногеном не позначилася на чутливості цих клітин до колагену. Отримані дані можна пояснити тим фактом, що вплив цих найбільш потужних фізіологічних агоністів реалізується через різні сигнальні шляхи, які проявляють різну чутливість до плазміногену. Відомо, що тромбоцити експонують два рецептори до колагену, а саме, глікопротеїн VI та інтегрин $\alpha_2\beta_1$, в свою чергу тромбін стимулює тромбоцити через PAR-опосередкований сигналінг [21].

Важливо зауважити, що результати МТТ-тесту, які засвідчили інгібувальні ефекти плазміногену на метаболічну активність тромбоцитів, корелюють з даними дослідження з використанням флуоресцентного зонду H_2DCF-DA, що був застосований для вимірювання внутрішньоклітинних рівнів АФО за допомогою протокової цитофлуориметрії [623]. За здатністю продукувати АФО тромбоцити розподілилися на дві основні популяції:

клітини з високою генерувальною активністю й підвищеною гранулярністю, яку оцінювали за віссю ординат SS Log (гейт 1, червоний колір), та клітини, що володіли меншим АФО-генерувальним потенціалом та гранулярністю (гейт 2, синій колір) (рис. 3.19).

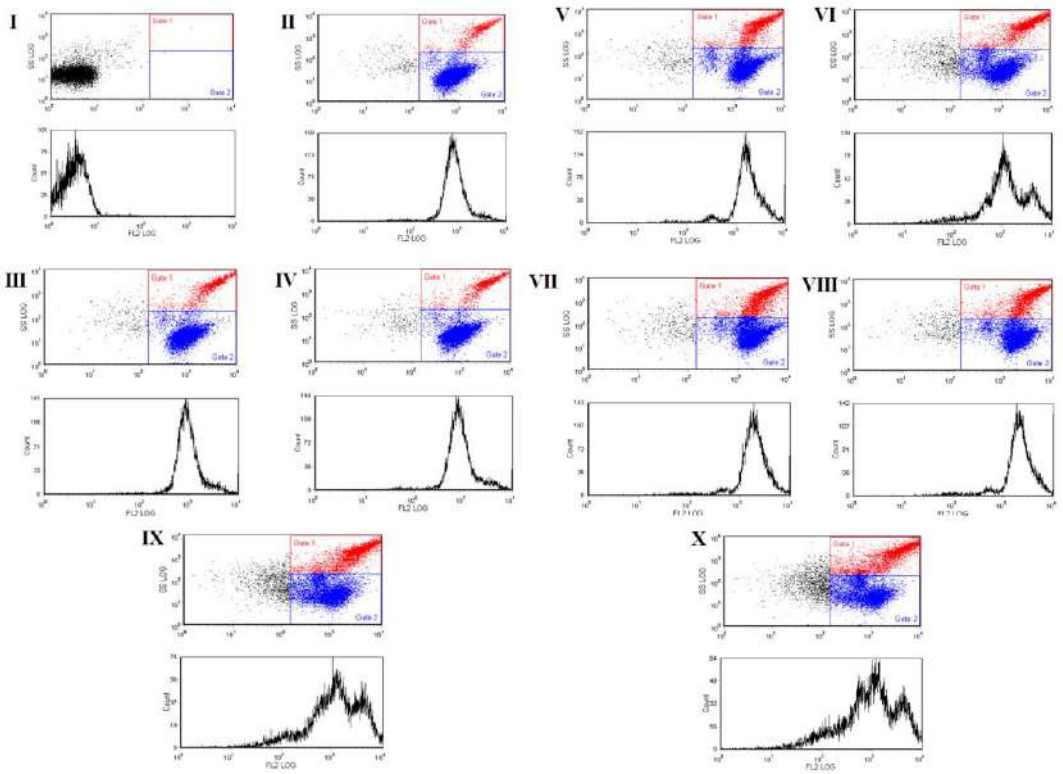

Рисунок 3.19 – Модулювальний вплив плазміногену на генерування активних форм оксигену (АФО) тромбоцитами: гістограми перерозподілу популяцій тромбоцитів за здатністю окиснювати H_2DCF-DA (сигнал за каналом FL2): I – спонтанна флуоресценція (за відсутності H_2DCF-DA), II – інтактні тромбоцити (контрольна група); III – тромбоцити інкубовані з Glu-Pg; IV – тромбоцити, інкубовані з Lys-Pg; V – тромбоцити, активовані тромбіном; VI – тромбоцити, активовані колагеном; VII – тромбоцити, попередньо інкубовані з Glu-Pg та активовані тромбіном; VIII – тромбоцити, попередньо інкубовані з Lys-Pg та активовані тромбіном; IX – тромбоцити, попередньо інкубовані з Glu-Pg та активовані колагеном; X – тромбоцити, попередньо інкубовані з Lys -Pg та активовані колагеном.

Gate 1 та Gate 2 обмежують популяції тромбоцитів, що продукують АФО з різною інтенсивністю.

Результати протокової цитофлуориметрії свідчать, що ізольований вплив ані нативної, ані частково гідролізованої форми плазміногену, не призводить до статистично достовірних змін кількості DCF-позитивних клітин (рис. 3.20). Натомість, Glu- та Lys-плазміноген спричинюють зростання рівня АФО у тромбоцитарній популяції, обмеженої першим гейтом ($P < 0,05$ у порівнянні з контролем) (рис. 3.21). Тромбін та, у більшому ступені, колаген ініціюють перерозподіл АФО-продукуючих тромбоцитів з гейту 2 до гейту 1. Збільшення кількості DCF-позитивних клітин у першому гейті після обробки тромбіном або колагеном супроводжується незначним, але статистично вірогідним зростанням інтенсивності окиснення молекул флуоресцентного зонду. Більш виражені зміни інтенсивності флуоресценції показані для тромбоцитів гейту 2 після інкубації з агоністами. Слід зауважити, що тромбін виявився більш потужним стимулятором процесів, що супроводжуються утворенням АФО, у порівнянні з колагеном за обраних концентрацій.

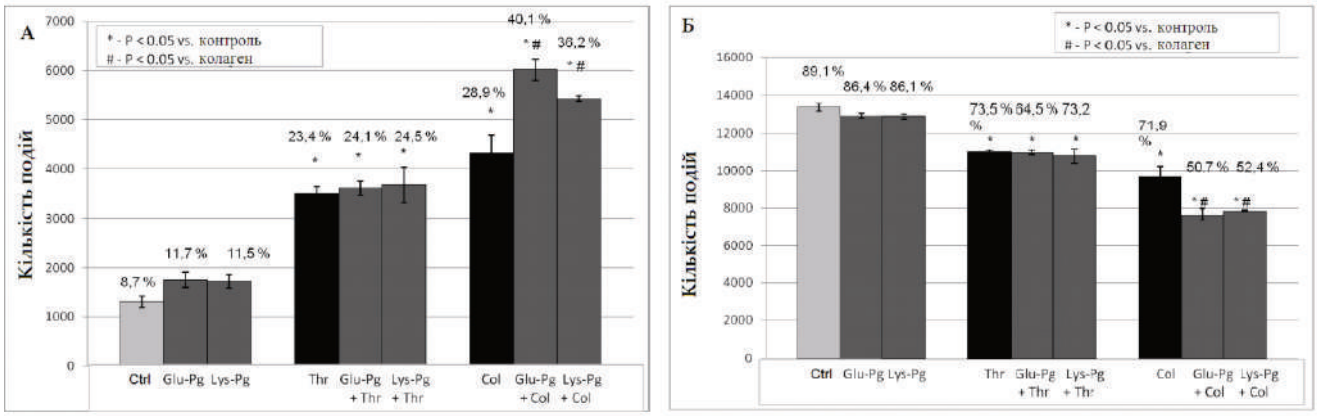

Рисунок 3.20 – Вплив плазміногену на кількість тромбоцитів, що генерують активні форм оксигену (АФО): результати сортингу тромбоцитів за кількістю DCF-позитивних подій (А – гейт 1, Б – гейт 2).

Плазміноген (більшою мірою Lys-форма) підсилював внутрішньоклітинне генерування АФО в тромбоцитах, стимульованих тромбіном, що обернено корелювало з пригніченням виживання клітин, показане за допомогою МТТ-тесту. Отже, отримані результати свідчать, що посилення плазміногеном генерування АФО може призводити до зниження їхньої функціональної активності та життєздатності. Проведене дослідження значно доповнює уявлення про можливі механізми впливу плазміногену на функціонування тромбоцитів.

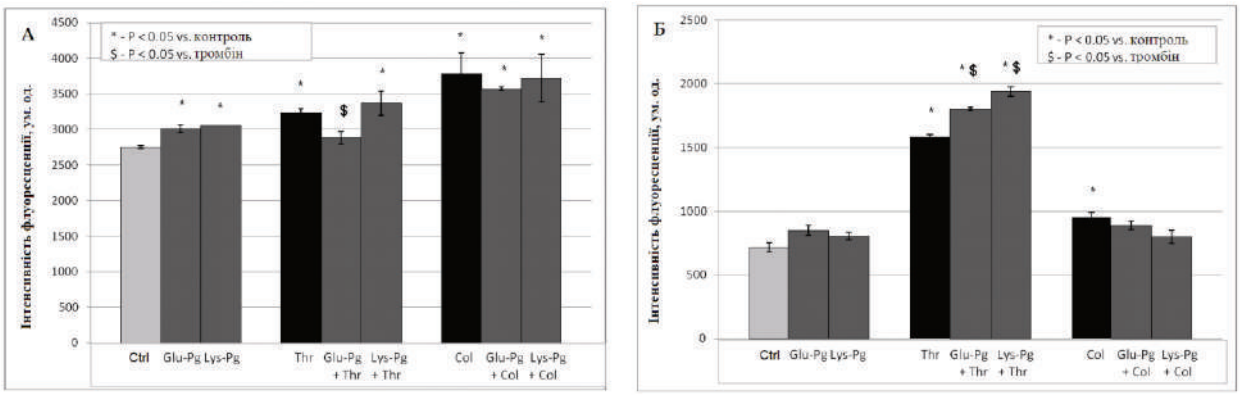

Рисунок 3.21 – Вплив плазміногену на інтенсивність продукування активних форм оксигену (АФО) тромбоцитами: результати сортингу тромбоцитів за інтенсивністю сигналу флуоресценції DCF (А – гейт 1, Б – гейт 2).

Обидві форми плазміногену сприяли перерозподілу тромбоцитів до першого гейту за умов активації клітин колагеном, але не тромбіном. На особливу увагу заслуговують результати вимірювання сигналу флуоресценції тромбоцитів другої популяції (гейт 2). Модулювальний вплив плазміногену на інтенсивність генерації АФО тромбоцитами за умов дії різних агоністів виявився різноспрямованим. Так, Glu-, а особливо Lys-форма плазміногену, підсилювали тромбін-індукований оксидативний вибух. У той самий час, попередня обробка тромбоцитів плазміногеном істотно не вплинула на сигнал за каналом FL2 після стимуляції клітин колагеном. Таким чином, плазміноген значною мірою модулює рівень аеробного метаболізму тромбоцитів тромбіном, впливаючи на сигнальні шляхи, що активуються цим агоністом.

Зокрема, модулювальні ефекти плазміну на тромбіновий каскад сигналінгу може реалізовуватися через обмежений протеоліз рецепторів PAR-1 та -4 [488, 504]. Плазмін здатний швидко відщеплювати розчинний екзодомен у сайтах R70/K76/K82 рецептору, які відповідають за заякорення ліганду до головної частини рецептору. Розщеплення плазміном екзодомену TR78 функціонально еквівалентне розщепленню тромбіном сайту R41 та характеризується зіставними швидкістю (kcat = 30 сек$^{-1}$) та афінністю (K_m = 18 мкМ). Плазмін-опосередкований протеоліз екзодомену TR78 поблизу сайту R41, який розщеплює тромбін, у результаті призводить до появи тимчасово активного екзодомену. Саме такий процес розщеплення плазміном PAR-1 є високо специфічним: обмежений протеоліз п'яти додаткових потенційних сайтів обмеженого протеолізу виявився неможливим. Вкорочення С-кінцевого домену цього рецептору плазміном призводить до видалення ліганду або пре-ліганду, що зв'язався з PAR-1 за допомогою N-кінцевої послідовності і, таким чином, спричинює ефективну десенситизацію PAR-1 *in vivo* [340]. Можливо, що саме такий механізм за участі плазміноген/плазміну реалізується в тромбоцитах і призводить до змін інтенсивності тромбін-індукованої генерації АФО.

Агоніст-індуковане стимулювання тромбоцитів супроводжується активацією процесів генерації вільних радикалів та реакцій вільнорадикального окиснення. Функціонування основних метаболічних шляхів в активованих тромбоцитах залежить від систем, що генерують АФО (O_2^-, HO^-, H_2O_2). Джерелами АФО в тромбоцитах є NAD(P)H-оксидаза, яку активують колаген через взаємодію з GPVI й тромбін через розщеплення PAR-рецепторів, циклооксигеназа-1, ліпоксигеназа, ксантиноксидаза, ензими циклу обміну глутатіону, мітохондрійний дихальний ланцюг та ін. [414]. Наявність у тромбоцитах мікропероксисом, які забезпечують синтез ендогенної H_2O_2 та її вивільнення в ході секреції, є беззаперечним підтвердженням важливості АФО в регулюванні агрегації/дезагрегації тромбоцитів. Пероксид гідрогену може індукувати агрегацію тромбоцитів,

опосередковуючи зв'язування фібриногену з інтегриновим рецептором GPIIbIIIa незалежно від АДФ, що вивільняється із щільних гранул. Показано, що у випадку недостатнього рівня АФО та пригнічення окиснення арахідонату, відбувається часткова дисоціація зв'язаного з тромбоцитами фібриногену й ініціюються процеси дезагрегації тромбоцитарного згустку [566]. Використання природних та синтетичних речовин-антиоксидантів (вітаміни С та Е, трансресвератрол, тролокс, церулоплазмін та ін.), які зменшують кількість АФО (перед усім O_2^-), що утворюються в ході активації тромбоцитів, призводить до порушення секреції, агрегації та рекрутингу нових тромбоцитів до згустку [5].

АФО виконують функцію вторинних месенджерів тромбоцитарного сигналювання, стимулюючи вивільнення Ca^{2+} до цитозолю та модулюючи активність ключових сигнальних ензимів тромбоцитів. Деполяризація мембрани, зростання рівнів $[Ca^{2+}]_i$ й стимуляція протеїнкінази С відповідають за активацію фосфоліпази A_2, що здійснює розщеплення фосфоліпідів мембран з вивільненням арахідонової кислоти, яка у тромбоцитах перетворюється переважно на тромбоксан A_2 (TXA_2) і малоновий діальдегід (МДА). Таким чином, АФО-чутливі сигнальні механізми контролюють найважливіші функціональні відповіді тромбоцитів на дію стимуляторів: реорганізацію актинового цитоскелету та залежний від неї тромбоцитарний екзоцитоз [503]. Показано, що тромбоцитарні АФО безпосередньо впливають на участь тромбоцитів в атерогенних, запальних та ангіогенних процесах [489]. З іншого боку, утворення надлишкових кількостей АФО, індукована плазмін(оген)ом, може призводити до виснаження системи антиоксидантного захисту клітин, що негативно відбивається на їхній метаболічній активності та здатності адекватно відповідати на вплив агоністів. Цілком імовірно, що антиагрегативні ефекти плазміногену, і насамперед його Lys-форми, реалізуються, принаймні частково, через додаткову стимуляцію тромбінових рецепторів, їхню наступну десенситизацію та розвиток внутрішньоклітинного окисного стресу.

Експериментальні дані, наведені у підрозділі 3.1, демонструють, що Lys-плазміноген чинить інгібувальну дію по відношенню до тромбоцитів, перешкоджаючи агоніст-індукованим перебудовам актинового цитоскелету й вивільненню вмісту α-гранул, а також пригнічуючи рівень метаболічної активності клітин. Показані ефекти Lys-плазміногену опосередковують антиагрегативну та антиангіогенну дію цього протеїну. Lys-плазміноген пригнічує ангіогенну функцію тромбоцитів через подвійний механізм: 1) інгібує вивільнення VEGF та 2) використовується тромбоцитами як субстрат для утворення ангіостатинів. Отримані вперше дані мають значний науково-прикладний інтерес, зважаючи на ту роль, яку відіграють тромбоцити в тромбоутворенні та репаративних процесах, а також залучаючись до перебігу запалення, імунних процесів та неопластичного росту. Таким чином, реципрокні взаємодії між тромбоцитами та плазміногеном становлять «точку перетину» між тромбоутворенням та регулюванням репаративних процесів за участі тромбоцитів. Отже, Lys-плазміноген виконує регуляторну роль, обмежуючи тромбоутворення та ангіогенез через модулювання функціонального стану тромбоцитів.

Висновки до підрозділу 3.1

1. Встановлено, що Lys-плазміноген залучається до регулювання тромбоутворення та ангіогенезу через модулювання функціонального стану тромбоцитів.

2. Показано, що антиагрегативна активність Lys-плазміногену реалізується через інгібування агоніст-індукованої реконструкції актинового цитоскелету тромбоцитів та пригнічення секреції α-гранул.

3. Продемонстровано, що Lys-плазміноген обмежує ангіогенну функцію тромбоцитів, інгібуючи агоніст-стимульоване вивільнення фактора росту ендотелійних клітин (VEGF) та залучаючись до продукування ангіостатинів *de novo*.

4. Показано, що стимульовані тромбоцити експонують актин на поверхні плазматичної мембрани, який бере участь у зв'язуванні плазміногену на тромбоцитарній поверхні.

5. Встановлено, що утворення ангіостатинів залежить від функціонального стану тромбоцитів і здійснюється активованими клітинами. Запропоновано молекулярний механізм генерування ангіостатинів за участі компонентів плазматичної мембрани активованих тромбоцитів, а саме, експонованого актину та плазміну.

6. Встановлено, що Lys-плазміноген підсилює генерування активних форм оксигену в тромбоцитах та пригнічує метаболізм інтактних та тромбін-стимульованих тромбоцитів *ex vivo*.

Основні праці здобувача, опубліковані за матеріалами підрозділу 3.1

1. Tykhomyrov AA. Interaction of actin with plasminogen/plasmin system: mechanisms and physiological role. *Biopolymers and Cell*. 2012;28(6):413-423.

2. Tykhomyrov AA, Yusova EI, Diordieva SI, Korsa VV, Grinenko TV. Production and characteristics of antibodies against K1-3 fragment of human plasminogen. *Biotechnologia Acta*. 2013;6(1):87-97.

3. Тихомиров АО, Жерносєков ДД, Рока-Мойя ЯМ, Діордієва СІ, Гриненко ТВ. Вплив Lys-форми плазміногену на актиновий цитоскелет тромбоцитів. *Фізіологічний журнал*. 2014;60(1):25-33.

4. Tykhomyrov AA. Dynamics of thrombin-induced exposition of actin on the platelet surface. *Ukrainian Biochemical Journal*. 2014;86(5):74-81.

5. Тихомиров АО, Жерносєков ДД, Рока-Мойя ЯМ, Діордієва СІ, Гриненко ТВ. Вплив Lys-плазміногену на секрецію тромбоцитів людини. *Фізіологічний журнал*. 2015;61(6):26-34.

6. Tykhomyrov AA, Zhernossekov DD, Grinenko TV. Surface-exposed actin binds plasminogen on the membrane of agonist-activated platelets: a flow cytometry study. *Biopolymers and Cell*. 2017;33(3):172-182.

7. Tykhomyrov AA, Zhernosekov DD, Guzyk MM, Korsa VV, Grinenko TV. Plasminogen modulates formation of reactive oxygen species in human platelets. *Ukrainian Biochemical Journal*. 2018;90(6):31-40.

8. Tykhomyrov AA, Zhernosekov DD, Grinenko TV. Plasminogen modulates formation and release of platelet angiogenic regulators. *Ukrainian Biochemical Journal*. 2020;92(1):31-40.

9. Tykhomyrov AA, Roka-Moya YM, Diordieva SI, Grinenko TV. Towards the mechanism of anti-aggregating activity of plasminogen: disruption of platelet actin cytoskeleton by Lys-form of plasminogen // Experimental and Theoretical Biophysics: International Conference for Young Scientists, Puschino, Russia, 22-24 October 2012.

10. Tykhomyrov AA, Diordieva SI, Roka-Moya YM, Grinenko TV. Thrombin-induced exposition of actin on the platelet membrane // Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології: Матеріали Другої Міжнародної наукової конференції, м. Дніпропетровськ, 24-25 вересня 2013 р. – С.89.

11. Bilous V, Roka-Moiia Y, Zhernossekov D, Tykhomyrov A, Diordieva S, Grinenko T. Lys-plasminogen affects platelet secretion and cytoskeleton rearrangement // 40-th FEBS Congress: FEBS Journal, Berlin, Germany, 4-9 July, 2015 – 282 (Suppl. 1) - P. 103.

12. Tykhomyrov A, Zhernosekov D, Roka-Moya Y, Grinenko T. Platelet-induced generation of angiostatins: a putative role for surface-exposed actin // Current Problems of Biochemistry and Cell Biology: The 3rd International Scientific conference, Dniepropetrovsk, Ukraine, 24-25 September 2015. - P. 47-48.

13. Tykhomyrov A, Zhernosekov D, Korsa V, Grinenko T. Does Lys-plasminogen make platelets anti-angiogenic? // Simposium and Summer School “Fundamental Principles of Cancer Biotherapy”, Kyiv, May 21-23, 2018: Experimental Oncology, 40 (2), p. 175.

3.2. Роль протеїнів плазміноген/плазмінової системи в процесах малігнізації та неопластичного росту

3.2.1. Вплив плазміноген/плазміну на апоптоз/автофагію в пухлинних клітинах in vitro

З метою визначення здатності пухлинних клітин активувати плазміноген у представленому дослідженні були використані онкотрансформовані клітини людини (MCF-7 – аденокарцинома грудної залози, A549 – аденокарцинома легені) та миші (4T1 – аденокарцинома грудної залози, LLC – карцинома легені миші). Визначення швидкості активації зимогену за розщепленням специфічного хромогенного субстрату S-2251 розраховували за формулою:

$$V = {}^{\Delta A_{405}}/_{\Delta t}$$

де ΔA_{405} – зміна поглинання за довжини хвилі 405 нм на лінійній ділянці кривої, Δt – проміжок часу (90 – 45 хв), за якого проводилось вимірювання зміни поглинання. Результати визначення швидкості активації зимогену з утворенням плазміну наведено у таблиці 3.1.

Таблиця 3.1

Швидкість утворення плазміну з Glu-плазміногену (Glu-Pg) різними лініями пухлинних клітин (M ± m, n = 3)

Glu-Pg, мкМ	MCF	4T1	LLC	A549
	V, опт.од.·с$^{-1}$ (×10^{-3})			
0,1	0,75 ± 0,08	0,24 ± 0,012	0,46 ± 0,02	1,5 ± 0,25
0,25	1,9 ± 0,23*	3,4 ± 0,19*	1,0 ± 0,08*	4,0 ± 0,56*
0,5	1,8 ± 0,17*	3,0 ± 0,32*	1,2 ± 0,16*	5,3 ± 0,41*

* - P < 0,05 у порівнянні з величиною за концентрації Pg 0,1 мкМ

Показано, що швидкість активації плазміногену, що є пропорційною інтенсивності розщеплення хромогенного субстрату S-2251 та вивільненню п-нітроаніліну, за концентрації зимогену у середовищі 0,25 та 0,5 мкМ істотно не відрізнялася за створених експериментальних умов, що може свідчити про насичення центрів зв'язування зимогену на поверхні клітин його молекулами. З усіх досліджених карциномних клітин найбільш вираженою питомою здатністю активувати плазміноген характеризувалися клітини лінії А549, які й були взяті для подальших досліджень (рис. 3.22). Здатність клітин активувати плазміноген перевіряли перед кожною серією досліджень, що проводилися.

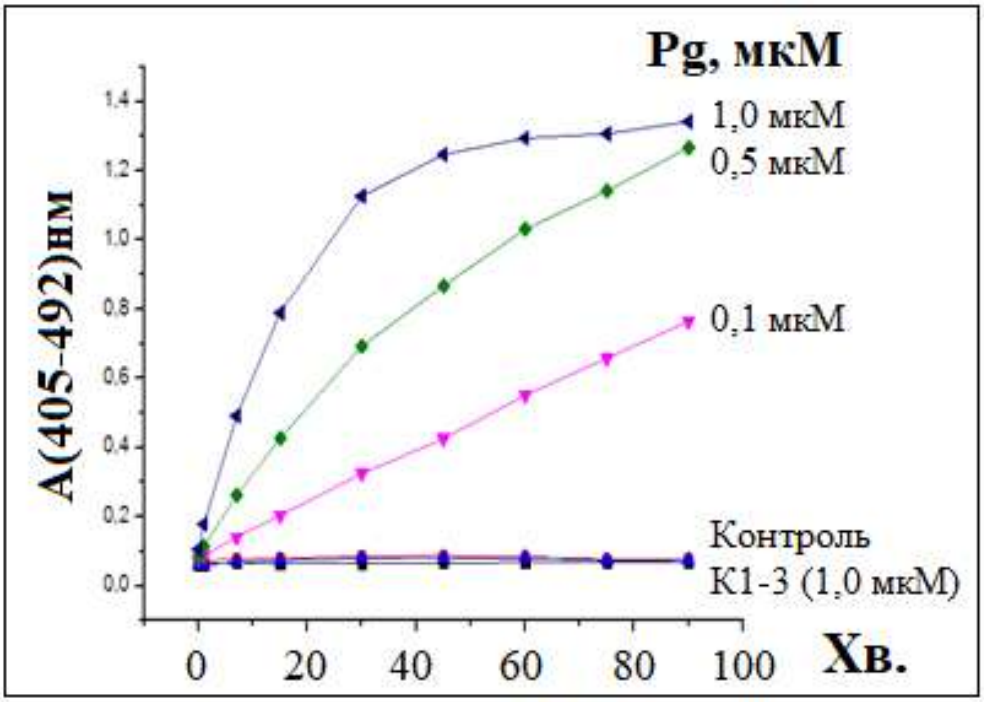

Рисунок 3.22 – Активація плазміногену за присутності клітин аденокарциноми легені А549 (усереднені результати трьох паралельних вимірювань).

Отже, інкубування клітин лінії А549 з плазміногеном за 37 ºС протягом 90 хв. призводить до появи плазміну, активність якого є пропорційною кількості доданого до клітин зимогену. Слід зауважити, що активність ендогенного плазміну виявилася нижчою за поріг чутливості методу

вимірювання. Фрагмент К1-3 важкого ланцюга плазмін(оген)у, взятий для перевірки можливої присутності домішок протеїнази, не розщеплював хромогенний субстрат, що свідчить додатковим доказом як специфічності методу, так і чистоти препарату ангіостатину.

Надекспресія протеїнів системи активації плазміногену (САП) є типовою рисою пухлинних клітин та використовується як прогностичний показник прогресії різних типів злоякісних пухлин: легені, грудної залози, прямої кишки, сечового пузиря, шлунку та ін. [141, 266]. Відомо, що за активацію плазміногену клітинами аденокарциноми легені відповідає, головним чином, активатор урокіназного типу (u-PA), який, разом з множинними копіями свого рецептору (u-PAR), надекспресується цими онкотрансформованими клітинами. Рецептором урокінази u-PAR, як відомо, є GPI-асоційований мембранний протеїн, який складається з трьох гомологічних доменів (DI, DII, DIII), основною функцією якого є участь у забезпеченні деградації компонентів ЕЦМ [407]. Кількість молекул u-PAR на поверхні клітин недрібноклітинного раку легень є підвищеною у порівнянні, наприклад, з нетрансформованими фібробластами, і корелює з негативним прогнозом захворювання та летальністю, асоційованими з ранньою інвазією та метастазуванням [417]. Плазмін, який утворюється на поверхні пухлинних клітин з плазміногену, зв’язаному з мембранними рецепторами, визначає феномен «озброєних» клітин і використовується ними для кліренсу шляху через міжклітинний простір у випадку мезенхімного типу рухливості. Показано, що плазмін розщеплює цілу низку адгезивних та рецепторних протеїнів, таких як синдекани, VCAM-1, ламінін, фібронектин, вітронектин, інтегрини тощо. Крім того, плазмін є одним з чинників, який сприяє вивільненню численних ростових факторів, як FGF-2, HGF та VEGF. Плазмін також активує латентні форми MMP-1, -2, -3, -9, -13 та -14, які у свою чергу забезпечують повну деградацію компонентів ЕЦМ [92].

В експерименті з клітинами лінії CHO-K1 (епітелійні клітини яєчника китайського хом’ячка) [160] показано, що плазмін, розщеплюючи ламінін та

фібронектин, порушує клітинну адгезію, призводячи до втрати контакту клітин з матриксом та клітинним мікрооточенням. Клітини змінюють свою морфологію, стають округлими, відбувається блебінг їхніх мембран, який супроводжується відшнуровуванням частини цитоплазми у вигляді мікровезикул. Результати світлової мікроскопії, проведеної у нашому дослідженні й наведені на рисунку 3.23, узгоджуються з даними літератури.

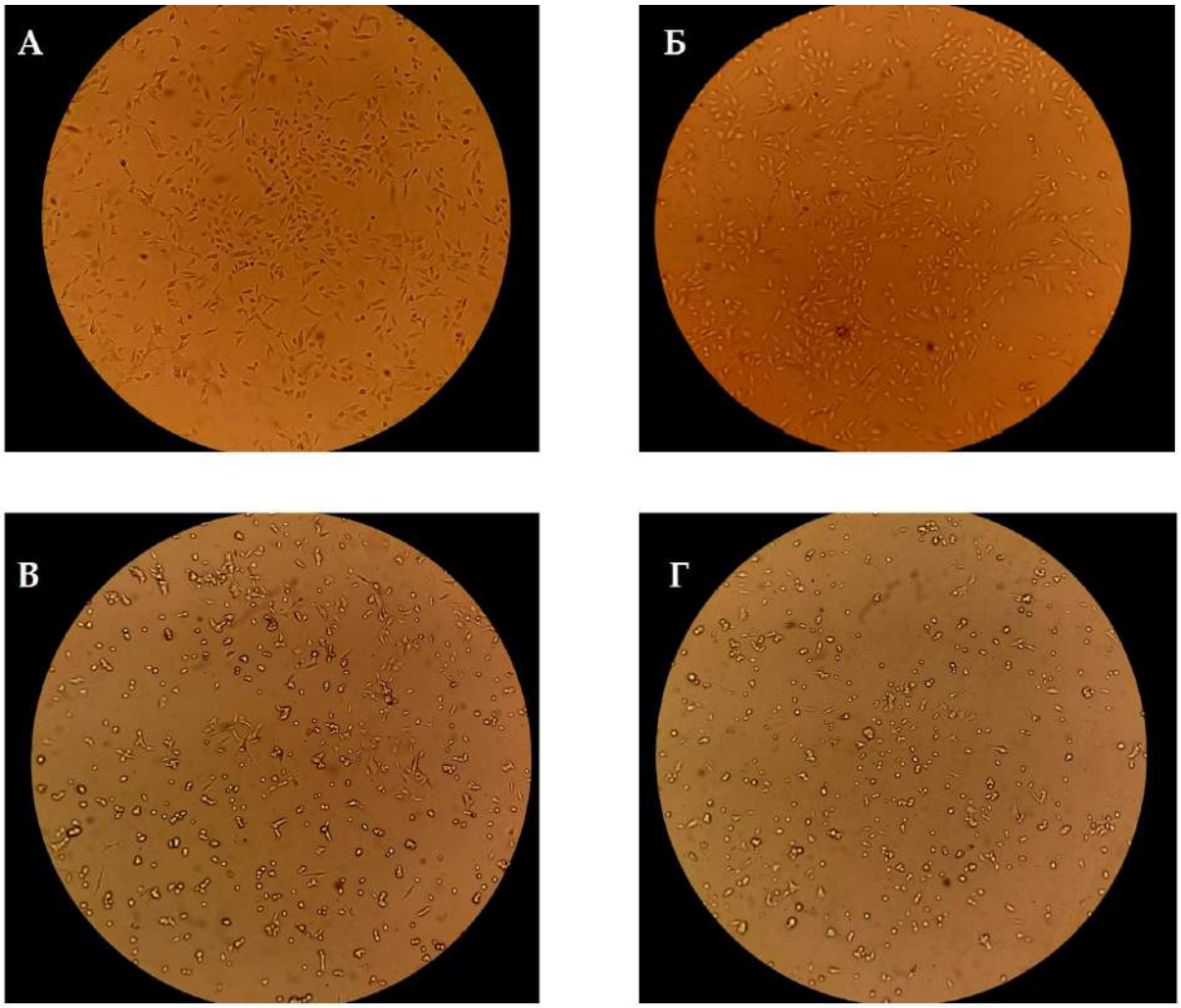

Рисунок 3.23 – Морфологічні зміни клітин лінії А549, індуковані плазміноген/плазміном (результати світлової мікроскопії): А – контроль, Б – ангіостатин К1-3 (1,0 мкМ), В – плазміноген (0,1 мкМ), Г – плазміноген (1,0 мкМ).

Інтактні клітини А549, які культивувалися у середовищі DMEM за стандартних умов (рис. 3.22А), характеризувалися притаманною цим

клітинам веретеноподібною морфологією, були розпластаними на підложці. Внесення фрагменту плазміногену К1-3 (ангіостатину) до кондиційного середовища у відносно високій концентрації (1 мкМ) істотно не вплинуло на морфологію та адгезивність клітин (рис. 3.22Б). Натомість присутність в інкубаційному середовищі плазміногену в концентрації 0,1 мкМ призвело до відшаровування клітин і зміни їхньої форми на округлу (рис. 3.22В,Г). За даними авторів [160], апротінін повністю пригнічував плазмін-індуковані зміни у культурі клітин CHO-K1. Це спостереження доводить, що саме плазмін, який утворюється з плазміногену за створених експериментальних умов, є головною протеазою, що порушує клітинну адгезію. Відокремившись від матриксу, клітини CHO-K1 підлягали апоптозу, як це показано авторами за допомогою МТТ-тесту. Результати TUNEL-аналізу, отримані авторами цитованої роботи, описують фрагментацію ДНК, що слугує додатковим критерієм запуску аноікісу – різновиду апоптотичної загибелі клітин внаслідок втрати ними адгезивності.

У нашій роботі ступінь деградації адгезивного протеїну фібронектин у лізатах клітин А549 використовували як додатковий параметр для оцінки активності плазмін-індукованого перицелюлярного протеоліза. Наявність продуктів деградації фібронектину визначали методом імуноблот-аналізу, результати якого показано на рисунку 3.24. Встановлено, що плазмін розщеплював фібронектин з утворенням цілого спектру продуктів деградації цього адегзивного протеїну в діапазоні M_m 180-25 кДа. Вже за концентрації екзогенного плазміногену 0,25 мкМ спостерігається практично повне розщеплення інтактної мономерної субодиниці фібронектину (~ 220 кДа) з превалюванням деградованих поліпептидів у діапазоні M_m 50-25 кДа. Таким чином, отримані результати свідчать про важливість фібронектину в утворенні адгезивних контактів аденокарциномних клітин та внесок плазмін-індукованого протеолізу фібронектину до втрати адгезивності пухлинними клітинами.

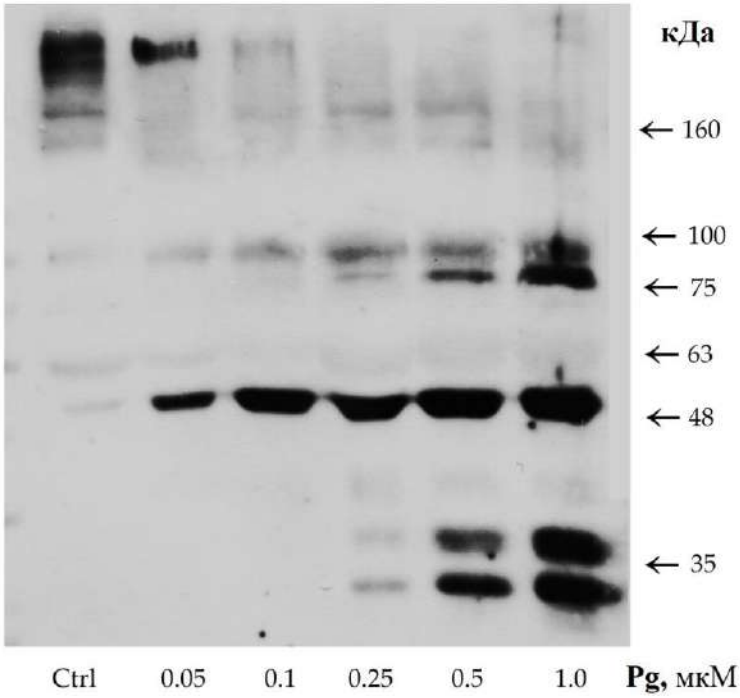

Рисунок 3.24 – Фрагментація фібронектина, індукована плазміном: результати імуноблот-аналізу лізатів аденокарциномних клітин легені А549.

Крім розщеплення протеїнів клітинної адгезії та компонентів ЕЦМ, плазмін активує латентні форми ММР та регулює біодоступність різних ростових факторів. Ці події асоційовані з ремоделюванням пухлинного мікрооточення та відіграють важливе значення для прогресії пухлини, індукції подальшої проліферації пухлинних клітин, міграції, інвазії та вивільнення пухлинними клітинами факторів росту та цитокінів [17, 424]. Плазмін-залежна деградація адгезивних протеїнів призводить до ретракції клітин та втрати ними адгезивності, що веде до індукування апоптозу/аноікісу Показано, що за описаним механізмом плазмін запускає аноікіс у нормальних клітинах: міофібробластах аорти [327] та клітинах гладеньких м’язів [423].

На противагу наведеним даним, результати МТТ-тесту клітин А549, оброблених плазміногеном, вказують на збереження метаболічної активності (життєздатності) клітинами аденокарциноми протягом 24 годин інкубації за експериментальних умов (рис. 3.25).

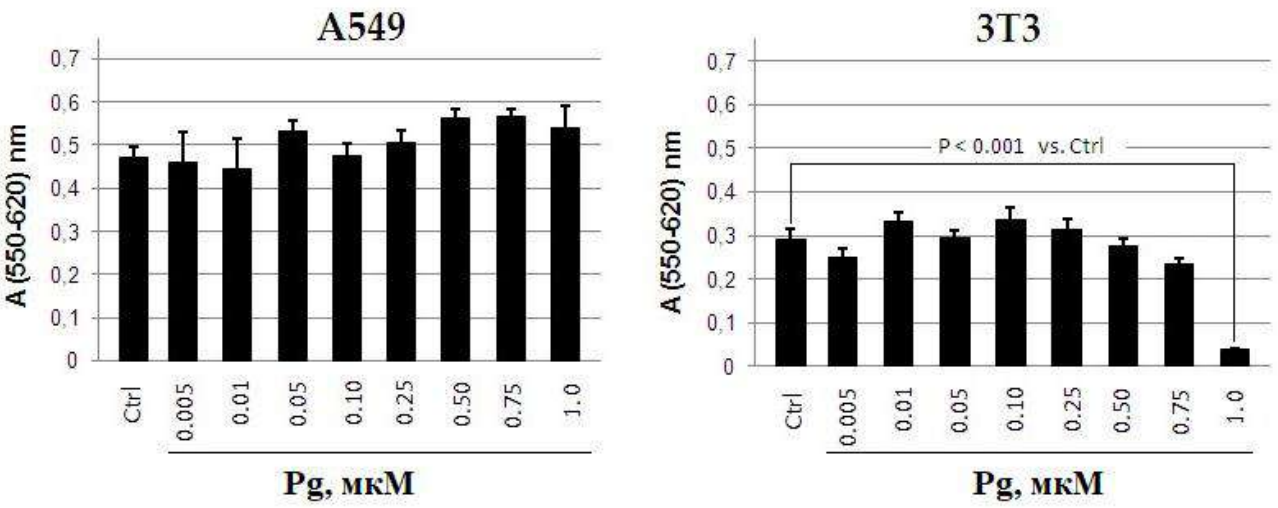

Рисунок 3.25 – Вплив плазміноген/плазміну на життєздатність клітин аденокарциноми легені А549 та умовно нормальних ембріональних фібробластів 3Т3 (результати МТТ-тесту).

На відміну від пухлинних клітин, які зберігали здатність відновлювати сіль тетразолію за умов інкубування в усьому діапазоні обраних концентрацій плазміногену, умовно нормальні ембріональні фібробласти 3Т3 виявилися чутливими до плазміногену у концентрації 1 мкМ. За найвищої концентрації проензиму здатність клітин 3Т3 відновлювати барвник в ході МТТ-тесту, яка відображає загальний рівень метаболізму клітин, виявилася у 7,6 рази нижчою за цей показник в інтактних клітинах, які правили за контроль ($P < 0,001$).

Згідно з існуючими даними, плазміноген та протеїни САП визначають перебіг процесів, що супроводжують загибель клітин через аноікіс. Цей феномен описаний для деяких епітелійних, амніотичних, лімфоїдних та інших нормальних клітин [13]. Залишається достеменно невідомим функціональне значення та роль САП у процесах, що супроводжують клітинну загибель, однак, доведеним є факт участі цих протеїнів як в ефекторній, так і екзекутивній фазах апоптозу. Показано, що в ході деградативної фази апоптозу на клітинах стрімко зростає кількість експонованих рецепторів плазміногену [463]. Активатор плазміногену u-PA транспортується до ядра

клітин завдяки механізму, який реалізується через взаємодію кринглового домену молекули активатору з протеїном-переносником ядерної мембрани нуклеоліном. Припускається, що в ядрі u-PA взаємодіє з транскрипційними факторами, впливаючи таким чином на експресію низки генів-регуляторів клітинного циклу [586].

Результати, отримані в дисертаційному дослідженні, свідчать на користь здатності клітин A549 проявляти резистентність до плазмін-індукованого апоптозу/аноікісу за створених експериментальних умов. Із джерел літератури відомо, що механізми виживання клітин, які втратили зв'язок з адгезивним субстратом або мікрооточенням, є множинними. Серед можливих шляхів уникнення пухлинними клітинами загибелі внаслідок порушення адгезії припускають існування наступних механізмів [601]:

- зміни патернів експресії інтегринів;
- створення власного позаклітинного матриксу, відмінного від нативного, який стимулює сигнальний шлях α_2-інтегрин–FAK–PI3K і забезпечує захист від аноікісу;
- використання активних форм оксигену (АФО);
- запуск епітелійно-мезенхімного переходу (ЕМП);
- перманентна активація сигнальних шляхів клітинного виживання;
- синтез мутантних і функціонально неактивних протеїнів-регуляторів шляхів клітинної загибелі;
- надекспресія специфічного інгібітору аноікісу tropomyosin-related kinase B (TrkB);
- гіпоксія.

Проте, які саме механізми сприяють виживанню пухлинних клітин після плазмін-індукованого порушення адгезивності в клітинах аденокарциноми легені, що може бути тісно асоційованим з підтриманням їхньої проліферативної активності, забезпеченням репликативного безсмертя, індукції ангіогенезу, активації інвазії і метастазування, репрограмування

енергетичного метаболізму та уникнення супресії з боку імунної системи, наразі вивчено недостатньо.

Зміни морфології клітини, не притаманні клітині взаємодії з позаклітинним матриксом у випадку онкогенної активації, порушення міжклітинних контактів, метаболічне репрограмування, надпродукування АФО та деякі інші процеси за множинними шляхами сприяють трансдукції сигналу до системи протеїну p53. Показано, що загибель неприкріплених клітин епітелійного походження внаслідок порушення адгезії, фокальних контактів або синтезу дефектних інтегринів супроводжується зростанням рівня АФО та запуском p53-опосередкованого аноікісу [224]. Як відомо, супресор пухлин p53 є транскрипційним фактором, який забезпечує контроль цілісності генетичного апарату та генетичну стабільність клітин, при цьому його експресія підсилюється внаслідок дії різних стресорних чинників. У залежності від ступеня пошкодження ДНК p53 активує транскрипцію певних регуляторних генів, визначаючи долю клітини: клітина, що потрапила до несприятливих умов або отримала пошкодження, повинна або підсилити репаративні процеси, або втратити здатність до проліферації через зупинку клітинного циклу чи загибелі шляхом апоптозу (рис. 3.26) [20].

До недавнього часу вважалося, що в нормальних клітинах за відсутністю стресу активність p53 та його вміст підтримуються на мінімальному рівні. Проте, на сьогодні встановлено, що, незалежно від умов, ген *p53* транскрибується постійно, а рівень транскрипту залежить від інтенсивності дії несприятливого чинника. Таким чином, головною функцією p53 є видалення з пулу клітин, що проліферують, тих з них, що є потенційно онкогенними. Це уявлення підтверджується тим фактом, що втрата функціональної активності p53, головним чином, через мутації гену встановлена більше, ніж у 50% випадків злоякісних новоутворень людини [591].

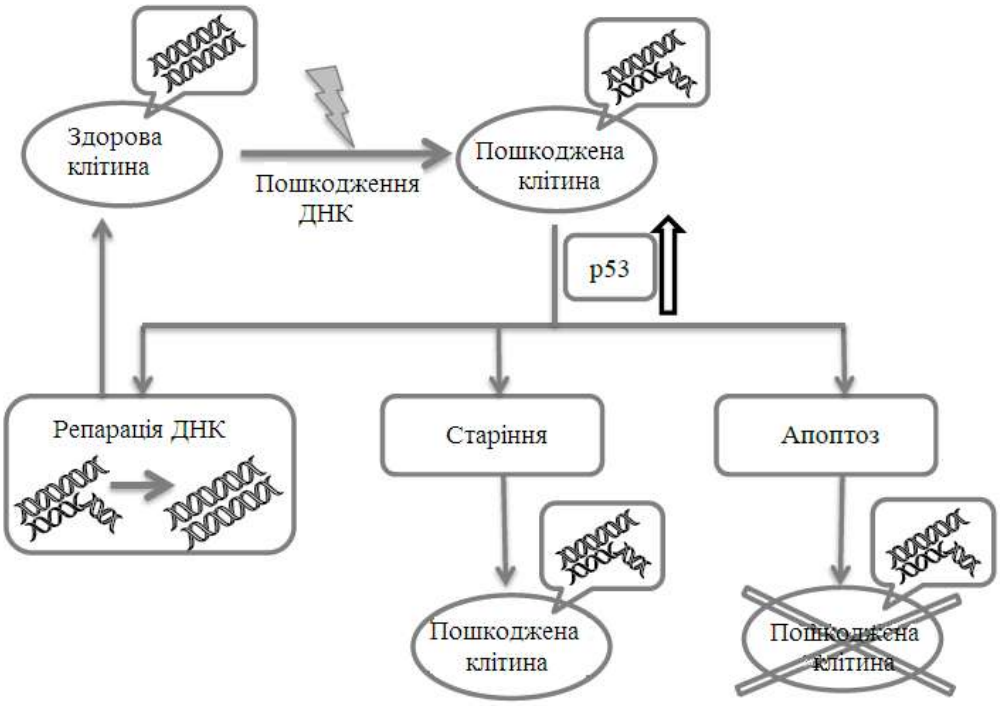

Рисунок 3.26 – Роль протеїну p53 у регулюванні клітинного циклу (за Чумаков [20]).

З метою встановлення субклітинної локалізації p53 у клітинах лінії A549 та вивчення впливу на неї плазмін(оген)у була проведена імуноцитохімічна детекція цього протеїну, результати якої представлено на рисунку 3.27. Як видно з мікрофотографій, отриманих за допомогою конфокального лазерного сканувального мікроскопу, інтактні клітини аденокарциноми (контроль) характеризуються позитивним сигналом за p53, який відносно рівномірно локалізується, переважно, у цитоплазмі клітин і відповідає певному базальному рівню цього протеїну. Проте, інкубація клітин з плазміногеном у концентрації 0,1 мкМ протягом 24 год. призводить до внутрішньоклітинного перерозподілу p53, при цьому специфічне забарвлення виявляється здебільшого у ядрі клітин.

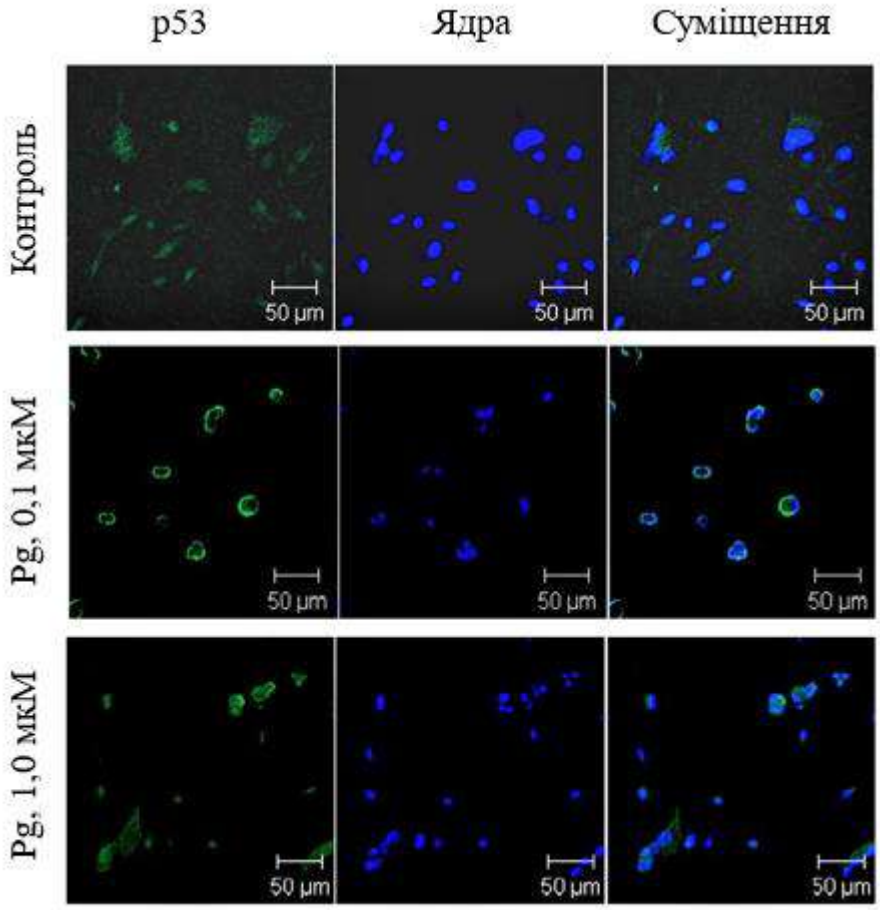

Рисунок 3.27 – Імуноцитохімічна детекція протеїну p53 у клітинах аденокарциноми лінії A549 за умов інкубації з плазміногеном протягом 24 годин (первинні мишачі анти-p53 антитіла, вторинні антитіла, кон'юговані з Alexa Fluor-488 – зелений колір, забарвлення ядер – синій колір).

На відміну від впливу плазміногену 0,1 мкМ, у клітинах A549 за присутності 1,0 мкМ плазміногену імунозабарвлення локалізується як у ядрі, так і у цитоплазмі. З отриманих результатів можна зробити висновок про те, що плазмін(оген) індукує зміни субклітинної локалізації p53, що може мати значення у регулюванні репаративних процесів або запуску апоптозу.

Для визначення впливу плазмін(оген)у на рівні деяких регуляторних протеїнів клітин A549 було проведено імуноблот-аналіз лізатів клітин, результати якого наведено на рисунку 3.28. З блотограми видно, що рівень протеїну p53 у клітинах після інкубування з плазміногеном не відрізнявся від такого в інтактних клітинах (контроль). Відомо, що протеїн p53

транслокується до ядра, зупиняє клітинний цикл на стадії G_1 й активувати транскрипцію таких проаптотичних генів, як *bax*.

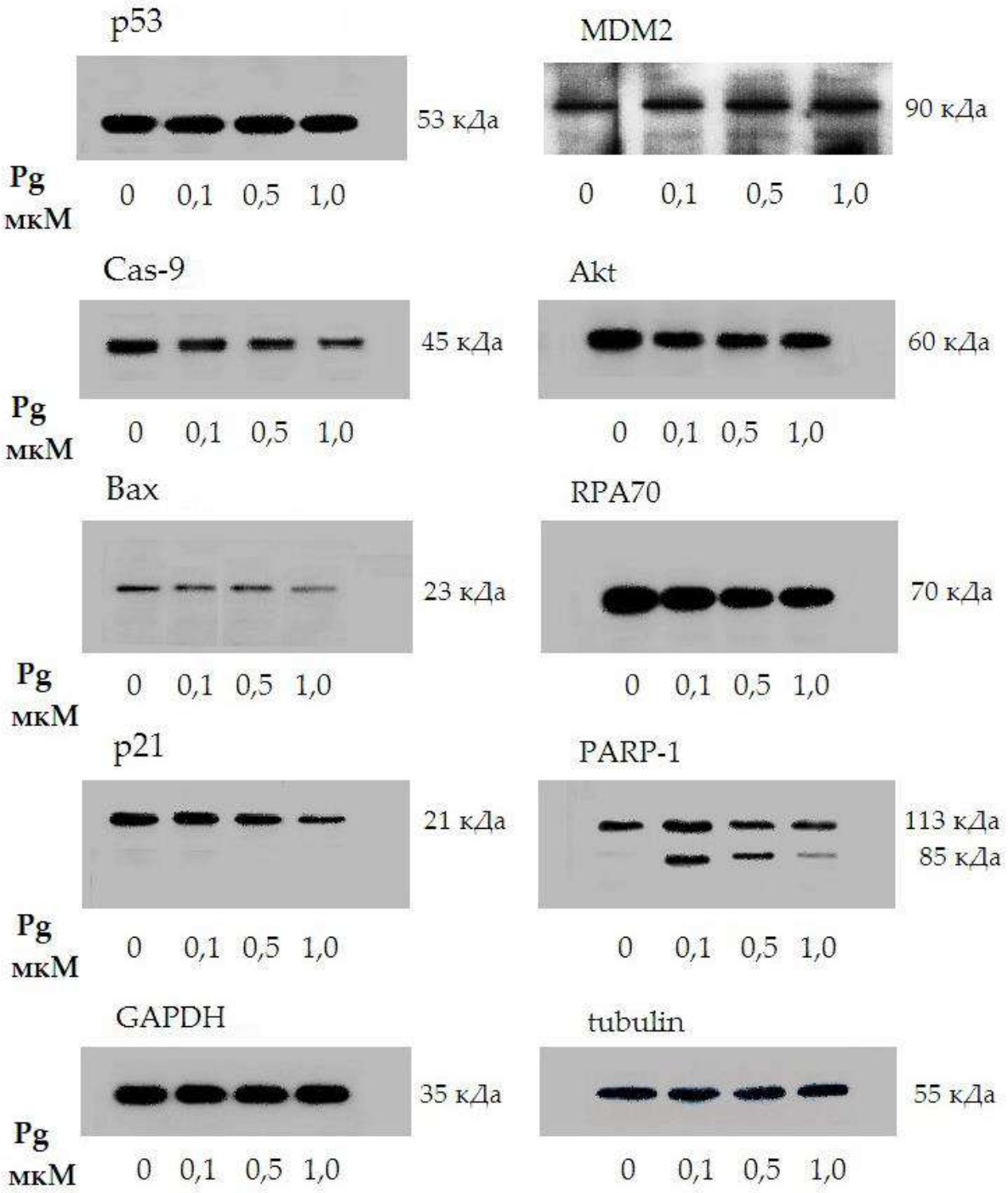

Рисунок 3.28 – Типові блотограми протеїнів-регуляторів апоптозу та клітинного циклу (лізати клітин аденокарциноми легень лінії A549, GADPH і тубулін – контроль адекватності нанесення протеїну).

Однак, за присутності плазмін(оген)у показано зниження рівня проапоптотичного протеїну Bax та зростання вмісту протеїну MDM2 у клітинах A549. Можливо, що надекспресія MDM2 – репресора p53, перешкоджає транслокації p53 до ядра. MDM2 є убіквітиновою лігазою, яка власно є продуктом гену, що активується p53, утворюючи таким чином з ним зворотні регуляторні зв'язки біосинтезу. MDM2 зв'язує p53 та затримує його у цитозолі, підсилюючи деградацію p53 у 26S протеасомах [263]. Ghosh та ін. [224] встановили, що за аноікісу підсилюється деградація p53, яка залежить від його взаємодії з MDM2, що призводить до убіквітинації p53 та наступній деградації в протеосомах.

Після активації гену *p53* під дією різних стресорних чинників частина цитозольного пулу протеїну p53 потрапляє до мітохондрій, де він взаємодіє з анти- та проапоптотичними протеїнами родини Bcl, а також регулює експресію каспаз. Проапоптотичний протеїн Bax, утворюючи гетеродимерний комплекс з білком Bcl-2, нейтралізує антиапоптотичну активність останнього. Встановлено, що для індукції експресії гена *bax* необхідна присутність функціонально активного протеїну p53, і що промоторна ділянка цього гена містить сайти, які розпізнаються p53 [119]. Можливо, що внаслідок наявності в клітинах A549 мутантної форми p53 або змін його рівня, індукованого плазміном, інтенсивність експресії *Bax* зменшується прямо у залежності від концентрації плазміногену, що підтверджується результатами імуноблот-аналізу, представленими на рисунку 3.28. Утворення пор у мітохондрійній мембрані відіграє головну роль у механізмах апоптозу, а Bax є одним з протеїнів, які саме й формують мітохондрійні пори, сприяючи загибелі клітин. Цілком можливо, що зменшення рівня Bax є одним з факторів виживання клітин A549, оскільки дозволяє протеїну-антагоністу – Bcl-2 – перешкоджати цьому процесу, інгібуючи витік цитохрому *c* з мітохондрій до цитозолю [182]. Крім того, Bax задіяний до регулювання експресії каспаз – протеаз, які слугують тригером апоптозу, розщеплюючи ключові регуляторні, ядерні та цитоскелетні протеїни, що призводить до модифікації їх функцій.

Активація каспази 3 – подія, спільна для внутрішнього та зовнішнього шляхів аноікісу. Вона запускає каскад протеолітичних реакцій, які розщеплюють такі сигнальні молекули, як кіназа фокальної адгезії (FAK), Cas і паксилін [538]. У нашому дослідженні показано, що плазмін(оген) дозозалежним чином пригнічує експресію каспази 9 – протеази, яка зв'язує та активує прокаспазу 3 з утворенням ефекторної каспази 3. Можливо, що зменшення рівня каспази 9 у клітинах A549 під дією плазміну, є одним з факторів виживання цих клітин. Отримані результати узгоджуються з інформацією, описаною в роботі [487], в який йдеться про те, що знижений рівень експресії каспаз як проапоптотичних регуляторів, є характерною рисою багатьох типів пухлинних клітин. Більш того, інактивація каспаз є специфічною ознакою деяких різновидів ракових клітин і відбувається на певних стадіях клітинної трансформації.

Ще одним регуляторним протеїном, зниження рівня якого спостерігається за умов впливу плазмін(оген)у на клітини A549, виявився протеїн p21 – універсальний інгібітор клітинного циклу. Інгібітор циклін-залежної кінази протеїн p21 є основною транскрипційною мішенню p53 і відіграє ключову роль у гальмуванні клітинного циклу на стадіях G1 та G2, чим запобігає неконтрольованому поділу клітин і розвитку пухлин. Показано, що зниження рівня експресії p21 є необхідною умовою для відновлення біосинтезу ДНК після блокування клітинного циклу у S-фазі [237]. В експериментах на клітинах A549 було показано, що алкалоїд матрин, індукуючи надекспресію p53 та p21 та інгібуючи синтез PCNA та eIF4E, пригнічує здатність цих клітин до міграції та проліферації [395]. Результати низки досліджень вказують на те, що втрата трансформованими клітинами здатності синтезувати p21 слугує негативним прогнозом захворювання [551]. Цікаво, що генетичне «вимкнення» гену *p21* призводить до підсилення регенерації нормальних тканин, зокрема, у випадку кардіоміоцитів спостерігається прискорення їх проліферації за умов супресії активності цього протеїну в мишей [186]. Можливо, що істотне зниження рівня p21 у

клітинах A549, індуковане плазмін(оген)ом, є важливим фактором набуття ними резистентості до апоптозу/аноікісу.

Реплікативний протеїн А (RPA70) – фактор, який відіграє ключову роль у метаболізмі ДНК, зв'язуючись з одноланцюговою ДНК у клітинах евкаріот, стабілізуючи її й не дозволяючи скручуватися в ході реплікації, він є також необхідною ланкою репаративного синтезу. У попередніх дослідах на інтактних клітинах A549 було встановлено, що RPA секвеструє частину пулу «вільного» p53 з подальшим його вивільненням, необхідним для активації низки генів, спрямованих на репарацію ДНК, пошкодженої ендогенними АФО [553]. Можливо, що зниження рівня RPA у клітинах аденокарциноми, індуковане плазмін(оген)ом, є відповіддю клітин, спрямованою на відновлення рівня вільного p53 у клітинах за умов стресу. АФО в клітинах A549 можуть генеруватися внаслідок активації асоційованих з G-білком PAR-рецепторів плазміном і відігравати подвійну роль у подальшій долі клітин: пошкоджувати ДНК та інші клітинні макромолекули та/або запускати захисні процеси, спрямовані на виживання клітин (зокрема, автофагію). Клітини лінії A549 характеризуються надекспресією усіх чотирьох ізоформ рецептору PAR [643]. На більшості клітин плазмін викликає десенситизацію рецепторів PAR, але за високих концентрацій ця протеїназа активує PAR-1 та -2. Результати низки експериметальних досліджень доводять провідну роль активації PAR у підтриманні життєздатності ракових клітин, що вважається одним з факторів малігнізації. Так, Huang та ін. [281] продемонстрували, що активація PAR-2 протеазою триптазою захищає клітини аденокарциноми легені від апоптозу, сприяючи зменшенню співвідношення Bax/Bcl-xL. Отримано переконливі свідчення того, що активація PAR-1 та -2 сериновими протеазами (тромбіном, трипсином та ін.) стимулює ріст первинної культури аденокарциномних клітин альвеол легені [298]. Wu та ін. [668] довели ефективність нокдауну експресії PAR-1 за допомогою технології siRNA з метою пригнічення проліферації та інвазії клітин A549 і запропонували використання таргетної стратегії як нового підходу в терапії злоякісних новоутворень.

Можливо, що протеази, які секретуються клітинами пухлин або утворюються перицелюлярно, через активацію PAR-рецепторів забезпечують реалізацію механізмів, які запобігають розвитку апоптозу. Одним з вірогідних шляхів антиапоптотичних ефектів системи активації PAR є генерування АФО, певні рівні яких можуть захищати ракові клітини від загибелі через окиснення/активацію тирозинкінази Src і запуск сигнальних шляхів виживання [480]. З іншого боку, надмірне утворення АФО може призвести до розвитку окисного стресу та пошкодження клітинних макромолекул, у тому числі й ДНК. У клітинах функціонують різні системи репарації ДНК, одна з головних ролей у цьому процесі відводиться ядерному протеїну полі(ADP-рибоза)-полімеразі-1 (PARP-1). Цей ензим здійснює процес полі(АДР)-рибозилювання ядерних протеїнів, перш за все, гістонів та рибосомальних білків, й бере участь у репарації одноланцюгових розривів ДНК, а також залучається до процесів експресії й ампліфікації генів клітинної диференціації, злоякісної трансформації тканин та апоптозу. Надактивація PARP-1 при масованих пошкодженнях ДНК призводить до вичерпування пулу NAD^+, пригнічення гліколізу та мітохондрійного дихання, драматичного зниження концентрації ATP та в кінцевому рахунку до клітинної загибелі шляхом «запрограмованого некрозу» або «некроптозу» [453]. Нещодавно описано механізм клітинної загибелі за участі PARP (партанатос), який є незалежним від активації каспаз і відрізняється від некрозу й апоптозу [695]. З іншого боку, саме активність PARP є важливою умовою виживання клітин за дії генотоксичних факторів, а отже, цей ензим може слугувати мішенню для фармакотерапії раку, адже його інгібування пригнічує пухлинний ріст і виживання [644]. Пригнічення активності PARP-1 в ході хіміотерапії призводить до апоптозу клітин, ДНК яких пошкоджене цитостатичними препаратами. У теперішній час низка інгібіторів PARP (веліпариб, ініпариб, олапариб, рукапариб) проходять клінічні випробування як потенційні протипухлинні препарати [147]. Результати імуноблот-аналізу, наведені на рисунку 3.29, показали, що вплив плазмін(оген)у на клітин A549 призвів до

зростання рівня як інтактної субодиниці PARP-1 113 кДа, так і продукту його розщеплення каспазою 3 (85 кДа), у цих клітинах. Важливо зауважити, що найбільше зростання рівня PARP-1 спостерігається за присутності найнижчої (0,1 мкМ) концентрації плазміногену, а у клітинах, оброблених 1,0 мкМ зимогену, вміст PARP-1 суттєво не відрізняється від базального рівня. На підставі отриманих у представленому дослідженні результатів можна підсумувати, що вплив плазміноген/плазміну на клітини A549, який викликає зміни морфології та втрату ними адгезивності, активує сигнальні та репаративні системи, спрямовані на уникнення ними апоптозу/аноікісу, що сприяє їхньому виживанню у відкріпленому стані.

З цих позицій дещо несподівано виглядає зниження рівня протеїну Akt, що спостерігається у клітинах A549 за дії плазмін(оген)у за всіх обраних концентрацій (рис. 3.28). Як відомо, у разі, коли інтегрини зв'язані з відповідними протеїнами ЕЦМ, FAK та integrin-linked kinase (ILK) рекрутують та активують сигнальні шляхи PI3K/Akt, ERK і Jun-кінази (JNK). PKB/Akt є необхідним елементом сигнальних шляхів виживання клітини, оскільки отримує адекватні сигнали виживання від інтегринів, факторів росту та міжклітинних контактів [445]. Активація PKB/Akt блокує низку етапів аноікісу, зокрема, вона супроводжується інактивацією каспази 9 і фосфорилюванням проапоптотичного протеїну Bad, активацією фактору NF-кB та інгібуванням транскрипційних факторів Fork head. Вважається, що шлях PI3K/Akt/mTOR є одним з універсальних сигнальних шляхів, які відповідають за уникнення апоптозу, ріст, проліферацію клітин та підтримання метаболізму. Обидва протеїни, PI3K та Akt, відповідають за транспорт глюкози та підтримання метаболічної активності клітин. Епітелійні клітини, що втратили зв'язок з матриксом, характеризуються дефіцитом ATP через порушення транспорту глюкози. Специфічні інгібітори експресії та активації Akt, наприклад, MK-2206, сенсетизують пухлинні клітини та розглядаються як потенційні протипухлинні агенти [121]. Не виключено, що у клітинах аденокарциноми втрата ними адгезивності також індукує

метаболічний дефіцит через супресію Akt. Можна припустити, що трансформовані клітини здатні виживати за умов метаболічного колапсу та уникати апоптозу/аноікісу, забезпечуючи енергетичні потреби за рахунок запуску автофагії. Цей процес дає змогу клітині, що відокремилася, отримувати енергію шляхом перетравлення в автофагосомах частини власних органел та макромолекул, тимчасово уникати апоптозу, отримуючи шанс на виживання та реактивацію, як тільки вона приєднається до адгезивного субстрату (механізм 'hide & wait') [476]. Індукція шляхів автофагії реалізується через активацію протеїнів-сенсорів метаболічного стресу клітини, таких як протеїнкіназа, що активується АМФ (АМРК). Остання активує канонічний шлях автофагії, опосередкований ATG6 та ATG8, підтримуючи продукцію ATP на життєво необхідному рівні, відтерміновуючи тим самим аноікіс. Важливу роль у такій інтеграції відіграють протеїни Beclin-1 (регулятор автофагії, який модулює анти-апоптотичну активність Bcl-2 і Bcl-xL, а також кіназ MAPK). Крім метаболічного колапсу як потужного індуктора автофагії, окисний стрес, спричинений втратою клітиною адгезивності, також слугує стимулом запуску автофагії. Було показано, що індукція автофагії внаслідок надпродукування АФО, контролюється активністю протеїнкінази ендоплазматичного ретикулуму, що активується РНК (PERK). У свою чергу, PERK фосфорилює та активує трансляційний фактор еукаріот 2α, індукуючи таким чином транскрипцію та трансляцію протеїнів ATG, які контролюють автофагію, стимулюють утворення ATP та підтримують виживання клітин за умов відсутності адгезії [95]. Можливо, що пухлинні клітини використовують саме такий механізм для захисту від аноікісу під час перебування у відкріпленому стані аж до відновлення зв'язку з міжклітинним матриксом. Отже, далі у представленому дослідженні перевіряли висунуту гіпотезу щодо запуску автофагії як відповіді клітин A549 на вплив плазмін(оген)у, вимірюючи рівні раннього маркеру автофагії Beclin-1, що відповідає за утворення автофагосом, та пізнього маркеру microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 (LC-3).

Результат імуноблот-аналізу рівня протеїну Beclin-1 у клітинах аденокарциноми легені А549 наведено на рисунку 3.29. Плазмін(оген) за концентрацій 0,1 та 0,5 мкМ спричинив статистично достовірне підвищення рівнів маркеру автофагії Beclin-1 у 1,74 та 2,19 рази у порівнянні з інтактними клітинами (P < 0,05), відповідно.

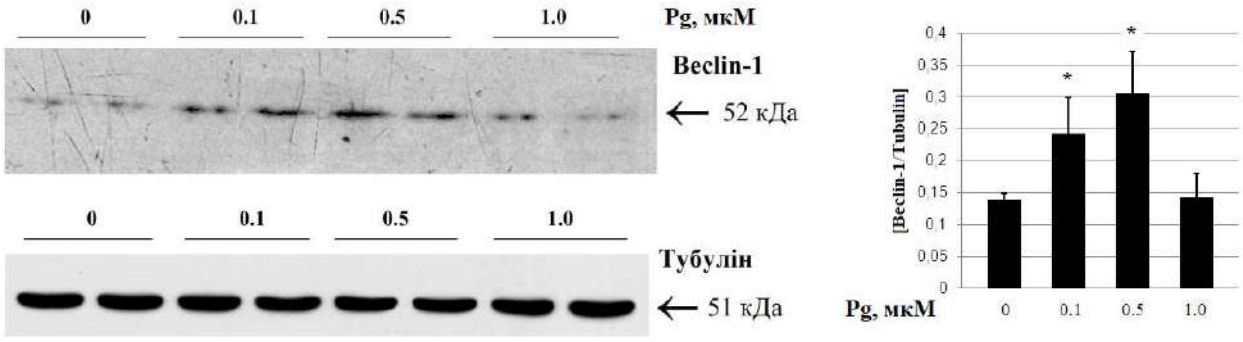

Рисунок 3.29 – Вплив плазмін(оген)у на рівень маркеру автофагії Beclin-1 у клітинах аденокарциноми легені А549 (типова блотограма лізатів клітин А549, n = 3, * – P < 0,05 порівняно з контролем «0 мкМ Pg»).

Beclin-1 (ортолог протеїну Atg6) належить до найбільш важливих регуляторів автофагічних процесів і використовується як маркер ранньої стадії автофагії, за якої цей протеїн бере участь у формуванні мембрани автофагосоми, яка оточує матеріал, що підлягає деградації. Крім того, цей протеїн модулює антиапоптичну активність Bcl-2, Bcl-xl та MAP-кіназ. Beclin-1 є складовою PI-3-кіназного комплексу III та регулює локалізацію інших протеїнів на автофагічних везикулах. Пригнічення експресії гену *BECN1* інгібує автофагію та гальмує утилізацію пошкоджених мітохондрій, що індукує надлишкове утворення АФО та спричинює тим самим генотоксичний стрес [310]. Експресія Beclin-1 прямо корелює з формуванням автофагосом, а отже, зростання його вмісту є прямою ознакою активації автофагії. Крім участі у формуванні резистентності пухлинних клітин до пошкоджуючих факторів, вважається, що Beclin-1 також залучається до

формування так званих васкулярних каналів – аналогів кровоносних судин у пухлинах, які доставляють поживні речовини та кисень до пухлини за умов гіпоксії [388].

Результати імуноблотингу ще одного маркеру мембрани автофагосом протеїну LC3 наведено на рисунку 3.30.

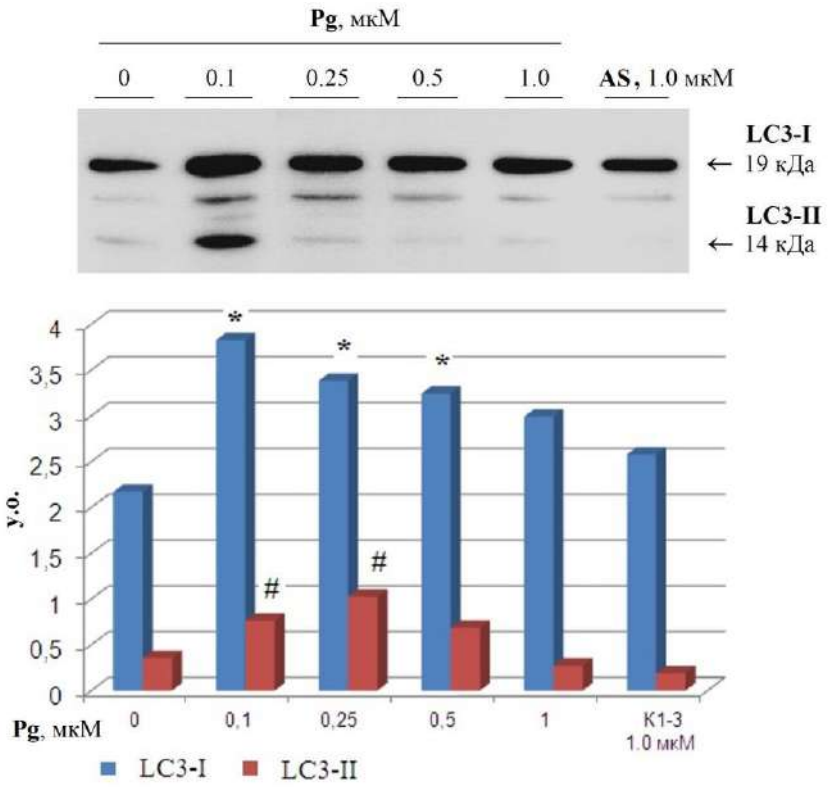

Рисунок 3.30 – Вплив плазмін(оген)у на рівень маркеру автофагії LC3 у клітинах A549 (типова блотограма лізатів клітин A549, медіани, n = 3)

* – P < 0,05 порівняно з контролем LC3-I «0 мкМ Pg»,

– P < 0,05 порівняно з контролем LC3-II «0 мкМ Pg».

Встановлено, що у клітинах A549 за присутності екзогенного плазміногену в концентраціях 0,1, 0,25 та 0,5 мкМ, рівень поліпептиду LC3-I у 1,76, 1,56 та 1,5 рази (P < 0.05) відповідно перевищував цю величину в інтактних клітинах. Разом із вмістом LC3-I у клітинах за присутності плазмін(оген)у в концентраціях 0,1 та 0,25 мкМ, спостерігалося зростання рівнів ліпокон'югату (форми LC3-II) у 2,17 та 2,94 у порівнянні з контрольною величиною відповідно (P < 0,05). Отриманий результат

імуноблот-аналізу вказує на конвертацію LC3-I на LC3-II, що є беззаперечною ознакою формування автофагосом. Аналогічно змінам рівня Beclin-1, у випадку LC3 також спостерігається обернена залежність змін вмісту маркерного протеїну від концентрації доданого до середовища плазміногену. Цей факт можна пояснити інтенсивною деградацією цих протеїнів протеїназами автолізосомального люмену в ході інкубації.

Результати визначення LC3 за допомогою імуноблоту узгоджуються з даними імуноцитохімічної детекція цього маркеру автофагії, представленими на рисунку 3.31.

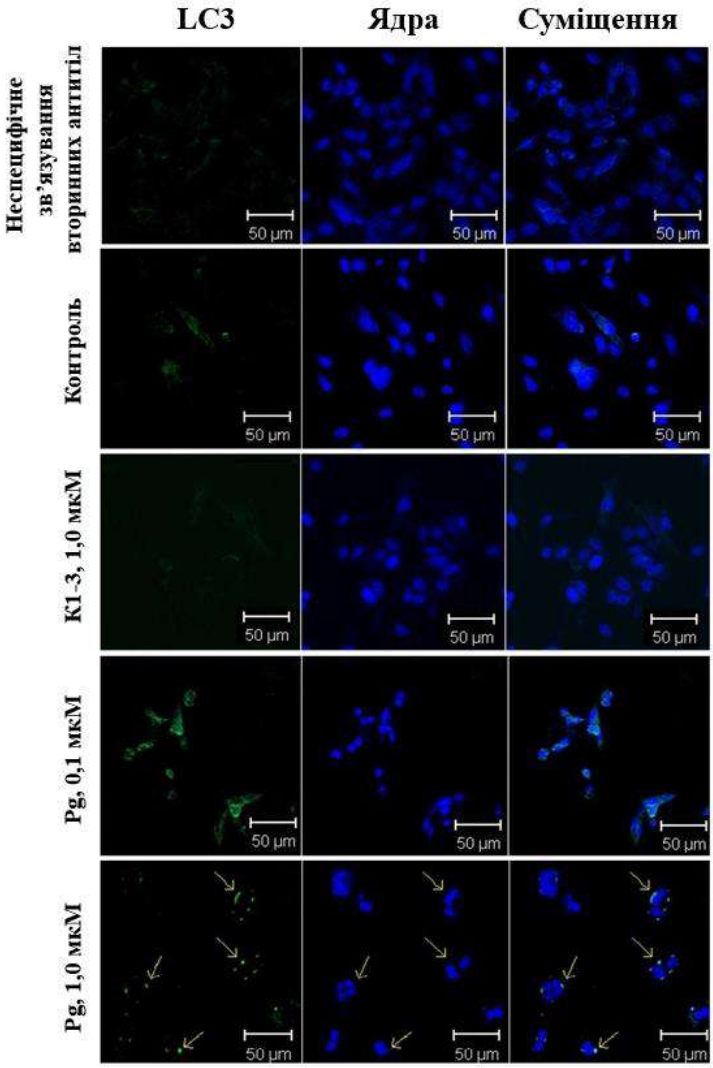

Рисунок 3.31 – Індукція плазміногеном автофагії в клітинах аденокарциноми легені A549 (типовий результат імуноцитохімічної детекції маркеру автофагосом LC3): зелений колір – імунозабарвлення LC3, синій колір – ядра, стрілками позначено пізні автофагосоми).

На відміну від інтактних клітин (контроль), які характеризувалися певним базальним рівнем імунозабарвлення за LC3, у цитозолі клітин за присутності 0,1 мкМ плазмін(оген)у спостерігалася наявність дифузно розташованих ділянок імунозабарвлення, які можуть відповідати автофагосомам на ранніх стадіях формування. У клітинах, які інкубували з плазміногеном у концентрації 1,0 мкМ, імунофлуоресценція LC3 була сконцентрована в крупних везикулах, які за розмірами та локалізацією в області ядерного ендоплазматичного ретикулума відповідають пізнім автофагосомам [687]. Слід зазначити, що ангіостатин (фрагмент К1-3) не спричинив будь-яких істотних змін рівня LC3 у клітинах аденокарциноми легені А549.

Молекулярний механізм автофагії є складним, його забезпечують дві автономні системи кон'югації, які здійснюють формування автофагосоми. До складу першої системи входять протеїни Atg 5, 7, 10 та 12, які виступають як «мітки» для матеріалу, що підлягає видаленню. Після стадії розпізнавання такого матеріалу до протеїнів приєднується комплекс Atg 5-12, а потім на ньому відбувається мультимеризація Atg16. Комплекс, що утворився, необхідний для мембранного секвестрування органел, які підлягають видаленню, з утворенням автофагосоми. Друга кон'югувальна система автофагії представлена протеїнами Atg3 і Atg4, котрі виконують функцію протеїнів убіквитинзалежного шляху деградації протеїнів. При цьому відбувається активація ензиму Autophagin-1, який активує протеїн LC3-I, переводячи його до форми LC3-II і закріплюючи на мембрані автофагосоми за рахунок утворення фосфоліпідного якоря внаслідок кон'югації з фосфатидилетаноламіном. Протеїн LC3-II залучається до росту фагофори і розташовується на внутрішній та зовнішній мембрані автофагосоми. Протеїн Autophagin-1 асоційований з системою мікротрубочок цитоскелету, завдяки чому відбувається рух та розширення автофагосоми для наступного злиття з лізосомою [686]. Таким чином, перетворення LC3-I (19 кДа) на LC3-II (14 кДа) використовується як показник для моніторингу автофагії [604].

Автофагію клітин можуть індукувати надпродукування АФО, іонізуюча радіація, деякими протипухлинні препарати, припинення дії факторів росту та, особливо, зниження вмісту амінокислот та АТР у цитозолі. У трьох останніх випадках автофагія запускається як компенсаторний механізм, спрямований на постачання живлення клітині з ендогенних джерел. Парадокс явища автофагії полягає у тому, що вона може виступати не лише як варіант реалізації танатогенної програми, але й, навпаки, спрацьовувати як програма виживання клітини (репаративна автофагія). Показано, що у випадку, якщо після активації апоптозу буде запущений процес автофагії, то відбувається відміна запрограмованої клітинної загибелі [373]. Таким чином, актуальним є пошук можливих взаємозв'язків між процесами автофагії та патогенетичними механізмами пухлинного росту. Індукція автофагії керується активацією протеїнів – сенсорів метаболічного стресу, таких як протеїнкіназа, що активується AMP (AMPK). AMPK активує канонічний шлях автофагії через ATG6 та ATG8, підтримуючи таким чином рівень АТР і відтерміновуючи аноікіс. Після втрати зв'язку з ЕЦМ та послаблення інтегринового сигналювання в клітинах інгібується шлях PI3K/Akt, який забезпечує їхнє виживання. Як PI3K, так і Akt відіграють ключову роль у забезпеченні транспорту та метаболізму глюкози. Відповідно, клітини, що втратили адгезивність, потерпають від дефіциту АТР через депривацію глюкози [123]. Роль автофагії за злоякісного росту може бути неоднозначною. За певних умов автофагія може забезпечувати тимчасовий механізм, спрямований на підтримання енергетичних потреб клітин, що втратили адгезивність, допоки вони не встановлять контакт з новим позаклітинним матриксом і не запустять механізми клітинного виживання. Отже, індукція апоптозу та пригнічення протекторної автофагії в ракових клітинах може бути ефективною стратегією обмеження дисемінації та метастазування злоякісних пухлин [31].

Процес автофагії починається з секвестрування міченого цитоплазматичного матеріалу до автофагосом. Двомембранні стінки автофагосом у більшості випадків утворені ділянками гладенького

ендоплазматичного ретикулуму. Альтернативним джерелом мембран автофагосом можуть бути фагофори та цистерни, що відшнурувалися від апарату Гольджі. Двомембранні автофагосоми зливаються з лізосомами з утворенням автофаголізосом, у яких відбувається деградація клітинного матеріалу. Важливу роль у цьому процесі відіграють протеїни цитоскелету, зокрема, цитокератин та віментин, які беруть участь у секвеструванні цитоплазматичного матеріалу та подальшій фузії автофагосом з лізосомами, що відбувається за участі мікротрубочок [74]. Результати визначення віментину в клітинах А549 методом імуноблотингу, наведені на рисунку 3.32, свідчать про зростання рівня цього цитоскелетного протеїну за присутності плазмін(оген)у.

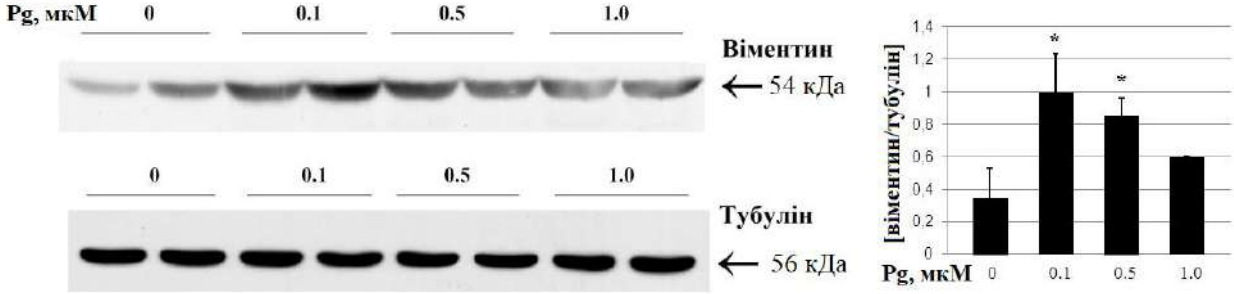

Рисунок 3.32 – Вплив плазмін(оген)у на рівень віментину в клітинах аденокарциноми легені А549 (типова блотограма лізатів клітин А549, n = 3); * – P < 0,05 порівняно з контролем.

Важливо зауважити, що, як й у випадку Beclin-1 та LC3, найбільш виражені зміни рівня віментину спостерігаються за присутності плазміногену у концентраціях 0,1 та 0,5 мкМ (зростання у 2,9 та 2,5 рази у порівнянні з контролем, P < 0.05). Відповідність змін вмісту протеїнів-маркерів автофагії та віментину можуть свідчити про залучення цього цитоскелетного протеїну до процесів, пов’язаних з плазмін-індукованою автофагією в клітинах А549. Крім участі в автофагії, віментин виконує свою канонічну цитоскелетну

функцію, забезпечуючи механічну стабільність клітини та її локомоторну активність. Показано, що експресія віментину в онкотрансформованих клітинах корелює з появою у них здатності до міграції та інвазії до оточуючих тканин. Для клітин багатьох типів пухлин епітелійного походження експресія віментину характерна для клітин з високим індексом метастазування. Підсилення експресії віментину супроводжується підвищенням рухливості та інвазійності пухлинних клітин. Віментин є одним з ключових маркерів епітелійно-мезенхімного переходу (ЕМП) [390]. Доведено, що надекспресія віментину є ознакою ЕМП, що асоціюється з набуттям пухлинними клітинами високого проінвазійного потенціалу й агресивного фенотипу. Підвищення експресії віментину в різних малігнізованих клітинах епітелійного походження корелює з негативним прогнозом виживання пацієнтів [539].

Окисний стрес, що розвивається внаслідок вичерпання потенціалу антиоксидантної системи в раковій клітині після втрати нею адгезивності, може бути одним з найбільш потужних стимуляторів автофагії. Плазмін, який утворюється із зимогену на плазматичній мембрані клітин, здатний стимулювати утворення АФО через активацію PAR-рецепторів та асоційованої з ними NADP(H)-оксидази [282]. Надактивація PAR-залежних шляхів, зокрема, PAR-1/NADP(H)-оксидази, призводить до підсиленого внутрішньоклітинного генерування АФО. Надмірна кількість АФО може чинити цитотоксичну дію через окисне ушкодження ДНК, ліпідів, протеїнів та інших клітинних молекул та структур. Зрештою, неконтрольоване утворення АФО спричинює апоптоз та клітинну загибель [511]. Внутрішньоклітинні антиоксидантні системи беруть участь у регулюванні рівнів АФО та активуються у відповідь на підсилене продукування АФО. Зокрема, ензими системи глутатіону здійснюють нейтралізацію вільних радикалів, використовуючи NADPH для забезпечення відновлення молекул глутатіону [60]. З огляду на це, значну увагу приділяється встановленню ролі різних сигнальних протеїнів у регулюванні окисно-відновного балансу в пухлинних клітинах. Одним з найбільш важливих регулювальних

(сенсорних) протеїнів, які визначають резистентність пухлинних клітин до метаболічних стресів та дії цитотоксичних факторів, є TIGAR (TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator). Цей ензим володіє фруктозо-2,6-дифосфатазною активністю й функціонує як регулятор обміну глюкози, перемикаючи її метаболізм з гліколітичного окиснення на розщеплення ензимами пентозофосфатного шляху, за рахунок чого клітина отримує додаткову кількість NADPH, необхідну, зокрема, для відновлення глутатіону, активації системи знешкодження АФО та зменшення рівня інтенсивності окисного пошкодження клітини [68]. Оскільки TIGAR підсилює роботу антиоксидантної системи клітини, сприяє нейтралізації ксенобіотиків/цитостатиків та проявляє антиапоптотичні властивості, є підстави розглядати цей протеїн як один з найбільш важливих факторів резистентності пухлинних клітин до дії стрес-факторів. Доведено, що TIGAR є одним з факторів підтримки процесів, асоційованих з малігнізацією пухлин [391]. Разом із залученням до роботи системи антиоксидантного захисту клітини, TIGAR виконує низку регуляторних функцій, зокрема, бере участь у репарації ДНК, апоптозі та автофагії, модулюванні клітинного циклу [672]. Надекспресія TIGAR є характерною ознакою прогресії, інвазії та метастазування недрібноклітинного раку легені, що асоційовано з активацією експресії Met [560]. Надекспресія TIGAR спостерігається в клітинах злоякісних пухлин та в різних трансформованих клітинах (за лейкемії, пухлинах грудної залози, легені, печінки, кишечника та ін.), а підвищення рівня цього протеїну розглядається як негативна прогностична ознака перебігу онкологічного захворювання [391]. У клітинах гліобластоми TIGAR зв’язується з протеїнкіназою B (AKT), підсилюючи її активність, чим сприяє резистентності до окисного стресу та прогресії пухлинного росту [603].

У представленому дослідженні визначали вплив плазмін(оген)у на рівень протеїну TIGAR у клітинах A549 за допомогою імуноблотингу, результати якого представлено на рисунку 3.33.

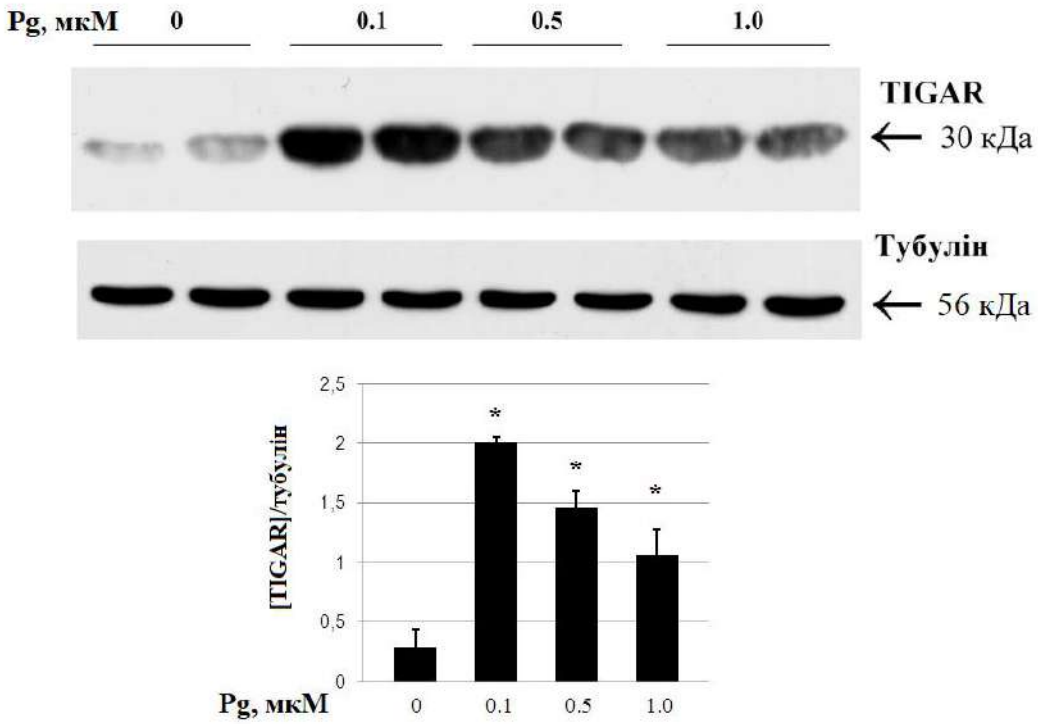

Рисунок 3.33 – Вплив плазмін(оген)у на рівень протеїну TIGAR у клітинах аденокарциноми легені А549 (типова блотограма лізатів клітин А549, n = 3); * – P < 0,05 порівняно з контролем.

Плазмін(оген) викликав статистично достовірні зміни рівня протеїну TIGAR, причому ефекти спостерігалися за усіх діючих концентрацій зимогену, що додавали до середовища культивування клітин А549. Так, за концентрацій плазміногену 0,1, 0,5 та 1,0 мкМ спостерігалося підвищення рівня протеїну TIGAR, у середньому, у 7,14, 5,21 та 3,82 рази у порівнянні з відповідним контрольним значенням (P < 0,05). Враховуючи, що TIGAR є одним з факторів, які визначають набуття раковими клітинами агресивного фенотипу та сприяє формуванню резистентності до дії цитотоксичних чинників, можна припустити, що зростання рівнів TIGAR у клітинах А549 за дії плазмін(оген)у може виступати одним з адаптивних механізмів малігнізованих клітин за умов стресу. Можливо, що метаболічне репрограмування, опосередковане TIGAR, визначає цитопротекторні

механізми, які спрямовані на уникнення загибелі пухлинних клітин внаслідок апоптозу/аноікосу.

Серед численних плейотропних ефектів TIGAR активно досліджується його мотогенна активність, яка полягає у підтримці та забезпеченні ЕМП та клітинної рухливості як основи інвазії пухлинних клітин та подальшого метастазування, через що цей протеїн отримав назву *motogenic protein*.

Існують докази щодо функціонування протеїну TIGAR як позитивного регулятора інвазійної активності пухлинних клітин та метастазування, що опосередковується через його реципрокні взаємодії з Met-асоційованими сигнальними шляхами [560]. Інгібування рецептору Met призводить до пригнічення експресії TIGAR та, відповідно, супроводжується зменшенням внутрішньоклітинної концентрації NADPH, що призводить до загибелі клітин [391]. У свою чергу, ензими центральних метаболічних шляхів беруть активну участь у регулюванні сигнальних мереж клітини. Зокрема, 6-фосфоглюконатдегідрогеназа регулює міграцію пухлинних клітин через модулювання експресії Met-рецептора *in vitro* [105].

Наступним етапом представленого експериментального дослідження було перевірити на клітинній моделі *in vitro* залучення протеїну TIGAR до регулювання міграційної активності клітин аденокарциноми легені A549. За допомогою технології siRNA було отримано сублінію клітин A549 з пригніченою експресію TIGAR (підхід *loss of function*) і досліджено міграційну активність цих клітин за допомогою скретч-тесту (метод подряпини) [24], результати якого представлено на рисунку 3.34. Отримані дані чітко вказують на істотне пригнічення міграційної активності клітин A549 з дефіцитом протеїну TIGAR. Результати, отримані в проведеному дослідженні, узгоджуються з даними імуноблот-аналізу, які демонструють, що культивування клітин аденокарциноми легені A549 за присутності плазміногену супроводжується утворенням плазміну та зростанням рівнів протеїну TIGAR (див. рис. 3.33).

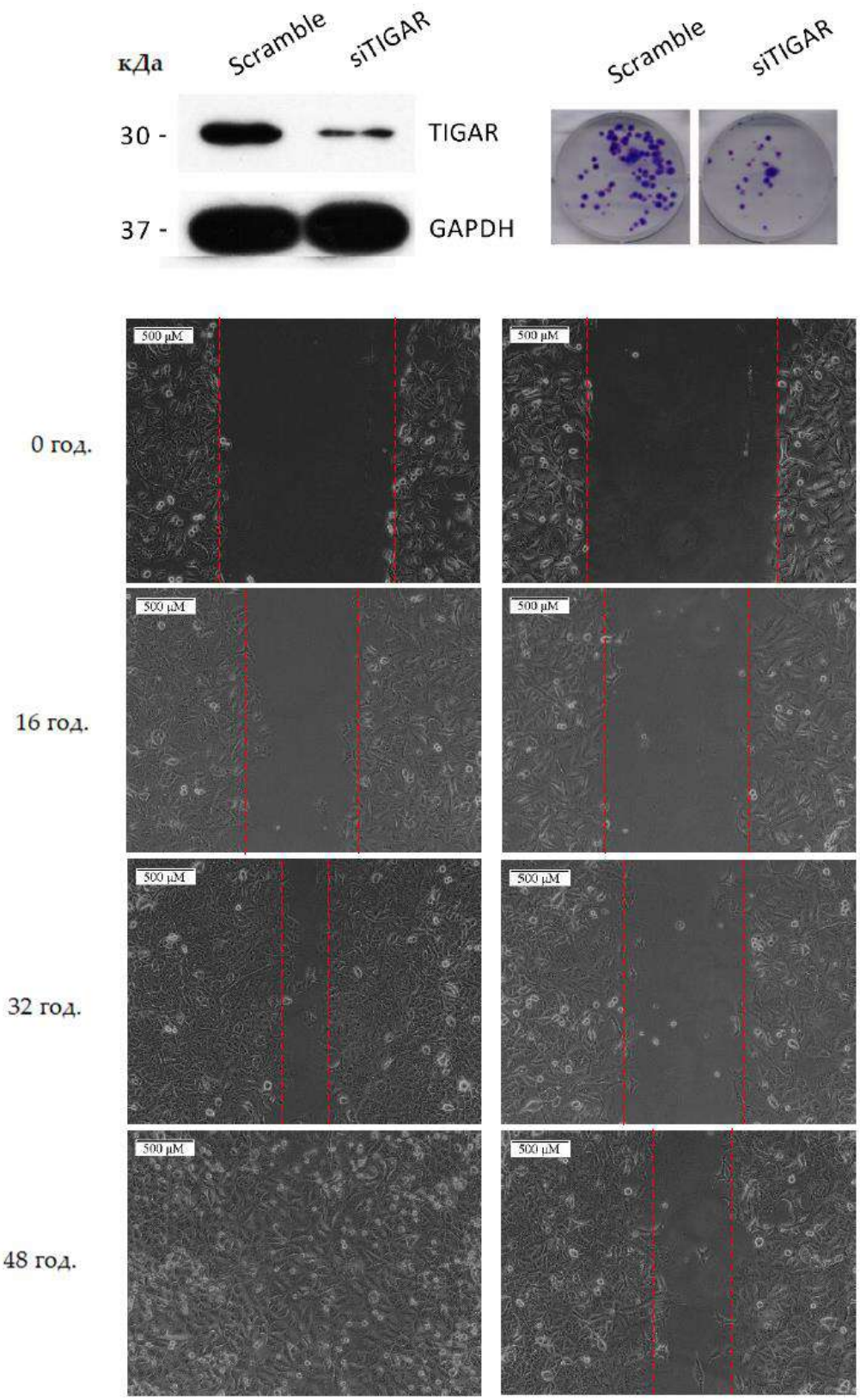

Рисунок 3.34 – Участь регуляторного ензиму TIGAR (TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator) у підтриманні міграційної активності клітин аденокарциноми легені A549 (нокдаун TIGAR за допомогою технології siRNA, результати скретч-тесту).

Таким чином, можна прийти до висновку, що підсилення синтезу TIGAR у клітинах A549 за умов стресу, індукованого порушенням адгезивності, разом із запуском репаративної автофагії, можуть використовуватися пухлинними клітинами для набуття резистентності до плазмін-індукованого апоптозу/аноікісу. Результати, вперше отримані у дисертаційній роботі, дозволяють стверджувати, що протеїн TIGAR може функціонувати як компонент сигнальних шляхів, які регулюють міграційну активність ракових клітин за впливу плазмін(оген)у.

Отже, проведене у дисертаційній роботі дослідження спрямовано на вирішення однієї з найбільш актуальних задач молекулярної онкології та біохімії – дослідженню механізмів резистентності трансформованих клітин до аноікісу. Отримані новітні дані свідчать, що одними з механізмів, що забезпечують виживання пухлинних клітин після втрати ними адгезивності, є автофагія та метаболічне репрограмування за участі протеїну TIGAR. Подальші дослідження мають з'ясувати контекст-залежну роль та механізми автофагії за розвитку неоплазій різного походження з метою розробки й впровадження нових препаратів-модуляторів таргетної терапії, спрямованих на пригнічення метастазування.

3.2.2. Регулювання ангіостатинами міграційної активності пухлинних клітин

Наступним питанням, поставленим у дисертаційній роботі, було з'ясування можливості утворення ангіостатинів за участі протеолітичних систем пухлинних клітин. Результати імунохімічної детекції продуктів фрагментації плазміногену протеазами клітин A549 за умов 24-годинної інкубації із зимогеном у різних його концентраціях наведено на рисунку 3.35. Плазміноген ендогенного походження в клітинах A549 (зразок «0 мкМ Pg») не виявлявся. Слід зауважити, що за додавання екзогенного плазміногену до середовища з клітинами аденокарциноми відбувалося інтенсивне

розщеплення зимогену. Переважна більшість імунореактивних поліпептидів, які є продуктами його обмеженого протеолізу з M_m у діапазоні 55-28 кДа, виявлялися у більшій кількості в кондиційному середовищі.

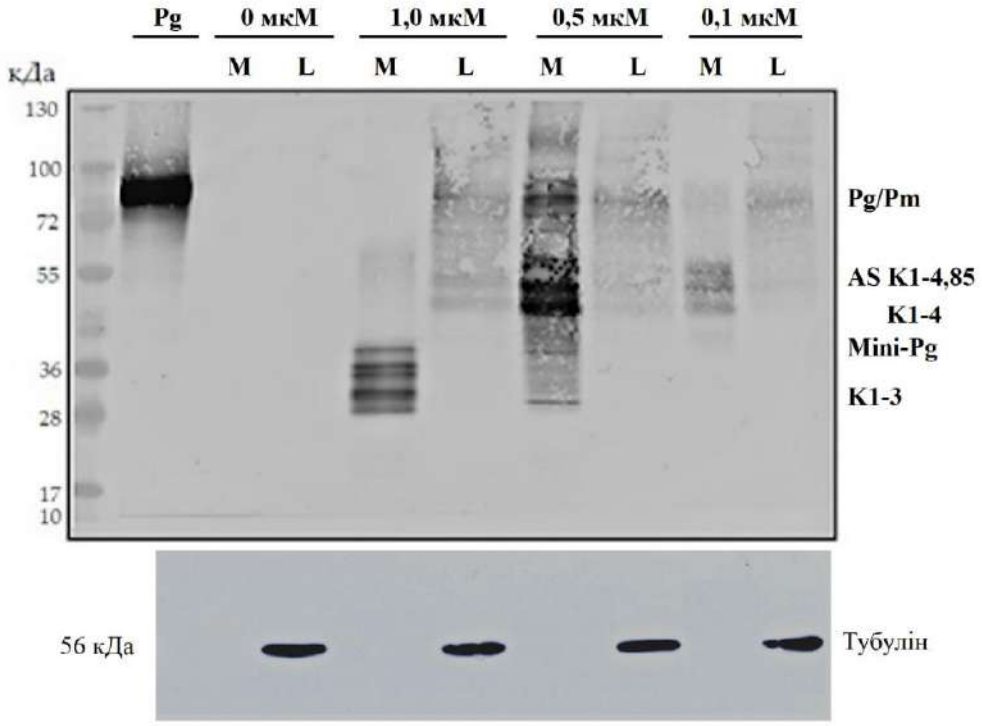

Рисунок 3.35 – Утворення ангіостатинів клітинами аденокарциноми легені А549 через обмежений протеоліз екзогенного плазміногену: результати імуноблот-аналізу лізатів (Lys) та зразків кондиційного середовища (Med) клітин А549.

Натомість, у лізатах клітин виявлено поліпептид з M_m ~ 85 кДа, що може відповідати Lys-плазміногену або власно плазміну. Поліпептиди 55-40 кДа (ангіостатини К1-4 та К1-4,85) у лізатах клітин знаходяться у мінорних кількостях у порівнянні з їхнім вмістом у середовищі. З блотограми видно, що поліпептидний склад фрагментів плазміногену, які утворилися за інкубації з клітинами А549, залежить від концентрації внесеного протеїну. Імовірно, що плазмін, який утворюється на клітинах і знаходиться в асоційованому з плазматичною мембраною стані, конвертує молекули зимогену кондиційного середовища до ангіостатинів, а отже, ступінь глибини гідролізу молекул

зимогену прямо залежить від кількості плазміну, що утворюється у системі. За концентрації плазміногену 0,1 та 0,5 мкМ у зразках культурального середовища виявляються переважно відносно високомолекулярні фрагменти 55-40 кДа, а також залишкові кількості інтактного протеїну. Натомість, за присутності 1,0 мкМ плазміногену склад імунореактивних поліпептидів представлений більш деградованими фрагментами (38-26 кДа – міні-плазміноген та К1-3), що свідчить про швидкий протеоліз як інтактних молекул зимогену, так і його високомолекулярних проміжних продуктів за механізмом блочного фрагментування.

Отримані у дисертаційній роботі дані узгоджуються з результатами дослідження [653], проведеного з використанням восьми різних типів пухлинних клітин (рак передміхурової залози, сечового міхура, меланоми, шийки матки, грудної залози, прямої кишки та нирок), що продукування ангіостатинів розпочинається з 8-ї години інкубації, а максимальна кількість фрагментів плазміногену з'являється після 24-ї години. При цьому, переважна кількість фрагментів має величину M_m 50-36 кДа і лише деякі лінії клітин розщеплюють цей протеїн з утворенням менших за масою продуктів (36 і 31 кДа). Зокрема, у кондиційному середовищі клітин лінії САМА (карцинома грудної залози) спостерігалася поява продуктів розщеплення з M_m 47 та 44 кДа на 8-му годину інкубації, тоді як фрагменти 42 та 39 кДа з'являлися вже після 24 годин експерименту. При проведенні інкубації за 0 ^oC відбувалося повне гальмування появи плазміну та утворення ангіостатинів. На підставі експериментальних даних, отриманих з використанням клітин, що експресували u-PA або t-PA, та інгібіторів протеаз (лейпептину та апротиніну), автори дійшли до висновку, що головний внесок до утворення ангіостатинів роблять саме серинові протеїнази – компоненти САП. Виключення становили клітини, які не експресували активатори плазміногену: утворення ними ангіостатинів пригнічувалося ЕДТК та фосфорамідоном, що свідчить про значну роль ММР в утворенні ангіостатинів. Важливо зауважити, що Е64 (інгібітор цистеїнових протеаз) та

пепстатин (інгібітор аспарагінових протеаз) не впливали на конвертацію плазміногену на ангіостатини жодною з досліджуваних ліній клітин. Результати, отримані у дисертаційному дослідженні, доповнюють існуючі уявлення тим спостереженням, що ангіостатини, здебільшого, вивільняються в оточуюче пухлину середовище (а також в лімфу або кров), де вони можуть функціонувати системно як інгібітори неоваскуляризації, пригнічуючи прогресію вторинних осередків пухлинного росту. Проте, безперечним є той факт, що здатність продукувати ангіостатини та локалізація останніх залежить від типу пухлинних клітин, як це буде продемонстровано нижче.

У літературі широко описано вирішальну роль серинових протеїназ в утворенні ангіостатин-подібних поліпептидів або у регулюванні активності інших протеолітичних систем, які відповідають за утворення ангіостатинів. Авторами [216] запропоновано гіпотетичний механізм генерування ангіостатинів за участі серинових протеїназ, що складається з двох стадій. На першому етапі uPA, що може секретуватися пухлинними клітинами до середовища, перетворює неактивний зимоген на плазмін. Активна протеїназа за присутності донору вільних сульфгідрильних груп (L-цистеїн, N-ацетил-L-цистеїн, D-пеніциламін, каптопріл, відновлений глутатіон) розщеплюється з утворенням ангіостатинів в ході автопротеолізу. В експериментах *in vitro* з використанням очищених активаторів (tPA та стрептокінази) було доведено можливість їхньої участі у появі ангіостатинів через стадію утворення активного плазміну [576]. Безпосередня роль плазміну та донорів вільних сульфгідрильних груп була показана згодом й у дослідах *in vivo*. На моделі пухлинного росту з використанням лінії ракових клітин MDA-MB-435 було встановлено, що введення N-ацетил-L-цистеїн тваринам-пухлиноносіям сприяло утворенню ангіостатинів в організмі та істотно гальмувало пухлинний ріст [23]. Імуноблот-аналіз виділених фрагментів дозволив встановити, що ними є ізоформи К1-4 і К1-5, тим самим підтверджуючи припущення, що різні типи пухлинних клітин здатні генерувати гетерогенні за ізоформним складом поліпептиди-ангіостатини. На підставі даних більш

точного аналізу складу кринглових доменів ангіостатинів пухлинного походження було уточнено, що одним з них є фрагмент К1-4, який містить 85% послідовності К5, що отримав назву К1-4,5, або К1-4,85 [575].

У подальших дослідженнях було акцентовано увагу на роль інших серинових протеїназ в утворенні ангіостатинів різними пухлинами. Migita та ін. [429] вивчали механізми утворення та ізоформний спектр ангіостатинів у клітинах карциноми передміхурової залози людини (лінії PC-3, DU-145, LNCAP, PPC-1, ALVA 41, ALVA 101) та тканинах карциноми простати. У лізатах клітин раку простати усіх шести досліджуваних ліній були ідентифіковані три поліпептидні зони, які відповідали ангіостатин-подібним протеїнам з M_m 35, 40 та 50 кДа. Авторами було зроблено важливе спостереження стосовно того, що пухлинні клітини містять ангіостатини як продукти процесінгу плазміногену, однак, не синтезують ці поліпептиди *de novo* як результат генної експресії. Більш того, клітини PC-3 виявилися не здатними продукувати ангіостатини за відсутності екзогенного протеїну-попереднику та не синтезують мРНК плазміногену, що узгоджується з нашими результатами, які демонструють відсутність власного пулу плазміногену в клітинах аденокарциноми легені А549. Далі було висунуто гіпотезу, згідно якої плазміноген може зв’язуватися з певними молекулами-рецепторами на поверхні пухлинних клітин і за участі власних протеїназ конвертуватися на ангіостатини, які можуть транспортуватися до цитоплазми шляхом ендоцитозу або за допомогою альтернативного, наразі невідомого, механізму. Згодом гіпотеза про механізми перицелюлярного утворення ангіостатинів знайшла своє підтвердження у серії дослідівпроведених тими самим авторами. У пацієнтів з карциномою передміхурової залози було показано часткову співлокалізацію LBS-1 плазміногену та протеїнази простатспецифічний антиген (PSA) у 33,3% випадків [429]. Це спостереження може вказувати на залучення цієї серинової протеїнази до клітиноспецифічних процесів утворення ангіостатинів. Heidtmann та ін. [264] встановили, що PSA здатний ефективно перетворювати Lys-форму

плазміногену на ангіостатин К1-4, який інгібує проліферацію ендотелійних клітин лінії HUVEC та формування ними трубчатих структур. На підставі цих результатів було зроблено припущення, що ця калікреїнподібна протеїназа, яка синтезується виключно клітинами епітелію передміхурової залози, відіграє роль антиангіогенного фактору саме через генерацію ангіостатинів.

Stathakis та ін. [583] в ході дослідів на клітинах яєчника китайського хом'ячка CHO та HT1080 запропонували тристадійну модель утворення різних ізоформ ангіостатинів за участі плазміну, відновлювальних агентів та ММР. У ній, зокрема, передбачається, що на першому етапі відбувається відновлення дисульфідних зв'язків у структурі К5 плазміну невідомою плазмінредуктазою, яка використовує відновлений глутатіон або цистеїн як кофактор. Цією редуктазою, залученою до відновлювального процесінгу плазміну, виявився ензим гліколізу фосфогліцераткіназа. На другому етапі відбувається протеолітичне розщеплення зв'язку у складі К5 сериновою протеїназою або в ході автолізу плазміну, що призводить до утворення К1-4,5. Зрештою, цей фрагмент підлягає протеолізу за участі різних ММР, що дає в результаті К1-3 та К1-4. Як підтвердження роботи цієї схеми можуть слугувати отримані дані про те, що у крові мишей з привитою фібросаркомою циркулюють підвищені рівні фосфогліцераткінази, а введення рекомбінантного інгібітору цього ензиму пригнічувало пухлинний ріст на 50-70% [355]. Подальшим етапом у розвитку поглядів на механізми утворення ангіостатинів слугували дані Wang та ін. [641], отримані в ході експериментів на клітинах фібросаркоми HT1080 та раку грудної залози MDA-MB231. Авторами встановлено, що генерування ангіостатину К1-4,85 відбувається на поверхні клітин і не залежить від наявності донору вільних сульфгідрильних груп. Ключовим у цій серії дослідів було спостереження стосовно того, що продукування ангіостатинів клітинами PC-3 є процесом, який залежить від експресії мембраноасоційованого uPA та експонування β-актину на поверхні цих клітин. Більш того, у безклітинній системі β-актин був здатний виконувати функцію донору вільних сульфгідрильних груп при утворенні

фрагментів плазміногену. Цікаво зазначити, що нормальні фібробласти та ендотелійні клітини мікросудин також генерують К1-4,85, але у кількостях, менших за пухлинні клітини. Імовірно, що ця різниця може бути обумовлена різною кількістю u-PA або/та актину, що експонуються [642]. Ці та інші спостереження надали потужного поштовху для розкриття функціонального значення актину, локалізованого екстрацелюлярно, у «незвичній» як для цитоскелетного протеїну локації, саме у контексті його взаємодії з протеїнами плазмінергічної системи. У сучасній науковій літературі широко обговорюється можлива роль поверхневого актину як універсального «негемостатичного» центру активації плазміногену на різних клітинах (див. підрозділ 3.1, а також огляд [614]).

Для перевірки гіпотези стосовно мембраноасоційованої локалізації плазмін(оген)у на клітинах А549 застосовували імуноцитохімічну детекцію. Результати імуноцитохімічного визначення протеїнів, які реагують з відповідними антитілами, що специфічно розпізнають ділянку К1-3 молекули плазмін(оген)у, представлені на рисунку 3.36. Отримані дані підтверджують результати, отримані за допомогою імуноблот-аналізу. Відсутність специфічного імунозабарвлення в клітинах А549, які вирощували без додавання плазміногену, свідчить про відсутність у них власного пулу цього протеїну. У клітинах, до середовища яких вносили екзогенний плазміноген (0,1–1,0 мкМ), спостерігали сигнал специфічної імунофлуоресценції, інтенсивність якого була пропорційна кількості доданого протеїну. Чітко видно, що області імунозабарвлення візуалізуються значною мірою на поверхні клітин і мають вигляд впорядкованих точкових або лінійних структур. Клітини, які інкубували з плазміногеном у концентрації 2 мкМ, не брали у дослід, оскільки повне відшарування клітин від поверхні покривного скельця, на якому вони вирощувалися, унеможливило проведення подальших імуноцитохімічних досліджень. Наразі питання щодо природи молекул, які залучаються до взаємодії плазмін(оген)у та його фрагментів з поверхнею пухлинних клітин, залишається недостатньо дослідженим, хоча наявність

таких центрів зв'язування продемонстрована на поверхні ендотелійних клітин [175, 220].

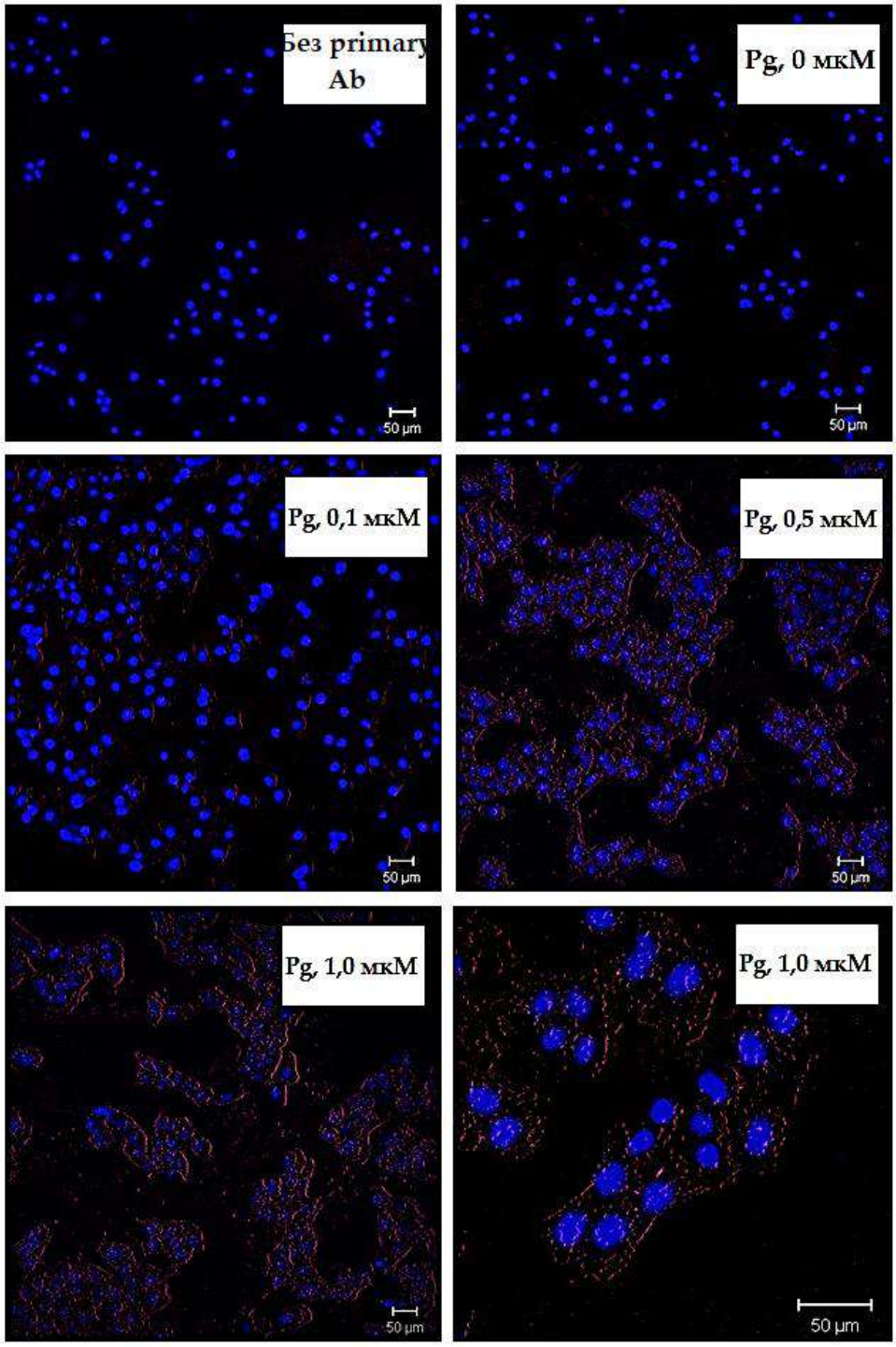

Рисунок 3.36 – Імуноцитохімічна детекція плазмін(оген)у в культурі клітин аденокарциноми легені А549 (червоний колір – специфічне імунозабарвлення плазмін(оген)у, синій колір – ядра).

Ангіостатин, блокуючи α/β субодиниці АТР-синтази, асоційованої з плазматичною мембраною ендотеліоцитів, пригнічує проліферацію та міграцію цих клітин [447]. За іншими даними ангіостатин може чинити пряму цитотоксичну дію на ракові клітини, запускаючи апоптоз через інігібування мембраноасоційованих АТР-синтаз за кислих значень pH середовища [117]. В іншій роботі [509] показано, що аденокарциномні клітини грудної залози лінії MDA-MB-231, що надекспресують u-PA/uPAR та демонструють високий метастатичний потенціал, характеризуються здатністю зв'язувати зимоген та утворювати плазмін у кількостях, що значно перевищують такі для пухлинних клітин з відносно низькою метастатичною активністю (MCF-7 і T-47D). Далі авторами було встановлено, що зв'язування плазміногену з клітинами MDA-MB-231 характеризувалося середнім рівнем афінності, проте асоціації плазміногену з клітинами була притаманна висока щільність (K_d = 1,8 мкМ, кількість рецепторів на клітину – $5{,}0\times10^7$). Отримані результати вказують на існування розбіжностей між клітинними лініями за їхньою здатністю зв'язувати плазміноген, що, вочевидь, є результатом існування гетерогенного пулу рецепторів та різної їхньої локалізації на поверхні клітин. Отже, діагностичний, прогностичний або терапевтичний потенціал ангіостатичних молекул, що не лише обмежують неоваскуляризацію, але й регулюють клітинні процеси за малігнізації в самій пухлині, потребує подальшого дослідження.

У наступних експериментах, виконаних в рамках дисертаційної роботи, було показано, що здатність продукувати ангіостатини деякими типами пухлинних клітин має вплив на їхню міграційну/інвазійну активність. У серії експериментальних робіт, проведених сумісно з д.б.н., проф. Дробот Л.Б. та співробітниками відділу сигнальних механізмів клітини ІБХ НАНУ, було показано, що інвазійна активність сублініій клітин аденокарциноми грудної залози миші 4T1 з різним ступенем експресії адаптерного/риштувального протеїну Ruk/CIN85, обернено корелює з кількістю ангіостатинів, що утворюються (рис. 3.37) [275].

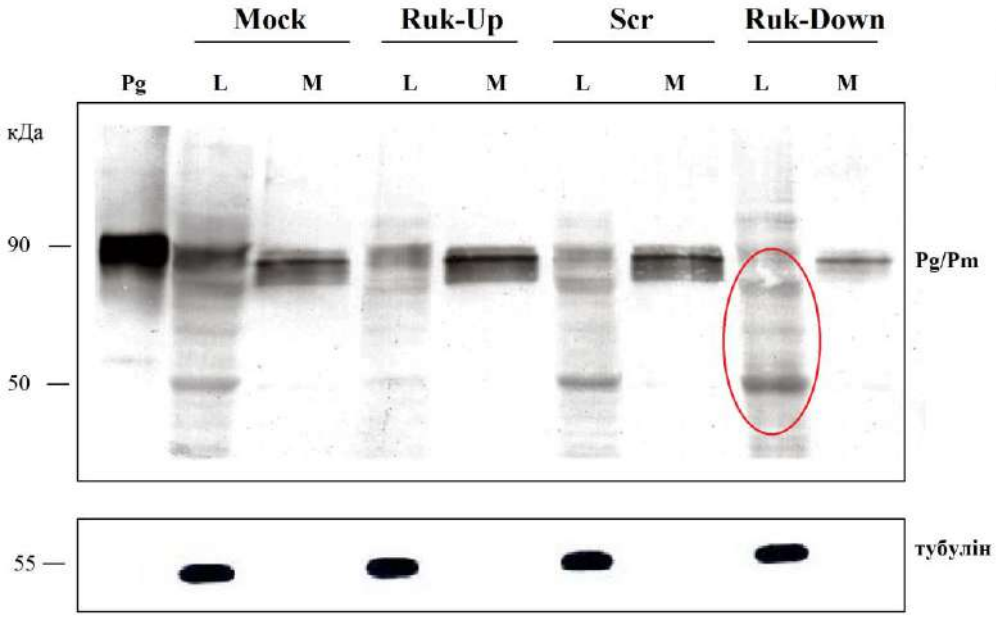

Рисунок 3.37 – Утворення ангіостатинів у різних сублініях клітин аденокарциноми грудної залози миші 4T1 у залежності від експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85 (типовий результат імуноблот-аналізу лізатів [L] та зразків кондиційного середовища [M], червоним виділено сублінію Ruk-Down, клітини якої надпродукують ангіостатини).

Підсилене генерування ангіостатинів клітинами 4T1 з пригніченою експресією протеїну Ruk/CIN85 може робити внесок до зменшення міграційного/інвазійного потенціалу цієї сублінії у порівнянні з високоінвазійною сублінією клітин, що надекспресують адаптерний протеїн (Ruk-Up). Адаптерний/риштувальний протеїн Ruk/CIN85 контролює міграцію та інвазію пухлинних клітин, а також модулює їхні стовбурові властивості та метастатичний потенціал. Результати попередніх досліджень продемонстрували підвищення експресії протеїну Ruk/CIN85 в аденокарциномах грудної залози, особливо в зонах інвазійного росту [534]. Встановлено, що стабільна надекспресія повнорозмірної форми Ruk/CIN85 у слабко інвазійних аденокарциномних клітинах грудної залози людини лінії MCF-7 призводить до підсилення їхньої малігнізації, потенційно асоційованої з ЕМП. Також показано, що агресивність онкотрансформованих клітин, що полягає у набутті ними високоінвазійного фенотипу та

резистентності до дії стрес-факторів, корелює з підвищеною експресією цього протеїну [66, 276]. Клітини зі стабільно репресованим синтезом Ruk/CIN85 або його надекспресією були використані для модельного експерименту з метою дослідження регуляторних властивостей ангіостатинів на міграційну активність аденокарциномних клітин. Інкубація клітин 4T1 з ізольованими кринглвмісними фрагментами плазміногену K1-3 або K5 призвела до значного пригнічення інвазійного потенціалу цих клітин (рис. 3.38). Було показано більш ніж дворазове зниження інвазійної активності високоінвазивної сублінії RukUp-1 під впливом ангіостатинів. Це спостереження, зроблене в експерименті з використанням препаратів високоочищених фрагментів плазміногену, може слугувати поясненням низької інвазійної активності сублінії клітин 4T1 з пригніченою експресією Ruk/CIN85 (RukDown), що вказує на залучення ангіостатинів до регулювання механізмів клітинної міграції, які контролюються адаптерним протеїном Ruk/CIN85. Застосування інгібітору MMP GM6001 відновлювало інвазивність клітин RukDown, оскільки MMP є основними протеїназами, які відповідають за утворення ангіостатинів клітинами 4T1 [275].

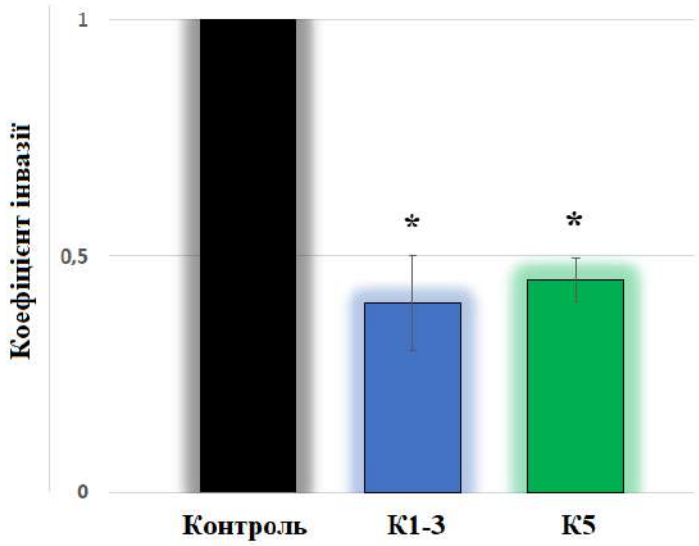

Рисунок 3.38 – Ефекти ізольованих фрагментів ангіостатинів K1-3 і K5 ($0,15 \times 10^{-6}$ M) на інвазійну активність клітин високоінвазійної сублінії RukUp-1 ($P < 0,05$ у порівнянні з контролем).

Молекулярні механізми інгібування ангіостатинами міграційної активності пухлинних клітин можуть реалізовуватися через їхній вплив на вісь c-Met/HGF-сигналювання. Ansell та ін. [39] показали, що ізольований фрагмент плазміногену К5 конкурує з HGF за зв'язування з c-Met-рецептором. Відомо, що Met, який кодується протоонкогеном *c-met*, функціонує як трансмембранний тирозинкіназний рецептор для фактору росту гепатоцитів (HGF), або фактору розсіювання (scatter factor). HGF/Met-опосередковане сигналювання регулює низку біологічних процесів, таких як проліферація та міграція клітин, інвазивність, ангіогенез, морфогенез, апоптоз та енергетичний метаболізм [484]. Аберантна активація HGF та його рецептора Met підтримує розвиток і прогресування багатьох видів раку людини, відіграючи важливу роль у пухлинному процесі і метастазуванні. Зокрема, надекспресія HGF/Met спостерігається у карциномних клітинах легені та грудної залози [247]. У більшості випадків активації Met при розвитку злоякісних новоутворень відбувається через лігандзалежні автокринні або паракринні механізми. Протеїн HGF за особливостями будови своєї молекули відноситься до плазміногенового підсімейства S1-пептидаз, оскільки має у своїй структурі чотири N-кінцеві кринглові домени, гомологічні таким у молекулі плазміногену. Інгібування фрагментом К5 фосфорилювання Met та Akt, що є ознаками пригнічення Met-опосередкованого сигналювання, можливо, є ключовим механізмом супресії фрагментом плазміногену К5 проліферації та міграції ракових клітин епітелійного походження. Надзвичайно важливими є дані Fang та ін. [192], які відкрили новий подвійний механізм протипухлинної активності К5, який реалізується як через пригнічення цим кринглом пухлиноасоційованого ангіогенезу, так і завдяки прямій цитотоксичній дії на аденокарциномні клітини раку шлунку SGC-7901. Авторами показано, що К5 сприяє убіквітин-опосередкованій протеасомній деградації HIF-1α та пригнічує синтез VEGF, інгібуючи в такий спосіб ангіогенез. Крім того, К5 через VDAC-опосередкований механізм пригнічував синтез протеїну GRP78 (glucose-

related protein 78), який є головним шапероном ендоплазматичного ретикулума, що проявляє антиапоптотичні ефекти, підтримує проліферацію та виживання пухлинних клітин, метастазування та резистентність до різних протипухлинних агентів та стресових факторів.

Отже, у представленій роботі з'ясовано, що антиміграційні властивості фрагментів плазміногену К1-3 та К5 по відношенню до пухлинних клітин грудної залози реалізуються через модулювання мереж клітинного сигналювання, які контролюються адаптерним/риштувальним протеїном Ruk/CIN85.

3.2.3. Утворення ангіостатинів за розвитку доброякісних новоутворень матки та грудної залози

Наступним завданням дисертаційного дослідження було визначити рівень ангіостатинів у тканинах міометрію матки та грудної залози за розвитку гіперпроліферативних захворювань та визначити можливість використання ангіостатинів як маркерів запальних процесів та малігнізації доброякісних новоутворень.

Ангіостатини за доброякісних новоутворень матки.

Міома матки є доброякісною моноклональною гормонзалежною пухлиною, що виникає у м'язовому шарі – міометрії. Міома є найбільш поширеним гінекологічним захворюванням, частота виникнення якого сягає 15-25% у жінок репродуктивного віку. Вузол міоми, який виникає внаслідок неконтрольованої проліферації клітин гладеньких м'язів, складається з хаотично розташованих міоцитів, які втім не втратили рис диференційованих клітин. Вважається, що розвиток запальних процесів та ангіогенез у тканині міометрію є важливими ланками патогенезу міоми та умов її прогресії. До ускладнень гіперпроліферативних хвороб міометрію відносяться некроз тканин, ризик злоякісного переродження та виникнення сарком [14].

За допомогою імуноблотингу із використанням кролячих антитіл проти фрагменту плазміногену К1-3, які розпізнають поліпептиди, що містять у своєму складі зазначені кринглові структури, в зразках протеїнів гіперпластичних тканин грудної залози було визначено дві основні поліпептидні зони: M_m 92 кДа, що відповідає інтактній молекулі плазміногену, та M_m близько 50 кДа, що відповідає ангіостатину К1-4,85 (рис. 3.39). Показано, що рівні плазміногену та ангіостатину в тканинах доброякісних новоутворень, які характеризуються запальними явищами, є відповідно у 1,4 та 2,5 рази меншими за ці показники в тканинах без запалення ($P < 0,05$). Як відомо, запалення є одним з найбільш небезпечних ускладнень, що супроводжують розвиток міоми матки, яке може призводити до сепсису, порушення функціонування яєчників та злоякісної трансформації [319].

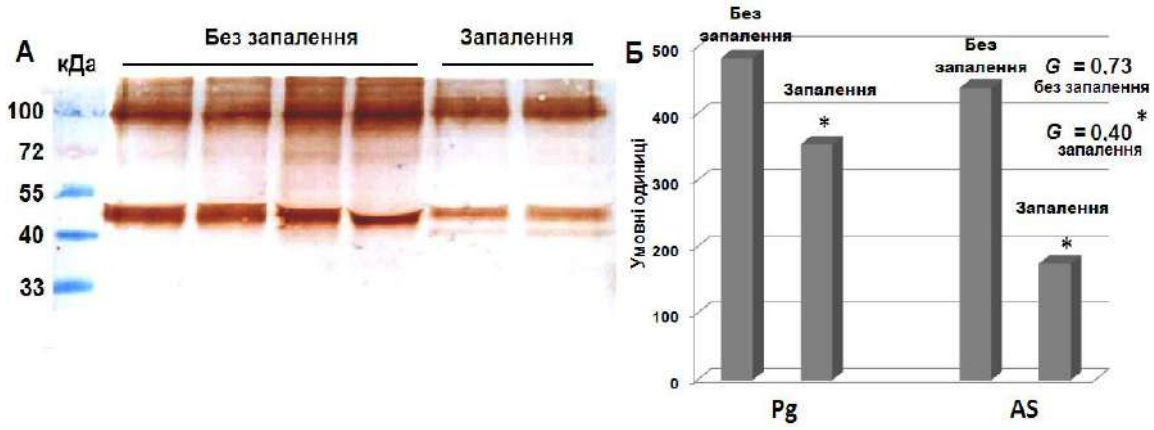

Рисунок 3.39 – Рівні плазміногену (Pg) та ангіостатину (AS) в біоптатах гіперпластичної тканини міометрію матки (міома) (типові результати імуноблот-аналізу): * – $P < 0,05$, *U*-критерій Манна-Уітні.

За допомогою денситометричного аналізу імуноблотів розраховано співвідношення $G_{[AS]/[Pg]}$, що становило 0,73 у випадку тканин без запалення та 0,40 за запалення. Спираючись на ці дані, можна зробити висновок, що ступінь запалення у тканинах міометрію за гіперпластичних змін обернено корелює з локальними рівнями ангіостатинів. Отриманий результат узгоджується з літературними даними щодо протизапальної активності

ангіостатину [110], а також провідної ролі плазмін(оген)у в розвитку та резолюції запальних процесів [265]. Таким чином, показано наявність оберненого зв'язку між вмістом плазміногену та утворенням ангіостатину в тканинах міоми та активацією запальних процесів.

Ангіостатини за доброякісних новоутворень грудної залози.

Фіброаденома грудної залози є доброякісною пухлиною залозистого походження, що має тенденцію до прогресивного росту. Розвиток фіброаденоми зрідка супроводжується запальними процесами та злоякісним переродження (за виключенням новоутворень IV типу, або листовидної, фіброаденоми) [260].

Результати імунохімічного дослідження протеїнів фіброаденоми грудної залози, представлені на рисунку 3.40, демонструють кількісну різницю між рівнями ангіостатину за хвороби в проліферативній фазі. У тканинах фіброаденоми з вираженими ознаками гіперпроліферації спостерігається істотне зниження рівнів як плазміногену, так і фрагменту з Mm ~ 50 кДа у 3,8 та 7 разів відповідно в порівнянні з тканинами фіброаденоми без гіперпроліферації ($P < 0,05$). При цьому величини коефіцієнту $G_{[AS]/[Pg]}$ в обох випадках були відносно малі (0,26 для фіброаденоми без гіперпроліферації та 0,14 для гіперпроліферативних тканин). Як відомо, ангіостатини пригнічують проліферативну та міграційну активності ендотеліоцитів та індукують апоптоз деяких типів пухлинних клітин [117, 361]. Отримані результати свідчать про те, що клітини грудної залози на стадії гіперпроліферації фіброаденоми характеризуються як зниженою здатністю зв'язувати або продукувати плазміноген, так і пригніченням утворення ангіостатинів.

Фіброзно-кістозна хвороба характеризується порушенням співвідношення епітелійного та сполучнотканинного компонентів, широким спектром проліферативних та регресивних змін тканин грудної залози. Фіброзно-кістозна мастопатія є найбільш поширеним доброякісним захворюванням у жінок (часто захворюваності у загальній популяції складає 30-45%).

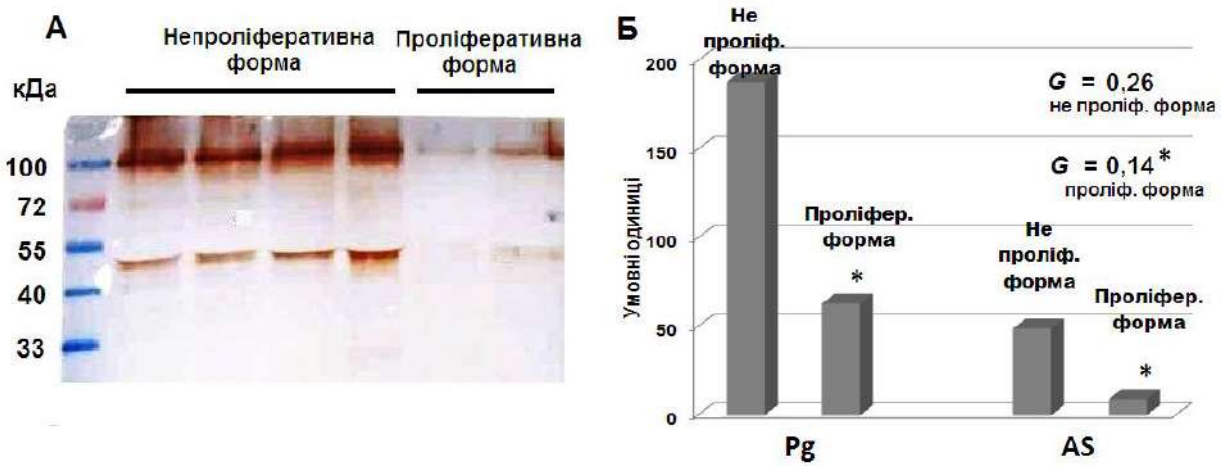

Рисунок 3.40 – Рівні плазміногену (Pg) та ангіостатину (AS) в біоптатах тканин фіброаденоми грудної залози з різним ступенем гіперплазії (типові результати імуноблот-аналізу): * – P < 0,05, *U*-критерій Манна-Уітні.

Пацієнти з цим типом змін тканин грудної залози відносяться до групи високого ризику виникнення онкологічних захворювань. Так, рак грудної залози виникає у 3-5 разів частіше на фоні доброякісних захворювань та у 30-40 разів частіше при деяких формах вузлової мастопатії [2]. Детекція плазміногену та його фрагментів у тканинах залози за вузлової фіброзно-кістозної мастопатії свідчить про різке зростання вмісту цих протеїнів у порівнянні з їхніми рівнями в гістологічно нормальній оточуючій тканині (рис. 3.41). Так, рівень плазміногену в фіброзно-кістозних вузлах виявився, у середньому, в 4,6 рази вищим за відповідний показник у гістологічно нормальній тканині, тоді як рівень ангіостатину був вищим у 6,8 разів (P < 0,05). Однак, відносний рівень генерування ангіостатинів за мастопатії виявився меншим за інтенсивність цього процесу в нормі ($G_{[AS]/[Pg]}$ = 0,46 і 0,31 відповідно), проте, різниця не сягала рівня статистичної достовірності.

На підставі отриманих результатів можна констатувати, що за розвитку вузлової форми фіброзно-кістозної мастопатії в тканинах грудної залози відбувається підсилення продукування плазміногену, який слугує субстратом для утворення ангіостатину. Не виключено, що багаторазове перевищення

нормального рівня інгібітору ангіогенезу за мастопатії може мати наслідком розвиток таких патоморфологічних змін, як кальціфікація та склероз сполучної тканини, порушення локального кровообігу та прогресуючої атрофії тканин [574].

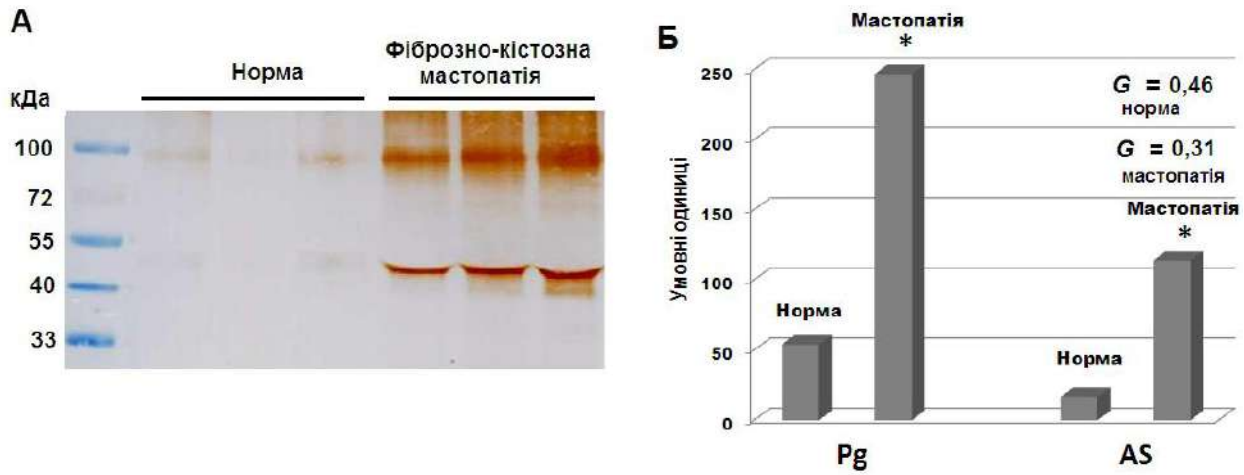

Рисунок 3.41 – Рівні плазміногену (Pg) та ангіостатину (AS) в біоптатах тканини грудної залози за фіброзно-кістозної мастопатії та гістологічно нормальної тканини (типові результати імуноблот-аналізу): * – P < 0,05, *U*-критерій Манна-Уітні.

Кісти грудної залози є проявом фіброзно-кістозної хвороби і, як виявилося, кількісні характеристики плазміногену/ангіостатину в тканинах, що формують кістозні утворення, аналогічні тим, що спостерігаються за мастопатії. На рисунку 3.42 представлені результати імуноблотингу протеїнів гістологічно нормальної тканини грудної залози, відібраної у трьох пацієнток в ході мастектомії, а також протеїнів кістозної тканини (післяопераційний матеріал), отриманих від тих самих осіб. Так, рівень плазміногену в кістозних вузлах у 4,4 рази перевищував його вміст в умовно нормальній тканині, а кількість ангіостатину в тканині кісти перевищувала рівень цього фрагменту плазміногену в контрольній тканині втричі (P < 0,05). Відповідно, співвідношення $G_{[AS]/[Pg]}$ у кісті грудної залози було нижчим за цей показник у нормальних тканинах тих самих пацієнток (0,34 проти 0,44, P > 0,05). Можливо, що підвищення рівня ангіостатинів у кісті грудної залози може бути

наслідком активації протеолітичних процесів. Раніше було показано, що підсилене продукування зимогену пепсину С епітелійними клітинами грудної залози, який акумулюється в кістовій рідині, може робити внесок до розвитку як доброякісних новоутворень, так і злоякісних пухлин [535].

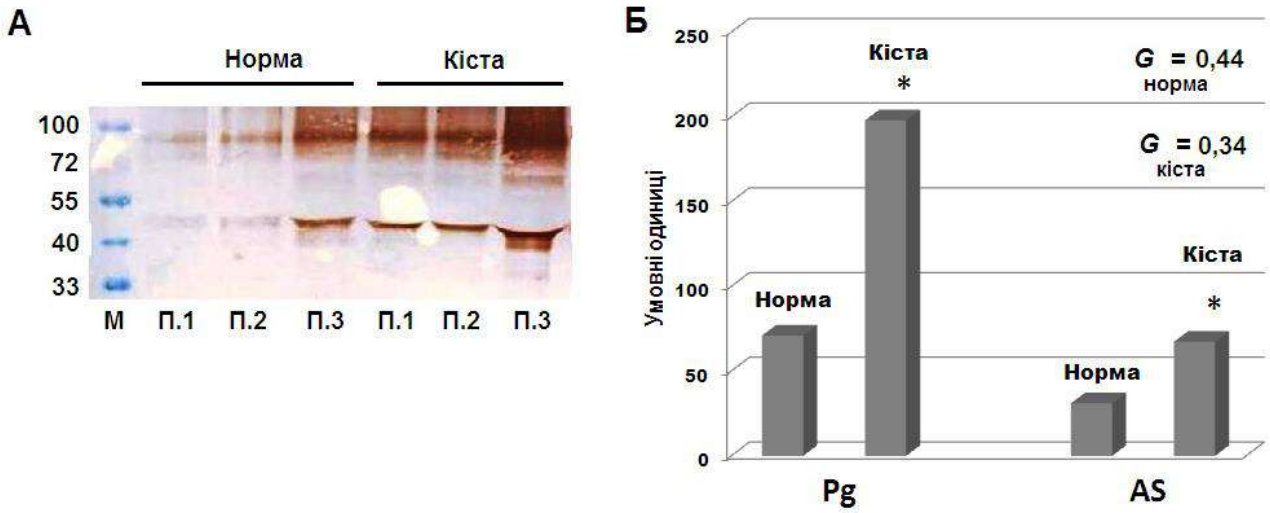

Рисунок 3.42 – Рівні плазміногену (Pg) та ангіостатину (AS) в біоптатах кісти грудної залози та гістологічно нормальної тканини (типові результати імуноблот-аналізу): П. 1-3 – номера пацієнток, * – P < 0,05, *U*-критерій Манна-Уітні.

Раніше було встановлено, що утворення ангіостатинів може відбуватися у кістах яєчника. Авторами було доведено, що інтенсивність продукування ангіостатинів за цих патологічних станів корелює з присутністю в тканинах активаторів плазміногену, більшою мірою, u-PA, ніж t-PA [630]. Крім того, оскільки в пухлинних тканинах відбувається активація желатиназ А та В (ММР-2 і -9), то визначення активності цих протеолітичних ензимів може надати додаткову інформацію щодо шляхів генерування ангіостатинів у гіперпластичних новоутвореннях [665]. У представленій роботі наявність активних ММР у тканинах грудної залози визначали методом желатинової зимографії, результати якої представлені на рисунку 3.43. У нормальних тканинах колагенолітична активність була не виявлена або виходила за межі

чутливості методу. Натомість, у зразках, отриманих з патологічних тканин, виявлено протеолітично активну форму колагенолітичного ензиму з M_m ~ 90 кДа, що за молекулярною масою відповідає ММР-9.

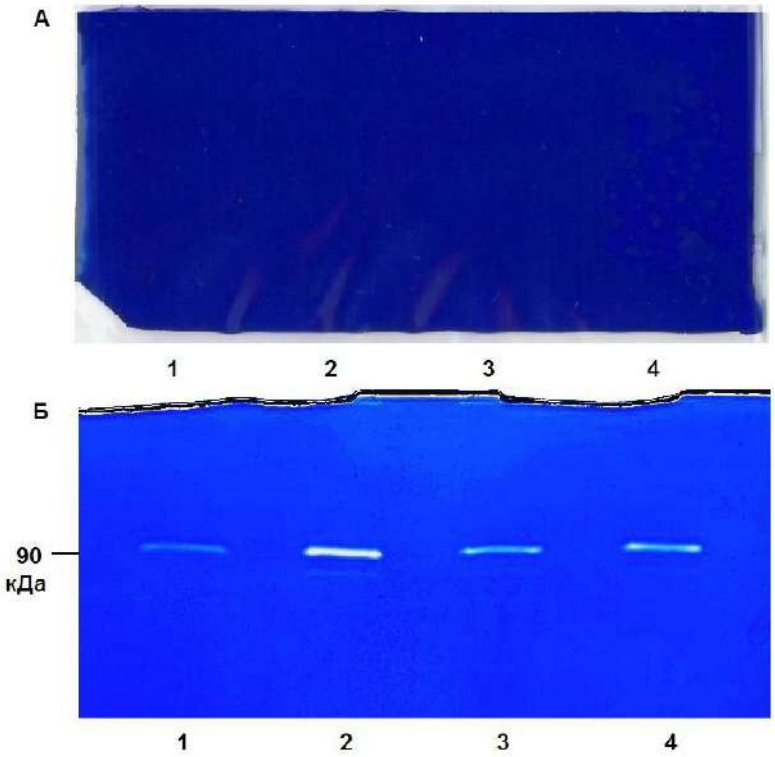

Рисунок 3.43 – Типові зимограми колагенолітичних протеїназ у нормальних (А) та гіперпластичних (Б) тканинах грудної залози: А – зразки, отримані з гістологічно нормальної тканини; Б – зразки патологічної тканини (1, 2 – фіброзно-кістозна мастопатія, 3, 4 – кіста).

Результати сучасних досліджень свідчать про наявність тісного взаємозв’язку між ступенем розвитку кровоносних судин у злоякісних пухлинах та здатністю до їхнього рецидивування та метастазування. Доведено, що активація ангіогенезу в тканинах доброякісних новоутворень є тригером їхньої малігнізації [146]. Отже, аналіз регуляторів ангіогенезу надає можливість прогнозувати перебіг захворювання та обґрунтувати доцільність антиангіогенної терапії. Раніше було показано, що ангіостатини відіграють важливу роль у контролі щільності мікросудинної мережі в неопластичних тканинах за розвитку онкологічних хвороб репродуктивної системи та пухлин

грудної залози, однак, у літературі зустрічаються лише поодинокі повідомлення стосовно змін рівнів ангіостатинів за розвитку доброякісних новоутворень [23, 676]. У зв'язку з тим, що детекція ангіостатинів як молекулярних маркерів пухлинного росту в плазмі або сироватці крові не завжди може слугувати об'єктивною оцінкою перебігу пухлинного росту, використання ангіостатинів для рутинного клінічного скринінгу в онкологічній практиці є вкрай обмеженим [554]. У нашому дослідженні рівні плазміногену та ангіостатину визначено безпосередньо в зразках тканин доброякісних новоутворень. Виявлені за допомогою імуноблотингу з використанням високоспецифічних антитіл відмінності тканинних рівнів ангіостатину в гіперпластичних тканинах за різного проліферативного потенціалу та запалення свідчать про можливість залучення цих молекул до патогенезу неоплазій грудної залози та міометрію матки. Отже, перспективною є подальша розробка підходів для використання цього показнику як одного з прогностичних маркерів перебігу гіперпластичних процесів в органах жіночої репродуктивної системи. Отримані вперше дані дозволять розширити і науково обґрунтувати перспективи використання досліджуваних протеїнів у клінічній діагностиці неоплазій.

Висновки до розділу 3.2

1. Показано, що клітини аденокарциноми легені людини лінії А549 за умов культивування *in vitro* конвертують екзогенний Glu-плазміноген на плазмін, який здійснює протеоліз адгезивних протеїнів та порушує адгезивність клітин.

2. Продемонстровано, що плазмін(оген) у діапазоні концентрації 0,75 – 1,0 мкМ пригнічує життєздатність умовно нормальних ембріональних фібробластів миші 3Т3, але не чинить цитотоксичної дії на клітини аденокарциноми легені А549, які виживають за присутності екзогенного плазмін(оген)у в діапазоні концентрації 0,005 – 1,0 мкМ.

3. Встановлено, що плазмін(оген) сприяє зменшенню рівнів проапоптотичних регуляторних протеїнів та інгібіторів клітинного циклу (Bax, caspase 9, p21) та зростання рівнів протеїну системи репарації геному PARP-1 та MDM2 – антагоністу супресора пухлинного росту p53. Припускається, що встановлені зміни можуть інгібувати апоптоз/аноікіс та сприяти виживанню пухлинних клітин після втрати ними адгезивності.

4. Показано, що активація автофагії та індукція синтезу регуляторного протеїну TIGAR у клітинах аденокарциноми легені A549 є одними з потенційних механізмів набуття пухлинними клітинами резистентності до плазмін-індукованого апоптозу/аноікісу.

5. Встановлено, що вимкнення експресії TIGAR за допомогою технології siRNA призводить до втрати клітинами A549 здатності до міграції, що свідчить про залучення цього протеїну до регулювання локомоторної активності аденокарциномних клітин легені за впливу плазмін(оген)у.

6. Доведено, що здатність сублінії клітин аденокарциноми грудної залози миші 4T1 з пригніченою експресією адаптерного/риштувального протеїну Ruk/CIN85 (RukDown) продукувати ангіостатини обернено корелює з їхньою інвазійною активністю. Показано, що екзогенні ангіостатини K1-3 та K5 пригнічують здатність до інвазії високоінвазійної сублінії 4T1 (RukUp).

7. Встановлено, що рівень ангіостатину в тканинах доброякісних новоутворень міометрію матки (міоми) та грудної залози за фіброаденоматозу обернено корелює з розвитком запальних процесів та високим проліферативним індексом гіперпластичних тканин. Ангіостатини можуть розглядатися як інгібітори малігнізації тканин та маркери позитивного прогнозу захворювання.

Основні праці здобувача, опубліковані за матеріалами підрозділу 3.2

1. Tykhomyrov AA, Vovchuk IL, Grinenko TV. Plasminogen and angiostatin levels in female benign breast lesions. *Ukrainian Biochemical Journal*. 2015;87(5): 103-112.

2. Ağca CA, Kırıcı M, Nedzvetsky VS, Gundogdu R, Tykhomyrov AA. The effect of TIGAR knockdown on apoptotic and epithelial- mesenchymal markers expression in doxorubicin- resistant non- small cell lung cancer A549 cell lines. *Chemistry & Biodiversity*. 2020;17(9):e2000441.

3. Tykhomyrov AA, Nedzvetsky VS, Ağca CA, Guzyk MM, Korsa VV, Grinenko TV. Plasminogen/plasmin affects expression of glycolysis regulator TIGAR and induces autophagy in lung adenocarcinoma A549 cells. *Experimental Oncology.* 2020;42(4):270-276.

4. Tykhomyrov AA, Ağca CA, Nedzvetsky VS, Guzyk MM, Korsa VV, Grinenko TV. Plasminogen/plasmin effects on A549 cells: from p53-induced apoptosis to angiostatin generation // Current Problems of Biochemistry and Cell Biology: The IVth International Scientific Conference, Dnipro, 5-6 October, 2017.

5. Horak I, Skaterna T, Gerashchenko D, Tykhomyrov A, Khudiakova O, Drobot L. Knockdown of the adaptor protein Ruk/CIN85 in 4T1 and LLC adenocarcinoma cells results in increased expression levels and activities of MMP-2 and MMP-9, associated with elevated production of angiostatins and suppression of invasion potential // Simposium and Summer School “Fundamental Principles of Cancer Biotherapy”, Kyiv, May 21-23, 2018: Experimental Oncology, 40 (2), p. 162.

6. Tykhomyrov AA, Nedzvetsky VS, Ağca CA, Guzyk MM, Grinenko TV. Plasminogen/plasmin affects expression of cell circle/apoptosis regulators and induces autophagy in A549 human lung cancer cells // Medical and Clinical Chemistry: XII Ukrainian Biochemical Congress, Ternopil, Sep. 30 – Oct. 4 2019 - Vol. 21, 3(80) - P. 140-141.

3.3. Ангіостатини як регулятори та маркери патологічних станів

3.3.1. Ангіостатини за розвитку ускладнень цукрового діабету

3.3.1.1. Рівень ангіостатинів та активність протеїназ у трофічних виразках м'яких тканин пацієнтів з цукровим діабетом II типу

Виконання представленої частини дисертаційної роботи мало на меті провести порівняльний аналіз рівнів регуляторів ангіогенезу, зокрема, ангіостатинів і VEGF, й визначити активність ММР та плазміну в ексудатах хронічних виразок м'яких тканин за цукрового діабету та гострих ран.

Визначення концентрації загального протеїну в ексудатах (рановій рідині) є первинним етапом біохімічного дослідження хронічних ран. За легкого пошкодження судин до вогнища запалення дифундують, головним чином, низькомолекулярні альбуміни. Однак, при більш тяжких пошкодженнях в ексудаті з'являються високомолекулярні глобуліни і, зрештою, найбільш високомолекулярні протеїни, зокрема, фібриноген, який перетворюється на фібрин на поверхні рани. Загальноприйнятою величиною вмісту протеїну в ексудаті, вище за яку рана характеризується як така, що перейшла до фази хронічного запалення, вважається 25-30 мг/мл [4]. За результатами визначення загального протеїну в проведеному дослідженні, його вміст в ексудатах хронічних ран становив $40,5 \pm 9,4$ мг/мл, тоді як у рановій рідині гострих ран ця величина сягала значення $8,3 \pm 2,8$ мг/мл.

У ході дослідження було вперше встановлено, що ексудати хронічних ран містять значно більшу кількість продуктів обмеженого протеолізу плазміногену (ангіостатинів), які можуть проявляти фізіологічну активність і чинити ангіосупресорні ефекти. Результати детекції плазміногену та ангіостатинів методом імуноблот-аналізу представлено на рисунку 3.44. В усіх досліджуваних зразках ексудатів виявлявся плазміноген незалежно від характеру рани, однак наявність у значних кількостях його фрагментів у

діапазоні M_m 50-28 кДа, які відповідають ангіостатинам, була притаманна більшою мірою ексудатам хронічних ран. Для кількісної характеристики акумуляції фрагментів плазміногену в ранах було проведено денситометричний аналіз блотограм та визначено співвідношення кількості продуктів розщеплення до рівні вихідного протеїну, яке засвідчило, що ця величина в ексудатах діабетичних виразок шкіри приблизно у 5 разів перевищує досліджуване значення в ексудатах операційних ран (P = 0,02).

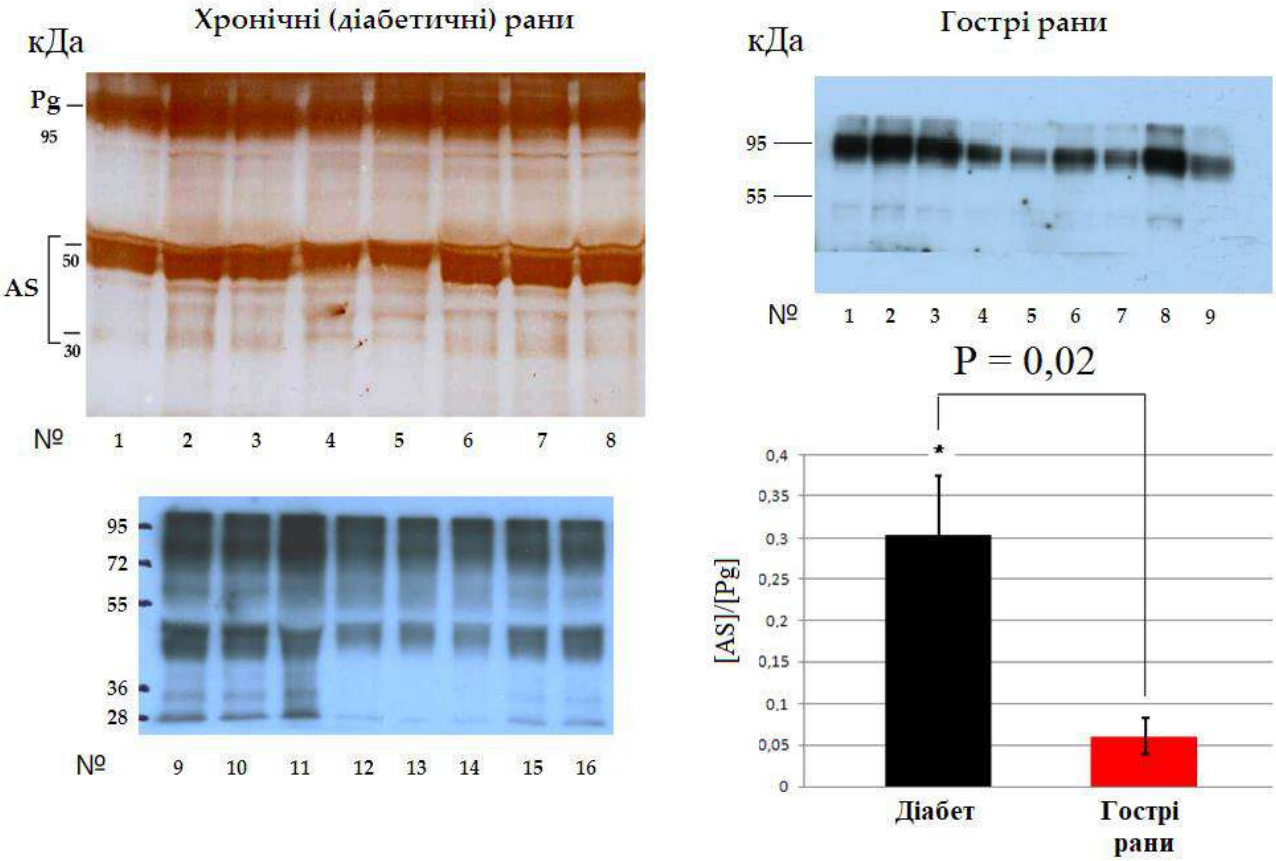

Рисунок 3.44 – Рівні плазміногену (Pg) та ангіостатинів (AS) в ексудатах хронічних ран пацієнтів з цукровим діабетом (n = 16) та гострих (хірургічних) ран (n = 9): результати імуноблотингу з наступним денситометричним аналізом (*U*-тест Манна-Уітні).

Про відповідність визначених в ексудатах хронічних ран фрагментів плазміногену функціонально активним ангіостатинам може свідчити

специфічне зв'язування цих поліпептидів з афінним сорбентом Lys-сефарозою (рис. 3.45)

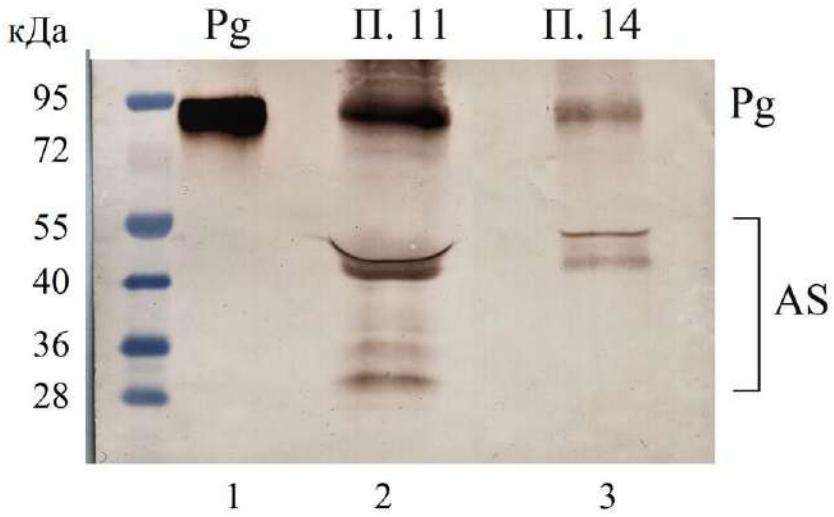

Рисунок 3.45 – Імуноблотинг плазміногену (Pg) та ангіостатинів (AS), ізольованих з ексудатів хронічних ран шкіри за допомогою афінного сорбенту Lys-сефарози-4B (елюція 0,1 М 6-аміногексановою кислотою): 1 – плазміноген-стандарт, 2 – ексудат пацієнта № 11, 3 – ексудат пацієнта № 14.

Інтенсивна деградація плазміногену в діабетичних ранах може відбуватися внаслідок надмірної активації ендогенних протеолітичних систем. Для перевірки цього припущення було визначено активність двох основних груп протеїназ, які можуть відповідати за обмежений протеоліз плазміногену та утворення ангіостатинів, а саме: ММР та плазміну. Результати детекції активних ММР методом желатинової зимографії свідчать, що ексудати хронічних ран пацієнтів з цукровим діабетом характеризуються наявністю латентної форми pro-ММР-9, активної форми ММР-9, або желатинази В, (90 кДа), а також високомолекулярного комплексу, який за M_m (~225 кДа) відповідає димеру ММР-9 (ММР-комплекс) (рис. 3.46). При цьому, активної форми ММР-2 (желатиназа А) не було виявлено у досліджуваних зразках ексудатів. На противагу цим результатам, для ексудатів гострих ран показано низьку колагенолітичну активність, рівень якої знаходиться поза межами чутливості методу.

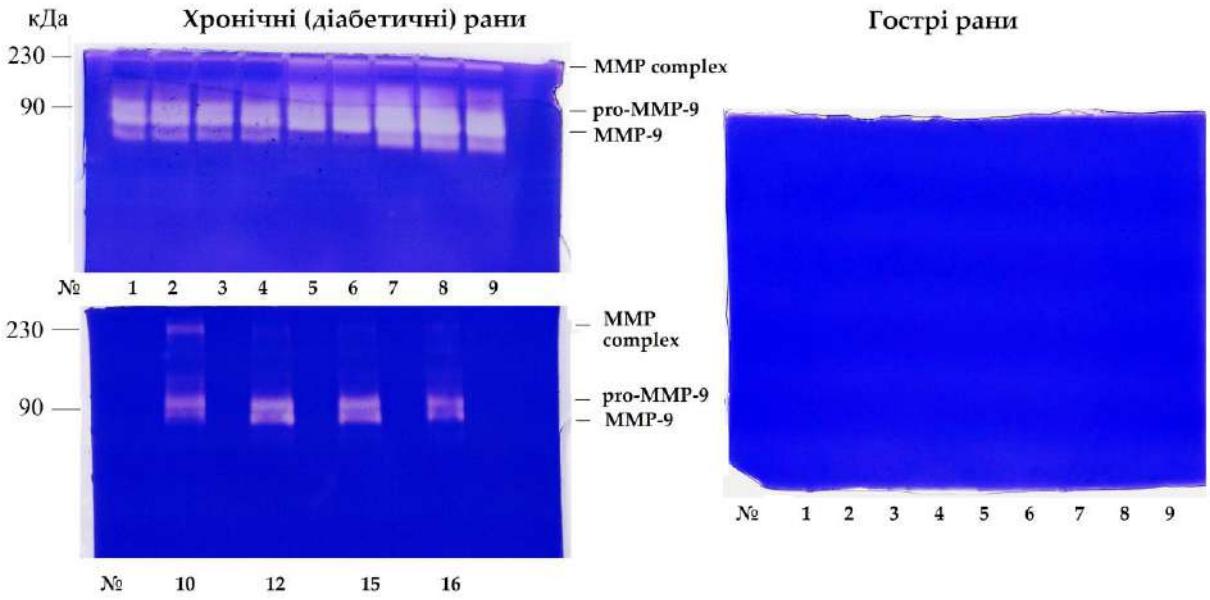

Рисунок 3.46 – Матриксні металопротеїнази (MMP) у ранах різної етіології: зимограми ексудатів хронічних ран шкіри пацієнтів з цукровим діабетом II типу та ранової рідини гострих (хірургічних) ран.

Роль протеїназ у перебігу різних фаз репаративних процесів (фібриноліз, деградація компонентів базальної мембрани та ЕЦМ, ремоделювання пошкодженої тканини, перебіг запальних процесів) широко описана у літературі [652]. Внесок колагенолітиних ензимів до патогенезу хронічних ран вважається ключовим *("Matrix metalloproteinases: the sculptors of chronic cutaneous wounds"*) [335]. Надмірна активність металопротеїназ, передусім, MMP-9, на фоні низького рівня її тканинних інгібіторів (TIMP), є характерною ознакою хронічних ран й може бути причиною інактивації медіаторів, які забезпечують перехід до наступних фаз нормального процесу загоєння. MMP-9 здатна деградувати цитокіни та фактори росту, які продукуються клітинами, що мігрують до рани, а також відповідає за утворення інгібіторів ангіогенезу – ангіостатинів та ендостатинів – у міжклітинному просторі [130]. За нормального загоєння MMP-9 розщеплює компоненти ECM, забезпечуючи очищення ранового ложа від некротичних тканин та пошкоджених структурних компонентів. Однак, надактивація

ММР-9 негативно впливає на структуру ключових протеїнових компонентів ЕЦМ [348]. Отримані результати визначення активності желатиназ, залучених до процесів загоєння, пояснюються залежністю від наповнення рани клітинами запалення. ММР-9 секретують, головним чином, нейтрофіли, що мігрують до ранового ложа у відповідь на вивільнення його клітинами первинних медіаторів запалення, тоді як ММР-2 є продуктом синтезу фібробластів. Існують дані про те, що ММР-9 не лише первинно секретується під час розвитку запалення, але й може відігравати значну роль й на більш пізніх етапах загоєння і синтезуватися кератиноцитами [385].

Активність ММР є одним з ключових факторів, які визначають здатність дермальних еквівалентів (шкіряних клапотів) до приживлення під час трансплантації шкіри [501]. Враховуючи цей факт, визначення активності колагенолітичних ензимів перед операцією аутодермопластики може слугувати прогностичним критерієм ефективності приживлення. Можливо, що надмірна активність ММР-9 в ексудаті хронічних виразок у пацієнтів з цукровим діабетом призводить до порушення балансу між утворенням та деградацією ЕЦМ. Внаслідок цього стає неможливою повноцінне ремоделювання ранової тканини та наступна реепітелізація рани. Отже, спираючись на власні результати та літературні дані, можна дійти до висновку, що перманентно висока активності ММР-9 у хронічних ранах корелює з негативним прогнозом їхнього загоєння. Хронічні трофічні виразки м’яких тканин пацієнтів з цукровим діабетом є яскравим прикладом патології, яка виникає внаслідок порушення активаторно-інгібіторного балансу протеолітичних ензимів. З цих позицій лікування, засноване на інгібуванні або неспецифічному видаленні надмірної кількості активних протеаз може бути одним з найбільш перспективних способів терапії хронічних виразок шкіри та ран м’яких тканин різного ґенезу, що не загоюються тривалий час.

Характерною особливістю хронічних ран є накопичення некротичних тканин та фібрину. Наявність фібринової плівки погіршує процес загоєння через створення бар’єру для міграції кератиноцитів та є потенційною умовою

розвитку інфекційних ускладнень [269]. Оскільки плазмін є головним фібринолітичним ензимом в організмі, то його утворення є важливою умовою для адекватного загоєння рани. Результати імунохімічної детекції ексудатів хронічних ран, наведені на рисунку 3.45, свідчать про наявність у них значної кількості імунореактивних поліпептидів плазмін(оген)у. Амідолітичну активність плазміну в ексудатах хронічних ран десяти пацієнтів з цукровим діабетом визначали за розщепленням специфічного хромогенного субстрату. Результати дослідження представлено на рисунку 3.47 у вигляді кінетичних кривих.

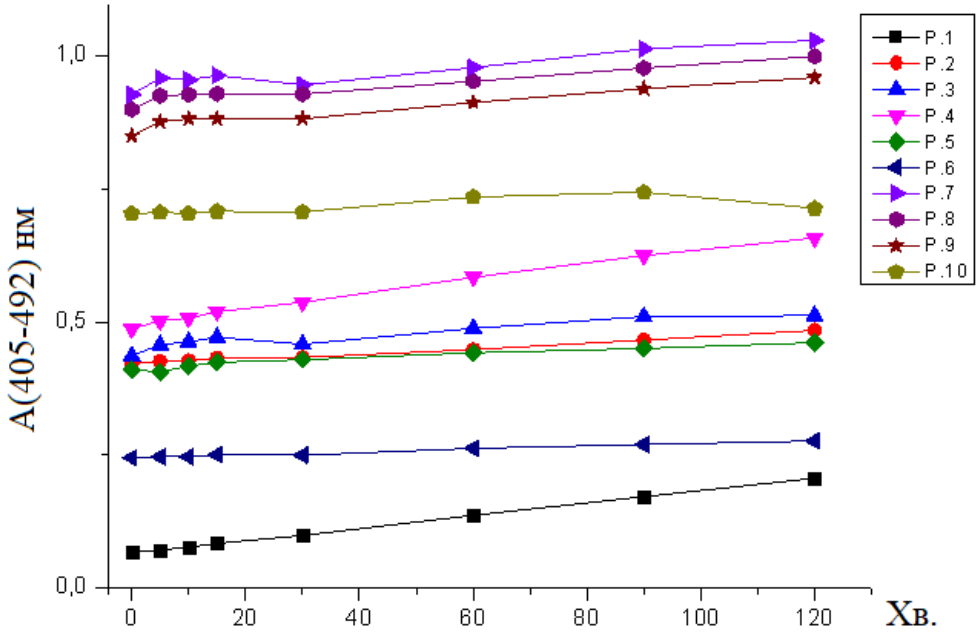

Рисунок 3.47 – Активність плазміну в ексудатах хронічних виразок шкіри пацієнтів з цукровим діабетом (за розщепленням специфічного хромогенного субстрату S-2251).

Через наявність відносно високого поглинання досліджуваних ексудатів більшість зразків характеризувалися високими значеннями оптичної густини у «нульовій» точці, однак, протягом 120 хв. вимірювання істотного приросту кількості р-нітроаніліну не спостерігалося. Не дивлячись на присутність значної кількості плазміногену в ексудатах хронічних ран, результати ензиматичного дослідження свідчать про низьку активність плазміну в

досліджуваних зразках, що може бути наслідком порушення функціонування системи активації зимогену або його інгібування. Показано, що перетворення зимогену на активну протеїназу в пошкодженій тканині шкіри забезпечує, головним чином, u-PA, який локалізований на рецепторах, презентованих на моноцитах/макрофагах. Важливо зауважити, що інший активатор, t-PA, у значно меншому ступені задіяний до утворення плазміну в ділянці ушкодження [545]. Однією з причин дефіциту плазмінової активності за стану гіперглікемії може бути підвищена експресія PAI-1. У нокаутованих за геном PAI-1 мишей з СТЗ-індукованим діабетом загоєння ран шкіри та регенерація м'язової тканини відбувалися значно швидше, ніж у тварин з нормальним рівнем інгібітору [510]. Підтвердженням ролі активного плазміну в процесах загоєння свідчать дані іншого модельного експерименту [311], які демонструють, що відновлення активності плазміну через дефіцит його інгібітору (α_2-AP) сприяє прискоренню загоєння ран шкіри через механізм, до якого залучена активація VEGF-індукованого ангіогенезу, опосередкованого фібробластами. Крім участі в розщепленні фібрину, важливою є роль плазміну в адекватному перебігу запальних реакцій в ушкодженій тканині, в яких він відіграє роль хемоатрактанту для прозапальних клітин. Раніше Ploplis та ін. [492] показали, що рекрутинг клітин, перед усім, моноцитів, до тканини під час запалення відбувається за участі плазміну. В експерименті на моделі опікових ран у мишей продемонстровано зростання локальної концентрації плазміногену поблизу ділянки пошкодження у ранньому періоді розвитку запального процесу. Більш того, системне введення екзогенного плазміногену нокаутованим за геном *Pg* мишам на фоні опікової патології прискорювало загоєння та утворення рубця [558]. Автори цитованого дослідження довели, що більша кількість плазміногену, який акумулюється у рані, асоційована з нейтрофілами та макрофагами, які зв'язують й транспортують цей протеїн. Подібний результат було отримано також на хронічних виразках шкіри мишей з гіперглікемією. При цьому прискорення часу загоєння за введення плазміногену відбувалося на фоні зростання рівня

IL-6 та активації STAT-3. У дослідженні на мутантних, нокаутованих за геном плазміногену мишах (*Pg*$^{-/-}$) було встановлено, що травматизація барабанної перетинки, яка набуває хронічного перебігу, стимулюється до загоєння локальними ін'єкціями зимогену [559]. Враховуючи непересічне значення плазмін(оген)у в процесах загоєння та узагальнюючи накопичені експериментальні дані, автори роботи [191] характеризують плазміноген як головний регулятор *("master regulator")* загоєння.

Не менш важливу роль у хронізації ранового процесу можуть відігравати екзогенні (головним чином, бактерійні) протеолітичні ензими. Еластази та металопротеази, які секретуються бактеріями до ранового ложа, також здатні здійснювати обмежений протеоліз плазміногену з утворенням низки фізіологічно активних фрагментів – ангіостатинів [456]. Оскільки неоваскуляризація та ангіогенез є абсолютно необхідними умовами відновлення кровотоку у пошкодженій тканині, то дія мікробних протеаз може перешкоджати нормальному кровопостачанню та репарації пошкодження. У власному дослідженні щодо з'ясування діагностичного значення екзогенних колагенолітичних протеаз при лікуванні пацієнтів із синдромом діабетичної стопи було показано, що найбільш високу загальну колагенолітичну активність проявляють екзопротеази, які секретуються *Proteus vulgaris* [12].

Хронічні ранові дефекти (трофічні виразки) є розповсюдженими і типовими ускладненнями цукрового діабету. Їх визначають як ерозію шкіри, що розповсюджується не лише на епідерміс, але й у більш глибокі шари тканини і характеризується уповільненою епітелізацією. Трофічні виразки за діабету виникають внаслідок травм, розвитку нейропатій та ішемічного пошкодження середніх артерій через атеросклероз, хронічну венозну недостатність, артеріальну гіпертензію на фоні гіперглікемії. Головна стратегія лікування хронічної рани – переведення її до гострого стану шляхом активації ендогенних процесів регенерації тканин і видалення некротичного компоненту. Клітини, рекрутовані до місця пошкодження, зазнають

фенотипової трансформації, яка призводить до порушення процесів регенерації. При цьому зміни клітин крайової зони та дна рани виражаються в їхній функціональній ареактивності до дії цитокінів, факторів росту, зниження мітотичної активності. Слід зазначити, що ексудат, який продукується фенотипово зміненими клітинами, інгібує проліферацію та функціональну активність кератиноцитів і фібробластів та містить протеїнази, які руйнують ЕЦМ та інактивують фактори росту [76]. Між тим, відомості щодо особливостей молекулярної складової ранового процесу дозволять оптимізувати та персоналізувати підходи до первинної обробки рани та її терапії з метою покращення результатів лікування пацієнтів з цією патологією. Зокрема, біохімічні зміни в ексудаті – рідині, що виділяється з тканин та кровоносних судин за запалення, відіграють важливу роль для діагностики та вибору методу лікування хронічних ран [43].

В останні роки пріоритетного застосування у терапії діабетичних ран набула вакуум-терапія, або VAC-терапія *(Vacuum-Assisted Closure therapy)*, яка лікувальна дія якої заснована на створенні локального негативного тиску у зоні пошкодження. Численні клінічні спостереження свідчать, що VAC-терапія сприяє покращенню репаративних процесів у проблемних ранах, однак механізми реалізації позитивних лікувальних ефектів наразі є недостатньо вивченими. Вважається, що терапія негативним тиском зменшує рівень ранової ексудації, підтримуючи помірно вологе ранове середовище, необхідне для нормального перебігу репаративних процесів, сприяє видаленню значної кількості патогенної мікрофлори, покращує ангіогенні процеси, посилює клітинну проліферацію та біосинтез у рановому ложі основних речовин сполучної тканини [262]. Можна припустити, що на молекулярному рівні вказані лікувальні ефекти VAC-терапії реалізуються завдяки нормалізації колагенолітичної активності та видаленню із пошкодженої тканини інгібіторів росту судин (ангіостатинів). Фізіологічне значення таких супресорів ангіогенезу, як тромбоспондин-1 та -2, ангіостатини, ендостатини та інших, полягає в пригніченні росту судин за

умов заповнення ранового ложа клітинами та формування грануляційної тканини [156]. Локальне утворення й акумуляція протеїнів-ангіостатиків, перед усім, ендостатинів та ангіостатинів, у кількостях, що значно перевищують фізіологічно необхідний рівень, може обумовлювати антиангіогені ефекти ексудатів хронічних ран. Так, за даними роботи [572], концентрація молекул ендостатину (поліпептид 20 кДа) в ексудаті у 8,5 разів перевищувала таку у сироватці крові. Відомо, що ангіостатини здатні інгібувати активність моноцитів/макрофагів через дезорганізацію їхнього актинового цитоскелету, що призводить до дисфункції цих клітин, важливих для адекватного перебігу запальних процесів під час загоєння [483].

Ростовий фактор ендотелійних клітин VEGF, головними джерелами якого є епідермальні клітини та макрофаги, відіграє ключову роль у репаративній неоваскуляризації тканин, забезпечуючи міграцію та проліферацію ендотелійних клітин, регулювання проникності судин, залучення прозапальних клітин, відновлення кровопостачання тканини [301]. У цьому контексті важливими є дані роботи [351], які свідчать, що плазмін здатний розщеплювати VEGF-A, призводячи до модулювання його біологічної активності. У представленому дисертаційному дослідженні проводили визначення рівнів VEGF в ексудатах хронічних та гострих ран методом імуноблотингу, результати якого представлено на рисунку 3.48. Як видно з блотограм, ендотелійний фактор росту в ексудатах гострих ран міститься в слідових кількостях.

Натомість, рівень VEGF у рановій рідині, відібраної з хронічних виразок шкіри пацієнтів з цукровим діабетом, у 12,4 рази перевищував вміст цього ростового фактора в ексудатах гострих ран, що може бути пов’язаним з ішемічними процесами та розвитком стану гіпоксії й активацією HIF-1α-опосередкованого сигналювання [274].

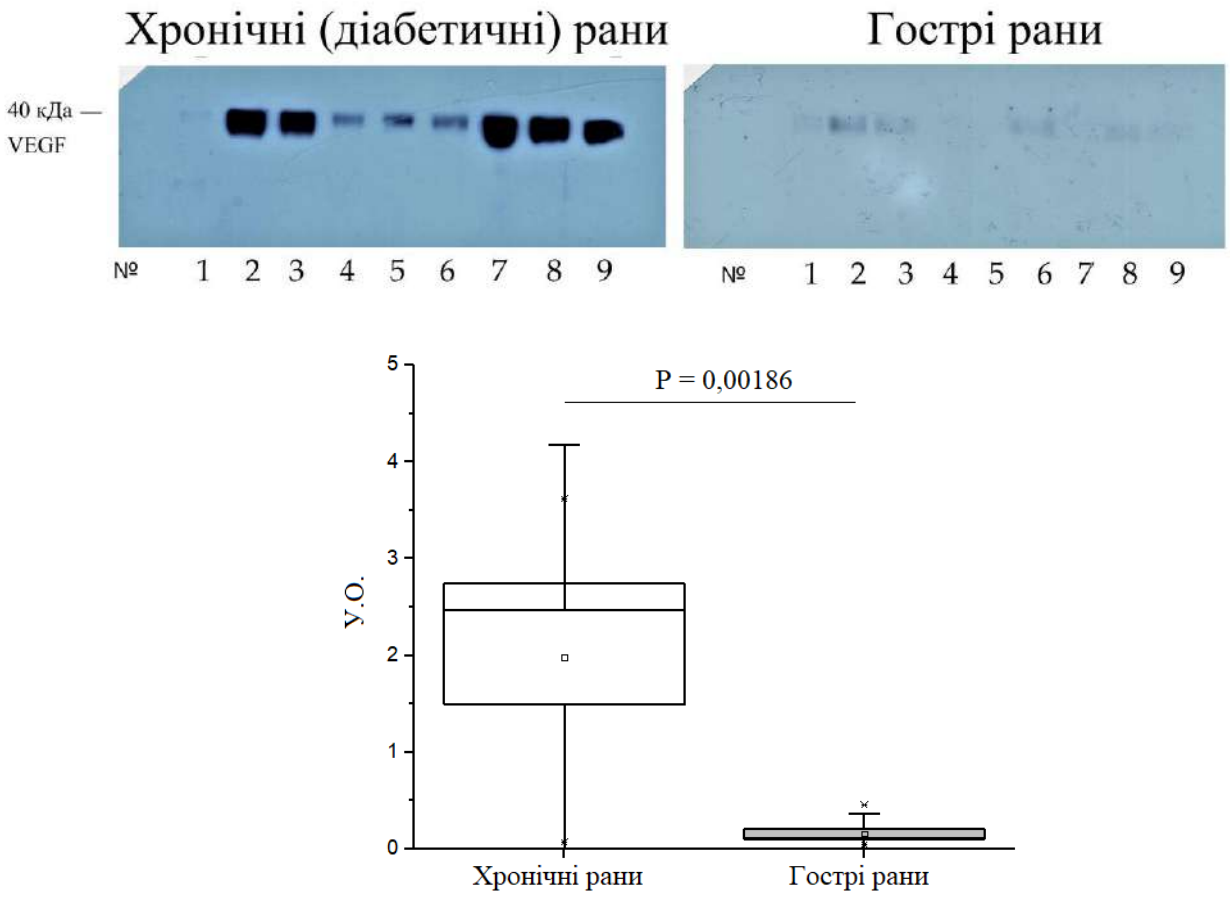

Рисунок 3.48 – Рівень фактора росту клітин судинного ендотелію (VEGF) у зразках ексудатів хронічних ран пацієнтів з цукровим діабетом II типу (n = 16) та гострих (хірургічних) ран (n = 9): типовий результат імуноблот-аналізу (* – P < 0,05, *U*-тест Манна-Уітні).

Результати представленого дослідження збігаються з попереднім спостереженням Drinkwater та ін. [172], яке свідчить, що загоєння хронічних ран не відбувається навіть за наявності значних кількостей судинного фактору росту. На підставі отриманих результатів можна висунути гіпотетичний механізм інактивації VEGF-індукованого проангіогенного стимулу у хронічних ранах. Провідну роль у цьому можуть відігравати ангіостатини, які, ініціюючи пошкодження мітохондрій ендотеліоцитів та активуючи апоптотичні сигнальні шляхи у цих клітинах, функціонують як ефективні антагоністи VEGF. Видалення супресорів ангіогенезу, що містяться в ексудаті, за допомогою VAC-терапії призводить до відновлення

неоваскуляризації. У підтримку цього висновку свідчать отримані результати гістохімічного дослідження тканин шкіри за перебігу хронічного ранового процесу та його терапії із застосуванням вакуумної помпи (рис. 3.49).

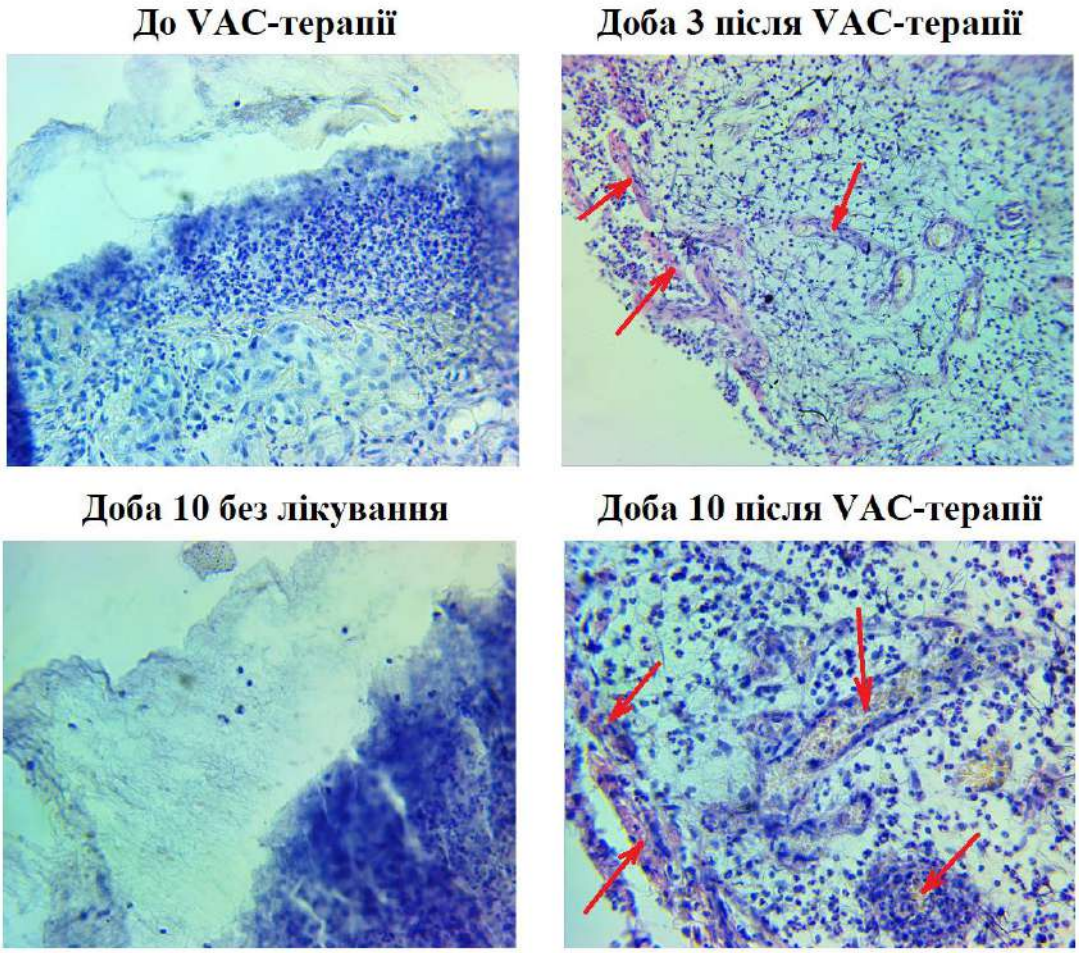

Рисунок 3.49 – Гістохімічне забарвлення (еозін-гематоксілін) поверхонь хронічних виразок шкіри пацієнтів з цукровим діабетом до лікування та після застосування VAC-терапії (збільшення × 10); стрілками позначено новоутворені капіляри.

За допомогою гістологічних досліджень було показано, що на десяту добу спостереження в ранах, які не лікували, були присутні яскраво виражені деструктивні зміни епідерміса, дерми, гіподерми та м’язів (коагуляційний некроз) з формуванням зони перифокального запалення та вираженими дисциркуляторними порушеннями. Вираженим є шар фібринової плівки, під

струпом спостерігалося скупчення гнійного ексудату. У рані після застосування VAC-терапії вже на третю добу лікування спостерігалася поява нових кровоносних мікросудин, зникнення фібринової плівки, що свідчить про інтенсивне очищення рани, поліпшення ангіогенезу та кровопостачання, що мало, як наслідок, скорочення термінів появи грануляційної тканини, формування регенерату, закінчення епітелізації та утворення рубця (рис. 3.50).

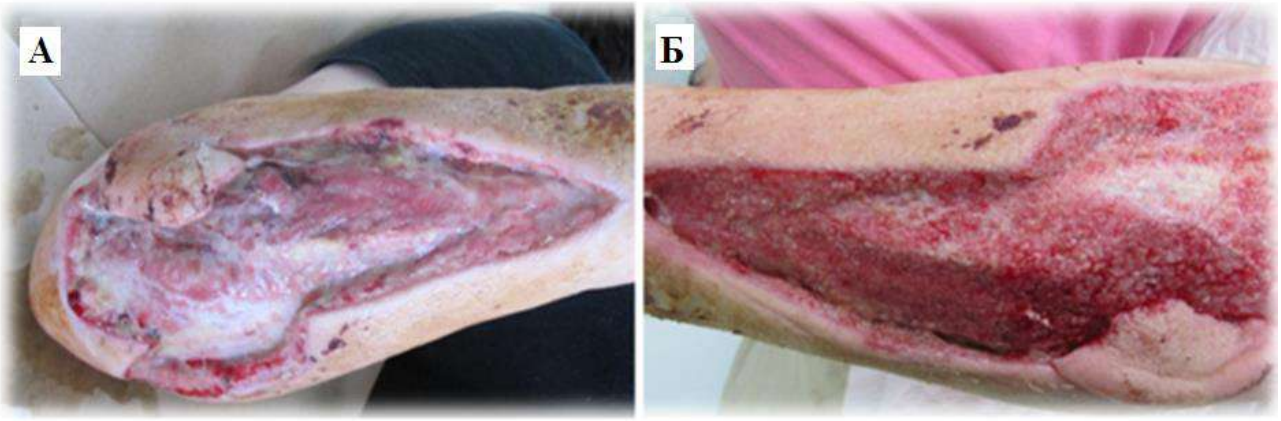

Рисунок 3.50 – Гнійно-некротична рана правого передпліччя пацієнтки з цукровим діабетом II типу до застосування вакуум-терапії (А) та на четверту добу після проведення курсу лікування негативним тиском (Б).

Активність ММР та вміст фрагментів плазміногену у хронічній гіпертонічній виразці шкіри (синдром Марторелла) (клінічний випадок).

Виразка, або синдром, Марторелла (Martorell's hypertensive ischemic leg ulcer, Martorell HYTILU) є рідкісним різновидом ішемічних виразок шкіри нижніх кінцівок, що важко підлягає діагностуванню. Гіпертонічні виразки Марторелла становлять приблизно 15% від усіх випадків госпіталізації з діагнозом виразок шкіри ніг. HYTILU відрізняється підвищеним больовим відчуттям і хронічним перебігом загоєння рани, що характеризується розвитком підшкірного артеріосклерозу, оклюзією малих судин та локальною ішемію тканин дерми [128]. Завданням цієї частини дисертаційного

дослідження було визначити рівні протеїнів-регуляторів ангіогенезу (ангіостатинів та VEGF) та активність колагеназ (MMP-2 та -9) у тканинах з виразки Марторелла як приклад рани, що не загоюється тривалий час. Дослідження проведено з використанням біоптатів тканин, отриманих від одного пацієнта з клінічно діагностованим випадком гіпертонічної виразки Марторелла (*case report*) після операції дермопластики. Окремим завданням цього дослідження було порівняти рівні регуляторів ангіогенезу та активності MMP у патологічному матеріалі з цими показниками у нормальних тканинах.

Результати імуноблот-аналізу VEGF у зразках протеїнів тканин виразки та гістологічно нормальної тканини представлені на рисунку 3.51. Показана виражена інтенсивність зони поліпептиду VEGF з M_m ~ 42 кДа та менш виражена – субодиниці ~ 21 кДа у зразках, отриманих з ранової ділянки виразки Марторелла, тоді як у зразках гістологічно нормальної тканини цей ростовий фактор містився у слідовій кількості.

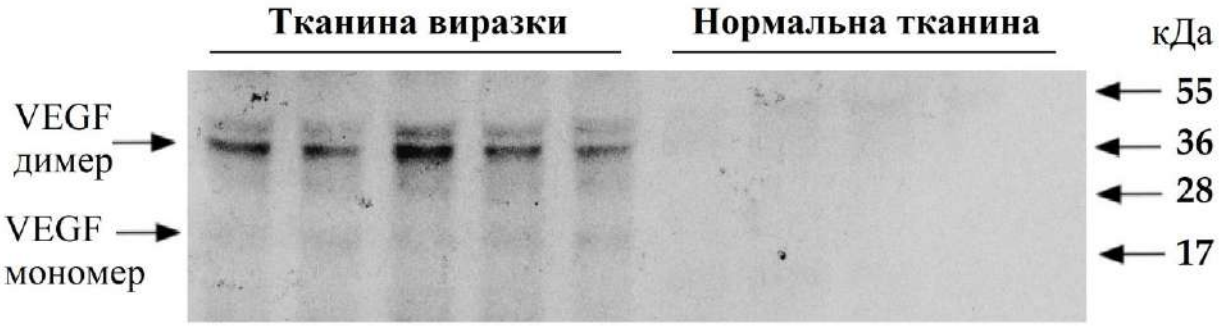

Рисунок 3.51 – Рівень VEGF у тканинах гіпертонічної виразки Марторелла та гістологічно нормальних тканинах (контроль): результат імуноблот-аналізу.

Результат визначення плазміногену/ангіостатинів у тих самих зразках за допомогою імуноблотингу наведено на рисунку 3.52.

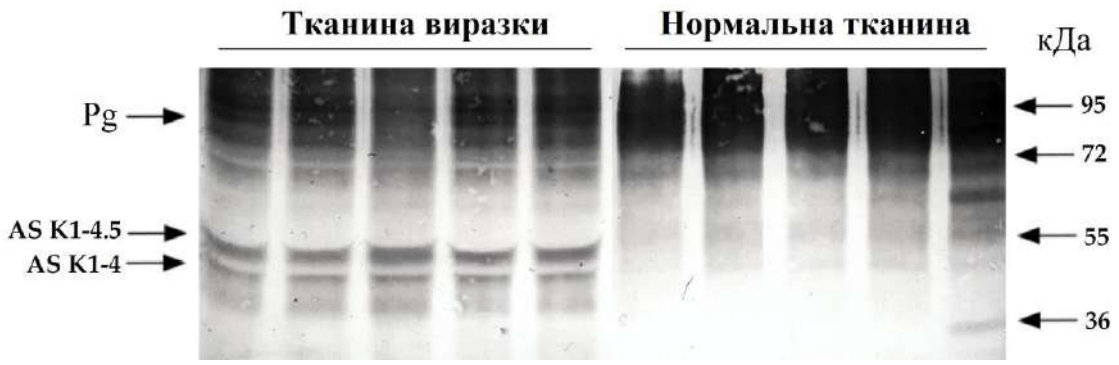

Рисунок 3.52 – Рівні плазміногену (Pg) та ангіостатинів (AS) у тканинах гіпертонічної виразки Марторелла та гістологічно нормальних тканинах (контроль): результат імуноблот-аналізу.

Аналогічно вмісту фрагментів плазміногену (ангіостатинів) в ексудатах хронічних ран за діабету, рівень фрагментів К1-4,5 (~50 кДа) та К1-4 (~ 40 кДа) у тканинах хронічної виразки є значно вищим за такий у нормальній тканині.

Результати детекції активних колагенолітичних ензимів (ММР) за допомогою желатинової зимографії наведено на рисунку 3.53.

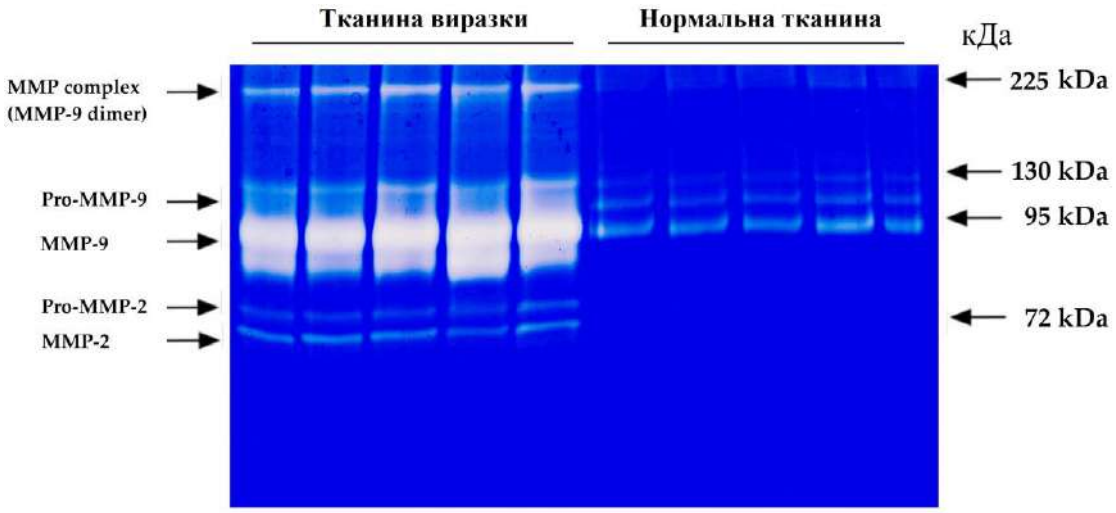

Рисунок 3.53 – Матриксні металопротеїнази (ММР) у тканинах шкіри за гіпертонічної виразки Марторелла та гістологічно нормальних тканинах (результати ензим-форезу).

Важливо зауважити, що метод желатинової зимографії дозволяє визначати як активні форми ММР, так і відповідні зимогени (proMMP),

оскільки в ході проведення електрофорезу за денатуруючих умов SDS сприяє відкриванню активного центру ензиму, що знаходиться в латентній формі. Це відбувається за рахунок порушення взаємодії між залишком Cys-73 і Zn^{2+} у структурі активаційної петлі молекули ензиму [573]. Для усіх п'яти зразків-біоптатів тканин, відібраних з різних ділянок виразки Марторелла, було отримано однотипний профіль активності ММР. Найбільш потужна колагенолітична активність була притаманна ММР-9 (92 кДа), а також її комплексам з M_m 130 та 225 кДа, тоді як активність ММР-2 та її латентна форма була менш виражена. На відміну від патологічного матеріалу, в умовно здоровій тканині містилося значно менша активність ММР, причому рівень активності ММР-2 виявився поза межами чутливості методу. Результати імуноблотингу та желатинової зимографії були оброблені за допомогою денситометричного аналізу і представлені у таблиці 3.2.

Таблиця 3.2

Кількісний аналіз рівнів регуляторів ангіогенезу та активності ММР у тканині з виразки Марторелла та нормальної тканини (контроль) (M ± m)

Параметр	**Контроль, у.о. (n = 5)**	**Виразка у.о. (n = 5)**
Рівень VEGF	0,78 ± 0,39	58,3 ± 9,79*
Рівень ангіостатину K1-4,5	н/в	45,1 ± 5,45
Рівень ангіостатину K1-4	н/в	16,1 ± 0,68
Активність ММР-комплексу	6,6 ± 2,13	61,1 ± 5,12*
Активність ММР-9	50,3 ± 5,92	484,9 ± 61,02*
Активність ММР-2	н/в	27,3 ± 2,61

Примітки: у.о. – умовні одиниці, н/в – не виявляється;
* - $P < 0.01$ у порівнянні з відповідним параметром у контролі, *U*-тест Манна-Уітні.

Серед отриманих результатів особливу увагу привертає драматичне зростання рівня ростового фактору VEGF у тканинах виразки, що у 75 разів

перевищує цей показник у неушкодженій тканині (P < 0,01). Ангіостатини К1-4,5 та К1-4, що у великих кількостях знаходяться в патологічній тканині, практично не виявляються у контрольних зразках. Активність ММР-9-комплексу в 9 разів перевищує цю величину в контрольних зразках (P < 0,01), а активність ММР-9 – удесятеро (P < 0,01). Важливо, що активність ММР, одних з протеолітичних ензимів, що розщеплюють плазміноген, прямо корелює з рівнем ангіостатинів у досліджуваних зразках.

На відміну від хронічних виразок м'яких тканин, які розвиваються у хворих на цукровий діабет, зокрема діабетичної стопи, молекулярні механізми розвитку гіпертензивних хронічних виразок шкіри залишаються невивченими. У представленому дослідженні вперше проведено комплексний аналіз, що включав визначення рівнів ключових регуляторів ангіогенезу та активності ММР – протеїназ, що забезпечують ремоделювання тканини, в хронічній рані за синдрому Марторелла. Відомо, що VEGF є головним проангіогенним медіатором у тканині шкіри, а його роль та механізми реалізації мітогенної та ангіогенної активності за загоєння ран детально описані раніше [185, 301]. Як свідчать дані літератури, а також результати досліджень, описані вище, нормальна тканина шкіри містить незначні кількості VEGF. Підсилення продукції VEGF спостерігається у відповідь на виникнення локальної ішемії та індукується фактором HIF-1α як компенсаторна реакція тканини, спрямована на відновлення кровопостачання та репарацію пошкодження [274]. Таким чином, у хронічних ранах різного патогенезу активація синтезу VEGF вказує на індукцію проангіогенного сигналювання. Разом з цим, раніше було показано, що ексудати хронічних ран шкіри нижніх кінцівок інгібують проліферацію ендотелійних клітин та формування судинної трубки [171, 572]. Кандидатами на роль антагоністів VEGF, що пригнічують відновлення судин та пролонгують загоєння ран, можуть виступати ангіостатини, оскільки ці фрагменти плазміногену інгібують синтез ростового фактору, індукують дисфункцію мітохондрій ендотелійних клітин та активують апоптоз [114]. Крім того, вказані

ангіостатичні поліпептиди запобігають активації нейтрофілів, індукують їхній апоптоз та блокують рекрутинг до регіонів запалення [47]. Оскільки нейтрофіли є головними клітинами, які забезпечують реалізацію ранніх стадій запального процесу, здійснюючи видалення некротичної тканини, фагоцитоз інфекційних агентів та продукування численних медіаторів та ростових факторів, послаблення функціональної активності цих клітин ангіостатинами може бути одним з чинників хронізації загоєння [659]. Ebaid та ін. [180] показали, що дефіцит функції нейтрофілів призводило до пролонгування термінів загоєння ранових уражень шкіри в експериментальних щурів через пригнічення проліферації та міграції епідермальних кератиноцитів та відкладання колагену. Іншими авторами встановлено, що пригнічення хемотаксису та інфільтрації нейтрофілів робить значний внесок до затримки резолюції запалення, спричиненого інфікуванням ран в осіб похилого віку, що може бути особливо актуальним у випадку синдрому Марторелла [89]. Спираючись на ці спостереження, можна припустити, що утворення та акумуляція ангіостатинів у хронічній гіпертонічній виразці шкіри може негативно впливати на загоєння саме через інгібування активації та рекрутингу нейтрофілів. На відміну від ексудатів хронічних ран, у яких було показано наявність ангіостатин-подібних поліпептидів у широкому діапазоні молекулярних мас, у виразках за синдрому Марторелла превалюють два поліпептиди, що за величинами M_m відповідають фрагментам плазміногену К1-4,5 та К1-4. При цьому, перший поліпептид-ангіостатин може бути продуктом автопротеолізу плазміну, тоді як другий – результат фрагментації плазміногену за участі ММР [162]. Тому не дивно, що поліпептидний склад ангіостатинів в ексудатах діабетичних ран корелює з високою активністю ММР та низькою активністю плазміну у досліджуваних зразках.

Ще однією спільною ланкою в ланцюзі патогенезу хронічних ран за цукрового діабету та гіпертонічної виразки шкіри є перманентна активація колагенолітичних протеїназ у рановому ложі, при цьому активність ММР-9 є

домінувальною. Як відомо, ремоделювання ЕЦМ є ключовою подією в ході нормального загоєння ран. Желатинази, а саме, ММР-2, що продукуються фібробластами, остеобластами, ендотелійними клітинами та макрофагами, та ММР-9, основними джерелами якої є поліморфноядерні лейкоцити, періцити судин, макрофаги та кератиноцити, здійснюють деградацію основного масиву протеїнів позаклітинного простору. Функціонування ММР необхідне для забезпечення міграції клітин до місця пошкодження та запалення, відкладання нової речовини ЕЦМ та розвитку нової тканини [356, 519]. Як вже зазначалося вище, надлишкова активація ММР під час загоєння розглядається як показник негативного прогнозу щодо адекватності загоєння, своєчасного закриття та епітелізації рани. Ladwig та ін. [348] показали, що висока активність ММР-9 порушує загоєння хронічних ран та може використовуватися як прогностичний маркер для оцінки загоювального потенціалу. Перманентно висока активність желатиназ, а також інших протеолітичних ензимів, спричинює деградацію молекул адгезії, ростових факторів (VEGF та EGF) та їхніх рецепторів, а також протеїнів ЕЦМ (зокрема, плазміногену та різних типів колагену), що супроводжується появою розчинних продуктів їхньої фрагментації – інгібіторів ангіогенезу (ангіостатинів, ендостатину, тумстатину, канстатину, арестену та ін.) [351]. Підвищена активність ММР є одним з доведених чинників відторгнення дермальних трансплантатів [286]. Результати, отримані у представленому дисертаційному дослідженні, значно доповнюють можливості молекулярної діагностики та лікування ранового процесу. Блокування протеолітичної активності ММР з використанням специфічних інгібіторів та/або видалення надлишкової кількості протеїназ з ранового середовища за допомогою неспецифічної евакуації за допомогою, зокрема, вакуум-терапії, можуть бути рекомендовані як ефективні підходи для відновлення та стимулювання репаративних процесів у хронічних ранах різного патогенезу. Визначення вмісту та поліпептидного спектру ангіостатинів у біоптатах або ранових ексудатах вперше пропонується використовувати як молекулярні

діагностично-прогностичні маркери перебігу загоєння та чутливі показники хронізації ран. Комплексна оцінка профілю регуляторів ангіогенезу та активності ММР може слугувати інформативним підходом для вибору стратегії лікування та рекомендацій стосовно терапії хронічних ран з використанням дермапластики ауто- або ксенотрансплантатами.

3.3.1.2. Ангіостатини у сітківці ока щурів за експериментальної гіперглікемії та застосування інгібіторів PARP-1

Ретинопатії є одним з найбільш поширених ускладнень цукрового діабету, які асоційоване з ангіопатіями, що виникають на фоні порушення балансу регуляторів ангіогенезу. Головними проблемами при лікуванні цієї патології є відшарування сітківки та внутрішньоочні кровотечі, тому пригнічення неоваскуляризації сітківки ока за хронічної гіперглікемії становить пріоритетний напрям досліджень сучасної ендокринології та офтальмології [73, 176]. Масована дегенерація клітин сітківки за хронічної гіперглікемії може бути причиною ендотелійної дисфункції, ішемії, реактивації ретиноглії, запалення та набряку. Одним з механізмів клітинної смерті за цукрового діабету є партонатос – шлях загибелі, що модулюється ензимом системи репарації геному PARP-1 [241]. Отже, головним завданням представленої частини досліджень, проведених у рамках дисертаційної роботи, було визначити ефекти інгібіторів ензиму PARP-1 на рівень ангіостатинів у сітківці ока щурів за експериментальної СТЗ-індукованої гперглікемії. У дослідженні використовувалися такі інгібітори PARP-1, як нікотинамід (NAm) та 3-амінобензамід (3-AB) [253].

Інгібування PARP-1 внаслідок введення інгібіторів було доведено статистично достовірним зниженням рівнів продуктів полі(ADP)рибозилювання протеїнів (pADP) у сітківці ока щурів з експериментальною гіперглікемією (рис. 3.54). Отже, отриманий результат вказує на ефективність інгібіторної дії NAm та 3-AB у пригніченні

ензиматичної активності PARP-1 за умов створеної експериментальної моделі гіперглікемії.

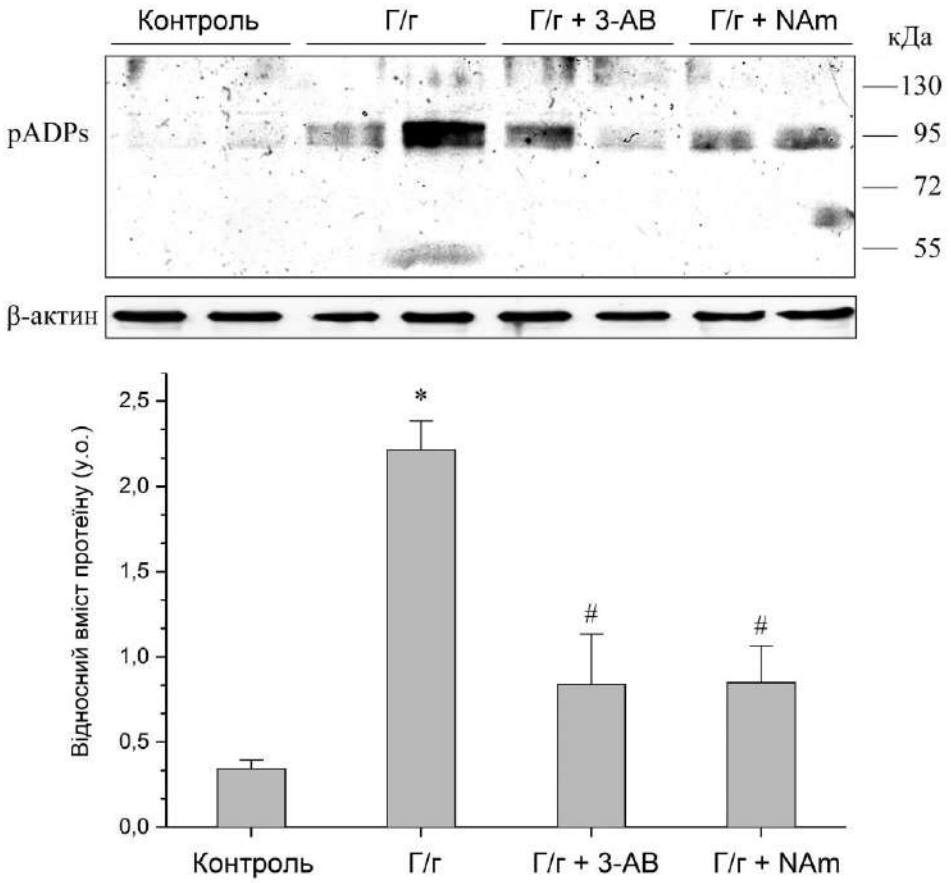

Рисунок 3.54 – Вплив інгібіторів PARP-1 (NAm та 3-AB) на рівень полі(ADP)рибозильованих протеїнів (pADPs) у сітківці ока щурів з експериментальною гіперглікемією (Г/г): результати імуноблот-аналізу.
* – P < 0,05 порівняно з контролем, # – P < 0,05 порівняно з СТЗ-гіперглікемією, n = 5, ANOVA.

Оскільки PARP-1 є ключовим компонентом системи репарації геному клітини та потужним регулятором клітинної загибелі, яка має місце за тривалої гіперглікемії, а надекспресія PARP-1 та її протеолітичне розщеплення є однією з ознак апоптозу, було досліджено вплив інгібіторів на рівень експресії цього ензиму в сітківці щурів за експериментальної гіперглікемії. Результати імуноблотингу, представлені на рисунку 3.55, демонструють зниження рівня інтактного поліпептиду PARP-1 та продукту

його розщеплення, надекспресія яких спостерігається у сітківці ока щурів із СТЗ-індукованою гіперглікемією.

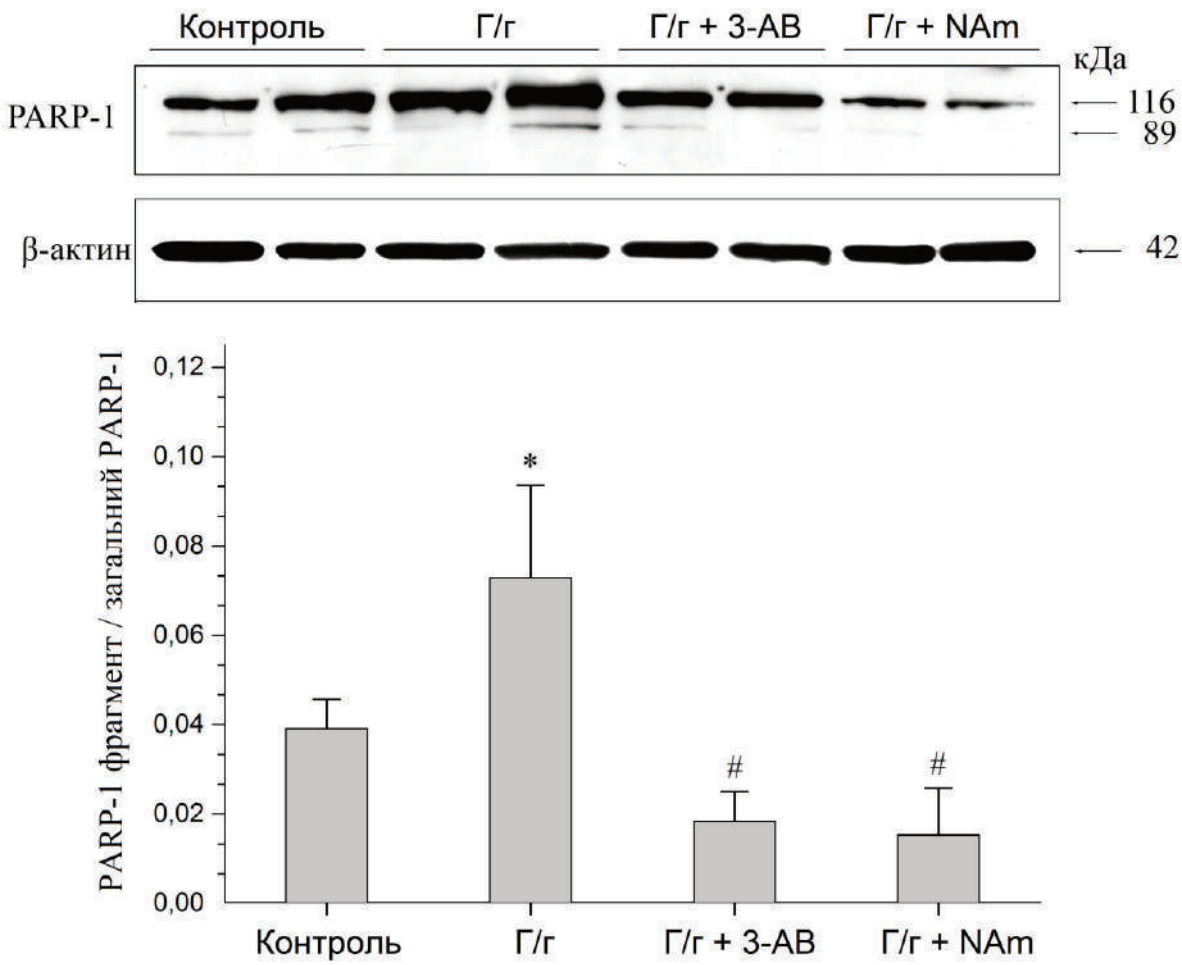

Рисунок 3.55 – Вплив інгібіторів PARP-1 (NAm та 3-АВ) на рівень протеїну PARP-1 та його фрагменту 89 кДа у сітківці ока щурів з експериментальною гіперглікемією (Г/г): результати імуноблот-аналізу.
* – P < 0,05 порівняно з контролем, # – P < 0,05 порівняно з СТЗ-гіперглікемією, n = 5, ANOVA.

Головне завдання, поставлене у представленій частині роботи, стосувалося визначення зв’язку між партанатосом за участі PARP-1 та змінами рівнів супресорів судинного росту – ангіостатинів. Результати визначення ангіостатинів у сітківці експериментальних тварин, отримано за допомогою імуноблоту й наведено на рисунку 3.56.

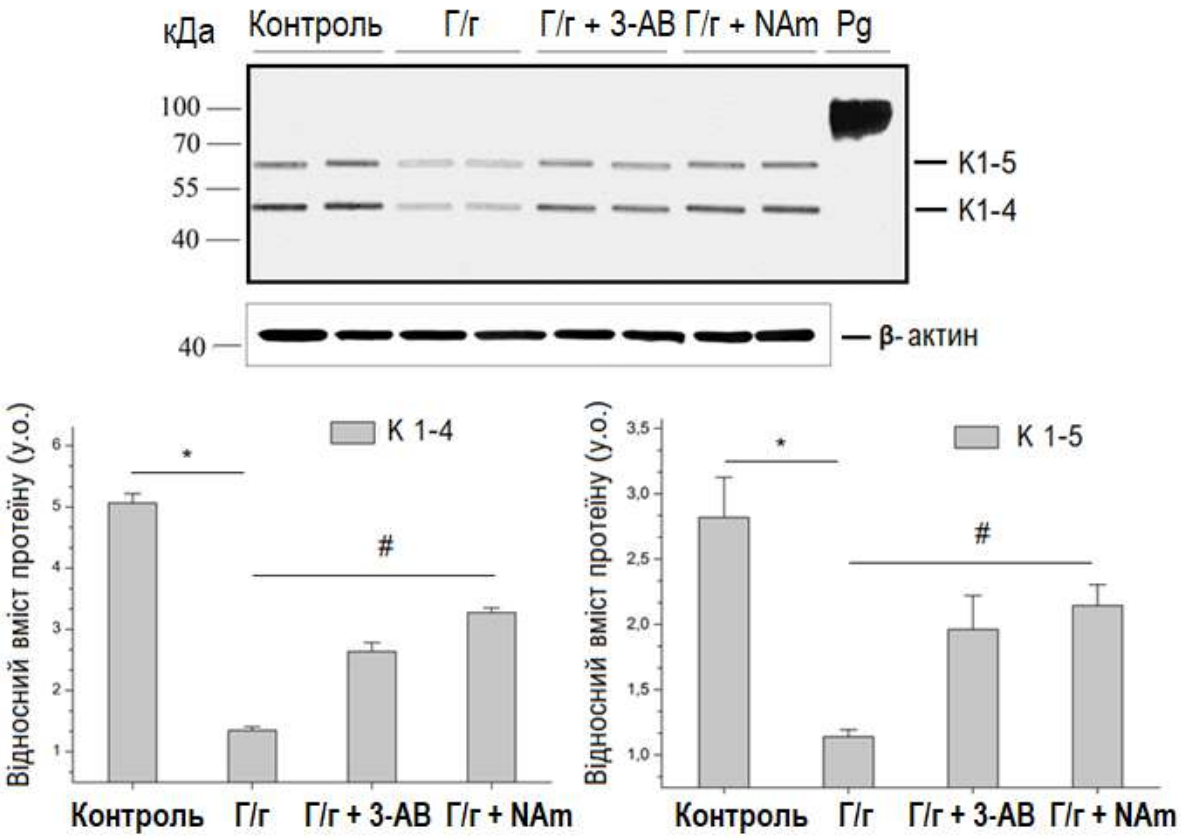

Рисунок 3.56 – Вплив інгібіторів PARP-1 (NAm та 3-AB) на рівень ангіостатинів у сітківці ока щурів з експериментальною гіперглікемією (Г/г): результати імуноблот-аналізу.

* – P < 0,05 порівняно з контролем, # – P < 0,05 порівняно з СТЗ-гіперглікемією, n = 5, ANOVA.

Вперше встановлено, що у тканині сітківки ока щурів превалюють два поліпептиди-ангіостатини, які за величиною M_m відповідають фрагментам К1-5 (65 кДа) та К1-4 (45-50 кДа). Тривала гіперглікемія негативно позначилася на здатності клітин сітківки продукувати ангіостатини. Так, рівень фрагменту К1-5 у сітківці за гіперглікемії зменшився у 3,7 разів у порівнянні з контролем (P < 0,05), а рівень поліпептиду К1-4 – у 2,5 рази (P < 0,05) (1,35 ± 0,06 проти 5,06 ± 0,15 та 1,14 ± 0,06 проти 2,82 ± 0,31 у.о. відповідно, P < 0.05). Введення інгібіторів PARP-1 призвело до часткового відновлення вмісту поліпептидів-ангіостатинів у сітківці ока щурів з

гіперглікемією. Так, рівень фрагменту К1-5 за введення 3-АВ та NAm збільшився відповідно у 1,5 та 1,6 разів у порівнянні з цією величиною у сітківці щурів із СТЗ-індукованою гіперглікемією ($P < 0,05$), тоді як фрагменту К1-4 – у 2,3 та 2,9 разів відповідно ($P < 0,05$).

Наступним завданням роботи було з'ясувати тип клітин, які продукують ангіостатини в нервовій тканині. Відомо, що астроцити сітківки виконують трофічну, регуляторну та протекторну функції по відношенню до нейрональних клітин, беруть участь у регулюванні функціонування фоторецепторів, формуванні та підтримці цілісності гемато-ретинального бар'єру, виконуючи роль посередників між клітинами ендотелію судин та нейронами. На відміну від ретинальних клітин Мюллерівської глії, популяції астроцитів локалізуються у периваскулярних зонах й контролюють ступінь васкуляризації тканини сітківки через здатність продукувати різні регулятори ангіогенезу [399]. Оскільки астроцити містять протеїни системи активації плазміногену, ММР, катепсин L та інші протеїнази [350], здатні розщеплювати плазміноген, а також беруть участь у кліренсі плазміну [88], нами було висунуто припущення, що ці клітини можуть бути джерелом ангіостатинів у нервовій тканині. Оскільки отримання первинної культури астроцитів сітківки ока було неможливим за технічних умов, то було одержано й охарактеризовано первинну культуру астроцитів головного мозку новонароджених щурів, які є структурними та функціональними аналогами астроцитів ретиноглії (див. підрозділ *2.10.1*) [399] (рис. 3.57). За допомогою імуноблотингу було показано, що астрогліальні клітини здатні зв'язувати плазміноген, утворювати та вивільняти ангіостатини до середовища (рис. 3.58).

Поліпептиди з Mm 92 та 84 кДа відповідають нативному (Glu-) плазміногену та його частково деградованій формі (Lys-плазміноген), утворення якої на поверхні різних клітин описано раніше. Поліпептиди з Mm~65-60 кДа є продуктами фрагментації плазміногену, які містять усі п'ять кринглових доменів (К1-5). Дві більш низькомолекулярні зони (~50 та 40 кДа) можуть відповідати ангіостатинам К1-4,5 та К1-4. Крім того, визначено

певну кількість імунореактивних проміжних продуктів деградації плазміногену в діапазоні Mm 38-30 кДа. Найбільш вираженою серед них є поліпептидна смуга 30 кДа, яка відповідає одній з глікоформ К1-3.

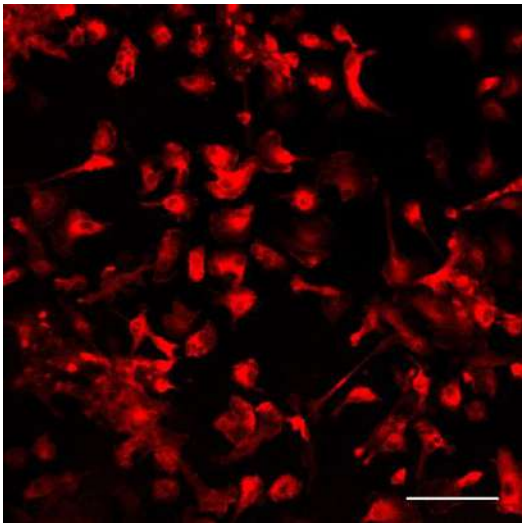

Рисунок 3.57 – Імуноцитохімічне забарвлення первинної культури астроцитів головного мозку щурів за гліальним фібрилярним кислим протеїном (GFAP) (риска шкали дорівнює 50 мкм).

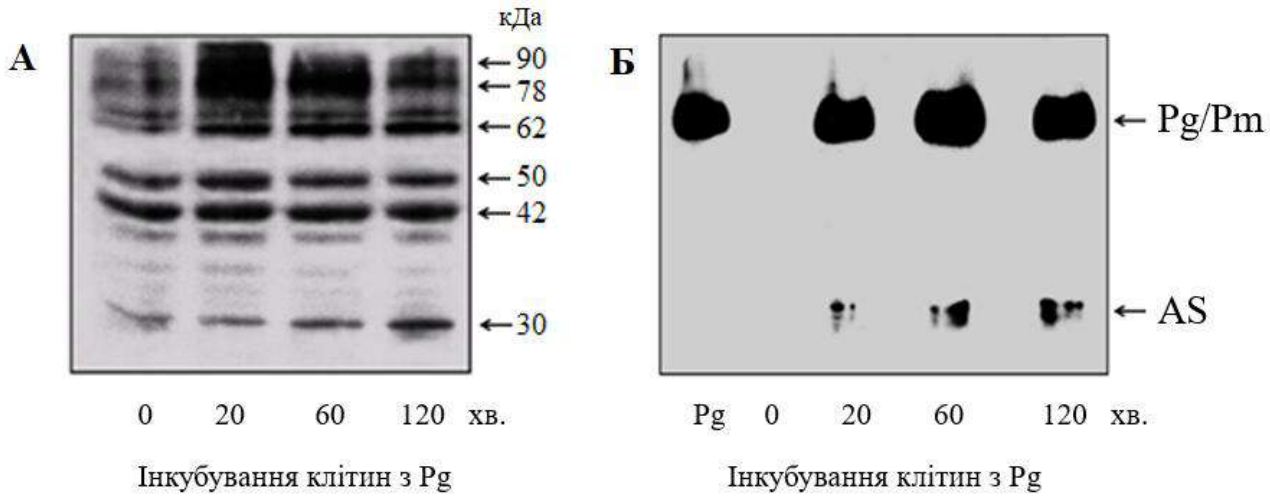

Рисунок 3.58 – Утворення та продукування ангіостатинів клітинами астроглії: А – визначення плазміногену та ангіостатинів у лізатах клітин астроглії (типова блотограма); В – визначення плазміногену та ангіостатинів у кондиційному середовищі первинної культури астроцитів (типова блотограма).

Інкубація астроцитів з екзогенним плазміногеном протягом 120 хв. призвела до поступового зменшення кількості плазміногену, що вказує на його утилізацію клітинами, та одночасного зростання вмісту та накопичення деградованих поліпептидів, головним чином, фрагменту 30 кДа (рис. 3.58А).

З метою визначення здатності астроцитів вивільняти ангіостатини до свого оточення був проведений імуноблот-аналіз зразків кондиційного середовища, яке відбирали в ході культивування. Слід зазначити, що протягом культивування астроцити не вивільняли ендогенний плазміноген до середовища («нульова» точка). Встановлено, що вже через 20 хв. після внесення плазміногену до первинної культури астроцитів у кондиційному середовищі з'являється імунореактивний поліпептид 30 кДа, який, ймовірно, представляє собою ангіостатин К1-3 (рис. 3.58Б).

Нещодавно Briens та ін. [88] описали принципово новий механізм кліренсу плазміногену в нервовій тканині. Авторами показано, що саме астроцити є головними клітинами нервової системи, які відповідають за регулювання тканинного рівня плазмін(оген)у. Астроцити інтерналізують як плазмін, так і плазміноген, за рахунок клатрин- та динамін-опосередкованого ендоцитозу. Слід зауважити, що транспортування плазміну досередини клітини відбувається у півтора рази швидше, ніж плазміногену (відповідно 29,9 проти 18,8 везикул на хвилину). Крім зазначених транспортних протеїнів, в ендоцитозі плазмін(оген)у бере участь актин, який експонується на поверхні плазматичної мембрани астроциту та відіграє таким чином рецепторну роль. Ці дані є першим експериментально доведеним свідченням безпосередньої участі цитоскелетного протеїну актину в процесах ендоцитозу. Подальша доля плазмін(оген)у в астроцитах полягає в його утилізації шляхом деградації через утворення ранніх та пізніх ендосом. Остаточна деградація інтерналізованих молекул плазмін(оген)у відбувається в лізосомальному люмені астроцитів. Спираючись на наведені експериментальні дані, ми припускаємо, що протеоліз плазмін(оген)у лізосомальними ензимами може супроводжуватися появою продуктів неповного розщеплення – ангіостатинів.

У такому випадку утворення ангіостатинів астроцитами є перманентним процесом за нормальних фізіологічних умов, так само, як генерація та секреція ендостатинів (фрагментів колагену XVIII) клітинами макроглії сітківки ока [257]. Отже, у представленій дисертаційній роботі вперше доведено провідну роль астрогліальних клітин в утворенні ангіостатинів у нервовій тканині.

Спираючись на отримані результати щодо здатності астроцитів функціонувати як джерело ангіостатинів у нервовій тканини, наступним етапом дослідження стало визначення впливу інгібіторів PARP-1 на функціональний стан астроцитів у сітківці ока щурів із СТЗ-індукованою гіперглікемією. Результати визначення GFAP – маркеру реактивних астроцитів – представлено на рисунку 3.59.

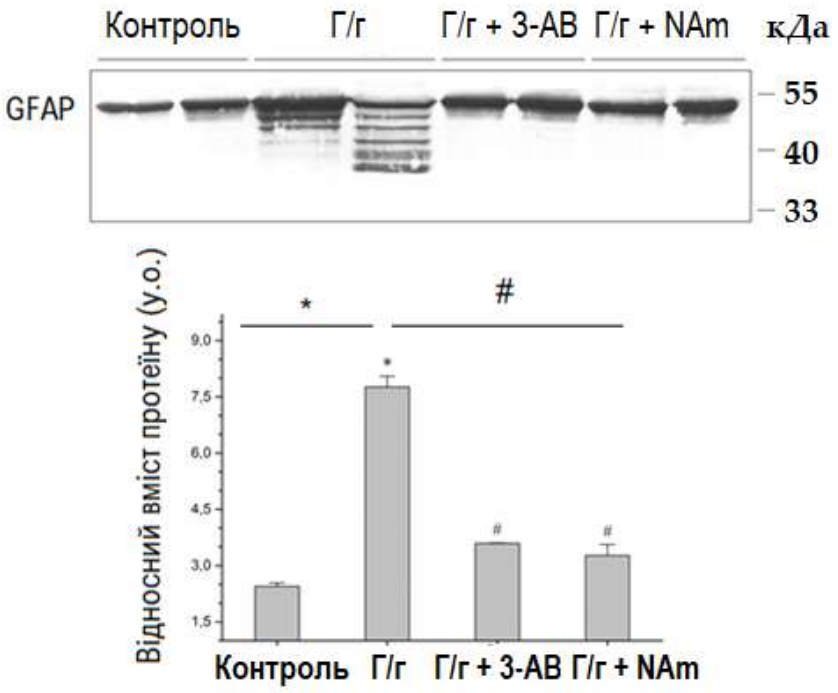

Рисунок 3.59 – Ефекти інгібіторів PARP-1 (NAm та 3-AB) на рівень астроцитарного маркеру GFAP у сітківці ока щурів з експериментальною гіперглікемією: результати імуноблот-аналізу.

* – P < 0,05 порівняно з контролем, # – P < 0,05 порівняно із СТЗ-гіперглікемією, n = 5, ANOVA.

За допомогою денситометричного аналізу блотограм було показано, що вміст GFAP у сітківці щурів з гіперглікемією втричі перевищував цю величину у контрольних тварин (відповідно 7,76 ± 0,29 проти 2,45 ± 0,09 у.о., $P < 0,05$). Введення щурам з гіперглікемією 3-АВ та NAm сприяло істотному зниженню рівня GFAP ($P < 0,05$) до 3,59 ± 0,01 і 3,27 ± 0,29 у.о. відповідно. Отримані результати кількісного визначення астрогліального маркеру GFAP свідчать про розвиток реактивного астроцитозу в сітківці ока щурів з експериментальною гіперглікемією, інтенсивність якого значно зменшується у тварин після введення інгібіторів PARP-1. Крім загального вмісту протеїну проміжних філаментів, важливим показником активації астрогліальної відповіді є поява низки деградованих поліпептидів GFAP у діапазоні M_m 47-39 кДа, які роблять значний внесок до сумарної величини імунозабарвлення GFAP у сітківці діабетичних тварин. Терапія із застосуванням інгібіторів PARP-1 практично повністю запобігала фрагментації GFAP, що свідчить про нормалізацію функціонування клітин макроглії.

Результати імуногістохімічного аналізу GFAP сітківки, представлені на рисунку 3.60, узгоджуються з даними, отриманими за допомогою імуноблотингу. Підсилене імунозабарвлення GFAP у тканині сітківки щурів з гіперглікемією відповідає ділянкам реактивного астроцитозу, інтенсивність якого є менш вираженою у зразках сітківки тварин з гіперглікемією, яким вводили інгібітори PARP-1.

Мікросудини сітківки повністю покриті астроцитами, утворюючи ендотелійно-астроцитарний комплекс, й астроцити мають здатність модулювати ангіогенез залежно від фізіологічних або патологічних станів. Показано, що в здоровій сітківці астроцити в стані спокою протидіють індукованим VEGF проангіогенним стимулам шляхом утворення та вивільнення екзосом, завантажених антиангіогенними компонентами, такими як ендостатин та PEDF, що пригнічують відростання нових судин [257].

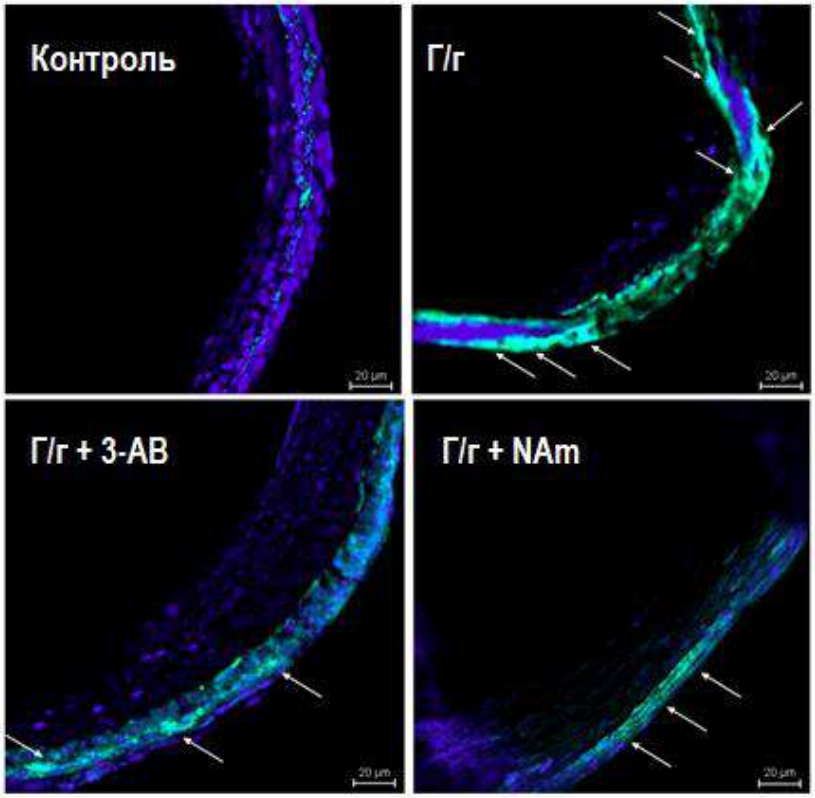

Рисунок 3.60 – Імуногістохімічна детекція GFAP на зрізах сітківки ока щурів з експериментальною СТЗ-індукованою гіперглікемією (Г/г) та її корекції з використанням інгібіторів PARP-1 (3-АВ та Nam) (зелений колір – імунозабарвлення GFAP, синій колір – ядра, стрілками позначено ділянки з реактивним астроцитозом).

За патологічних умов реактивні астроцити набувають проангіогенного фенотипу, який, як вважають, є компенсаторною реакцією на гіпоксію, індуковану ішемією тканини [455]. Однак надмірна активація астроглії може спричинити аномальну неоваскуляризацію сітківки, що, в свою чергу, призводить до утворення фіброзних рубців і завершується відшаруванням сітківки [399]. У такому випадку відновлення пулу молекул, що інгібують ангіогенез, пригнічуючи гліальну реактивність у сітківці за гіперглікемії може бути перспективним підходом для профілактики та лікування діабетичної ретинопатії. Для оцінки впливу NAm та 3-АВ на вміст антиангіогенних регуляторів у сітківці щурів за СТЗ-індукованої гіперглікемії ми визначали

рівні ангіостатинів – інгібіторів проліферації та міграції ендотелійних клітин, які є важливими регуляторними молекулами, що контролюють стан судин у тканинах ока й відіграють значну роль у розвитку різних діабетичних ускладненнях, як було узагальнено вище [73, 617].

Раніше було встановлено, що підсилена продукція ангіостатину, що супроводжується зниженням рівнів VEGF, відбувається під час фотокоагуляції сітківки за лікування проліферативної діабетичної ретинопатії [581]. Автори цитованої роботи припускають, що генерування ангіостатинів у тканинах ока є індуцибельним. Цілком імовірно, що утворення ангіостатинів з плазміногену, який в достатній кількості синтезується клітинами сітківки та скловидного тіла, може здійснюватися металоеластазами активованих макрофагів. Іншими дослідниками показано, що ангіостатин (ізоформа 50 кДа) у нормі локалізується у шарі нервового волокна, шарі клітин гангліїв, внутрішньому та зовнішньому плексиформних шарах та шарі фоторецепторів сітківки ока кота, корови, собаки та щура, тоді як у сітківці ока коней та свиней показано додаткове імунозабарвлення за ангіостатинами матриксу внутрішнього ядерного шару [477]. Таким чином, результати дисертаційного дослідження підтверджують останні спостереження стосовно того, що ангіостатини конститутивно утворюються у сітківці за нормального фізіологічного стану та можуть підтримувати ангіогенний баланс у здоровому оці ссавців, запобігаючи надмірній неоваскуляризації. Наразі популяції астрогліальних (та, можливо, інших) клітин сітківки, які відповідають за генерування ангіостатину в рогівці ока, залишаються невідомі, а їхня ідентифікація потребує додаткових зусиль.

Низка експериментальних розробок свідчить на користь ефективності застосування екзогенних ангіостатинів або відповідних генно-інженерних конструкцій, що їх кодують, з метою пригнічення проангіогенного сигналювання за діабетичної ретинопатії. Автори роботи [565] для експресії ангіостатину в сітківці ока щурів з СТЗ-індукованою гіперглікемією використовували рекомбінантний аденоаційований вірусний вектор (rAAV),

що відповідає послідовності фрагмента K1-4. Було показано, що експресія rAAV-AS істотно знижувала ступінь проникності капілярів у сітківці ока щурів з гіперглікемією. Використання запропонованої системи доставки гена має значні перспективи для терапії захворювань ока, оскільки rAAV-AS відрізняється високою стабільністю, здатністю до тривалої експресії, що дозволяє досягти значного терапевтичного ефекту навіть після одноразової ін'єкції. Показана перспективність застосування нативних ангіостатинів як засобів, що нормалізують судиноутворення в сітківці. Показано, що одноразова ін'єкція ангіостатину K1-4 до скловидного тіла у дозі 7,5 мкг на око значно зменшила ступінь проникності капілярів сітківки з оксиген- і СТЗ-індукованою діабетичною ретинопатією [567]. Автори роботи зробили цікаве спостереження стосовно того, що ангіостатин не вплинув на вміст VEGF та стан судин у сітківках здорових щурів. Описані ефекти ангіостатину на клітинному рівні корелювали зі зниженням рівнів VEGF у тканини сітківки діабетичних тварин. На підставі отриманих даних було висунуто припущення про те, що ангіостатини пригнічують розвиток проліферативної ретинопатії шляхом непрямого інгібувального впливу на ендотеліоцити судин завдяки блокуванню експресії VEGF у сітківці за умов гіпоксії. Запропоновано молекулярний механізм пригнічення ангіостатинами синтезу VEGF. Відомо, що за гіпоксичного стану відбувається фосфорилювання p42/p44 MAP-кінази, що в свою чергу, призводить до зростання рівня VEGF в результаті стимуляції його транскрипції активаторним протеїном AP-2/Sp1. Ангіостатін інгібує фосфорилювання p42/P44 MAP-кінази і, таким чином, пригнічує експресію VEGF за умов гіпоксії. В ході досліджень, описаних у [565], введення конструкції rAAV-AS призводило до паралельного зниження рівня фосфорилювання p42/P44 MAP-кінази і вмісту VEGF у сітківці щурів з гіперглікемією вже на перший день експерименту. Механізми, за рахунок яких стан гіперглікемії індукує розвиток патологій сітківки ока, а також залучення ангіостатинів до регулювання ангіогенного балансу за розвитку цукрового діабету, наведено на рисунку 3.61.

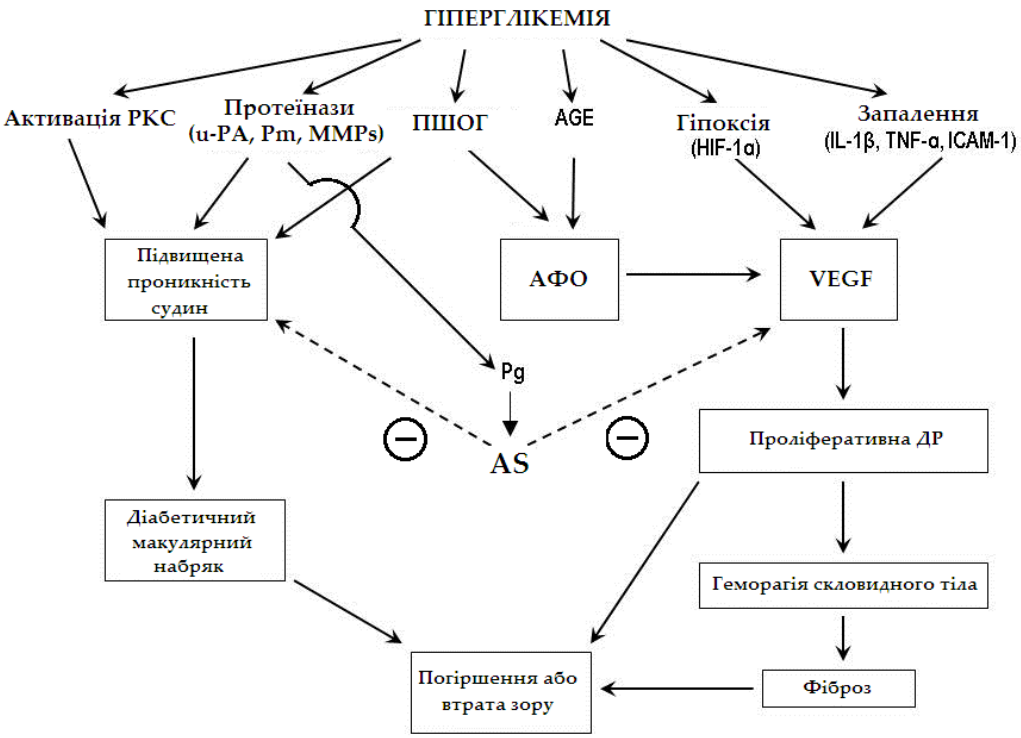

Рисунок 3.61 – Залучення ангіостатинів (AS) до патогенезу діабетичної ретинопатії (PKC – протеїнкіназа C, ПШОГ – поліольний шлях окиснення глюкози, АФО – активні форми оксигену, AGE – кінцеві продукти глікування, Pg – плазміноген) [617].

Незважаючи на те, що більша частина робіт, спрямованих на вивчення ефектів ангіостатинів за діабетичної ретинопатії, проведена з використанням фрагментів плазміногену, що складаються з перших трьох або чотирьох крінглових доменів, втім, особлива роль ізольованого K5 все частіше стає предметом досліджень. У ході перших досліджень K5 зарекомендував себе як перспективний потенційний терапевтичний агент для лікування діабетичної ретинопатії. Показано, що доставка гена, що кодує послідовність K5, до клітин сітківки сприяла зменшенню ступеня проникності капілярів, інгібувала гіперекспресію VEGF та гальмувала неоваскуляризацію сітківки за умов ішемії [690]. Результати роботи [394] демонструють, що K5 здатний чинити прямий ефект на клітини Мюллерівської глії. Як відомо, ці клітини є основними клітинами офтальмоглії й виконують відразу декілька регулювальних функцій по відношенню до нейронів сітківки: опорну,

метаболічну і трофічну, нейтралізують надлишок таких нейротрансмітерів, як L-глутамат і L-аспартат, регулюють кількість окису нітрогену (NO) [179]. Мюллеровскі клітини є головним джерелом прозапальних і проангіогенних факторів, у тому числі й VEGF, у сітківці та відіграють ключову роль у підтримці неоваскуляризації за умов гіперглікемії. Показано, що К5 знижує рівень експресії VEGF мюлерівськими клітинами за умов *in vitro*. Проводяться дослідження з ідентифікації сайту зв'язування та пошуки рецептора К5 на поверхні мюллеровських клітин. Отримано дані про те, що інші ангіостатини, у тому числі К1-4, не взаємодіяли із сайтом зв'язування К5 на поверхні мюллеровських клітин що вказує на специфічний характер асоціації К5 з клітинами [212]. Передбачається, що фізіологічні ефекти цього фрагменту плазміногену реалізуються завдяки його здатності специфічно й з високою афінністю зв'язуватися з потенціал-залежним аніонним каналом (VDAC), як це відбувається у ендотеліоцитах. Було відзначено зниження рівня експресії рецептора К5 (K5R) у культурі мюллеровських клітин за гіпоксії й підвищеної концентрації глюкози, що моделюють умови розвитку проліферативної діабетичної ретинопатії, а також в сітківки щурів в моделях оксиген- та СТЗ-індукованої ретинопатії [404]. Інкубація клітин з К5 за патологічних умов сприяла збереженню рівнів K5R, що, на думку авторів цитованої роботи, було головною причиною пригнічення експресії VEGF. Незважаючи на наявні обнадійливі результати, потрібні подальші дослідження, спрямовані на з'ясування механізмів дії ізольованого К5, природи й особливостей функціонування його рецепторів і залучення до процесів регулювання ангіогенного балансу в сітківці.

На сьогоднішній день не існує неінвазивних методів лікування захворювань очей, асоційованих з порушенням проникності мікросудин і макулярною набряком, таких як діабетична ретинопатія й увеїт, що є головними причинами втрати зору пацієнтами з цукровим діабетом. Результати досліджень з використанням як нативних, так і генно-інженерних ангіостатинів, є обнадійливими у зв'язку з їхньою високою ефективністю й

малоінвазивністю щодо застосування в терапії цілої низки хвороб очей. Не втрачає своєї актуальності й пошук нових ефективних фармакологічних агентів, дія яких спрямована на пригнічення надмірної неоваскуляризації сітківки. У представленій роботі досліджували ефекти інгібіторів ензиму PARP-1 на утворення інгібіторів росту судин – ангіостатинів. PARP-1 є репаративним ензимом, який активується одноланцюговими розривами в молекулі ДНК з подальшим відновленням її цілісності, що необхідно для репарації та підтримання цілісності геному в клітинах евкаріотів. Однак, надактивація PARP-1 може мати негативний вплив на виживання клітин, спричинюючи проапоптотичні та пронекротичні ефекти й спричинювати партонатос, що асоційовано з розвитком різних патологічних станів [371]. Залучення ензиматичної системи полі(ADP)рибозилювання протеїнів до розвитку діабетичної ретинопатії схематично зображено на рисунку 3.62.

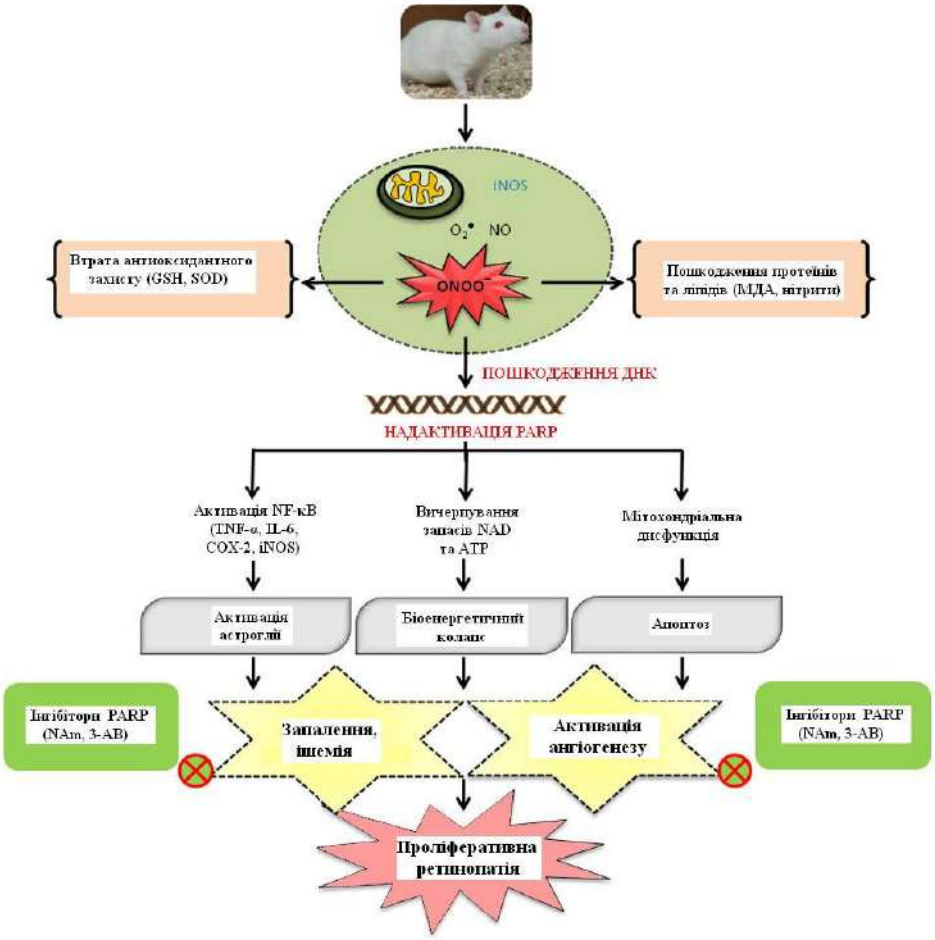

Рис. 3.62 – Роль надактивації PARP у розвитку діабетичної ретинопатії.

Препарати, створені на платформі інгібіторів PARP розглядаються як перспективні терапевтичні або профілактичні засоби для лікування різних патологічних станів, асоційованих з аберантним ангіогенезом. Повідомлення останніх років свідчать, що інгібітори PARP володіють антиангіогенними властивостями й чинять сприятливі ефекти щодо нормалізації ангіогенезу та зменшення ступеня пошкодження тканини сітківки за гіпоксії [333]. У науковій літературі наразі не існує даних стосовно взаємозв'язку між інгібуванням PARP та змінами рівнів ангіостатинів у сітківці ока. Отже, у дисертаційній роботі вперше представлено експериментальні докази протекторного впливу інгібіторів PARP-1, а саме, 3-AB та NAm, на стан ретинальної астроглії та покращення антиангіогенного статусу завдяки модулюванню вмісту ангіостатинів у сітківці ока щурів з експериментальною гіперглікемією.

Згідно з даними, опублікованими Kim et al. [322], PARP-1 бере участь у регулюванні загибелі нейронів та астроцитів, а також у розвитку реактивного гліозу. Отримані результати підтверджують концепцію зв'язку між надактивацією/надекспресією PARP-1 та розвитком реактивного астроцитозу. На підставі результатів імуноблоту та імуногістохімічного визначення GFAP встановлено, що зменшення ступеня гліальної реактивності в сітківці асоціюється з пригніченням активності/експресії PARP-1. Результати імуноблоту вочевидь демонструють, що гіперглікемія спричинила достовірне зниження рівнів обох ізоформ ангіостатинів у сітківці ока, тоді як інгібітори PARP-1 сприяли підвищенню рівнів ангіостатинів практично до контрольної величини. Результати нашого дослідження підтверджують, принаймні частково, результати низки досліджень, в яких внутрішньоочне введення ангіостатину застосовували з метою інгібування патологічної неоваскуляризації сітківки [73]. Хоча у представленому дослідженні ми не зосереджувались на визначенні експресії VEGF у сітківках, результати попередньої роботи [460] демонструють, що інгібування PARP-1 запобігало підсиленню синтезу VEGF у сітківці за умов діабету та гіпоксії, що може становити багатообіцяючу стратегію,

спрямовану на запобігання ангіогенного дисбалансу за діабетичної ретинопатії. Більше того, результати, отримані у представленій роботі, надають перші докази того, що пригнічення активності PARP-1 має більш складні наслідки для балансу регуляторів ангіогенезу в сітківці, впливаючи не лише на експресію факторів росту та цитокінів, але й модулюючи продукцію ендогенних ангіостатиків.

У дисертаційному дослідженні досліджували ефекти двох супресорів PARP-1, а саме, NAm і 3-AB. Отримані результати узгоджуються з даними, опублікованими раніше, які демонструють, що інгібування PARP-1 протидіє численним проявам периферичної нейропатії та ниркової гіпертрофії у мишей з експериментальним цукровим діабетом [169]. Ефекти NAm – антагоніста PARP-1 природного походження – виявились більш вираженими у порівнянні з ефектами 3-AB. На відміну від 3-AB, NAm здатний проявляти протекторні ефекти за стану хронічної гіперглікемії завдяки плейотропним механізмам, які виходять за межі безпосереднього інгібування PARP-1. Відомо, що нікотинамід виконує основні функції завдяки комплексному впливу відповідного вітаміну або його метаболітів [635], включаючи пригнічення генерації внутрішньоклітинних АФО й надходження Ca^{2+} до клітини, та чинить антиапоптотичні й цитопротекторні ефекти [557]. У контексті результатів наших досліджень, можна припустити, що NAm може нормалізувати пул NAD^{+} у тканині сітківки, зменшуючи ступінь мітохондрійної дисфункції та захищаючи клітини сітківки від загибелі, тим самим відновлюючи нормальну функцію клітин, що конститутивно продукують антиангіогенні регулятори [53]. Більше того, антидіабетична ефективність NAm також може бути пов'язана з утворенням та кращою доступністю 1-метилнікотинаміду – ендогенного продукту метилювання нікотинаміду, завдяки його здатності послаблювати розвиток ускладнень цукрового діабету в ЦНС, як описано у попередніх роботах [338]. 3-AB є синтетичним інгібітором PARP-1 першого покоління, який не демонструє плейотропних фізіологічних ефектів. Тим не менш, було встановлено, що 3-

АВ пригнічує пошкодження сітківки ока щурів, спричинене N-метил-N-нітрозосечовиною, і демонструє потужні антиапоптотичні властивості по відношенню до клітин фоторецепторів через збереження активності NF-κB [430]. Слід зазначити, що інші процеси, крім тих, що були розглянуті у представленому дослідженні, можуть впливати на цитопротекторні ефекти 3-АВ і NAm, і, перш за все, їхня потужна антиоксидантна активність [294].

Підводячи підсумок підрозділу роботи, слід зазначити, що стан гіперглікемії порушує здатність клітин сітківки продукувати протеїни-ангіостатини, які були вперше ідентифіковані нами як фрагменти плазміногену K1-4 та K1-5. Ключові результати цього дослідження наближають нас до розуміння функціональних взаємодій між процесами, асоційованими з PARP, реактивним гліозом та ангіогенезом за розвитку діабетичної ретинопатії. Вперше показано, що інгібітори PARP-1 (3-АВ та NAm) чинять захисні ефекти, сприяючи відновленню рівнів цих ендогенних ангіостатиків, які можуть бути залученими до пригнічення надмірного ангіогенезу. Таким чином, модулювання функціональної активності ретиноглії через пригнічення проапоптотичного сигналінгу за допомогою інгібування PARP-1 може бути механізмом нормалізації ангіогенного балансу в сітківці ока за гіперглікемії завдяки відновленню рівнів ангіостатинів.

3.3.2. Ангіостатини за серцево-судинних захворювань та їхньої фармакокорекції

Утворення колатерального кровообігу є необхідною умовою для відновлення кровопостачання тканин міокарду та головного мозку за гіпоксії, спричиненою ураженням коронарних судин за ІХС та інсультів. Як відомо, інгібування реваскуляризації відбувається через гальмування локального ангіогенезу [59, 574]. Раніше було показано, що рівні циркулюючого ангіостатину відображають інтенсивність його утворення в тканинах за

деяких патологічних процесів, пов’язаних, насамперед, з пухлинним ростом, запаленням та розвитком автоімунних хвороб [222, 317, 331]. У дисертаційній роботі вперше доведено залучення ангіостатинів до механізмів реалізації фармакодинамічних ефектів препаратів кардіопротекторної та нейропротекторної дії.

3.3.2.1. Визначення ангіостатинів у сироватці крові пацієнтів з ішемічною хворобою серця за терапії з використанням симвастатину

Типовий результат імуноблотингу зразків сироватки хворих на ІХС до та після статинової терапії наведено на рисунку 3.63. На блотограмах зразків сироватки було виявлено мажорну поліпептидну зону з M_m ~ 50 кДа, що відповідає ангіостатину – фрагменту плазміногену К1-4,5.

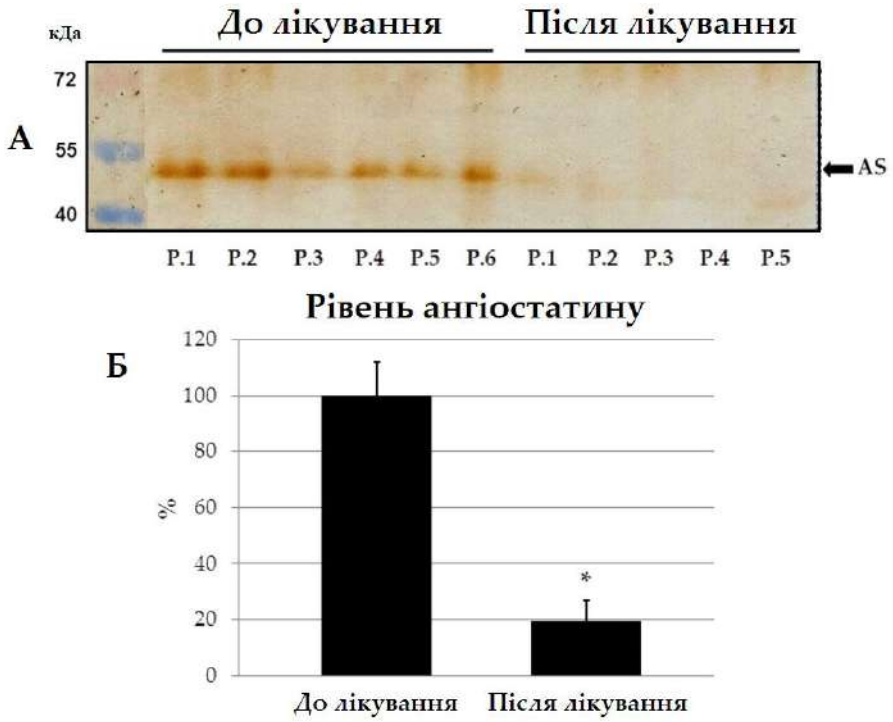

Рисунок 3.63 – Вплив симвастатину на рівень ангіостатину (AS) у сироватці крові пацієнтів з ішемічною хворобою серця (ІХС): А – типова блотограма зразків сироватки; Б – результати денситометричного аналізу блотограм (* – Р < 0,05 порівняно з базальною величиною до лікування (n = 26, парний *t*-критерій Ст’юдента).

У сироватці крові пацієнтів, що проходили курс статинової терапії, спостерігалося істотне зниження рівня ангіостатину. За даними денситометричного аналізу блотограм рівень ангіостатину в сироватці крові хворих після курсу лікування статиновим препаратом зменшився, в середньому, в 5 разів у порівнянні з цим показником у тих самих пацієнтів до початку терапії.

Результати біохімічних тестів, наведені у таблиці 3.3, дозволяють стверджувати, що курс лікування симвастатином позитивно вплинув на вміст найголовніших показників ліпідного обміну, а також сприяв істотному зменшенню вмісту маркеру запалення (CRP) у сироватці крові.

Таблиця 3.3

Вплив статинової терапії на деякі біохімічні показники в сироватці крові пацієнтів з ішемічною хворобою серця

(M ± m, n = 26, парний t-критерій Ст'юдента)

Параметр	До лікування	Після лікування	*P*
TC, *ммоль/л*	6,26 ± 0,16	4,33 ± 0,06	0,000001
VLDL-C, *ммоль/л*	0,77 ± 0,14	0,49 ± 0,04	0,327
LDL-C, *ммоль/л*	4,17 ± 0,14	2,41 ± 0,06	0,000001
HDL-C, *ммоль/л*	1,36 ± 0,06	1,43 ± 0,04	0,424
TG, *ммоль/л*	2,02 ± 0,35	1,09 ± 0,08	0,005
TG/HDL-C	1,80 ± 0,46	0,79 ± 0,07	0,031
CRP, *мг/л*	2,84 ± 0,35	1,93 ± 0,26	0,002

Примітка: TC – загальний холестерол, VLDL-C – холестерол ліпопротеїнів дуже низької щільності, LDL-C – холестерол ліпопротеїдів низької щільності, HDL-L – холестерол ліпопротеїнів високої щільності, TG – триацилгліцероли, CRP – С-реактивний протеїн.

Показано, що симвастатин сприяв статистично достовірному зниженню вмісту TC на 31%, LDL-C – 42%, TG – 46% та зменшенню співвідношення TG/HDL-C. Натомість, такі показники, як VLDL-C та HDL-C наприкінці лікування статистично не відрізнялися від своїх початкових величин. За даними Американської асоціації кардіологів, вміст CRP у крові, менший за 1 мг/л, свідчить про низьку ймовірність розвитку серцево-судинних захворювань, від 1,0 до 3,0 мг/л – діапазон середнього ризику, більше 3,0 г/л – характеризує групу з високим ризиком серцево-судинних ускладнень [478]. У представленому дослідженні встановлено, що тривалість курсової терапії (8 тижнів) симвастатином є достатньою для проявів протизапальних ефектів препарату, на що вказує зниження рівня чутливого маркеру неліпідної природи та предиктора серцево-судинних захворювань CRP на 32% у порівнянні з вихідною величиною ($P < 0,002$).

Результати кореляційного аналізу, наведені на рисунку 3.64, вказують на наявність щільного позитивного кореляційного зв'язку між змінами вмісту показників ліпідного обміну, маркера запалення та рівнем ангіостатину в сироватці крові хворих.

Відомо, що ангіостатини в низьких концентраціях циркулюють у крові клінічно здорових людей [575]. Окреслені перспективи кількісної оцінки пулу циркулюючих ангіостатинів за розвитку деяких злоякісних новоутворень як маркерів прогресії пухлинного росту та реактивації метастазування після хірургічного видалення первинної пухлини [479]. Однак, на сьогодні можливість використання ангіостатинів як маркерів інших патологічних станів, зокрема, атеросклерозу та його ускладнень, визначена вкрай недостатньо. Розвиток серцево-судинних хвороб, асоційованих з атеросклерозом, відбивається на загальному метаболізмі тканин та характеризується локальним дисбалансом про- та ангіогенних факторів у місті відкладання атеросклеротичної бляшки, що дає змогу припустити залучення ангіостатинів до патогенетичних механізмів [320].

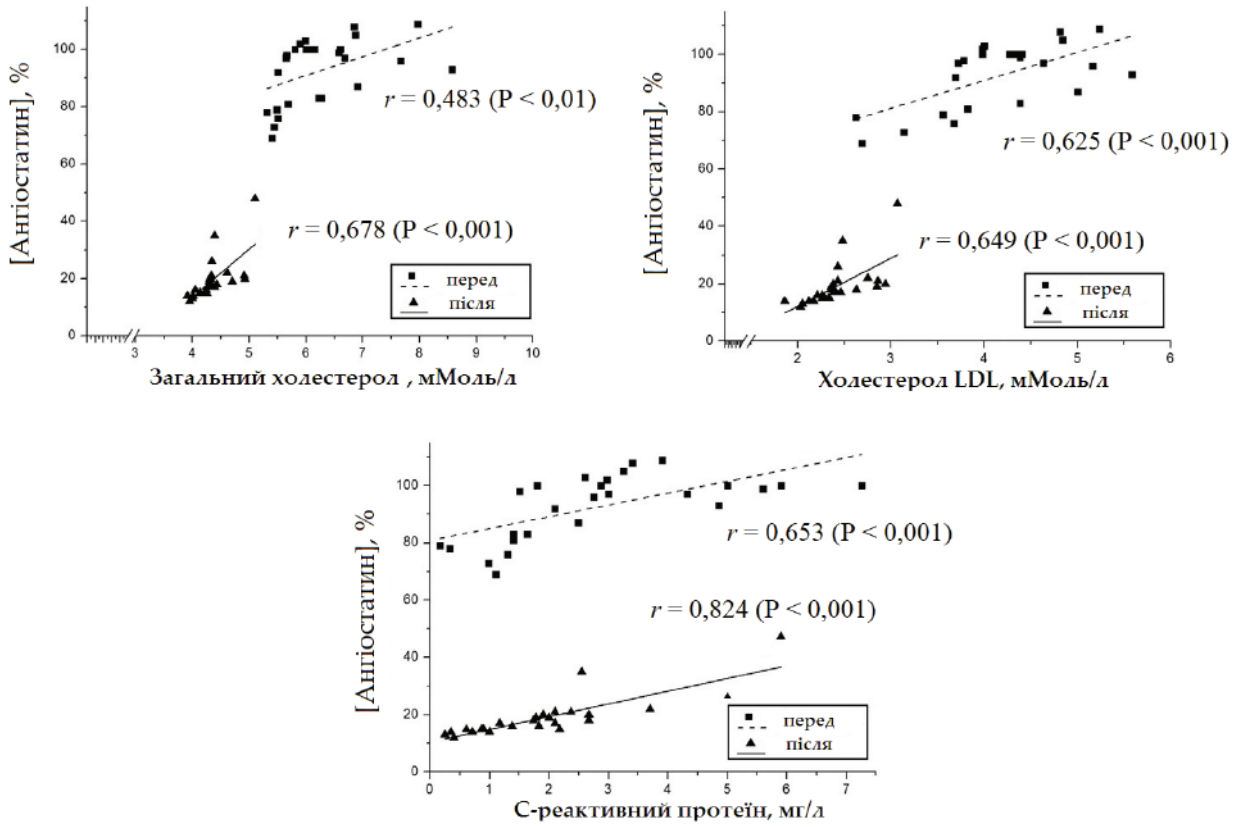

Рисунок 3.64 – Кореляційний зв’язок між рівнем ангіостатину, показниками ліпідного обміну та С-реактивного протеїну (CRP) в сироватці крові пацієнтів з ішемічною хворобою серця до та після лікування з використанням симвастатину (n = 26, коефіцієнт кореляції Пірсона *r*, статистична достовірність *r* прийнято при P < 0,05).

У дисертаційній роботі вперше продемонстровано й описано новий плейотропний ефект препарату групи статинів (симвастатину), який полягає в його здатності сприяти зменшенню рівня ангіостатину в крові пацієнтів з ІХС. Надпродукція ангіостатинів у тканинах таких хворих може бути наслідком активації протеолітичних систем, що супроводжується інтенсивною деградацією плазміногену міжклітинного матриксу. Можна припустити, що деструктивні процеси в міокарді, стінці аорти та ділянках пошкодження судин є головними джерелами надходження ангіостатину до системного кровообігу. Схожі спостереження були зроблені авторами [574],

які спостерігали зростання рівня ангіостатину в тканинах міокарду та стінках аорти за ішемії, спричиненою експериментально індукованою гіперглікемією. Ними доведено, що патофізіологічне значення цього феномену полягає в гальмуванні утворення судинних колатералей та реваскуляризації, що унеможливлює відновлення кровопостачання в пошкодженій тканині. Можливо, що однією з причин покращення функції ендотелію статинами є зменшення ступеня ішемізації серцевого м'язу та нормалізація балансу регуляторів ангіогенезу за рахунок зниження продукції ангіостатичних факторів.

Не виключено також, що робити внесок до підвищення рівня ангіостатинів за ускладнень атеросклерозу можуть прозапальні клітини. Показано, що макрофаги, які рекрутуються до ділянки запалення, індукованого відкладанням атеросклеротичної бляшки, розщеплюють компоненти ЕЦМ фіброзної тканини завдяки роботі власних металопротеїназ, зокрема металоеластази. Автори дослідження [448] встановили, що ангіостатини, які утворюються в пошкодженій ділянці судини, інгібують запальний процес та пригнічують міграцію макрофагів до атероми за механізмом негативного зворотного зв'язку. Такий механізм утворення ангіостатинів за атеросклерозу може розглядатися як реакція, спрямована на компенсацію пошкодження судини.

Запалення відіграє одну з провідних ролей в атерогенезі та патогенезі судинних ускладнень атеросклерозу. Прозапальні клітини залучаються до формування як самої атеросклеротичної бляшки, так і пошкодження стабільної атероми з наступною тромботичною оклюзією та розвитком подальших серцево-судинних подій. Гострота запального процесу за атеросклерозу посилюється за рахунок активної інфільтрації (хемотаксису) до тканин циркулюючих моноцитів та нейтрофілів (функціональних фагоцитів) [120]. Відомо, що протизапальні властивості статинів є одним з факторів, що пояснюють їхній виражений позитивний вплив на клінічний перебіг та прогноз атеросклеротичного ураження судин, ризик розвитку

інфаркту міокарду, інсульту головного мозку та пошкодження периферичних артерій. Симвастатин може сприяти зниженню рівня ангіостатину, пригнічуючи активність металопротеїназ макрофагів та клітин гладеньких м'язів, що їх продукують [396].

У представленому дослідженні визначення рівня CRP, який відноситься до гострофазових протеїнів, використовувалося для оцінки перебігу запального процесу в хворих на ІХС та ефективності його корекції дисліпідемії за допомогою симвастатину. Встановлений щільний статистично достовірний кореляційний зв'язок між вмістом CRP та ангіостатину (r = 0,653 та 0,8244 перед та після статинової терапії відповідно, $P < 0,001$) надає можливість припустити, що гальмування запальних процесів супроводжується зниженням інтенсивності продукування ангіостатину в тканинах, що відповідним чином відбивається на рівні цього протеїну в крові. Наразі зустрічаються лише нечисленні дані про кількісні зміни ангіостатинів у крові хворих на деякі розлади, які супроводжуються розвитком автоімунної реакції та запальних процесів. Зростання рівня сироваткового ангіостатину продемонстровано у пацієнтів з хворобою Бехчета [317], ревматоїдним артритом [600] та гострим запаленням нирок [63]. Отже, результати, отримані у представленій роботі, суттєво розширюють уявлення про залучення біологічно активних фрагментів плазміногену до патофізіологічних механізмів розвитку атеросклеротичних ускладнень.

До генерації ангіостатинів в організмі можуть долучатися також й тромбоцити, як це показано у п. 3.1 дисертаційної роботи. Jurasz та ін. [306] встановили, що тромбоцити володіють здатністю утворювати ангіостатини, інтерналізувати їх та вивільняти в ході секреції. Відомо, що при запаленні за атеросклерозу має місце адгезія та фіксація тромбоцитів на базальній мембрані пошкодженого ендотелію судин [458]. Згідно з цими даними не можна виключати, що активація тромбоцитів стимулює утворення ангіостатинів через протеолітичне розщеплення плазміногену, асоційованого з плазматичною мембраною. У літературі описано прямі та непрямі

антитромботичні ефекти статинів, що реалізуються через нормалізацію цими препаратами утворення тромбіну в пацієнтів з гіперхолестеролемією, зміни вмісту холестеролу в тромбоцитарних мембранах, інгібування утворення власно тромбоцитів з мегакаріоцитів [440, 599]. Можна припустити, що модулювання активності тромбоцитів за умов курсового лікування статинами пацієнтів з ІХС може представляти собою один з процесів, залучених до регулювання утворення ангіостатинів в організмі. У підсумку, на підставі отриманих результатів проведеного дослідження та даних, наведених у літературі, нами було запропоновано гіпотетичну схему основних шляхів генерації ангіостатинів за ІХС та дисліпідемії, які можуть бути мішенями симвастатину (рис. 3.65). Отже, оскільки нормалізація показників загального обміну ліпідів внаслідок дії симвастатину відбувається паралельно зі зменшенням вмісту маркеру запалення CRP та зниженням рівня ангіостатину в сироватці крові пацієнтів з ІХС, то ангіостатин потенційно можна розглядати як додатковий маркер ефективності ліпідознижувальної терапії.

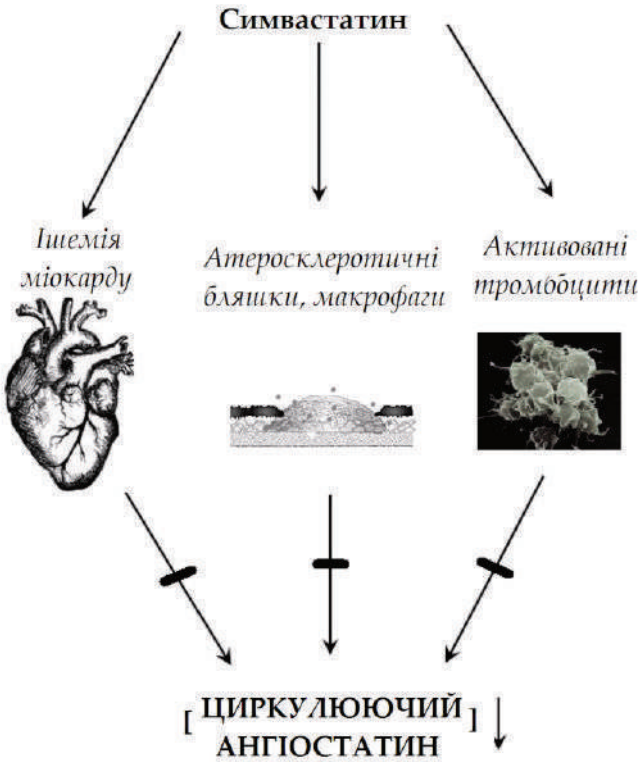

Рисунок 3.65 – Вплив симвастатину на основні шляхи утворення ангіостатинів: гіпотетична схема [616].

3.3.2.2. Вплив L-аргініну на вміст регуляторів ангіогенезу та активність ММР у крові пацієнтів з хронічною серцевою недостатністю та ішемічною хворобою серця (ІХС)

Завданням запланованих досліджень, результати яких увійшли до представленого підрозділу, було визначити рівні основних регуляторів ангіогенезу (ангіостатинів та VEGF), продуктів деградації фібронектину та активності ММР-2 та -9 у сироватці крові пацієнтів з ішемічною хворобою серця (ІХС) на фоні хронічної серцевої недостатності (ХСН) за їхнього лікування з використанням L-аргініну (препарат «Тівортін»).

У таблиці 3.4 наведено результати визначення клінічних та біохімічних показників у сироватці крові пацієнтів з ІХС та ХСН, які проходили курс лікування з використанням L-аргініну (основна група) або отримували курс стандартної терапії. Не було показано достовірної різниці між базальним та кінцевим значенням усіх показників в обох групах, що свідчить про відсутність побічних ефектів використання препарату. Єдине виключення становив CRP, у випадку якого спостерігалася виражена тенденція до зниження вмісту в сироватці крові після лікування із застосуванням «Тівортіну» (з 5,1 ± 2,78 до 3,5 ± 2,48 мкг/л, P = 0,05). Натомість істотних кількісних змін зазнав профіль ангіогенних регуляторів (VEGF та ангіостатину) в сироватці крові пацієнтів після лікування із застосуванням L-аргініну. В основній групі рівень VEGF після лікування препаратом «Тівортін» виявився достовірно вищим за базальний вміст фактору (319 ± 26,4 проти 509 ± 53,1 у.о., P < 0,01) (рис. 3.66). У групі порівняння, пацієнти якої проходили лікування за стандартним протоколом, достовірної різниці між рівнями VEGF не спостерігалося (321 ± 27,1 проти 330 ± 19,4 у.о., P > 0,05). Разом із зростанням рівнів VEGF, лікування з використанням L-аргініну могло позитивно позначатися на проангіогенному статусі пацієнтів з КХС та ХСН завдяки пригніченню утворення інгібіторів росту судин ангіостатинів.

Таблиця 3.4

Лабораторні та біохімічні показники у сироватці крові пацієнтів основної (n = 20) та контрольної (n = 13) груп (M ± m, парний t-критерій Ст'юдента)

Параметри	Контрольна група (n=13)		Основна група (лікування L-аргініном) (n=20)	
	До лікування	Після лікування	До лікування	Після лікування
Систолічний кров'яний тиск, мм Hg	135,7±4,35	135±55,00	139,4±18,10	127,5±17,50
Діастолічний кров'яний тиск, мм Hg	88,2±8,15	87,5±12,50	84,2±5,80	82,5±17,50
Білі клітини крові, клітини/мкл	6,8 ± 2,21	6,3 ± 1,86	7,0 ± 1,79	6,3 ± 1,51
Швидкість осідання еритроцитів, мм/год.	8,3 ± 6,64	7,0 ± 5,37	7,2 ± 4,26	5,2 ± 3,51
Глюкоза, мМ/л	5,2±0,20	4,9±0,70	5,3±0,25	5,4±1,20
Холестерол, мМ/л	4,87±1,17	5,13±1,73	5,60±1,90	4,92±1,93
Тригліцериди, мМ/л	1,15±0,25	1,57±0,70	1,55±0,45	1,62±0,52
С-реактивний протеїн, мг/л	6,1 ± 3,21	5,3 ± 3,06	5,1 ± 2,78	3,5 ± 2,48 *

Примітка: * – P = 0.05 (парний *t*-тест).

На рисунку 3.67 наведено результати імунохімічної детекції ангіостатину в сироватці крові, які свідчать про статистично достовірне зниження вмісту цього супресору ангіогенезу в системному кровотоці після курсового прийому L-аргініну пацієнтами основної групи (363 ± 70,5 проти 285 ± 61,2 у.о., P < 0,05). На противагу цьому, в пацієнтів контрольної групи, що проходили курс стандартного лікування, вміст ангіостатину залишився на сталому рівні (310 ± 68,6 проти 330 ± 48,1 у.о., P > 0,05).

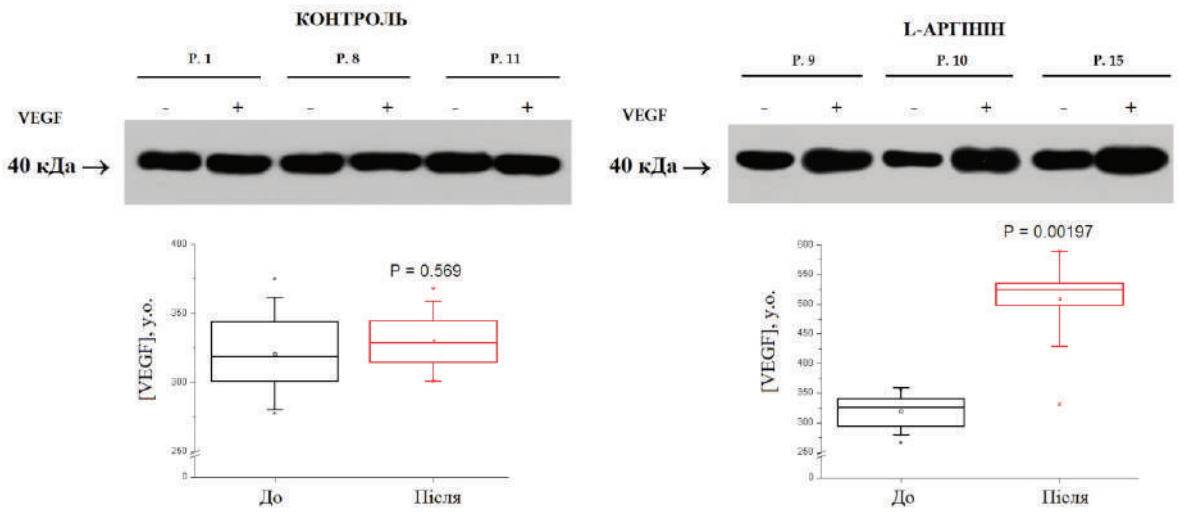

Рисунок 3.66 – Рівень VEGF у сироватці крові пацієнтів з ішемічною хворобою серця (ІХС) на фоні хронічної серцевої недостатності (ХСН), які проходили курс терапії із застосуванням L-аргініну (n = 20) та пацієнтів контрольної групи (n = 13): типовий результат імуноблот-аналізу (парний *t*-тест Ст'юдента, P < 0,05 порівняно з величиною до лікування прийнято за статистично достовірний). Позначення: - до лікування, + - після лікування; у.о. – умовні одиниці.

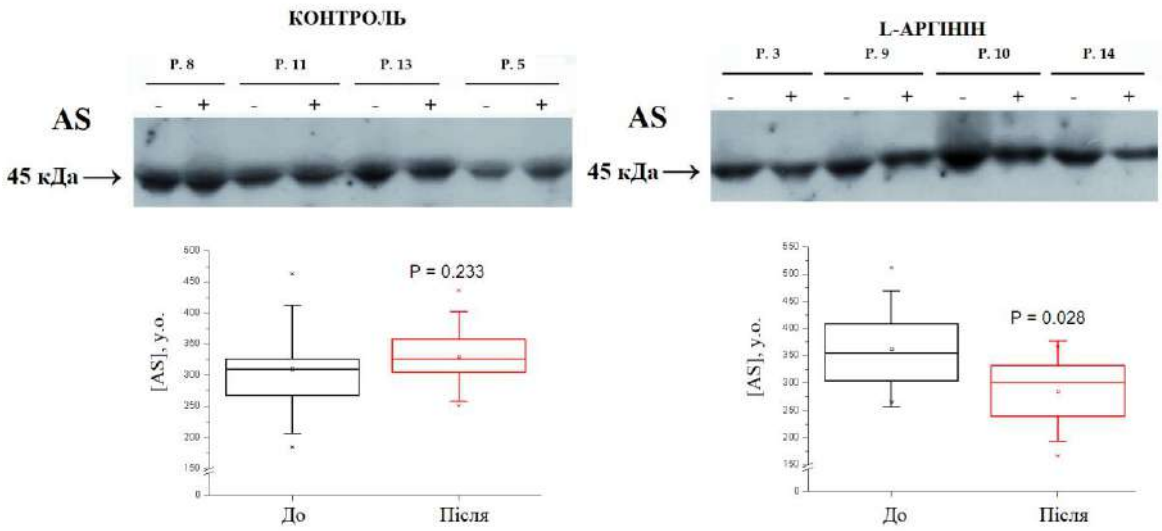

Рисунок 3.67 – Рівень ангіостатину (AS) в сироватці крові пацієнтів з ішемічною хворобою серця (ІХС) на фоні хронічної серцевої недостатності (ХСН), які проходили курс терапії із застосуванням L-аргініну (n = 20) та пацієнтів контрольної групи (n = 13): типовий результат імуноблот-аналізу (парний *t*-тест Ст'юдента, P < 0,05 порівняно з величиною до лікування прийнято за статистично достовірний). Позначення: - до лікування, + - після лікування; у.о. – умовні одиниці.

У сироватці крові пацієнтів обох груп було виявлено значну кількість імунореактивних поліпептидів у діапазоні M_m 135-35 кДа, що відповідають інтактній субодиниці фібронектину та продуктам його деградації (рис. 3.68). Слід зазначити, що після курсу лікування із застосуванням «Тівортіну» рівень деградованих поліпептидів фібронектину виявився значно нижчим за базальний показник (644 ± 254 проти 446 ± 186 у.о., P < 0,05). У сироватці крові пацієнтів контрольної групи після курсу стандартного лікування вміст продуктів деградації фібронектину залишився на високому рівні (606 ± 165 проти 578 ± 120 у.о., P > 0,05).

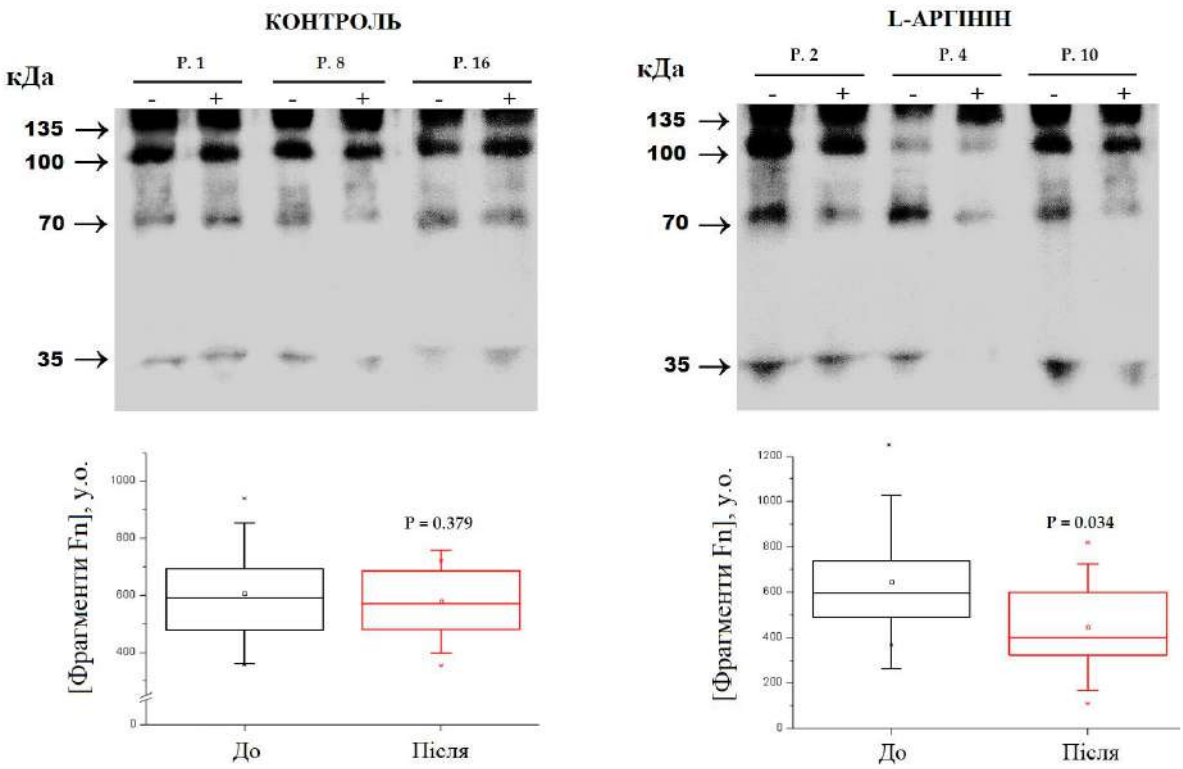

Рисунок 3.68 – Рівень фібронектину (Fn) та його фрагментів у сироватці крові пацієнтів з ішемічною хворобою серця (ІХС) на фоні хронічної серцевої недостатності (ХСН), які проходили курс терапії із застосуванням L-аргініну (n = 20) та пацієнтів контрольної групи (n = 13): типовий результат імуноблот-аналізу (парний *t*-тест Ст'юдента, P < 0,05 порівняно з величиною до лікування прийнято за статистично достовірний). Позначення: - до лікування, + - після лікування; у.о. – умовні одиниці.

За допомогою желатинової зимографії, результати якої наведено на рисунку 3.69, було показано наявність двох основних зон активних колагенолітичних протеїназ з M_m 70 та 90 кДа, які відповідають ММР-2 та -9. Результати денситометричного аналізу свідчать, що в контрольній групі була відсутня різниця між базальним значення активності обох желатиназ та кінцевою величиною (ММР-2: 66,9 ± 14,1 проти 65,2 ± 14,4 у.о., P > 0,05; ММР-9: 175 ± 5,8 проти 169 ± 12,1 у.о., P > 0,05).

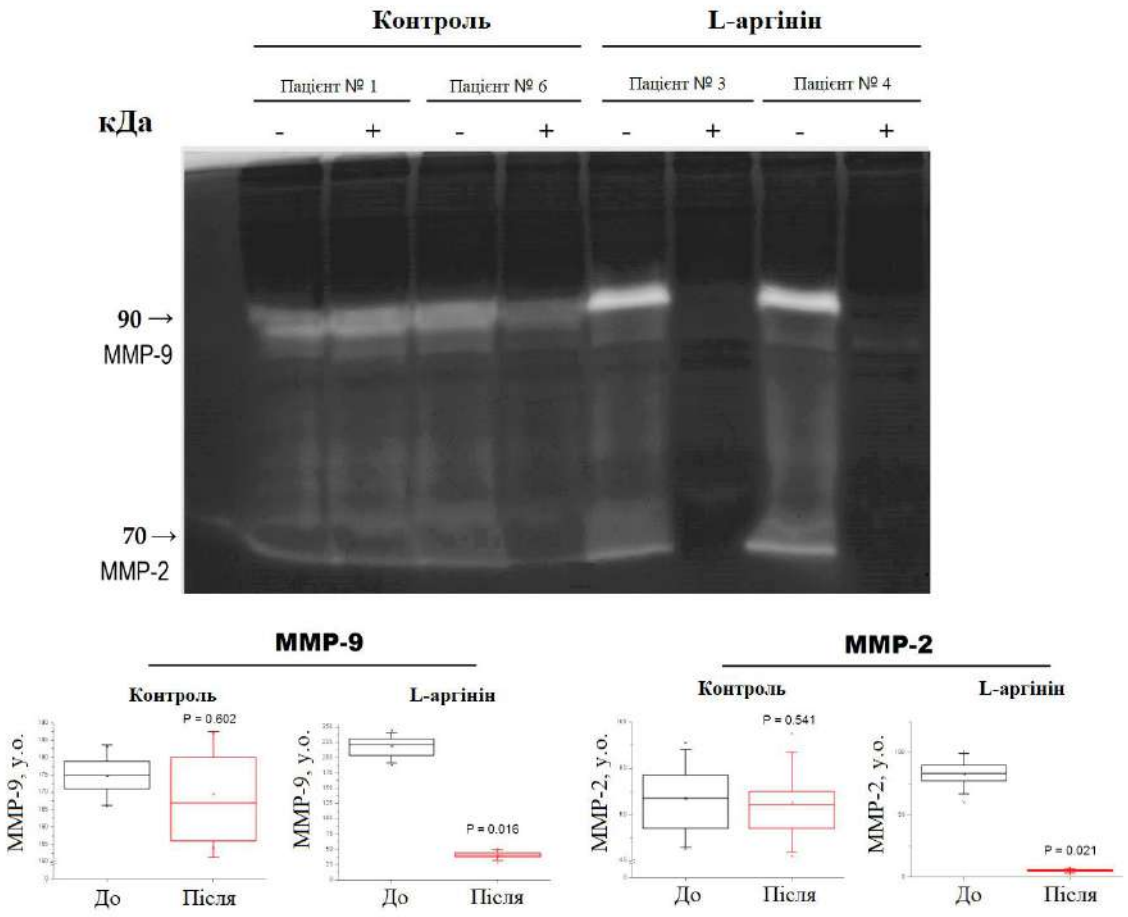

Рисунок 3.69 – Активність матриксних металопротеїназ (ММР) у сироватці крові пацієнтів з ішемічною хворобою серця (ІХС) на фоні хронічної серцевої недостатності (ХСН), які проходили курс терапії із застосуванням L-аргініну (n = 20) та пацієнтів контрольної групи (n = 13): типовий результат желатинової зимографії (парний *t*-тест Ст'юдента, P < 0,05 порівняно з величиною до лікування прийнято за статистично достовірний). Позначення: - до лікування, + - після лікування; у.о. – умовні одиниці.

Натомість, у пацієнтів після курсового прийому «Тівортіну» спостерігалося істотне зниження рівнів активних ММР у сироватці крові. Так, прийом L-аргініну сприяв достовірному зниженню рівня активної ММР-2 (з 83,1 ± 10,8 до 5,3 ± 1,16 у.о., $P < 0,05$). Для пацієнтів основної групи було показано зменшення активності ММР-9 у 5,5 разів після курсу лікування «Тівортіном» у порівнянні з базальною величиною активності цієї желатинази (з 218 ± 16,4 до 40 ± 5,7 у.о., $P < 0,05$).

L-аргінін є напівзамінною амінокислотою, яка відіграє ключову роль у функціонуванні ендотелію судин, слугуючи єдиним субстратом для синтезу NO [613]. Добова норма споживання L-аргініну для дорослої людини становить 2,5 – 5 г (60% від загальної кількості амінокислоти метаболізується у шлунково-кишковому тракті, 40% потрапляє до системного кровотоку), концентрація в плазмі за норми – 80-120 мкМ, внутрішньоклітинна концентрація – 1мМ. У представленому дослідженні доза препарату була обрана на підставі попередніх клінічних спостережень лікувальної дії L-аргініну у пацієнтів з гіпертензією та ревматоїдним артритом [343]. Kamada та ін. [308] вперше продемонстрували, що екзогенне надходження L-аргініну чинить позитивні ефекти на функціонування серцево-судинної системи. Відомо, що ІХС є результатом багатовекторних змін метаболізму, асоційованих з порушеннями ліпідного профілю, системи гемостазу та тромбогенними подіями, які призводять до ендотелійної дисфункції та запалення. Результати, отримані у представленій роботі, вказують на пригнічення запальних процесів у пацієнтів, яким призначали L-аргінін-вмісний препарат у доповнення до стандартної терапії. Наші дані узгоджуються зі спостереженнями інших авторів [77], які продемонстрували, що L-аргінін чинить протизапальну дію за м’язової дистрофії та стенокардії (*angina pectoris*). Припускається, що L-аргінін впливає на NF-κB-опосередковані сигнальні шляхи, проявляючи антиапоптотичні властивості, захищає цілісність плазматичних мембран та чинить цитопротекторні ефекти. Слід зауважити, що інгібування експресії ядерного фактору κB за

умов надходження екзогенного L-аргініну призводить до пригнічення синтезу MMP-2 та -9, експресія яких активується на транскрипційному рівні саме NF-κB. Крім того, L-аргінін зменшує рівень секреції макрофагами та іншими прозапальними клітинами таких прозапальних медіаторів, як IL-1β, IL-6 та TNF-α [271].

Активація репаративного ангоігенезу відіграє ключову роль у відновленні кровопостачання до ішемізованої ділянки серцевого м'язу [571]. Отже, реваскуляризація ішемізованої ділянки міокарду вважається найбільш ефективною терапевтичною стратегією, спрямованою на відновлення забезпечення серцевого м'язу киснем після ішемічних подій або інфаркту. Відомо, що деякі ростові фактори, зокрема, VEGF, є ефективними агентами, які стимулюють реваскуляризацію та покращують прогноз за різних ССЗ. Тривають розробки фармакологічних підходів, спрямованих на індукцію утворення ендогенного VEGF [27, 149]. Спираючись на дані про те, що підсилення біодоступності NO індукує синтез VEGF *in vitro* та *in vivo* [177, 365], ми висунули гіпотезу, що додаткове надходження донору NO, L-аргініну, може мати позитивний вплив на утворення ендогенного VEGF. Отримані результати узгоджуються з даними попередніх досліджень Matsunaga та ін. [415], які встановили зв'язок між метаболізмом NO та синтезом VEGF. Було показано, що експресія VEGF залежить від утворення NO та є обов'язковою умовою для формування коронарної колатеральної циркуляції як компенсаторна відповідь на ішемію серцевого м'язу. Більш того, Fiorito та ін. [199] встановили, що L-аргінін демонструє цитопротекторну активність по відношенню до циркулюючих попередників ендотелійних клітин саме через стимулювання секреції VEGF.

На відміну від даних щодо ефектів L-аргініну на утворення активаторів ангіогенезу, в науковій літературі зустрічаються лише поодинокі відомості стосовно впливу L-аргініну на рівень антиангіогенних регуляторів, зокрема, ангіостатинів. Ranjbar та ін. [508] встановили, що введення L-аргініну та аеробне фізичне навантаження інгібувало утворення ангіостатину в

серцевому м’язі щурів з експериментальним інфарктом міокарду. Зростання локального вмісту ангіостатинів відбувається за рахунок активації протеолітичних систем, які здійснюють обмежений протеоліз плазмін(оген)у, та негативно асоціюється з реваскуляризацією ішемізованої тканини [416]. Крім безпосередньої інгібувальної дії на проліферативну та міграційну активність ендотеліоцитів, ангіостатин пригнічує проангіогенне сигналювання через супресію синтезу VEGF [114, 124]. Надмірне утворення ангіостатину зменшує ступінь перфузії, залежної від утворення колатералей, у моделі коронарної оклюзії у собак [648]. Boodhwani та ін. [80] показали підсилення продукування ангіостатину в тканині міокарду свинок з експериментальною гіперглікемією, розвиток якої супроводжувався ішемією й порушенням коронарного ангіогенезу. Слід зазначити, що ангіостатини впливають на механізми активації eNOS, призводячи до порушення залежної від ендотелію вазодилятації через надмірне утворення синтазою супероксиданіон-радикалу замість NO, зменшуючи таким чином біодоступність останнього [330]. На важливу роль NO у патофізіологічних процесах за участі ангіостатинів вказують дані про їхнє підсилене генерування за умов ішемії на фоні супресії синтезу NO навіть за присутності високих кількостей VEGF [416].

Встановлені зміни рівня ангіостатину в пацієнтів з ІХС, викликані L-аргініном, можна пояснити тим, що NO є потужним ендогенним інгібітором MMP [178], які відповідають за утворення ангіостатину. У дослідженні Dodd та ін. [159] показано, що MMP є головними регуляторами кількості ангіостатинів, які утворюються за метаболічного синдрому: утворення ангіостатинів повністю припинялося за фармакологічного блокування активності цих протеїназ. Припускається, що зростання активності MMP у тканині стінок судин, яке має місце за цукрового діабету, гіпертензії та багатьох інших ССЗ, є головною причиною підсиленого утворенням ангіостатинів з плазміногену. Ця обставина, в свою чергу, негативно впливає на активність eNOS та утворення/секрецію VEGF, порушуючи вазодилятацію

та неоваскуляризацію [330]. Слід зазначити, що протеолітичні ензими іншого походження, такі як ММР макрофагального походження, еластаза нейтрофілів, протеїнази деяких прозапальних клітин, також беруть участь в утворенні ангіостатинів [543]. Не виключено, що L-аргінін здатний пригнічувати утворення ангіостатину цими клітинами, інгібуючи їхню фізіологічну активність. Це припущення підтверджують дані авторів роботи [457], які встановили, що введення L-аргініну пацієнтам після балонної ангіопластики послаблювало адгезивні властивості моноцитів та індукувало апоптоз резидентних макрофагів. Отримані в дисертаційному дослідженні дані вказують на можливість визначення рівня циркулюючого ангіостатину не лише як маркеру розвитку патологічних станів, асоційованих з ангіопатіями, але й як показника ефективності терапії ІХС.

Відомо, що деградація позаклітинного матриксу ММР є важливою патогенетичною стадією розвитку різних ССЗ, таких як атеросклероз, кардіоміопатія, ХСН, інфаркт міокарду, аневризма аорти, стеноз мітрального клапану та інших [427]. Визначення активності ММР-2 та -9 у периферичній крові запропоновано використовувати як молекулярний показник ступеня тяжкості гострого коронарного синдрому та прогностичний біомаркер можливих серцево-судинних рецидивів [69, 215]. Молекулярний таргетинг ММР, що дозволяє модулювати активність цих протеїназ, розглядається як новий перспективний напрям корекції ІХС [580]. Було встановлено, що введення L-аргініну до раціону щурів з інсулінорезистентністю [443] та легеневою гіпертензією [646] сприяло значному зростанню рівня інгібітору ММР (TIMP-1), що призводило до пригнічення надлишкової активності цих ензимів. Garcia та ін. [213] описали подібні ефекти за внутрішньовенного введення L-аргініну пацієнтам з гіпертензією, спостерігаючи зменшення співвідношення ММР-9/TIMP-1. Результати ензим-форезу, наведені у нашому дослідженні, дозволяють припустити, що істотне зниження рівнів активних ММР-2 та -9 у сироватці крові в результаті лікування з використанням L-аргініну, може свідчити про зменшення ступеня деструкції

позаклітинного матриксу міокарду. На користь цього припущення вказує зниження рівня циркулюючих фрагментів фібронектину, які, як відомо, проявляють самостійну біологічну активність [204]. Отже, пригнічення активності ММР може бути одним з механізмів модулювання L-аргініном утворення ангіостатинів за ІХС на фоні ХСН. Отримані у роботі дані становлять підґрунтя для подальших досліджень механізмів залучення ангіостатинів до реалізації фармакологічної активності кардіопротекторних сполук з метою коригування патофізіологічних процесів у серцево-судинній системі.

3.3.2.3. Вплив цитіколіну на рівень ангіостатину в сироватці крові пацієнтів з гострим ішемічним інсультом та фібриляцією передсердь

Основним завданням запланованого дослідження було визначити вплив курсової терапії з використанням ноотропного препарату цитіколін (CDP-холін) на рівень ангіостатину та нервовоспецифічних протеїнів (GFAP і NF-H) у сироватці крові пацієнтів з фібриляцією передсердь та інсультом головного мозку.

Відновлювальна терапія постінсультних пацієнтів основної та контрольної груп не призвела до істотних змін основних фізіологічних та біохімічних показників за обраний період спостереження (табл. 3.5). Виключення становило зростання швидкості гломерулярної фільтрації, що спостерігалося в основній групі після курсового введення цитіколіну. На відміну від основних клінічних параметрів, вміст досліджуваних біомаркерів у сироватці крові зазнав статистично достовірних змін як результат цитіколінової терапії. Так, рівень обох нервовоспецифічних протеїнів, які визначалися в сироватці крові імуноблот-аналізом, істотно зменшився після курсової терапії з використанням цитіколіну.

Таблиця 3.5

Динаміка змін клінічних і лабораторних параметрів у пацієнтів з фібриляцією передсердь та інсультом головного мозку, які проходили курс лікування з використанням CDP-холіну (цитіколіну) (n = 33), та пацієнтів контрольної групи (n = 25) (M ± m, парний *t*-критерій Ст'юдента)

Контрольна група	**До лікування**	**Після лікування**	***P***
Гемоглобін, г/л	136,1±3,1	134,3±2,8	0,272
Тромбоцити, 10^{-9}	241,2±12,2	229,4±12,6	0,388
Аланінамінотрансфераза (ALT), IU/л	25,2±2,8	25,2±2,7	0,900
Аспартатамінотрансфераза (AST), IU/л	26,2±2,2	23,6±2,1	0,201
Білірубін, мкМ/л	24,4±7,0	24,9±7,3	0,551
Швидкість гломерулярної фільтрації (GFR), мл/хв.	74,6±3,4	74,4±3,7	0,451
Загальний холестерол, мкМ/л	4,3±0,3	4,9±0,3	0,170
Тригліцериди, мкМ/л	1,3±0,1	1,4±0,3	0,616
Глюкоза, мкМ/л	6,1±0,5	6,2±0,5	0,906
Основна група (цитіколін)	**До лікування**	**Після лікування**	***P***
Гемоглобін, г/л	134,2±2,9	135,4±2,8	0,097
Тромбоцити, 10^{-9}	217,3±10,1	222,4±11,7	0,387
Аланінамінотрансфераза (ALT), IU/л	18,8±1,6	18,3±1,9	0,577
Аспартатамінотрансфераза (AST), IU/л	23,2±2,3	22,4±2,4	0,142
Білірубін, мкМ/л	13,8±1,2	13,8±1,2	0,284
Швидкість гломерулярної фільтрації (GFR), мл/хв.	67,0±2,8	94,3±21,6	0,007
Загальний холестерол, мкМ/л	4,9±0,2	4,7±0,2	0,368
Тригліцериди, мкМ/л	1,8±0,3	1,5±0,2	0,107
Глюкоза, мкМ/л	6,1±0,4	7,0±0,6	0,223

Найбільш вираженим виявилося зниження рівня GFAP (на 61% у порівнянні з цією величиною до лікування, P < 0,01) (рис. 3.70). Результати імуноблотингу демонструють значну внутрішньогрупову варіабельність рівнів циркулюючого GFAP, що може бути наслідком різного ступеня пошкодження ГЕБ або інтенсивності астрогліальної відповіді.

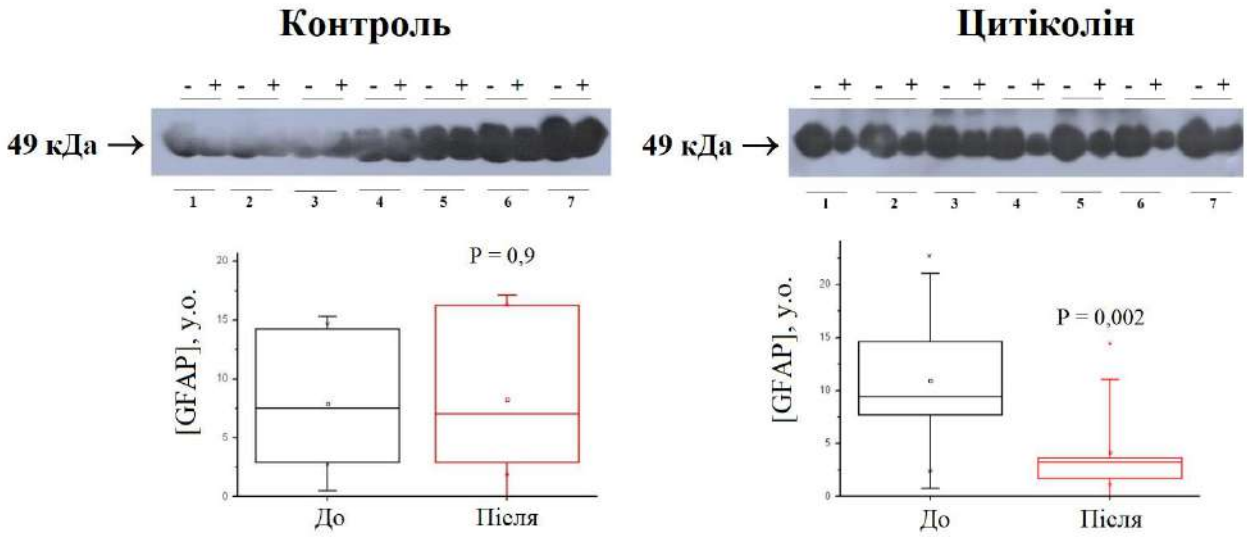

Рисунок 3.70 – Рівень гліального фібрилярного кислого протеїну (GFAP) у сироватці крові пацієнтів з гострим ішемічним інсультом та фібриляцією передсердь, які проходили курс терапії із застосуванням цитіколіну (CDP-холіну) (n = 33), та пацієнтів контрольної групи (n = 25): типовий результат імуноблот-аналізу (парний *t*-тест Ст'юдента, P < 0,05 порівняно з величиною до лікування прийнято за статистично достовірний). Позначення: - до лікування, + - після лікування; у.о. – умовні одиниці.

Зменшення рівня важкої субодиниці нейрофіламентів (NF-H) у сироватці крові постінсультних пацієнтів, які отримували цитіколін протягом періоду відновлювальної терапії, було менш вираженим, ніж у випадку GFAP, але тим не менш, було статистично достовірним (на 19% у порівнянні з рівнем протеїну до лікування, P < 0,05) (рис. 3.71).

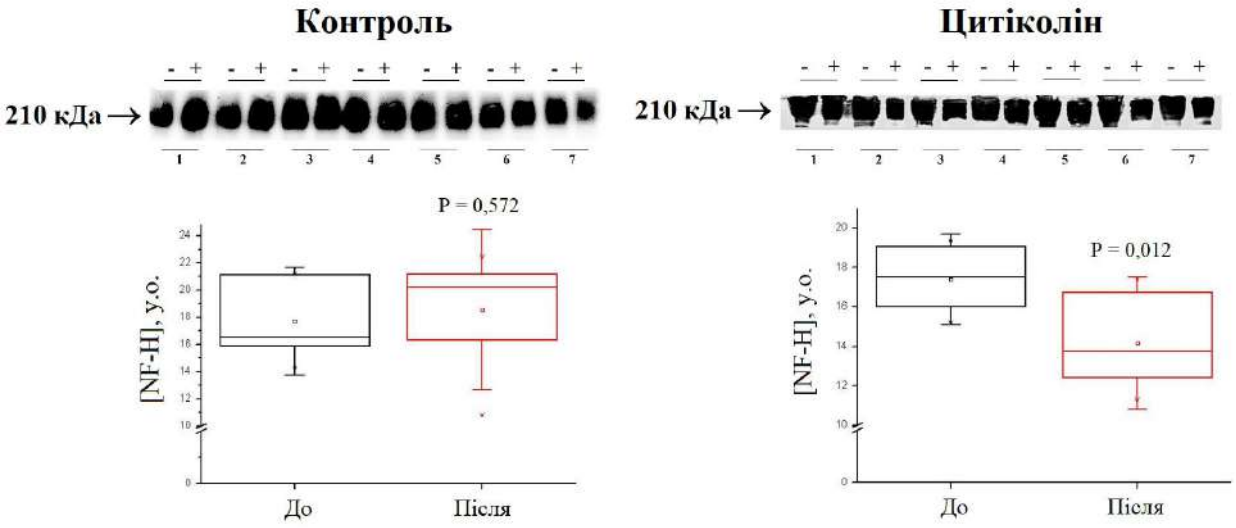

Рисунок 3.71 – Рівень протеїну нейрофіламентів NF-H у сироватці крові пацієнтів з гострим ішемічним інсультом та фібриляцією передсердь, які проходили курс терапії із застосуванням цитіколіну (CDP-холіну) (n = 33), та пацієнтів контрольної групи (n = 25): типовий результат імуноблот-аналізу (парний *t*-тест Ст'юдента, P < 0,05 порівняно з величиною до лікування прийнято за статистично достовірний). Позначення: - до лікування, + - після лікування; у.о. – умовні одиниці.

За допомогою імуноблот-аналізу, результати якого наведено на рисунку 3.72, було встановлено, що рівень ангіостатинів у сироватці крові пацієнтів із фібриляцією передсердь корелює зі ступенем тяжкості захворювання. У пацієнтів з персистентною та хронічною формами фібриляції, усі з яких перенесли гострий ішемічний інсульт, показано статистично достовірне зростання рівня ангіостатинів у сироватці крові. Більш того, у сироватці крові хворих з фібриляцією передсердь IV та V ступеня, крім основного поліпептиду-ангіостатину M_m ~ 50 кДа (К1-4,5), з'являлася низькомолекулярна ізоформа, яка за величиною M_m (15 кДа) відповідає окремому кринглу (К5).

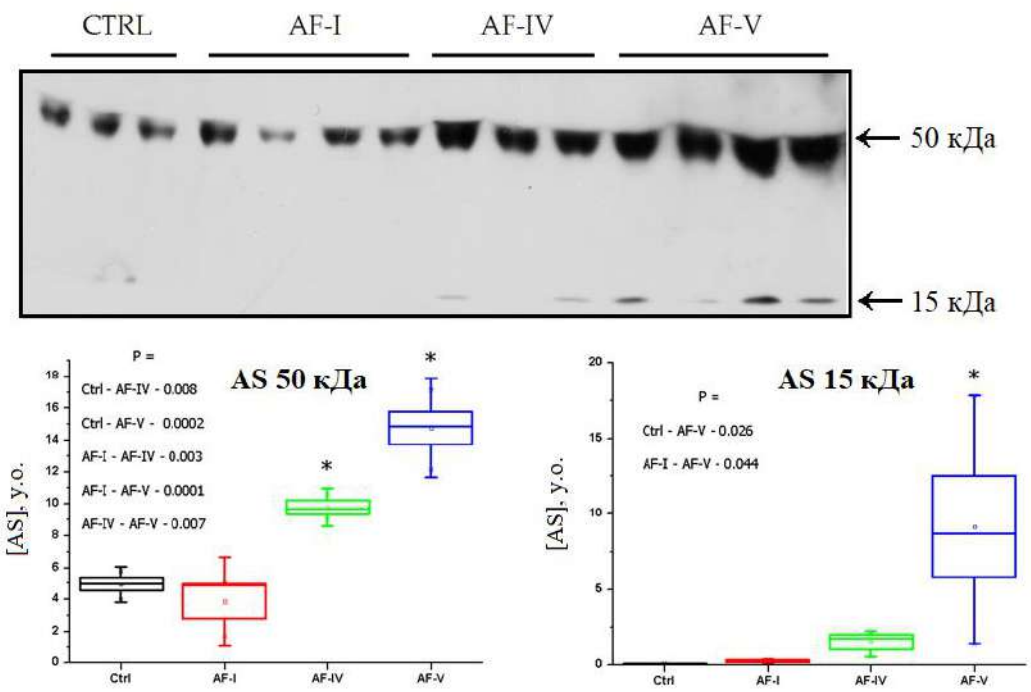

Рисунок 3.72 – Рівень ангіостатинів у сироватці крові здорових донорів (CTRL) і пацієнтів з фібриляцією передсердь (AF) I стадії (пароксизмальної) (n = 7), IV стадії (персистентної) (n = 8) та хронічної стадії (AF-V) (n = 11): типовий результат імуноблот-аналізу (* – P < 0,05 порівняно з CTRL, ANOVA, post-hoc *U*- тест Манна-Уітні).

Терапія хворих з фібриляцією передсердь, що перенесли гострий ішемічний інсульт, яка включала прийом цитіколіну, сприяла істотному зниженню рівня ангіостатину в сироватці крові (на 40% у порівнянні з цією величиною до лікування, P < 0,05) (рис. 3.73). На відміну від основної групи, не визначено статистично достовірних змін рівня ангіостатину в сироватці крові хворих, що проходили лікування за стандартним протоколом. Отже, отримані результати свідчать про те, що лікувальний ефект цитіколіну реалізується через протекторні ефекти по відношенню до астроцитів та нейронів, відновлення та підтримку цілісності ГЕБ, а також пригнічення процесів, що сприяють утворенню інгібітору ангіогенезу – ангіостатину.

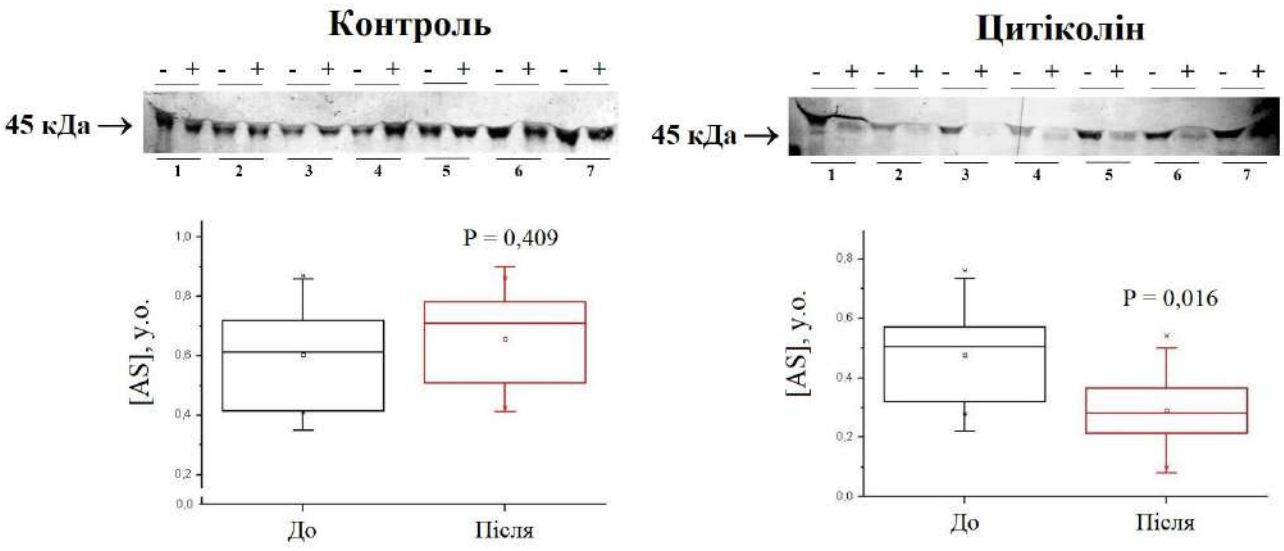

Рисунок 3.73 – Рівень ангіостатину в сироватці крові пацієнтів згострим ішемічним інсультом та фібриляцією передсердь, які проходили курс терапії із застосуванням цитіколіну (CDP-холіну) (n = 33), та пацієнтів контрольної групи (n = 25): типовий результат імуноблот-аналізу (парний *t*-тест Ст'юдента, P < 0,05 порівняно з величиною до лікування прийнято за статистично достовірний). Позначення: - до лікування, + - після лікування; у.о. – умовні одиниці.

Показано, що цитіколін не викликав змін рівня сироваткового альбуміну, що свідчить на користь відсутності побічних ефектів CDP-холіну на протеїнсинтезувальну функцію печінки за обраної дози та режиму введення (рис. 3.74).

Цитіколін є нейропротекторним препаратом нового покоління, який впливає на низку процесів ішемічного каскаду, а також проявляє нейрорепаративні ефекти [413]. Однак, практично недослідженим залишається питання стосовно визначення релевантних маркерів для оцінки терапевтичної ефективності цитіколіну. Авторами дослідження [336] описано протекторні ефекти цитіколіну по відношенню до ендотелійних клітин мікросудин мозку людини (hCMEC/D3). CDP-холін запобігав апоптозу цих клітин та захищав їх від ексайтотоксичного пошкодження, сприяв активації

ангіогенезу та істотно поліпшував васкуляризацію ділянок тканин, пошкоджених за інсульту, у модельному експерименті оклюзії середньої церебральної артерії (MCAO) у щурів.

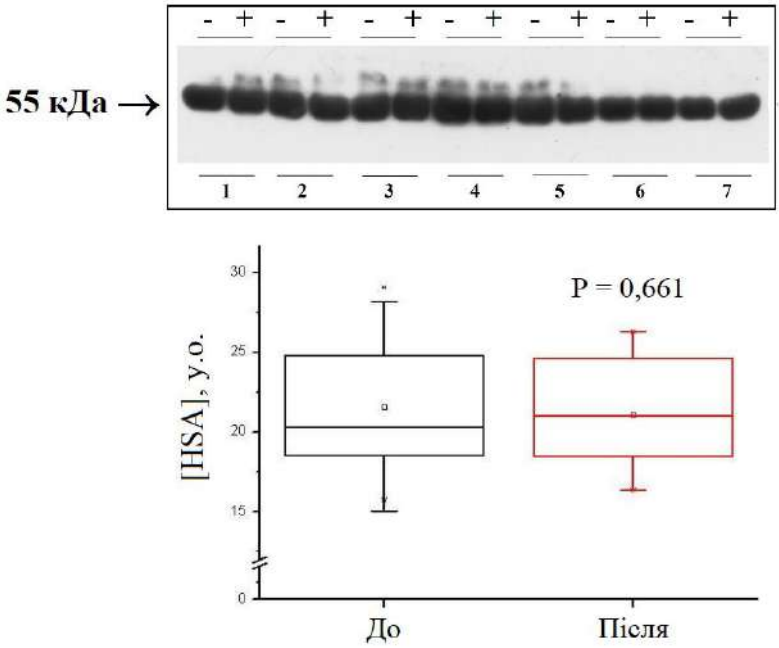

Рисунок 3.74 – Рівень сироваткового альбуміну (HSA) в крові пацієнтів з гострим ішемічним інсультом та фібриляцією передсердь, які проходили курс терапії із застосуванням цитіколіну (CDP-холіну) (n = 33): типовий результат імуноблот-аналізу (парний *t*-тест Ст'юдента, $P < 0,05$ у порівнянні з величиною до лікування прийнято за статистично достовірний). Позначення: - до лікування, + - після лікування; у.о. – умовні одиниці.

При цьому показано, що цитіклоін впливав на сигнальні шляхи, що активують субстрат інсулінового рецептору-1 (IRS-1). Результати іншої роботи [252] свідчать, що CDP-холін сприяв процесам функціонального відновлення після перманентної оклюзії середньої церебральної артерії, що відбувалося паралельно зі зменшенням площі пошкодженої ділянки, інтенсивності клітинної загибелі та експресії рецепторів LRP. Більш того, цитіколін прискорював клітинну проліферацію, сприяв васкулогенезу та зростанню рівнів синаптофізину, а також призводив до зменшення експресії

GFAP у навколоінфарктній ділянці за ішемічного інсульту. Відомо, що попередники ендотелійних клітин (EPC) підсилюють колатералізацію, сприяють зростанню щільності капілярів та забезпечують перебіг репаративних процесів у нервовій тканині та нейрогенез за експериментальної ішемії мозку. Швидке збільшення кількості EPC у пацієнтів протягом першого тижня після лакунарного інсульту асоційовано з кращим прогнозом відносно функціонального відновлення. Показано, що введення цитіколіну у добовій дозі 2000 мг, починаючи з першої доби після лакунарного інсульту, сприяло значному збільшенню кількості циркулюючих EPC на 7-й день після інсульту та покращенню клінічних показників у порівнянні з пацієнтами з цією патологією, що проходили лікування без прийому цитіколіну [30]. Спираючись на ці дані, ми сформулювали як завдання оцінити можливість використання деяких тканиноспецифічних протеїнів як маркерів перебігу постішемічних подій, рівні яких відображають терапевтичну ефективність цитіколіну. Отже, у представленій роботі вперше показано прямий зв'язок між зменшенням рівнів специфічних нейрональних та гліальних маркерних протеїнів та рівнем супресора неоваскуляризації ангіостатину в сироватці крові пацієнтів з фібриляцією передсердь, що перенесли гострий ішемічний інсульт, й проходили курс відновлювальної терапії із застосуванням цитіколіну. У роботі використовували верифіковані маркери пошкодження нервової тканини, викликаного ішемічним інсультом [297], а саме: GFAP – компонент астрофібрил гліального цитоскелету та широко відомий маркер розвитку реактивного астроцитозу [397, 618], та протеїн нейрофіламентів (NF-H) – компонент проміжних філаментів цитоскелету нервових клітин, біомаркер атрофії нейронів та аксональної дегенерації [502]. Визначення циркулюючих пулів цих нервовоспецифічних протеїнів є чутливим та малоінвазійним тестом ступеня деструкції нервової тканини та порушення цілісності ГЕБ [297, 314]. Зокрема, вміст протеїну NF у сироватці крові пацієнтів з інсультом є значно вищим за цей показник у крові здорових людей і демонструє тенденцію до зростання пропорційно до

тяжкості та розмірів ураження тканини мозку [502]. Найновіші дані клінічних досліджень переконливо доводять релевантність GFAP та NF як чутливих біомаркерів нейродегенеративних процесів, спричинених інфікуванням вірусу SARS-CoV-2 [309]. Слід зазначити, що в ході інфекційного процесу вміст GFAP у сироватці крові хворих після стрімкого зростання демонстрував тенденцію до зменшення, тоді як рівень протеїну NF-L продовжував зростати. Можливо, що ці результати відображають ранню астроцитарну відповідь на інфікування SARS-CoV-2, яка передує аксональній дегенерації. Втім, залишається незрозумілим, яка саме ланка патології або комбінація факторів призводять до надходження специфічних протеїнів ЦНС до системного кровообігу: безпосереднє ураження вірусами клітин з їхньою наступною загибеллю, пошкодження цілісності ГЕБ, активація імунної відповіді або розвиток гіпоксичних процесів за COVID-19 [663].

У дисертаційному дослідженні встановлено, що відновлювальна терапія пацієнтів з гострим ішемічним інсультом із застосуванням цитіколіну призвела до істотного зниження рівнів обох нервовоспецифічних протеїнів у сироватці крові. Важливо зазначити, що рівень циркулюючого пулу GFAP виявився більш чутливим до впливу CDP-холіну, про що свідчить більш істотне зменшення його вмісту в сироватці у порівнянні зі вмістом протеїну NF-H. Беручи до уваги отримані результати імунохімічного аналізу цих протеїнів, а також зважаючи на роль астрогліальних клітин у патофізіологічних процесах у головному мозку за інсульту, можна припустити, що зменшення рівня вивільнення GFAP до циркуляції в результаті застосування CDP-холіну може пояснюватися обмеженням астрогліальної реактивності та частковим відновленням структури ГЕБ. На користь цього припущення свідчать також результати попередньої роботи [283], в якій описано цитопротекторні ефекти цитіколіну як на нейрональні клітини, так і на астроцити. Авторами встановлено, що CDP-холін чинить нейропротекторну дію, пригнічуючи вивільнення глутамату клітинами мозку за умов ішемії. У порівнянні з кількісними змінами GFAP, цитіколін

спричинив мінорні, проте статистично достовірні, зміни рівня NF-H у сироватці крові постінсультних хворих. Аксональна форма NF-H є фосфорильованим поліпептидом, відносно резистентним до протеолізу, проте, надходження цього високомолекулярного протеїну до кровоносного русла можливо за умови важких пошкоджень ГЕБ [34]. Результати кількісного визначення NF-H можуть відображати нейропротекторну дію цитіколіну, що проявляється у запобігання аксональної дегенерації та захисті нейрональних клітин від загибелі, індукованої ішемічним каскадом.

Одним з можливих механізмів реалізації CDP-холіном ноотропних властивостей є активація процесів, спрямованих на відновлення мозкового кровообігу після інсульту. Як відомо, репаративний ангіогенез є ключовою ланкою постішемічного нейроваскулярного ремоделювання, а формування нових судин є важливою умовою для міграції нейрональних та гліальних клітин-попередників до ішемізованої ділянки мозку. Завдяки активації неоваскуляризації та утворення судинних колатералей у мозку можливе відновлення постачання кисню, метаболітів та нейротропних факторів до пошкодженої тканини, що забезпечує адекватний перебіг репаративних процесів, нейрогенезу та синаптогенезу як основи функціонального відновлення ЦНС [541]. Незадовільний колатеральний кровообіг асоціюється з негативним прогнозом щодо відновлення постінсультних пацієнтів, оскільки асоційований з розширенням площі інфаркту мозку за гострого інсульту. Отже, стимуляція ангіогенезу за допомогою судинної терапії становить зручну мішень фармакотерапії постінсультних ускладнень, оскільки швидкість формування судинних колатералей визначає як вірогідність виживання пацієнту, так і ступінь відновлення когнітивних функцій [303].

Ангіогенний потенціал тканини суворо контролюється завдяки існуванню рівноваги між молекулами-активаторами та супресорами ангіогенезу, які у різних концентраціях одночасно присутні у тканині. За ішемії спостерігається порушення ангіогенного балансу, що часто

призводить до пригнічення колатералізації судин [389]. Тканинні серинові протеїнази та ММР, що беруть участь у руйнуванні ЕЦМ, відіграють важливу роль як в індукції ангіогенезу, так і в його інгібуванні. У попередніх дослідженнях показано, що стрімке підвищення експресії та активності ММР-2 (желатинази А) та ММР-9 (желатинази В) за ішемії головного мозку, зокрема, в експериментальній моделі ліпополісахарид-індукованого пошкодження мозку, роблять внесок до розвитку патології мозку та порушення цілісності ГЕБ [442, 524]. Gundogdu та ін. [248] продемонстрували, що CDP-холін сприяв зниженню рівнів протеїнів ММР-2 та -9, а також їхньої протеолітичної активності, одночасно стимулюючи аксональну регенерацію за пошкодження периферичного нерву. У тканині ЦНС клітинами, що продукують ММР, є, переважно, астроцити та клітини мікроглії, які володіють макрофагальною активністю [673]. Враховуючи цей факт, можна припустити, що цитіколін сприяє покращенню проангіогенного балансу в ішемізованій тканині головного мозку через пригнічення реактивності гліальних клітин та негативне регулювання ензиматичної активності ММР, які відповідають за утворення ангіосупресорних молекул – ангіостатинів.

Наразі відомості щодо утворення ангіостатинів у головному мозку людини та їхньої ролі в перебігу фізіологічних та патофізіологічних процесів є надзвичайно обмеженими. Результати представленого дослідження становлять беззаперечну науково-практичну цінність, не лише доповнюючи уявлення про механізми плейотропної дії цитіколіну на процеси у ЦНС, асоційовані з розвитком ангіопатій за ішемічного інсульту (рис. 3.75), але й доводять перспективність використання ангіостатину як фармакологічної мішені з метою поліпшення ангіогенного сигналінгу в ішемізованій тканині.

У цілому, результати, описані у п. 3.3.2, демонструють, що фармакодинамічні властивості низки кардіопротекторних та ноотропного препаратів за ад’ювантної терапії ССЗ, реалізуються через зниження рівня ангіостатину в системному кровотоці [616, 622, 624]. Зміни рівня

циркулюючих ангіостатинів прямо асоціюються з антиатерогенними, протизапальними та нейропротекторними ефектами досліджуваних препаратів, що дозволяє розглядати ангіостатини як самостійні біомаркери розвитку коронарної хвороби серця, фібриляції передсердь та церебрального інсульту та ефективності їхньої терапії.

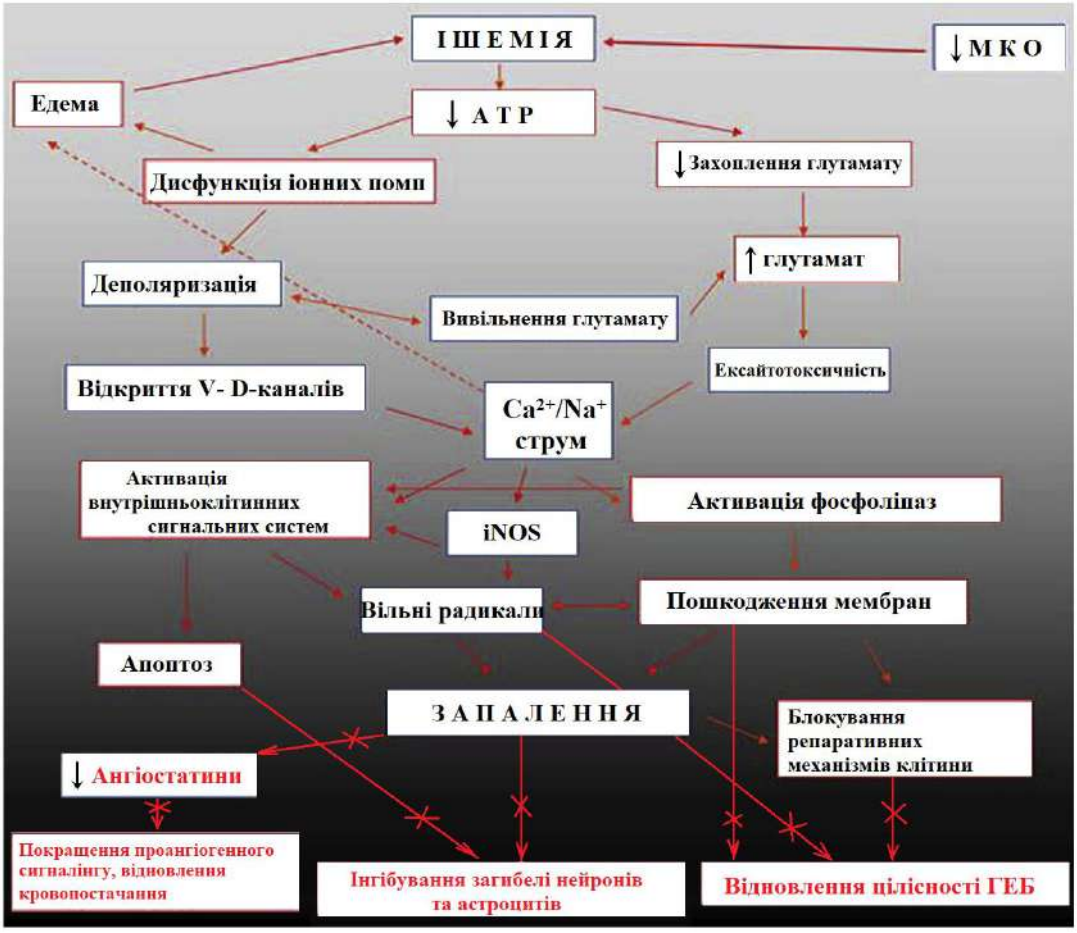

Рисунок 3.75 – Залучення ангіостатинів до реалізації механізмів нейрофармакологічної активності цитіколіну в нервовій тканині за церебральної ішемії [51, 624]. Яскраво-червоними стрілками позначені ланки ішемічного каскаду, на перебіг процесів у яких впливає цитіколін.

Висновки до підрозділу 3.3

1. Показано, що підвищені рівні ангіостатинів та перманентно висока активність матриксних металопротеїназ у тканинах трофічних виразок пацієнтів з цукровим діабетом II типу, а також за гіпертонічної ішемічної виразки шкіри (синдром Марторелла), асоціюються з хронізацією загоєння ран. Відновлення росту судин та скорочення термінів загоєння хронічних виразок пацієнтів з цукровим діабетом II типу після застосування курсу вакуумної терапії (VAC-therapy) можуть реалізуватися через елімінацію з пошкоджених тканин протеїнів-інгібіторів ангіогенезу та надмірної активності колагенолітичних ензимів (матриксних металопротеїназ).

2. Встановлено, що стан експериментальної гіперглікемії у щурів індукує зниження рівнів ангіостатинів (К1-4 та К1-5) у сітківці ока, що є ознакою активації неоваскуляризації та фактором ризику розвитку діабетичної ретинопатії.

3. Доведено, що в утворенні й продукуванні ангіостатинів у нервовій тканині беруть участь астрогліальні клітини.

4. Показано розвиток реактивного астроцитозу в сітківці щурів за гіперглікемії. Нормалізація функціонального стану ретиноглії після введення інгібіторів PARP-1 сприяла відновленню рівнів ангіостатинів у сітківці.

5. Показано зниження рівня ангіостатину в сироватці крові пацієнтів з ішемічною хворобою серця та дисліпідемією після курсу терапії з використанням симвастатину. Зниження вмісту циркулюючого ангіостатину в результаті ліпідознижувальної терапії статистично достовірно корелювало з нормалізацією показників ліпідного обміну та пригніченням запальних процесів у пацієнтів означеної групи.

6. Показано зменшення рівня ангіостатину та зростання вмісту VEGF у сироватці крові пацієнтів з ішемічною хворобою серця та хронічною серцевою недостатністю після ад'ювантної терапії з використанням L-аргініну. Модулювання ангіогенного балансу та пригнічення надмірної

активності металопротеїназ матриксу є важливими чинниками реваскуляризації міокарду за ішемії, що становить один з можливих механізмів кардіопротекторної дії L-аргініну.

7. Показано зниження рівня ангіостатину в сироватці крові пацієнтів з ішемічним інсультом на фоні фібриляції передсердь після курсового введення цитіколіну (CDP-холіну). Встановлено, що зменшення вмісту циркулюючого ангіостатину у пацієнтів з гострим ішемічним інсультом відбувалося паралельно зі зниженням рівнів нейроспецифічних протеїнів, зокрема, GFAP (маркеру реактивного астрогліозу та пошкодження ГЕБ) та протеїну нейрофіламентів (маркеру нейродегенерації), у сироватці крові.

8. Вперше доведено залучення ангіостатинів до реалізації фармакодинамічних ефектів препаратів кардіопротекторної та нейропротекторної дії. Зниження рівнів ангіостатинів у сироватці крові за ішемічної хвороби серця та гострого ішемічного інсульту є позитивною прогностичною ознакою, що асоціюється з активацією компенсаторних та репаративних механізмів. Результати представленого дослідження відкривають перспективи використання ангіостатинів як потенційної фармакологічної мішені для підходів, спрямованих на поліпшення ангіогенного сигналінгу в ішемізованих тканинах, та як біомаркеру для оцінки ефективності терапії серцево-судинних захворювань.

Основні праці здобувача, опубліковані за матеріалами підрозділу 3.3

1. Петренко ОМ, Тихомиров АО. Роль металопротеїназ матриксу в процесах загоєння ран. *Медична хімія*. 2013;15(4):100-106.

2. Tykhomyrov AA, Shram SI, Grinenko TV. The role of angiostatins in diabetic complications. *Biochemistry (Supplement Series B Biomedical Chemistry)*. 2014;8(2):94-107.

3. Tykhomyrov AA, Nedzvetsky VS, Bardachenko NI, Grinenko TV, Kuryata OV. Statin treatment affects serum angiostatin levels in patients with ischemic heart disease. *Life Sciences*. 2015;134:24-29.

4. Guzyk MM, Tykhomyrov AA, Nedzvetsky VS, Prischepa IV, Yanitska LV, Grinenko TV, Kuchmerovska TM. Poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) inhibitors reduce reactive gliosis and improve angiostatin levels in retina of diabetic rats. *Neurochemical Research*. 2016;41(10):2526-2537.

5. Petrenko OM, Bezrodnyi BH, Tykhomyrov AA. Vacuum therapy of diabetic soft tissue wounds: the impact on the matrix metalloproteinase activity. *International Journal of Endocrinology*. 2016;1(73):53-57.

6. Tykhomyrov AA, Nedzvetsky VS, Ağca CA, Korsa VV, Grinenko TV. Plasminogen and its fragments in rat brain: a plausible role for astrocytes in angiostatin generation. *Ukrainian Biochemical Journal*. 2017;89(2):43-54.

7. Tykhomyrov AA, Nedzvetsky VS, Zabida AA, Ağca CA, Kuryata OV. L-arginine treatment improves angiogenic response and reduces matrix metalloproteinase activity in chronic heart failure patients with coronary artery disease. *PharmaNutrition*. 2018;6(4):137-146.

8. Tykhomyrov AA, Kushnir YS, Nedzvetsky VS, Grinenko TV, Kuryata OV. Citicoline affects serum angiostatin and neurospecific protein levels in patients with atrial fibrillation and ischemic stroke. *Ukrainian Biochemical Journal*. 2019;91(5):34-45.

9. Petrenko OM, Tykhomyrov AA. Levels of angiogenic regulators and MMP-2, -9 activities in Martorell ulcer: a case report. *Ukrainian Biochemical Journal*. 2019; 91(1):100-107.

10. Bilous VL, Kapustianenko LG, Tykhomyrov AA. Production and application of angiostatins for the treatment of ocular neovascular diseases. *Biotechnologia Acta*. 2021;14(1):4-15.

11. Петренко О.М., Безродний Б.Г., Зубов Д.О., Васильєв Р.Г., Тихомиров А.О. Модуляція активності матриксних металопротеїназ як ключової ланки патофізіології хронічних ран / У книзі «Застосування

інноваційних технологій в хірургічному лікуванні гнійно-некротичних ран м'яких тканин (монографія)». Київ: LAT & K; 2018; 103-157.

12. Guzyk M, Tykhomyrov A, Kuchmerovska T. Attenuation of reactive gliosis in retinas by PARP-1 inhibitors treatment under diabetes in rats. //50th Meeting of the European Association for the Study of Diabetes, Vienna, Austria, 15-19 September 2014 – p. 126.

13. Guzyk M, Tykhomyrov A, Nedzvetsky V, Prischepa I, Grinenko T, Kuchmerovska T. Poly(ADP-ribose)polymerase-1 (PARP-1) inhibitors alleviate reactive gliosis and recover angiostatin expression in retina of diabetic rats // Current Problems of Biochemistry and Cell Biology: The 3rd International Scientific conference, Dniepropetrovsk, Ukraine, 24-25 September 2015 - P. 28-30.

14. Tykhomyrov AA, Nedzvetsky VS, Agca CA, Korsa VV, Grinenko TV. Immunohistochemical localization of plasminogen and its fragments in rat brain: the novel role for astrocytes in angiostatin generation // Матеріали VII Конгресу Українського товариства нейронаук, Київ, 7-11 червня 2017 р., р. 56.

15. Петренко ОМ, Тихомиров АО. Визначення вмісту регуляторів ангіогенезу та активності матриксних металопротеїназ у хронічній виразці шкіри за синдрому Марторелла // Матеріали XVIII конференції «Клініко-технологічні виклики в етапній та реконструктивній хірургії. Вогнепальні та побутові рани, електрозварювання та з'єднання живих тканин, діабетична стопа», м. Київ, 29-30 листопада 2018 р.

16. Tykhomyrov AA, Petrenko OM, Kolosovych IV, Bezrodnyi BG. Angiogenic regulators and MMP activity in trophic diabetic and hypertonic ulcers of mild tissues // Medical and Clinical Chemistry: XII Ukrainian Biochemical Congress, Ternopil, Sep. 30 – Oct. 4 2019 - Vol. 21, 3(80) - P. 241.

18. Zhovannyk VO, Tykhomyrov AA, Petrenko OM. Angiogenesis regulators and MMP activity in trophic and hypertonic ulcers of mild tissues // Конференція молодих вчених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології», Київ, 21-22 березня 2019 р., Укр. Біохім. Ж., 91 (2). – с. 87.

РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Протягом багатьох років плазміноген/плазмінова система досліджувалася з точки зору її центральної ролі в процесах, пов'язаних з руйнуванням внутрішньосудинних фібринових згустків. Не зменшуючи пріоритетного значення цих протеїнів у фібринолізі, слід визнати, що плазміноген/плазмінова система функціонує як інтегратор між фібринолізом та процесами клітинного протеолізу (рис. 4.1), забезпечуючи регулювання активності тромбоцитів та запальних/імунних клітин, які через різноманітні сигнальні механізми визначають перебіг фізіологічних процесів та механізмів патогенезу цілої низки розладів та хвороб.

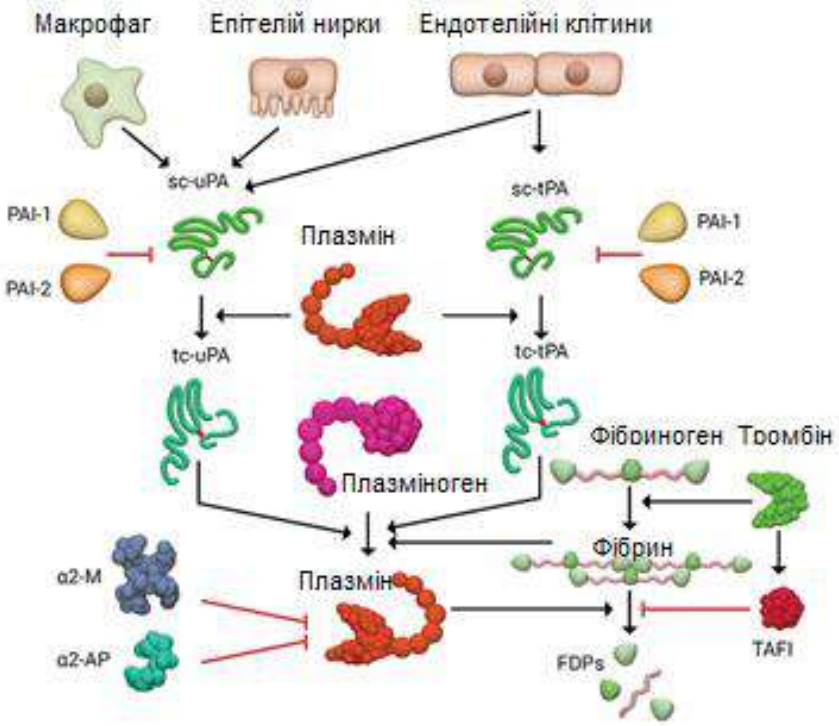

Рисунок 4.1 – Загальна схема функціонування плазміноген/плазмінової системи: зимоген плазміноген перетворюється на активну протеїназу плазмін під дією активаторів (u-PA або t-PA). У складі фібринолітичного каскаду таку конвертацію здійснює t-PA, тоді як за активацію зимогену на поверхні клітин відповідає u-PA, зв'язаний зі своїм рецептором (u-PAR). PAI та α_2-антиплазмін (α_2-AP) функціонують як інгібітори фібринолітичної системи [за 629].

Основними протеїнами, що визначають активність плазміноген/плазмінової системи є активатор плазміногену урокіназного типу (u-PA) та його рецептор (u-PAR), активатор плазміногену тканинного типу (t-PA), інгібітор плазміну α_2-антиплазмін, інгібітори активатора плазміногену PAI-1,-2 та -3. Існують усі підстави для виокремлення продуктів обмеженого протеолізу плазмін(оген)у (ангіостатинів) як повноцінних компонентів плазміноген/плазмінової системи, що виконують власні біологічні функції. На сьогодні накопичено значний масив експериментальних даних, що засвідчують плейотропність функцій цієї протеолітичної системи і вказують на її ключову роль у регулюванні коагуляції крові та фібринолітичних реакцій, функціонування вродженої імунної системи в ході запалення, адаптивної імунної відповіді, а також утворенні продуктів деградації фібрину на перехресті регуляторних механізмів між згортанням та запаленням.

Як відомо, гарантією підтримки гемостазу є рівновага між двома протилежно спрямованими процесами: прокоагулянтними (тромбоутворення) та антикоагулянтними (фібриноліз, лізис згустків навколо тромбоцитарних агрегатів). Послідовні каскади обох цих процесів у кровоносному руслі можна було б визнати добре дослідженими, якби не нові факти щодо їхнього функціонування. Стає зрозумілим, що центральним місцем їхньої реалізації є поверхня тромбоцитів, а саме плазматична мембрана активованих тромбоцитів. Другий аспект, який випливає з результатів, отриманих в ході виконання роботи, є існування функціональних розгалужень від основних напрямів цих шляхів, які мають важливе самостійне регуляторне значення. Такі відгалуження мають місце на етапі утворення частково розщепленого плазміногену, коли крім головної протеїнази плазміну з відносно добре відомими функціями, утворюються інші молекули, біологічна активність яких досліджена менш детально, зокрема, Lys-плазміноген та ангіостатини. Необхідність вивчення особливостей їхнього утворення, функціонування та можливості практичного застосування й зумовлює актуальність роботи.

Отже, представлена дисертаційна робота присвячена вирішенню наукової проблеми з визначення механізмів регулювання протеїнами плазміноген/плазмінової системи клітинних процесів за норми та патологічних станів. Результати, отримані в ході виконання роботи, є концептуально новими. Вперше досліджено модулювальну дію плазміногену на агрегативну та ангіогенну функцію тромбоцитів та встановлено, що антиагрегативна активність Lys-плазміногену реалізується шляхом інгібування агоніст-індукованої реконструкції актинового цитоскелету тромбоцитів та пригнічення вивільнення з α-гранул адгезивного протеїну P-селектину. Ангіогенні властивості тромбоцитів обмежуються через пригнічення Lys-плазміногеном агоніст-стимульованої секреції фактору росту VEGF та утворення на плазматичній мембрані фрагментів плазміногену – ангіостатинів, які є потужними інгібіторами ангіогенезу. Встановлено, що важливу роль у зв'язуванні плазміногену та утворенні з нього ангіостатинів є експонування на поверхні тромбоцитів актину. Запропоновано схему генерування ангіостатинів активованими тромбоцитами за участі активатора урокіназного типу та експонованого на поверхні актину як центра зв'язування плазміногену. На основі одержаних експериментальних даних сформульовано наукове положення про залучення протеїнів плазміноген/плазмінової системи до тромбоутворення, ангіогенезу та репаративних процесів через регулювання функціонального стану тромбоцитів та утворення ангіостатинів. Важливо зазначити, шо отримані експериментальні дані створюють підґрунтя для розроблення новітніх антитромботичних засобів на основі використання Lys-плазміногену для профілактики та лікування станів, асоційованих з гіперфункцією тромбоцитів. Lys-плазміногену завдяки своїм інгібувальним ефектам на секрецію тромбоцитів та обмеженню викиду тромбоцитарного VEGF може знайти застосування в терапії онкологічних хвороб з метою пригнічення ангіогенезу, індукованого в пухлинах.

У контексті участі плазміноген/плазмінової системи в процесах, асоційованих з перицелюлярним протеолізом, система активації плазміногену

(САП) може розглядатися як позаклітинний мультимолекулярний ензимний комплекс, що інтегрований з поверхнею клітини й залучений до контролю різних фізіологічних та патофізіологічних процесів. Зокрема, u-PA та його рецептор u-PAR відіграють провідну роль у регулюванні проліферації і виживання пухлинних клітин, контролі епітелійно-мезенхімного переходу, є критично важливими для забезпечення деградації компонентів позаклітинного матриксу, процесу, який лежить в основі міграції й інвазії пухлинних клітин, забезпечуючи прогресію пухлинного росту та метастазування. Однак, незважаючи на значні зусилля, експериментальні дані, нагромаджені у цій галузі біохімії, молекулярної й клітинної біології та експериментальній біомедицині, часто не дають цілісного уявлення про роль окремих компонентів плазміноген/плазмінової системи в контролі регуляторних механізмів клітин на мережевому рівні. Залишаються нез'ясованими питання про роль продуктів деградації плазміногену (ангіостатинів) у контролі біологічних відповідей клітин за умов норми та патологічних станів. Від відповіді на ці та інші взаємопов'язані питання в значній мірі буде залежати, які стратегічні підходи буде використовувати медицина в майбутньому для профілактики і лікування захворювань, асоційованих з функціонуванням САП. У роботі представлено нові дані стосовно механізмів залучення плазмін(оген)у до регулювання виживання та рухливості пухлинних клітин. Вперше показано, що одним з механізмів набуття пухлинними клітинами резистентності до плазмін-індукованого апоптозу/аноікісу, є розвиток репаративної автофагії. Новими є дані про індукування плазміном експресії регуляторного ензиму TP53-inducible glycolysis and apoptosis regulator (TIGAR), який відіграє важливе значення у підтримці мотогенної активності аденокарциномних клітин легені. Дані стосовно активації автофагії як одного з механізмів набуття пухлинними клітинами стійкості до плазмін-індукованого апоптозу/аноікісу мають практичне значення, оскільки можуть бути використані для розроблення принципово нових терапевтичних стратегій, спрямованих на обмеження розвитку злоякісних новоутворювань та метастазування. З'ясування важливої ролі мотогенного протеїну TIGAR у

підтриманні плазмін-індукованої міграції має вагоме прикладне значення, яке полягає в можливості створення високоефективних таргетних протипухлинних та антиметастатичних препаратів.

Значний інтерес представляють експериментальні дані стосовно існування зворотної залежності між здатністю клітин аденокарциноми грудної залози утворювати ангіостатини та їхнім міграційним/інвазійним потенціалом у залежності від експресії адаптерного/риштувального протеїну Ruk/CIN85. Уявлення про участь ангіостатинів у процесах неопластичного росту значно розширено завдяки новим даним про роль ангіостатинів як негативних регуляторів запальних та гіперпластичних процесів у тканинах доброякісних новоутворень матки та грудної залози. Вперше встановлено, що інтенсивність запальних процесів та проліферативного потенціалу доброякісних новоутворень обернено корелює з рівнем ангіостатинів у тканинах.

У дисертаційній роботі обґрунтовано біологічне значення різноспрямованих змін вмісту ангіостатинів у патогенезі різних розладів та хвороб, асоційованих з судинними дисфункціями, а саме, ускладнень цукрового діабету та серцево-судинними захворюваннями. Зокрема, встановлено, що стан хронічної гіперглікемії спричиняє зменшення вмісту ангіостатинів у сітківці ока щурів, що може робити істотний внесок до розвитку діабетичної ретинопатії. Вперше продемонстровано, що одними з клітин, які відповідають за конститутивне генерування ангіостатинів у нервовій тканині, є астроцити. Показано, що підвищений рівень ангіостатинів та надмірна активність матриксних металопротеїназ є факторами хронізації ран. Встановлено значення ангіостатинів як маркерів дерегулювання ангіогенного балансу за серцево-судинних хвороб та доведено можливість кількісного аналізу цих протеїнів для оцінки ефективності фармакокорекції ішемічної хвороби серця та постінсультних станів. Важливість практичного значення отриманих даних засвідчують розроблені й запроваджені в дослідженні підходи з визначення ангіостатинів у біологічному матеріалі із використанням імунохімічних методів, що значно розширює спектр можливого використання цих протеїнів як діагностико-прогностичних маркерів різних патологій: як показників

малігнізації пухлин та прогностичних маркерів перебігу неопластичного процесу, для моніторингу загоєння хронічних ран. Визначення вмісту циркулюючих ангіостатинів у сироватці крові може слугувати чутливим показником ефективності фармакотерапії патологій серцево-судинної системи.

Отже, результати дисертаційної роботи роблять вагомий внесок у розкриття біологічного значення протеїнів плазміноген/плазмінової системи як регуляторів клітинних процесів за норми та патологічних станів різного ґенезу (рис. 4.2). Розроблені підходи з використанням імунохімічних методів по виявленню ангіостатинів у біологічному матеріалі створюють нові можливості для їхнього визначення як діагностично-прогностичних маркерів різних патологій.

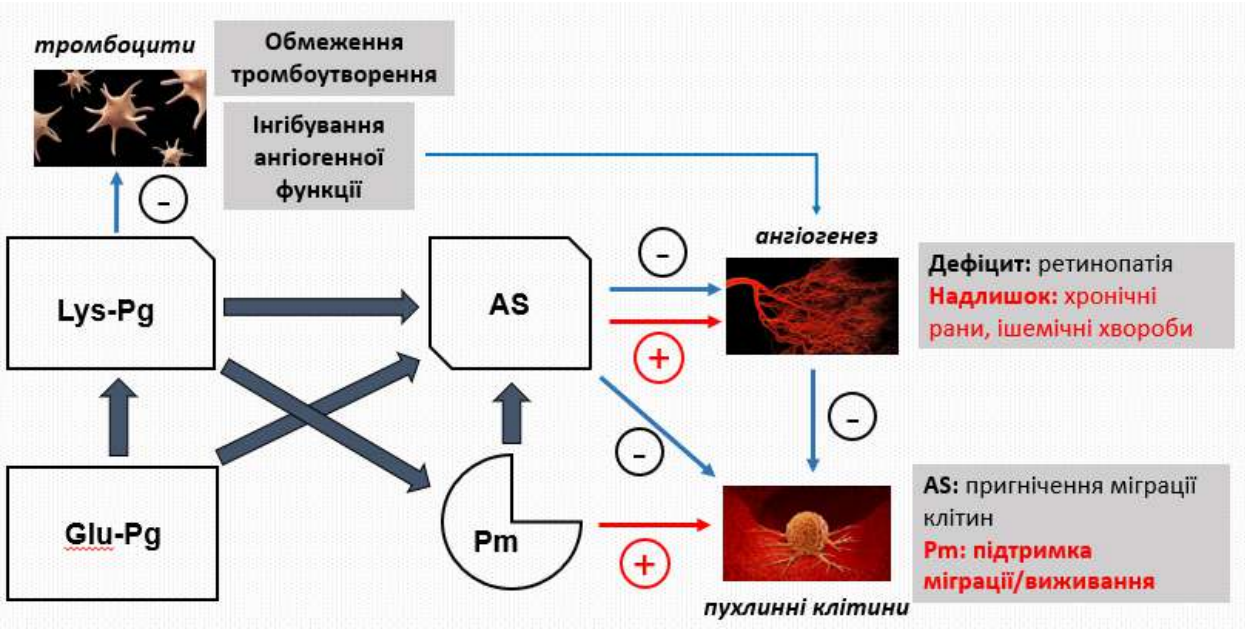

Рисунок 4.2 – Узагальнююча схема процесів за участі протеїнів плазміноген/плазмінової системи, що досліджувалися в дисертаційній роботі. Красним кольором позначено активацію процесу, синім кольором позначено пригнічення процесу.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлено результати комплексного дослідження механізмів регулювання протеїнами плазміноген/плазмінової системи функціонального стану тромбоцитів та процесів, асоційованих з виживанням та міграцією/інвазією пухлинних клітин, а також визначено значення фрагментів плазміногену (ангіостатинів) як маркерів патологічних станів. Вперше встановлено, що зміни рівня ангіостатинів у тканинах та крові супроводжують розвиток доброякісних новоутворень матки та грудної залози, ускладнень цукрового діабету та серцево-судинних захворювань, що відкриває перспективи використання цих протеїнів у клінічній діагностиці.

1. Експериментально доведено, що Lys-плазміноген залучається до регулювання тромбоутворення та ангіогенезу через модулювання функціонального стану тромбоцитів.

2. Показано, що антиагрегативна активність Lys-плазміногену реалізується через інгібування агоніст-індукованої реконструкції актинового цитоскелету тромбоцитів та пригнічення вивільнення тромбоцитарних α-гранул.

3. Встановлено, що Lys-плазміноген обмежує ангіогенну функцію тромбоцитів через інгібування агоніст-стимульованого вивільнення фактора росту ендотелійних клітин (VEGF) та залучення до продукування ангіостатинів.

4. Запропоновано молекулярний механізм генерування ангіостатинів на плазматичній мембрані активованих тромбоцитів за участі компонентів системи активації плазміногену та експонованого актину як центру зв’язування плазмін(оген)у.

5. Встановлено, що активація автофагії в клітинах аденокарциноми легені А549 є фактором резистентності пухлинних клітин до плазмін-індукованої клітинної загибелі (аноікісу).

6. Показано, що плазмін індукує підсилення синтезу протеїну TIGAR (TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator), який відіграє ключову роль у підтриманні міграції/інвазії клітин аденокарциноми легені А549.

7. Встановлено, що продукування ангіостатинів клітинами сублінії аденокарциноми грудної залози 4Т1 з пригніченою експресією адаптерного/риштувального протеїну Ruk/CIN85 (RukDown) обернено корелює з їхньою інвазійною активністю. Ангіостатини К1-3 та К5 пригнічують здатність до інвазії високоінвазійної сублінії клітин 4Т1 (RukUp).

8. Визначено, що утворення ангіостатинів у тканинах доброякісних новоутворень міометрію матки (міома) та грудної залози (фіброаденома) асоціюється із зниженням ступеня запальних процесів та низьким проліферативним потенціалом. Ангіостатини можуть розглядатися як інгібітори гіперпластичних процесів у цих тканинах.

9. Показано, що стан експериментальної гіперглікемії у щурів призводить до зниження рівнів ангіостатинів (К1-4 та К1-5) у сітківці ока, що є передумовою активації патологічної неоваскуляризації та фактором ризику розвитку діабетичної ретинопатії.

10. Вперше встановлено, що в утворенні ангіостатинів у нервовій тканині провідну роль відіграють астроцити. Показано, що гіперглікемія індукує реактивацію астроглії у сітківці ока щурів. Нормалізація функціонального стану ретиноглії після введення інгібіторів PARP-1 супроводжується відновленням рівнів ангіостатинів у сітківці за експериментальної гіперглікемії.

11. Продемонстровано, що зростання рівня ангіостатинів та підвищена активність матриксних металопротеїназ у тканинах трофічних виразок м’яких тканин пацієнтів з цукровим діабетом II типу та гіпертонічній ішемічній виразці шкіри є факторами, що асоціюються з хронізацією загоєння.

12. Доведено залучення ангіостатинів до реалізації фармакодинамічних ефектів препаратів кардіопротекторної та нейропротекторної дії. Зниження рівня ангіостатинів у сироватці крові пацієнтів з ішемічною хворобою серця, фібриляцією передсердь та гострим ішемічним інсультом є позитивною прогностичною ознакою, пов’язаною з активацією компенсаторних та репаративних механізмів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ЛІТЕРАТУРИ

1. Баркаган ЗС, Момот АП. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза. – Москва: Ньюдиамед, 2008. – 289 с.
2. Гурьева В.А. Фиброзно-кистозная болезнь (патогенез, классификация, диагностика, лечение). – Барнаул, 2000. – 212 с.
3. Доклінічні дослідження лікарських засобів // Під ред. О.В. Стефанова. – К., Авіцена; 2001, 528 с.
4. Долгов ВВ, Шабалова ИП, Миронова ИИ. Выпотные жидкости. Лабораторное исследование. – Тверь., «Триада»; 2006, 161 с.
5. Ермолаева ЕН, Кривожихина ЛВ, Кантюков СА, Сурина-Марышева ЕФ. Свободнорадикальное окисление в интактных и активированных тромбоцитах. Фундаментальные исследования. 2014; 7:61-65.
6. Жерносеков ДД, Золотарева ЭН, Кондратюк АС. Структурно-функциональные особенности ингибитора активатора плазминогена ПАИ-1. Биополимеры и клетка. 2010;26(4):255-264.
7. Жерносеков ДД, Юсова Е.И., Гриненко Т.В. Роль плазминоген/плазмина в функционировании клеток крови. Укр. Біохім. Ж. 2012; 84(4):5-19.
8. Зубовская ЕТ, Светлицкая СГ. Система гемостаза. Теоретические основы и методы исследования. – Минск: БГУФК, 2010. – 310 с.
9. Комісаренко СВ. Світова коронавірусна криза. – К.: ЛАТ&К, 2020. – 120 с.
10. Луговской ЕВ, Макогоненко ЄМ, Комісаренко СВ. Молекулярні механізми утворення та руйнування згустку. – К.: Наук. Думка, 2013. – 230 с.
11. Пантелеев МА, Свешникова АН. Тромбоциты и гемостаз. Онкогематология. 2014; 9(2): 65-73.
12. Петренко ОН, Безродный БГ, Тихомиров АА. Экзогенные коллагенолитические протеиназы в гнойных ранах у пациентов с синдромом диабетической стопы. Хирургия. Восточная Европа. 2015;2(14):57-67.

13. Рока-Мойя ЯМ, Жерносєков ДД, Гриненко ТВ. Вплив плазміногену/плазміну на агрегаційну здатність тромбоцитів. Biopolymers Cell. 2012;28(5):352-356.
14. Тихомиров АЛ. Алгоритм консервативного лечения миомы матки. Гинекология. 2013;15(5):92-94.
15. Тихомиров АО, Жерносєков ДД, Рока-Мойя ЯМ, Діордієва СІ, Гриненко ТВ. Вплив Lys-форми плазміногену на актиновий цитоскелет тромбоцитів. Фізіологічний журнал. 2014;60(1):25-33.
16. Тихомиров АО, Жерносєков ДД, Рока-Мойя ЯМ, Діордієва СІ, Гриненко ТВ. Вплив Lys-плазміногену на секрецію тромбоцитів людини. Фізіологічний журнал. 2015;61(6):26-34.
17. Фільченков О.О., Стойка Р.С. Апоптоз і рак: від теорії до практики. – Тернопіль: ТДМУ «Укрмедкнига», 2006. – 524 с.
18. Хайтлина СЮ. Механизмы сегрегации изоформ актина в клетке. Цитология. 2007;49(5):345-354.
19. Чехонин ВП, Шеин СА, Корчагина АА, Гурина ОИ. Роль VEGF в развитии неопластического ангиогенеза. Вестник РАМН. 2012; 2:23-34.
20. Чумаков ПМ. Белок P53 и его универсальные функции в многоклеточном организме. Успехи биологической химии. 2007; 47:3-52.
21. Шатурный ВИ, Шахиджанов СС, Свешникова АН, Пантелеев МА. Активаторы, рецепторы и пути внутриклеточной сигнализации в тромбоцитах крови. Биомед Хим. 2014;60(2):182-200.
22. Adelman B, Michelson AD, Greenberg J, Handin RI. Proteolysis of platelet glycoprotein Ib by plasmin is facilitated by plasmin lysine-binding regions. Blood. 1986;68(6):1280-1284.
23. Agarwal A, Muñoz-Nájar U, Klueh U, Shih SC, Claffey KP. N-acetyl-cysteine promotes angiostatin production and vascular collapse in an orthotopic model of breast cancer. Am J Pathol. 2004;164(5):1683-1696.

24. Ağca CA, Kırıcı M, Nedzvetsky VS, Gundogdu R, Tykhomyrov AA. The effect of TIGAR knockdown on apoptotic and epithelial- mesenchymal markers expression in doxorubicin- resistant non- small cell lung cancer A549 cell lines. Chemistry Biodiversity. 2020;17(9):e2000441.
25. Aguirre Ghiso JA, Kovalski K, Ossowski L. Tumor dormancy induced by downregulation of urokinase receptor in human carcinoma involves integrin and MAPK signaling. J Cell Biol. 1999;147(1):89-104.
26. Aisina RB, Mukhametova LI. Structure and function of plasminogen/plasmin system. Russ J Bioorg Chem. 2014;40,590-605.
27. Alber HF, Frick M, Dulak J, Dörler J, Zwick RH, Dichtl W, Pachinger O, Weidinger F. Vascular endothelial growth factor (VEGF) plasma concentrations in coronary artery disease. Heart. 2005;91(3):365-366.
28. Alegria-Schaffer A. Western blotting using chemiluminescent substrates. Methods Enzymol. 2014; 541: 251-259.
29. Altalhi R, Pechlivani N, Ajjan RA. PAI-1 in diabetes: pathophysiology and role as a therapeutic target. Int J Mol Sci. 2021;22(6):3170.
30. Alvarez-Sabín J, Román GC. The role of citicoline in neuroprotection and neurorepair in ischemic stroke. Brain Sci. 2013;3(3):1395-1414.
31. Amaravadi RK, Kimmelman AC, Debnath J. Targeting autophagy in cancer: recent advances and future directions. Cancer Discov. 2019;9(9):1167-1181.
32. Ambati BK, Joussen AM, Ambati J, Moromizato Y, Guha C, Javaherian K, Gillies S, O'Reilly MS, Adamis AP. Angiostatin inhibits and regresses corneal neovascularization. Arch Ophthalmol. 2002;120(8):1063-1068.
33. Ambrosio AL, Di Pietro SM. Storage pool diseases illuminate platelet dense granule biogenesis. Platelets. 2017;28(2):138-146.
34. Anderson KJ, Scheff SW, Miller KM, Roberts KN, Gilmer LK, Yang C, Shaw G. The phosphorylated axonal form of the neurofilament subunit NF-H (pNF-H) as a blood biomarker of traumatic brain injury. J Neurotrauma. 2008;25(9):1079-1085.
35. Andre P. P-selectin in haemostasis. Br J Haematol. 2004;126(3):298-306.

36. Andreasen PA, Egelund R, Petersen HH. The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis. Cell Mol Life Sci. 2000;57(1):25-40.
37. Andronicos NM, Ranson M. The topology of plasminogen binding and activation on the surface of human breast cancer cells. Br J Cancer. 2001; 85(6): 909-916.
38. Andronicos NM, Chen EI, Baik N, Bai H, Parmer CM, Kiosses WB, Kamps MP, Yates JR 3rd, Parmer RJ, Miles LA. Proteomics-based discovery of a novel, structurally unique, and developmentally regulated plasminogen receptor, Plg-R_{KT}, a major regulator of cell surface plasminogen activation. Blood. 2010;115(7):1319-1330.
39. Ansell PJ, Zhang H, Davidson DJ, Harlan JE, Xue J, Brodjian S, Lesniewski R, McKeegan E. Recombinant kringle 5 from plasminogen antagonises hepatocyte growth factor-mediated signalling. Eur J Cancer. 2010; 46(5):966-973.
40. Aponte PM, Caicedo A. Stemness in cancer: stem cells, cancer stem cells, and their microenvironment. Stem Cells Int. 2017;2017:5619472.
41. Aranda A, Sequedo L, Tolosa L, Quintas G, Burello E, Castell JV, Gombau L. Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) assay: a quantitative method for oxidative stress assessment of nanoparticle-treated cells. Toxicol In Vitro. 2013;27(2):954-963.
42. Arisato T, Hashiguchi T, Sarker KP, Arimura K, Asano M, Matsuo K, Osame M, Maruyama I. Highly accumulated platelet vascular endothelial growth factor in coagulant thrombotic region. J Thromb Haemost. 2003;1(12):2589-2593.
43. Armstrong DG, Boulton AJM, Bus SA. Diabetic Foot Ulcers and Their Recurrence. N Engl J Med. 2017;376(24):2367-2375.
44. Aslan JE. Platelet Rho GTPase regulation in physiology and disease. Platelets. 2019;30(1):17-22.
45. Astedt B, Lindoff C, Lecander I. Significance of the plasminogen activator inhibitor of placental type (PAI-2) in pregnancy. Semin Thromb Hemost. 1998;24(5):431-435.

46. Atkinson RA, Williams RJ. Solution structure of the kringle 4 domain from human plasminogen by 1H nuclear magnetic resonance spectroscopy and distance geometry. J Mol Biol. 1990;212(3):541-552.
47. Aulakh GK, Balachandran Y, Liu L, Singh B. Angiostatin inhibits activation and migration of neutrophils. Cell Tissue Res. 2014;355(2):375-396.
48. Ayuk SM, Abrahamse H, Houreld NN. The role of matrix metalloproteinases in diabetic wound healing in relation to photobiomodulation. J Diabetes Res. 2016;2016:2897656.
49. Baart VM, Houvast RD, de Geus-Oei LF, Quax PHA, Kuppen PJK, Vahrmeijer AL, Sier CFM. Molecular imaging of the urokinase plasminogen activator receptor: opportunities beyond cancer. EJNMMI Res. 2020;10(1):87.
50. Bachvaroff RJ, Miller F, Rapaport FT. Appearance of cytoskeletal components on the surface of leukemia cells and of lymphocytes transformed by mitogens and Epstein-Barr virus. Proc Natl Acad Sci U S A. 1980;77(8):4979-4983.
51. Badola S, Spurling H, Robison K, Fedyk ER, Silverman GA, Strayle J, Kapeller R, Tsu CA. Correlation of serpin-protease expression by comparative analysis of real-time PCR profiling data. Genomics. 2006;88(2):173-184.
52. Baeten KM, Richard MC, Kanse SM, Mutch NJ, Degen JL, Booth NA. Activation of single-chain urokinase-type plasminogen activator by platelet-associated plasminogen: a mechanism for stimulation of fibrinolysis by platelets. J Thromb Haemost. 2010,8(6):1313-1322.
53. Bai S, Sheline CT. NAD(+) maintenance attenuates light induced photoreceptor degeneration. Exp Eye Res. 2013;108:76-83.
54. Bajou K, Maillard C, Jost M, Lijnen RH, Gils A, Declerck P, Carmeliet P, Foidart JM, Noel A. Host-derived plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) concentration is critical for *in vivo* tumoral angiogenesis and growth. Oncogene. 2004;23(41):6986-6990.

55. Baker M, Robinson SD, Lechertier T, Barber PR, Tavora B, D'Amico G, Jones DT, Vojnovic B, Hodivala-Dilke K. Use of the mouse aortic ring assay to study angiogenesis. Nat Protoc. 2011;7(1):89-104.
56. Baker SK, Strickland S. A critical role for plasminogen in inflammation. J Exp Med. 2020;217(4):e20191865.
57. Balaggan KS, Binley K, Esapa M, MacLaren RE, Iqball S, Duran Y, Pearson RA, Kan O, Barker SE, Smith AJ, Bainbridge JW, Naylor S, Ali RR. EIAV vector-mediated delivery of endostatin or angiostatin inhibits angiogenesis and vascular hyperpermeability in experimental CNV. Gene Ther. 2006;13(15):1153-1165.
58. Balsara RD, Ploplis VA. Plasminogen activator inhibitor-1: the double-edged sword in apoptosis. Thromb Haemost. 2008;100(6):1029-1036.
59. Bang OY, Saver JL, Kim SJ, Kim GM, Chung CS, Ovbiagele B, Lee KH, Liebeskind DS. Collateral flow predicts response to endovascular therapy for acute ischemic stroke. Stroke. 2011;42(3):693-699.
60. Bansal A, Simon MC. Glutathione metabolism in cancer progression and treatment resistance. J Cell Biol. 2018;217(7):2291-2298.
61. Banys-Paluchowski M, Witzel I, Aktas B, Fasching PA, Hartkopf A, Janni W, Kasimir-Bauer S, Pantel K, Schön G, Rack B, Riethdorf S, Solomayer EF, Fehm T, Müller V. The prognostic relevance of urokinase-type plasminogen activator (uPA) in the blood of patients with metastatic breast cancer. Sci Rep. 2019;9(1):2318.
62. Barrett TJ. Macrophages in atherosclerosis regression. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2020;40(1):20-33.
63. Basile DP, Fredrich K, Weihrauch D, Hattan N, Chilian WM. Angiostatin and matrix metalloprotease expression following ischemic acute renal failure. Am J Physiol Renal Physiol. 2004;286(5):F893-902.
64. Battinelli EM, Markens BA, Italiano JE Jr. Release of angiogenesis regulatory proteins from platelet alpha granules: modulation of physiologic and pathologic angiogenesis. Blood. 2011;118(5):1359-1369.

65. Battinelli EM, Thon JN, Okazaki R, Peters CG, Vijey P, Wilkie AR, Noetzli LJ, Flaumenhaft R, Italiano JE. Megakaryocytes package contents into separate α-granules that are differentially distributed in platelets. Blood Adv. 2019;3(20):3092-3098.
66. Bazalii AV, Horak IR, Pasichnyk GV, Komisarenko SV, Drobot LB. Transcriptional regulation of NOX genes express ion in human breast adenocarcinoma MCF-7 cells is modulated by adaptor protein Ruk/CIN85. Ukr Biochem J. 2016;88(1):119-125.
67. Benelli R, Morini M, Brigati C, Noonan DM, Albini A. Angiostatin inhibits extracellular HIV-Tat-induced inflammatory angiogenesis. Int J Oncol. 2003;22(1):87-91.
68. Bensaad K, Cheung EC, Vousden KH. Modulation of intracellular ROS levels by TIGAR controls autophagy. EMBO J. 2009;28(19);3015-3026.
69. Bergman MR, Teerlink JR, Mahimkar R, Li L, Zhu BQ, Nguyen A, Dahi S, Karliner JS, Lovett DH. Cardiac matrix metalloproteinase-2 expression independently induces marked ventricular remodeling and systolic dysfunction. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2007;292(4):H1847-1860.
70. Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. Biotechnol Annu Rev. 2005;11:127-152.
71. Bharadwaj AG, Holloway RW, Miller VA, Waisman DM. Plasmin and plasminogen system in the tumor microenvironment: implications for cancer diagnosis, prognosis, and therapy. Cancers (Basel). 2021;13(8):1838.
72. Biagioni A, Laurenzana A, Menicacci B, et al. uPAR-expressing melanoma exosomes promote angiogenesis by VE-Cadherin, EGFR and uPAR overexpression and rise of ERK1,2 signaling in endothelial cells. Cell Mol Life Sci. 2021;78(6):3057-3072.
73. Bilous VL, Kapustianenko LG, Tykhomyrov AA. Production and application of angiostatins for the treatment of ocular neovascular diseases. Biotechnologia Acta. 2021;14(1):5-24.

74. Biskou O, Casanova V, Hooper KM, Kemp S, Wright GP, Satsangi J, Barlow PG, Stevens C. The type III intermediate filament vimentin regulates organelle distribution and modulates autophagy. PLoS One. 2019;14(1):e0209665.
75. Blake GJ, Ridker PM. C-reactive protein and other inflammatory risk markers in acute coronary syndromes. J Am Coll Cardiol. 2003;41(4 Suppl S):37S-42S.
76. Blakytny R, Jude E. The molecular biology of chronic wounds and delayed healing in diabetes. Diabet Med. 2006;23(6):594-608.
77. Blum A, Porat R, Rosenschein U, Keren G, Roth A, Laniado S, Miller H. Clinical and inflammatory effects of dietary L-arginine in patients with intractable angina pectoris. Am J Cardiol. 1999;83(10):1488-1490.
78. Böcker W. WHO-Klassifikation der Tumoren der Mamma und des weiblichen Genitale: Pathologie und Genetik [WHO classification of breast tumors and tumors of the female genital organs: pathology and genetics]. Verh Dtsch Ges Pathol. 2002;86:116-119.
79. Bodin S, Soulet C, Tronchère H, Sié P, Gachet C, Plantavid M, Payrastre B. Integrin-dependent interaction of lipid rafts with the actin cytoskeleton in activated human platelets. J Cell Sci. 2005;118(Pt 4):759-769.
80. Boodhwani M, Sodha NR, Mieno S, Xu SH, Feng J, Ramlawi B, Clements RT, Sellke FW. Functional, cellular, and molecular characterization of the angiogenic response to chronic myocardial ischemia in diabetes. Circulation. 2007;116(11 Suppl):I31-37.
81. Boone TJ, Burnham CA, Tyrrell GJ. Binding of group B streptococcal phosphoglycerate kinase to plasminogen and actin. Microb Pathog. 2011 Oct;:255-261.
82. Bot I, von der Thüsen JH, Donners MM, Lucas A, Fekkes ML, de Jager SC, Kuiper J, Daemen MJ, van Berkel TJ, Heeneman S, Biessen EA. Serine protease inhibitor Serp-1 strongly impairs atherosclerotic lesion formation and induces a stable plaque phenotype in ApoE-/-mice. Circ Res. 2003;93(5):464-471.

83. Brands-Nijenhuis AV, van Geel PP, Meijer K. Acute myocardial ischemia in a patient with heterozygous alpha-2-plasmin inhibitor deficiency. Blood Coagul Fibrinolysis. 2009;20(7):599-600.
84. Brass LF. Thrombin and platelet activation. Chest. 2003;124(3 Suppl):18S-25S.
85. Brass L. Understanding and evaluating platelet function. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2010; 2010:387-396.
86. Bratt A, Birot O, Sinha I, Veitonmäki N, Aase K, Ernkvist M, Holmgren L. Angiomotin regulates endothelial cell-cell junctions and cell motility. J Biol Chem. 2005;280(41):34859-34869.
87. Bres EE, Faissner A. Low density receptor-related protein 1 interactions with the extracellular matrix: more than meets the eye. Front Cell Dev Biol. 2019;7:31.
88. Briens A, Bardou I, Lebas H, Miles LA, Parmer RJ, Vivien D, Docagne F. Astrocytes regulate the balance between plasminogen activation and plasmin clearance via cell-surface actin. Cell Discov. 2017;3:17001.
89. Brubaker AL, Rendon JL, Ramirez L, Choudhry MA, Kovacs EJ. Reduced neutrophil chemotaxis and infiltration contributes to delayed resolution of cutaneous wound infection with advanced age. J Immunol. 2013;190(4):1746-1757.
90. Burkhart JM, Vaudel M, Gambaryan S, Radau S, Walter U, Martens L, Geiger J, Sickmann A, Zahedi RP. The first comprehensive and quantitative analysis of human platelet protein composition allows the comparative analysis of structural and functional pathways. Blood. 2012;120(15):e73-82.
91. Burwick NR, Wahl ML, Fang J, Zhong Z, Moser TL, Li B, Capaldi RA, Kenan DJ, Pizzo SV. An Inhibitor of the F1 subunit of ATP synthase (IF1) modulates the activity of angiostatin on the endothelial cell surface. J Biol Chem. 2005;280(3):1740-1745.
92. Bydoun M, Sterea A, Weaver ICG, Bharadwaj AG, Waisman DM. A novel mechanism of plasminogen activation in epithelial and mesenchymal cells. Sci Rep. 2018;8(1):14091.

93. Cai Q, Yan L, Xu Y. Anoikis resistance is a critical feature of highly aggressive ovarian cancer cells. Oncogene. 2015;34(25):3315-3324.
94. Cao Y, Xue L. Angiostatin. Semin Thromb Hemost. 2004;30(1):83-93.
95. Cao Y, Klionsky DJ. Physiological functions of Atg6/Beclin 1: a unique autophagy-related protein. Cell Res. 2007;17(10):839-849.
96. Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. Cancer Res. 1987;47(4):936-942.
97. Carmo AA, Costa BR, Vago JP, de Oliveira LC, Tavares LP, Nogueira CR, Ribeiro AL, Garcia CC, Barbosa AS, Brasil BS, Dusse LM, Barcelos LS, Bonjardim CA, Teixeira MM, Sousa LP. Plasmin induces in vivo monocyte recruitment through protease-activated receptor-1-, MEK/ERK-, and CCR2-mediated signaling. J Immunol. 2014;193(7):3654-3663.
98. Carpenter SL, Mathew P. Alpha2-antiplasmin and its deficiency: fibrinolysis out of balance. Haemophilia. 2008;14(6):1250-1254.
99. Castellino FJ, McCance SG. The kringle domains of human plasminogen. Ciba Found Symp. 1997;212:46-60.
100. Castellino FJ, Ploplis VA. Structure and function of the plasminogen/plasmin system. Thromb Haemost. 2005;93(4):647-654.
101. Cederholm-Williams SA. Concentration of plasminogen and antiplasmin in plasma and serum. J Clin Pathol. 1981;34:979-981.
102. Ceruti P, Principe M, Capello M, Cappello P, Novelli F. Three are better than one: plasminogen receptors as cancer theranostic targets. Exp Hematol Oncol. 2013;2(1):12.
103. Cesari M, Pahor M, Incalzi RA. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1): a key factor linking fibrinolysis and age-related subclinical and clinical conditions. Cardiovasc Ther. 2010;28(5):e72-91.
104. Cesarman-Maus G, Hajjar KA. Molecular mechanisms of fibrinolysis. Br J Haematol. 2005;129(3):307-21.

105. Chan B, VanderLaan PA, Sukhatme VP. 6-Phosphogluconate dehydrogenase regulates tumor cell migration in vitro by regulating receptor tyrosine kinase c-Met. Biochem Biophys Res Commun. 2013;439(2):247-251.
106. Chana-Muñoz A, Jendroszek A, Sønnichsen M, Wang T, Ploug M, Jensen JK, Andreasen PA, Bendixen C, Panitz F. Origin and diversification of the plasminogen activation system among chordates. BMC Evol Biol. 2019;19(1):27.
107. Chandrasekar N, Mohanam S, Gujrati M, Olivero WC, Dinh DH, Rao JS. Downregulation of uPA inhibits migration and PI3k/Akt signaling in glioblastoma cells. Oncogene. 2003;22(3):392-400.
108. Chang PC, Wu HL, Lin HC, Wang KC, Shi GY. Human plasminogen kringle 1-5 reduces atherosclerosis and neointima formation in mice by suppressing the inflammatory signaling pathway. J Thromb Haemost. 2010;8(1):194-201.
109. Chavakis E, Dimmeler S. Regulation of endothelial cell survival and apoptosis during angiogenesis. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2002;22(6):887-893.
110. Chavakis T, Athanasopoulos A, Rhee JS, Orlova V, Schmidt-Wöll T, Bierhaus A, May AE, Celik I, Nawroth PP, Preissner KT. Angiostatin is a novel anti-inflammatory factor by inhibiting leukocyte recruitment. Blood. 2005;105(3):1036-1043.
111. Chavez-Dominguez R, Perez-Medina M, Lopez-Gonzalez JS, Galicia-Velasco M, Aguilar-Cazares D. The double-edge sword of autophagy in cancer: from tumor suppression to pro-tumor activity. Front Oncol. 2020;10:578418.
112. Chekenya M, Hjelstuen M, Enger PØ, Thorsen F, Jacob AL, Probst B, Haraldseth O, Pilkington G, Butt A, Levine JM, Bjerkvig R. NG2 proteoglycan promotes angiogenesis-dependent tumor growth in CNS by sequestering angiostatin. FASEB J. 2002;16(6):586-588.
113. Chen LY, Nichols WW, Saldeen TG, Mehta JL. Recombinant lys-plasminogen given before, but not after, recombinant tissue-type plasminogen

activator markedly improves coronary thrombolysis in dogs: relationship of thrombolytic efficacy with parameters of fibrinolysis. J Cardiovasc Pharmacol. 1996;27(2):283-289.

114. Chen YH, Wu HL, Chen CK, Huang YH, Yang BC, Wu LW. Angiostatin antagonizes the action of VEGF-A in human endothelial cells via two distinct pathways. Biochem Biophys Res Commun. 2003;310(3):804-810.
115. Chen K, Bai H, Arzigian M, Gao YX, Bao J, Wu WS, Shen WF, Wu L, Wang ZZ. Endothelial cells regulate cardiomyocyte development from embryonic stem cells. J Cell Biochem. 2010;111(1):29-39.
116. Chew HK, Davies AM, Wun T, Harvey D, Zhou H, White RH. The incidence of venous thromboembolism among patients with primary lung cancer. J Thromb Haemost. 2008;6(4):601-608.
117. Chi SL, Pizzo SV. Angiostatin is directly cytotoxic to tumor cells at low extracellular pH: a mechanism dependent on cell surface-associated ATP synthase. Cancer Res. 2006;66(2):875-882.
118. Chi SL, Pizzo SV. Cell surface F_1F_o ATP synthase: a new paradigm? Ann Med. 2006;38(6):429-438.
119. Chipuk JE, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Droin NM, Newmeyer DD, Schuler M, Green DR. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. Science. 2004;303(5660):1010-1014.
120. Chistiakov DA, Grechko AV, Myasoedova VA, Melnichenko AA, Orekhov AN. The role of monocytosis and neutrophilia in atherosclerosis. J Cell Mol Med. 2018;22(3):1366-1382.
121. Choi AR, Kim JH, Yoon S. Sensitization of cancer cells through reduction of total Akt and downregulation of salinomycin-induced pAkt, pGSk3β, pTSC2, and p4EBP1 by cotreatment with MK-2206. Biomed Res Int. 2014;2014:295760.
122. Christen MT, Frank P, Schaller J, Llinás M. Human plasminogen kringle 3: solution structure, functional insights, phylogenetic landscape. Biochemistry. 2010;49(33):7131-7150.

123. Chu Y, Chang Y, Lu W, Sheng X, Wang S, Xu H, Ma J. Regulation of autophagy by glycolysis in cancer. Cancer Manag Res. 2020;12:13259-13271.
124. Chung AW, Hsiang YN, Matzke LA, McManus BM, van Breemen C, Okon EB. Reduced expression of vascular endothelial growth factor paralleled with the increased angiostatin expression resulting from the upregulated activities of matrix metalloproteinase-2 and -9 in human type 2 diabetic arterial vasculature. Circ Res. 2006;99(2):140-148.
125. Clemetson K.J., Clemetson J.M. Platelet collagen receptors. Thromb Haemost. 2001;86(1):189-197.
126. Cochain C, Channon KM, Silvestre JS. Angiogenesis in the infarcted myocardium. Antioxid Redox Signal. 2013;18(9):1100-1113.
127. Collet JP, Montalescot G, Vicaut E, et al. Acute release of plasminogen activator inhibitor-1 in ST-segment elevation myocardial infarction predicts mortality. Circulation. 2003;108(4):391-394.
128. Conde Montero E, Guisado Muñoz S, Pérez Jerónimo L, Peral Vazquez A, Montoro Lopez JJ, Hocajada Reales C, Baniandrés Rodriguez O, de la Cueva Dobao P. Martorell hypertensive ischemic ulcer successfully treated with punch skin grafting. Wounds. 2018;30(2):E9-12.
129. Coppini LP, Visniauskas B, Costa EF, Filho MN, Rodrigues EB, Chagas JR, Farah ME, Barros NM, Carmona AK. Corneal angiogenesis modulation by cysteine cathepsins: In vitro and in vivo studies. Exp Eye Res. 2015;134:39-46.
130. Cornelius LA, Nehring LC, Harding E, Bolanowski M, Welgus HG, Kobayashi DK, Pierce RA, Shapiro SD. Matrix metalloproteinases generate angiostatin: effects on neovascularization. J Immunol. 1998;161(12):6845-6852.
131. Cozen AE, Moriwaki H, Kremen M, DeYoung MB, Dichek HL, Slezicki KI, Young SG, Véniant M, Dichek DA. Macrophage-targeted overexpression of urokinase causes accelerated atherosclerosis, coronary artery occlusions, and premature death. Circulation. 2004;109(17):2129-2135.

132. Crippa MP. Urokinase-type plasminogen activator. Int J Biochem Cell Biol. 2007;39(4):690-694.
133. Cvirn G, Gallistl S, Koestenberger M, Kutschera J, Leschnik B, Muntean W. Alpha 2-macroglobulin enhances prothrombin activation and thrombin potential by inhibiting the anticoagulant protein C/protein S system in cord and adult plasma. Thromb Res. 2002;105(5):433-439.
134. Czekay RP, Loskutoff DJ. Plasminogen activator inhibitors regulate cell adhesion through a uPAR-dependent mechanism. J Cell Physiol. 2009;220(3):655-663.
135. Czekay RP, Wilkins-Port CE, Higgins SP, Freytag J, Overstreet JM, Klein RM, Higgins CE, Samarakoon R, Higgins PJ. PAI-1: An integrator of cell signaling and migration. Int J Cell Biol. 2011;2011:562481.
136. Dabrosin C, Gyorffy S, Margetts P, Ross C, Gauldie J. Therapeutic effect of angiostatin gene transfer in a murine model of endometriosis. Am J Pathol. 2002;161(3):909-918.
137. Dale GL. Coated-platelets: an emerging component of the procoagulant response. J Thromb Haemost. 2005;3(10):2185-2192.
138. D'Alessio S, Blasi F. The urokinase receptor as an entertainer of signal transduction. Front Biosci (Landmark Ed). 2009;14:4575-4587.
139. Das R, Pluskota E, Plow EF. Plasminogen and its receptors as regulators of cardiovascular inflammatory responses. Trends Cardiovasc Med. 2010; 20(4):120-124.
140. Das A, Ganesh K, Khanna S, Sen CK, Roy S. Engulfment of apoptotic cells by macrophages: a role of microRNA-21 in the resolution of wound inflammation. J Immunol. 2014;192(3):1120-9.
141. Dass K, Ahmad A, Azmi AS, Sarkar SH, Sarkar FH. Evolving role of uPA/uPAR system in human cancers. Cancer Treat Rev. 2008;34(2):122-136.
142. Davidson DJ, Castellino FJ. The influence of the nature of the asparagine 289-linked oligosaccharide on the activation by urokinase and lysine binding properties of natural and recombinant human plasminogens. J Clin Invest. 1993;92(1):249-254.

143. De Cortin ME, Brass LF, Diamond SL. Core and shell platelets of a thrombus: A new microfluidic assay to study mechanics and biochemistry. Res Pract Thromb Haemost. 2020;4(7):1158-1166.
144. De Filippis AP, Chernyavskiy I, Amraotkar AR, et al. Circulating levels of plasminogen and oxidized phospholipids bound to plasminogen distinguish between atherothrombotic and non-atherothrombotic myocardial infarction. J Thromb Thrombolysis. 2016;42(1):61-76.
145. De Oliveira DM, Law RH, Ly D, Cook SM, Quek AJ, McArthur JD, Whisstock JC, Sanderson-Smith ML. Preferential acquisition and activation of plasminogen glycoform II by PAM positive group A streptococcal isolates. Biochemistry. 2015;54(25):3960-3968.
146. De Palma M, Biziato D, Petrova TV. Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis. Nat Rev Cancer. 2017;17(8):457-474.
147. De Soto JA, Deng CX. PARP-1 inhibitors: are they the long-sought genetically specific drugs for BRCA1/2-associated breast cancers? Int J Med Sci. 2006;3(4):117-123.
148. De Taeye B, Gils A, Declerck PJ. The story of the serpin plasminogen activator inhibitor 1: is there any need for another mutant? Thromb Haemost. 2004;92(5):898-924.
149. Degen A, Millenaar D, Schirmer SH. Therapeutic approaches in the stimulation of the coronary collateral circulation. Curr Cardiol Rev. 2014;10(1):65-72.
150. Dejouvencel T, Doeuvre L, Lacroix R, Plawinski L, Dignat-George F, Lijnen HR, Anglés-Cano E. Fibrinolytic cross-talk: a new mechanism for plasmin formation. Blood. 2010;115(10):2048-2056.
151. Deng W, Boey J, Chen B, Byun S, Lew E, Liang Z, Armstrong DG. Platelet-rich plasma, bilayered acellular matrix grafting and negative pressure wound therapy in diabetic foot infection. J Wound Care. 2016;25(7):393-397.
152. der Bom JG, de Knijff P, Haverkate F, Bots ML, Meijer P, de Jong PT, Hofman A, Kluft C, Grobbee DE. Tissue plasminogen activator and risk of

myocardial infarction. The Rotterdam Study. Circulation. 1997;95(12):2623-2627.

153. Deryugina EI, Quigley JP. Cell surface remodeling by plasmin: a new function for an old enzyme. J Biomed Biotechnol. 2012;2012:564259.
154. Deutsch DG, Mertz ET. Plasminogen: purification from human plasma by affinity chromatography. Science. 1970;170(3962):1095-1096.
155. Devy L, Blacher S, Grignet-Debrus C, Bajou K, Masson V, Gerard RD, Gils A, Carmeliet G, Carmeliet P, Declerck PJ, Nöel A, Foidart JM. The pro- or antiangiogenic effect of plasminogen activator inhibitor 1 is dose dependent. FASEB J. 2002;16(2):147-154.
156. Di Pietro LA. Angiogenesis and wound repair: when enough is enough. J Leukoc Biol. 2016;100(5):979-984.
157. Di Vito C, Navone SE, Marfia G, Abdel Hadi L, Mancuso ME, Pecci A, Crisà FM, Berno V, Rampini P, Campanella R, Riboni L. Platelets from glioblastoma patients promote angiogenesis of tumor endothelial cells and exhibit increased VEGF content and release. Platelets. 2017;28(6):585-594.
158. Díaz-Ricart M, Arderiu G, Estebanell E, Pérez-Pujol S, Lozano M, White JG, Escolar G, Ordinas A. Inhibition of cytoskeletal assembly by cytochalasin B prevents signaling through tyrosine phosphorylation and secretion triggered by collagen but not by thrombin. Am J Pathol. 2002;160(1):329-337.
159. Dodd T, Wiggins L, Hutcheson R, et al. Impaired coronary collateral growth in the metabolic syndrome is in part mediated by matrix metalloproteinase 12-dependent production of endostatin and angiostatin. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2013;33(6):1339-1349.
160. Doeuvre L, Plawinski L, Goux D, Vivien D, Anglés-Cano E. Plasmin on adherent cells: from microvesiculation to apoptosis. Biochem J. 2010;432(2):365-373.
161. Dolinschek R, Hingerl J, Benge A, Zafiu C, Schüren E, Ehmoser EK, Lössner D, Reuning U. Constitutive activation of integrin αvβ3 contributes to anoikis resistance of ovarian cancer cells. Mol Oncol. 2021;15(2):503-522.

162. Doll JA, Soff GA. Angiostatin. Cancer Treat Res. 2005;126:175-204.
163. Dominguez M, Rojas G, Loyau S, et al. Kringles of the plasminogen-prothrombin gene family share conformational epitopes with recombinant apolipoprotein (a): specificity of the fibrin-binding site. Biochim. Biophys. Acta. 2001;1548(1):72-80.
164. Donate LE, Gherardi E, Srinivasan N, Sowdhamini R, Aparicio S, Blundell TL. Molecular evolution and domain structure of plasminogen-related growth factors (HGF/SF and HGF1/MSP). Protein Sci. 1994;3(12):2378-2394.
165. Dong Z, Yoneda J, Kumar R, Fidler IJ. Angiostatin-mediated suppression of cancer metastases by primary neoplasms engineered to produce granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. J Exp Med. 1998;188(4):755-763.
166. Dorrington MG, Fraser IDC. NF-κB signaling in macrophages: dynamics, crosstalk, and signal integration. Front Immunol. 2019;10:705.
167. Dovnik NF, Takac I. Prognostic significance of uPA/PAI-1 level, HER2 status, and traditional histologic factors for survival in node-negative breast cancer patients. Radiol Oncol. 2016;51(1):65-73.
168. Drabik L, Wołkow P, Undas A. Denser plasma clot formation and impaired fibrinolysis in paroxysmal and persistent atrial fibrillation while on sinus rhythm: association with thrombin generation, endothelial injury and platelet activation. Thromb Res. 2015;136(2):408-414.
169. Drel VR, Pacher P, Stavniichuk R, Xu W, Zhang J, Kuchmerovska TM, Slusher B, Obrosova IG. Poly(ADP-ribose)polymerase inhibition counteracts renal hypertrophy and multiple manifestations of peripheral neuropathy in diabetic Akita mice. Int J Mol Med. 2011;28(4):629-635.
170. Drenberg CD, Saunders BO, Wilbanks GD, Chen R, Nicosia RF, Kruk PA, Nicosia SV. Urinary angiostatin levels are elevated in patients with epithelial ovarian cancer. Gynecol Oncol. 2010;117(1):117-124.
171. Drinkwater SL, Smith A, Sawyer BM, Burnand KG. Effect of venous ulcer exudates on angiogenesis *in vitro*. Br J Surg. 2002; 89(6);709-713.

172. Drinkwater SL, Burnand KG, Ding R, Smith A. Increased but ineffectual angiogenic drive in nonhealing venous leg ulcers. J Vasc Surg. 2003;38(5):1106-1112.
173. Drixler TA, Borel Rinkes IH, Ritchie ED, Treffers FW, van Vroonhoven TJ, Gebbink MF, Voest EE. Angiostatin inhibits pathological but not physiological retinal angiogenesis. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2001;42(13):3325-3330.
174. Dudani AK, Ganz PR. Endothelial cell surface actin serves as a binding site for plasminogen, tissue plasminogen activator and lipoprotein(a). Br J Haematol. 1996;95(1):168-178.
175. Dudani AK, Ben-Tchavtchavadze M, Porter S, Tackaberry E. Angiostatin and plasminogen share binding to endothelial cell surface actin. Biochem Cell Biol. 2005;83(1):28-35.
176. Duh EJ, Sun JK, Stitt AW. Diabetic retinopathy: current understanding, mechanisms, and treatment strategies. JCI Insight. 2017;2(14):e93751.
177. Dulak J, Józkowicz A, Dembinska-Kiec A, Guevara I, Zdzienicka A, Zmudzinska-Grochot D, Florek I, Wójtowicz A, Szuba A, Cooke JP. Nitric oxide induces the synthesis of vascular endothelial growth factor by rat vascular smooth muscle cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2000;20(3):659-666.
178. Eagleton MJ, Peterson DA, Sullivan VV, Roelofs KJ, Ford JA, Stanley JC, Upchurch GR Jr. Nitric oxide inhibition increases aortic wall matrix metalloproteinase-9 expression. J Surg Res. 2002;104(1):15-21.
179. Eastlake K, Luis J, Limb GA. Potential of Müller glia for retina neuroprotection. Curr Eye Res. 2020;45(3):339-348.
180. Ebaid H. Neutrophil depletion in the early inflammatory phase delayed cutaneous wound healing in older rats: improvements due to the use of un-denatured camel whey protein. Diagn Pathol. 2014;9:46.
181. Ebisch IM, Thomas CM, Wetzels AM, Willemsen WN, Sweep FC, Steegers-Theunissen RP. Review of the role of the plasminogen activator system and

vascular endothelial growth factor in subfertility. Fertil Steril. 2008;90(6):2340-2350.

182. Edlich F, Banerjee S, Suzuki M, Cleland MM, Arnoult D, Wang C, Neutzner A, Tjandra N, Youle RJ. Bcl-x(L) retrotranslocates Bax from the mitochondria into the cytosol. Cell. 2011;145(1):104-116.
183. Eitzman DT, Westrick RJ, Xu Z, Tyson J, Ginsburg D. Plasminogen activator inhibitor-1 deficiency protects against atherosclerosis progression in the mouse carotid artery. Blood. 2000;96(13):4212-4215.
184. Ellis V, Behrendt N, Danø K. Plasminogen activation by receptor-bound urokinase. A kinetic study with both cell-associated and isolated receptor. J Biol Chem. 1991;266(19):12752-12758.
185. Eming SA, Krieg T. Molecular mechanisms of VEGF-A action during tissue repair. J Investig Dermatol Symp Proc. 2006;11(1):79-86.
186. Engel FB, Hauck L, Boehm M, Nabel EG, Dietz R, von Harsdorf R. p21(CIP1) Controls proliferating cell nuclear antigen level in adult cardiomyocytes. Mol Cell Biol. 2003;23(2):555-565.
187. Ertürk İ, Sertoğlu E, Yeşildal F, Acar R, Özgürtaş T, Sağlam K. Angiostatin levels in diabetes mellitus patients receiving insulin treatment: associations with laboratory findings, comorbidities, and medications. Turk J Med Sci. 2018;48(6):1192-1199.
188. Estevez B, Du X. New concepts and mechanisms of platelet activation signaling. Physiology (Bethesda). 2017;32(2):162-177.
189. Etulain J, Mena HA, Negrotto S, Schattner M. Stimulation of PAR-1 or PAR-4 promotes similar pattern of VEGF and endostatin release and pro-angiogenic responses mediated by human platelets. Platelets. 2015;26(8):799-804.
190. Falcone DJ, Khan KM, Layne T, Fernandes L. Macrophage formation of angiostatin during inflammation. A byproduct of the activation of plasminogen. J Biol Chem. 1998;273(47):31480-31485.

191. Fallah M, Viklund E, Bäckman A, et al. Plasminogen is a master regulator and a potential drug candidate for the healing of radiation wounds. Cell Death Dis. 2020;11(3):201.
192. Fang S, Hong H, Li L, He D, Xu Z, Zuo S, Han J, Wu Q, Dai Z, Cai W, Ma J, Shao C, Gao G, Yang X. Plasminogen kringle 5 suppresses gastric cancer via regulating HIF-1α and GRP78. Cell Death Dis. 2017;8(10):e3144.
193. Fares J, Fares MY, Khachfe HH, Salhab HA, Fares Y. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. Signal Transduct Target Ther. 2020;5(1):28.
194. Farndale RW. Collagen-induced platelet activation. Blood Cells Mol Dis. 2006;36(2):162-165.
195. Fay WP, Garg N, Sunkar M. Vascular functions of the plasminogen activation system. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2007;27(6):1231-1237.
196. Feinberg WM, Macy E, Cornell ES, Nightingale SD, Pearce LA, Tracy RP, Bovill EG. Plasmin-alpha2-antiplasmin complex in patients with atrial fibrillation. Stroke Prevention in Atrial Fibrillation Investigators. Thromb Haemost. 1999;82(1):100-103.
197. Felez J, Chanquia CJ, Fabregas P, Plow EF, Miles LA. Competition between plasminogen and tissue plasminogen activator for cellular binding sites. Blood. 1993;82(8):2433-2441.
198. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. Nat Med. 2003;9:669-676.
199. Fiorito C, Balestrieri ML, Crimi E, Giovane A, Grimaldi V, Minucci PB, Servillo L, D'Armiento FP, Farzati B, Napoli C. Effect of L-arginine on circulating endothelial progenitor cells and VEGF after moderate physical training in mice. Int J Cardiol. 2008;126(3):421-423.
200. Foley JH, Conway EM. Cross talk pathways between coagulation and inflammation. Circ Res. 2016;118(9):1392-1408.
201. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. N Engl J Med. 1971;285(21):1182-1186.

202. Folkman J. Angiogenesis and proteins of the hemostatic system. J Thromb Haemost. 2003;1(8):1681-1682.
203. Fox JE. The platelet cytoskeleton. Thromb. Haemost. 1993;70(6):884-893.
204. Frangogiannis NG. The Extracellular Matrix in Ischemic and Nonischemic Heart Failure. Circ Res. 2019;125(1):117-146.
205. Fredenburgh JC, Nesheim ME. Lys-plasminogen is a significant intermediate in the activation of Glu-plasminogen during fibrinolysis *in vitro*. J Biol Chem. 1992;267(36):26150-26156.
206. Frenette PS, Johnson RC, Hynes RO, Wagner DD. Platelets roll on stimulated endothelium *in vivo*: an interaction mediated by endothelial P-selectin. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995;92(16):7450-7454.
207. Freynhofer MK, Draxler DF, Gruber SC, Bruno V, Höchtl T, Fellner B, Jakl-Kotauschek G, Wojta J, Pabinger-Fasching I, Huber K, Ay C. Endogenous t-PA-antigen is an independent predictor of adverse cardiovascular events and all-cause death in patients with atrial fibrillation. J Thromb Haemost. 2013;11(6):1069-1077.
208. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. Clin Chem. 1972;18(6):499-502.
209. Friedrichs K, Klinke A, Baldus S. Inflammatory pathways underlying atrial fibrillation. Trends Mol Med. 2011;17(10):556-563.
210. Frykberg RG, Banks J. Challenges in the treatment of chronic wounds. Adv Wound Care (New Rochelle). 2015;4(9):560-582.
211. Fuentes RE, Zaitsev S, Ahn HS, et al. A chimeric platelet-targeted urokinase prodrug selectively blocks new thrombus formation. J Clin Invest. 2016;126(2):483-94.
212. Gao G, Li Y, Gee S, Dudley A, Fant J, Crosson C, Ma JX. Down-regulation of vascular endothelial growth factor and up-regulation of pigment epithelium-derived factor: a possible mechanism for the anti-angiogenic activity of plasminogen kringle 5. J Biol Chem. 2002;277(11):9492-9497.

213. Garcia VP, Rocha HNM, Silva GM, Amaral TAG, Secher NH, Nóbrega ACL, Vianna LC, Rocha NG. Exogenous l-arginine reduces matrix metalloproteinase-2 and -9 activities and oxidative stress in patients with hypertension. Life Sci. 2016;157:125-130.
214. Gardiner EE, Medcalf RL. Is plasminogen activator inhibitor type 2 really a plasminogen activator inhibitor after all? J Thromb Haemost. 2014;12(10):1703-1705.
215. Garvin P, Nilsson L, Carstensen J, Jonasson L, Kristenson M. Circulating matrix metalloproteinase-9 is associated with cardiovascular risk factors in a middle-aged normal population. PLoS One. 2008;3(3):e1774.
216. Gately S, Twardowski P, Stack MS, et al. The mechanism of cancer-mediated conversion of plasminogen to the angiogenesis inhibitor angiostatin. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;94(20):10868-10872.
217. Gawaz M, Langer H, May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis. J Clin Invest. 2005;115(12):3378-3384.
218. Gawaz M, Vogel S. Platelets in tissue repair: control of apoptosis and interactions with regenerative cells. Blood. 2013;122(15):2550-2554.
219. Gear AR, Suttitanamongkol S, Viisoreanu D, Polanowska-Grabowska RK, Raha S, Camerini D. Adenosine diphosphate strongly potentiates the ability of the chemokines MDC, TARC, and SDF-1 to stimulate platelet function. Blood. 2001;97(4):937-945.
220. Geiger JH, Cnudde SE. What the structure of angiostatin may tell us about its mechanism of action. J Thromb Haemost. 2004n;2(1):23-34.
221. George JN, Lyons RM, Morgan RK. Membrane changes associated with platelet activation. Exposure of actin on the platelet surface after thrombin-induced secretion. J Clin Invest. 1980;66(1):1-9.
222. Gerlicz-Kowalczuk Z, Dziankowska-Zaborszczyk E, Dziankowska-Bartkowiak B. Circulating angiostatin serum level in patients with systemic sclerosis. Postepy Dermatol Alergol. 2017;34(6):543-546.

223. Gherardi E, Sandin S, Petoukhov MV, Finch J, Youles ME, Ofverstedt LG, Miguel RN, Blundell TL, Vande Woude GF, Skoglund U, Svergun DI. Structural basis of hepatocyte growth factor/scatter factor and MET signalling. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(11):4046-4051.
224. Ghosh A, Chen TC, Kapila YL. Anoikis triggers Mdm2-dependent p53 degradation. Mol Cell Biochem. 2010;343(1-2):201-209.
225. Ghoshal K, Bhattacharyya M. Overview of platelet physiology: its hemostatic and nonhemostatic role in disease pathogenesis. ScientificWorldJournal. 2014;2014:781857.
226. Godier A, Hunt BJ. Plasminogen receptors and their role in the pathogenesis of inflammatory, autoimmune and malignant disease. J Thromb Haemost. 2013;11(1):26-34.
227. Golebiewska EM, Poole AW. Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. Blood Rev. 2015;29(3):153-162.
228. Gondi CS, Lakka SS, Yanamandra N, Siddique K, Dinh DH, Olivero WC, Gujrati M, Rao JS. Expression of antisense uPAR and antisense uPA from a bicistronic adenoviral construct inhibits glioma cell invasion, tumor growth, and angiogenesis. Oncogene. 2003;22(38):5967-5975.
229. Gong Y, Kim SO, Felez J, Grella DK, Castellino FJ, Miles LA. Conversion of Glu-plasminogen to Lys-plasminogen is necessary for optimal stimulation of plasminogen activation on the endothelial cell surface. J Biol Chem. 2001;276(22):19078-19083.
230. Gonias SL, Hu J. Urokinase receptor and resistance to targeted anticancer agents. Front Pharmacol. 2015;6:154.
231. Gonias SL, Zampieri C. Plasminogen receptors in human malignancies: effects on prognosis and feasibility as targets for drug development. Curr Drug Targets. 2020;21(7):647-656.
232. Gonzalez-Gronow M, Gawdi G, Pizzo SV. Tissue factor is the receptor for plasminogen type 1 on 1-LN human prostate cancer cells. Blood. 2002;99(12):4562-4567.

233. Gonzalez-Gronow M, Kalfa T, Johnson CE, Gawdi G, Pizzo SV. The voltage-dependent anion channel is a receptor for plasminogen kringle 5 on human endothelial cells. J Biol Chem. 2003;278(29):27312-27318.
234. Gonzalez-Gronow M, Ray R, Wang F, Pizzo SV. The voltage-dependent anion channel (VDAC) binds tissue-type plasminogen activator and promotes activation of plasminogen on the cell surface. J Biol Chem. 2013;288(1):498-509.
235. Goretzki L, Lombardo CR, Stallcup WB. Binding of the NG2 proteoglycan to kringle domains modulates the functional properties of angiostatin and plasmin(ogen). J Biol Chem. 2000;275(37):28625-28633.
236. Gorski SM, Ries J, Lum JJ. Targeting autophagy: the Achilles' heel of cancer. Autophagy. 2012;8(8):1279-1280.
237. Gottifredi V, McKinney K, Poyurovsky MV, Prives C. Decreased p21 levels are required for efficient restart of DNA synthesis after S phase block. J Biol Chem. 2004;279(7):5802-5810.
238. Gousset K, Wolkers WF, Tsvetkova NM, Oliver AE, Field CL, Walker NJ, Crowe JH, Tablin F. Evidence for a physiological role for membrane rafts in human platelets. J Cell Physiol. 2002;190(1):117-128.
239. Gramling MW, Church FC. Plasminogen activator inhibitor-1 is an aggregate response factor with pleiotropic effects on cell signaling in vascular disease and the tumor microenvironment. Thromb Res. 2010;125(5):377-381.
240. Gravanis I, Tsirka SE. Tissue-type plasminogen activator as a therapeutic target in stroke. Expert Opin Ther Targets. 2008;12(2):159-170.
241. Greenwald SH, Pierce EA. Parthanatos as a cell death pathway underlying retinal disease. Adv Exp Med Biol. 2019;1185:323-327.
242. Gregson J, Kaptoge S, Bolton T, et al. Emerging risk factors collaboration. cardiovascular risk factors associated with venous thromboembolism. JAMA Cardiol. 2019;4(2):163-173.

243. Griffin MO, Jinno M, Miles LA, Villarreal FJ. Reduction of myocardial infarct size by doxycycline: a role for plasmin inhibition. Mol Cell Biochem. 2005;270(1-2):1-11.
244. Grinenko T., Yusova O., Revka O., Patalakh I., Yatsenko T. Fibrinolysis regulation by platelets retaining plasminogen and tissue-type plasminogen activator on their surface. Ukr Biochem J. 2019;91(6):38-48.
245. Gu X, Yao Y, Cheng R, Zhang Y, Dai Z, Wan G, Yang Z, Cai W, Gao G, Yang X. Plasminogen K5 activates mitochondrial apoptosis pathway in endothelial cells by regulating Bak and Bcl-x(L) subcellular distribution. Apoptosis. 2011;16(8):846-855.
246. Guadamillas MC, Cerezo A, Del Pozo MA. Overcoming anoikis--pathways to anchorage-independent growth in cancer. J Cell Sci. 2011;124(Pt 19):3189-3197.
247. Gumustekin M, Kargi A, Bulut G, Gozukizil A, Ulukus C, Oztop I, Atabey N. HGF/c-Met overexpressions, but not met mutation, correlates with progression of non-small cell lung cancer. Pathol Oncol Res. 2012;18(2):209-218.
248. Gundogdu EB, Bekar A, Turkyilmaz M, Gumus A, Kafa IM, Cansev M. CDP-choline modulates matrix metalloproteinases in rat sciatic injury. J Surg Res. 2016;200(2):655-663.
249. Guo P, Hu B, Gu W, Xu L, Wang D, Huang HJ, Cavenee WK, Cheng SY. Platelet-derived growth factor-B enhances glioma angiogenesis by stimulating vascular endothelial growth factor expression in tumor endothelia and by promoting pericyte recruitment. Am J Pathol. 2003;162(4):1083-1093.
250. Gupta KK, Xu Z, Castellino FJ, Ploplis VA. Plasminogen activator inhibitor-1 stimulates macrophage activation through Toll-like Receptor-4. Biochem Biophys Res Commun. 2016;477(3):503-508.
251. Gutiérrez-Fernández A, Gingles NA, Bai H, Castellino FJ, Parmer RJ, Miles LA. Plasminogen enhances neuritogenesis on laminin-1. J Neurosci. 2009;29(40):12393-12400.

252. Gutiérrez-Fernández M, Rodríguez-Frutos B, Fuentes B, Vallejo-Cremades MT, Alvarez-Grech J, Expósito-Alcaide M, Díez-Tejedor E. CDP-choline treatment induces brain plasticity markers expression in experimental animal stroke. Neurochem Int. 2012;60(3):310-317.
253. Guzyk MM, Tykhomyrov AA, Nedzvetsky VS, Prischepa IV, Yanitska LV, Grinenko TV, Kuchmerovska TM. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) inhibitors reduce reactive gliosis and improve angiostatin levels in retina of diabetic rats. Neurochemical Research. 2016;41(10),2526-2537.
254. Haemmerle M, Stone RL, Menter DG, Afshar-Kharghan V, Sood AK. The platelet lifeline to cancer: challenges and opportunities. Cancer Cell. 2018;33(6):965-983.
255. Hajjar KA, Nachman RL. Endothelial cell-mediated conversion of Glu-plasminogen to Lys-plasminogen. Further evidence for assembly of the fibrinolytic system on the endothelial cell surface. J Clin Invest. 1988;82(5):1769-1778.
256. Hajjar KA. Cellular receptors in the regulation of plasmin generation. Thromb Haemost. 1995;74(1):294-301.
257. Hajrasouliha AR, Jiang G, Lu Q, Lu H, Kaplan HJ, Zhang HG, Shao H. Exosomes from retinal astrocytes contain antiangiogenic components that inhibit laser-induced choroidal neovascularization. J Biol Chem. 2013;288(39):28058-28067.
258. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. Cell 2011,144,646-674.
259. Hansen MH, Nielsen HV, Ditzel HJ. Translocation of an intracellular antigen to the surface of medullary breast cancer cells early in apoptosis allows for an antigen-driven antibody response elicited by tumor-infiltrating B cells. J Immunol. 2002;169(5):2701-2711.
260. Hartmann LC, Sellers TA, Frost MH, et al. Benign breast disease and the risk of breast cancer. N Engl J Med. 2005;353(3):229-237.

261. Hartwig JH, Barkalow K, Azim A, Italiano J. The elegant platelet: signals controlling actin assembly. Thromb Haemost. 1999;82(2):392-398.
262. Hasan MY, Teo R, Nather A. Negative-pressure wound therapy for management of diabetic foot wounds: a review of the mechanism of action, clinical applications, and recent developments. Diabet Foot Ankle. 2015;6:27618.
263. Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. Nature. 1997;387(6630):296-299.
264. Heidtmann HH, Nettelbeck DM, Mingels A, Jäger R, Welker HG, Kontermann RE. Generation of angiostatin-like fragments from plasminogen by prostate-specific antigen. Br J Cancer. 1999;81(8):1269-1273.
265. Heissig B, Salama Y, Takahashi S, Osada T, Hattori K. The multifaceted role of plasminogen in inflammation. Cell Signal. 2020;75:109761.
266. Heissig B, Salama Y, Osada T, Okumura K, Hattori K. The multifaceted role of plasminogen in cancer. Int J Mol Sci. 2021;22(5):2304.
267. Herren T, Swaisgood C, Plow EF. Regulation of plasminogen receptors. Front Biosci. 2003;8:d1-8.
268. Herren T, Burke TA, Das R, Plow EF. Identification of histone H2B as a regulated plasminogen receptor. Biochemistry. 2006;45(31):9463-9474.
269. Hirsch T, Spielmann M, Zuhaili B, Koehler T, Fossum M, Steinau HU, Yao F, Steinstraesser L, Onderdonk AB, Eriksson E. Enhanced susceptibility to infections in a diabetic wound healing model. BMC Surg. 2008;8:5.
270. Hisada Y, Grover SP, Maqsood A, Houston R, Ay C, Noubouossie DF, Cooley BC, Wallén H, Key NS, Thålin C, Farkas ÁZ, Farkas VJ, Tenekedjiev K, Kolev K, Mackman N. Neutrophils and neutrophil extracellular traps enhance venous thrombosis in mice bearing human pancreatic tumors. Haematologica. 2020;105(1):218-225.
271. Hnia K, Gayraud J, Hugon G, Ramonatxo M, De La Porte S, Matecki S, Mornet D. L-arginine decreases inflammation and modulates the nuclear

factor-kappaB/matrix metalloproteinase cascade in mdx muscle fibers. Am J Pathol. 2008;172(6):1509-1519.

272. Holtet TL, Graversen JH, Clemmensen I, Thøgersen HC, Etzerodt M. Tetranectin, a trimeric plasminogen-binding C-type lectin. Protein Sci. 1997;6(7):1511-1515.
273. Holvoet P, Lijnen HR, Collen D. A monoclonal antibody specific for Lys-plasminogen. Application to the study of the activation pathways of plasminogen in vivo. J Biol Chem. 1985;260(22):12106-12111.
274. Hong WX, Hu MS, Esquivel M, et al. The Role of hypoxia-inducible factor in wound healing. Adv Wound Care (New Rochelle). 2014;3(5):390-399.
275. Horak I, Skaterna T, Gerashchenko D, Tykhomyrov A, Khudiakova O, Drobot L. Knockdown of the adaptor protein Ruk/CIN85 in 4T1 and LLC adenocarcinoma cells results in increased expression levels and activities of MMP-2 and MMP-9, associated with elevated production of angiostatins and suppression of invasion potential // Simposium and Summer School "Fundamental Principles of Cancer Biotherapy", Kyiv, May 21-23, 2018: Experimental Oncology, 40 (2), p. 162.
276. Horak I., Drobot L., Borsig L., Knopfova L. Overexpression of adaptor protein Ruk/CIN85 in mouse breast adenocarcinoma 4T1 cells is followed by increased migration rate and invasion potential. Biopolymers Cell. 2018;34(4):284-291.
277. Ho-Tin-Noé B, Meilhac O, Rossignol P, Lijnen HR, Anglés-Cano E. Dual effect of apolipoprotein(a) on plasmin(ogen)-induced apoptosis through modulation of cell detachment of adherent cells. Thromb Haemost. 2006;95(1):142-150.
278. Hou Y, Carrim N, Wang Y, Gallant RC, Marshall A, Ni H. Platelets in hemostasis and thrombosis: Novel mechanisms of fibrinogen-independent platelet aggregation and fibronectin-mediated protein wave of hemostasis. J Biomed Res. 2015;29(6):437-444.

279. Ho-Yen CM, Jones JL, Kermorgant S. The clinical and functional significance of c-Met in breast cancer: a review. Breast Cancer Res. 2015;17(1):52.
280. Hu K, Yang J, Tanaka S, Gonias SL, Mars WM, Liu Y. Tissue-type plasminogen activator acts as a cytokine that triggers intracellular signal transduction and induces matrix metalloproteinase-9 gene expression. J Biol Chem. 2006;281(4):2120-2127.
281. Huang SH, Li Y, Chen HG, Rong J, Ye S. Activation of proteinase-activated receptor 2 prevents apoptosis of lung cancer cells. Cancer Invest. 2013;31(9):578-581.
282. Huang QT, Chen JH, Hang LL, Liu SS, Zhong M. Activation of PAR-1/NADPH oxidase/ROS signaling pathways is crucial for the thrombin-induced sFlt-1 production in extravillous trophoblasts: possible involvement in the pathogenesis of preeclampsia. Cell Physiol Biochem. 2015;35(4):1654-1662.
283. Hurtado O, Moro MA, Cárdenas A, Sánchez V, Fernández-Tomé P, Leza JC, Lorenzo P, Secades JJ, Lozano R, Dávalos A, Castillo J, Lizasoain I. Neuroprotection afforded by prior citicoline administration in experimental brain ischemia: effects on glutamate transport. Neurobiol Dis. 2005;18(2):336-345.
284. Indira Chandran V, Eppenberger-Castori S, Venkatesh T, Vine KL, Ranson M. HER2 and uPAR cooperativity contribute to metastatic phenotype of HER2-positive breast cancer. Oncoscience. 2015;2(3):207-224.
285. Italiano JE Jr, Richardson JL, Patel-Hett S, Battinelli E, Zaslavsky A, Short S, Ryeom S, Folkman J, Klement GL. Angiogenesis is regulated by a novel mechanism: pro- and antiangiogenic proteins are organized into separate platelet alpha granules and differentially released. Blood. 2008;111(3):1227-1233.
286. Izzo V, Meloni M, Vainieri E, Giurato L, Ruotolo V, Uccioli L. High matrix metalloproteinase levels are associated with dermal graft failure in diabetic foot ulcers. Int J Low Extrem Wounds. 2014;13(3):191-196.

287. Jacobson LK, Johnson MB, Dedhia RD, Niknam-Bienia S, Wong AK. Impaired wound healing after radiation therapy: a systematic review of pathogenesis and treatment. JPRAS Open. 2017;13:92-105.
288. Jaiswal RK, Varshney AK, Yadava PK. Diversity and functional evolution of the plasminogen activator system. Biomed Pharmacother. 2018;98:886-898.
289. Janmey PA, Lind SE. Capacity of human serum to depolymerize actin filaments. Blood. 1987;70(2):524-530.
290. Janmey PA, Lamb JA, Ezzell RM, Hvidt S, Lind SE. Effects of actin filaments on fibrin clot structure and lysis. Blood. 1992;80(4):928-936.
291. Jeffers M, Rong S, Vande Woude GF. Hepatocyte growth factor/scatter factor-Met signaling in tumorigenicity and invasion/metastasis. J Mol Med (Berl). 1996;74(9):505-513.
292. Jennewein C, Tran N, Paulus P, Ellinghaus P, Eble JA, Zacharowski K. Novel aspects of fibrin(ogen) fragments during inflammation. Mol Med. 2011;17(5-6):568-73.
293. Ji WR, Castellino FJ, Chang Y, Deford ME, Gray H, Villarreal X, Kondri ME, Marti DN, Llinás M, Schaller J, Kramer RA, Trail PA. Characterization of kringle domains of angiostatin as antagonists of endothelial cell migration, an important process in angiogenesis. FASEB J. 1998;12(15):1731-1738.
294. Ji D, Li GY, Osborne NN. Nicotinamide attenuates retinal ischemia and light insults to neurones. Neurochem Int. 2008;52(4-5):786-798.
295. Ji HL, Zhao R, Matalon S, Matthay MA. Elevated plasmin(ogen) as a common risk factor for COVID-19 susceptibility. Physiol Rev. 2020;100(3):1065-1075.
296. Jiang L, Luan Y, Miao X, Sun C, Li K, Huang Z, Xu D, Zhang M, Kong F, Li N. Platelet releasate promotes breast cancer growth and angiogenesis via VEGF-integrin cooperative signalling. Br J Cancer. 2017;117(5):695-703.
297. Jickling GC, Sharp FR. Biomarker panels in ischemic stroke. Stroke. 2015;46(3):915-920.

298. Jin E, Fujiwara M, Pan X, Ghazizadeh M, Arai S, Ohaki Y, Kajiwara K, Takemura T, Kawanami O. Protease-activated receptor (PAR)-1 and PAR-2 participate in the cell growth of alveolar capillary endothelium in primary lung adenocarcinomas. Cancer. 2003;97(3):703-713.
299. Jirousková M, Jaiswal JK, Coller BS. Ligand density dramatically affects integrin alpha IIb beta 3-mediated platelet signaling and spreading. Blood. 2007;109(12):5260-5269.
300. Jo M, Lester RD, Montel V, Eastman B, Takimoto S, Gonias SL. Reversibility of epithelial-mesenchymal transition (EMT) induced in breast cancer cells by activation of urokinase receptor-dependent cell signaling. J Biol Chem. 2009;284(34):22825-22833.
301. Johnson KE, Wilgus TA. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis in the regulation of cutaneous wound repair. Adv Wound Care (New Rochelle). 2014;3(10):647-661.
302. Jorgenson E, Deitcher SR, Cicek M, Liu X, Plummer S, Casey G, Witte JS. Plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) polymorphism 4G/5G is associated with prostate cancer among men with a positive family history. Prostate. 2007;67(2):172-177.
303. Jung S, Wiest R, Gralla J, McKinley R, Mattle H, Liebeskind D. Relevance of the cerebral collateral circulation in ischaemic stroke: time is brain, but collaterals set the pace. Swiss Med Wkly. 2017;147:w14538.
304. Jung RG, Motazedian P, Ramirez FD, et al. Association between plasminogen activator inhibitor-1 and cardiovascular events: a systematic review and meta-analysis. Thromb J. 2018;16:12.
305. Jurasz P, Alonso D, Castro-Blanco S, Murad F, Radomski MW. Generation and role of angiostatin in human platelets. Blood. 2003;102(9):3217-3223.
306. Jurasz P, Santos-Martinez MJ, Radomska A, Radomski MW. Generation of platelet angiostatin mediated by urokinase plasminogen activator: effects on angiogenesis. J Thromb Haemost. 2006;4(5):1095-1106.

307. Jurasz P, Ng D, Granton JT, Courtman DW, Stewart DJ. Elevated platelet angiostatin and circulating endothelial microfragments in idiopathic pulmonary arterial hypertension: a preliminary study. Thromb Res. 2010;125(1):53-60.
308. Kamada Y, Nagaretani H, Tamura S, et al. Vascular endothelial dysfunction resulting from L-arginine deficiency in a patient with lysinuric protein intolerance. J Clin Invest. 2001;108(5):717-724.
309. Kanberg N, Ashton NJ, Andersson LM, Yilmaz A, Lindh M, Nilsson S, Price RW, Blennow K, Zetterberg H, Gisslén M. Neurochemical evidence of astrocytic and neuronal injury commonly found in COVID-19. Neurology. 2020;95(12):e1754-e1759.
310. Kang R, Zeh HJ, Lotze MT, Tang D. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. Cell Death Differ. 2011;18(4):571-580.
311. Kanno Y, Hirade K, Ishisaki A, Nakajima K, Suga H, Into T, Matsushita K, Okada K, Matsuo O, Matsuno H. Lack of alpha2-antiplasmin improves cutaneous wound healing via over-released vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis in wound lesions. J Thromb Haemost. 2006;4(7):1602-1610.
312. Kanno Y. The role of fibrinolytic regulators in vascular dysfunction of systemic sclerosis. Int J Mol Sci. 2019;20(3):619.
313. Kapustianenko LG, Iatsenko TA, Iusova OI, Grinenko TV. Isolation and purification of a kringle 5 from human plasminogen using AH-Sepharose. Biotechnologia Acta. 2014;7(4):35-42.
314. Katsanos AH, Makris K, Stefani D, et al. Plasma glial fibrillary acidic protein in the differential diagnosis of intracerebral hemorrhage. Stroke. 2017;48(9):2586-2588.
315. Keragala CB, Medcalf RL. Plasminogen: an enigmatic zymogen. Blood. 2021;137(21):2881-2889.

316. Kerris EWJ, Hoptay C, Calderon T, Freishtat RJ. Platelets and platelet extracellular vesicles in hemostasis and sepsis. J Investig Med. 2020;68(4):813-820.
317. Keskin D, Keskin G, Inal A, Ozışık L. Serum angiostatin levels in patients with Behçet's disease: does angiogenesis play a role in the pathogenesis of Behçet's disease? Acta Clin Belg. 2014;69(4):246-250.
318. Khan KN, Kitajima M, Hiraki K, Fujishita A, Sekine I, Ishimaru T, Masuzaki H. Changes in tissue inflammation, angiogenesis and apoptosis in endometriosis, adenomyosis and uterine myoma after GnRH agonist therapy. Hum Reprod. 2010;25(3):642-653.
319. Khan MA, Ahmed F, Neyses L, Mamas MA. Atrial fibrillation in heart failure: The sword of Damocles revisited. World J Cardiol. 2013;5(7):215-227.
320. Khurana R, Simons M, Martin JF, Zachary IC. Role of angiogenesis in cardiovascular disease: a critical appraisal. Circulation. 2005;112(12):1813-1824.
321. Kim JM, Ho SH, Park EJ, Hahn W, Cho H, Jeong JG, Lee YW, Kim S. Angiostatin gene transfer as an effective treatment strategy in murine collagen-induced arthritis. Arthritis Rheum. 2002;46(3):793-801.
322. Kim JE, Kim YJ, Kim JY, Kang TC. PARP1 activation/expression modulates regional-specific neuronal and glial responses to seizure in a hemodynamic-independent manner. Cell Death Dis. 2014;5(8):e1362.
323. Kinlough-Rathbone RL, Perry DW, Rand ML, Packham MA. Pretreatment of human platelets with plasmin inhibits responses to thrombin, but potentiates responses to low concentrations of aggregating agents, including the thrombin receptor activating peptide, SFLLRN. Thromb Haemost. 1997;77(4):741-747.
324. Kirwan CC, Byrne GJ, Kumar S, McDowell G. Platelet release of vascular endothelial growth factor (VEGF) in patients undergoing chemotherapy for breast cancer. J Angiogenes Res. 2009;1:7.

325. Klement GL, Yip TT, Cassiola F, Kikuchi L, Cervi D, Podust V, Italiano JE, Wheatley E, Abou-Slaybi A, Bender E, Almog N, Kieran MW, Folkman J. Platelets actively sequester angiogenesis regulators. Blood. 2009;113(12):2835-2842.
326. Knip M, Douek IF, Moore WP, Gillmor HA, McLean AE, Bingley PJ, Gale EA; European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial Group. Safety of high-dose nicotinamide: a review. Diabetologia. 2000;43(11):1337-1345.
327. Kochtebane N, Choqueux C, Passefort S, Nataf P, Messika-Zeitoun D, Bartagi A, Michel JB, Anglés-Cano E, Jacob MP. Plasmin induces apoptosis of aortic valvular myofibroblasts. J Pathol. 2010;221(1):37-48.
328. Korkmaz L, Baştuğ O, Özdemir A, Korkut S, Karaca Ç, Akın MA, Öztürk MA. Platelet mass index can be a reliable marker in predicting the prognosis of retinopathy of prematurity in very preterm infants. Pediatr Neonatol. 2018;59(5):455-463.
329. Kosanovic D, Yaroshetskiy AI, Tsareva NA, Merzhoeva ZM, Trushenko NV, Nekludova GV, Schermuly RT, Avdeev SN. Recombinant tissue plasminogen activator treatment for COVID-19 associated ARDS and acute cor pulmonale. Int J Infect Dis. 2021;104:108-110.
330. Koshida R, Ou J, Matsunaga T, Chilian WM, Oldham KT, Ackerman AW, Pritchard KA Jr. Angiostatin: a negative regulator of endothelial-dependent vasodilation. Circulation. 2003;107(6):803-806.
331. Kotulska-Kucharz A, Kopeć-Mędrek M, Kucharz EJ. Serum angiostatin and endostatin levels in patients with granulomatosis with polyangiitis and immune complex small vessel vasculitis. Reumatologia. 2018;56(5):285-288.
332. Koupenova M, Clancy L, Corkrey HA, Freedman JE. Circulating platelets as mediators of immunity, inflammation, and thrombosis. Circ Res. 2018;122(2):337-351.
333. Kovacs K, Vaczy A, Fekete K, Kovari P, Atlasz T, Reglodi D, Gabriel R, Gallyas F, Sumegi B. PARP inhibitor protects against chronic hypoxia/reoxygenation-

induced retinal injury by regulation of MAPKs, HIF1α, Nrf2, and NFκB. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2019;60(5):1478-1490.

334. Krishnan R, Kremen M, Hu JH, Emery I, Farris SD, Slezicki KI, Chu T, Du L, Dichek HL, Dichek DA. Level of macrophage uPA expression is an important determinant of atherosclerotic lesion growth in Apoe-/- mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2009;29(11):1737-1744.
335. Krishnaswamy VR, Mintz D, Sagi I. Matrix metalloproteinases: The sculptors of chronic cutaneous wounds. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res. 2017;1864(11 Pt B):2220-2227.
336. Krupinski J, Abudawood M, Matou-Nasri S, Al-Baradie R, Petcu EB, Justicia C, Planas A, Liu D, Rovira N, Grau-Slevin M, Secades J, Slevin M. Citicoline induces angiogenesis improving survival of vascular/human brain microvessel endothelial cells through pathways involving ERK1/2 and insulin receptor substrate-1. Vasc Cell. 2012;4(1):20.
337. Kubala MH, DeClerck YA. The plasminogen activator inhibitor-1 paradox in cancer: a mechanistic understanding. Cancer Metastasis Rev. 2019;38(3):483-492.
338. Kuchmerovska T, Shymanskyy I, Chlopicki S, Klimenko A. 1-methylnicotinamide (MNA) in prevention of diabetes-associated brain disorders. Neurochem Int. 2010;56(2):221-228.
339. Kugaevskaya EV, Gureeva TA, Timoshenko OS, Solovyeva NI. Rol' sistemy aktivatora plazminogena urokinaznogo tipa v progressii opukholeĭ [The urokinase-type plasminogen activator system and its role in tumor progression]. Biomed Khim. 2018;64(6):472-486.
340. Kuliopulos A, Covic L, Seeley SK, Sheridan PJ, Helin J, Costello CE. Plasmin desensitization of the PAR1 thrombin receptor: kinetics, sites of truncation, and implications for thrombolytic therapy. Biochemistry. 1999;38(14):4572-4585.
341. Kumari S, Malla R. New insight on the role of plasminogen receptor in cancer progression. Cancer Growth Metastasis. 2015;8:35-42.

342. Kurup A, Lin C-, Murry DJ, Dobrolecki L, Estes D, Yiannoutsos CT, Mariano L, Sidor C, Hickey R, Hanna N. Recombinant human angiostatin (rhAngiostatin) in combination with paclitaxel and carboplatin in patients with advanced non-small-cell lung cancer: a phase II study from Indiana University. Ann Oncol. 2006;17(1):97-103.
343. Kuryata O, Sirenko O. Oral L-Arginine supplementation effects on cardiometabolic factors in hypertensive patients with rheumatoid arthritis and its relationship with body mass index. J Nutr Therap. 2015;4(2):41-49.
344. Kwaan HC, McMahon B. The role of plasminogen-plasmin system in cancer. Cancer Treat Res. 2009;148:43-66.
345. Lacroix R, Sabatier F, Mialhe A, Basire A, Pannell R, Borghi H, Robert S, Lamy E, Plawinski L, Camoin-Jau L, Gurewich V, Angles-Cano E, Dignat-George F. Activation of plasminogen into plasmin at the surface of endothelial microparticles: a mechanism that modulates angiogenic properties of endothelial progenitor cells in vitro. Blood. 2007;110(7):2432-2439.
346. Lacroix R, Plawinski L, Robert S, et al. Leukocyte- and endothelial-derived microparticles: a circulating source for fibrinolysis. Haematologica. 2012;97(12):1864-1872.
347. Lademann UA, Rømer MU. Regulation of programmed cell death by plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1). Thromb Haemost. 2008;100(6):1041-1046.
348. Ladwig GP, Robson MC, Liu R, Kuhn MA, Muir DF, Schultz GS. Ratios of activated matrix metalloproteinase-9 to tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in wound fluids are inversely correlated with healing of pressure ulcers. Wound Repair Regen. 2002;10(1):26-37.
349. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970;227(5259):680-685.
350. Lafon-Cazal M, Adjali O, Galéotti N, Poncet J, Jouin P, Homburger V, Bockaert J, Marin P. Proteomic analysis of astrocytic secretion in the mouse.

Comparison with the cerebrospinal fluid proteome. J Biol Chem. 2003;278(27):24438-24348.

351. Lauer G, Sollberg S, Cole M, Flamme I, Stürzebecher J, Mann K, Krieg T, Eming SA. Expression and proteolysis of vascular endothelial growth factor is increased in chronic wounds. J Invest Dermatol. 2000;115(1):12-18.
352. Laumonnier Y, Syrovets T, Burysek L, Simmet T. Identification of the annexin A2 heterotetramer as a receptor for the plasmin-induced signaling in human peripheral monocytes. Blood. 2006;107(8):3342-3349.
353. Law RH, Caradoc-Davies T, Cowieson N, Horvath AJ, Quek AJ, Encarnacao JA, Steer D, Cowan A, Zhang Q, Lu BG, Pike RN, Smith AI, Coughlin PB, Whisstock JC. The X-ray crystal structure of full-length human plasminogen. Cell Rep. 2012;1(3):185-190.
354. Law RH, Abu-Ssaydeh D, Whisstock JC. New insights into the structure and function of the plasminogen/plasmin system. Curr Opin Struct Biol. 2013;23(6):836-841.
355. Lay AJ, Jiang XM, Daly E, Sun L, Hogg PJ. Plasmin reduction by phosphoglycerate kinase is a thiol-independent process. J Biol Chem. 2002;277(11):9062-9068.
356. Lazaro JL, Izzo V, Meaume S, Davies AH, Lobmann R, Uccioli L. Elevated levels of matrix metalloproteinases and chronic wound healing: an updated review of clinical evidence. J Wound Care. 2016;25(5):277-287.
357. Leclercq A, Houard X, Loyau S, Philippe M, Sebbag U, Meilhac O, Michel JB. Topology of protease activities reflects atherothrombotic plaque complexity. Atherosclerosis. 2007;191(1):1-10.
358. Lecoultre M, Dutoit V, Walker PR. Phagocytic function of tumor-associated macrophages as a key determinant of tumor progression control: a review. J Immunother Cancer. 2020;8(2):e001408.
359. Lee MH, Vosburgh E, Anderson K, McDonagh J. Deficiency of plasma plasminogen activator inhibitor 1 results in hyperfibrinolytic bleeding. Blood. 1993;81(9):2357-2362.

360. Lee JK, Hong YJ, Han CJ, Hwang DY, Hong SI. Clinical usefulness of serum and plasma vascular endothelial growth factor in cancer patients: which is the optimal specimen? Int J Oncol. 2000;17(1):149-152.
361. Lee TY, Muschal S, Pravda EA, Folkman J, Abdollahi A, Javaherian K. Angiostatin regulates the expression of antiangiogenic and proapoptotic pathways via targeted inhibition of mitochondrial proteins. Blood. 2009;114(9):1987-1998.
362. Lee P, Vousden KH, Cheung EC. TIGAR, TIGAR, burning bright. Cancer Metab. 2014;2(1):1.
363. Leibundgut G, Arai K, Orsoni A, Yin H, Scipione C, Miller ER, Koschinsky ML, Chapman MJ, Witztum JL, Tsimikas S. Oxidized phospholipids are present on plasminogen, affect fibrinolysis, and increase following acute myocardial infarction. J Am Coll Cardiol. 2012;59(16):1426-1437.
364. Lenich C, Liu JN, Gurewich V. Thrombin stimulation of platelets induces plasminogen activation mediated by endogenous urokinase-type plasminogen activator. Blood. 1997;90(9):3579-3586.
365. Lerman A, Burnett JC Jr, Higano ST, McKinley LJ, Holmes DR Jr. Long-term L-arginine supplementation improves small-vessel coronary endothelial function in humans. Circulation. 1998;97(21):2123-2128.
366. Lester RD, Jo M, Montel V, Takimoto S, Gonias SL. uPAR induces epithelial-mesenchymal transition in hypoxic breast cancer cells. J Cell Biol. 2007;178(3):425-36.
367. Leytin V, Mody M, Semple JW, Garvey B, Freedman J. Quantification of platelet activation status by analyzing P-selectin expression. Biochem Biophys Res Commun. 2000;273(2):565-570.
368. Li WY, Chong SS, Huang EY, Tuan TL. Plasminogen activator/plasmin system: a major player in wound healing? Wound Repair Regen. 2003;11(4):239-247.
369. Li GH, Arora PD, Chen Y, McCulloch CA, Liu P. Multifunctional roles of gelsolin in health and diseases. Med Res Rev. 2012;32(5):999-1025.

370. Li L, Yao YC, Gu XQ, Che D, Ma CQ, Dai ZY, et al. Plasminogen kringle 5 induces endothelial cell apoptosis by triggering a voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1) positive feedback loop. J Biol Chem. 2014;289:32628-32638.
371. Li N, Chen J. ADP-ribosylation: activation, recognition, and removal. Mol Cells. 2014;37(1):9-16.
372. Li X, Wu B, Chen L, Ju Y, Li C, Meng S. Urokinase-type plasminogen activator receptor inhibits apoptosis in triple-negative breast cancer through miR-17/20a suppression of death receptors 4 and 5. Oncotarget. 2017;8(51):88645-88657.
373. Li Q, Yin Y, Zheng Y, Chen F, Jin P. Inhibition of autophagy promoted high glucose/ROS-mediated apoptosis in ADSCs. Stem Cell Res Ther. 2018;9(1):289.
374. Li Santi A, Napolitano F, Montuori N, Ragno P. The urokinase receptor: a multifunctional receptor in cancer cell biology. Therapeutic Implications. Int J Mol Sci. 2021;22(8):4111.
375. Lighvani S, Baik N, Diggs JE, Khaldoyanidi S, Parmer RJ, Miles LA. Regulation of macrophage migration by a novel plasminogen receptor Plg-R_{KT}. Blood. 2011;118(20):5622-5630.
376. Lijnen HR, Van Hoef B, Collen D. Characterization of the murine plasminogen/urokinase-type plasminogen-activator system. Eur J Biochem. 1996;241(3):840-848.
377. Lijnen HR. Elements of the fibrinolytic system. Ann N Y Acad Sci. 2001;936:226-236.
378. Lijnen HR. Role of fibrinolysis in obesity and thrombosis. Thromb Res. 2009;123 Suppl 4:S46-49.
379. Lillicrap T, Keragala CB, Draxler DF, Chan J, Ho H, et al. Plasmin generation potential and recanalization in acute ischaemic stroke; an observational cohort study of stroke biobank samples. Front Neurol. 2020;11:589628.

380. Lima Pinto AP, Silva NA Jr, Osorio CT, Rivera LM, Carneiro S, Ramos-E-Silva M, Gomes Bica BE. Martorell's ulcer: diagnostic and therapeutic challenge. Case Rep Dermatol. 2015;7(2):199-206.
381. Lin Y, Xu J, Lan H. Tumor-associated macrophages in tumor metastasis: biological roles and clinical therapeutic applications. J Hematol Oncol. 2019;12(1):76.
382. Lin H, Xu L, Yu S, Hong W, Huang M, Xu P. Therapeutics targeting the fibrinolytic system. Exp Mol Med. 2020;52(3):367-379.
383. Lind SE, Smith CJ. Actin is a noncompetitive plasmin inhibitor. J Biol Chem. 1991;266(8):5273-5278.
384. Lind SE, Smith CJ. Actin stimulates plasmin generation by tissue and urokinase-type plasminogen activators. Arch Biochem Biophys. 1993;307(1):138-145.
385. Lindner D, Zietsch C, Becher PM, Schulze K, Schultheiss HP, Tschöpe C, Westermann D. Differential expression of matrix metalloproteases in human fibroblasts with different origins. Biochem Res Int. 2012;2012:875742.
386. Lip GYH, Jensen M, Melgaard L, Skjøth F, Nielsen PB, Larsen TB. Stroke and bleeding risk scores in patients with atrial fibrillation and valvular heart disease: evaluating 'valvular heart disease' in a nationwide cohort study. Europace. 2019;21(1):33-40.
387. Lishko VK, Novokhatny VV, Yakubenko VP, Skomorovska-Prokvolit HV, Ugarova TP. Characterization of plasminogen as an adhesive ligand for integrins alphaMbeta2 (Mac-1) and alpha5beta1 (VLA-5). Blood. 2004;104(3):719-726.
388. Liu JL, Chang KC, Lo CC, Chu PY, Liu CH. Expression of autophagy-related protein Beclin-1 in malignant canine mammary tumors. BMC Vet Res. 2013;9:75.
389. Liu J, Wang Y, Akamatsu Y, Lee CC, Stetler RA, Lawton MT, Yang GY. Vascular remodeling after ischemic stroke: mechanisms and therapeutic potentials. Prog Neurobiol. 2014;115:138-156.

390. Liu CY, Lin HH, Tang MJ, Wang YK. Vimentin contributes to epithelial-mesenchymal transition cancer cell mechanics by mediating cytoskeletal organization and focal adhesion maturation. Oncotarget. 2015;6(18):15966-15983.
391. Liu Z, Wu Y, Zhang Y, Yuan M, Li X, Gao J, Zhang S, Xing C, Qin H, Zhao H, Zhao Z. TIGAR promotes tumorigenesis and protects tumor cells from oxidative and metabolic stresses in gastric cancer. Front Oncol. 2019;9:1258.
392. Longstaff C, Thelwell C, Williams SC, Silva MM, Szabó L, Kolev K. The interplay between tissue plasminogen activator domains and fibrin structures in the regulation of fibrinolysis: kinetic and microscopic studies. Blood. 2011;117(2):661-668.
393. Lopez-Alemany R, Suelves M, Diaz-Ramos A, Vidal B, Munoz-Canoves P. Alpha-enolase plasminogen receptor in myogenesis. Front Biosci. 2005;10:30-36.
394. Lu K, ZhangSX, Wang JX, Shao C, Mott R, Ma JX. Down-regulation of plasminogen kringle 5 receptor in Müller cells under hypoxia and in the diabetic retina. Investigative Ophthalmology & Visual Science (May 2004), 45,664.
395. Lu Z, Xiao Y, Liu X, Zhang Z, Xiao F, Bi Y. Matrine reduces the proliferation of A549 cells via the p53/p21/PCNA/eIF4E signaling pathway. Mol Med Rep. 2017;15(5):2415-2422.
396. Luan Z, Chase AJ, Newby AC. Statins inhibit secretion of metalloproteinases-1, -2, -3, and -9 from vascular smooth muscle cells and macrophages. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2003;23(5):769-775.
397. Luger S, Witsch J, Dietz A, Hamann GF, Minnerup J, Schneider H, Sitzer M, Wartenberg KE, Niessner M, Foerch C; BE FAST II and the IGNITE Study Groups. Glial fibrillary acidic protein serum levels distinguish between intracerebral hemorrhage and cerebral ischemia in the early phase of stroke. Clin Chem. 2017;63(1):377-385.

398. Lui VW, Wong EY, Ho K, et al. Inhibition of c-Met downregulates TIGAR expression and reduces NADPH production leading to cell death. Oncogene. 2011;30(9):1127-1134.
399. Luna G, Keeley PW, Reese BE, Linberg KA, Lewis GP, Fisher SK. Astrocyte structural reactivity and plasticity in models of retinal detachment. Exp Eye Res. 2016;150:4-21.
400. Luo LY, Hahn WC. Oncogenic Signaling Adaptor Proteins. J Genet Genomics. 2015;42(10):521-529.
401. Lupia E, Del Sorbo L, Bergerone S, Emanuelli G, Camussi G, Montrucchio G. The membrane attack complex of complement contributes to plasmin-induced synthesis of platelet-activating factor by endothelial cells and neutrophils. Immunology. 2003;109(4):557-563.
402. Lupu F, Heim DA, Bachmann F, Hurni M, Kakkar VV, Kruithof EK. Plasminogen activator expression in human atherosclerotic lesions. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1995;15(9):1444-1455.
403. Ma L, Perini R, McKnight W, Dicay M, Klein A, Hollenberg MD, Wallace JL. Proteinase-activated receptors 1 and 4 counter-regulate endostatin and VEGF release from human platelets. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102(1):216-220.
404. Ma J, Li C, Shao C, Gao G, Yang X. Decreased K5 receptor expression in the retina, a potential pathogenic mechanism for diabetic retinopathy. Mol Vis. 2012;18:330-336.
405. MacDonald NJ, Murad AC, Fogler WE, Lu Y, Sim BK. The tumor-suppressing activity of angiostatin protein resides within kringles 1 to 3. Biochem Biophys Res Commun. 1999;264(2):469-477.
406. Magalhães V, Andrade EB, Alves J, Ribeiro A, Kim KS, Lima M, Trieu-Cuot P, Ferreira P. Group B Streptococcus hijacks the host plasminogen system to promote brain endothelial cell invasion. PLoS One. 2013;8(5):e63244.

407. Mahmood N, Mihalcioiu C, Rabbani SA. Multifaceted role of the urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its receptor (uPAR): diagnostic, prognostic, and therapeutic applications. Front Oncol. 2018;8:24.
408. Maloney JP, Silliman CC, Ambruso DR, Wang J, Tuder RM, Voelkel NF. In vitro release of vascular endothelial growth factor during platelet aggregation. Am J Physiol. 1998;275(3):H1054-1061.
409. Mancek-Keber M. Inflammation-mediating proteases: structure, function in (patho) physiology and inhibition. Protein Pept Lett. 2014;21(12):1209-1229.
410. Mandal SK, Rao LV, Tran TT, Pendurthi UR. A novel mechanism of plasmin-induced mitogenesis in fibroblasts. J Thromb Haemost. 2005;3(1):163-169.
411. Margheri F, Luciani C, Taddei ML, Giannoni E, Laurenzana A, Biagioni A, Chillà A, Chiarugi P, Fibbi G, Del Rosso M. The receptor for urokinase-plasminogen activator (uPAR) controls plasticity of cancer cell movement in mesenchymal and amoeboid migration style. Oncotarget. 2014;5(6):1538-1553.
412. Margraf A, Zarbock A. Platelets in Inflammation and Resolution. J Immunol. 2019;203(9):2357-2367.
413. Martí-Carvajal AJ, Valli C, Martí-Amarista CE, Solà I, Martí-Fàbregas J, Bonfill Cosp X. Citicoline for treating people with acute ischemic stroke. Cochrane Database Syst Rev. 2020;8:CD013066.
414. Masselli E, Pozzi G, Vaccarezza M, et al. ROS in platelet biology: functional aspects and methodological insights. Int J Mol Sci. 2020;21(14):4866.
415. Matsunaga T, Warltier DC, Weihrauch DW, Moniz M, Tessmer J, Chilian WM. Ischemia-induced coronary collateral growth is dependent on vascular endothelial growth factor and nitric oxide. Circulation. 2000;102(25):3098-3103.
416. Matsunaga T, Chilian WM, March K. Angiostatin is negatively associated with coronary collateral growth in patients with coronary artery disease. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2005;288(5):H2042-2046.

417. Mauro CD, Pesapane A, Formisano L, et al. Urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) expression enhances invasion and metastasis in RAS mutated tumors. Sci Rep. 2017;7(1):9388.
418. McCarty SM, Percival SL. Proteases and delayed wound healing. Adv Wound Care. 2013; 2(8):438-447.
419. McGuinness CL, Humphries J, Waltham M, Burnand KG, Collins M, Smith A. Recruitment of labelled monocytes by experimental venous thrombi. Thromb Haemost. 2001,85(6):1018-1024.
420. Medcalf RL, Keragala CB, Myles PS. Fibrinolysis and COVID-19: A plasmin paradox. J Thromb Haemost. 2020;18(9):2118-2122.
421. Mehta R, Shapiro AD. Plasminogen deficiency. Haemophilia. 2008;14(6):1261-1268.
422. Meigs JB, Dupuis J, Liu C, O'Donnell CJ, Fox CS, Kathiresan S, Gabriel SB, Larson MG, Yang Q, Herbert AG, Wilson PW, Feng D, Tofler GH, Cupples LA. PAI-1 Gene 4G/5G polymorphism and risk of type 2 diabetes in a population-based sample. Obesity (Silver Spring). 2006;14(5):753-758.
423. Meilhac O, Ho-Tin-Noé B, Houard X, Philippe M, Michel JB, Anglés-Cano E. Pericellular plasmin induces smooth muscle cell anoikis. FASEB J. 2003;17(10):1301-1303.
424. Meissauer A, Kramer MD, Schirrmacher V, Brunner G. Generation of cell surface-bound plasmin by cell-associated urokinase-type or secreted tissue-type plasminogen activator: a key event in melanoma cell invasiveness in vitro. Exp Cell Res. 1992;199(2):179-190.
425. Melo PM, Bagnaresi P, Paschoalin T, Hirata IY, Gazarini ML, Carmona AK. Plasmodium falciparum proteases hydrolyze plasminogen, generating angiostatin-like fragments. Mol Biochem Parasitol. 2014;193(1):45-54.
426. Merten M, Thiagarajan P. P-selectin expression on platelets determines size and stability of platelet aggregates. Circulation. 2000;102(16): 1931-1936.
427. Messerli FH. TIMPs, MMPs and cardiovascular disease. Eur Heart J. 2004;25(17):1475-1476.

428. Michelson AD. Evaluation of platelet function by flow cytometry. Pathophysiol Haemost Thromb. 2006;35(1-2):67-82.
429. Migita T, Oda Y, Naito S, Morikawa W, Kuwano M, Tsuneyoshi M. The accumulation of angiostatin-like fragments in human prostate carcinoma. Clin Cancer Res. 2001;7(9):2750-2756.
430. Miki K, Uehara N, Shikata N, Matsumura M, Tsubura A. Poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor 3-aminobenzamide rescues N-methyl-N-nitrosourea-induced photoreceptor cell apoptosis in Sprague-Dawley rats through preservation of nuclear factor-kappaB activity. Exp Eye Res. 2007;84(2):285-292.
431. Miles LA, Plow EF. Binding and activation of plasminogen on the platelet surface. J Biol Chem. 1985;260(7):4303-4311.
432. Miles LA, Dahlberg CM, Plow EF. The cell-binding domains of plasminogen and their function in plasma. J Biol Chem. 1988;263(24):11928-11934.
433. Miles LA, Hawley SB, Baik N, Andronicos NM, Castellino FJ, Parmer RJ. Plasminogen receptors: the sine qua non of cell surface plasminogen activation. Front Biosci. 2005;10:1754-1762.
434. Miles LA, Andronicos NM, Baik N, Parmer RJ. Cell-surface actin binds plasminogen and modulates neurotransmitter release from catecholaminergic cells. J Neurosci. 2006;26(50):13017-13024.
435. Miles LA, Plow EF, Waisman DM, Parmer RJ. Plasminogen receptors. J Biomed Biotechnol. 2012;2012:130735.
436. Miles LA, Lighvani S, Baik N, al. The plasminogen receptor, Plg-R(KT), and macrophage function. J Biomed Biotechnol. 2012;2012:250464.
437. Miles LA, Parmer RJ. Plasminogen receptors: the first quarter century. Semin Thromb Hemost. 2013;39(4):329-337.
438. Miles LA, Lighvani S, Baik N, et al. New insights into the role of Plg-RKT in macrophage recruitment. Int Rev Cell Mol Biol. 2014;309:259-302.
439. Miles LA, Baik N, Lighvani S, Khaldoyanidi S, Varki NM, Bai H, Mueller BM, Parmer RJ. Deficiency of plasminogen receptor, Plg-RKT , causes

defects in plasminogen binding and inflammatory macrophage recruitment *in vivo*. J Thromb Haemost. 2017;15(1):155-162.

440. Mitsios JV, Papathanasiou AI, Goudevenos JA, Tselepis AD. The antiplatelet and antithrombotic actions of statins. Curr Pharm Des. 2010;16(34):3808-3814.
441. Miyazono K, Okabe T, Urabe A, Yamanaka M, Takaku F. A platelet factor that stimulates the proliferation of vascular endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun. 1985;126(1),83-88.
442. Montaner J, Alvarez-Sabín J, Molina CA, Anglés A, Abilleira S, Arenillas J, Monasterio J. Matrix metalloproteinase expression is related to hemorrhagic transformation after cardioembolic stroke. Stroke. 2001;32(12):2762-2767.
443. Monti LD, Galluccio E, Lucotti P, Setola E, Costa S, Fontana B, Oldani M, Merante D, Di Blasi P, Bosi E, Piatti PM. Beneficial role of L-arginine in cardiac matrix remodelling in insulin resistant rats. Eur J Clin Invest. 2008;38(11):849-856.
444. Moons L, Shi C, Ploplis V, Plow E, Haber E, Collen D, Carmeliet P. Reduced transplant arteriosclerosis in plasminogen-deficient mice. J Clin Invest. 1998;102(10):1788-1797.
445. Moreno-Layseca P, Streuli CH. Signalling pathways linking integrins with cell cycle progression. Matrix Biol. 2014;34:144-153.
446. Morrow GB, Whyte CS, Mutch NJ. Functional plasminogen activator inhibitor 1 is retained on the activated platelet membrane following platelet activation. Haematologica. 2020;105(12):2824-2833.
447. Moser TL, Stack MS, Asplin I, et al. Angiostatin binds ATP synthase on the surface of human endothelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96(6):2811-2816.
448. Moulton KS, Vakili K, Zurakowski D, Soliman M, Butterfield C, Sylvin E, Lo KM, Gillies S, Javaherian K, Folkman J. Inhibition of plaque neovascularization reduces macrophage accumulation and progression of advanced atherosclerosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100(8):4736-4741.

449. Mowery YM, Pizzo SV. Targeting cell surface F1F0 ATP synthase in cancer therapy. Cancer Biol Ther. 2008;7(11):1836-1838.
450. Mueller BM, Yu YB, Laug WE. Overexpression of plasminogen activator inhibitor 2 in human melanoma cells inhibits spontaneous metastasis in scid/scid mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995;92(1):205-209.
451. Mulcahy Levy JM, Thorburn A. Autophagy in cancer: moving from understanding mechanism to improving therapy responses in patients. Cell Death Differ. 2020;27(3):843-857.
452. Muñoz-Galván S, Rivero M, Peinado-Serrano J, Martinez-Pérez J, Fernández-Fernández MC, Ortiz MJ, García-Heredia JM, Carnero A. PAI1 is a marker of bad prognosis in rectal cancer but predicts a better response to treatment with pim inhibitor AZD1208. Cells. 2020;9(5):1071.
453. Murata MM, Kong X, Moncada E, et al. NAD^+ consumption by PARP1 in response to DNA damage triggers metabolic shift critical for damaged cell survival. Mol Biol Cell. 2019;30(20):2584-2597.
454. Nagy JA, Dvorak AM, Dvorak HF. VEGF-A and the induction of pathological angiogenesis. Annu Rev Pathol. 2007;2:251-275.
455. Nakamura-Ishizu A, Kurihara T, Okuno Y, Ozawa Y, Kishi K, Goda N, Tsubota K, Okano H, Suda T, Kubota Y. The formation of an angiogenic astrocyte template is regulated by the neuroretina in a HIF-1-dependent manner. Dev Biol. 2012;363(1):106-114.
456. Narasaki R, Kuribayashi H, Shimizu K, Imamura D, Sato T, Hasumi K. Bacillolysin MA, a novel bacterial metalloproteinase that produces angiostatin-like fragments from plasminogen and activates protease zymogens in the coagulation and fibrinolysis systems. J Biol Chem. 2005;280(14):14278-14287.
457. Niebauer J, Schwarzacher SP, Hayase M, Wang B, Kernoff RS, Cooke JP, Yeung AC. Local L-arginine delivery after balloon angioplasty reduces monocyte binding and induces apoptosis. Circulation. 1999;100(17):1830-1835.
458. Nording H, Baron L, Langer HF. Platelets as therapeutic targets to prevent atherosclerosis. Atherosclerosis. 2020;307:97-108.

459. Ny L, Parmer RJ, Shen Y, et al. The plasminogen receptor, Plg-R_{KT}, plays a role in inflammation and fibrinolysis during cutaneous wound healing in mice. Cell Death Dis. 2020;11(12):1054.
460. Obrosova IG, Li F, Abatan OI, Forsell MA, Komjáti K, Pacher P, Szabó C, Stevens MJ. Role of poly(ADP-ribose) polymerase activation in diabetic neuropathy. Diabetes. 2004;53(3):711-720.
461. Ogston D. Biochemistry of the plasmin system. J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol). 1980;14:5-9.
462. Okunishi K, Sisson TH, Huang SK, Hogaboam CM, Simon RH, Peters-Golden M. Plasmin overcomes resistance to prostaglandin E2 in fibrotic lung fibroblasts by reorganizing protein kinase A signaling. J Biol Chem. 2011;286(37):32231-32243.
463. O'Mullane MJ, Baker MS. Loss of cell viability dramatically elevates cell surface plasminogen binding and activation. Exp Cell Res. 1998;242(1):153-164.
464. O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, Lane WS, Cao Y, Sage EH, Folkman J. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. Cell. 1994;79(2):315-328.
465. O'Reilly MS, Holmgren L, Chen C, Folkman J. Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice. Nat Med. 1996;2(6):689-692.
466. O'Reilly MS. Angiostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and of tumor growth. EXS. 1997;79:273-294.
467. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. Cell. 1997;88(2):277-285.
468. Ortiz-Zapater E, Peiró S, Roda O, Corominas JM, Aguilar S, Ampurdanés C, Real FX, Navarro P. Tissue plasminogen activator induces pancreatic cancer cell proliferation by a non-catalytic mechanism that requires extracellular

signal-regulated kinase 1/2 activation through epidermal growth factor receptor and annexin A2. Am J Pathol. 2007;170(5):1573-1584.

469. Ouimet H, Freedman JE, Loscalzo J. Kinetics and mechanism of platelet-surface plasminogen activation by tissue-type plasminogen activator. Biochemistry. 1994;33(10):2970-2976.
470. Owen MJ, Auger J, Barber BH, Edwards AJ, Walsh FS, Crumpton MJ. Actin may be present on the lymphocyte surface. Proc Natl Acad Sci U S A. 1978;75(9):4484-4488.
471. Pakneshan P, Szyf M, Rabbani SA. Hypomethylation of urokinase (uPA) promoter in breast and prostate cancer: prognostic and therapeutic implications. Curr Cancer Drug Targets. 2005;5(7):471-488.
472. Panium S, Chalkey R. High resolution acril-amide gel electrophoresis of histones. Arch.Biochem. Biophys. 1969;130(1-2):337-346.
473. Panková K, Rösel D, Novotný M, Brábek J. The molecular mechanisms of transition between mesenchymal and amoeboid invasiveness in tumor cells. Cell Mol Life Sci. 2010;67(1):63-71.
474. Parmer RJ, Mahata M, Gong Y, Mahata SK, Jiang Q, O'Connor DT, Xi XP, Miles LA. Processing of chromogranin A by plasmin provides a novel mechanism for regulating catecholamine secretion. J Clin Invest. 2000;106(7):907-915.
475. Parri M, Taddei ML, Bianchini F, Calorini L, Chiarugi P. EphA2 reexpression prompts invasion of melanoma cells shifting from mesenchymal to amoeboid-like motility style. Cancer Res. 2009;69(5):2072-2081.
476. Parzych KR, Klionsky DJ. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. Antioxid Redox Signal. 2014;20(3):460-473.
477. Pearce JW, Janardhan KS, Caldwell S, Singh B. Angiostatin and integrin alphavbeta3 in the feline, bovine, canine, equine, porcine and murine retina and cornea. Vet Ophthalmol. 2007;10(5):313-319.
478. Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, et al. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health

practice: A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. Circulation. 2003;107(3):499-511.

479. Peeters CF, de Geus LF, Westphal JR, de Waal RM, Ruiter DJ, Wobbes T, Oyen WJ, Ruers TJ. Decrease in circulating anti-angiogenic factors (angiostatin and endostatin) after surgical removal of primary colorectal carcinoma coincides with increased metabolic activity of liver metastases. Surgery. 2005;137(2):246-249.
480. Perillo B, Di Donato M, Pezone A, Di Zazzo E, Giovannelli P, Galasso G, Castoria G, Migliaccio A. ROS in cancer therapy: the bright side of the moon. Exp Mol Med. 2020;52(2):192-203.
481. Perraud F, Labourdette G, Eclancher F, Sensenbrenner M. Primary cultures of astrocytes from different brain areas of newborn rats and effects of basic fibroblast growth factor. Dev Neurosci. 1990;12(1):11-21.
482. Perri SR, Martineau D, François M, Lejeune L, Bisson L, Durocher Y, Galipeau J. Plasminogen Kringle 5 blocks tumor progression by antiangiogenic and proinflammatory pathways. Mol Cancer Ther. 2007;6(2):441-449.
483. Perri SR, Annabi B, Galipeau J. Angiostatin inhibits monocyte/macrophage migration via disruption of actin cytoskeleton. FASEB J. 2007;21(14):3928-3936.
484. Peters S, Adjei AA. MET: a promising anticancer therapeutic target. Nat Rev Clin Oncol. 2012;9(6):314-326.
485. Petri B, Phillipson M, Kubes P. The physiology of leukocyte recruitment: an in vivo perspective. J Immunol. 2008;180(10):6439-6446.
486. Peyruchaud O, Serre CM, NicAmhlaoibh R, Fournier P, Clezardin P. Angiostatin inhibits bone metastasis formation in nude mice through a direct anti-osteoclastic activity. J Biol Chem. 2003;278(46):45826-458232.

487. Philchenkov A, Zavelevich M, Kroczak TJ, Los M. Caspases and cancer: mechanisms of inactivation and new treatment modalities. Exp Oncol. 2004;26(2):82-97.
488. Pielsticker C, Brodde MF, Raum L, Jurk K, Kehrel BE. Plasmin-induced activation of human platelets is modulated by thrombospondin-1, bona fide misfolded proteins and thiol isomerases. Int J Mol Sci. 2020;21(22):8851.
489. Pietraforte D, Vona R, Marchesi A, de Jacobis IT, Villani A, Del Principe D, Straface E. Redox control of platelet functions in physiology and pathophysiology. Antioxid Redox Signal. 2014;21(1):177-193.
490. Placencio VR, DeClerck YA. Plasminogen activator inhibitor-1 in cancer: rationale and insight for future therapeutic testing. Cancer Res. 2015;75(15):2969-2974.
491. Platelets (4-nd edition). – Academic Press (ed. A.D. Michelson), 1268 p.
492. Ploplis VA, French EL, Carmeliet P, Collen D, Plow EF. Plasminogen deficiency differentially affects recruitment of inflammatory cell populations in mice. Blood. 1998;91(6):2005-2009.
493. Plow EF, Hoover-Plow J. The functions of plasminogen in cardiovascular disease. Trends Cardiovasc Med. 2004;14(5):180-186.
494. Plow EF, Doeuvre L, Das R. So many plasminogen receptors: why? J Biomed Biotechnol. 2012;2012:141806.
495. Podor TJ, Singh D, Chindemi P, Foulon DM, McKelvie R, Weitz JI, Austin R, Boudreau G, Davies R. Vimentin exposed on activated platelets and platelet microparticles localizes vitronectin and plasminogen activator inhibitor complexes on their surface. J Biol Chem. 2002;277(9):7529-7539.
496. Polat SB, Ugurlu N, Yulek F, Simavli H, Ersoy R, Cakir B, Erel O. Evaluation of serum fibrinogen, plasminogen, α2-anti-plasmin, and plasminogen activator inhibitor levels (PAI) and their correlation with presence of retinopathy in patients with type 1 DM. J Diabetes Res. 2014;2014:317292.

497. Ponikowski P. et al. ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. Eur Heart J. 2016;37(27):2129-2200.
498. Ponting CP, Marshall JM, Cederholm-Williams SA. Plasminogen: a structural review. Blood Coagul Fibrinolysis. 1992;3(5):605-614.
499. Poole LG, Massey VL, Siow DL, Torres-Gonzáles E, Warner NL, Luyendyk JP, Ritzenthaler JD, Roman J, Arteel GE. Plasminogen activator inhibitor-1 is critical in alcohol-enhanced acute lung injury in mice. Am J Respir Cell Mol Biol. 2017;57(3):315-323.
500. Proia AD, Caldwell MC. Intraretinal neovascularization in diabetic retinopathy. Arch Ophthalmol. 2010;128(1):142-144.
501. Protasov MV, Smagina LV, Iudintseva NM, Galibin OV, Pinaev GP, Voronkina IV. Possibility of prediction of rat wound epithelization by changes of matrix metalloproteinases levels in wound fluid. Tsitologiia. 2009;51(4):311-314.
502. Pujol-Calderón F, Portelius E, Zetterberg H, Blennow K, Rosengren LE, Höglund K. Neurofilament changes in serum and cerebrospinal fluid after acute ischemic stroke. Neurosci Lett. 2019;698:58-63.
503. Qiao J, Arthur JF, Gardiner EE, Andrews RK, Zeng L, Xu K. Regulation of platelet activation and thrombus formation by reactive oxygen species. Redox Biol. 2018;14:126-130.
504. Quinton TM, Kim S, Derian CK, Jin J, Kunapuli SP. Plasmin-mediated activation of platelets occurs by cleavage of protease-activated receptor 4. J Biol Chem. 2004;279(18):18434-18439.
505. Radziwon-Balicka A, Moncada de la Rosa C, Jurasz P. Platelet-associated angiogenesis regulating factors: a pharmacological perspective. Can J Physiol Pharmacol. 2012;90(6):679-688.

506. Radziwon-Balicka A, Ramer C, Moncada de la Rosa C, Zielnik-Drabik B, Jurasz P. Angiostatin inhibits endothelial MMP-2 and MMP-14 expression: a hypoxia specific mechanism of action. Vascul Pharmacol. 2013;58(4):280-291.
507. Ramnefjell M, Aamelfot C, Helgeland L, Akslen LA. Low expression of SerpinB2 is associated with reduced survival in lung adenocarcinomas. Oncotarget. 2017;8(53):90706-90718.
508. Ranjbar K, Rahmani-Nia F, Shahabpour E. Aerobic training and l-arginine supplementation promotes rat heart and hindleg muscles arteriogenesis after myocardial infarction. J Physiol Biochem. 2016;72(3):393-404.
509. Ranson M, Andronicos NM, O'Mullane MJ, Baker MS. Increased plasminogen binding is associated with metastatic breast cancer cells: differential expression of plasminogen binding proteins. Br J Cancer. 1998;77(10):1586-1597.
510. Rebalka IA, Raleigh MJ, D'Souza DM, Coleman SK, Rebalka AN, Hawke TJ. Inhibition of PAI-1 Via PAI-039 Improves Dermal Wound Closure in Diabetes. Diabetes. 2015;64(7):2593-2602.
511. Redza-Dutordoir M, Averill-Bates DA. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. Biochim Biophys Acta. 2016;1863(12):2977-2992.
512. Reichel CA, Uhl B, Lerchenberger M, et al. Urokinase-type plasminogen activator promotes paracellular transmigration of neutrophils via Mac-1, but independently of urokinase-type plasminogen activator receptor. Circulation. 2011;124(17):1848-1859.
513. Reiner Ž. Statins in the primary prevention of cardiovascular disease. Nat Rev Cardiol. 2013;10(8):453-464.
514. Renckens R, Roelofs JJ, de Waard V, Florquin S, Lijnen HR, Carmeliet P, van der Poll T. The role of plasminogen activator inhibitor type 1 in the inflammatory response to local tissue injury. J Thromb Haemost. 2005;3(5):1018-1025.

515. Repsold L, Pool R, Karodia M, Tintinger G, Joubert AM. An overview of the role of platelets in angiogenesis, apoptosis and autophagy in chronic myeloid leukaemia. Cancer Cell Int. 2017;17:89.
516. Riondino S, Guadagni F, Formica V, Ferroni P, Roselli M. Gender differences in cancer-associated venous thromboembolism. Curr Med Chem. 2017;24(24):2589-2601.
517. Robbins KC, Summaria L. Plasminogen and plasmin. Methods Enzymol. 1976;45:257-273.
518. Roda O, Valero ML, Peiró S, Andreu D, Real FX, Navarro P. New insights into the tPA-annexin A2 interaction. Is annexin A2 CYS8 the sole requirement for this association? J Biol Chem. 2003;278(8):5702-5709.
519. Rohani MG, Parks WC. Matrix remodeling by MMPs during wound repair. Matrix Biol. 2015;44-46:113-121.
520. Roka-Moya YM, Bilous VL, Zhernosekov DD. Novel aspects of platelet aggregation. Biopolimers Cell. 2014;30(1):10-15.
521. Roka-Moya YM, Zhernossekov DD, Yusova E.I., Kapustianenko LG, Grinenko TV. The study of the sites of plasminogen molecule which are responsible for inhibitory effect of Lys-plasminogen on platelet aggregation. Ukr Biochem J. 2014;86(5):80-87.
522. Romer J, Bugge TH, Pyke C, Lund LR, Flick MJ, Degen JL, Dano K. Impaired wound healing in mice with a disrupted plasminogen gene. Nat Med. 1996;2(3):287-292.
523. Rondina MT, Weyrich AS. Regulation of the genetic code in megakaryocytes and platelets. J Thromb Haemost. 2015;13 Suppl 1(0 1):S26-S32.
524. Rosell A, Cuadrado E, Ortega-Aznar A, Hernández-Guillamon M, Lo EH, Montaner J. MMP-9-positive neutrophil infiltration is associated to blood-brain barrier breakdown and basal lamina type IV collagen degradation during hemorrhagic transformation after human ischemic stroke. Stroke. 2008;39(4):1121-1126.

525. Rossignol P, Luttun A, Martin-Ventura JL, Lupu F, Carmeliet P, Collen D, Anglès-Cano E, Lijnen HR. Plasminogen activation: a mediator of vascular smooth muscle cell apoptosis in atherosclerotic plaques. J Thromb Haemost. 2006;4(3):664-670.
526. Roth D, Piekarek M, Paulsson M, Christ H, Bloch W, Krieg T, Davidson JM, Eming SA. Plasmin modulates vascular endothelial growth factor-A-mediated angiogenesis during wound repair. Am J Pathol. 2006;168(2):670-684.
527. Rubenstein P, Ruppert T, Sandra A. Selective isoactin release from cultured embryonic skeletal muscle cells. J Cell Biol. 1982;92(1):164-169.
528. Sabrkhany S, Griffioen AW, Oude Egbrink MG. The role of blood platelets in tumor angiogenesis. Biochim Biophys Acta. 2011;1815(2):189-196.
529. Sack RA, Beaton AR, Sathe S. Diurnal variations in angiostatin in human tear fluid: a possible role in prevention of corneal neovascularization. Curr Eye Res. 1999;18(3):186-193.
530. Sakai T, Balasubramanian K, Maiti S, Halder JB, Schroit AJ. Plasmin-cleaved beta-2-glycoprotein 1 is an inhibitor of angiogenesis. Am J Pathol. 2007;171(5):1659-1669.
531. Salgado R, Vermeulen PB, Benoy I, Weytjens R, Huget P, Van Marck E, Dirix LY. Platelet number and interleukin-6 correlate with VEGF but not with bFGF serum levels of advanced cancer patients. Br J Cancer. 1999;80(5-6):892-897.
532. Salgado R, Benoy I, Bogers J, Weytjens R, Vermeulen P, Dirix L, Van Marck E. Platelets and vascular endothelial growth factor (VEGF): a morphological and functional study. Angiogenesis. 2001;4(1):37-43.
533. Samoylenko A, Dimova EY, Kozlova N, Drobot L, Kietzmann T. The adaptor protein Ruk/CIN85 activates plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) expression via hypoxia-inducible factor-1alpha. Thromb Haemost. 2010;103(5):901-909.

534. Samoylenko A., Vynnytska-Myronovska B., Byts N., et al. Increased levels of the HER1 adaptor protein Rukl/CIN85 contribute to breast cancer malignancy. Carcinogenesis. 2012;33(10):1976-1984.
535. Sánchez LM, Freije JP, Merino AM, Vizoso F, Foltmann B, López-Otín C. Isolation and characterization of a pepsin C zymogen produced by human breast tissues. J Biol Chem. 1992;267(34):24725-24731.
536. Santibanez JF, Obradović H, Kukolj T, Krstić J. Transforming growth factor-β, matrix metalloproteinases, and urokinase-type plasminogen activator interaction in the cancer epithelial to mesenchymal transition. Dev Dyn. 2018;247(3):382-395.
537. Santos IC, Silbiger VN, Higuchi DA, Gomes MA, Barcelos LS, Teixeira MM, Lopes MT, Cardoso VN, Lima MP, Araujo RC, Pesquero JB, Pesquero JL. Angiostatic activity of human plasminogen fragments is highly dependent on glycosylation. Cancer Sci. 2010 101(2):453-459.
538. Sasaki H, Kotsuji F, Tsang BK. Caspase 3-mediated focal adhesion kinase processing in human ovarian cancer cells: possible regulation by X-linked inhibitor of apoptosis protein. Gynecol Oncol. 2002;85(2):339-350.
539. Satelli A, Li S. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. Cell Mol Life Sci. 2011;68(18):3033-3046.
540. Satoh M, Kidokoro K, Ozeki M, Nagasu H, Nishi Y, Ihoriya C, Fujimoto S, Sasaki T, Kashihara N. Angiostatin production increases in response to decreased nitric oxide in aging rat kidney. Lab Invest. 2013;93(3):334-343.
541. Sawada M, Matsumoto M, Sawamoto K. Vascular regulation of adult neurogenesis under physiological and pathological conditions. Front Neurosci. 2014;8:53.
542. Sawicki G, Sanders EJ, Salas E, Wozniak M, Rodrigo J, Radomski MW. Localization and translocation of MMP-2 during aggregation of human platelets. Thromb Haemost. 1998;80(5):836-839.

543. Scapini P, Nesi L, Morini M, Tanghetti E, Belleri M, Noonan D, Presta M, Albini A, Cassatella MA. Generation of biologically active angiostatin kringle 1-3 by activated human neutrophils. J Immunol. 2002;168(11):5798-5804.
544. Schafer AI, Adelman B. Plasmin inhibition of platelet function and of arachidonic acid metabolism. J Clin Invest. 1985;75(2):456-461.
545. Schäfer BM, Maier K, Eickhoff U, Todd RF, Kramer MD. Plasminogen activation in healing human wounds. Am J Pathol. 1994;144(6):1269-1280.
546. Schäfer, M., Werner, S. Cancer as an overhealing wound: an old hypothesis revisited. Nat Rev Mol Cell Biol. 2008;9:628-638.
547. Schroder WA, Major LD, Le TT, et al. Tumor cell-expressed SerpinB2 is present on microparticles and inhibits metastasis. Cancer Med. 2014;3(3):500-513.
548. Schuliga M. The inflammatory actions of coagulant and fibrinolytic proteases in disease. Mediators Inflamm. 2015;2015:437695.
549. Schuster V, Hügle B, Tefs K. Plasminogen deficiency. J Thromb Haemost. 2007;5(12):2315-2322.
550. Selvarajan S, Lund LR, Takeuchi T, Craik CS, Werb Z. A plasma kallikrein-dependent plasminogen cascade required for adipocyte differentiation. Nat Cell Biol. 2001;3(3):267-275.
551. Seo YH, Joo YE, Choi SK, Rew JS, Park CS, Kim SJ. Prognostic significance of p21 and p53 expression in gastric cancer. Korean J Intern Med. 2003;18(2):98-103.
552. Serhan CN. The resolution of inflammation: the devil in the flask and in the details. FASEB J. 2011;25(5):1441-1448.
553. Serrano MA, Li Z, Dangeti M, Musich PR, Patrick S, Roginskaya M, Cartwright B, Zou Y. DNA-PK, ATM and ATR collaboratively regulate p53-RPA interaction to facilitate homologous recombination DNA repair. Oncogene. 2013;32(19):2452-2462.
554. Shantha Kumara HM, Tohme ST, Yan X, Nasar A, Senagore AJ, Kalady MF, Hyman N, Kim IY, Whelan RL. Plasma levels of angiostatin and endostatin

remain unchanged for the first 3 weeks after colorectal cancer surgery. Surg Endosc. 2011;25(6):1939-1944.

555. Sharma MR, Tuszynski GP, Sharma MC. Angiostatin-induced inhibition of endothelial cell proliferation/apoptosis is associated with the down-regulation of cell cycle regulatory protein cdk5. J Cell Biochem. 2004;91(2):398-409.
556. Shattil SJ, Newman PJ. Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets. Blood. 2004 ;104(6):1606-1615.
557. Shen CC, Huang HM, Ou HC, Chen HL, Chen WC, Jeng KC. Protective effect of nicotinamide on neuronal cells under oxygen and glucose deprivation and hypoxia/reoxygenation. J Biomed Sci. 2004;11(4):472-481.
558. Shen Y, Guo Y, Mikus P, Sulniute R, Wilczynska M, Ny T, Li J. Plasminogen is a key proinflammatory regulator that accelerates the healing of acute and diabetic wounds. Blood. 2012;119(24):5879-5887.
559. Shen Y, Guo Y, Wilczynska M, Li J, Hellström S, Ny T. Plasminogen initiates and potentiates the healing of acute and chronic tympanic membrane perforations in mice. J Transl Med. 2014;12:5.
560. Shen M, Zhao X, Zhao L, Shi L, An S, Huang G, Liu J. Met is involved in TIGAR-regulated metastasis of non-small-cell lung cancer. Mol Cancer. 2018;17(1):88.
561. Sheu JR, Fong TH, Liu CM, Shen MY, Chen TL, Chang Y, Lu MS, Hsiao G. Expression of matrix metalloproteinase-9 in human platelets: regulation of platelet activation in in vitro and in vivo studies. Br J Pharmacol. 2004;143(1):193-201.
562. Shigeta O, Kojima H, Jikuya T, Terada Y, Atsumi N, Sakakibara Y, Nagasawa T, Mitsui T. Aprotinin inhibits plasmin-induced platelet activation during cardiopulmonary bypass. Circulation. 1997;96(2):569-574.
563. Shiri R, Yari F, Ahmadinejad M, Vaeli S, Tabatabaei MR. The caspase-3 inhibitor (peptide Z-DEVD-FMK) affects the survival and function of platelets in platelet concentrate during storage. Blood Res. 2014;49(1):49-53.

564. Shoshan-Barmatz V, De Pinto V, Zweckstetter M, Raviv Z, Keinan N, Arbel N. VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death. Mol Aspects Med. 2010;31(3):227-285.
565. Shyong MP, Lee FL, Kuo PC, Wu AC, Cheng HC, Chen SL, Tung TH, Tsao YP. Reduction of experimental diabetic vascular leakage by delivery of angiostatin with a recombinant adeno-associated virus vector. Mol Vis. 2007;13:133-141.
566. Sill JC, Proper JA, Johnson ME, Uhl CB, Katusic ZS. Reactive oxygen species and human platelet GP IIb/IIIa receptor activation. Platelets. 2007;18(8):613-619.
567. Sima J, Zhang SX, Shao C, Fant J, Ma JX. The effect of angiostatin on vascular leakage and VEGF expression in rat retina. FEBS Lett. 2004;564(1-2):19-23.
568. Simone TM, Higgins SP, Higgins CE, Lennartz MR, Higgins PJ. Chemical antagonists of plasminogen activator inhibitor-1: mechanisms of action and therapeutic potential in vascular disease. J Mol Genet Med. 2014;8(3):125.
569. Simpson AJ, Booth NA, Moore NR, Bennett B. Distribution of plasminogen activator inhibitor (PAI-1) in tissues. J Clin Pathol. 1991;44(2):139-143.
570. Smalheiser NR. Proteins in unexpected locations. Mol Biol Cell. 1996;7(7):1003-1014.
571. Smart N, Dubé KN, Riley PR. Coronary vessel development and insight towards neovascular therapy. Int J Exp Pathol. 2009;90(3):262-283.
572. Smith E, Hoffman R. Multiple fragments related to angiostatin and endostatin in fluid from venous leg ulcers. Wound Repair Regen. 2005;13(2):148-157.
573. Snoek-van Beurden PA, Von den Hoff JW. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. Biotechniques. 2005;38(1):73-83.
574. Sodha NR, Clements RT, Boodhwani M, et al. Endostatin and angiostatin are increased in diabetic patients with coronary artery disease and associated with

impaired coronary collateral formation. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2009;296(2):H428-H434.

575. Soff GA. Angiostatin and angiostatin-related proteins. Cancer Metastasis Rev. 2000;19(1-2):97-107.
576. Solly F, Fish R, Simard B, Bolle N, Kruithof E, Polack B, Pernod G. Tissue-type plasminogen activator has antiangiogenic properties without effect on tumor growth in a rat C6 glioma model. Cancer Gene Ther. 2008;15(10):685-692.
577. Sottrup-Jensen L, Claeys H, Zajdel M, Peterson TE, Magnusson S. The primary structure of human plasminogen: Isolation of two lysine-binding fragments and one “mini”-plasminogen (MW, 38,000) by elastase-catalyzed specific limited proteolysis. Progress in chemical fibrinolysis and thrombolysis. Davidson, J.F., Samama, M. and Denoyers, P., (eds). 1978,3:191-209.
578. Sottrup-Jensen L. Alpha-macroglobulins: structure, shape, and mechanism of proteinase complex formation. J Biol Chem. 1989;264(20):11539-11542.
579. Sousa LP, Silva BM, Brasil BS, Nogueira SV, Ferreira PC, Kroon EG, Kato K, Bonjardim CA. Plasminogen/plasmin regulates alpha-enolase expression through the MEK/ERK pathway. Biochem Biophys Res Commun. 2005;337(4):1065-1071.
580. Spinale FG, Villarreal F. Targeting matrix metalloproteinases in heart disease: lessons from endogenous inhibitors. Biochem Pharmacol. 2014;90(1):7-15.
581. Spranger J, Hammes HP, Preissner KT, Schatz H, Pfeiffer AF. Release of the angiogenesis inhibitor angiostatin in patients with proliferative diabetic retinopathy: association with retinal photocoagulation. Diabetologia. 2000;43(11):1404-1407.
582. Stalder M, Hauert J, Kruithof EK, Bachmann F. Release of vascular plasminogen activator (v-PA) after venous stasis: electrophoretic-zymographic analysis of free and complexed v-PA. Br J Haematol. 1985;61(1):169-176.

583. Stathakis P, Fitzgerald M, Matthias LJ, Chesterman CN, Hogg PJ. Generation of angiostatin by reduction and proteolysis of plasmin. Catalysis by a plasmin reductase secreted by cultured cells. J Biol Chem. 1997;272(33):20641-20645.
584. Stefanini MO, Wu FT, Mac Gabhann F, Popel AS. A compartment model of VEGF distribution in blood, healthy and diseased tissues. BMC Syst Biol. 2008;19(2):77.
585. Sten-Linder M, Linder C, Strander H, Munck-Wikland E, Wersäll P, Linder S, Wiman B. Angiostatin fragments in urine from patients with malignant disease. Anticancer Res. 1999;19(4C):3409-3414.
586. Stepanova V, Lebedeva T, Kuo A, Yarovoi S, Tkachuk S, Zaitsev S, Bdeir K, Dumler I, Marks MS, Parfyonova Y, Tkachuk VA, Higazi AA, Cines DB. Nuclear translocation of urokinase-type plasminogen activator. Blood. 2008;112(1):100-110.
587. Stoscheck CM. Quantitation of protein. Methods Enzymol. 1990;182:50-68.
588. Sudakov NP, Klimenkov IV, Byvaltsev VA, Nikiforov SB, Konstantinov YM. Extracellular actin in health and disease. Biochemistry (Mosc). 2017;82(1):1-12.
589. Sugimoto MA, Ribeiro ALC, Costa BRC, et al. Plasmin and plasminogen induce macrophage reprogramming and regulate key steps of inflammation resolution via annexin A1. Blood. 2017;129(21):2896-2907.
590. Suleman L. Extracellular bacterial proteases in chronic wounds: a potential therapeutic target? Adv Wound Care. 2016;5(10):455-463.
591. Sullivan KD, Galbraith MD, Andrysik Z, Espinosa JM. Mechanisms of transcriptional regulation by p53. Cell Death Differ. 2018;25(1):133-143.
592. Sulniute R, Shen Y, Guo YZ, Fallah M, Ahlskog N, Ny L, Rakhimova O, Broden J, Boija H, Moghaddam A, Li J, Wilczynska M, Ny T. Plasminogen is a critical regulator of cutaneous wound healing. Thromb Haemost. 2016;115(5):1001-1009.
593. Suzuki K. Protein C inhibitor (PAI-3): structure and multi-function. Fibrinolysis Proteolysis; 2000; 14(2-3);133-145.

594. Syed SP, Martin AM, Haupt HM, Arenas-Elliot CP, Brooks JJ. Angiostatin receptor annexin II in vascular tumors including angiosarcoma. Hum Pathol. 2007;38(3):508-513.
595. Syrovets T, Jendrach M, Rohwedder A, Schüle A, Simmet T. Plasmin-induced expression of cytokines and tissue factor in human monocytes involves AP-1 and IKKbeta-mediated NF-kappaB activation. Blood. 2001;97(12):3941-3950.
596. Syrovets T, Simmet T. Novel aspects and new roles for the serine protease plasmin. Cell Mol Life Sci. 2004;61(7-8):873-885.
597. Syrovets T, Lunov O, Simmet T. Plasmin as a proinflammatory cell activator. J Leukoc Biol. 2012;92(3):509-519.
598. Szabo I, Simon M Jr, Hunyadi J. Plasmin promotes keratinocyte migration and phagocytic-killing accompanied by suppression of cell proliferation which may facilitate re-epithelialization of wound beds. Clin Dev Immunol. 2004;11(3-4):233-240.
599. Szczeklik A, Musiał J, Undas A, Gajewski P, Góra P, Swadźba J, Jankowski M. Inhibition of thrombin generation by simvastatin and lack of additive effects of aspirin in patients with marked hypercholesterolemia. J Am Coll Cardiol. 1999;33(5):1286-1293.
600. Szekanecz Z, Gáspár L, Koch AE. Angiogenesis in rheumatoid arthritis. Front Biosci. 2005;10:1739-1753.
601. Taddei ML, Giannoni E, Fiaschi T, Chiarugi P. Anoikis: an emerging hallmark in health and diseases. J Pathol. 2012;226(2):380-393.
602. Takada A, Shizume K, Cho M, Takada Y. Differences in the activation rates of plasminogen by tissue plasminogen activator and urokinase. Thromb Res. 1987;45(4):371-381.
603. Tang Z, He Z. TIGAR promotes growth, survival and metastasis through oxidation resistance and AKT activation in glioblastoma. Oncol Lett. 2019;18(3):2509-2517.

604. Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 and autophagy. Methods Mol Biol. 2008;445:77-88.
605. Tarui T, Miles LA, Takada Y. Specific interaction of angiostatin with integrin alpha(v)beta(3) in endothelial cells. J Biol Chem. 2001;276(43):39562-39568.
606. Tefs K, Gueorguieva M, Klammt J, et al. Molecular and clinical spectrum of type I plasminogen deficiency: A series of 50 patients. Blood. 2006;108(9):3021-3026.
607. Thunø M, Macho B, Eugen-Olsen J. suPAR: the molecular crystal ball. Dis Markers. 2009;27(3):157-172.
608. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci U S A. 1979;76(9):4350-4354.
609. Troyanovsky B, Levchenko T, Månsson G, Matvijenko O, Holmgren L. Angiomotin: an angiostatin binding protein that regulates endothelial cell migration and tube formation. J Cell Biol. 2001;152(6):1247-1254.
610. Tschoepe D, Spangenberg P, Esser J, Schwippert B, Kehrel B, Roesen P, Gries FA. Flow-cytometric detection of surface membrane alterations and concomitant changes in the cytoskeletal actin status of activated platelets. Cytometry. 1990;11(5):652-656.
611. Tsuji T, Kelly NJ, Takahashi S, Leme AS, Houghton AM, Shapiro SD. Macrophage elastase suppresses white adipose tissue expansion with cigarette smoking. Am J Respir Cell Mol Biol. 2014;51(6):822-829.
612. Tuszynski GP, Sharma MR, Rothman VL, Sharma MC. Angiostatin binds to tyrosine kinase substrate annexin II through the lysine-binding domain in endothelial cells. Microvasc Res. 2002;64(3):448-462.
613. Tuteja N, Chandra M, Tuteja R, Misra MK. Nitric oxide as a unique bioactive signaling messenger in physiology and pathophysiology. J Biomed Biotechnol. 2004;2004(4):227-237.
614. Tykhomyrov AA. Interaction of actin with plasminogen/plasmin system: mechanisms and physiological role. Biopolymers Cell. 2012;28(6):413-423.

615. Tykhomyrov AA. Dynamics of thrombin-induced exposition of actin on the platelet surface. Ukr Biochem J. 2014;86(5):74-81.
616. Tykhomyrov AA, Nedzvetsky VS, Bardachenko NI, Grinenko TV, Kuryata OV. Statin treatment affects serum angiostatin levels in patients with ischemic heart disease. Life Sciences. 2015;134:24-29.
617. Tykhomyrov AA, Shram SI, Grinenko TV. Role of angiostatins in diabetic complications. Biomed Khim. 2015;61(1):41-56.
618. Tykhomyrov AA, Pavlova AS, Nedzvetsky VS. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): on the 45th anniversary of discovery. Neurophysiol. 2016;48(1):54-71.
619. Tykhomyrov A, Nedzvetsky V, Shemet S, Ağca CA. Production and characterization of polyclonal antibodies to human recombinant domain B-free antihemophilic factor VIII. Turk J Biol. 2017;41(6):857-867.
620. Tykhomyrov AA, Zhernossekov DD, Grinenko TV. Surface-exposed actin binds plasminogen on the membrane of agonist-activated platelets: a flow cytometry study. Biopolymers Cell. 2017;33(3);172-182.
621. Tykhomyrov AA, Nedzvetsky VS, Ağca CA, Korsa VV, Grinenko TV. Plasminogen and its fragments in rat brain: a plausible role for astrocytes in angiostatin generation. Ukr Biochem J. 2017;89(2),43-54.
622. Tykhomyrov AA, Nedzvetsky VS, Zabida AA, Ağca CA, Kuryata OV. L-arginine treatment improves angiogenic response and reduces matrix metalloproteinase activity in chronic heart failure patients with coronary artery disease. PharmaNutrition. 2018;6(4),137-146.
623. Tykhomyrov AA, Zhernosekov DD, Guzyk MM, Korsa VV, Grinenko TV. Plasminogen modulates formation of reactive oxygen species in human platelets. Ukr Biochem J. 2018;90(6):31-40.
624. Tykhomyrov AA, Kushnir YS, Nedzvetsky VS, Grinenko TV, Kuryata OV. Citicoline affects serum angiostatin and neurospecific protein levels in patients with atrial fibrillation and ischemic stroke. Ukr Biochem J. 2019;91(5),34-45.

625. Tykhomyrov AA, Zhernosekov DD, Grinenko TV. Plasminogen modulates formation and release of platelet angiogenic regulators. Ukr Biochem J. 2020;92(1): 31-40.
626. Urano T, Castellino FJ, Suzuki Y. Regulation of plasminogen activation on cell surfaces and fibrin. J Thromb Haemost. 2018;16(8):1487-1497.
627. Vago JP, Sugimoto MA, Lima KM, et. al. Plasminogen and the plasminogen receptor, Plg-R_{KT}, regulate macrophage phenotypic, and functional changes. Front Immunol. 2019;10:1458.
628. Valiente M, Obenauf AC, Jin X, Chen Q, Zhang XH, Lee DJ, Chaft JE, Kris MG, Huse JT, Brogi E, Massagué J. Serpins promote cancer cell survival and vascular co-option in brain metastasis. Cell. 2014;156(5):1002-1016.
629. van der Vorm LN, Remijn JA, de Laat B, Huskens D. Effects of plasmin on von Willebrand factor and platelets: a narrative review. TH Open. 2018;2(2):e218-e228.
630. van Tilborg AA, Sweep FC, Geurts-Moespot AJ, Wetzels AM, de Waal RM, Westphal JR, Massuger LF. Plasminogen activators are involved in angiostatin generation in vivo in benign and malignant ovarian tumor cyst fluids. Int J Oncol. 2014;44(4):1394-1400.
631. Vaughan DE, Rai R, Khan SS, Eren M, Ghosh AK. Plasminogen activator inhibitor-1 is a marker and a mediator of senescence. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2017;37(8):1446-1452.
632. Veith AP, Henderson K, Spencer A, Sligar AD, Baker AB. Therapeutic strategies for enhancing angiogenesis in wound healing. Adv Drug Deliv Rev. 2019;146:97-125.
633. Verheul HM, Hoekman K, Luykx-de Bakker S, Eekman CA, Folman CC, Broxterman HJ, Pinedo HM. Platelet: transporter of vascular endothelial growth factor. Clin Cancer Res. 1997;3(12 Pt 1):2187-2190.
634. Verheul HM, Lolkema MP, Qian DZ, Hilkes YH, Liapi E, Akkerman JW, Pili R, Voest EE. Platelets take up the monoclonal antibody bevacizumab. Clin Cancer Res. 2007;13(18 Pt 1):5341-5347.

635. Virág L, Szabó C. The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. Pharmacol Rev. 2002;54(3):375-429.
636. Wahl ML, Kenan DJ, Gonzalez-Gronow M, Pizzo SV. Angiostatin's molecular mechanism: aspects of specificity and regulation elucidated. J Cell Biochem. 2005;96(2):242-261.
637. Wajih N, Sane DC. Angiostatin selectively inhibits signaling by hepatocyte growth factor in endothelial and smooth muscle cells. Blood. 2003;101(5):1857-1863.
638. Walker JB, Nesheim ME. The molecular weights, mass distribution, chain composition, and structure of soluble fibrin degradation products released from a fibrin clot perfused with plasmin. J Biol Chem. 1999;274(8):5201-5212.
639. Walsh TG, Metharom P, Berndt MC. The functional role of platelets in the regulation of angiogenesis. Platelets. 2015;26(3):199-211.
640. Walter JJ, Sane DC. Angiostatin binds to smooth muscle cells in the coronary artery and inhibits smooth muscle cell proliferation and migration In vitro. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1999;19(9):2041-2048.
641. Wang H, Schultz R, Hong J, Cundiff DL, Jiang K, Soff GA. Cell surface-dependent generation of angiostatin4.5. Cancer Res. 2004;64(1):162-168.
642. Wang H, Doll JA, Jiang K, Cundiff DL, Czarnecki JS, Wilson M, Ridge KM, Soff GA. Differential binding of plasminogen, plasmin, and angiostatin4.5 to cell surface beta-actin: implications for cancer-mediated angiogenesis. Cancer Res. 2006;66(14):7211-7215.
643. Wang H, Zheng Y, He S. Induction of release and up-regulated gene expression of interleukin (IL)-8 in A549 cells by serine proteinases. BMC Cell Biol. 2006;7:22.
644. Wang L, Liang C, Li F, Guan D, Wu X, Fu X, Lu A, Zhang G. PARP1 in carcinomas and PARP1 inhibitors as antineoplastic drugs. Int J Mol Sci. 2017;18(10):2111.

645. Warejcka DJ, Vaughan KA, Bernstein AM, Twining SS. Differential conversion of plasminogen to angiostatin by human corneal cell populations. Mol Vis. 2005;11:859-868.
646. Wei B, Du J, Li J, Qi J, Tang C. The modulating effect of L-arginine on collagen metabolism of pulmonary artery in pulmonary hypertension induced by a left-to-right shunt. Zhonghua Yi Xue Za Zhi. 2002;82(18):1273-1275.
647. Weide I, Tippler B, Syrovets T, Simmet T. Plasmin is a specific stimulus of the 5-lipoxygenase pathway of human peripheral monocytes. Thromb Haemost. 1996;76(4):561-568.
648. Weihrauch D, Lohr NL, Mraovic B, Ludwig LM, Chilian WM, Pagel PS, Warltier DC, Kersten JR. Chronic hyperglycemia attenuates coronary collateral development and impairs proliferative properties of myocardial interstitial fluid by production of angiostatin. Circulation. 2004;109(19):2343-2348.
649. Weinstein MJ, Doolittle RF. Differential specificities of the thrombin, plasmin and trypsin with regard to synthetic and natural substrates and inhibitors. Biochim Biophys Acta. 1972;258(2):577-590.
650. Weinzierl MR, Collmann H, Korinth MC, Gilsbach JM, Rohde V. Management of hydrocephalus in children with plasminogen deficiency. Eur J Pediatr Surg. 2007;17(2):124-128.
651. Wen-Li Z, Jian W, Yan-Fang T, et al. Inhibition of the ecto-beta subunit of F1F0-ATPase inhibits proliferation and induces apoptosis in acute myeloid leukemia cell lines. J Exp Clin Cancer Res. 2012;31(1):92.
652. Westby MJ, Dumville JC, Stubbs N, et al. Protease activity as a prognostic factor for wound healing in venous leg ulcers. Cochrane Database Syst Rev. 2018;9(9):CD012841.
653. Westphal JR, Van't Hullenaar R, Geurts-Moespot A, Sweep FC, Verheijen JH, Bussemakers MM, Askaa J, Clemmensen I, Eggermont AA, Ruiter DJ, De Waal RM. Angiostatin generation by human tumor cell lines: involvement of plasminogen activators. Int J Cancer. 2000;86(6):760-767.

654. Westrick RJ, Røjkjaer LP, Yang AY, Roh MH, Siebert AE, Ginsburg D. Deficiency of plasminogen activator inhibitor-2 results in accelerated tumor growth. J Thromb Haemost. 2020;18(11):2968-2975.
655. Weymann A, Sabashnikov A, Ali-Hasan-Al-Saegh S, et al. Predictive role of coagulation, fibrinolytic, and endothelial markers in patients with atrial fibrillation, stroke, and thromboembolism: a meta-analysis, meta-regression, and systematic review. Med Sci Monit Basic Res. 2017;23:97-140.
656. White J.G. Arrangements of actin filaments in the cytoskeleton of human platelets. Am J Pathol. 1984;117(2):207-217.
657. Whyte CS, Swieringa F, Mastenbroek TG, et al. Plasminogen associates with phosphatidylserine-exposing platelets and contributes to thrombus lysis under flow. Blood. 2015;125(16):2568-2578.
658. Whyte CS, Morrow GB, Baik N, Booth NA, Jalal MM, Parmer RJ, Miles LA, Mutch NJ. Exposure of plasminogen and a novel plasminogen receptor, Plg-R_{KT}, on activated human and murine platelets. Blood. 2021;137(2):248-257.
659. Wilgus T.A., Roy S., McDaniel J.C. Neutrophils and wound repair: positive actions and negative reactions. Adv Wound Care. 2013;2(7):379-388.
660. Wiman B, Wallén P. On the primary structure of human plasminogen and plasmin. Purification and characterization of cyanogen-bromide fragments. Eur J Biochem. 1975;57(2):387-394.
661. Wojtukiewicz MZ, Sierko E, Hempel D, Tucker SC, Honn KV. Platelets and cancer angiogenesis nexus. Cancer Metastasis Rev. 2017;36(2):249-262.
662. Won KY, Lim SJ, Kim GY, Kim YW, Han SA, Song JY, Lee DK. Regulatory role of p53 in cancer metabolism via SCO2 and TIGAR in human breast cancer. Hum Pathol. 2012; 43(2):221-228.
663. Wood H. New insights into the neurological effects of COVID-19. Nat Rev Neurol. 2020;16(8):403.
664. Woronowicz K, Dilks JR, Rozenvayn N, Dowal L, Blair PS, Peters CG, Woronowicz L, Flaumenhaft R. The platelet actin cytoskeleton associates

with SNAREs and participates in alpha-granule secretion. Biochemistry. 2010;49(21):4533-4542.

665. Wu TT, Tsai JH, Tsai JH, Kuo SJ, Yu SY, Huang CY, Hsieh HY, Hsieh YS, Liu JY. Augmented release of matrix metalloproteinase-9 by PKC activation in organotypic cultures of human breast cancer and adjacent normal breast tissue and fibroadenoma. Chin J Physiol. 2004;47(2):73-78.
666. Wu WC, Chen CC, Liu CH, Wang NK, Chen KJ, Chen TL, Hwang YS, Li LM, Lai CC. Plasmin treatment accelerates vascular endothelial growth factor clearance from rabbit eyes. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2011;52(9):6162-6167.
667. Wu T, Du Y, Han J, et al. Urinary angiostatin - a novel putative marker of renal pathology chronicity in lupus nephritis. Mol Cell Proteomics. 2013;12(5):1170-1179.
668. Wu Z, Zeng Y, Zhong M, Wang B. Targeting A549 lung adenocarcinoma cell growth and invasion with protease- activated receptor- 1 siRNA. Mol Med Rep. 2014;9(5):1787-1793.
669. Wu G, Quek AJ, Caradoc-Davies TT, Ekkel SM, Mazzitelli B, Whisstock JC, Law RHP. Structural studies of plasmin inhibition. Biochem Soc Trans. 2019;47(2):541-557.
670. Wygrecka M, Marsh LM, Morty RE, Henneke I, Guenther A, Lohmeyer J, Markart P, Preissner KT. Enolase-1 promotes plasminogen-mediated recruitment of monocytes to the acutely inflamed lung. Blood. 2009;113(22):5588-5598.
671. Xia YY, Bu R, Cai GY, Zhang XG, Duan SW, Wu J, Wu D, Chen XM. Urinary angiostatin: a novel biomarker of kidney disease associated with disease severity and progression. BMC Nephrol. 2019;20(1):118.
672. Xie JM, Li B, Yu HP, Gao QG, Li W, Wu HR, Qin ZH. TIGAR has a dual role in cancer cell survival through regulating apoptosis and autophagy. Cancer Res. 2014;74(18):5127-5138.

673. Xu S, Lu J, Shao A, Zhang JH, Zhang J. Glial Cells: Role of the immune response in ischemic stroke. Front Immunol. 2020; 11: 294.
674. Xu L, Sun Y, Yang K, Zhao D, Wang Y, Ren S. Novel homozygous mutation of plasminogen in ligneous conjunctivitis: a case report and literature review. Ophthalmic Genet. 2021;42(2):105-109.
675. Xue Y, Bodin C, Olsson K. Crystal structure of the native plasminogen reveals an activation-resistant compact conformation. J Thromb Haemost. 2012;10(7):1385-1396.
676. Yabushita H, Noguchi M, Obayashi Y, Kishida T, Noguchi Y, Sawaguchi K, Noguchi M. Angiostatin expression in ovarian cancer. Oncol Rep. 2003;10(5):1225-1230.
677. Yamahara K, Min KD, Tomoike H, Kangawa K, Kitamura S, Nagaya N. Pathological role of angiostatin in heart failure: an endogenous inhibitor of mesenchymal stem-cell activation. Heart. 2009;95(4):283-289.
678. Yanbaeva DG, Dentener MA, Creutzberg EC, Wesseling G, Wouters EF. Systemic effects of smoking. Chest. 2007;131(5):1557-1566.
679. Yang W, Arii S, Gorrin-Rivas MJ, Mori A, Onodera H, Imamura M. Human macrophage metalloelastase gene expression in colorectal carcinoma and its clinicopathologic significance. Cancer. 2001;91(7):1277-1283.
680. Yang DZ, He J, Zhang JC, Wang ZR. Angiostatin inhibits pancreatic cancer cell proliferation and growth in nude mice. World J Gastroenterol. 2005;11(32):4992-4996.
681. Yang L, Shi P, Zhao G, Xu J, Peng W, Zhang J, Zhang G, Wang X, Dong Z, Chen F, Cui H. Targeting cancer stem cell pathways for cancer therapy. Signal Transduct Target Ther. 2020;5(1):8.
682. Yarmolinsky J, Bordin Barbieri N, Weinmann T, Ziegelmann PK, Duncan BB, Inês Schmidt M. Plasminogen activator inhibitor-1 and type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis of observational studies. Sci Rep. 2016; 6: 17714.

683. Yaron JR, Zhang L, Guo Q, Haydel SE, Lucas AR. Fibrinolytic Serine Proteases, Therapeutic Serpins and Inflammation: Fire Dancers and Firestorms. Front Cardiovasc Med. 2021; 8: 648947.
684. Yepes M, Lawrence DA. Neuroserpin: a selective inhibitor of tissue-type plasminogen activator in the central nervous system. Thromb Haemost. 2004;91(3):457-464.
685. Yepes M. The plasminogen activating system in the pathogenesis of Alzheimer's disease. Neural Regen Res. 2021;16(10):1973-1977.
686. Yorimitsu T, Klionsky DJ. Autophagy: molecular machinery for self-eating. Cell Death Differ. 2005;12(Suppl 2):1542-1552.
687. Yoshii SR, Mizushima N. Monitoring and measuring autophagy. Int J Mol Sci. 2017;18(9):1865.
688. Yun SH, Sim EH, Goh RY, Park JI, Han JY. Platelet activation: the mechanisms and potential biomarkers. Biomed Res Int. 2016; 2016: 9060143.
689. Zhang L, Gong Y, Grella DK, Castellino FJ, Miles LA. Endogenous plasmin converts Glu-plasminogen to Lys-plasminogen on the monocytoid cell surface. J Thromb Haemost. 2003;1(6):1264-1270.
690. Zhang SX, Sima J, Shao C, Fant J, Chen Y, Rohrer B, Gao G, Ma JX. Plasminogen kringle 5 reduces vascular leakage in the retina in rat models of oxygen-induced retinopathy and diabetes. Diabetologia. 2004;47(1):124-131.
691. Zhernossekov DD, Roka-Moiia YM, Tykhomyrov AA, Grinenko TV. Lys-plasminogen stimulates vitronectin exposure on the platelet surface. Biopolymers Cell. 2015;31(2):104-108.
692. Zhernossekov D, Roka-Moiia Y, Tykhomyrov A, Guzyk M, Grinenko T. Glu- and Lys-forms of plasminogen differentially affect phosphatidylserine exposure on the platelet surface. Ukr Biochem J.; 2017;89 (special issue):102-110.
693. Zhuo M, Holtzman DM, Li Y, Osaka H, DeMaro J, Jacquin M, Bu G. Role of tissue plasminogen activator receptor LRP in hippocampal long-term potentiation. J Neurosci. 2000; 20(2): 542-9.

694. Zhou Z, Ju H, Sun M, Chen H. Serum vascular endothelial growth factor levels correlate with severity of retinopathy in diabetic patients: a systematic review and meta-analysis. Dis Markers. 2019; 2019:9401628.
695. Zhou Y, Liu L, Tao S, Yao Y, Wang Y, Wei Q, Shao A, Deng Y. Parthanatos and its associated components: promising therapeutic targets for cancer. Pharmacol Res. 2021; 163: 105299.

ДОДАТКИ

ДОДАТОК А

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ:

– статті у наукових періодичних фахових виданнях України, у т.ч., які входять до міжнародних наукометричних баз:

1. **Tykhomyrov AA.** Interaction of actin with plasminogen/plasmin system: mechanisms and physiological role. *Biopolymers and Cell*. 2012;28(6):413-423. doi:10.7124/bc.000130. *(Scopus Q4) (Особисто дисертантом здійснено пошук та аналіз літературних даних, написання статті).*

2. **Tykhomyrov AA**, Yusova EI, Diordieva SI, Korsa VV, Grinenko TV. Production and characteristics of antibodies against K1-3 fragment of human plasminogen. *Biotechnologia Acta*. 2013;6(1):87-97. doi: 10.15407/biotech6.01.086. *(Особисто дисертантом проведено імунізацію тварин, виконано імунохімічний аналіз, статистичне оброблення даних та їхнє інтерпретування, підготовку ілюстративного матеріалу та написання статті).*

3. Петренко ОМ, **Тихомиров АО**. Роль металопротеїназ матриксу в процесах загоєння ран. *Медична хімія*. 2013;15(4):100-106. https://doi.org/10.11603/1681-2557.2013.v15.i4.2819. *(Особисто дисертантом проведено літературний пошук та узагальнення даних, написання та оформлення статті).*

4. **Тихомиров АО**, Жерносєков ДД, Рока-Мойя ЯМ, Діордієва СІ, Гриненко ТВ. Вплив Lys-форми плазміногену на актиновий цитоскелет тромбоцитів. *Фізіологічний журнал*. 2014;60(1):25-33. http://nbuv.gov.ua/UJRN/Fiziol_2014_60_1_6. *(Особисто дисертантом проведено експериментальні дослідження, виконано статистичний аналіз даних та їх інтерпретування, формулювання висновків, підготовку ілюстративного матеріалу та написання статті).*

5. **Tykhomyrov AA**. Dynamics of thrombin-induced exposition of actin on the platelet surface. *Ukrainian Biochemical Journal*. 2014;86(5):74-81. doi: https://doi.org/10.15407/ubj86.05.074. *(Scopus Q4) (Особисто дисертантом проведено експериментальні дослідження, виконано статистичний аналіз даних та їхнє інтерпретування, формулювання висновків та основної концепції статті, підготовку ілюстративного матеріалу та написання статті).*

6. **Тихомиров АО**, Жерносєков ДД, Рока-Мойя ЯМ, Діордієва СІ, Гриненко ТВ. Вплив Lys-плазміногену на секрецію тромбоцитів людини. *Фізіологічний журнал*. 2015;61(6):26-34. https://fz.kiev.ua/journals/2015_V.61/2015_6/2015_6-26-34.pdf. *(Особисто дисертантом проведено експериментальні дослідження, виконано статистичний аналіз даних та їхнє інтерпретування, формулювання висновків, підготовку ілюстративного матеріалу та написання статті).*

7. **Tykhomyrov AA**, Vovchuk IL, Grinenko TV. Plasminogen and angiostatin levels in female benign breast lesions. *Ukrainian Biochemical Journal*. 2015;87(5): 103-112. doi: https://doi.org/10.15407/ubj87.05.103. *(Scopus Q4) (Особисто дисертантом проведено експериментальні дослідження, виконано статистичний аналіз даних та їхнє інтерпретування, формулювання висновків та основної концепції статті, підготовку ілюстративного матеріалу та написання статті).*

8. Zhernossekov DD, Roka-Moiia YM, **Tykhomyrov AA**, Grinenko TV. Lys-plasminogen stimulates vitronectin exposure on the platelet surface. *Biopolymers and Cell*. 2015;31(2):104-108. http://dx.doi.org/10.7124/bc.0008D3. *(Scopus Q4) (Дисертант особисто брав участь у проведенні експериментальних досліджень, обговоренні результатів та підготовці статті).*

9. **Tykhomyrov AA**, Pavlova AS, Nedzvetsky VS. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): on the 45th anniversary of discovery. *Neurophysiology*. 2016;48(1):54-71. https://doi.org/10.1007/s11062-016-9568-8. *(Scopus Q4)*

(Особисто дисертантом проведено літературний пошук та узагальнення літературних даних, написання та оформлення статті).

10. Petrenko OM, Bezrodnyi BH, **Tykhomyrov AA**. Vacuum therapy of diabetic soft tissue wounds: the impact on the matrix metalloproteinase activity. *International Journal of Endocrinology*. 2016;1(73):53-57. https://doi.org/10.22141/2224-0721.1.73.2016.71065. *(Особисто дисертантом виконано біохімічний аналіз, проведено інтерпретування та обговорення отриманих даних, формулювання наукової концепції та висновків, написання статті).*

11. **Tykhomyrov AA**, Zhernossekov DD, Grinenko TV. Surface-exposed actin binds plasminogen on the membrane of agonist-activated platelets: a flow cytometry study. *Biopolymers and Cell*. 2017;33(3):172-182. http://dx.doi.org/10.7124/bc.000953. *(Scopus Q4) (Особисто дисертантом проведено експериментальні дослідження, виконано статистичний аналіз даних, їхнє інтерпретування та обговорення, формулювання висновків, підготовку ілюстративного матеріалу та написання статті).*

12. **Tykhomyrov AA**, Nedzvetsky VS, Ağca CA, Korsa VV, Grinenko TV. Plasminogen and its fragments in rat brain: a plausible role for astrocytes in angiostatin generation. *Ukrainian Biochemical Journal*. 2017;89(2):43-54. doi: https://doi.org/10.15407/ubj89.02.043. *(Scopus Q4) (Особисто дисертантом проведено експериментальні дослідження, виконано статистичний аналіз даних, їхнє інтерпретування та обговорення, формулювання наукової концепції та висновків, підготовку ілюстративного матеріалу та написання статті).*

13. Zhernossekov D, Roka-Moiia Y, **Tykhomyrov A**, Guzyk M, Grinenko T. Glu- and Lys-forms of plasminogen differentially affect phosphatidylserine exposure on the platelet surface. *Ukrainian Biochemical Journal*. 2017;89 (special issue):102-110. doi:https://doi.org/10.15407/ubj89.si01.102. *(Scopus Q4) (Особисто дисертантом взято участь у плануванні та проведенні експериментальних досліджень, обговоренні результатів та підготовці статті)*.

14. Ağca CA, **Tykhomyrov AA**, Baydas G, Nedzvetsky VS. Effects of propolis ethanol extract on viability and levels of cytoskeletal and regulatory proteins of rat brain astrocytes: an in vitro study. *Neurophysiology*. 2017;49(4):261-271. https://doi.org/10.1007/s11062-017-9680-4. *(Scopus Q4) (Особисто дисертантом взято участь у плануванні експериментальних досліджень, виконано статистичний аналіз даних, їхнє інтерпретування та обговорення, формулювання наукової концепції та висновків, підготовку ілюстративного матеріалу та написання статті).*

15. **Tykhomyrov AA**, Zhernosekov DD, Guzyk MM, Korsa VV, Grinenko TV. Plasminogen modulates formation of reactive oxygen species in human platelets. *Ukrainian Biochemical Journal*. 2018;90(6):31-40. doi:https://doi.org/10.15407/ubj90.06.031. *(Scopus Q4) (Особисто дисертантом проведено експериментальні дослідження, виконано статистичний аналіз даних, їхнє інтерпретування та обговорення, формулювання наукової концепції та висновків, підготовку ілюстративного матеріалу та написання статті).*

16. **Tykhomyrov AA**, Kushnir YS, Nedzvetsky VS, Grinenko TV, Kuryata OV. Citicoline affects serum angiostatin and neurospecific protein levels in patients with atrial fibrillation and ischemic stroke. *Ukrainian Biochemical Journal*. 2019;91(5):34-45. doi: https://doi.org/10.15407/ubj91.05.034. *(Scopus Q4) (Особисто дисертантом виконано імунохімічний аналіз, проведено статистичне оброблення даних, їхнє інтерпретування та обговорення, формулювання наукової концепції та висновків, підготовку ілюстративного матеріалу та написання статті).*

17. Petrenko OM, **Tykhomyrov AA**. Levels of angiogenic regulators and MMP-2, -9 activities in Martorell ulcer: a case report. *Ukrainian Biochemical Journal*. 2019; 91(1):100-107. doi: https://doi.org/10.15407/ubj91.01.100. *(Scopus Q4) (Особисто дисертантом виконано біохімічний аналіз, проведено статистичне оброблення даних, їхнє інтерпретування та обговорення,*

формулювання наукової концепції та висновків, підготовку ілюстративного матеріалу та написання статті).

18. **Tykhomyrov AA**, Zhernosekov DD, Grinenko TV. Plasminogen modulates formation and release of platelet angiogenic regulators. *Ukrainian Biochemical Journal*. 2020;92(1):31-40. doi: https://doi.org/10.15407/ubj92.01.031. *(Scopus Q4) (Особисто дисертантом проведено експериментальні дослідження, виконано статистичний аналіз даних, їхнє інтерпретування та обговорення, формулювання наукової концепції та висновків, підготовку ілюстративного матеріалу та написання статті).*

19. **Tykhomyrov AA**, Nedzvetsky VS, Ağca CA, Guzyk MM, Korsa VV, Grinenko TV. Plasminogen/plasmin affects expression of glycolysis regulator TIGAR and induces autophagy in lung adenocarcinoma A549 cells. *Experimental Oncology*. 2020;42(4):270-276. DOI: 10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-42-no-4.15253. *(Scopus Q4) (Особисто дисертантом проведено експериментальні дослідження, виконано статистичний аналіз даних, їхнє інтерпретування та обговорення, формулювання наукової концепції та висновків, підготовку ілюстративного матеріалу та написання статті).*

20. Bilous VL, Kapustianenko LG, **Tykhomyrov AA.** Production and application of angiostatins for the treatment of ocular neovascular diseases. *Biotechnologia Acta*. 2021;14(1):4-15. https://doi.org/10.15407/biotech14.01.005. *(Особисто дисертантом висунуто наукову ідею та проведено узагальнення літературних даних).*

– статті у наукових періодичних виданнях інших держав, в т.ч., що входять до міжнародних наукометричних баз:

21. **Tykhomyrov AA**, Shram SI, Grinenko TV. The role of angiostatins in diabetic complications. *Biochemistry (Supplement Series B Biomedical Chemistry)*. 2014;8(2): 94-107. https://doi.org/10.1134/S1990750814020140. *(Scopus Q4)*

(Особисто дисертантом проведено літературний пошук та узагальнення даних, написання та оформлення статті).

22. **Tykhomyrov AA**, Nedzvetsky VS, Bardachenko NI, Grinenko TV, Kuryata OV. Statin treatment affects serum angiostatin levels in patients with ischemic heart disease. *Life Sciences*. 2015;134:24-29. doi: 10.1016/j.lfs.2015.05.008. *(Scopus Q1) (Особисто дисертантом проведено експериментальні дослідження, виконано статистичний аналіз даних та їхнє інтерпретування, формулювання висновків, підготовку ілюстративного матеріалу та написання статті).*

23. Guzyk MM, **Tykhomyrov AA**, Nedzvetsky VS, Prischepa IV, Yanitska LV, Grinenko TV, Kuchmerovska TM. Poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) inhibitors reduce reactive gliosis and improve angiostatin levels in retina of diabetic rats. *Neurochemical Research*. 2016;41(10):2526-2537. https://doi.org/10.1007/s11064-016-1964-3. *(Scopus Q1) (Особисто дисертантом проведено імунохімічні дослідження, інтерпретування та обговорення отриманих даних, формулювання наукової концепції та висновків, написання статті).*

24. **Tykhomyrov A**, Nedzvetsky V, Shemet S, Ağca CA. Production and characterization of polyclonal antibodies to human recombinant domain B-free anti-hemophilic factor VIII. *Turkish Journal of Biology*. 2017;41(6):857-867. DOI: 10.3906/biy-1704-10. *(Scopus Q2) (Особисто дисертантом проведено експериментальні дослідження, їхнє інтерпретування та обговорення отриманих результатів, формулювання висновків, підготовку ілюстративного матеріалу та написання статті).*

25. **Tykhomyrov AA**, Nedzvetsky VS, Zabida AA, Ağca CA, Kuryata OV. L-arginine treatment improves angiogenic response and reduces matrix metalloproteinase activity in chronic heart failure patients with coronary artery disease. *PharmaNutrition*. 2018;6(4):137-146.

https://doi.org/10.1016/j.phanu.2018.06.005. *(Scopus Q2) (Особисто дисертантом проведено експериментальні дослідження, виконано статистичний аналіз даних, їхнє інтерпретування та обговорення, формулювання наукової концепції та висновків, підготовку ілюстративного матеріалу та написання статті).*

26. Ağca CA, Kırıcı M, Nedzvetsky VS, Gundogdu R, **Tykhomyrov AA**. The effect of TIGAR knockdown on apoptotic and epithelial- mesenchymal markers expression in doxorubicin- resistant non- small cell lung cancer A549 cell lines. *Chemistry & Biodiversity*. 2020;17(9):e2000441. DOI: 10.1002/cbdv.202000441. *(Scopus Q2) (Дисертант особисто брав участь в інтерпретуванні та обговоренні результатів досліджень, написанні статті).*

Наукові праці, які додатково відображають наукові результати дисертації

– монографії:

27. Петренко О.М., Безродний Б.Г., Зубов Д.О., Васильєв Р.Г., **Тихомиров А.О.** Модуляція активності матриксних металопротеїназ як ключової ланки патофізіології хронічних ран / У книзі «Застосування інноваційних технологій в хірургічному лікуванні гнійно-некротичних ран м'яких тканин (монографія)». Київ: LAT & K; 2018; 103-157. *(Особисто дисертантом проведено аналіз джерел літератури, проведення біохімічних досліджень, оброблення отриманих результатів, написання та оформлення публікації).*

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

– тези та матеріали конференцій:

28. Тихомиров АО, Юсова ОІ, Корса ВВ, Діордієва СІ. Одержання антитіл до кринглу 1-3 плазміногену (ангіостатину) та перспективи їх біомедичного використання // Фізіологія: від молекул до організму: Матеріали Всеукраїнської наукової конференції молодих учених, м. Київ, 20-21 жовтня 2011. – с. 38.

29. Тихомиров АА, Корса ВВ, Диордиева СИ, Лайкова ЕВ. Использование антител к фрагменту плазминогена К1-3 для определения ангиостатинов в биологическом материале // Біологія: від молекули до біосфери: Матеріали VI Міжнародної конференції молодих вчених, Харків, 21-24 листопада 2011. – с. 24.

30. Тихомиров АА, Юсова ЕИ, Жерносеков ДД, Диордиева СИ, Рока-Мойя ЯМ, Гриненко ТВ. Ангиостатины: генерация и роль в норме и патологиях, ассоциированных со старением // Біологічні механізми старіння: Матеріали X Міжнародного симпозіуму, Харків, 16-19 травня 2012. – с. 21-22.

31. Tykhomyrov AA, Roka-Moya YM, Diordieva SI, Grinenko TV. Towards the mechanism of anti-aggregating activity of plasminogen: disruption of platelet actin cytoskeleton by Lys-form of plasminogen // Experimental and Theoretical Biophysics: International Conference for Young Scientists, Puschino, Russia, 22-24 October 2012. – с. 34-35.

32. Рока-Мойя ЯМ, Тихомиров АА, Гриненко ТВ. Влияние Лиз-плазминогена на агрегацию и секрецию тромбоцитов // Experimental and Theoretical Biophysics: International Conference for Young Scientists, Puschino, Russia, 22-24 October 2012. – с. 12.

33. Тихомиров АО, Митропан МП, Діордієва СІ, Рока-Мойя ЯМ. Lys-плазміноген інгібує реконструкцію актинового цитоскелету тромбоцитів // Молодь і поступ біології: Матеріали IX Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів, Львів, 2013. – с.374.

34. Mytropan MP, Roka-Moya YM, Diordieva SI, Shtal YP, Tykhomyrov AA. Lys-plasminogen, but not Glu-form, inhibits reorganization of actin cytoskeleton in platelets // Experimental and Theoretical Biophysics: International Conference for Young Scientists, Puschino, Russia, 21-26 April 2013. – p. 171-172.

35. Tykhomyrov AA, Diordieva SI, Roka-Moya YM, Grinenko TV. Thrombin-induced exposition of actin on the platelet membrane // Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології: Матеріали Другої

Міжнародної наукової конференції, м. Дніпропетровськ, 24-25 вересня 2013 р. – с. 89.

36. Рока-Моя ЯМ, Діордієва СІ, Горошко АО, Тихомиров АО. Залучення актину, експонованого на поверхні плазматичної мембрани тромбоцитів, у зв'язування та процесінг плазміногену // Актуальні проблеми біохімії та біотехнології: Матеріали Конференції молодих вчених, м. Київ, 29-30 травня 2014 р. – с. 17.

37. Guzyk M, Tykhomyrov A, Kuchmerovska T. Attenuation of reactive gliosis in retinas by PARP-1 inhibitors treatment under diabetes in rats. //50th Meeting of the European Association for the Study of Diabetes, Vienna, Austria, 15-19 September 2014 – p. 126.

38. Гриненко ТВ, Жерносєков ДД, Тихомиров АО, Юсова ОІ. Нові уявлення про фізіологічну та патофізіологічну роль // XI Український біохімічний конгрес: Укр. Біохім. Ж., Київ, 6-10 жовтня 2014 р. – с. 21.

39. Bilous V, Roka-Moiia Y, Zhernossekov D, Tykhomyrov A, Diordieva S, Grinenko T. Lys-plasminogen affects platelet secretion and cytoskeleton rearrangement // 40-th FEBS Congress: FEBS Journal, Berlin, Germany, 4-9 July, 2015 – 282 (Suppl. 1) – p. 103.

40. Guzyk M, Tykhomyrov A, Nedzvetsky V, Prischepa I, Grinenko T, Kuchmerovska T. Poly(ADP-ribose)polymerase-1 (PARP-1) inhibitors alleviate reactive gliosis and recover angiostatin expression in retina of diabetic rats // Current Problems of Biochemistry and Cell Biology: The 3rd International Scientific conference, Dniepropetrovsk, Ukraine, 24-25 September 2015 – p. 28-30.

41. Tykhomyrov A, Zhernosekov D, Roka-Moya Y, Grinenko T. Platelet-induced generation of angiostatins: a putative role for surface-exposed actin // Current Problems of Biochemistry and Cell Biology: The 3rd International Scientific conference, Dniepropetrovsk, Ukraine, 24-25 September 2015. – p. 47-48.

42. Жерносеков ДД, Рока-Мойя ЯМ, Тихомиров АА, Гриненко ТВ. Регуляция функциональной активности тромбоцитов человека

компонентами плазминоген/плазминовой системы // Современные проблемы естествознания в науке и образовательном процессе: Матеріали Міжнародної науково-практичної конференції, Мінськ, Республіка Білорусь, 22-23 жовтня 2015 р. – с. 16-17.

43. Рока-Мойя ЯМ, Корса ВВ, Гузик ММ, Тихомиров АО, Жерносєков ДД. Плазміноген модулює зв'язування екзогенного анексину V тромбоцитами людини // Актуальні проблеми біохімії та біотехнології: Матеріали конференції молодих вчених, Київ, 26-27 травня 2016 р. – с. 114.

44. Tykhomyrov AA, Ağca CA, Nedzvetsky VS, Guzyk MM, Korsa VV, Grinenko TV. Plasminogen/plasmin effects on A549 cells: from p53-induced apoptosis to angiostatin generation // Current Problems of Biochemistry and Cell Biology: The IVth International Scientific Conference, Dnipro, 5-6 October, 2017. – p. 80-82.

45. Tykhomyrov A, Nedzvetsky V, Shemet S, Ağca CA. Polyclonal antibodies to domain B-free recombinant anti-hemophilic factor VIII: production, characterization and possible biomedical applications // «Биотехнология: достижения и перспективы развития»: Матеріали II Міжнародної науково-практичної конференції, Пінськ, РБ, 7-8 грудня 2017 р. – р. 111-113.

46. Tykhomyrov AA, Nedzvetsky VS, Agca CA, Korsa VV, Grinenko TV. Immunohistochemical localization of plasminogen and its fragments in rat brain: the novel role for astrocytes in angiostatin generation // Матеріали VII Конгресу Українського товариства нейронаук, Київ, 7-11 червня 2017 р. – с. 56.

47. Петренко ОМ, Тихомиров АО. Визначення вмісту регуляторів ангіогенезу та активності матриксних металопротеїназ у хронічній виразці шкіри за синдрому Марторелла // Матеріали XVIII конференції «Клініко-технологічні виклики в етапній та реконструктивній хірургії. Вогнепальні та побутові рани, електрозварювання та з'єднання живих тканин, діабетична стопа», м. Київ, 29-30 листопада 2018 р. – с. 44.

48. Horak I, Skaterna T, Gerashchenko D, Tykhomyrov A, Khudiakova O, Drobot L. Knockdown of the adaptor protein Ruk/CIN85 in 4T1 and LLC adenocarcinoma cells results in increased expression levels and activities of MMP-2 and MMP-9, associated with elevated production of angiostatins and suppression of invasion potential // Simposium and Summer School "Fundamental Principles of Cancer Biotherapy", Kyiv, May 21-23, 2018: Experimental Oncology, 40 (2). – p. 162.

49. Tykhomyrov A, Zhernosekov D, Korsa V, Grinenko T. Does Lys-plasminogen make platelets anti-angiogenic? // Simposium and Summer School "Fundamental Principles of Cancer Biotherapy", Kyiv, May 21-23, 2018: Experimental Oncology, 40 (2). – p. 175.

50. Tykhomyrov AA, Nedzvetsky VS, Ağca CA, Guzyk MM, Grinenko TV. Plasminogen/plasmin affects expression of cell circle/apoptosis regulators and induces autophagy in A549 human lung cancer cells // Medical and Clinical Chemistry: XII Ukrainian Biochemical Congress, Ternopil, Sep. 30–Oct. 4 2019, Vol. 21, 3(80) – P. 140-141.

51. Tykhomyrov AA, Petrenko OM, Kolosovych IV, Bezrodnyi BG. Angiogenic regulators and MMP activity in trophic diabetic and hypertonic ulcers of mild tissues // Medical and Clinical Chemistry: XII Ukrainian Biochemical Congress, Ternopil, Sep. 30 – Oct. 4 2019, Vol. 21, 3(80) – P. 241.

52. Курята ОВ, Кушнір ЮС, Тихомиров АО, Віхрова ТО, Діброва МС. Функціональний стан ендотелію судин та рівень С-реактивного протеїну в пацієнтів з фібриляцією передсердь та гострим порушенням мозкового кровообігу // Український кардіологічний журнал: Матеріали XX Національного конгресу кардіологів, Київ, 25-27 вересня 2019. – Т. 26. – с. 146-147.

53. Петренко ОМ, Безродний БГ, Тихомиров АО. Роль матриксних металопротеїназ у процесах загоєння ран // Матеріали XIX конференції «Клініко-технологічні виклики в етапній та реконструктивній хірургії.

Вогнепальні та побутові рани, електрозварювання та з'єднання живих тканин, діабетична стопа», Київ, 28-29 листопада 2019 р. – с. 42.

54. Zhovannyk VO, Tykhomyrov AA, Petrenko OM. Angiogenesis regulators and MMP activity in trophic and hypertonic ulcers of mild tissues // Конференція молодих вчених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології», Укр. Біохім. Ж., 91 (2). – с. 87.

55. Воробйов А, Тихомиров А. Вплив плазміноген-плазмінової системи на лінії клітин аденокарцином легень А549 // «Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології»: Матеріали V Міжнародної наукової конференції, Дніпро, 1-2 жовтня, 2020 – с. 152-153.

ДОДАТОК Б
АПРОБАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ

Основні положення дисертаційної роботи представлені та обговорені на міжнародних і вітчизняних конференціях і конгресах різного рівня:

1. Всеукраїнській науковій конференції молодих учених «Фізіологія: від молекул до організму» (Київ, 20-21 жовтня 2011 р., форма участі – усна доповідь).
2. VI Міжнародній конференції молодих вчених «Біологія: від молекули до біосфери» (Харків, 21-24 листопада 2011 р., форма участі – стендова доповідь).
3. X Міжнародному симпозіумі «Біологічні механізми старіння» (Харків, 16-19 травня 2012 р., форма участі – усна доповідь).
4. Міжнародній конференції молодих учених «Experimental and Theoretical Biophysics» (Пущино, Російська Федерація, 22-24 жовтня 2012 р., форма участі – усна доповідь).

5. Міжнародній конференції молодих учених «Experimental and Theoretical Biophysics» (Пущино, Російська Федерація, 21-26 квітня 2013 р., форма участі – усна доповідь).
6. II Міжнародній науковій конференції «Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології» (Дніпропетровськ, 24-25 вересня 2013 р., форма участі – усна доповідь).
7. 50th Meeting of the European Association for the Study of Diabetes (Vienna, Austria, 15-19 September 2014, форма участі – стендова доповідь).
8. XI Українському біохімічному конгресі (Київ, 6-10 жовтня 2014 р., форма участі – усна доповідь).
9. 40-му Конгресі FEBS (Berlin, Germany, 4-9 July 2015, форма участі – стендова доповідь).
10. III Міжнародній науковій конференції «Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології» (Дніпропетровськ, 24-25 вересня 2015 р., форма участі – усна доповідь).
11. Науковій конференції «Molecular Science Day» (Бінгол, Туреччина, 15 грудня 2016 р., форма участі – усна доповідь).
12. IV Міжнародній науковій конференції «Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології» (Дніпро, 5-6 жовтня 2017 р., форма участі – усна доповідь).
13. II Міжнародній науково-практичній конференції «Биотехнология: достижения и перспективы развития» (Пінськ, Республіка Білорусь, 7-8 грудня 2017 р., форма участі – усна доповідь).
14. VII Конгресі Українського товариства нейронаук (Київ, 7-11 червня 2017 р., форма участі – стендова доповідь).
15. Симпозіумі та літній школі «Fundamental Principles of Cancer Biotherapy» (Київ, 21-23 травня 2018 р., форма участі – усна та стендова доповіді).
16. XX Національному конгресі кардіологів (Київ, 25-27 вересня 2019 р., форма участі – усна доповідь).

17. XII Українському біохімічному конгресі (Тернопіль, 30 вересня – 4 жовтня 2019 р., форма участі – усна та стендова доповіді).
18. Воркшопі «Actual aspects of agriculture, molecular biology, genetics, biochemistry and veterenary medicine» (організатор – Bingol University, Туреччина, 29 квітня 2021 р., форма участі – усна доповідь).