

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



Яценко Тетяна Андріївна

УДК: 577.151

**МОЛЕКУЛЯРНІ МЕХАНІЗМИ РЕГУЛЯЦІЇ ФІБРИНОЛІЗУ ЗА
УЧАСТІ ФРАГМЕНТІВ ФІБРИНОГЕНУ/ФІБРИНУ**

03.00.04 – біохімія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2018

Дисертацією є рукопис

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

Науковий керівник доктор біологічних наук, старший науковий співробітник
Гриненко Тетяна Вікторівна
Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України
завідувач відділу хімії та біохімії ферментів

Офіційні опоненти доктор біологічних наук, професор
Варбанець Людмила Дмитрівна
Інститут мікробіології ім. Д.К. Заболотного НАН України
Завідувач відділу біохімії мікроорганізмів

доктор біологічних наук, професор
Кучменко Олена Борисівна
Ніжинський державний університет імені Миколи Гоголя
завідувач кафедри біології природничо-географічного
факультету

Захист відбудеться «19» березня 2018 р. о 14 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.240.01 в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України за адресою: 01030, Київ, вул. Леонтовича, 9.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України (Київ, вул. Леонтовича, 9).

Автореферат розісланий «1» лютого 2018 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
кандидат біологічних наук



Карлова Н.П.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми дослідження. Фібринолітична система – складна багатокомпонентна ензимна система, яка тісно пов'язана з системою зсідання крові. Функціонування обох цих систем забезпечує нормальний кровоток, кровоспинення, утворення і усунення фібринових депозитів в судинному руслі та поза ним [Луговской, 2013; Charman, 2013]. Порушення балансу між системами зсідання крові та фібринолізу призводить до тромбоутворення або геморагічних станів, внаслідок чого розвиваються серцево-судинні захворювання різного характеру і складності [Kolev, 2015]. Дослідження механізмів, що забезпечують нормальний судинний кровоток, є необхідною умовою розуміння причин і закономірностей виникнення ряду захворювань та створення підходів для їх лікування.

Дія фібринолітичної системи відбувається в межах згустку фібрину. Фізіологічний фібриноліз контролюється численними взаємодіями між окремими компонентами фібринолітичної системи [Гриненко, 2007; Silva, 2013]. До складу фібринолітичної системи входять проензими, ензими, активатори та інгібітори. Основним ензимом є плазмін, що утворюється з неактивного попередника плазміногену під дією специфічних активаторів – тканинного активатора і урокінази. Важливою умовою нормального функціонування протеїнів системи фібринолізу є їх взаємодія з системою коагуляції. Поверхня активованих в процесі згортання клітин крові та полімерний фібрин є необхідним фактором активації фібринолізу. Згусток фібрину, локалізуючи процес на своїй поверхні, є одночасно і субстратом фібринолітичних ензимів, і кофактором їхньої дії. Експонування центрів взаємодії з плазміногеном і тканинним активатором на поверхні фібрину під час полімеризації є тригером для утворення плазміну. Поява додаткових центрів зв'язування проензиму і активатора під час деградації фібрину регулює швидкість лізису тромбу [Medved, 2003; Yakovlev, 2002]. Таким чином, протеїн-протеїнові взаємодії мають вирішальне значення в руйнуванні фібринових згустків фібринолітичною системою.

В цілому молекулярний механізм фібринолізу, в якому вирішальна роль належить міжмолекулярним взаємодіям плазміногену, його активатора та фібрину, встановлений, визначені основні етапи фібринолітичного процесу та продукти гідролізу, що утворюються. Однак, роль фібриногену/фібрину та їх фрагментів в механізмі ініціації та регуляції процесу руйнування фібринового згустку остаточно не з'ясована. Дискутивним є питання щодо механізму експонування сайтів зв'язування плазміногену та тканинного активатора в різних доменах фібриногену/фібрину під час полімеризації. Недослідженою є участь окремих доменів молекули плазміногену у взаємодії з D-доменами фібриногену/фібрину. Вирішення цих питань є необхідною умовою розкриття механізмів регуляції фібринолізу на рівні протеїн-протеїнових взаємодій, що відкриває можливості вирішення практичних задач медицини, пов'язаних з порушеннями фібринолітичної системи.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконувалась в рамках наукових тем відділу хімії та біохімії ензимів: «Молекулярні механізми функціонування ензимів системи гемостазу» (№ держреєстрації 0110U002701, 2010 – 2012 рр.), «Розробка діагностикумів для тестування стану системи руйнування

тромбів» (№ держреєстрації 0113U003649, 2012 – 2015 рр.), «Механізми регуляції плазміноген/плазміном міжмолекулярних та міжклітинних взаємодій в системі гемостазу за норми та патології» (№ держреєстрації 0113U003203, 2013 – 2017 рр.), «Механізми регуляції внутрішньоклітинних сигнальних мереж, міжклітинних та міжмолекулярних взаємодій» (№ держреєстрації 0112U002624, 2012 – 2016 рр.).

Мета та завдання дослідження. Метою досліджень є з'ясування молекулярних механізмів ініціації та регуляції фібринолітичного процесу за участі фрагментів та певних ділянок молекул фібриногену/фібрину.

Відповідно до мети було поставлено наступні завдання:

1. Визначити функціональну роль продуктів деградації фібриногену/фібрину на різних етапах фібринолітичного процесу.
2. З'ясувати молекулярний механізм стимуляції E-фрагментами фібриногену/фібрину активації плазміногену тканинним активатором.
3. Встановити роль іонів кальцію та ковалентної стабілізації γ -ланцюгів D-доменів фібриногену/фібрину в ініціації фібринолітичного процесу.
4. Дослідити можливість існування в D-доменах фібриногену/фібрину окремих центрів зв'язування для різних кринглових структур молекули плазміногену.
5. Розробити спосіб визначення активності тканинного активатора плазміногену в плазмі крові з використанням DD-фрагменту фібрину як стабільного стимулятора процесу активації.

Об'єкт дослідження. Об'єктом дослідження є протеїни фібринолітичної системи, фібриноген/фібрин та продукти їх деградації.

Предмет дослідження. Молекулярні механізми ініціації та регуляції фібринолітичного процесу.

Методи дослідження: методи препаративної біохімії, фізико-хімічні (спектрофотометрія, турбідиметрія, електрофорез), хроматографічні (гель-фільтрація, іонообмінна та афінна хроматографія), імунохімічні (імуноензимний аналіз, вестерн-блот аналіз) методи, визначення активності ензимів за хромогенним субстратом та статистичні методи.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше встановлено, що продукти плазмінової деградації фібриногену та фібрину регулюють активність фібринолітичної системи. Показано, що фрагменти фібрину (DDE-комплекс, DD і продукт дисоціації DDE-комплексу E_1, E_2) стимулюють активацію плазміногену тканинним активатором. Високомолекулярні продукти гідролізу та DDE-фрагмент пригнічують швидкість гідролізу фібрину плазміном, конкуруючи з субстратом за ензим. З усіх досліджених фрагментів тільки високомолекулярні продукти захищають плазмін, що утворюється на їх поверхні, від інгібування α_2 -антиплазміном. Зроблено висновок, що накопичення в мікрооточенні згустку продуктів деградації фібрину, які зв'язують на своїй поверхні плазміноген і не захищають утворений плазмін від інгібіторів плазми, призводить до зниження фібринолітичного потенціалу плазміноген/плазмінової системи і може бути однією з причин резистентності згустку до лізису.

Вперше встановлено стимулюючий ефект раннього E-фрагменту (E_p) фібриногену на активацію Glu-плазміногену тканинним активатором. Показано, що

взаємодія тканинного активатора з E_p-фрагментом забезпечується лізин-зв'язувальними ділянками активатора та C-кінцевими залишками лізину α- та γ-ланцюгів фрагменту. Встановлено двоцентрову взаємодію Glu-плазміногену з E_p-фрагментом, що є необхідною умовою експонування активаційної петлі проензиму та високої швидкості процесу активації.

Досліджено механізм активації Glu-плазміногену тканинним активатором на D-доменвісних фрагментах фібриногену/фібрину. Показано, що виснаження іонів кальцію хелатуючими агентами призводить до підвищення стимулюючих властивостей D- та DD-фрагментів фібриногену та фібрину відповідно. Вперше встановлено, що іони кальцію дозозалежно інгібують реакцію перетворення плазміногену на плазмін, індуковану D-димером фібрину. Показано, що DD-фрагмент, одержаний з ковалентно прошитого фібриногену, також проявляє стимулюючу дію на активацію Glu-плазміногену тканинним активатором. Отримані дані свідчать, що ініціація фібринолізу відбувається на ранніх стадіях полімеризації фібрину. Вона контролюється структурними перебудовами в βC- та γC-модулях D-домену, що мають місце відповідно при видаленні іонів кальцію з β2 сайту під час взаємодії "B"- "b" центрів полімеризації та ковалентній стабілізації γγ-ланцюгів D-доменів суміжних молекул в одній нитці протофібрили. Наслідком цих перетворень є експонування центрів зв'язування плазміногену і тканинного активатора.

Доведено існування в D-домені фібрину різних ділянок зв'язування для фрагментів плазміногену K 1-3 та K 5. Вперше показано, що сайти зв'язування плазміногену можуть бути розташовані поза ділянкою Aα 148-160 D-домену фібриногену/фібрину.

Практичне значення роботи полягає в тому, що отримані результати щодо залежності активації плазміногену тканинним активатором на полімерному фібрині від іонів кальцію та ковалентної стабілізації фактором XIIIa суміжних молекул в протофібрилі, а також багатоцентрової взаємодії плазміногену з D-доменами фібрину відкривають можливості для пошуку нових підходів до регуляції швидкості руйнування фібринових згустків.

Запропоновано новий кількісний метод визначення активності тканинного активатора в плазмі крові з використанням DD-фрагмента фібрину як стабільного стимулятора реакції активації плазміногену в присутності хелатуючого агента EGTA. Спосіб є високочутливим, економічним, простим та швидким у виконанні. Метод може знайти застосування в лабораторно-клінічній практиці для оцінки рівня функціонально активного тканинного активатора плазміногену в плазмі крові за серцево-судинних захворювань. На основі розробки отримано патент на винахід (№ 113014, МПК G01N 33/68 (2016.01) G01N (2016.01)).

Особистий внесок здобувача. Здобувачем самостійно одержано більшу частину необхідних для досліджень протейнових препаратів: плазміноген, плазмін та їх фрагменти, антитіла до фрагмента плазміногену K 1-3, фібриноген, фібрин. Вивчення кінетики активації плазміногену тканинним активатором на фрагментах фібриногену проведено разом з с.н.с. відділу хімії та біохімії ферментів к.б.н. Юсовою О.І. Одержання фрагментів фібриногену та фібрину, дослідження

процесу активації плазміногену тканинним активатором в присутності фрагментів фібрину та визначення ролі кальцій-зв'язувальних сайтів в ініціації фібринолізу проведено разом з с.н.с. відділу хімії та біохімії ферментів к.б.н. Рибачук В.Н. Одержання антитіл до фрагмента плазміногену К5 та дослідження зв'язування фрагментів плазміногену з DD-фрагментом фібрину проведено разом з н.с. відділу хімії та біохімії ферментів к.б.н. Капустяненко Л.Г. Постановка наукових задач, аналіз та обговорення отриманих результатів проведено спільно з науковим керівником завідувачем відділом хімії та біохімії ферментів д.б.н. Гриненко Т.В. Друковані праці підготовлено за безпосередньої участі автора.

Апробація результатів дисертації. Основні результати та окремі положення дисертаційної роботи викладено на конференції-конкурсі молодих вчених “Актуальні проблеми біохімії та біотехнології” (Київ, 2013 і 2015 рр.), XI Українському біохімічному конгресі (Київ, 2014 р.), міжнародній конференції «International symposium “Young Researchers in Bioscience”» (Клуж-Напока, Румунія, 2015 р.), конференції “Современные проблемы естествознания в науке и образовательном процессе” (Мінськ, Білорусь, 2015 р.), X Parnas Conference (Вроцлав, Польща, 2016 р.), I Білоруському біохімічному конгресі (Гродно, Білорусь, 2016 р.), 41 FEBS Congress (Кушадаси, Туреччина, 2016 р.), міжнародній науковій конференції “Актуальні проблеми сучасної біохімії” (Львів, 2016 р.), міжнародній літній школі Spetsai-2017 “Proteins and Organized Complexity” (о. Спецес, Греція, 2017 р.).

Матеріали досліджень відзначено премією конкурсу молодих учених інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України на кращу наукову роботу (Київ, 2014 р.).

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 7 статей в українських та закордонних фахових виданнях, 9 тез доповідей у збірках наукових конференцій та 1 патент.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається з анотації, переліку опублікованих робіт за темою дисертаційної роботи, вступу, огляду літератури (1 розділ, 3 підрозділи), експериментальної частини (2 розділи), заключення, висновків та списку джерел літератури (176 найменувань). Робота представлена на 140 сторінках, містить 46 рисунків та 2 таблиці.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури

В огляді літератури представлено сучасні відомості щодо основних компонентів фібринолітичної системи, системи згортання крові та механізму фібринолітичного процесу. Детально описано структуру молекул плазміногену/плазміну, тканинного активатора плазміногену, фібриногену/фібрину, особливу увагу приділено локалізації комплементарних центрів взаємодії молекул плазміногену/плазміну та фібриногену/фібрину. Розглянуто механізми активації фібринолітичної системи на фібрині та шляхи гідролізу фібринового згустку.

Матеріали та методи

Кров умовно здорових донорів отримували згідно договору співпраці з Центром крові Головного військового клінічного шпиталю Міністерства оборони України.

Glu-плазміноген людини отримували з цитратної плазми крові методом афінної

хроматографії на лізин-сефарозі в присутності інгібітора протеїназ апротиніну [Deutsch, 1970]. Плазмін одержували активацією плазміногену урокіназою, іммобілізованою на BrCN-активованій сефарозі 4В [Norman, 1985]. Іммобілізацію урокінази проводили на бромціан-активованій сефарозі 4В [March, 1974]. Чистоту одержаних протеїнів перевіряли методом електрофорезу в ПААГ за низьких значень рН [Panim, 1969].

Фрагменти плазміногену К 1-3 та міні-плазміноген отримували шляхом обмеженого гідролізу плазміногену панкреатичною еластазою свині з наступною гель-фільтрацією на сефадексі G-75 та афінною хроматографією на лізин-сефарозі [Sottrup-Jensen, 1978]. Фрагмент плазміногену К 5 отримували шляхом обмеженого гідролізу міні-плазміногену пепсином свині з наступною афінною хроматографією на АН-сефарозі [Karustianenko, 2013]. Очищені фрагменти плазміногену використовували для імунізації кролів. Антитіла до фрагментів плазміногену К 1-3 та К 5 отримували з сироватки крові кролів з використанням протеїн А-сефарози та відповідно К 1-3- та К 5-сефарози.

Фібриноген людини одержували з цитратної плазми крові методом фракційного висолювання сульфатом натрію в присутності соєвого інгібітора трипсину [Варецька, 1961]. desAB фібрин отримували обробкою фібриногену тромбіном за присутності *n*-хлормеркурійбензоату натрію та ϵ -АСА [Варецька, 1965]. Фрагменти фібриногену E_p, E_n та D отримували шляхом гідролізу фібриногену плазміном з наступною гель-фільтрацією на сефадексі G-100 [Белицер, 1986]. Фрагмент ковалентно стабілізованого фібриногену DD_{Fg} отримували з фібриногену, ковалентне утворення зв'язків якого по γ -ланцюгам ендogenous фактором XIIIa індукували 5 М CaCl₂, аналогічним способом. Фрагменти вміДФ та DDE-комплекс отримували шляхом плазмінового гідролізу ковалентно стабілізованого в результаті тромбін-індукованої полімеризації фібрину з наступною гель-фільтрацією на сефакрилі S300 [Olexa, 1979]. Суміш фрагментів E₁, E₂ отримували дисоціацією DDE-комплексу в присутності 3 М сечовини з наступною гель-фільтрацією на Сефакрил S300 [Varadi, 1983]. Продукти повного гідролізу ковалентно стабілізованого фібрину DD та E₃ отримували з плазмінового гідролізату фібрину методом гель-фільтрації на сефадексі G-100 [Белицер, 1986]. D-фрагмент фібриногену, D-фрагмент нестабілізованого фібрину та DD-фрагмент фібрину також отримували з плазмінового гідролізату відповідно фібриногену та фібрину іонообмінною хроматографією на КМ-Сефадекс G-50 в присутності EDTA та ϵ -АСА [Varadi, 1983]. Чистоту одержаних протеїнів перевіряли електрофорезом в ПААГ за присутності SDS [Laemlie, 1970].

Еуглобулінову фракцію одержували з цитратної плазми крові донорів [Wiman, 1978].

Видалення іонів кальцію з D- та DD-фрагментів проводили шляхом обробки 20 мМ EGTA з наступним діалізом. E_p-фрагмент фібриногену без фібринопептидів А отримували шляхом обробки фрагмента тромбіном [Yatsenko, 2015]. Видалення С-кінцевих залишків лізину в E-фрагментах фібриногену проводили з використанням карбоксипептидази В [Ellis, 1993].

Протеолітичну активність плазміну та потенційну активність плазміногену та їх низькомолекулярних форм визначали за гідролізом казеїну [Robbins, 1967].

Дослідження активації Glu-плазміногену проводили за амідолітичною

активністю. Амідолітичну активність плазміну та потенційну активність плазміногену визначали за швидкістю вивільнення *n*-нітроаніліну з хромогенного субстрату S₂₂₅₁ [Wiman, 1978]. Концентрації досліджуваних протеїнів складали: Glu-плазміноген – 20 мкг/мл; тканинний активатор – 3 МО/мл; desAB фібрин та фрагменти фібриногену/фібрину в еквімолярній до плазміногену кількості. Швидкість активації Glu-плазміногену тканинним активатором розраховували за формулою:

$$V = \Delta A_{405} / \Delta t,$$

де ΔA_{405} – зміна поглинання за довжини хвилі 405 нм, Δt – проміжок часу, за якого проводилось вимірювання зміни поглинання. За кінетичними кривими розраховували кількість утвореного плазміну за приростом оптичної густини реакційного середовища на лінійній ділянці кривої по експериментально визначеному співвідношенню для чистого плазміну:

$$1 \text{ нМ плазміну} - 0,0036 \text{ опт.од. } E_{405}/\text{хв.}$$

Константу Міхаеліса K_m реакції активації плазміногену тканинним активатором визначали графічним методом в координатах Хайнса-Вульфа. Каталітичну константу k_{cat} розраховували за рівнянням:

$$k_{cat} = V_{max} / [E_0],$$

де V_{max} – максимальна швидкість активації плазміногену, $[E_0]$ – початкова концентрація тканинного активатора. Ефективність реакції утворення плазміну визначали як співвідношення k_{cat}/K_m [Druzhyuna, 1997].

Активність плазміну визначали за швидкістю гідролізу фібринового згустку, використовуючи турбідиметричний метод [Bouvier, 1975]. Вплив фрагментів фібриногену/фібрину на гідроліз фібринового згустку досліджували за активністю плазміну. Концентрації протеїнів складали: desAB фібрин – 200 мкг/мл, плазмін – 20 мкг/мл, фрагменти фібриногену/фібрину в еквімолярній до плазміну кількості. Швидкість гідролізу V визначали як обернену величину до часу напівлізису згустку. Інгібіторну активність α_2 -антиплазміну плазми крові визначали за здатністю інгібувати амідолітичну активність чистого плазміну [Wiman, 1978].

Протеїн-протеїнові взаємодії досліджували з використанням авідин-біотинової системи та імуноензимного аналізу. Біотинілювання плазміногену, його фрагментів, DD-фрагменту фібрину, тканинного активатора плазміногену проводили за методикою, що використовували для імуноглобулінів. Рівень зв'язування біотинілюваних протеїнів визначали за активністю лужної фосфатази, кон'югованої з авідином [Hiller, Bayer, and Wilchek, 1991]. Імуноензимний аналіз проводили з використанням первинних поліклональних антитіл кроля до К 1-3 та К 5 та вторинних антикролячих антитіл, кон'югованих з лужною фосфатазою [Thermo Scientific, 2010]. K_d комплексоутворення за результатами імуноензимного та авідин-біотинового аналізу розраховували за рівнянням [Tsurupa, 2003]:

$$A = \frac{A_{max}}{1 + K_d/[L]},$$

де A – поглинання n -нітрофенолу, яке пропорційне кількості зв'язаного міченого ліганду на лінійному відрізку кривої; A_{\max} – поглинання за насичуючих концентрацій ліганду; $[L]$ – молярна концентрація ліганду в точці A ; K_d – константа дисоціації.

Дослідження зв'язування плазміногену та його фрагментів з окремими ланцюгами D-фрагменту та D-димеру проводили з використанням методу вестерн-блоту [Burnette, 1981].

Математичну обробку та статистичний аналіз отриманих експериментальних даних виконували за допомогою програм MS Excel та ORIGIN 8.1. До роботи включено результати експериментів, допустима похибка яких не перевищує 5 % ($p < 0,05$). Представлені на рисунках в розділі 3 кінетичні криві є типовими для серій повторюваних дослідів (не менше трьох у кожній серії).

Результати досліджень та їх обговорення

Функціональна роль продуктів деградації фібриногену/фібрину в регуляції фібринолітичного процесу. Продукти деградації фібрину утворюються під час лізису фібринового згустку плазміном. На перших етапах утворюються проміжні високомолекулярні продукти (вмПДФ), що представляють собою фрагменти стабілізованих фактором XIIIa протофібрил, наприклад, DX_nD , DXY , YY , DY , що формують супрамолекулярні комплекси через DDE-взаємодії і містять варіабельну кількість DDE-блоків [Луговской, 2013]. Далі ці фрагменти гідролізуються з утворенням DDE-комплексів (два ковалентно зшитих D-домени двох сусідніх молекул однієї нитки протофібрили, нековалентно з'єднані з E-доменом іншої нитки), які далі деградують до кінцевих DD- і E₃-фрагментів.

Продукти деградації фібриногену плазміном утворюються в кровотоці в результаті фібринолізу – патофізіологічного процесу, що супроводжує гіперактивацію фібринолітичної системи, або є наслідком заниженого рівня інгібіторів фібринолізу в плазмі крові. Результатом дії плазміну на фібриноген є утворення проміжних X- та Y- і кінцевих D- та E-фрагментів. Причому E-фрагмент проходить декілька стадій гідролізу з утворенням послідовно раннього E_p- та пізнього E_n-фрагментів, що відрізняються за молекулярною масою [Garlund, 1977; Gaffney, 1980].

Для визначення шляхів регуляції фібринолізу фрагментами фібриногену/фібрину досліджена їх дія на процеси активації плазміногену тканинним активатором, гідролізу фібрину плазміном та інактивації плазміну α_2 -антиплазміном плазми крові.

Вивчення активації Glu-плазміногену тканинним активатором в присутності продуктів гідролізу фібрину показало, що всі фрагменти, крім кінцевого E₃, здатні стимулювати процес утворення плазміну (рис.1). Стимулюючий ефект вмПДФ і DDE-комплексу подібний до такого desAB фібрину, тоді як стимулююча здатність кінцевих продуктів критично знижується у DD та відсутня у E₃-фрагмента.

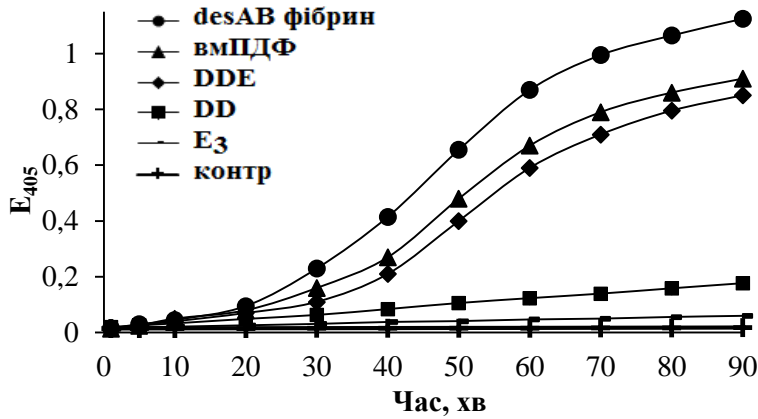


Рис.1. Кінетика стимульованої фрагментами фібрину реакції активації *Glu*-плазміногену тканинним активатором. Контроль – кінетична крива активації проензиму тканинним активатором без стимуляторів.

Нами показано, що ранній продукт гідролізу фібриногену E_p стимулює реакцію активації плазміногену за еквімолярної кількості відносно проензиму. Тоді як E_n або D стимулюючого ефекту не виявляють (рис. 2).

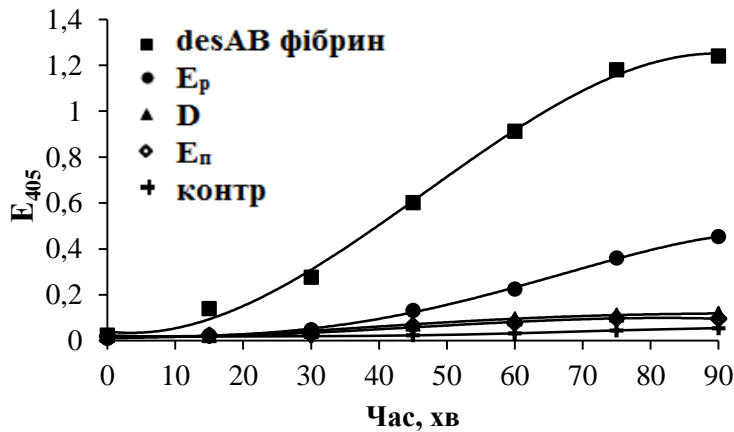


Рис. 2. Стимулюючий ефект фрагментів фібриногену на активацію плазміногену тканинним активатором. Контроль – кінетична крива активації проензиму тканинним активатором без стимуляторів.

Отримані дані свідчать про те, що в продуктах деградації фібрину вмпДФ та DDE, як і в E_p -фрагменті фібриногену, центри взаємодії з компонентами фібринолітичної системи є експонованими, що обумовлює їх здатність стимулювати утворення плазміну.

Фрагменти фібрину вмпДФ та DDE-комплекс знижують швидкість гідролізу фібринового згустку плазміном на 72 % та 30 % відповідно за молярного відношення до фібрину 0,4 (рис. 3). В той же час, жоден з продуктів деградації фібриногену не впливає на процес гідролізу фібринового згустку плазміногеном, активованим тканинним активатором. Отже, проміжні високомолекулярні продукти гідролізу фібрину можуть конкурувати зі згустком за зв'язування плазміногену та тканинного активатора.

Виявлено, що з досліджених фрагментів фібриногену/фібрину тільки вмпДФ захищають зв'язаний з ними плазмін від інактивації α_2 -антиплазміном плазми крові. За умови додавання до реакційного середовища 20 мкл плазми крові, що відповідає еквімолярній до внесеного плазміну кількості інгібітора, швидкість лізису фібринового згустку в присутності вмпДФ знижується вдвічі, тоді як – інших фрагментів фібриногену/фібрину відбувається повне інгібування плазміну і лізис згустку не спостерігається.

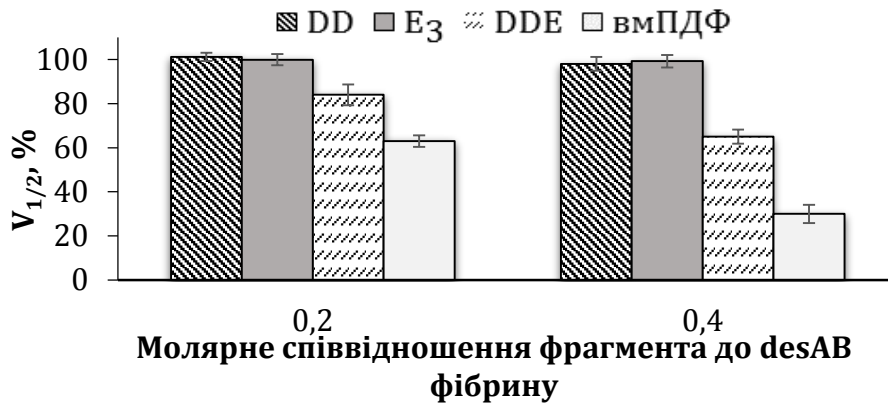
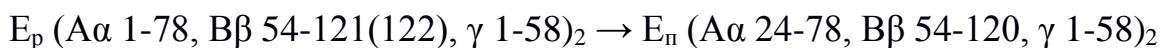


Рис. 3. Лізис згустку фібрину плазміном за присутності фрагментів фібрину. За 100 % прийнято швидкість гідролізу фібрину за відсутності ефекторів.

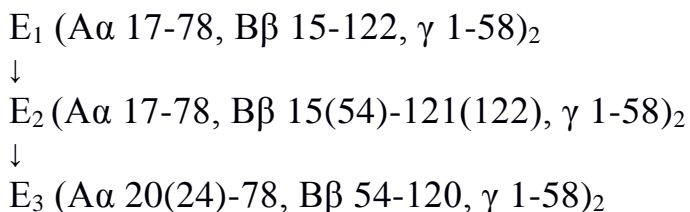
Одержані дані щодо впливу фрагментів ковалентно прошитого фібрину на різні етапи дії плазміноген/плазмінової системи дозволяють запропонувати можливий механізм регуляції фібринолізу, який полягає в тому, що розчинні високомолекулярні фрагменти фібрину, утворюючись в області згустку, вивільняються в кровотік і конкурують зі згустком за зв'язування плазміногену і тканинного активатора, уповільнюючи руйнування тромбу за механізмом негативного зворотного зв'язку. Подальша дія утвореного на них плазміну призводить до формування більш легких фрагментів – DDE-комплексів і кінцевих продуктів DD і E₃, які не захищають ензим від інактивації α₂-антиплазміном плазми крові. Таким чином, інгібування плазміну, який разом з фрагментами фібрину потрапляє в кровотік, захищає протеїни крові від неспецифічного протеолізу поза межами фібринового згустку.

Дослідження молекулярного механізму стимуляції E-доменвмісними фрагментами фібриногену/фібрину активації плазміногену тканинним активатором.

E-фрагмент фібриногену утворюється на кінцевих етапах плазмінового гідролізу через декілька послідовних стадій. Він входить до складу X- та Y-фрагментів. За дії плазміну від Y-фрагмента відщеплюється E_p, який надалі перетворюється на E_n [Garlund, 1977]:



E-фрагмент фібрину знаходиться в складі DDE-комплексу у формі E₁ або E₂. Внаслідок відщеплення плазміном N-кінцевого пептиду від одного з двох β-ланцюгів E₁ перетворюється на E₂. Слід зазначити, що E₁ та E₂ у вільній формі в кровотоці не існують [Олеха, 1986]. Відщеплення другого N-кінцевого пептиду від E₂-фрагмента призводить до дисоціації DDE-комплексу з утворенням E₃-фрагмента, аналогічного за структурою до E_n-фрагмента фібриногену:



Відомо, що в молекулах фібриногену/фібрину в центральному E-домені центри взаємодії з плазміногеном та тканинним активатором плазміногену відсутні. Отже, виявлений нами стимулюючий ефект E_p-фрагмента фібриногену

пов'язаний з появою центрів зв'язування проензиму та його активатора в результаті гідролізу.

Для встановлення молекулярного механізму активації плазміногену тканинним активатором на E-фрагментах фібриногену/фібрину нами було отримано, крім E_p -, $E_{п}$ -фрагментів фібриногену та E_3 -фрагменту фібрину, суміш фрагментів E_1, E_2 , що існують тільки у складі DDE-комплексу. Показано, що в присутності $E_{п}$ та E_3 активація плазміногену тканинним активатором не відбувається, тоді як і E_p , і E_1, E_2 стимулюють утворення плазміну (рис. 4А). Очевидно, що здатність E_p та E_1, E_2 взаємодіяти з проензимом та активатором обумовлена наявністю в них відповідно N-кінцевої ділянки $A\alpha$ 1-17(17-24) та C-кінцевої ділянки $B\beta$ 120-122, відсутніх у $E_{п}$ - та E_3 -фрагментах. Видалення тромбіном N-кінцевої ділянки $A\alpha$ 1-17 в E_p -фрагменті фібриногену призводить до зниження рівня активації плазміногену тканинним активатором на 25 %, тоді як відщеплення карбоксипептидазою В С-кінцевих залишків лізину всіх трьох пар поліпептидних ланцюгів призводить до повного пригнічення активації (рис. 4Б).

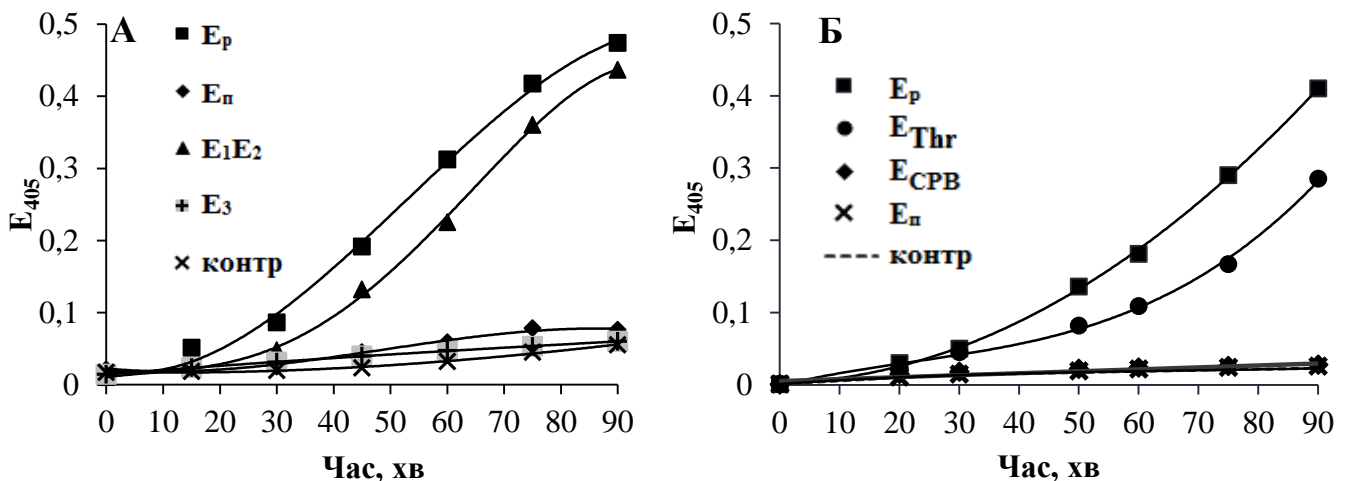


Рис. 4. Кінетика реакції активації Glu-плазміногену тканинним активатором, стимульованої E-фрагментами фібриногену та фібрину (А) та E_p -фрагментом фібриногену після обробки тромбіном (E_{Thr}) та карбоксипептидазою В (E_{CPB}) (Б). Контроль – активація плазміногену у відсутності ефektorів.

Методом ізомолярних серій нами встановлено, що E_p -фрагмент фібриногену найбільш ефективно стимулює утворення плазміну під дією тканинного активатора за молярного співвідношення проензим/фрагмент 4/1, що вказує на можливу взаємодію одночасно до чотирьох молекул проензиму з E_p -фрагментом під час активації. В той же час, Glu-плазміноген зв'язується як з раннім E-фрагментом фібриногену, так і з пізнім – рівень зв'язування на 25 % нижче (рис. 5А), хоча останній не стимулює активацію проензиму. Видалення С-кінцевих залишків лізину карбоксипептидазою В призводить до 70 % зниження рівня зв'язування плазміногену. Очевидно, плазміноген зв'язується як з С-кінцевими залишками лізину, так і з N-кінцевою ділянкою $A\alpha$ 1-24, однак для активації необхідна двоцентрова взаємодія проензиму з E-фрагментом.

Представлені на рис. 5Б дані демонструють, що E_p - та E_n -фрагменти мають однакову здатність зв'язувати тканинний активатор плазміногену. В той же час видалення С-кінцевих лізину у E_p призводить до дев'ятикратного зниження рівня зв'язування активатора. Залучення до взаємодії з Е-фрагментами лізін-зв'язувальних ділянок тканинного активатора підтверджується пригніченням зв'язування активатора з фрагментом за присутності ϵ -АСА.

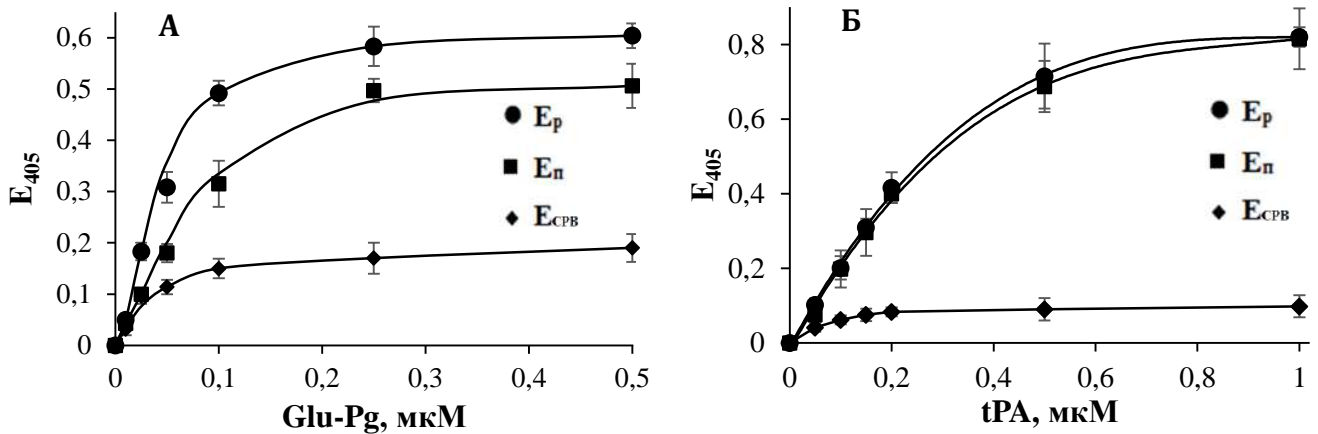


Рис. 5. Зв'язування тканинного активатора плазміногену (А) та Glu-плазміногену (Б) з Е-фрагментами фібриногену.

Однакова кількість тканинного активатора, що зв'язується з E_p - та E_n -фрагментами вказує на те, що N-кінцеві залишки амінокислот $A\alpha$ -ланцюга (1-24) та С-кінцеві залишки $B\beta$ -ланцюга (121-122), які відсутні у E_n -фрагмента, не істотні для зв'язування тканинного активатора. Таким чином, взаємодія E_p -фрагмента фібриногену з тканинним активатором плазміногену обумовлена наявністю залишків лізину на С-кінцях $A\alpha$ - і γ -ланцюгів молекули.

Отримані дані свідчать про те, що стимуляція активації плазміногену тканинним активатором фрагментами E_p фібриногену та E_1, E_2 фібрину обумовлена зв'язуванням тканинного активатора з С-кінцевими залишками лізину $A\alpha$ - та γ -ланцюгів і плазміногену – з ділянками $B\beta$ 120-122 та $A\alpha$ 1-17(24). Утворення плазміну на Е-фрагментах фібриногену/фібрину потребує двоцентрової взаємодії проензиму з фрагментом.

Дослідження молекулярного механізму взаємодії плазміногену та тканинного активатора плазміногену з D-доменними фрагментами фібриногену/фібрину.

Роль кальцій-зв'язувальних центрів D-доменів фібриногену/фібрину в ініціації фібринолізу. Встановлено, що центри взаємодії з плазміногеном та тканинним активатором в D-доменах фібриногену/фібрину розташовані на ділянках $A\alpha$ 148-160 та γ 312-324, відповідно. Вважається, що ці ділянки експонуються в процесі полімеризації фібрину на етапі DDE-взаємодії по центрах полімеризації «А»-«а» та «В»-«в» [Medved, 2006]. В D-домені також розташовано 4 центри зв'язування іонів кальцію – γ_1 , γ_2 , β_1 та β_2 – по два в γ - та в β -субдоменах. γ_1 та β_2 знаходяться в безпосередній близькості до центрів полімеризації «а» і «в» та центрів взаємодії з плазміногеном та тканинним активатором [Kostelansky, 2002].

Відомо, що іони кальцію необхідні для полімеризації фібрину, стабілізації структури згустку, дії фактору XIIIa [Mosesson, 2005]. β 2-центр руйнується під час «В»-«в» взаємодії і призводить до конформаційних змін в β -субдоміні. γ 1 перебудовується під час «А»-«а» взаємодії і стабілізує зв'язок [Averett, 2012]. Однак, яку роль іони кальцію відіграють в процесі фібринолізу наразі не з'ясовано.

Нами показано, що видалення іонів кальцію з D-фрагмента фібриногену та DD-фрагмента фібрину хелатуючим агентом EGTA призводить до дозозалежного підвищення швидкості активації плазміногену тканинним активатором та кількості утвореного плазміну (рис.6).

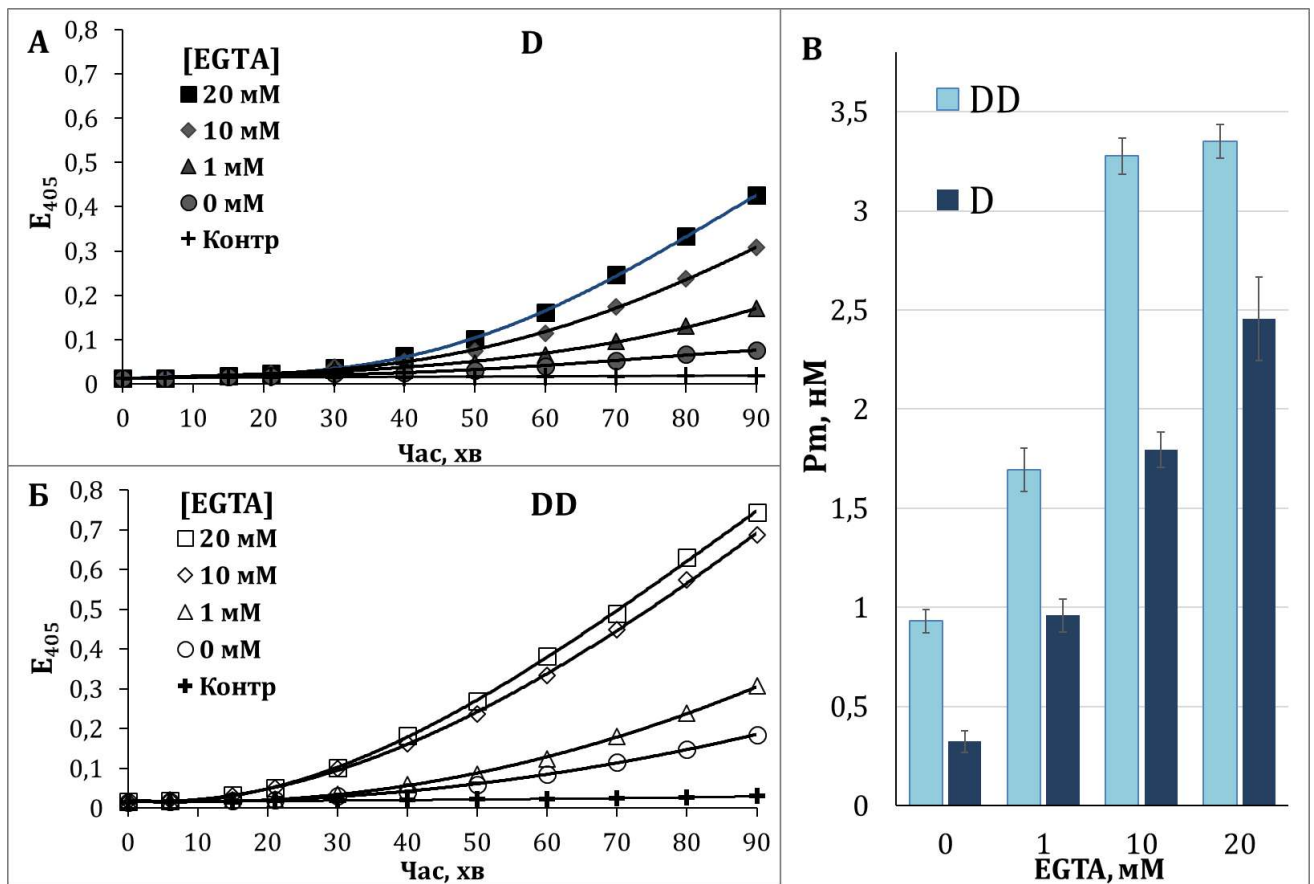


Рис. 6. Вплив EGTA (0 – 20 мМ) на активацію Glu-плазміногену тканинним активатором на D-фрагменті фібриногену і DD-фрагменті фібрину. А. Кінетичні криві процесу активації за присутності різних концентрацій хелатора. Контроль – рівень активації Glu-плазміногену тканинним активатором без стимуляторів в присутності 20 мМ EGTA. Б. Кількість плазміну, утвореного на D-фрагменті фібриногену і DD-фрагменті фібрину в результаті активації в присутності EGTA.

При додаванні в реакційне середовище іони кальцію реасоціюють з центрами зв'язування в DD-фрагменті фібрину, обробленому хелатором, що призводить до дозозалежного зменшення швидкості активації (рис.7). Причому, цей процес є специфічним для кальцію – інші досліджені двовалентні катіони (Mg^{2+} , Mn^{2+}) не впливають на кінетику активації проензиму на DD-фрагменті фібрину. Отже, ініціація активації плазміногену тканинним активатором є кальцій-залежним процесом.

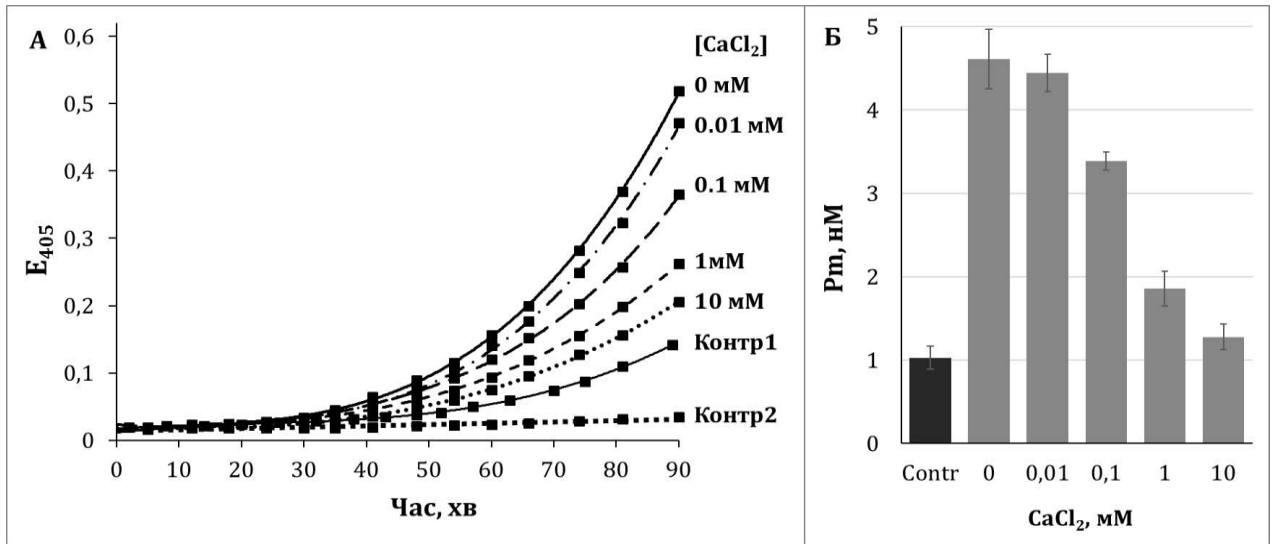


Рис. 7. Вплив іонів кальцію на активацію Glu-плазміногену тканинним активатором на попередньо обробленому EGTA DD-фрагменті фібрину. А. Кінетичні криві процесу активації за присутності різних концентрацій іонів кальцію. Контроль 1 – активація без CaCl₂ на DD-фрагменті, не обробленому хелатором. Контроль 2 – активація з 10 мМ CaCl₂ без DD-фрагмента. Б. Кількість плазміну, що утворився в результаті активації плазміногену на обробленому EGTA DD-фрагменті фібрину в присутності іонів кальцію. Контроль – активація без CaCl₂ на DD-фрагменті, не обробленому хелатором.

На основі даних літератури та отриманих нами результатів ми пропонуємо наступний механізм ініціації фібринолізу на D-доменах фібриногену/фібрину за участі кальцій-зв'язувальних центрів:

- руйнування Ca²⁺-сольового містка між β-субдоменом та суперспіральним регіоном внаслідок видалення іону кальцію з β2 під дією хелатуючих агентів або взаємодії по центрах полімеризації «В»-«в»;
- дисоціація β-субдомену від суперспірального регіону з наступним експонуванням області Aα 148-160 і зв'язуванням з нею плазміногену;
- видалення іону кальцію з γ1-центру хелаторами або реорганізація координаційних зв'язків іону кальцію в ньому в результаті «А»-«а» взаємодії з наступною перебудовою петлі γ 312-324 і набуття нею необхідної для взаємодії з тканинним активатором конформації;
- зв'язування тканинного активатора з γ 312-324 та активація плазміногену з утворенням плазміну.

Роль ковалентної стабілізації γ-ланцюгів D-доменів фібриногену/фібрину в експонуванні центрів взаємодії з плазміногеном і тканинним активатором. Іншою суттєвою структурною перебудовою в D-доменах фібриногену/фібрину, що відбувається під час полімеризації, є утворення ковалентного зв'язку між γ-ланцюгами двох сусідніх в одній нитці протофібрили D-доменів під дією фактора XIIIa. Нами отримано DD-фрагмент ковалентно стабілізованого фактором XIIIa фібриногену і показано, що його стимулюючий ефект складає 65 % такого desAB фібрину і дорівнює ефекту DD-фрагмента фібрину, обробленого хелатуючими агентами (рис. 8, табл. 1).

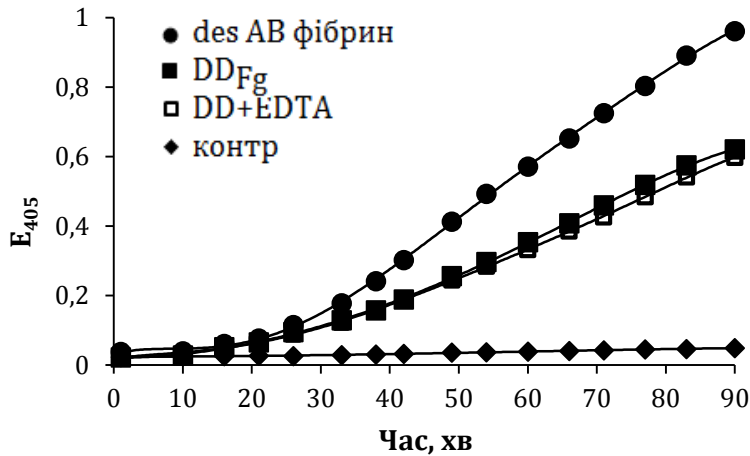


Рис. 8. Стимуляція активзації Glu-плазміногену тканинним активатором на DD-фрагменті ковалентно стабілізованого фібриногену та DD-фрагменті фібрину, обробленого EDTA.

Ймовірно, утворення ковалентного $\gamma\gamma$ -зв'язку між D-доменами призводить до стабілізації γ -модулів, які в нативному фібриногені є високорухливими. Така стабілізація викликає експонування центрів зв'язування плазміногену та тканинного активатора, незалежне від DDE-взаємодій, і підтримує необхідну для активзації плазміногену структуру D-доменів. Це припущення підтверджується різницею в ефективності реакції активзації плазміногену тканинним активатором, стимульованої D-фрагментом з непрошитого фібрину та DD-фрагментом фібрину, оброблених EDTA (таблиця). DD-фрагмент ковалентно стабілізованого фібрину є вдвічі більш ефективним стимулятором утворення плазміну, ніж D-фрагмент з непрошитого фібрину. Значення кінетичних параметрів реакції активзації плазміногену тканинним активатором, стимульованої DD-фрагментами фібриногену і фібрину є близькими, що вказує на ідентичність центрів взаємодії з проензимом і активатором, експонованих в результаті ковалентної стабілізації периферичних доменів фібриногену/фібрину та структурних змін в цих доменах, викликаних кальцій-залежними перебудовами. Однак desAB фібрин є в 4 рази більш ефективним стимулятором утворення плазміну, що підтверджує необхідність цілісної молекули фібрину для повноцінної ініціації фібринолітичного процесу.

Таблиця. Кінетичні параметри активзації Glu-плазміногену тканинним активатором на D-фрагменті з непрошитого фібрину, DD-фрагменті ковалентно стабілізованого фібриногену, DD-фрагменті фібрину та desAB фібрині

Параметри	D	2×D	DD	DD _{Fg}	desAB фібрин
K_m , нМ	0,067	0,151	0,078	0,075	0,031
V_{max} , опт. од./хв	$3,621 \times 10^{-6}$	$8,356 \times 10^{-6}$	$8,679 \times 10^{-6}$	$7,889 \times 10^{-6}$	$1,333 \times 10^{-5}$
k_{cat} , с ⁻¹	0,051	0,115	0,121	0,110	0,185
Ефективність реакції	0,760	0,775	1,553	1,470	5,936

Отримані нами дані демонструють, що експонування центрів зв'язування плазміногену та тканинного активатора в D-доменах фібриногену/фібрину

контролюється кальцій-залежними структурними перебудовами та ковалентною стабілізацією γ -ланцюгів.

Взаємодія Glu-плазміногену та його фрагментів з D-доменвмісними фрагментами фібриногену/фібрину. Ділянка A α 148-160 на сьогодні є єдиним встановленим центром взаємодії з плазміногеном в D-домені фібриногену/фібрину. Вважається, що плазміноген зв'язується з нею кринглом 5 [Wu, 1994], однак встановлено, що в нативному проензимі єдиною експонованою лізін-зв'язувальною ділянкою є така крингла 1 [Хуе, 2012]. Крім того, міні-плазміноген, який з п'яти кринглових доменів плазміногену містить лише крингл 5, не активується тканинним активатором на синтетичному пептиді, аналогічному A α 148-160. Ці факти вказують на можливість залучення до зв'язування плазміногену амінокислотних послідовностей поза відомою ділянкою A α 148-160 D-доменів фібриногену/фібрину.

З використанням авідин-біотинової системи нами встановлено, що фрагменти плазміногену K 1-3 та K 5 конкурують з Glu-плазміногеном за зв'язування з DD-фрагментом фібрину, максимально знижуючи рівень зв'язування проензиму на 38 % і 43 % відповідно. Самі по собі крингл 1-3 та крингл 5 зв'язуються з DD-фрагментом фібрину D з високою афінністю (рис. 9А). С-кінцеві залишки лізину не є суттєвими для цього процесу – обробка карбоксипептидазою В призводить лише до 20 % зниження зв'язування K 1-3 та не впливає на рівень зв'язування K 5. Крім того, обидва кринглові фрагменти плазміногену здатні зв'язуватись з іммобілізованим насиченим комплексом DD-фрагменту з альтернативним крингловим фрагментом (рис. 9Б), що вказує на існування в D-доменах окремих центрів взаємодії з обома фрагментами плазміногену.

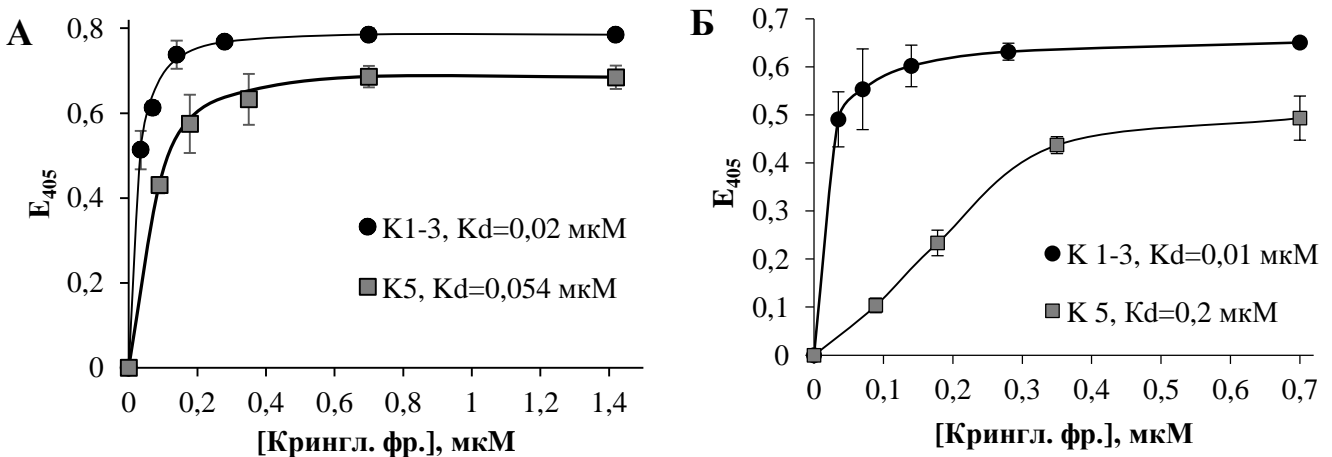


Рис. 9. Зв'язування фрагментів плазміногену K 1-3 та K 5 з DD-фрагментом фібрину (А) та з насиченим комплексом відповідно K 5/DD та K 1-3/DD (Б).

За одночасного додавання до DD-фрагменту фібрину K 1-3 та K 5 (один з кринглових фрагментів з біотиновою міткою, інший не мічений) спостерігається зниження рівня зв'язування максимально на 50 % для K 5 та на 60 % для K 1-3, однак кринглові фрагменти не витісняють одне одного з центрів зв'язування на DD-фрагменті фібрину. Ці дані вказують на те, що центри взаємодії з кринглами 1-3 та 5 в D-доменах фібриногену/фібрину частково перекриваються. Методом ліганд-вестерн-блоту з використанням поліклональних антитіл до K 1-3 показано, що Glu-плазміноген здатен взаємодіяти з A α -, B β - та γ -ланцюгами DD-фрагмента фібрину та A α -, B β - та

γ -ланцюгами D-фрагмента фібриногену (рис. 10), що вказує на наявність в них потенційних центрів взаємодії з плазміногеном поза відомою ділянкою A α 148-160, з якими молекула плазміногену може зв'язуватись і кринглом 1-3, і кринглом 5.

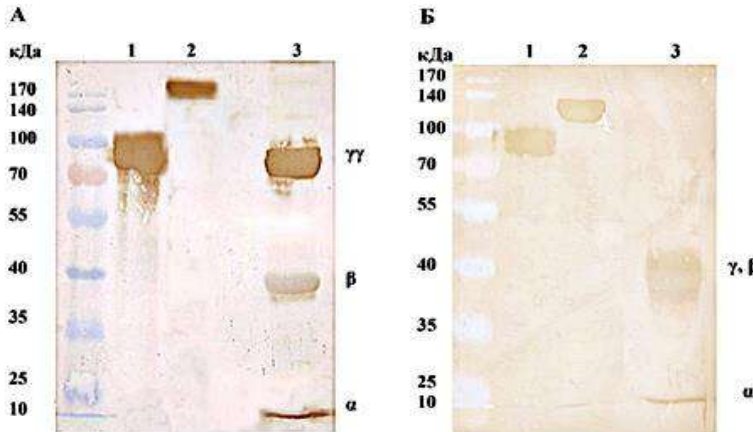


Рис. 10. Взаємодія Glu-плазміногену з DD-фрагментом фібрину (А) і D-фрагментом фібриногену (Б) 1 – контроль фрагмент; 3 – DD-/D-фрагмент, відновлені β -меркаптоетанолом.

Отримані результати свідчать, що у взаємодії плазміногену з DD-фрагментом фібрину беруть участь як крингл 1-3, так і крингл 5, причому вони мають окремі сайти взаємодії в D-домени, які можуть бути розташовані поза відомою ділянкою A α 148-160 як в A α -ланцюзі, так і в B β - та $\gamma\gamma$ -ланцюгах.

Розробка способу визначення активності тканинного активатора в плазмі крові з використанням DD-фрагмента фібрину як стабільного ефективного стимулятора реакції активації плазміногену. Отримані нами дані про те, що видалення іонів кальцію з DD-фрагмента фібрину призводить до інтенсифікації стимуляції цим фрагментом процесу активації плазміногену тканинним активатором, було використано для розробки способу визначення активності тканинного активатора в плазмі крові.

Тканинний активатор плазміногену є одним із важливих показників, який характеризує стан фібринолітичної системи. Показано, що рівень тканинного активатора може бути маркером ряду серцево-судинних захворювань, таких як стеноз коронарних судин, інфаркт міокарда, інсульт [Juhan-Vague, 1996; Zorio, 2008]. Таким чином, точне визначення рівня активатора у плазмі крові є необхідним для прогнозування тромботичних станів та кровотеч, а також для контролю активності тканинного активатора під час тромболітичної терапії.

Суть методу полягає у визначенні активності тканинного активатора в біологічному матеріалі з використанням DD-фрагмента фібрину як стабільного ефективного стимулятора реакції активації плазміногену у присутності EGTA. EGTA значно посилює стимулюючий ефект фрагмента на активацію плазміногену тканинним активатором і в такий спосіб пришвидшує процес визначення активності тканинного активатора в зразках. Активація плазміногену тканинним активатором зразка оцінюється за швидкістю розщеплення хромогенного субстрату S₂₂₅₁ новоутвореним плазміном.

Запропонований спосіб є високочутливим, економічним, простим та швидким у виконанні. Метод може знайти застосування в лабораторно-клінічній практиці для оцінки рівня функціонально активного тканинного активатора плазміногену в плазмі крові за серцево-судинних захворювань. На основі розробки отримано патент на винахід № 113014, МПК G01N 33/68 (2016.01) G01N (2016.01).

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі продемонстровано участь фрагментів та окремих ділянок молекул фібриногену/фібрину в стимуляції активації плазміногену тканинним активатором та регуляції фібринолітичного процесу. Визначено роль структурних перебудов молекули фібриногену під час утворення полімерного фібрину в експонуванні центрів зв'язування плазміногену і тканинного активатора та ініціації фібринолізу. Отримані результати є важливими для розуміння молекулярних механізмів реалізації ефекторної функції фібрину в регуляції активності фібринолітичної системи і можуть бути основою для подальшого пошуку підходів для корекції патологічних станів, пов'язаних з розвитком серцево-судинних захворювань.

1. Встановлено, що продукти деградації фібриногену та фібрину впливають на різні ланки фібринолітичного процесу: DDE-комплекс, DD-фрагмент фібрину та ранній E_p-фрагмент фібриногену стимулюють активацію плазміногену тканинним активатором; високомолекулярні продукти гідролізу фібрину та DDE-комплекс уповільнюють гідроліз фібрину плазміном. Протекторну дію за інактивації плазміну α₂-антиплазміном виявляють тільки високомолекулярні фрагменти. Продукти гідролізу, які утворюються під час руйнування фібринового згустку, уповільнюють його лізис за механізмом негативного зворотного зв'язку.

2. Вперше показано, що E_p-фрагмент фібриногену, як і E₁, E₂-фрагменти фібрину в складі DDE-комплексу, стимулює активацію Glu-плазміногену тканинним активатором. С-кінцеві залишки лізину Aα- і γ-ланцюгів E-фрагмента зв'язують крингл 2 тканинного активатора, тоді як N-кінцевий фрагмент Aα 1-24 і С-кінцева ділянка Bβ 120–122 відповідають за зв'язування плазміногену.

3. Показано, що видалення іонів кальцію з DD-фрагмента фібрину в чотири рази підвищує швидкість реакції активації та кількість утворюваного плазміну. Отримані результати свідчать, що експонування центрів зв'язування плазміногену і тканинного активатора в периферичних D-доменах фібрину є кальцій-залежним процесом.

4. Встановлено, що DD-фрагмент стабілізованого фактором XIIIa фібриногену стимулює активацію плазміногену тканинним активатором на рівні такої DD-фрагмента фібрину, обробленого EGTA, що вказує на важливе значення ковалентної стабілізації γγ-ланцюгів для експонування центрів зв'язування плазміногену і тканинного активатора.

5. Запропоновано гіпотезу, згідно якої структурні перебудови в β- та γ-модулях D-домену, що мають місце на ранніх стадіях полімеризації фібрину, є необхідними для експонування центрів взаємодії плазміногену і тканинного активатора та ініціації фібринолітичного процесу.

6. Показано, що в DD-фрагменті фібрину існують окремі центри зв'язування для крингла 1-3 та крингла 5 молекули плазміногену, які можуть бути локалізовані в Aα-, Bβ- і γγ-ланцюгах цього фрагмента.

7. Розроблено новий ефективний та швидкий у виконанні спосіб визначення активності тканинного активатора плазміногену в плазмі крові з використанням DD-фрагмента фібрину та EGTA.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Капустяненко Л.Г., **Яценко Т.А.**, Юсова О.І., Гриненко Т.В. Одержання та очищення крингла 5 плазміногену людини з використанням АН-сефарози. // *Biotechnologia Acta*. – 2014. – Т.85, №4. – С.35-42. (Здобувачем одержано плазміноген з плазми крові людини, проведено характеристику отриманих фрагментів плазміногену).

2. **Yatsenko T.**, Rybachuk V.N., Kharchenko S.M., Grinenko T.V., Yusova O.I. Effect of fibrinogen degradation products on various stages of the fibrinolytic process. // *J. Precl. Clin. Res.* – 2015. – Vol. 9(1). – P. 18-22. (Здобувачем одержано плазміноген, фібриноген людини, плазмін, фрагменти фібриногену, проведено дослідження стимуляції фрагментами фібриногену активації плазміногену тканинним активатором, опрацьовано літературу та підготовано статтю до друку).

3. **Yatsenko T. A.**, Rybachuk V. M., Yusova O. I., Kharchenko S. M., Grinenko T. V. Effect of fibrin degradation products on fibrinolytic process. // *Ukr. Biochem. J.* – 2016. – Vol. 88, N 2. – P.16-24. (Здобувачем одержано плазміноген, фібриноген, фібрин, плазмін, фрагменти фібрину, проведено дослідження впливу фрагментів фібрину на активацію плазміногену тканинним активатором, лізис фібринового згустку та інгібування плазміну $\alpha 2$ -антиплазміном плазми крові, опрацьовано літературу та підготовано статтю до друку).

4. Гриненко Т.В., Рыбачук В.Н., **Яценко Т.А.**, Капустяненко Л.Г. Активация плазминогена тканевым активатором на DD-фрагментах фибрина и ковалентно прошитого фактором XIIIa фибриногена. // Сборник науч. статей «Современные проблемы биохимии» I Белорусского биохимического конгресса, Гродно. 2016. – Т. 2. С. 72-77. (Здобувачем одержано плазміноген, фібриноген людини, плазмін, фрагменти фібриногену/фібрину, проведено дослідження активації плазміногену тканинним активатором на DD-фрагментах фібриногену/фібрину).

5. Grinenko T.V., Kapustianenko L.G., **Yatsenko T.A.**, Yusova O.I., Rybachuk V.N. Plasminogen fragments K 1-3 and K 5 bind to different sites in fibrin fragment DD. // *Ukr. Biochem. J.* – 2016. – Vol. 88, N 3. – P.32-38. (Здобувачем одержано плазміноген, фібриноген людини, DD-фрагмент фібрину, фрагменти плазміногену, антитіла до фрагменту K 1-3 плазміногену, проведено дослідження впливу K 1-3, K 4 та K 5 на активацію плазміногену тканинним активатором на DD-фрагменті, аналіз даних щодо взаємодії K 1-3 та K 5 з DD-фрагментом, підготовано матеріали до друку).

6. Рыбачук В.М., **Яценко Т.А.**, Харченко С.М., Савчук О.В., Юсова О.І., Гриненко Т.В. Розробка методу визначення активності тканинного активатора в плазмі крові з використанням DD-фрагменту фібрину як стабільного ефективного стимулятора реакції активації плазміногену. // Вісник Львівського нац. унів. Серія біологічна. – 2016. – Вип. 73. – С. 314 – 319. (Здобувачем одержано плазміноген, фібриноген людини, плазмін, DD-фрагмент фібрину, оброблений EGTA, проведено дослідження активації плазміногену тканинним активатором на DD-фрагменті фібрину в присутності хелатуючих агентів, аналіз результатів, опрацювання літератури за темою дослідження та підготовка матеріалу до публікації).

7. **Yatsenko T. A.**, Rybachuk V. M., Kharchenko S. M., Grinenko T. V. Ca^{2+} -dependent regulation of fibrinolytic system activation on fibrin(ogen) D-domains. //

Ukr. Biochem. J. – 2017. – Vol. 89, N 5. – P. 21 – 31. (Здобувачем одержано плазміноген, фібриноген людини, DD-фрагмент фібрину, D-фрагмент фібриногену, одержано фрагменти фібриногену та фібрину, оброблені хелатуючими агентами, проведено дослідження впливу EDTA, EGTA та Ca^{2+} на активацію плазміногену тканинним активатором на D-фрагментах фібриногену та DD-фрагментах фібрину, аналіз даних щодо впливу виснаження та реасоціації кальцію з D-доменвмісними фрагментами фібриногену та фібрину, підготовано матеріали до друку).

8. **Яценко Т.А.**, Рибачук В.Н., Юсова О.І.. Дослідження механізму фібринолізу і його регуляції на модельних системах за участі продуктів деградації фібрину. // Тези доповідей конференції-конкурсу молодих учених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології - 2013», (Київ, 6-7 червня 2013 р.): Укр. біохім. журн. – 2013. – 85, №4. – С. 156.

9. **Яценко Т.А.**, Рибачук В.Н., Гриненко Т.В.. Дослідження впливу фрагментів прошитого фібрину на активацію Glu-плазміногену тканинним активатором і гідроліз фібрину плазміном. // Матеріали XI Українського біохімічного конгресу, (Київ, 6-10 жовтня 2014 р.): Укр. біохім. журн. – 2014. – 86, №5 (Suppl. 1.). – С. 89.

10. **Yatsenko T.**, Rybachuk V., Kharchenko S., Grinenko T. Localization of plasminogen-binding site in fibrin fragment DD. // Abstract book of 39 FEBS Congress (Paris, France, Aug 30 – Sept 3, 2014). – FEBS Journal. – V.281 (Suppl 1). – P.580.

11. **Яценко Т.А.**, Рибачук В.Н., Юсова О.І.. Дослідження впливу фрагментів фібриногену на різні ланки фібринолізу. // Матеріали конф. молодих вчених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології», (Київ, 23-24 квітня 2015). – С. 70.

12. **Yatsenko T.**, Grinenko T., Rybachuk V.. Effect of plasmic degradation products of fibrinogen/fibrin on fibrinolytic system activity. // Abstract book of «International symposium “Young Researchers in Bioscience”» (Cluj-Napoca, Romania, July 22-26 2015) – P. 16.

13. **Яценко Т.А.**, Рыбачук В.Н., Гриненко Т.В. Исследование влияния ионов кальция и хелатирующих агентов на стимуляцию активации Glu-плазминогена тканевым активатором D-доменсодержащими фрагментами фибриногена и фибрина. // Материалы междунар. конф. «Современные проблемы естествознания в науке и образовательном процессе» (Минск, Беларусь, 10-11 ноября 2015). – С. 48-49.

14. **Yatsenko T.**, Grinenko T., Rybachuk V. The role of Ca^{2+} -dependent structure changes and gamma chains crosslinking in plasminogen activation on fibrin fragment DD. // Abstract book of X Parnas Conference (Wroclaw, Poland, July 10-12 2016.). – Acta Biochemica Polonica. – V. 63, Suppl. 1/2016 - P 44.

15. **Yatsenko T.**, Rybachuk V., Kapustianenko L., Kharchenko S., Yusova O., Grinenko T. Interaction of plasminogen fragments K 1-3 and K 5 with fibrin fragment DD. // Abstract book of 41 FEBS Congress (Kusadasi, Turkey, Sept 3-8, 2016). – FEBS Journal. – V. 283 (Suppl.1) – P. 230.

16. **Yatsenko T.**, Rybachuk V., Kapustianenko L., Grinenko T. Interaction of kringle-containing plasminogen fragments with carboxy-terminal fibrin DD domains. // Abstract book of Spetsai summer school “Proteins and Organized Complexity” (Spetses, Greece, Sept 24 – Oct 1 2017). – P. 59 – 60.

17. Патент на винахід № 113014, МПК G01N 33/68 (2016.01) G01N (2016.01). «Спосіб визначення тканинного активатора плазміногену» / Рибачук В.М., Савчук О.В., Харченко С.М., Яценко Т.А., Юсова О.І., Гриненко Т.В., заявник і патентовласник Інститут біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України. – Заявл. 13.02.2015. – Позитивний висновок про відповідність винаходу умовам патентоздатності від 27.09.2016 р.

АНОТАЦІЯ

Яценко Т.А. Молекулярні механізми регуляції фібринолізу за участі фрагментів фібриногену/фібрину. – Рукопис.

Дисертація на здобуття ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія. – Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України. – 2018 р.

Дисертаційна робота присвячена з'ясуванню молекулярних механізмів регуляції активності фібринолітичної системи продуктами плазмінової деградації фібриногену та фібрину. Встановлено, що продукти деградації фібриногену та фібрину впливають на різні стадії фібринолітичного процесу: DDE-комплекс, DD-фрагмент фібрину та E_p-фрагмент фібриногену стимулюють активацію плазміногену тканинним активатором; високомолекулярні продукти гідролізу фібрину та DDE-комплекс уповільнюють гідроліз фібрину плазміном. Протекторну дію за інактивації плазміну α₂-антиплазміном виявляють тільки високомолекулярні фрагменти. Зроблено висновок, що продукти гідролізу, які утворюються під час руйнування фібринового згустку, уповільнюють його лізис за механізмом негативного зворотного зв'язку.

Вперше показано, що E_p-фрагмент фібриногену, як і E₁, E₂-фрагменти фібрину в складі DDE-комплексу, стимулює активацію Glu-плазміногену тканинним активатором. С-кінцеві залишки лізину Aα- і γ-ланцюгів E-фрагменту зв'язують крингл 2 тканинного активатора, тоді як N-кінцевий фрагмент Aα 1-24 і С-кінцева ділянка Bβ 120–122 відповідають за зв'язування плазміногену.

Встановлено, що взаємодія плазміногену та тканинного активатора з D-доменами фібриногену/фібрину та наступна активація проензиму з утворенням плазміну вимагає кальцій-опосередкованих структурних перебудов та ковалентної стабілізації γ-субдоменів периферичних доменів фібрину. Встановлено що в периферичних доменах фібрину існують окремі центри зв'язування для крингла 1-3 та крингла 5 молекули плазміногену. Вперше показано, що Glu-плазміноген взаємодіє з окремими поліпептидними ланцюгами D- та DD-фрагментів фібриногену/фібрину, що свідчить про наявність в них потенційних центрів взаємодії з проензимом поза відомою ділянкою Aα 148-160.

В даному дослідженні продемонстрована роль структурних перебудов в молекулі фібриногену/фібрину в процесі полімеризації, а також змін в цих молекулах під час фрагментації плазміном, в експонуванні або утворенні нових центрів взаємодії з плазміногеном та тканинним активатором, що призводить до активації плазміногену.

З використанням одержаних даних розроблено новий ефективний та швидкий у виконанні спосіб визначення активності тканинного активатора плазміногену в біологічному матеріалі з використанням DD-фрагмента фібрину як стабільного ефективного стимулятора реакції активації плазміногену в присутності EGTA.

Ключові слова: плазміноген/плазмін, тканинний активатор, продукти деградації фібриногену/фібрину, фібриноліз.

ABSTRACT

Yatsenko T.A. Molecular mechanisms of fibrinolysis regulation by fibrinogen/fibrin fragments. – Manuscript.

Thesis for PhD`s degree by speciality 03.00.04 – Biochemistry. – Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2018.

The thesis highlights investigation of molecular mechanisms of fibrinolytic process initiation and regulation, in which fibrinogen/fibrin fragments and certain parts of the molecules are involved.

The study demonstrates that early fibrinogen fragment E_e binds plasminogen and tissue-type plasminogen activator and stimulate proenzyme activation process. Availability of C-terminal lysine remnants of α -, β - and γ -chains and 16 or 24 N-terminal amino acids of this fragment is a necessary condition of the process. As was shown plasminogen activation require multiple site plasminogen interaction with early fibrinogen fragment E for the initiation of the process. Late fibrinogen fragment E₁ loses its stimulation ability, but still binding plasminogen and its activator. Fibrinogen fragment D does not interact with plasminogen and tissue-type activator because of closed state of plasminogen-binding sites in end-point fibrinogen degradation product fragment D.

Fibrin plasmic hydrolysis products can stimulate plasminogen activation by tissue-type plasminogen activator, except of end-point degradation product E₃. Activation reaction rate in the presence of high molecular weight DDE-containing fibrin degradation products and DDE-complexes is close to the activation rate on polymeric fibrin. Stimulation effect of fibrin fragment DD appears without E-domain. Fragment E₁,E₂ mixture demonstrates high stimulation ability, what indicates of plasminogen- and tissue-type activator-binding sites in the fragments.

High molecular weight DDE-containing fibrin degradation products and DDE-complexes decrease fibrin clot lysis rate competing with fibrin for the enzyme, while fragment DD does not affect the lysis rate. The data indicates that plasminogen- and activator-binding sites on these molecules are identical with fibrin. At the same time any of fibrin degradation products, except of molecular weight DDE-containing fragments, do not affect plasmin inhibition by blood plasma α_2 -antiplasmin.

Thus, possible involvement of fibrinogen/fibrin degradation products from clot microenvironment into fibrinolysis activation and regulation.

Investigation of Glu-plasminogen activation by tissue-type activator on D-domain containing fibrinogen/fibrin fragments have shown stimulation ability intensification caused by calcium chelation from the fragments. At the same time, increasing of calcium ion concentration in activation reaction medium with EDTA-treated D- and DD-fragments of

fibrinogen and fibrin results in dose-dependent activation rate decreasing. The results indicate that calcium-dependent structural changes in peripheral fibrinogen/fibrin domains are related to plasminogen activation sites exposition in this domains.

As it was demonstrated, stimulation effect of covalently cross-linked fibrinogen fragment DD on Glu-plasminogen activation by tissue-type activator is equal to the effect of chelator-treated fibrin fragment DD. The effect confirms the crucial role of $\gamma\gamma$ -chains cross-linkage in plasminogen system activation process.

The result of investigation of plasminogen and its fragments interactions with D-domain containing fibrinogen/fibrin fragments indicates localization of binding sites for plasminogen fragments K 1-3 and K 5 in D-domain. The kringle fragments partially compete for binding with fibrin fragment DD, but do not displace each other. Thus the sites are separate, furthermore they are not related to C-terminal lysines. For the first time plasminogen ability to interact with all D- and DD-fragments chains was demonstrated. K 1 3 also binds to α -, β - and $\gamma\gamma$ -chains of fibrin DD-fragment, whether K 5 only to α and $\gamma\gamma$. On the base of the data it is concluded that different kringle domains of plasminogen can be involved into plasmin proenzyme interaction with fibrin D-domains and interaction sites in D-domain are located also out of well-known plasminogen-binding sequence A α 148-160.

The results confer the requirement of fibrinogen/fibrin D-domains structural changes, related to β - and γ -subdomains calcium-binding sites reorganization and γ -chains covalent cross-linking during fibrin polymerization, for the fibrinolytic process initiation. The study demonstrates the multisite interaction between plasminogen and fibrin D-domains and establishes the pathways of fibrinogen/fibrin degradation products involvement into fibrinolytic process regulation.

Using obtained data, we have developed new quantitative method for the evaluation of tissue-type activator activity in blood plasma samples. The approach utilizes fibrin fragment DD as stabile stimulator of plasminogen activation reaction in the presence of calcium-chelating agent EGTA. The method is highly sensitive, cost-saving, simple and fast in performing and can be used in wide clinical practice for assessment of the functionally active tissue-type plasminogen activator in blood plasma at the range of cardiovascular diseases. The developed method was patented.

Key words: plasminogen, tissue-type plasminogen activator, fibrinolysis, fibrinogen/fibrin degradation products.

АННОТАЦИЯ

Яценко Т.А. Молекулярные механизмы регуляции фибринолиза при участии фрагментов фибриногена/фибрина. – Рукопись.

Диссертация на соискание степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04 – биохимия. – Институт биохимии им. А.В. Палладина НАН Украины. – 2018 г.

Диссертационная работа посвящена исследованию молекулярных механизмов регуляции активности фибринолитической системы продуктами деградации плазмином фибриногена и фибрина. Установлено, что продукты деградации фибриногена и фибрина влияют на различные стадии фибринолитического процесса: DDE-комплекс, DD-фрагмент фибрина и E_p-фрагмент фибриногена стимулируют активацию плазминогена тканевым активатором; высокомолекулярные продукты гидролиза

фибрина и DDE-комплекс замедляют гидролиз фибрина плазмином. Протекторное действие при инактивации плазмينا α_2 -антиплазмином проявляют только высокомолекулярные фрагменты. Сделано вывод, что продукты гидролиза, которые образуются во время лизиса фибринового сгустка, замедляют его растворение, связывая компоненты фибринолитической системы и устрояя их из микроокружения сгустка, по механизму отрицательной обратной связи.

Впервые показано, что E_p-фрагмент фибриногена, как и E₁,E₂-фрагменты фибрина в составе DDE-комплекса, стимулирует активацию Glu-плазминогена тканевым активатором. С-концевые остатки лизина A α - и γ -цепей E-фрагментов связывают крингл 2 тканевого активатора, тогда N-концевой фрагмент A α 1-24 и С-концевой участок B β 120–122 отвечают за связывание плазминогена.

Установлено, что взаимодействие плазминогена и тканевого активатора с D-доменами фибриногена/фибрина и последующая активация проэнзима с образованием плазмينا требует кальций-опосредованных структурных изменений и ковалентной стабилизации γ -субдоменов периферических доменов фибрина. Установлено, что в D-доменах фибрина существуют отдельные центры связывания для кринглов 1-3 и крингла 5 молекулы плазминогена. Впервые показано, что Glu-плазминоген взаимодействует с отдельными полипептидными цепями D- и DD-фрагментов фибриногена/фибрина, что свидетельствует о наличии потенциальных центров взаимодействия с проэнзимом вне известного участка A α 148-160.

В данном исследовании продемонстрирована роль структурных перестроек в молекуле фибриногена/фибрина, которые происходят в процессе полимеризации, а также преобразования этих молекул в процессе гидролиза плазмином, в экспонировании ранее закрытых или образовании новых центров взаимодействия с плазминогеном и тканевым активатором, что в конечном счете приводит к активации плазминогена.

С использованием полученных данных разработано новый эффективный и быстрый в выполнении способ определения активности тканевого активатора плазминогена в биологическом материале с использованием DD-фрагмента фибрина как стабильного стимулятора реакции активации плазминогена в присутствии EGTA.

Ключевые слова: плазминоген/плазмин, тканевой активатор, продукты деградации фибриногена/фибрина, фибринолиз.