

Національна академія наук України
Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

Грабовський Олексій Олегович

УДК 577.112.083; 577.151.45

ДИСЕРТАЦІЯ
“СТРУКТУРА, ФУНКЦІЇ ТА МОЛЕКУЛЯРНІ МЕХАНІЗМИ ІНГІБУВАННЯ
АКТИВНИХ САЙТІВ КЛЮЧОВИХ ПРОТЕЇНІВ ГЕМОСТАЗУ”

091 – Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

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

Науковий керівник: **Чернишенко Володимир Олександрович**, доктор
біологічних наук

Київ - 2023

АНОТАЦІЯ

Грабовський О.О. Структура, функції та молекулярні механізми інгібування активних сайтів ключових протеїнів гемостазу. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – Біологія. – Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ, 2023.

Гемостатична система - це комплекс судинних, тромбоцитарних і гуморальних компонентів плазми крові, які забезпечують швидке припинення кровотечі при ушкодженні судин. В разі порушення регуляторних механізмів гемостазу виникає надмірна продукція тромбіну, що може призвести до утворення внутрішньосудинних тромбів і спричинити тромботичні ускладнення.

Тому вивчення молекулярних механізмів тромбоутворення є важливим завданням біохімії, а пошук шляхів ефективного запобігання утворенню тромбу в судині – важливе питання сучасної медицини та біохімії. Зважаючи на це, створення нових лікарських препаратів, направлених на попередження тромбоутворення, є доволі актуальним на сьогоднішній день. Існує кілька стратегій пошуку таких препаратів.

Найперспективнішим та унікальним напрямком, започаткованим у Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, є інгібування полімеризації фібрину як на стадії формування протофібрил, так і на стадії їхньої латеральної асоціації. Розуміння механізмів міжмолекулярних взаємодій молекул фібрину та пошук нових сайтів полімеризації може стати запорукою створення нових активних і селективних низькомолекулярних інгібіторів та синтетичних пептидів. Застосування методів молекулярного моделювання, таких як: моделювання структур протеїнів та молекулярна динаміка, разом з методами

класичної біохімії можуть розширити знання про механізми полімеризації фібрину.

Друга стратегія – класична – полягає в розробці інгібіторів активованих факторів зсідання крові, основною функцією яких є участь в ензиматичних реакціях коагуляційного каскаду. В фармацевтичній галузі пошук інгібіторів проводять за допомогою як високопродуктивного, так і віртуального скринінгу. Швидкість, дешевизна, можливість пояснити механізм дії сполук робить останню технологію все більш популярною. Основними і найбільш точними методами віртуального скринінгу є молекулярний докінг та пошук за подібністю. Їхнє застосування дозволяє проаналізувати мільйонні бібліотеки органічних сполук і відібрати декілька сотень для перевірки їх активності *in vitro*. Ключовою мішенню застосування таких інгібіторів є фактор Ха, який у активній формі безпосередньо активує протромбін.

Попри те, що головною функцією протеїнів системи гемостазу є зупинка кровотечі та підтримка крові в рідкому стані, все більше даних ілюструє факт їхнього залучення в інші як фізіологічні, так і патологічні процеси. До таких поліфункціональних протеїнів належить, зокрема, активатор плазміногену урокіназного типу, який залучений не тільки в процес фібринолізу, а й бере участь в імунній відповіді (вродженій і набутій), сперматогенезі, ангіогенезі та рості пухлин. Відповідно, розробка молекул, здатних інгібувати активність урокінази, становить значний інтерес.

Отже, представлену дисертаційну роботу було присвячено дослідженню структури, функцій та способів інгібування сайтів міжмолекулярних взаємодій таких ключових сайтів мішеней: центрів полімеризації фібриногену, активного центру фактора Ха та урокінази. Робота включала в себе комплекс заходів, спрямованих на ідентифікацію сайтів міжмолекулярних взаємодій, молекулярний докінг та динаміку, перевірку *in vitro* та *in vivo*.

Для досягнення поставлених цілей методами хроматографії, що розділяє за розміром, турбідиметрії та електронної мікроскопії вивчено комплексоутворення фібрину з продуктами гідролізу фібрин(оген)у, ефекти поліпептидів (структурних аналогів суперспірального регіону молекули фібрину), а також низькомолекулярних сполук калікс[4]аренового ряду на процес полімеризації фібрину. З використанням підходів *in silico* створено просторові моделі таких взаємодій, спрогнозовано оптимальні конформації молекул та структури ефекторів, верифіковано експериментальні дані.

Методами ензиматичного аналізу, коагулометрії та агрегатометрії вивчено інгібіторну дію низькомолекулярних сполук з бібліотеки, створеної *in silico*, на активність фактора Ха *in vitro*. Крім того, апробовано обрані сполуки-інгібітори *in vivo* за умов внутрішньовенного введення щурам.

Методами ензиматичного аналізу та з використанням підходів клітинної біології досліджували дію низькомолекулярних сполук з бібліотеки, створеної *in silico*, на активність урокінази. Перевіряли обрані сполуки на моделі проліферації клітин у культурі.

Проведено дослідження формування потрійного комплексу методом гель-проникної хроматографії у різних системах: у системі “фібрин desAB, D-димер, D-region”, у системі “фібрин desAB, D-димер, D-region у присутності пептиду GHRP”, а також у системі “фібрин desAB, D-димер, D-region у системі за присутності фрагменту B β 1-42”. Показано, що за присутності пептиду GHRP, що конкурує з центром полімеризації «B» за центри полімеризації «b», які розташовано у D-регіонах, потрійний комплекс не формується. В той самий час у суміші desAB, D-димеру та D-фрагменту за присутності фрагменту B β 1-42 потрійний комплекс формується, що вказує на необхідність залучення лише «B»-«b» центрів полімеризації фібрину. Результати турбідиметричних досліджень узгоджуються з даними по комплексоутворенню і доводять, що D-фрагмент посилює інгібіторний ефект D-димеру, і, таким чином, разом ці

фрагменти проявляють адитивний ефект, що, у свою чергу, підтверджує включення третього D-регіону в DD-E-тріаду. За допомогою електронної мікроскопії було показано, що фібрили полімерного фібрину не зазнають помітних змін за умов формування у присутності D-димеру, оскільки спорідненість останнього до мономерного фібрину менша, ніж між молекулами самого мономерного фібрину. В результаті, попри меншу швидкість фібриноутворення, згусток формується все ж із протофібрил та фібрил фібрину без включення D-димеру – тобто після того, як D-димер витісняється зі структури молекулами фібрину. Проте, за присутності D-димеру та D-фрагменту формуються «дефектні» протофібрили, а з них – фібрили, які є загалом тоншими; спостерігається інтенсивне галуження тонких фібринових ниток. Вочевидь, така порушена структура і призводить до зростання кінцевої мутності згустку фібрину за присутності еквімолярної суміші D-димера та D-фрагмента. Методами комп'ютерного моделювання було побудовані теоретичні моделі потрібного комплексу і галуження протофібрил за рахунок включення третього D-регіону в DD-E-тріаду.

Для дослідження міжмолекулярної взаємодії ряду сполук калікс[4]аренового ряду з молекулою фібрину було побудовано відсутні ділянки кристалографічної структури фібриногену (PDB ID:3GHG), а власне ділянку α -ланцюга 17-26, до якої входить центр полімеризації «А», що є сайтом зв'язування калікс[4]аренів. Побудовано 3D-структури калікс[4]аренів з різною кількістю залишків бісфосфонової кислоти та проведено послідовно молекулярний докінг і молекулярну динаміку. Показано формування водневих зв'язків і сольових містків між позитивнозарядженими амінокислотними залишками $\text{A}\alpha$ -ланцюга фібрину та бісфосфоновими залишками калікс[4]аренів, причому при зменшенні кількості з трьох до двох залишків міцність комплексу значно зменшується. Це було підтверджено в експериментах з розрахунку абсолютної вільної енергії зв'язування.

Для дослідження взаємодії пептидів, що імітують послідовності суперспіральної ділянки молекули фібрину, з молекулою фібрину використано турбідиметричний метод і показано інгібуючий вплив пептидів на полімеризацію фібрину. Для встановлення міжмолекулярних взаємодій між ними отримано ряд конформацій пептидів. Структури пептидів A α 91-103 MEILRGDFSSANN, B β 125-135 QKRQKQVKDN та γ 69-77 NPDESSKPN отримано за допомогою молекулярної динаміки і кластеризації з використанням Dihedral Principal Component Analysis. Встановлено два потенційні сайти взаємодії, що розміщені в суперспіральній ділянці молекули фібрину, і проведено докінг пептидів в один з сайтів.

Створено фінальну фокусну бібліотеку низькомолекулярних сполук – інгібіторів фактора Ха. Проведено *in vitro* біологічний скринінг низькомолекулярних сполук потенційних інгібіторів фактора Ха. Показано, що у збагаченій тромбоцитами плазмі крові людини інгібітори фактора Ха концентраційно залежно ефективно інгібують агрегацію тромбоцитів та затримують фібриноутворення. Виявлені закономірності свідчать про ефективне гальмування генерації тромбіну внаслідок прямого інгібування фактора Ха. Вибрано сполуки з вираженою інгібіторною активністю щодо фактора Ха для перевірки їх дії *in vivo*. На моделях *in vivo* продемонстровано інгібіторний ефект досліджуваних низькомолекулярних сполук, про що свідчить відсутність процесу агрегації тромбоцитів та процесу фібриноутворення.

З використанням молекулярного докінгу та молекулярної динаміки проведено пошук низькомолекулярних сполук, які є ефективними інгібіторами урокіназного активатора плазміногену. Інгібітор, що мав найвищу афінність до активного центру ензиму (IC₅₀ = 2,5 μ M), також ефективно пригнічував проліферацію пухлинних клітин у культурі (IC₅₀ = 24.5 μ M). Дана сполука може бути використана як основа для подальшого раціонального дизайну з метою підвищення її специфічності та селективності. Отже, запропоновані

сполуки є потенційними неімуногенними та ефективними засобами з антитромботичною та антиметастатичною дією відповідно. Подальше дослідження створених сполук є перспективним для розробки терапевтичних препаратів.

Проведені дослідження є вагомим кроком на шляху до розуміння тонких молекулярних механізмів формування протофібрил фібрину, фібрил та формування тривимірної сітки фібрину – основи тромбу. Створені у рамках виконання роботи молекулярні ефектори (пептиди, калікс[4]арени, низькомолекулярні інгібітори ензимів) можуть розглядатися як основа для створення антитромботичних та антиметастатичних препаратів.

Ключові слова: протеїни, фібрин(оген), калікс[4]арен, ензими, урокіназа, гемостаз, тромбоцити, молекулярна динаміка, молекулярний докінг, комп'ютерне моделювання, молекулярна структура, віртуальний скринінг, інгібітор, серинові протеїнази, пухлини.

Список публікацій здобувача

Праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

СТАТТІ

1. **Hrabovskyi, O.**; Syrko, M. Detection of ternary complex of fibrin desAB with D-dimer and D-fragment of fibrin. *Biotechnologia Acta* 2023, 16 (2), 21-23. <https://doi.org/10.15407/biotech16.02.021>.
2. **Hrabovskyi, O.**; Chernyshenko, V.; Stohnii, Y.; Kucheriavyi, Y.; Korolova, D.; Komisarenko, S.; Platonova, T. Alternative role of B:b knob-hole interactions in the fibrin assembly. *Biochemistry* (In press)
3. Kucheriavyi, Y.; **Hrabovskyi, O.**; Rebriev, A. V.; Stohnii, Y. Limited proteolysis of fibrinogen α C-region reveals its structure. *Biotechnologia Acta* 2022, 15 (2), 60. <https://doi.org/10.15407/biotech15.02.060>.

4. Ahishev, D.; **Hrabovskyi, O.** Synthesis of calix[4]arenes with fixed conformation as potential inhibitors of fibrin polymerization. *Biotechnologia Acta* 2023, 16 (2), 7-10. <https://doi.org/10.15407/biotech16.02.007>.
5. Pyrogoва, L.; Makogonenko, Y.; **Hrabovskyi, O.**; Marunych, R.; Bereznyskyj, G.; Gogolinskaya, G. Chlorine-binding structures: role and organization in different proteins. *Ukr. Biochem. J.* 2021. <https://doi.org/10.15407/ubj93.04.005>.
6. Marunych, R.; Gornyska, O.; Gudzenko, A.; Salnyk, O.; **Hrabovskyi, O.**; Bereznyskyj, G.; Makogonenko, Y. The role of endothelium in the regulation of the aggregate state of blood under normal conditions, in atherosclerosis and arterial hypertension. *Fiziol. Zh.* 2021, 67(3), 87-99. <https://doi.org/10.15407/fz67.03.087>.
7. Horak, I.; Prylutska, S.; Krysiuk, I.; Luhovskyi, S.; **Hrabovskyi, O.**; Tverdokhleba, N.; Franskevych, D.; Rumiantsev, D.; Senenko, A.; Evstigneev, M. et al. Nanocomplex of Berberine with C60 Fullerene Is a Potent Suppressor of Lewis Lung Carcinoma Cells Invasion In Vitro and Metastatic Activity In Vivo. *Materials* 2021, 14, 6114. <https://doi.org/10.3390/ma14206114>.
8. Vidovic, T.; Dakhovnik, A.; **Hrabovskyi, O.**; MacArthur, M.R.; Ewald, C.Y. AI-Predicted mTOR Inhibitor Reduces Cancer Cell Proliferation and Extends the Lifespan of *C. elegans*. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 7850. <https://doi.org/10.3390/ijms24097850>.

ПАТЕНТИ

1. Патент на винахід. Комісаренко С.В., Чернишенко В.О., Макогоненко С.М., Пирогова Л.В., Луговська Н.Е., Горницька О.В., **Грабовський О.О.** Спосіб інгібування полімеризації фібрину синтетичними пептидами, які імітують фрагменти суперспіральної ділянки фібрин(оген)у. №143853. Заявка u202002124. від 30.03.2020. Опубл. 29.12.2020.
2. Міжнародна патентна заявка – WO2021201813 – Komisarenko S., Chernyshenko V., Makogonenko Y., Pyrogoва L., Lugovska N., Hornyska O., **Hrabovskyi O.** The method of inhibiting of the fibrin polymerization

https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2021201813&_cid=P22-L4D7V6-70729-1

ТЕЗИ

1. Bekala, M. I.; Markhaychuk, V. J.; Horak, I. R.; Krysiuk, I. P.; Skaterna, T. D.; Grebinyk, A. G.; Gudkova, O. O.; Latyshko, N. V.; Kishko, T. O.; **Hrabovskyi, O. O.**; Prylutska, S. V. Nanocomplex of berberine with C60 fullerene effectively decreases proliferation, motility, and metastasis of lung cancer cell. Матеріали конференції-конкурсу “Актуальні проблеми біохімії та біотехнології” – Kyiv, 2021, 24.
2. Didkivskyi, V. A.; **Hrabovskyi, O. O.**; Humenyuk, A. S.; Selikhova, A. I.; Banya, M. O.; Cherenok, S. O.; Chernyshenko, V. O. Binding of calix[4]arene to the α -knob of fibrin: in silico proves in vitro. Clusters and Nanostructured Materials (CNM-6). – Uzhhorod, 2020, 48-49.
3. **Hrabovskyi, O.**; Platonov, M. Development of the pharmacophore models for the identification of novel inhibitors of the urokinase plasminogen activator. XVII International Conference of Students and Young Scientists “Shevchenkivska Vesna: Bioscience Advances” - Kyiv, 2019.
4. **Hrabovskyi, O.O.**; Lugovska, N.E.; Kurchenko, T.O.; Chernishov, V.I. Coiled-coil region of fibrin(ogen) as the target of antithrombotic therapy. Students Symposium "Medicine and Science 2022", 2022.

SUMMARY

Hrabovskyi O.O. Structure, functions, and molecular mechanisms of inhibition of the hemostasis' key proteins' active sites. – Qualifying scientific work on manuscript rights.

Dissertation for applying for the Doctor of Philosophy degree in specialty 091 "Biology". – Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine, Kyiv, 2023.

The hemostasis system is a complex of vascular, platelet and humoral components of blood plasma that ensure rapid termination of bleeding in case of vascular damage. In the case of disruption of the regulatory mechanisms of hemostasis, excessive production of thrombin occurs, which can lead to the formation of intravascular clots and cause thrombotic complications.

For this reason, molecular mechanics of thrombus formation is an important biochemical issue; finding ways to efficiently prevent intravascular thrombus formation is a pressing problem of medical science. Creating new drugs to stave off thrombus formation is a fairly urgent task, and the search for them follows several strategies.

An unequalled, and currently the most promising, avenue to tackle this problem which was initiated in Palladin Institute of biochemistry of the NAS of Ukraine is to inhibit fibrin polymerization during the protofibril formation or during their lateral association. Understanding the mechanisms of intermolecular interactions of the fibrin molecules and discovering new polymerization sites can become a basis for developing novel active and selective low-molecular weight inhibitors and synthetic peptides. Such techniques as molecular modeling and molecular dynamics combined with the classical biochemical approaches can significantly enlarge our knowledge of fibrin polymerization.

Another possible strategy (the classical one) is to develop inhibitors of the activated blood clotting factors involved mostly in the enzymatic reactions of the coagulation cascade. In the pharmaceutical industry, inhibitors are sought using either the high-throughput or the virtual screening. The latter one is growing more popular

because it is fast and cheap and allows explaining the substances' action mechanisms. Virtual screening's main and most precise methods are molecular docking and similarity search. They allow analyzing databases containing millions of organic compounds and narrowing down the pool to be tested *in vitro* to a few hundreds. Factor Xa, which in its active form directly activates prothrombin, is a promising target for the search for inhibitors.

There are ever more findings to the effect that besides mostly being employed in stopping hemorrhages and keeping the blood liquid, the hemostasis proteins are also involved in other processes both physiological and pathological. One such multifunctional protein is the urokinase-type plasminogen activator. It is involved in the immunity (innate and adaptive), spermatogenesis, angiogenesis, and tumor growth. This is why, the development of molecules capable of inhibiting urokinase activity is of considerable interest.

The present thesis was dedicated to the structure, functions, and ways to inhibit sites of intermolecular interactions of the following protein targets: fibrinogen polymerization sites, active centers of the factor Xa and urokinase. The work included a number of approaches aimed at identifying sites of intermolecular interactions, molecular docking and dynamics, and testing *in vitro* and *in vivo*.

Size-exclusion chromatography, turbidity study, and electron microscopy were used to estimate formation of fibrin's complexes with fibrin(ogen) hydrolysis products and effects of polypeptides (structural analogues of the fibrin's hinge region) and low-molecular calix[4]arenes on the fibrin polymerization. Using *in silico* methods, spatial models of such interactions were created, optimal conformations of molecules and structures of effectors were predicted, and experimental data were verified.

Methods of enzymatic analysis, coagulometry, and aggregatometry were used to study the inhibitory effects of the low-molecular compounds from the *in silico* library on the activity of factor Xa *in vitro*. We also tested selected inhibitory compounds in rats by intravenous injection.

Methods of enzymatic analysis and methods of cell biology were used to study how the low-molecular compounds from the *in silico* library influenced the urokinase activity. Selected compounds were tested using a model of cell proliferation in culture.

We studied the formation of the ternary complex using the size-exclusion chromatography in different systems: 1) fibrin desAB, D dimer, D-fragment 2) fibrin desAB, D dimer, D-fragment in the presence of GHRP peptide; 3) fibrin desAB, D dimer, D-fragment in the system in the presence of the B β 1-42 fragment.

In the presence of the GHRP peptide which competes with the “B”-knobs for the “b”-holes in D-regions, the ternary complex is not formed. However, it is formed in a mixture of fibrin desAB, D dimer, and D fragment in the presence of B β 1-42 fragment; this implies that only the “B”-“b” knob-hole interactions need to be involved. Data of turbidity study agree with the data on complex formation and prove that the D fragment enhances the inhibitory effect of the DD fragment and that the two fragments have an additive effect; this finding supports the inclusion of the third D region in the DDE complex. Electron microscopy was employed to show that fibrils of polymeric fibrin do not undergo noticeable change if formed in the presence of D dimer as D dimer’s affinity to monomeric fibrin is lesser than the affinity between the monomeric fibrin molecules. As a result, despite a lesser rate of fibrin production, the clot is still made up from protofibrils and fibrils of fibrin without including D dimer (that is, after D dimer is forced out of the structure by the fibrin molecules). However, in the presence of DD and D fragments the protofibrils are “defective”, and the fibrils they form are generally thinner; the thin fibrin threads are frequently branched. Obviously, such a disrupted structure is the reason for the increasing final opacity of the fibrin clot in the presence of the equimolar mixture of DD and D-fragments. Moreover, theoretical models of the ternary complex and branching of protofibrils due to the inclusion of the third D-region in the DD-E-triad were constructed by computer modelling.

To study the interaction of a number of calix[4]arene derivatives with fibrin, we modelled the crystallographic structure of fibrinogen with the absent parts (PDB

ID:3GHG): the 17-26 fragment of the α chain which includes the “A-knob”, a calix[4]arene-binding site. We built 3D-structures of calix[4]arenes with different numbers of bisphosphonic residues and performed the docking and the molecular dynamics. The formation of hydrogen bonds and salt bridges between the positively charged amino acid residues of the A α -chain of fibrin and the bisphosphonate residues of calix[4]arenes was shown, and the strength of the complex decreases significantly when the number of functional groups decreases from three to two. This was confirmed in experiments of calculating the absolute free binding energy.

The turbidimetry was used to study the interaction of peptides that mimic the sequences of the fibrin’s coiled-coil region with the fibrin molecule and it was shown the inhibitory effect of peptides on fibrin polymerisation. A number of peptide conformations were obtained to determine the intermolecular interactions between them. The structures of the peptides A α 91-103 MEILRGDFSSANN, B β 125-135 QKRQKQVKDN and γ 69-77 NPDESSKPN were obtained by molecular dynamics with subsequent clustering using Dihedral Principal Component Analysis. Two potential interaction sites located in the coiled-coil region of the fibrin molecule were identified, and peptides were docked into one of those sites.

There was created a final target library of low-molecular compounds inhibiting factor Xa. Potential inhibitors of factor Xa were screened *in vitro*. In the platelet-rich human plasma, factor Xa inhibitors inhibit platelet aggregation and slow down fibrin formation in a dose-dependent manner. The patterns suggest efficient slowing down of thrombin generation due to direct inhibition of factor Xa. Compounds with pronounced inhibitory activity towards factor Xa were selected to test *in vivo*. In the *in vivo* models, the inhibitory effect of the studied low-molecular compounds was confirmed, as there was observed neither platelet aggregation nor fibrin formation.

Using molecular docking and molecular dynamics, we performed virtual screening of small molecule compounds that could be effective inhibitors of urokinase plasminogen activator. The inhibitor with the highest affinity for the active site of the enzyme ($IC_{50} = 2.5 \mu M$) also effectively inhibited the proliferation of tumor cells in culture ($IC_{50} = 24.5 \mu M$). This compound can be used as a basis for

further rational design to improve its specificity and selectivity. Thus, the proposed compounds are potential non-immunogenic and effective agents with antithrombotic and antimetastatic effects, respectively. Further study of the compounds is promising for the development of therapeutic drugs.

The research is a solid contribution towards understanding molecular mechanisms of the formation of fibrin protofibrils, fibrils, and three-dimensional network which is the basis of a clot. The created molecular effectors (peptides, calix[4]arenes, low-molecular inhibitors of enzymes) can be viewed as a platform to create antithrombotic and anti-tumour drugs.

Keywords: proteins, fibrin(ogen), calix[4]arene, enzymes, urokinase, hemostasis, platelets, molecular dynamics, molecular docking, computer simulation, molecular structure, virtual screening, inhibitor, serine proteinases, cancer.

List of the candidate's publications

Works publishing the main scientific results of the dissertation:

ARTICLES

1. **Hrabovskyi, O.**; Syrko, M. Detection of ternary complex of fibrin desAB with D-dimer and D-fragment of fibrin. *Biotechnologia Acta* 2023, 16 (2), 21-23. <https://doi.org/10.15407/biotech16.02.021>.
2. **Hrabovskyi, O.**; Chernyshenko, V.; Stohnii, Y.; Kucheriavyyi, Y.; Korolova, D.; Komisarenko, S.; Platonova, T. Alternative role of B:b knob-hole interactions in the fibrin assembly. *Biochemistry* (In press)
3. Kucheriavyyi, Y.; **Hrabovskyi, O.**; Rebriev, A. V.; Stohnii, Y. Limited proteolysis of fibrinogen α C-region reveals its structure. *Biotechnologia Acta* 2022, 15 (2), 60. <https://doi.org/10.15407/biotech15.02.060>.
4. Ahishev, D.; **Hrabovskyi, O.** Synthesis of calix[4]arenes with fixed conformation as potential inhibitors of fibrin polymerization. *Biotechnologia Acta* 2023, 16 (2), 7-10. <https://doi.org/10.15407/biotech16.02.007>.

5. Pyrogorova, L.; Makogonenko, Y.; **Hrabovskyi, O.**; Marunych, R.; Bereznyskyj, G.; Gogolinskaya, G. Chlorine-binding structures: role and organization in different proteins. Ukr. Biochem. J. 2021. <https://doi.org/10.15407/ubj93.04.005>.
6. Marunych, R.; Gornytska, O.; Gudzenko, A.; Salnyk, O.; **Hrabovskyi, O.**; Bereznyskyj, G.; Makogonenko, Y. The role of endothelium in the regulation of the aggregate state of blood under normal conditions, in atherosclerosis and arterial hypertension. Fiziol. Zh. 2021, 67(3), 87-99. <https://doi.org/10.15407/fz67.03.087>.
7. Horak, I.; Prylutska, S.; Krysiuk, I.; Luhovskyi, S.; **Hrabovsky, O.**; Tverdokhle, N.; Franskevych, D.; Rumiantsev, D.; Senenko, A.; Evstigneev, M. et al. Nanocomplex of Berberine with C60 Fullerene Is a Potent Suppressor of Lewis Lung Carcinoma Cells Invasion In Vitro and Metastatic Activity In Vivo. Materials 2021, 14, 6114. <https://doi.org/10.3390/ma14206114>.
8. Vidovic, T.; Dakhovnik, A.; **Hrabovskyi, O.**; MacArthur, M.R.; Ewald, C.Y. AI-Predicted mTOR Inhibitor Reduces Cancer Cell Proliferation and Extends the Lifespan of C. elegans. Int. J. Mol. Sci. 2023, 24, 7850. <https://doi.org/10.3390/ijms24097850>.

PATENTS

1. Patent of the invention. Komisarenko S., Chernyshenko V., Makogonenko Y., Pyrogorova L., Lugovska N., Hornytska O., **Hrabovskyi O.** Спосіб інгібування полімеризації фібрину синтетичними пептидами, які імітують фрагменти суперспіральної ділянки фібрин(оген)у. №143853. Заявка u202002124. від 30.03.2020. Опубл. 29.12.2020.
2. International PCT-application – WO2021201813 – Komisarenko S., Chernyshenko V., Makogonenko Y., Pyrogorova L., Lugovska N., Hornytska O., **Hrabovskyi O.** The method of inhibiting of the fibrin polymerization https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2021201813&_cid=P22-L4D7V6-70729-1

CONFERENCE PAPERS

1. Bekala, M. I.; Markhaychuk, V. J.; Horak, I. R.; Krysiuk, I. P.; Skaterna, T. D.; Grebinyk, A. G.; Gudkova, O. O.; Latyshko, N. V.; Kishko, T. O.; **Hrabovskyi, O.**

O.; Prylutska, S. V. Nanocomplex of berberine with C60 fullerene effectively decreases proliferation, motility, and metastasis of lung cancer cell. Матеріали конференції-конкурсу “Актуальні проблеми біохімії та біотехнології” – Kyiv, 2021, 24.

2. Didkivskyi, V. A.; **Hrabovskyi, O. O.**; Humenyuk, A. S.; Selikhova, A. I.; Banya, M. O.; Cherenok, S. O.; Chernyshenko, V. O. Binding of calix[4]arene to the α -knob of fibrin: in silico proves in vitro. Clusters and Nanostructured Materials (CNM-6). – Uzhhorod, 2020, 48-49.

3. **Hrabovskyi, O.**; Platonov, M. Development of the pharmacophore models for the identification of novel inhibitors of the urokinase plasminogen activator. XVII International Conference of Students and Young Scientists “Shevchenkivska Vesna: Bioscience Advances” - Kyiv, 2019.

4. **Hrabovskyi, O.O.**; Lugovska, N.E.; Kurchenko, T.O.; Chernishov, V.I. Coiled-coil region of fibrin(ogen) as the target of antithrombotic therapy. Students Symposium "Medicine and Science 2022", 2022.

ЗМІСТ

ВСТУП	20
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	24
РОЗДІЛ 1. СИСТЕМА ГЕМОСТАЗУ	24
РОЗДІЛ 2. ПОЛІМЕРИЗАЦІЯ ФІБРИНУ	29
2.1. Структурно-функціональні особливості сайтів полімеризації молекули фібріну	29
2.2. Молекулярні основи полімеризації фібріну	36
РОЗДІЛ 3. ЕНЗИМИ ГЕМОСТАЗУ ТА ЇХ ІНГІБУВАННЯ	40
3.1. Активність фактора Ха та її інгібування	40
3.2. Активатор плазміногену урокіназного типу	43
РОЗДІЛ 4. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	46
4.1 Матеріали	46
4.2 Методи.....	46
4.2.1 Забір крові.....	46
4.2.2. Отримання плазми крові.....	46
4.2.3. Отримання фібриногену	47
4.2.4. Отримання фібріну desAB.....	48
4.2.5. Отримання D-димеру	49
4.2.6. Отримання D-фрагменту фібриногену	49
4.2.7. Вимірювання концентрації протеїнів.....	50
4.2.8. SDS-PAGE.....	50
4.2.9. Турбідиметричні вимірювання	51
4.2.10. Формування комплексів фібріну та його фрагментів	51

4.2.11. Електронна мікроскопія	52
4.2.12. Визначення інгібіторної дії низькомолекулярних сполук на фактор Ха за допомогою хромогенного субстрату.....	52
4.2.13. Отримання збагаченої тромбоцитами плазми крові людини та дослідження процесу агрегації тромбоцитів	53
4.2.14. Активованний частковий тромбопластичний час.....	54
4.2.15. Молекулярний докінг.	54
4.2.16. Повноатомна молекулярна динаміка	55
4.2.17. Крупнозерниста молекулярна динаміка.	57
4.2.18. Підхід Umbrella sampling (US).....	58
4.2.19. МТТ-тест	59
4.2.20. Статистичний аналіз	59
РОЗДІЛ 5. ДОСЛІДЖЕННЯ МІЖМОЛЕКУЛЯРНИХ ВЗАЄМОДІЙ У DDE-ТРИАДИ З ВИКОРИСТАННЯМ D-ДИМЕРУ ТА D-ФРАГМЕНТУ ФІБРИН(ОГЕН)У	60
5.1. Формування міжмолекулярних комплексів фібрину з D-димером та D-фрагментом фібрин(оген)у	60
5.2. Інгібування полімеризації фібрину D-димером та D-фрагментом	64
5.3. Структура полімерів фібрину, утворених за присутності D-димеру та D-фрагменту	66
5.4. Молекулярне моделювання комплексу desAB фібрин – D-димер – D-фрагмент.....	68
5.5. Роль D-фрагменту в галуженні протофібрил фібрину	72
РОЗДІЛ 6. РОЛЬ ШАРНІРНОЇ ОБЛАСТІ ФІБРИН(ОГЕН)У В ПРОЦЕСАХ ФОРМУВАННЯ ТА ЛАТЕРАЛЬНОЇ АСОЦІАЦІЇ ПРОТОФІБРИЛ ФІБРИНУ	76
6.1. Вивчення інгібіторної дії пептидів на полімеризацію фібрину	76

6.2. Молекулярне моделювання.....	80
РОЗДІЛ 7. ВСТАНОВЛЕННЯ МЕХАНІЗМУ ІНГІБІТОРНОЇ ДІЇ СПОЛУК КАЛІКС[4]АРЕНОВОГО РЯДУ НА ПРОЦЕС ПОЛІМЕРИЗАЦІЇ ФІБРИНУ ..	87
7.1. Калікс[4]арени – прямі інгібітори полімеризації фібрину.....	87
7.2. Залежність <i>in vitro</i> ефективності інгібіторної дії калікс[4]аренів від кількості залишків бісфосфонової кислоти	89
7.3. Молекулярний докінг сполук калікс[4]аренового ряду до «А» центру полімеризації фібрину	93
7.4. Молекулярна динаміка комплексів сполук калікс[4]аренового ряду з «А» центром полімеризації фібрину	97
РОЗДІЛ 8. ІНГІБІТОРИ ФАКТОРА Ха	109
8.3. Скринінг низькомолекулярних сполук - потенційних інгібіторів фактора Ха	109
8.2 Дослідження <i>in vitro</i> інгібіторної дії низькомолекулярних сполук на активність Ха та на процес активації тромбоцитів.....	111
8.4. Тестування інгібіторів фактора Ха <i>in vivo</i>	116
РОЗДІЛ 9. ПОШУК НОВИХ ІНГІБІТОРІВ УРОКІНАЗИ	120
10. Заключення	144
Висновки	151
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	152

ВСТУП

Актуальність теми. Гемостаз є динамічною рівноважною системою, належне функціонування якої забезпечує циркуляцію кров в рідкому стані, а за умов ушкодження судини – ефективну зупинку кровотечі. Будь-яке порушення рівноваги у системі гемостазу потребує негайної компенсації для підтримки балансу, який забезпечує нормальне функціонування організму. Неможливість відновлення цього балансу призводить до патологічних станів, у основі яких лежать тромбози (ішемічний інсульт, інфаркт міокарду, тромбоемболія легеневої артерії, тощо) або геморагії (геморагічний інсульт, внутрішні крововиливи, тощо).

Тому актуальним питанням сучасної біохімії та біотехнології є пошук ефекторів, які б ефективно та специфічно змінювали активність окремих компонентів системи гемостазу, запобігаючи розвитку патологічних процесів. До таких ефекторів насамперед належать сполуки з антитромботичною дією: інгібітори факторів каскаду зсідання крові, фібринолітики, інгібітори активації тромбоцитів, тощо.

Такими ефекторами переважно є пептиди чи протеїни, ензими, низькомолекулярні сполуки з гетероциклами. Для того, щоб здійснювати їх пошук максимально ефективно, необхідне чітке розуміння: а) активність якого компоненту системи гемостазу має бути заінгібована; б) з яким саме активним сайтом молекули повинен взаємодіяти ефектор, щоб бути потенційним прототипом терапевтичного агенту.

Для того, щоб задовольнити обидві вимоги, необхідно застосовувати методи структурної біології, поєднуючи експериментальні дані з результатами докінгу та молекулярної динаміки.

Запропонований нами підхід дозволяє експериментально визначити важливі функціонально активні сайти протеїнів компонентів системи зсідання крові, за допомогою докінгу створити бібліотеку сполук їхніх потенційних

ефекторів, провести скринінг дії обраних сполук *in vitro*, провести молекулярну динаміку взаємодії найефективніших сполук з активним сайтом-мішенню.

У ході роботи з використанням описаної стратегії ми вивчали особливості функціонування центрів полімеризації фібрину та пропонували сполуки, здатні їх інгібувати; здійснювали пошук низькомолекулярних сполук, здатних інгібувати активність фактора Ха (ключового ензиму каскаду коагуляції) та урокінази (активатора плазміногену, який також бере участь у процесах клітинної міграції).

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. 0122U002132 «Ідентифікація сайтів міжмолекулярних взаємодій фібрин(оген)у», 2022-2023 рр.; 0119U002512 «Взаємодії компонентів системи гемостазу на клітинному та молекулярному рівні в процесі формування та елімінації тромбу», 2019-2023 рр.; 0115U003650 «Дослідження каліксаренів як кровозберігаючих антифібринолітичних та антитромботичних агентів», 2015-2019 рр.; 0120U102682 «Вивчення нового механізму галуження протофібрил, що відбувається у процесі формування тривимірної сітки фібрину – каркасу тромбу», 2020 р.

Мета і задачі дослідження. Метою роботи було дослідження структури, функцій та способів інгібування сайтів міжмолекулярних взаємодій таких ключових сайтів мішеней: центрів полімеризації фібриногену, активного центру фактора Ха та урокінази.

Відповідно до мети було поставлено такі завдання.

1. Дослідити потенційну участь пари центрів полімеризації фібрину «B:b» у формуванні та галуженні протофібрил.

2. З'ясувати молекулярний механізм інгібування «A»-центрів полімеризації фібрину сполуками калікс[4]аренового ряду.

3. Вивчити структурно-функціональні особливості суперспіральних ділянок молекули фібрину, які забезпечують їхню участь у побудові протофібрил та створити модель взаємодії цих ділянок з пептидами-міметиками.

4. Створити фокусну бібліотеку сполук інгібіторів фактора Ха, обрати найбільш ефективні інгібітори та апробувати їх у системі *in vitro* та *in vivo*.

5. Створити фокусну бібліотеку сполук інгібіторів урокінази, провести віртуальний скринінг інгібіторів та апробувати їх у системі *in vitro* та на культурі пухлинних клітин.

Об'єкт дослідження. Функціонально активні сайти молекули фібрину, активні центри фактора Ха та урокінази, їхні низькомолекулярні або пептидні інгібітори.

Предмет дослідження. Механізми інгубування та міжмолекулярних взаємодій за участю досліджуваних активних сайтів.

Методи дослідження. У роботі використано базові біохімічні та біофізичні методи, зокрема спектрофотометрія, електронна мікроскопія, турбідиметрія, електрофорез протеїнів, хроматографія, тощо; методи клітинної біології та підходи до культивування клітин, агрегатометрія тромбоцитів; методи ензимології, зокрема застосування хромогенних субстратів для визначення активності ензимів; методи комп'ютерного моделювання, докінгу та молекулярної динаміки.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше показано залучення взаємодій центрів полімеризації «В:b» у новому механізмі галуження протофібрил; обґрунтовано інгібіторний ефект сполук калікс[4]аренового ряду на полімеризацію фібрину взаємодіями залишків бісфосфонових кислот з А α -ланцюгом фібрину; встановлено молекулярний механізм участі суперспіральних ділянок молекули фібрину в полімеризації.

Практичне значення одержаних результатів. Спрогнозовано методами комп'ютерного моделювання, створено та охарактеризовано низькомолекулярні сполуки, які є ефективними інгібіторами фактора Ха та урокінази, а отже є потенційними неімуногенними та ефективними засобами з антитромботичною та антипроліферативною дією відповідно.

Особистий внесок здобувача. Здобувачем самостійно проведено аналіз даних літератури за темою дисертації, виконано основний обсяг

експериментальних досліджень, статистичний аналіз одержаних результатів. Здобувач брав участь у всіх дослідженнях *in vitro* та *in vivo*, самостійно виконував усі досліди *in silico*. Мету, завдання і план роботи здобувачем сформульовано разом з науковим керівником д.б.н Чернишенком В.О. Експерименти з культурами клітин проведено у співпраці зі співробітниками відділу сигнальних механізмів клітини під керівництвом проф., д.б.н. Дробот Л.Б.

Апробація результатів дисертації. Результати дисертації були повідомлені та обговорені на вітчизняних та міжнародних конференціях:

1. «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології-2021» – Київ, 26 травня 2021.
2. «Clusters and nanostructured materials (CNM-6)» – Uzhhorod, 5-9 October 2020.
3. XVII International Conference of Students and Young Scientists «Shevchenkivska Vesna: Bioscience Advances» – Kyiv, 23-25 April 2019.
4. Symposium «Medicine and Science 2022», 07 December 2022.
5. «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології-2023» – Київ, 26 травня 2023.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів досліджень з їх обговоренням викладених в 10 розділах, у висновках, списку використаних джерел літератури (134 посилань). Дисертаційна робота викладена на 168 сторінках (з них 128 сторінок основної частини), містить 65 рисунків та 4 таблиці.

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

РОЗДІЛ 1. СИСТЕМА ГЕМОСТАЗУ

Сучасні концепції розглядають гемостаз як складну фізіологічну систему, що охоплює процеси активації тромбоцитів, коагуляційної системи та фібринолізу після репарації пошкодженої судини, а також участь у цих процесах ендотелію судин. Складність системи гемостазу зумовлена різноманітністю та комплексністю взаємопов'язаних реакцій в яких задіяно плазмові та клітинні фактори коагуляції, системи фібринолізу, фізіологічні антикоагулянти тощо. Система гемостазу залучає велику кількість судинних та позасудинних рецепторів, які діють спільно із компонентами крові для збереження реологічних властивостей крові, закриття пошкоджень кровоносних судин та наступного видалення тромбу після відновлення цілісності кровоносного русла. Таким чином, система гемостазу – це біологічна система, яка забезпечує з одного боку, збереження крові в рідкому стані, а з другого – зупинку кровотечі та мінімізує пошкодження судин. Останні дані свідчать, що окрім базових функцій, гемостаз опосередковує периваскулярні механізми. До них можна віднести участь у запальних процесах, відмежування інфекційних джерел, забезпечення оптимальних умов для фагоцитозу, репараційні функції тощо. Гемостатична система є висококонсервативним механізмом, центральним процесом якого виступає коагуляційний каскад [1,2].

На сьогодні існує дві основні моделі, що описують послідовність та механізми взаємодії компонентів системи гемостазу: класична каскадна модель та сучасна клітинноасоційована, або клітинна модель.

Каскадна модель була запропонована у 1964 році. Згідно з цією моделлю виділяють первинний, або судинно-тромбоцитарний, і вторинний, або коагуляційний, гемостаз. Модель має значення лише як відображення процесу зсідання крові *in vitro* і описує послідовні етапи активації коагуляційних факторів, виділяючи зовнішній, внутрішній та загальний шляхи активації процесу коагуляції. Клітинна сучасна модель не протиставляється каскадній

моделі та не заперечує коагуляційні механізми взаємодії факторів та шляхи активації, проте великою мірою модифікує їх, узагальнюючи сучасні уявлення про систему гемостазу [3].

Класична каскадна модель коагуляції виділяє три шляхи активації зсідання крові: зовнішній, внутрішній, а також загальний, в яких беруть участь фактори згортання крові. Згідно з цією моделлю, зовнішній шлях активації ініціюється медіаторами, яких за нормальних умов немає у внутрішньосудинному просторі. Ключовий елемент цієї ланки – тканинний фактор, або тромбопластин, знаходиться в субендотелії і, відповідно, його взаємодія із факторами коагуляції крові можлива лише при пошкодженні судини, коли тромбопластин поступає в кров у вигляді ліпопротеїнових дериватів клітинних мембран. Таким чином, зовнішній шлях активації коагуляції розпочинається при взаємодії тромбопластину із фактором крові VII, результатом якого стає активація останнього та утворення комплексу тканинний фактор/фактор VIIa. Такий комплекс здатний активувати протромбіназу, фактори IX та X, відповідно [4, 5,6].

Активацію коагуляційного каскаду згідно внутрішнього шляху ініціюють компоненти внутрішньосудинного простору, а ініціатором є контактна активація коагуляційного фактору XII, який переходить в активну форму при взаємодії із колагеновими волокнами. Наступні етапи включають каскадну активацію фактору XI та фактору IX зсідання крові. Активація фактора X та наступні процеси утворення тромбіну забезпечуються утворенням комплексу активованих факторів IX та VIII [7].

Загальний шлях активації каскаду зсідання крові об'єднує процеси зовнішнього та внутрішнього шляху, а також включає етапи формування протромбіназного комплексу, утвореного активованими факторами X та V, іонами кальцію та фосфоліпідами. Функцією протромбіназного комплексу є перетворення протромбіну на тромбін за рахунок протеолізу із наступним утворенням фібрину із фібриногену під дією тромбіну [8].

Каскадна модель гемостазу на сьогодні не втратила актуальності, проте необхідність її перегляду в першу чергу обумовлена отриманням нових даних щодо участі клітинних компонентів у процесах згортання крові. Класична модель є більш зручною для розробки та вдосконалення основних методів лабораторної діагностики гемостазу, оскільки показує каскадну взаємодію коагуляційних факторів. Попри те, класична модель не уточнює механізми взаємодій між ланками коагуляції, до прикладу, не пояснює, чому активація фактору X у зовнішньому шляху активації за допомогою комплексу тканинний фактор/фактор VIIa не здатна компенсувати дефіцит факторів VIII та IX. Таким чином, нестача фактору VII не компенсується факторами VIII та IX. Крім того, клітинна модель дозволяє більш точно інтерпретувати патофізіологічні процеси гемостазу [9].

Відповідно до поширеної на сьогодні клітинноасоційованої моделі, локалізацію та активацію факторів коагуляції опосередковано рецепторами та негативно зарядженими фосфоліпідами на поверхні клітин, зокрема тромбоцитів та ендотеліоцитів.

Основоположні дослідження для сучасної моделі були проведені М. Hoffman та D.M. Monroe [10, 11], які показали значення локалізації коагуляційних факторів на поверхні клітин для динаміки утворення фібрину. Ці та подібні дослідження дозволили переглянути класичну каскадну модель.

Відповідно до сучасної моделі, процес коагуляції включає три окремі послідовні стадії: ініціація, під час якої утворюється порівняно невелика кількість активних факторів згортання, ампліфікація, під час якої підвищується рівень активних факторів згортання та фаза пропagaції або поширення, на якій фактори згортання зв'язуються з високопрокоагулянтними мембранами активованих тромбоцитів з наступним утворенням фібринового згустку [12].

Ключовими процесами фази ініціації, яку класично вважають зовнішнім шляхом коагуляції, є утворення комплексу тканинний фактор/активованний фактор VII/ Ca^{2+} , а також активація факторів коагуляції IX та X із наступним утворенням тромбіну. Фаза ініціації розпочинається при пошкодженні

цілісності судини, при якому субендотеліальні клітини, зокрема фібробласти та міоцити гладкої мускулатури потрапляють у кровотік. Тканинний фактор цих клітин виступає ключовим ініціатором каскаду коагуляції, оскільки протеолітично активує фактор VII коагуляції (проконвертин). Комплекс тканинний фактор/активованій фактор VII/ Ca^{2+} розщеплює фактори IX та X з утворенням факторів IXa і Xa, після чого фактор Xa зв'язується з кофактором Va для утворення протромбіназного комплексу на клітинах, що експресують тканинний фактор. За рахунок механізму позитивного зворотного зв'язку активований фактор X сприяє утворенню необхідних кількостей фактору VIIa. Перетворення протромбіну у тромбін опосередковує протромбіназний комплекс, що складається із активованого фактору V, активованого фактору X. Процес, як і більшість реакцій у гемостазі, є кальцій-залежним. Утворений тромбін відіграє ключову роль у процесі ампліфікації коагуляції. Цікаво, що на етапі ініціації коагуляції присутні механізми, що здатні інгібувати вироблення тромбіну. Сукупність таких механізмів називають антикоагулянтною системою. Зокрема, важливу роль у пригніченні утворення тромбіну відіграє TFPI (англ. Tissue factor pathway inhibitor, специфічний інгібітор шляху тканинного фактора) - серинова протеїназа, що здатна зв'язувати активований фактор X із утворенням комплексу TFPI/фактор Xa. Останній інгібує функціонування комплексу тканинний фактор/активованій фактор VII/ Ca^{2+} . Крім того, важливим елементом антикоагулянтної системи є антитромбін III, що здатний інгібувати активований фактор X та тромбін при їх транслокації у кровносна систему.

Враховуючи фізіологічну необхідність системи гемостазу не тільки забезпечувати формування фібринового згустку, але й підтримувати рідкий стан крові, сучасні дослідники пропонують виокремлювати додаткову стадію гемостазу – термінацію. Безумовно, процеси інгібування та припинення утворення тромбоцитарно-фібринового згустку було досліджено та описано як при класичній, так і при сучасній моделях гемостазу, проте, зазвичай не виділено в окрему стадію. Важливо зазначити, що коагуляційні процеси

регулюються антикоагулянтною системою, що дозволяє зберігати кров у рідкому стані. До важливих антикоагулянтів належать специфічний інгібітор шляху тканинного фактора та антитромбін III, а також протеїн С, оскільки ці протеїни забезпечують термінаційні стадії обмеження коагуляції. Інгібітор TFPI інактивує фактор VIIa, а також тканинний фактор, антитромбін III пригнічує тромбін та активований фактор X при їх переході із клітин, що містить тканинний фактор, у позаклітинний простір. Активованій за рахунок комплексу тромбін/тромбомодулін, протеїн С спільно із кофактором протеїном S інактивують фактори Va та VIIIa.

Натомість уже сформований фібриновий згусток гідролізується завдяки роботі системи фібринолізу. Активуючись на полімерному фібрину, плазміноген перетворюється на плазмін, який гідролізує молекули фібрину до продуктів розщеплення фібрину (ПРФ). Важливими факторами у цьому процесі є тканинний активатор плазміногену (tPA) та урокіназа (uPA).

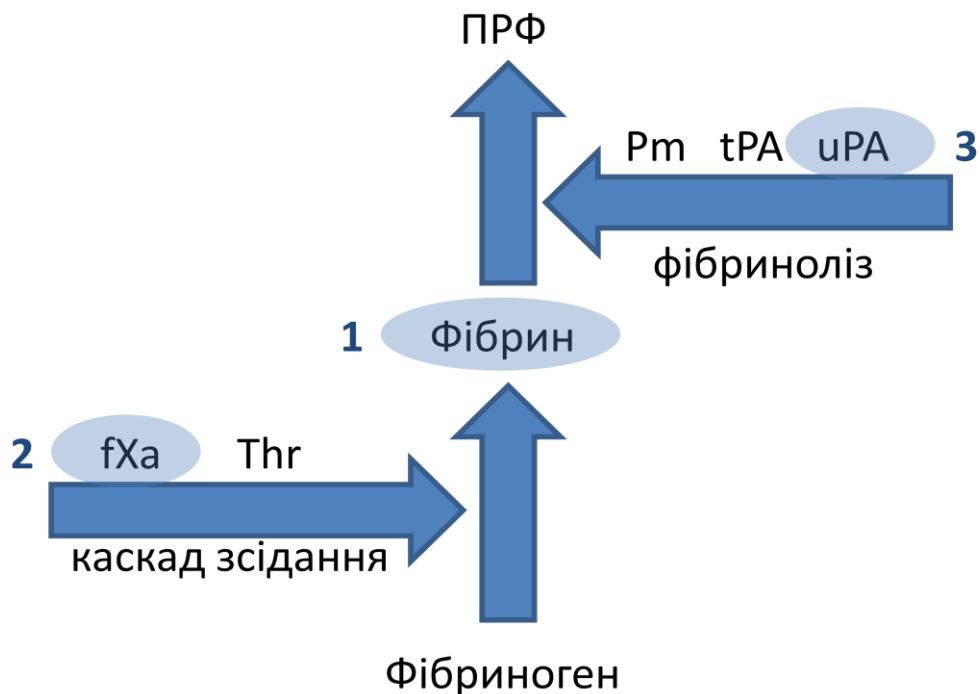


Рис. 1.1. Принципова схема формування та гідролізу полімерного фібрину з позначеними об'єктами дослідження: 1 – фібрин; 2 – фактор Ха; 3 – урокіназа.

РОЗДІЛ 2. ПОЛІМЕРИЗАЦІЯ ФІБРИНУ

2.1. Структурно-функціональні особливості сайтів полімеризації молекули фібрину

Процес полімеризації фібрину характеризується високою складністю та підпорядкований жорсткій регуляції, зокрема за рахунок ензиматичної активності тромбіну, який відіграє головну роль у формуванні фібринового згустку. Ключовим процесом всього коагуляційного каскаду є перетворення фібриногену на фібрин, що забезпечує самозбирання останнього, формування фібриново-тромбоцитарного згустку та, зрештою, зупинку кровотечі. При цьому, процес утворення молекул фібрину відбувається послідовно за допомогою двох етапів, а саме – ензиматичного та неензиматичного. Перший етап опосередковано тромбіном, який безпосередньо забезпечує відщеплення фібринопептидів від фібриногену, завдяки чому утворюються молекули фібрину. Тромбін утворюється з протромбіну – свого неактивного попередника. Останній вільно циркулює в кров'яному руслі при фізіологічних умовах. Як високоспецифічна серинова протеїназа, тромбін відщеплює фібринопептиди фібриногену для експонування сайтів полімеризації фібрину. Такі сайти у складі фібрин-мономеру забезпечують його самозбирання з утворенням полімерів фібрину. Результатом цього етапу є утворення олігомерів фібрину. Останні подовжуються завдяки приєднанню нових молекул мономерного фібрину та формують дволанцюгові протофібрили, які здатні утворювати розгалужені волокна. Результатом вищеписаних процесів є утворення тривимірної сітки волокон, стабілізованої фактором XIIIa ковалентними зв'язками між молекулами фібрину, яка становить основу кров'яного згустку [13]

Фібриноген – попередник фібрину – є мультидоменним глікопротеїном, до складу якого входять дві ідентичні субодиниці, кожна з яких складається із трьох ланцюгів: A α -поліпептидний ланцюг із молекулярною масою 67 kDa, B β -

ланцюг із молекулярною масою 54 кДа та γ -ланцюг із молекулярною масою 48 кДа. Структурна формула фібриногену позначається як $(A\alpha B\beta \gamma)_2$. $A\alpha$ -ланцюг фібриногену складається із 610 амінокислотних залишків, $B\beta$ - та γ -ланцюги із 461 та 411 залишків амінокислот відповідно. [14]. Цікаво, що ланцюги фібриногену мають високий ступінь гомології за послідовністю амінокислотних залишків у поліпептиді [15, 16]. Загальна молекулярна маса фібриногену становить 340 кДа. Структура молекули фібриногену характеризується видовженою формою, діаметр молекули становить близько 22 нм. За доменною організацією у фібриногені виділяють два периферичні D-регіони, а також центральний E-регіон, який поєднаний із двома D-регіонами. Кожен із регіонів характеризується складною субдоменною організацією, зокрема до складу D-регіонів входить по сім субдоменів, до складу E-регіону – чотири субдомени. Структурною особливістю останнього є наявність симетричних частин із потрійною α -спіральною структурою, що утворена C-кінцевими частинами $A\alpha$, $B\beta$ та γ ланцюгів. У центрі E-регіону розташований γ N-субдомен, що характеризується асиметричною формою та складається із N-кінцевих частини двох ланцюгів γ . Частини двох $A\alpha$ та $B\beta$ ланцюгів на зворотній стороні E-регіону формують воронкоподібний домен. N-кінці $A\alpha$ -, $B\beta$ - та γ -ланцюгів входять до складу D-регіонів у дистальних областях молекули та формують потрійні α -спіралі. При цьому, C-кінці ланцюгів β та γ формують відповідно β - та γ -вузли. Кожен з останніх складається з трьох субдоменів, а саме N-кінцевого A-домену, центрального B-домену, та C-кінцевого P-домену [17].

Центральний регіон E, а також периферичні регіони D, що розташовані на дистальних кінцях молекули фібриногену, з'єднані конекторними α -спіралями із потрійною структурою, сформовані відповідно залишками кожного з ланцюгів $A\alpha$, $B\beta$ та γ . При цьому, за рахунок обертання правосторонніх спіралей навколо спільної осі утворюється ліва суперспіраль [18]. Остання згинається навколо центру шарніра, що міститься у неспіральній ділянці ланцюга γ .

Важливо, що власне зігнута ділянка α -спіралей забезпечує експонування відповідних ділянок, які здатні піддаватись ензиматичній дії плазміну [19, 20].

Важливу роль у стабілізації та підтримці функціональних сайтів молекул фібрин(оген)у відіграють дисульфідні зв'язки. Зокрема, дисульфідні містки забезпечують формування з'єднань між субодинацями молекули за рахунок взаємодії залишків амінокислот ланцюгів $A\alpha$ та γ , що розташовані на N-кінцях останніх. Це призводить до формування так званих дисульфідних кілець, опосередкованих шістьма дисульфідними містками, у кожній субодинаці молекули. Крім того, SS-зв'язки забезпечують антипаралельну конфігурацію ланцюгів γ за рахунок з'єднань N-кінців. Для забезпечення жорсткої конформації фібрин(оген)у поліпептидні ділянки між такими кільцями формують суперспіраль. При цьому лабільні частини ланцюгів, а саме ділянки амінокислотних залишків у положеннях 96-119 $A\alpha$ -ланцюга, 127-150 $B\beta$ -ланцюга та 70-93 γ -ланцюга не формують SS-зв'язків, що необхідно для їх ензиматичного розщеплення [21].

Власне, $A\alpha$ -ланцюг молекули містить послідовність фібринопептиду A на N-кінці, відщеплення якого тромбіном забезпечує формування сайту полімеризації фібрину E_A , який є тригером у процесі самозбирання полімерного фібрину. Відщеплення фібринопептидів A дозволяє експонувати сайт гліцин-гістидин-аргінін-пролін, розміщений на N-кінцях поліпептиду. Окрім того, цей ензиматичний процес модулює локальну зміну заряду домену E. Фібринопептид B розташовано на H_2N -кінці ланцюга $B\beta$. При його ензиматичному відщепленні формується другий сайт полімеризації фібрину «B». Таким чином, полімеризаційні центри «A» і «B» експонуються у центральному регіоні E молекули. Такі процеси забезпечують можливість утворення полімерного фібрину за рахунок нековалентних міжмолекулярних взаємодій між центрами «A» або «B» однієї молекули з комплементарними «A» або «B» центрами полімеризації іншої молекули відповідно. При цьому така взаємодія не потребує додаткової участі сторонніх молекул або додаткових процесів активації фібрину для можливості взаємодії «A» чи «B» центрів із

іншими «А» чи «В» центрами полімеризації [15]. Для формування протофібрили достатньо нековалентної взаємодії між полімеризаційними сайтами «А»-«а». Таким чином, фібрили будуть утворені з молекул фібрин-мономеру, орієнтованих паралельно із частковим перекриванням. При цьому, бічні регіони D двох сусідніх молекул формують D:D інтерфейс, який включає залишки амінокислот γ -ланцюга, що є критичним для можливості подовження фібрил [22].

Одну із ключових ролей у процесі самозбирання фібрину забезпечують C-кінці A α -ланцюгів молекули, які асоційовані між собою, а також поєднані із E-регіоном, оскільки саме α C-домени забезпечують створення первинних контактів між протофібрилами та новими доменами фібрину. Такі ділянки формують глобулярну структуру молекули та забезпечують високий рівень гідrataції фібрин(оген)у. Після ензиматичного відщеплення фібринопептиду A, α C-домени підлягають дисоціації та опосередковують латеральну асоціацію протофібрил, що підтверджується проведеними дослідженнями щодо вивчення полімеризаційних здатностей фібрин із використання α C-доменів із зміненою структурою. Структурні особливості C-кінцевої послідовності A α -ланцюга фібриногену було досліджено за допомогою методу обмеженого протеолізу, суть якого полягає в можливості ензиматичної реакції протеолізу ланцюгів, які не лише експоновані на поверхні глобули для можливості взаємодії із протеїназою, але й характеризуються високим рівнем гнучкості, тоді як ядро протеїну залишається більш жорстким та стійким до протеолізу відповідно [23]. Така методика характеризується рядом переваг порівняно із традиційними методами визначення просторової структури протеїнової молекули, такими як ядерний магнітний резонанс або рентгеноструктурний аналіз, що мають ряд суттєвих недоліків [24]. Наприклад, для застосування методу ядерного магнітного резонансу необхідний нереагуючий розчин протеїну в мілімолярній концентрації. Складність також полягає у визначенні просторового розміщення неструктурованих чи високолабільних фрагментів, експонованих у розчин. Така властивість може бути критичною, зокрема при дослідженні

функціонально важливих ділянок протеїну, що характеризуються подібними особливостями. Таким чином, застосування методу обмеженого протеолізу для вивчення сайтів протеїну із високим рівнем гнучкості поліпептидного ланцюга чи розгортання глобули є найбільш доцільним [25]. Відомо, що С-термінальна послідовність А α -ланцюга фібриногену людини у ділянці 220-610 амінокислотних залишків, так званий α С-регіон, утворений із полі-L-пролінової спіралі, яка сформована із конекторної ділянки у положеннях амінокислот 221-391, та власне α С-домену у положеннях амінокислот 392-610. Останній включає антипаралельну, стабілізовану SS-зв'язками, β -структуру, утворену ділянками амінокислотних залишків у положеннях 425-433 та 437-445 А α -ланцюга, та β -структуру, сформовану фрагментом амінокислотних залишків у положеннях 459-476. У молекулі фібриногену α С-домени взаємодіють між собою, а також із центральним доменом молекули, що опосередковано електростатичними взаємодіями. При цьому, спорідненість α С-доменів до фібринопептидів В є вищою порівняно із спорідненістю до фібринопептидів А або інших α С-доменів. При ензиматичному відщепленні фібринопептидів В, α С-регіони перемикаються на міжмолекулярні взаємодії, зокрема беруть участь у бічній асоціації фібрил. Важливою властивістю α С-регіонів є можливість їх зшивання фактором XIIIa для забезпечення стабілізації згустку фібрину [20].

Результати досліджень з використанням протеолітичної деградації фібрину плазміном підтверджують наявність в α С-домені двох субдоменів. Цікаво, що у молекулі фібрину наявні близько 20 потенційних сайтів розщеплення плазміном в області амінокислотних залишків у положеннях 392-610, однак лише чотири сайти здатні фактично піддаватися ензиматичному розщепленню: Arg424, Arg491, Lys508 й Lys583. Фрагменти деградації молекули плазміном, зокрема А α 425-491 та А α 509-583, відповідають N- та С-кінцевим субдоменам α С-домену. Станом на сьогодні, не ідентифіковано впорядкованих структур у С-термінальному субдомени мономерного α С-домену, проте це не свідчить про розгортання цього субдомену у фібрин(оген)і. У молекулі фібриногену α С-домени характеризуються внутрішньомолекулярною взаємодією та утворюють

димери, в той час як у молекулі фібрину їх взаємодія має міжмолекулярний характер, результатом якої стає утворення α C-полімерів. Важливо зазначити, що подібні взаємодії здатні підвищити структурованість та стабільність C-термінальних субдоменів. Подальші дослідження з використанням методів обмеженого протеолізу спільно з комп'ютерним моделюванням дозволять розширити розуміння структури як мономерного α C-домена, так й α C-полімерів. Методи молекулярної динаміки нададуть можливість проаналізувати взаємодію між двома α C-доменами та E-регіоном, а також процеси перемикання між інтра- та інтермолекулярними станами та відповідним впливом α C-доменів на бічну асоціацію фібрил [26].

Дослідження структурно-функціональних особливостей сайтів полімеризації фібрину також проводили за використання пептидів, послідовності амінокислотних залишків яких відповідають амінокінцевим ділянкам ланцюгів A α та B β . Зокрема, при використанні трипептидів гліцин-пролін-аргінін і гліцин-гістидин-аргінін було показано значне інгібування процесу полімеризації фібрину за присутності пептиду гліцин-пролін-аргінін. При цьому показано висококонсервативність амінокінцевих ділянок A α -ланцюгів, оскільки заміна одного з трьох амінокислотних залишків у структурі пептиду, наприклад, залишку аргініну на залишок серину, призводила до порушення полімеризації фібрину. Трипептид гліцин-гістидин-аргінін не продемонстрував ефект інгібування процесу полімеризації, проте порушення здатності до полімеризації спостерігалось при участі ділянки амінокислотної послідовності 15-42 B β -ланцюга. Крім того, вищеописані трипептиди продемонстрували здатність до асоціації із фрагментом D фібрину. Отримані дані дозволили сформуванню моделі перебудови конформації ланцюга B β , за якої у мікродомені в області 30-43 амінокислотних залишків утворюється петля, що здатна внаслідок ензиматичного відщеплення фібринопептиду B зазнавати конформаційної перебудови та просторово зближуватися із областю поліпептидного ланцюга в мікродомені 15-17 амінокислотних залишків. Такі зміни дозволяють сформуванню іншого, додаткового, сайту полімеризації молекули

фібрину. При цьому, полімеризаційний центр «b» бере додаткову участь у пришивдженні бічної асоціації фібрил. Розміщення сайту «b» на С-кінцевій ділянці ланцюга В β дослідили із використанням флуоресцентно міченого зонду, а саме пептиду гліцин-гістидин-аргінін-пролін, для визначення особливостей інгібування полімеризації. Дослідження здатності до полімеризації фібрину, отриманого з фібриногену з відсутніми амінокислотними залишками 1-43 ланцюга В β продемонстрували значне уповільнення полімеризаційного процесу порівняно із нативним фібрином. Участь мікродомену γ -ланцюга в області 337-379 амінокислотних залишків у формуванні полімеризаційного центру «a», зокрема здатність до зв'язування трипептиду гліцин-пролін-аргінін, було встановлено з використанням рекомбінантних модулів фібриногену та кристалізації його окремих доменів [27].

Важливу роль для процесу полімеризації молекул фібрину відіграє глікозилювання молекули. Вуглеводна частина молекули фібриногену сформована залишками олігосахаридів з кінцевими сіаловими кислотами. Відомо, що полімерна сітка фібрину у пацієнтів з патологіями печінки характеризується більш тонкими волокнами та вищим ступенем щільності галуження фібрил, що пояснюється порівняно вищим рівнем сіалізації сахаридів фібриногену [28]. Цікаво, що в умовах синтезу при запальних станах, фібриноген відрізняється іншою олігосахаридною структурою. При цьому, структура полімерів фібрину при видаленні усіх сахаридних залишків молекули значно змінюється, зокрема спостерігається потовщення фібрил. Таким чином, структура фібринового згустку та ступінь латеральної агрегації напрямку залежать від наявності вуглеводних залишків у молекулі, а також їх заряду та маси [29].

Важливу роль у процесі полімеризації фібрину відіграють центри зв'язування іонів кальцію. Відомо, що фібриноген містить як високоафінні, так і низькоафінні центри зв'язування іонів Ca^{2+} . Перші формуються у γ -ланцюгах та β -вузлах та утворюють $\gamma 1$ та $\beta 1$ високоафінні сайти зв'язування іонів кальцію відповідно. Такі високоафінні сайти містять координуючу зв'язану молекулу

води [30]. При приєднанні іонів кальцію до високоафінних сайтів, зокрема до сайту $\gamma 1$, відповідний поліпептидний ланцюг захищений від ензиматичної деградації [31]. Відомо, що при деяких мутаціях, що впливають на високоафінні сайти зв'язування іонів кальцію, виникають значні функціональні зміни молекули. Зв'язування йонів кальцію з великою імовірністю має велике значення як модулятор полімеризації молекул фібрину за рахунок підвищення ступеня бічної агрегації та утворення більш товстих фібрил [32]. Інші сайти зв'язування іонів кальцію, а саме $\gamma 2$ і $\beta 2$, характеризуються значно нижчим рівнем афінності до Ca^{2+} [33]. Низькоафінний сайт зв'язування іонів кальцію $\beta 2$, утворений залишками аспарагінових кислот ланцюга В β , глутамінової кислоти γ ланцюга та аспартату В β ланцюга, відіграє важливу роль для бічної агрегації протофібрил. Останні дані дозволяють вважати, що саме цей сайт визначає доступність молекули для приєднання тканинного активатора плазміногену [34].

2.2. Молекулярні основи полімеризації фібрину

Утворення фібрин-мономеру опосередковане тромбіном, та відбувається, зокрема, за рахунок обмеженого протеолізу фібриногену. Як описано вище, тромбін забезпечує відщеплення від N-кінця А α -ланцюга 16 амінокислотних залишків, так званий фібринопептид А, та 14 амінокислотних залишків від N-кінця В β -ланцюга – фібринопептид В, відповідно. При цьому, тромбін характеризується високим рівнем спорідненості до А α -ланцюга фібриногену, ензиматична дисоціація фібринопептиду А має кооперативний характер: від'єднання одного фібринопептиду А відбувається значно швидше порівняно із дисоціацією другого фібринопептиду. Приєднання активного центру тромбіну відбувається в області аспарагінового та валінового амінокислотних залишків в 7 та 5 положеннях А α -ланцюга відповідно. На цьому етапі ключовим процесом є формування гідрофобного кластеру за рахунок формування шпилькоподібної структури фенілаланіновим, лейциновим та

валіновим амінокислотними залишками у положеннях 8, 9 і 15, та наступне його впізнавання гідрофобною ділянкою тромбіну, що розташована поруч із активним центром. Власне гідроліз відбувається по амінокислотним залишкам Арг16 та Глі17 А α -ланцюга фібриногену за рахунок просторового зближення каталітичної тріади, розташованої в активному центрі тромбіну, з амінокислотним залишком аргініну фібриногену. На противагу цим процесам, дисоціація фібринопептиду В опосередкована ензиматичною дією тромбіну на В β -ланцюг та спрямована на розривання зв'язку між амінокислотними залишками аргініну та гліцину у 14 та 15 положеннях поліпептиду відповідно [35]. При заміні залишку аргініну у 16 та 14 положеннях А α -ланцюга та В β -ланцюга відповідно, що відбувається при певних мутаціях, ензиматична дисоціація фібринопептидів не відбувається, що призводить до неможливості формування фібринового згустку та тромбоутворення в цілому [36].

Хоча вивільнення фібринопептиду В відбувається значно повільніше порівняно з відщепленням фібринопептиду А, швидкість його відокремлення може зростати при процесі полімеризації фібрину і на етапі завершення формування згустку набуває максимального значення. Очевидно, такі дані свідчать про те, що фібринопептид В дисоціює з полімеру фібрину. Різниця у параметрах швидкості ензиматичного відщеплення фібринопептидів пояснюється, в першу чергу, конформаційними обмеженнями приєднання тромбіну до відповідного субстрату, оскільки за звичайних умов N-кінцеві ділянки А α -ланцюга молекули фібриногену порівняно більш доступні для ензиматичної дії тромбіну. Це також підтверджують дослідження порівняння вивільнення фібринопептидів А та В фібриногену у розчині та фібриногену, іммобілізованого до поверхні. У другому випадку спостерігаються вищі значення швидкості дисоціації фібринопептиду В порівняно із вивільненням фібринопептиду А. Отже, у залежності від орієнтації молекули та параметру поверхневої щільності, що впливає на конформацію молекули, спостерігається різниця у дисоціації відповідних фібринопептидів. Власне початкова швидкість

полімеризації молекул фібрину пропорційна квадрату концентрації фібриногену.

Відомо, що латеральна асоціація протофібрил відбувається при досягненні порогової довжини полімерів та опосередковує формування розгалуженого тривимірного згустку.

За рахунок процесу асоціації протофібрил утворюються більш товсті та міцні волокна. Товщина сформованих фібрил залежить в першу чергу від умов, в яких відбувається полімеризація. Варто зазначити, що молекулярні механізми латеральної асоціації протофібрил на сьогодні встановлені не повністю. Дослідження повздовжньої упаковки фібрил зазвичай здійснюється із використанням методів атомно-силової або трансмісійної електронної мікроскопії. Варто зазначити, що структура сформованого згустку полімерного фібрину залежить від багатьох параметрів, що ускладнює подібні дослідження. Зв'язки, які беруть участь у взаємодії між фібрилами, характеризують як слабкі та такі, що кооперуються у повздовжньому напрямку осі фібрили.

Важливу роль у формуванні складної тривимірної сітки волокон відіграє не лише потовщення фібрил, опосередковане бічною агрегацією, а й можливість розгалуження. Останнє відбувається за допомогою утворення точок галуження різного типу, про що свідчать дані електронної мікроскопії. Молекулярні механізми формування точки розгалуження, відомої як точка двостороннього з'єднання, включає неповну латеральну агрегацію протофібрил, в результаті чого кожна з них розходить у іншому напрямку, даючи початок волокну із новим напрямком. Інший механізм розгалуження шляхом тримолекулярного з'єднання опосередковано специфічним приєднанням фібрину до кінця волокна, при якому зберігається можливість незалежного подовження як самої фібрили, так і приєднання нових мономерів до фібрину, в результаті чого уможливіюється галуження із утворенням двох незалежних ланцюгів. Цікаво, що по мірі потовщення фібрил спостерігається зменшення точок розгалуження, відповідно зростання кількості таких точок корелює із зменшенням діаметру фібрили. Активна бічна агрегація забезпечує

формування товстіших волокон фібрину із меншим значенням галуження і навпаки, при менш активній агрегації спостерігається формування згустку із тонкими та більш розгалуженими фібрилами [37]. Дослідження структури фібринових волокон та їх мереж зазвичай проводять із використанням скануючої електронної мікроскопії, визначаючи при цьому довжину волокон, кількість точок розгалуження фібрил, діаметр останніх, тощо. Варто зазначити, що більшість таких параметрів характеризуються значною варіабельністю, яка пояснюється різницею у кінетиці утворення фібрил [38]. Важливо зазначити, що формування зв'язків між волокнами фібрину у просторі відповідає фазовому переходу розчин-гель. Для утворення стійкого гелю достатньо ензиматичного перетворення близько 20 % фібриногену у фібрин, що відповідає точці гелеутворення. Утворення стабільної розгалуженої структури згустку продовжується після досягнення точки гелеутворення, нові фібрили із відповідним галуженням продовжують формуватись у фазі гелю.

Важливим процесом для додаткової стабілізації та фіксації утвореної полімерної мережі фібрил є їх зшивання за участю фактора XIIIa, який формує ковалентні взаємодії між фібрилами. Оскільки полімери утримуються нековалентними міжмолекулярними зв'язками, саме цей механізм забезпечує зміцнення сформованого згустку. У цьому процесі фібрин виступає як кофактор для молекул тромбіну для активації XIII фактора та забезпечує зближення молекул у просторі та взаємовигідну орієнтацію фібрин-стабілізуючого фактору та тромбіну. Стабілізація фібринових волокон здійснюється по α - і γ -ланцюгам ізопептидними зв'язками, зокрема за рахунок взаємодій між γ -карбоксильною групою глутамінового залишку 398 поліпептиду та ϵ -аміногрупою лізінового залишку 406. При цьому формування ізопептидних взаємодій по γ -ланцюгах відбувається порівняно швидше, ніж у ланцюгах α . Більше того, воно може проходити навіть при низькій концентрації XIIIa фактора. З іншої сторони, стабілізація фібринових волокон по α -ланцюгам протікає лише при високій концентрації фібрин-стабілізуючого фактора. Важливо зазначити, що із набуттям механічної міцності та стабілізації

фібринової мережі, структура самого згустку не набуває змін, за рахунок утворення зв'язків виключно між тими молекулами фібрину, що нековалентно закріплені у фібрилі. Попри те, що полімеризація фібрину характеризується зворотними властивостями, після ковалентного зшивання молекул фібрину полімеризація набуває незворотнього характеру. Молекули фібрину є рівноважними полімерами. Після їх фіксації за участю фактора XIIIа згусток стає не лише міцним механічно, але й більш стійким до процесу фібринолізу, оскільки ковалентні зв'язки сприяють стійкості до плазмінового лізису. Стабілізовані молекули фібрину можуть бути розчинені лише за рахунок ензиматичного гідролізу поліпептидних ланцюгів, або ж при відновлення SS-зв'язків [39]. Важливо також зазначити, що формування ковалентних зв'язків у мережі фібринових волокон є кальцій-залежним процесом. Іони кальцію забезпечують структурно-функціональну цілісність молекул та їх функціональних сайтів та відіграють важливу участь у процесах формування фібринового згустку. Це підтверджують дані досліджень інгібування процесу бічної асоціації волокон фібрину при низьких концентраціях іонів кальцію.

РОЗДІЛ 3. ЕНЗИМИ ГЕМОСТАЗУ ТА ЇХ ІНГІБУВАННЯ

3.1. Активність фактора Ха та її інгібування

Порушення в системі гемостазу є причиною більш ніж третини смертності за серцево-судинних захворювань, травмах різної природи і хірургічних операціях, сепсисі, опіках, онкологічних захворюваннях та ін. наслідок дії таких патогенетичних факторів, як пошкодження ендотеліальних клітин з експонуванням тромбогенних субендотеліальних структур; патологічна активація тромбоцитів та системи зсідання крові; резистентність до антикоагулянтів або дефіцит антикоагулянтів; зниження фібринолітичного потенціалу; реологічні порушення та стаз виникає тромбофілія, – патологічний

стан, який характеризується порушенням системи зсідання крові, за якого зростає ризик розвитку тромбозу. Розуміння патологічних процесів необхідно для розробки і удосконалення антитромботичних засобів.

Протягом останніх п'яти десятиліть антикоагулянтна терапія включає швидко діючі парентеральні препарати (нефракціонований гепарин, низькомолекулярні гепарини) для профілактики венозної тромбоемболії і первинного лікування артеріальної і венозної тромбоемболії, тоді як для довгострокового перорального лікування використовують антагоністи вітаміну К (варфарин, кумарин). Ці препарати діють шляхом блокування синтезу функціонально активних вітамінів К-залежних протеїнів системи зсідання крові.

Нефракціонований гепарин або його низькомолекулярні аналоги, оральний антикоагулянт варфарин (антагоніст вітаміну К) і інгібітор активації тромбоцитів - аспірин мають обмеження в застосуванні і побічні ефекти, що лімітує їх використання і спонукає до пошуку і розробки нових препаратів, не менше ефективних, але вільних від недоліків стандартних засобів. Антикоагулянтна терапія варфарином для запобігання кровотечі потребує постійного контролю.

В останні роки були розроблені сполуки, які селективно інгібують активований коагуляційний фактор X або тромбін [40]. Сучасні уявлення про гемостаз і тромбози і досвід використання антитромботичних засобів (антикоагулянтів, тромболітиків та антитромбоцитарних агентів) свідчать про те, що перспективною є розробка синтетичних низькомолекулярних інгібіторів фактору Ха та тромбіну, оскільки тромбін є ключовим в системі згортання крові завдяки його здатності каталізувати перетворення фібриногену на фібрин і стимулювати активацію і агрегацію тромбоцитів, а фактор X об'єднує «зовнішній» і «внутрішній» шляхи коагуляційного каскаду і перетворює протромбін в активний ензим [41].

У процесі активації коагуляційної ланки системи гемостазу утворюється протромбіназний комплекс на активованих тромбоцитах. Фактор Ха, який входить до цього комплексу, є єдиним ензимом, що відповідає за конституційне

утворення тромбіну в кровотоці. На відміну від тромбіну, який має низьку субстратну специфічність і діє на різні протеїни, такі як, наприклад, фібриноген і PAR-рецептори, фактор Ха, ймовірно, має один фізіологічний субстрат – протромбін [42, 43].

Одна молекула фактора Ха в складі протромбіназного комплексу, що має каталітичну активність в 10 разів вищу, ніж у вільному виді, генерує понад тисячу молекул тромбіну, таким чином ампліфікуючи сигнал в коагуляційному каскаді. При прямому інгібуванні фактора Ха, що призводить до непрямого інгібування продукції тромбіну, відбувається негативний контроль утворення фібрину. Тому для досягнення антикоагулянтного ефекту необхідно заінгібувати значно меншу кількість фактора Ха, ніж тромбіну, оскільки концентрація протромбіну в крові значно вища (1,4 μ M протромбіну проти 150 нМ фактора X) [44, 45].

Непрямий доказ гіпотези про перевагу фактора Ха як терапевтичної мішені, в порівнянні з тромбіном, також можна знайти в клінічних випробуваннях для профілактики тромбозу глибоких вен. Було доведено, що фондапарин (антитромбін III-залежний інгібітор фактора Ха) перевершував еноксапарин (низькомолекулярний гепарин, який пригнічує тромбін і фактор Ха) у чотирьох дослідженнях ортопедичної хірургії [46]. Тому було висловлено припущення, що речовини, які вибірково пригнічують фактор Ха, можуть бути корисні в якості діагностичних агентів *in vitro* або для терапевтичного введення при певних тромботичних ускладненнях.

Інгібітори фактора Ха відносяться до класу пероральних антикоагулянтів прямої дії. Використовуються для профілактики інсульту та системної емболії у пацієнтів з атріальною ФП, а також для лікування та профілактики венозної тромбоемболії. Ці препарати знижують ризик тромбоутворення, але в деяких випадках – за рахунок збільшення ризику кровотечі. Клінічні дослідження свідчать, що за показниками безпеки та ефективності вони порівняні з варфарином, одним з недоліків якого є відсутність антитоту [47].

Перший пероральний інгібітор фактора Ха, ривароксабан, був схвалений FDA до використання у Сполучених Штатах Америки в 2011 році [48]. Інгібітори фактору Ха апіксабан [49] і едоксабан [50] схвалені проте ще знаходяться в розробці (всі інгібітори фактора Ха мають суфікс «Ха-ban» [Ten-A-Ban], щоб позначити їх механізм дії).

Розробка низькомолекулярних інгібіторів тромбіну і фактора Ха почалась вже давно та активно продовжується і в наш час. Використовуючи методи молекулярного моделювання, раціонального дизайну було отримано, як приклад, серію карбоксилатних сполук бісфеніламідіна, що виявились ефективними інгібіторами фактору Ха. З накопиченням нових даних про активні та неактивні сполуки і появою все більшої кількості рентгенівських кристалічних структур фактора Ха, пошук інгібіторів ставав все більш ефективними [51]. У свою чергу, синтетичні низькомолекулярні інгібітори тромбіну мають цілий ряд переваг перед антикоагулянтами, які використовують в клініці в даний час: це швидкість дії, висока ефективність, передбачувана фармакокінетика, відсутність необхідності постійного моніторингу стану гемостазу.

В даний час в Україні немає ефективних препаратів, здатних замінити варфарин. Альтернативою можуть бути пероральні інгібітори фактора Ха і тромбіну, однак, крім ривароксана (Ксарелто) - інгібітора ФХа, такі препарати також відсутні. Україна є імпортозалежною від постачальників ефективних інгібіторів зсідання крові. Тому пошук нових, ефективних і безпечних низькомолекулярних синтетичних інгібіторів тромбіну і фактора Ха є актуальним завданням сучасної фундаментальної науки і клінічної медицини.

3.2. Активатор плазміногену урокіназного типу

Урокіназний активатор плазміногену (uPA) - це мультидоменний глікопротеїн, який разом з тканинним активатором плазміногену (tPA) каталізує перетворення неактивного плазміногену на плазмін, який, у свою

чергу, розщеплює фібриновий згусток [52]. Його структура складається з N-кінцевого домену, подібного до епідермального фактора росту (GFD), кринглового домену та каталітичного C-кінцевого домену. UPA синтезується як неактивний одностанцюговий зимоген, двостанцюгова форма uPA, зв'язана дисульфідним зв'язком, утворюється після розщеплення лінкерної ділянки, а саме пептидного зв'язку між Lys158 та Ile159 [53].

У свою чергу, рецептор урокіназного активатора плазміногену (uPAR) представляє собою цистеїн-багатий глікопротеїн, що має три різні домени (DI, DII і DIII), які зв'язані між собою за допомогою двох гнучких лінкерних послідовностей [54]. Ці домени залучені в зв'язування з uPA та іншими протеїнами, наприклад, інтегринами, G-зв'язаними рецепторами (GPCR) і рецепторами тирозинових кіназ, які взаємодіють з DII та DIII доменами uPAR [55].

Повністю спектр функцій uPA розкривається при його взаємодії зі своїм специфічним рецептором (uPAR). Система uPA-uPAR бере участь у фібринолізі, механізмах імунної відповіді, а її дисбаланс є причиною розвитку ряду патологій [56]. Наприклад, зазначена система бере участь у протеолітичній активації низки факторів росту та цитокінів (наприклад, основного фактора росту фібробластів, TGF- β та інтерлейкіну-1 бета), що беруть участь у мієлопоезі [57]. uPA також викликає активацію нейтрофілів і сприяє їх міграції. Додатково uPA відіграє важливу роль у нормальній роботі чоловічої репродуктивної системи [58]. Проте система uPA-uPAR може бути також залучена і в патофізіологічні процеси, включаючи розвиток раку [59], розсіяний склероз [60] та атеросклероз [61].

Рецептори uPA надекспресуються в пухлинних клітинах, відіграючи, таким чином, важливу роль у канцерогенезі. В результаті зв'язування uPA з рецептором, локальна концентрація uPA, а також плазміну (прямо пропорційна до урокінази) значно зростає. На відміну від нього, тканинний активатор плазміногену (tPA) не зв'язується з рецепторами, експресованими на поверхні пухлинних клітин, а отже, і не впливає на канцерогенез.

Інтенсивна активація плазміногену за допомогою uPA та зворотна активація uPA плазміном дозволяє пухлинним клітинам руйнувати позаклітинний матрикс, що сприяє їх ефективній міграції та інвазії [62,63]. Додатково плазмін активує про-металопротеїнази, що посилює цей процес [64]. В результаті відбувається вивільнення факторів росту (FGF2, TGFb і VEGF), які були зв'язані з екстрацелюлярним матриксом [65], що, в свою чергу, стимулює проліферацію ракових клітин, ангіогенез і метастазування. Було показано, що рівень експресії uPA зростає у випадку аденокарциноми легень [66], гепатоцелюлярної карциноми [67], раку молочної [68] та підшлункової залоз [69].

Таким чином, інгібування ензиматичної активності uPA повинно пригнічувати канцерогенез. Саме тому розробка інгібіторів uPA є перспективним для створення протиракових препаратів і активно ведеться по всьому світові [70]. Більшість синтетичних інгібіторів uPA можна розділити на дві основні групи. Інгібітори на основі пептидів або пептидоміметиків показали свою ефективність *in vitro*, але не були впроваджені на практиці [71]. Органічні синтетичні інгібітори uPA в основному належать до груп сполук на основі нафтамідину, амідориду або НМА [72]. Майже жоден з них не пройшов стадію клінічних випробувань, проте деякі з них виявилися ефективними антипроліферативними агентами *in vitro* та *in vivo* [73]. Однак інгібітор WX-UK1 (та його проформа WX-671) – похідне 3-амінофенілаланіну в L-конформації з антипроліферативними властивостями – нещодавно пройшов II фазу клінічних випробувань [74].

РОЗДІЛ 4. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

4.1 Матеріали

В роботі було використано такі матеріали та реактиви: хромогенні субстрати S2238 H-D-Phe-Pip-Arg-pNA та 2765 Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA («Chromogenix», Швеція), активований фактор Ха («Bio-Merieux», Франція), активатор фактора X Russell's viper venom in cephalin («Sigma», США), тромбін («Merck», Німеччина), ADP («Merck», Німеччина), тромбопластин, АЧТЧ-реагент, кальцій хлористий 0.025 М («Siemens», Данія), трис, хлорид натрію (NaCl), персульфат амонію, гліцин («Sigma», США), акриламід, біс-акриламід, додецилсульфат натрію (ДСН) («Хіммед», Україна), тромбін 50 NIH/мл (NIH – National Institute of Health, одиниці активності тромбіну) («Sigma», США), 1% водний розчин уранілацетату («Merck», Німеччина).

4.2 Методи

4.2.1 Забір крові

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

4.2.2. Отримання плазми крові

Осадження формених елементів крові проводили центрифугуванням протягом 10 хв при 1200-1400 g. Плазму крові (супернатант) переносили у поліетиленову пробірку. Зберігали плазму крові при температурі -20 °C [75]

4.2.3. Отримання фібриногену

Фібриноген одержували з плазми крові донорів методом фракційного висолювання Na_2SO_4 . Кров донорів отримували в Головному військовому госпіталі Міністерства Оборони України м. Києва. Відразу після забору кров змішували з антикоагулянтом у співвідношенні 9:1 та охолоджували льодом. Водний розчин антикоагулянту містив 3,8 % цитрату натрію, 0,262 % ϵ -амінокапронової кислоти (ϵ АКК) та 0,01 % соєвого інгібітору трипсину (CIT).

Кров із антикоагулянтом центрифугували при 1200-1400 g протягом 60 хв за температури 5 °C. Плазму обережно зливали з осаду, що містив клітини крові, та повторно центрифугували протягом 60 хв.

Охолоджену плазму крові змішували з водною суспензією BaSO_4 (із розрахунку: 60 г BaSO_4 – на 1 л плазми) і перемішували протягом 25 хв за температури +4 °C для адсорбції вітамін К-залежних протеїнів. Наважку BaSO_4 двічі промивали охолодженою дистильованою водою. Центрифугували протягом 10 хв при 1200-1400 g. Адсорбцію вітамін К-залежних протеїнів повторювали.

Фібриноген людини отримували з плазми крові фракційним висолюванням із використанням Na_2SO_4 . До плазми крові, дефіцитної на протромбін, додавали 1/10 від об'єму плазми крові 1 М гліцинового буферу з 0,1 М NaCl та перемішували при температурі 20-22 °C на водяній бані. Обережно, при постійному перемішуванні, до плазми крові по краплях додавали 16 % розчин Na_2SO_4 (із розрахунку на 1 л плазми 520-680 мл 16 % розчину Na_2SO_4) до появи дрібного осаду, що являє собою нульову фракцію фібриногену. Концентрація Na_2SO_4 для висолювання нульової фракції фібриногену залежить від стану плазми крові. Останню видаляли шляхом центрифугування при 1400 g протягом 15 хвилин, після чого супернатант переносили до склянки і висолювали фібриноген додаванням по краплях 16 % розчину Na_2SO_4 до його кінцевої концентрації 8,5 %. Отриманий осад центрифугували при 1200-1400 g протягом 15 хвилин. Осад розчиняли в 0,2 М NaCl із розрахунку: осад з 1 л

вихідної плазми – у 200 мл 0,2 М NaCl, після чого по краплях додавали рівний об'єм 16 % розчину Na_2SO_4 та центрифугували при 1200-1400 g протягом 15 хвилин. Осад розчиняли в 0,2 М NaCl із розрахунку: осад з 1 л плазми – у 200 мл 0,2 М NaCl. До одержаного розчину додавали 1/5 об'єму 0,5 М калій-фосфатного буферу pH 6,5. Фібриноген знову висолювали додаванням рівного об'єму 16 % розчину Na_2SO_4 та центрифугували при 1200-1400 g протягом 15 хвилин. Осад розчиняли в 0,15 М NaCl. Концентрацію протеїну (мг/мл) визначали спектрофотометрично за використанням коефіцієнта екстинкції (1,506 для нейтрального середовища), після чого концентрацію фібриногену доводили до 10 мг/мл за допомогою 0,15 М NaCl та залишали на 16 годин при температурі +4 °C для видалення кріофібриногену; потім розчин центрифугували при 1400 g протягом 15 хвилин, при цьому кріофібриноген залишався в осаді. До супернатанту додавали рівний об'єм 16 % розчину Na_2SO_4 та центрифугували при 1200 g протягом 15 хвилин. Осад розчиняли в 0,15 М NaCl до кінцевої концентрації фібриногену 25-30 мг/мл. Розчин фібриногену переносили в пробірки по 2 мл та заморожували при -30°C. Фібриноген зберігали при тій самій температурі [76].

4.2.4. Отримання фібрину *desAB*

До 0,25 %-го розчину фібриногену в 0,15 М NaCl додавали тромбін із розрахунку: 0,15-0,3 NIH – на 1 мг фібриногену та інкубували при температурі 37 °C протягом 1- 1,5 годин. Після інкубації згусток вилучали, намотуючи його на скляну паличку, і промивали двічі в 0,15 М NaCl. Згустки звільняли від рідини за допомогою паперових фільтрів, після чого розчиняли в 0,125% оцтовій кислоті.

Для переосадження до розчину фібрину додавали 14 об'ємів 0,063 М калій-фосфатного буферу з 0,25 М NaCl (pH 6,0) і залишали на 2 год для полімеризації фібрину. Утворений згусток знову промивали двічі в 0,15 М NaCl та третій раз – в 0,075 М NaCl і розчиняли при охолодженні в 0,0125% М оцтовій кислоті. Розчин фібрину центрифугували за температури 5 °C протягом

10-15 хв при 900 g. Цей цикл полімеризації та розчинення повторювали ще двічі. Одержаний 1,2-1,5 %-ий розчин фібрину desAB в 0,0125% М оцтовій кислоті зберігали при температурі +4 °C [77].

4.2.5. Отримання D-димеру

D-димер отримували з плазмінового гідролізату фібрину при наступних умовах. До розчину фібриногену концентрації 10 мг/мл в 0,05 М трис-НСІ буфері рН 7,4, який містив 0,13 М NaCl, додавали CaCl₂ до кінцевої концентрації $2 \cdot 10^{-2}$ М та тромбін (0,5-1 NIH тромбіну на 1 мг фібриногену) та інкубували 30 хв при температурі 23°C. Утворення ізопептидних зв'язків між молекулами фібрину відбувалося при каталітичній дії ендogenous фактора XIIIa. Стабілізований фібрин піддавали гідролізу плазміном із розрахунку на 1 мг фібриногену – 0,03 каз. од. Витримували при температурі 23°C протягом 4-6 год. Гідроліз зупиняли додаванням 20% розчину диізопропілфторфосфату із розрахунку 1 мкл на 1 мл гідролізату, після чого плазмін вилучали на Lys-сефарозі. D-димер отримували методом афінної хроматографії. Отриману суміш наносили на колонку з іммобілізованим мономером фібрину в буфері 0,05 М Tris-H₃PO₄ рН 6,85. Елюцію домішок D-фрагменту проводили з використанням 0,05 М трис-H₃PO₄ буферу рН 5,9. D-димер елюювали 0,05 М трис-H₃PO₄ буфером рН 5,3 [78].

4.2.6. Отримання D-фрагменту фібриногену

D-фрагмент отримували з плазмінового гідролізату фібриногену при наступних умовах. До розчину фібриногену концентрації 10 мг/мл в 0,05 М трис-НСІ буфері рН 7,4, який містив 0,13 М NaCl, додавали CaCl₂ до кінцевої концентрації $1 \cdot 10^{-3}$ М. Потім у реакційне середовище вносили розчин плазміну із розрахунку: на 1 мг фібриногену – 0,03 каз. од. Реакційну суміш витримували протягом 4 год при температурі 23 °C. Гідроліз зупиняли додаванням 20% розчину диізопропілфторфосфату із розрахунку 1 мкл на 1 мл гідролізату, після

чого плазмін вилучали на Lys-сефарозі. Виділення D-фрагменту проводили методом іонообмінної хроматографії на КМ-сефадексі С-50 [79].

4.2.7. Вимірювання концентрації протеїнів

Концентрацію протеїнів у розчині з нейтральним рН визначали за методом Бредфорда [80] у модифікації Седмака [81], використовуючи 0,2% розчин кумасі G-250 у 3,5% надхлорній кислоті. Кількість комплексу протеїн-кумасі, що утворився, визначали за графіком, побудованому при різних розведеннях розчину тромбіну відомої концентрації.

При спектрофотометричному визначенні концентрації протеїну виміряли оптичну густину протеїнових розчинів при 280 нм и 320 нм, враховуючи питоме поглинання протеїну в кюветі з довжиною шляху променя 1 см при 280 нм. Для розрахунку $E_{1\%}^{280}$ використовували рівняння: $[C], \text{мг/мл} = (E^{280} - E^{320})$.

4.2.8. SDS-PAGE

Чистоту отриманих протеїнів, зокрема фібрину desAB, D-димеру та D-фрагменту, а також аналіз отриманих комплексів із відповідних фракцій, отриманих за допомогою гель-фільтрації, проводили методом SDS-PAGE за Леммлі із використанням трис-гліцинової системи. Для аналізу використовували 7 % поліакриламідний розподільчий гель, а також концентруючий гель, які полімеризували із використанням відповідних буферних розчинів із додаванням очищеної води, 40 % розчину акриламиду та 1,5 % персульфату амонію при температурі 25 °С, у співвідношеннях, як описано вище. Буферні розчини для розподільчого та концентруючого гелю, а також електродний буферний розчин готували за вищеописаними співвідношеннями. Зразки для електрофорезу готували, додаючи до розчину протеїну 1 мг/мл буфера для зразків. Електрофорез протеїнів проводили в апараті для вертикального гель-електрофорезу Mini-PROTEAN Tetra Cell. Для ідентифікації протеїнів бендів гель фарбували в розчині 0,125 % кумасі G-250 протягом 30 хв при температурі 35-40 °С. Для відмивання гелю з метою

видалення залишків фарбування використовували 3–9 % розчин оцтової кислоти, нагрівали гель у термостійкому скляному стакані на газовому пальнику не доводячи до кипіння та візуалізували отримані електрофореграми [82,83].

4.2.9. Турбідиметричні вимірювання

Здатність отриманого фібрину desAB до полімеризації в системі фібриноген-тромбін перевіряли шляхом вимірювання зміни мутності середовища при 350 нм. До досліджуваного розчину фібриногену в кінцевій концентрації 0,1 мг/мл додавали 0,05 М трис-HCl буфер pH 7,4, який містив 0,15 М NaCl. Для ініціації полімеризації фібрину додавали тромбін у концентрації 0,25 NIH/мл. Для перевірки ефекту інгібування полімеризації фібрину D-димером та D-фрагментом до досліджуваного розчину додавали відповідні похідні фібриногену та проводили реєстрацію зміни мутності спектрофотометрично [84].

4.2.10. Формування комплексів фібрину та його фрагментів

Комплекси фібрину та його фрагментів, зокрема D-димеру та D-фрагменту, формували у 0,05 М фосфатному буфері pH 7,6. У скляну пробірку добавляли 0,05 М фосфатного буферу, розчини D-димеру та D-фрагменту та краплями добавляли розчин фібрину desAB. При проведенні досліджень із використанням пептидів GHRP ($B\beta$ 15-18) та $B\beta$ 1-42, останні використовувалися у співвідношенні 800:1 до фібрину. Витримували суміш при 25 °C протягом 10 хвилин для забезпечення відсутності формування фібринового згустку.

Для виділення отриманих комплексів фібрину desAB із D-димером та D-фрагментом застосовували метод хроматографії, що розділяє за розміром, на Sepharose-6B (0,6 x 45 см). Попередньо отриману суміш фібрин-мономеру та фрагментів у об'єму 0,5 – 1,0 мл наносили на Sepharose-6B та елюювали 0,05 М фосфатним буфером зі швидкістю 3,5 мл/год. Проби відбирали по окремих фракціях об'ємом 0,5 мл [85]. Матеріал аналізували електрофоретично.

4.2.11. Електронна мікроскопія

Попередньо утворені згустки фібрин-полімеру досліджували за допомогою методу трансмісійної електронної мікроскопії негативно контрастованих зразків, при цьому використовуючи певні модифікації. Зразки для мікроскопії готували так, як і для турбідиметричного методу дослідження полімеризаційних властивостей. Для негативного контрастування використовували 1 % водний розчин ураніацетату. Сітки для електронного мікроскопу вкривали шаром розчину формвару в дихлоретані та закріплювали розпиленням вуглецем за допомогою вакуумного випарювача HUS-5GB. Під час реакції полімеризації відбирали аліквоти із розчину через 30 та 300 секунд. Аліквоти доводили концентрації протеїну 7 мкг/мл. Отриманий розчин в об'ємі 10 мкл переносили на вкриті вуглецем ґратки після чого обробляли 1 % розчином ураніацетату через 2 хвилини. Після інкубації сітку двічі промивали 100 мМ амоній-ацетатним буфером рН 7,9 спочатку та 10 мМ амоній-ацетатним буфером рН 8,5 вдруге. Розчин, що залишився на сітці, видаляли використовуючи фільтрувальний папір. На поверхню тefлонового блоку наносили краплину контрастеру та накладали поверх неї сітку. Контрастер видаляли із використанням водоструменевого насосу через 1 хвилину. Електронно-мікроскопічні зображення були отримані із збільшенням 20000 – 50000 із використанням електронного мікроскопу H-600 при 75 kV [86].

4.2.12. Визначення інгібіторної дії низькомолекулярних сполук на фактор Ха за допомогою хромогенного субстрату.

Модельна система з використанням активованого фактора Х. Визначення інгібіторної дії низькомолекулярних сполук на фактор Ха проводили у 0,05 М трис HCl буфері рН 7,45, який містив 0,15 М NaCl, та $1 \cdot 10^{-3}$ М CaCl_2 . Кінцева концентрація субстрату S2765 (Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA 2HCl) становила 0,16 мМ, фактора Ха 0,27 нкат/мл. Низькомолекулярні сполуки, що досліджуються, додавали у концентрації від 5 до 50 μM .

Аналіз проводили у комірках мікропланшетів, загальний об'єм реакційної суміші становив 250 мкл. Реакційну суміш інкубували в термостаті при температурі 37 °С протягом 5-20 хв. Кількість розщепленого субстрату визначали спектрофотометрично при 405 нм на мікропланшетному спектрофотометрі Multiskan EX Thermo [87].

Модельна система з використанням плазми крові та активатора фактора X. Визначення інгібіторної дії низькомолекулярних сполук на фактор Ха проводили у 0,05 М трис HCl буфері pH 7,45, який містив 0,15 М NaCl, та $1 \cdot 10^{-3}$ М CaCl₂. Кінцева концентрація субстрату S2765 (Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA 2HCl) становила 0,16 мМ, 40 мкл референтної плазми крові та активатор фактора X з отрути гадюки Russellі (RVV) – 0,02 мг. Низькомолекулярні сполуки, що досліджуються, додавали у концентрації від 5 до 50 μМ [88].

4.2.13. Отримання збагаченої тромбоцитами плазми крові людини та дослідження процесу агрегації тромбоцитів

Збагачену тромбоцитами плазму крові людини (ЗТПК) одержували із цільної крові, яка містила 3,8 %-й цитрат натрію у співвідношенні 9:1, центрифугуванням за 160 g впродовж 20 хв. при температурі 20 °С [89]. Під час центрифугування пробірки не закривали, щоб не обмежувати доступ кисню до тромбоцитів.

Агрегацію тромбоцитів вивчали в збагаченій тромбоцитами плазмі крові (ЗТПК) людини (200-300 тис. тромбоцитів/мкл). Перед дослідженням проводили скринінгову оцінку агрегації тромбоцитів донорів, і при виявленні гіпоагрегації ЗТПК не використовували. Агрегатометрію виконували в перші три години після забору крові на фотооптичному агрегометрі “SOLAR AP2110” за методом Born [90].

В кювету для агрегометра вносили 430 мкл ЗТПК і 20 мкл 0,025 М CaCl₂ та інкубували *ex tempore* 5 хв при температурі 37 °С. Агрегацію тромбоцитів ініціювали внесенням одного з індукторів агрегації тромбоцитів: ADP (у концентрації 12,5 та 10 мкМ). Процес агрегації реєстрували протягом 10 хв в

режимі роботи без нормування результатів вимірів за початковим рівнем світлопропускання.

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

4.2.14. Активованний частковий тромбопластичний час.

Активованний частковий тромбопластиновий час (АЧТЧ) – базовий коагуляційний тест, який свідчить про здатність плазми крові формувати згусток під дією факторів внутрішнього шляху коагуляції. Не дивлячись на те, що АЧТЧ вважають недостатнім для точної лабораторної діагностики, його можна застосовувати для вивчення біологічних моделей як скринінговий тест.

АЧТЧ-тест виконували згідно зі стандартними лабораторними методиками. Для цього до 0,1 мл плазми крові додавали 0,1 мл АЧТЧ-реагенту та інкубували суміш протягом 3 хвилин при 37 °С, після чого ініціювали полімеризацію фібрину 0,1 мл розчином CaCl_2 (0,025 M). Фіксували час утворення згустку за допомогою коагулометра «Солар» [91].

4.2.15. Молекулярний докінг.

В ході досліджень було використано 3D структуру молекули фібриногену PDB (Protein data bank) ID: 3GHG, урокіназного активатора плазміногену (PDB ID: 1OWH, 1LMW, 1SQO). Типовий структурний файл з бази PDB не підходить для негайного використання в молекулярному моделюванні, оскільки містить координати тільки важких атомів (відсутні атоми гідрогену), певні амінокислотні залишки можуть бути відсутні повністю або частково. За допомогою UCSF Chimera 1.16 структуру протеїнів було підготовлено до молекулярного докінгу додавши атоми водню з подальшою енергетичною мінімізацією комплексу білок-ліганд або чистого протеїну [92]. В використаній

структурі 3GHG були відсутні ділянки “A-knob” і “B-knob”, які є важливими для наших досліджень. Тому для проведення молекулярного докінгу ми добудували ці фрагменти, використовуючи стандартний скрипт в програмі Modeller10.2 [93].

Структури лігандів було побудовано в програмі Marvin Sketch, після чого ліганди протонували і генерували їх низькоенергетичні конформації (MarvinSketch версія 21.16.0, ChemAxon (<https://www.chemaxon.com>)).

За допомогою молекулярного докінгу можна змодельовати молекулярні комплекси, що дає змогу встановити та проаналізувати взаємодії між компонентами цього комплексу. Процес докінгу включає 2 основних етапи: генерація ряду конформацій ліганда з подальшою орієнтацією і розміщенням в активному сайті та розрахунок енергії зв'язування. Для напівгнучкого молекулярного докінгу у випадку з низькомолекулярними органічними речовинами використовували програми ICM Molsoft або SWISSDOCK; HADDOCK, FlexPepDock, HPEPDOCK та HDOCK у випадку з пептидами та протеїнами [94, 95, 96, 97, 98]. Центр зв'язування для розрахунку ґріда обирався в залежності від задачі: для калікс[4]аренів - N-кінцева частина А α -ланцюга молекули фібрину, для пептидів - друга контактна зона в суперспіральній ділянці фібрину, для uPA - S1-кишеня. Відбір конформацій відбувався за значеннями Docking Score та після ретельної візуальної інспекції.

4.2.16. Повноатомна молекулярна динаміка

Розрахунок молекулярної динаміки було проведено за допомогою пакета програм GROMACS 2020.6 [99]. Протонування амінокислотних залишків проводили програмою pdb2gmh у відповідності до структури топологій та силового поля CHARMM36. Топології лігандів були отримані за допомогою серверу SwissParam [100]. Структуру комплексу «ліганд-протеїн» було розміщено в центрі додекаедричного боксу, дистанція від граничних атомів комплексу до стінок боксу не перевищувала 1 нм. Після цього бокс було заповнено молекулами води типу TIP3P. Заряд системи нейтралізовували

шляхом додавання йонів Na^+ та Cl^- (фінальна йонна концентрація становила 120 mM). Після створення системи було проведено мінімізацію енергії комплексу у водному оточенні з використанням алгоритму крутого спуску (steepest descent) протягом 5000 кроків. Мінімізація автоматично зупинялася при досягненні максимальної сили $<10,0$ кДж/моль. Після мінімізації енергії систему було врівноважено шляхом накладання гармонійних обмежуючих потенціалів на важкі атоми протеїну та ліганду. На першому етапі урівноваження було застосовано канонічний ансамбль NVT з наступними параметрами: урівноваження системи проводилося протягом 200 пс; чисельне інтегрування проводилось з кроком 2 фс; довжини ковалентних зв'язків фіксувалися за алгоритмом LINCS; електростатичні взаємодії обчислювалися методом PME; параметр відсічення (cutoff), рівний 1.2 нм, було використано для всіх типів взаємодій (Ван дер Ваальсових та електростатичних); температуру системи підтримували постійною при 300 K за допомогою термостату V-rescale. Для другого етапу врівноваження системи було використано ансамбль NPT (температура та тиск системи константні). Врівноваження системи було продовжено з попереднього етапу, швидкості були взяті з траєкторії і проводилося протягом 1 нс з кроком 2 фс. Тиск системи контролювали за допомогою Parrinello-Rahman баростату, який був рівний 1 атм. Параметри обчислень рівноважної динаміки були подібними до параметрів другого етапу врівноваження системи. Відмінністю є лише відсутність накладання гармонійних обмежуючих потенціалів на важкі атоми протеїну та ліганда. Координати атомів системи записувалися в траєкторію кожні 10 пс. Аналіз водневих зв'язків проведено за допомогою програми g_hbond пакету GROMACS, яка розраховує водневі зв'язки між всіма можливими донорними та акцепторними групами. Такі параметри як RMSD, RMSF, радіус гірації, енергія взаємодії були пораховані внутрішніми утилітами GROMACSy.

Молекулярне моделювання потрібного комплексу. За основу використали змодельовану структуру дволанцюгової протофібрили фібрину, з якої було видалено всі молекули фібрину, крім однієї, зв'язаної з D-димером за

допомогою "A"- "a" knob-hole взаємодій [101]. Кристалографічна структура (PDB ID: *1LTJ*) D-регіону молекули фібрину з ко-кристалізованими пептидами GPRP та GHRP була використана для протеїн-протеїнового докінгу з метою отримання потрібного комплексу. Протеїн-протеїновий докінг проводили в програмі HDOCK, де амінокислотні залишки N-кінцевої частини суперспіральної ділянки молекули фібрину були визначені як “активні” амінокислоти рецептору. Відсутню неструктуровану частину В β -ланцюга фібрину добудовували за допомогою програми MODELLER 10.2, зберігаючи координати GHRP в "b"- hole незмінними.

4.2.17. Крупнозерниста молекулярна динаміка.

Крупнозернисту молекулярну динаміку комплексу фібрин - D-димер та фібрин - D-димер - D-регіон виконували за допомогою підходу Elnedyn у поєднанні з силовим полем Martini2 у програмному забезпеченні Gromacs-2020.6 [102, 103, 104]. Пружні обмеження (elastic constraints) застосовували як усередині фібрину, D-димеру, так і між "A"-knobs та "a"-holes, що запобігало дисоціації фібрину та D-димеру. У випадку молекулярної динаміки фібрин - D-димер - D-регіон додаткові пружні обмеження накладалися всередині D-регіону та між "B"-knob фібрину і "b"-hole D-регіону. Після конвертації комплексів з повноатомної репрезентації у крупнозернисту та розміщення їх у додекаедричних коробках з мінімальною відстанню 1 нм від протеїну до будь-якої сторони боксу, проводили коротку енергетичну мінімізацію у вакуумі. Потім систему сольватували і нейтралізували додаванням іонів з подальшою мінімізацією енергії протягом 40000 кроків з $dt = 0,03$ нс. Позиційно-обмежене еквілібрування в NPT ансамблі проводили протягом 500000 кроків з $dt = 0,03$ нс. Нарешті, для комплексів фібрин - D-димер і фібрин - D-димер - D-фрагмент було проведено 150-нс і 500-нс молекулярну динаміку, відповідно. Скрипт *Initram.sh* було використано для відтворення повноатомної структури з крупнозернистої з подальшою двоступеневою мінімізацією енергії протягом 15000 кроків з $dt = 0,0002$ та 10000 кроків з $dt = 0,0005$ нс, еквілібруванням

протягом 5000 кроків з $dt = 0,001$ нс та короткою молекулярною динамікою протягом 5000 кроків з $dt = 0,002$ нс [105]. Метою такого постпроцесингу є переважно поліпшення вторинної структури, оскільки однією з основних проблем молекулярної динаміки з використанням крупнозернистих силових полів є втрата елементів вторинної структури через обмеження бекмапінгу.

4.2.18. Підхід *Umbrella sampling* (US)

Даний метод було використано для розрахунку абсолютної вільної енергії зв'язування калікс[4]аренів з N-кінцевою частиною A α -ланцюга молекули фібрину. Стабільну конформацію з молекулярної динаміки комплексу було використано як початкову конформацію для моделювання дисоціації ліганду від протеїну для чого було застосовано зовнішню гармонійну силу. Атоми Ca протеїну утримувалися під час *steered molecular dynamics* (SMD) за допомогою невеликого гармонійного потенціалу. Таким чином, ліганди дисоціювали за допомогою гармонійної сили з константою сили на пружині $k = 600$ кДж/моль/нм² вздовж реакційної координати (ξ). Швидкість витягування була експериментально підібрана і дорівнювала $v = 0,005$ нм/пс. Тривалість SMD моделювання становила 500 пс. Силу витягування і координати центру мас ліганду реєстрували кожні 0,1 пс протягом симуляції. Конформації комплексів для подальших розрахунків було відібрано за збільшенням відстані між центрами мас ліганду і протеїну на 0.1 - 0.2 нм, які потім використовувалися як початкові структури для US моделювання [106]. Таким чином було отримано від 12 до 14 “вікон”, які характеризують перехід від зв'язаного до незв'язаного стану ліганду вздовж реакційної координати (ξ). Інтервал в ~ 0.1 нм було використано лише для початкових стадій, коли ліганд ще міцно зв'язаний з рецептором, після руйнування зв'язків інтервал збільшили до ~ 0.2 нм. Отримані конформації були використані для US моделювання протягом 10 нс. Таким чином, тривалість молекулярної динаміки для одного комплексу складала від 120 до 140 нс. Щоб уникнути початкових флуктуацій, перші 0,5 нс динаміки були вилучені з аналізу. Метод аналізу зваженої гістограми (*weighted*

histogram analysis method (WHAM)) був використаний для розрахунку потенціалу середньої сили (PMF) вздовж реакційної координати (ξ), відповідно до протоколу gmx wham [107, 108].

4.2.19. MTT-тест

Життєздатність клітин MDA-MB-231, оброблених різними концентраціями отриманого інгібітору uPA, вимірювали за допомогою MTT-тесту, який базується на перетворенні MTT у кристали за допомогою мітохондріальної дегідрогенази. Клітини вносили зі щільністю 1×10^4 клітин/лунку в 96-лункові планшети за 12 годин до обробки інгібітором протягом 24, 48 і 72 годин. 20 мкл MTT (5 мг/мл у фосфатному буферному розчині) додавали в кожен лунку за 4 години до бажаної кінцевої точки, щоб розчинити кристали формагану. Поглинання, яке представляло собою оптичну щільність (OD), вимірювали при 570 нм. Контрольна та експериментальна групи отримували 0, 25, 50, 100 та 150 мкмоль/л інгібітору протягом 24, 48 та 72 годин.

4.2.20. Статистичний аналіз

Статистичну обробку проводили з використанням пакету Microsoft Excel. Аналізи проводили в серії з трьох повторностей. Для аналізу даних було враховано стандартне відхилення. Результати представлені як середнє значення \pm стандартне відхилення.

РОЗДІЛ 5. ДОСЛІДЖЕННЯ МІЖМОЛЕКУЛЯРНИХ ВЗАЄМОДІЙ У DDE-ТРИАДИ З ВИКОРИСТАННЯМ D-ДИМЕРУ ТА D-ФРАГМЕНТУ ФІБРИН(ОГЕН)У

5.1. Формування міжмолекулярних комплексів фібрину з D-димером та D-фрагментом фібрин(оген)у

Хроматографія за виключенням по розміру дозволяє розділяти різні протеїни залежно від їх молекулярної маси. Вона також може бути використана для виявлення великих, високоафінних протеїн-протеїнових комплексів.

На першому етапі дослідження було одержано суміш фібрину desAB (1 мг/мл) з D-димером та D-фрагментом у молярному співвідношенні 0,8:1:1, які було нанесено на сефарозу 6B (0,5x45) після 30 хвилин інкубації при кімнатній температурі. Процес елюції контролювали спектрофотометрично, а склад отриманих фракцій аналізували за допомогою SDS-PAGE.

Цей підхід виявив утворення потрібного комплексу, що містить фібрин desAB, D-димер та D-фрагмент. Об'єм елюції комплексу становив 5,5-6 мл (рис. 5.1 А), і згідно даним SDS-PAGE (рис. 5.1 Б) комплекс складався з фібрину desAB, D-димеру та D-фрагмента. Елюційний об'єм є підтвердженням комплексоутворення, оскільки об'єм елюції для індивідуальних D-димеру і D-фрагменту складає 8 та 9 мл відповідно.

Денситометрія електроферограм з використанням TotalLab TL100, показала, що густина пікселів у смугах, що відповідали фібрину desAB, D-димеру та D-фрагменту, була однакова. Це означає, що потрібний комплекс desAB фібрину з D-димером та D-фрагментом утворюється у співвідношенні приблизно 1:1:1.

D-E-D взаємодії під час формування протофібрил добре вивчена, і тому можна було б очікувати зв'язування D-димеру з фібрином desAB. Однак було незрозуміло, які саме активні центри в складі D-E-D комплексів беруть участь у взаємодії D-фрагмента з комплексом D-димеру з фібрином desAB. Тому

завданням було виявити можливі сайти таких взаємодій. Для досягнення цієї мети досліджували комплексоутворення з використанням двох різних форм фібрину: desA фібрину (з експонованим центром полімеризації "А", без експонованого центру полімеризації "В" і з нативним нерозщепленим фрагментом В β 1-42, в який входить сайт полімеризації "С") або desAB-desB β 15-42 фібрину (з експонованим центром полімеризації "А", тоді як центр полімеризації "В" і сайт полімеризації "С" у N-кінцевих ділянках В β -ланцюга були видалені шляхом протеолізу).

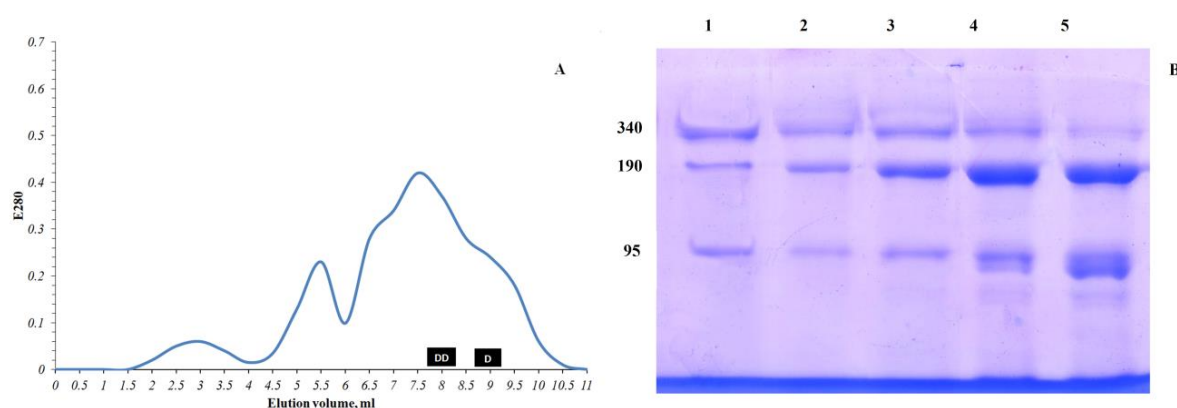


Рис. 5.1. Профіль елюції суміші desAB фібрину, D-димеру та D-фрагмента на сефарозі 6В у молярному співвідношенні 0,8:1:1 з отриманим SDS-PAGE аналізом складу фракцій. [А] - профіль елюції з позначеними зонами елюції індивідуального D-димеру (DD) та D-фрагмента (D). (Б) - SDS-PAGE отриманих фракцій: 1 - суміш до розділення; 2 – фракція, елюйована на 5-му мл; 3 – фракція, елюйована на 5,5-му мл; 4 - фракція, елюйована на 6,5-му мл; 5 - фракція, елюйована на 8,5-му мл.

В обох випадках формування потрійного комплексу не було виявлено. Фібрин desA утворював комплекс з D-димером, а елюція D-фрагмент відбувалася пізніше в зоні вільної молекули. Денситометрія показала, що густина пікселів у смугах фібрину desA та D-димеру була однаковою, з чого витікає, що отриманий комплекс складався з однієї молекули фібрину desA та однієї молекули D-димеру (рис. 5.2). Фібрин desAB-desB β 15-42 також

зв'язувався виключно з D-димером, D-фрагмент не входив до комплексу і пізніше елюювався, як вільний D-фрагмент (рис. 5.3).

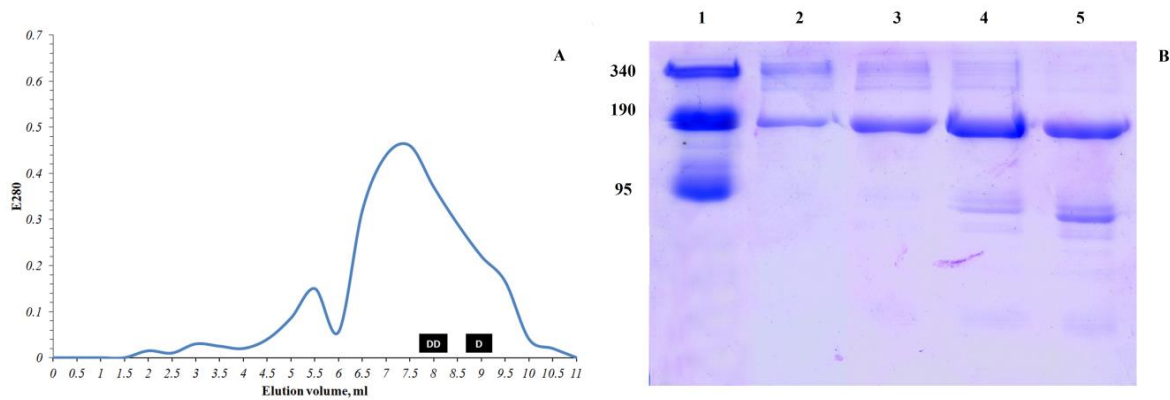


Рис. 5.2. Профіль елюції на сефарозі 6В суміші desA фібрину, D-димеру та D-фрагменту (0,8:1:1) з отриманим SDS-PAGE аналізом складу фракцій. [A] - профіль елюції з позначеними зонами елюції індивідуального D-димеру (DD) та D-фрагмента (D). (Б) - SDS-PAGE отриманих фракцій: 1 - суміш до розділення; 2 – фракція, елюйована на 5-му мл; 3 – фракція, елюйована на 5,5-му мл; 4 - фракція, елюйована на 6,5-му мл; 5 - фракція, елюйована на 8,5-му мл.

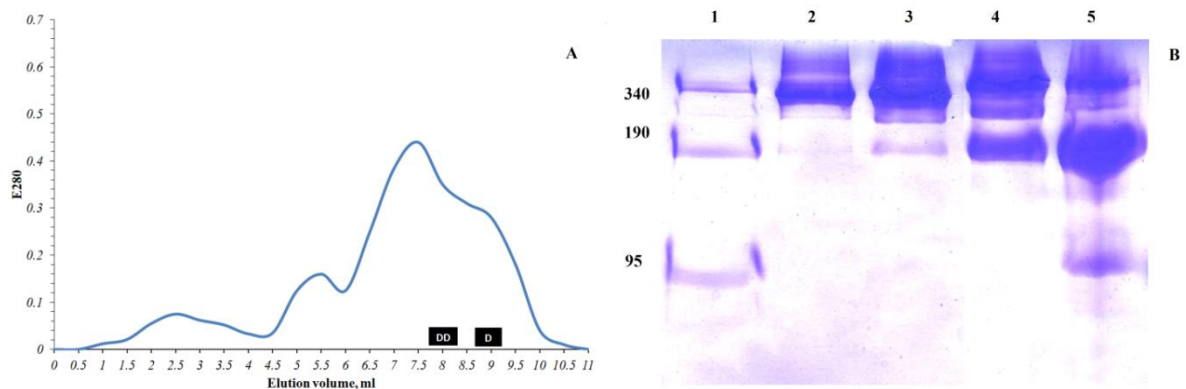


Рис. 5.3. Профіль елюції на сефарозі 6В суміші desAB-desB β 15-42, D-димеру та D-фрагменту (0,8:1:1) фібрину з отриманим SDS-PAGE аналізом складу фракцій. (А) - профіль елюції з позначеними зонами елюції індивідуального D-димеру (DD) та D-фрагмента (D). (Б) - SDS-PAGE отриманих фракцій: 1 - суміш до розділення; 2 – фракція, елюйована на 5-му мл; 3 – фракція,

елюйована на 5,5-му мл; 4 - фракція, елюйована на 6,5-му мл; 5 - фракція, елюйована на 8,5-му мл.

Наступним кроком було з'ясування, який саме активний центр фрагмента $V\beta 1-42$ бере участь у взаємодії фрагмента D з комплексом D-димеру та фібрину desAB. Для досягнення цієї мети було досліджено утворення комплексу з використанням фібрину desAB (який мав експоновані центри полімеризації "A" і "B" та сайт полімеризації "C") у присутності пептиду GHRP (пептид $V\beta 15-18$, що імітує центр полімеризації "B" і взаємодіє з центром полімеризації "b") або у присутності пептиду $V\beta 1-42$ (містить сайт полімеризації "C" і взаємодіє з відповідним сайтом "c" у D-регіоні).

Було показано, що пептид GHRP, доданий до суміші D-димеру, D-фрагмента та фібрину desAB, запобігає утворенню потрібного комплексу – виявлено лише комплекс фібрину desAB з D-димером (рис. 5.4). В свою чергу, пептид $V\beta 1-42$ в аналогічному експерименті не перешкоджав утворенню потрібного комплексу фібрину desAB, D-димеру та D-фрагмента (рис. 5.5).

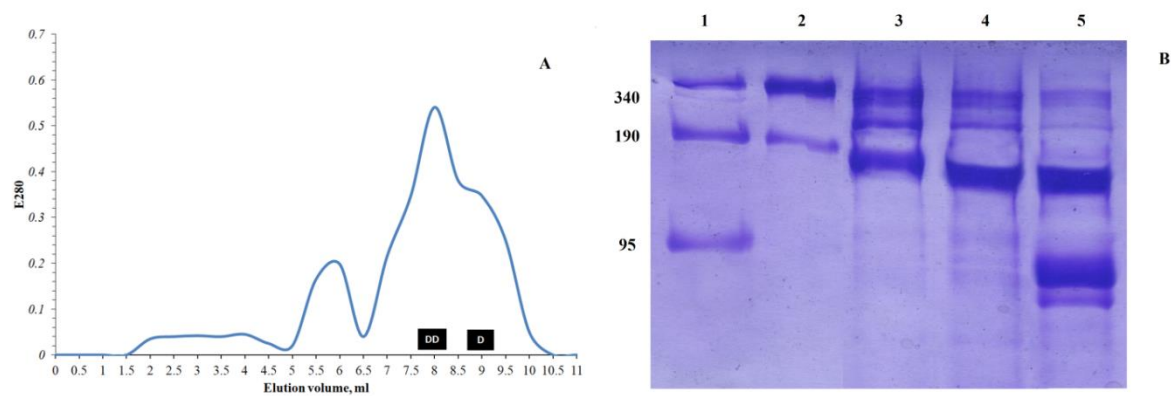


Рис. 5.4. Профіль елюції на сефарозі 6В суміші фібрину desAB, D-димеру та D-фрагменту (0,8:1:1) у присутності пептиду GHRP (масове співвідношення фібрину desAB до пептиду становило 1:100) з отриманим аналізом складу фракцій у SDS-PAGE-аналізі. (А) - профіль елюції з позначеними зонами елюції індивідуального D-димеру (DD) та D-фрагмента (D). (Б) - SDS-PAGE отриманих фракцій: 1 - суміш до розділення; 2 - фракція, елюйована на 5,5-му

мл; 3 - фракція, елюйована на 6-му мл; 4 - фракція, елюйована на 7-му мл; 5 - фракція, елюйована на 8,5-му мл.

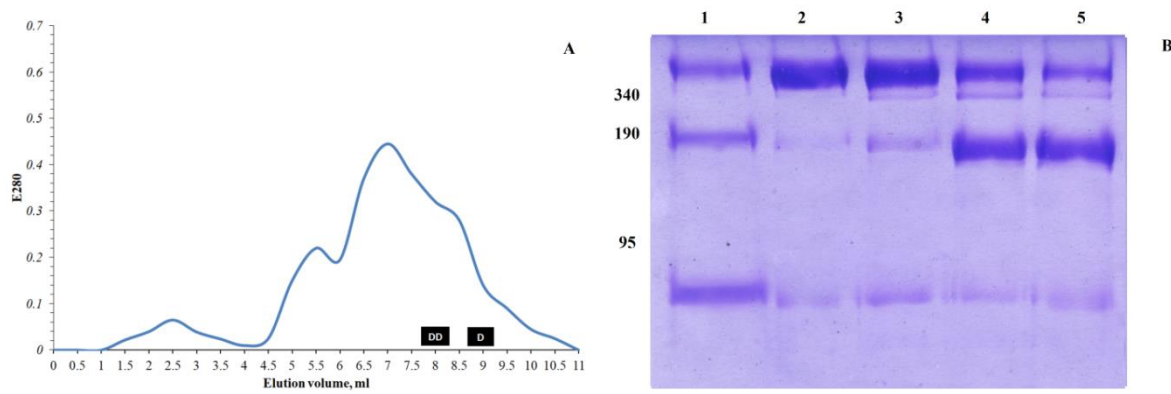


Рис. 5.5. Профіль елюції на сефарозі 6В суміші фібрину desAB, D-димеру та D-фрагменту (0,8:1:1) у присутності пептиду B β 1-42 (масове співвідношення фібрину desAB до пептиду становило 1:100) з отриманим аналізом складу фракцій у SDS-PAGE-аналізі. (А) - профіль елюції з позначеними зонами елюції індивідуального D-димеру (DD) та D-фрагмента (D). (Б) - SDS-PAGE отриманих фракцій: 1 - суміш до розділення; 2 – фракція, елюйована на 5-му мл; 3 – фракція, елюйована на 5,5-му мл; 4 - фракція, елюйована на 6,5-му мл; 5 - фракція, елюйована на 8,5-му мл.

5.2. Інгібування полімеризації фібрину D-димером та D-фрагментом

Турбідиметричне дослідження проводили, вважаючи, що за умов аналізу особливостей полімеризації фібрину про формування комплексу «DD-desAB» свідчитиме інгібіторна дія DD-фрагменту, а на включення у DDE-тріаду додаткової D-одиниці вказуватиме посилення інгібування полімеризації D-фрагментом.

Виходячи з цих міркувань, досліджували ефект D димеру та D димеру в суміші з D-фрагментом за еквімолярного співвідношення до фібриногену на тромбін-індуковану полімеризацію фібрину.

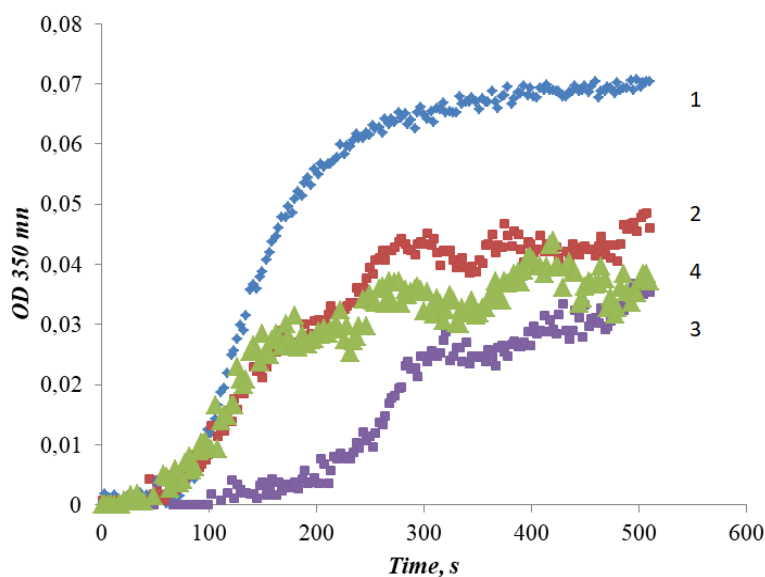


Рис. 5.6. Зміна мутності під час тромбін-індукованої полімеризації фібрину в присутності D-димеру або D-димеру разом з D-фрагментом чи D-димеру з D-фрагментом у присутності GHRP. Фрагменти брали в молярному співвідношенні 1:1 до фібриногену. GHRP брали у молярному співвідношенні 1:100 до фібриногену.

- 1 - тромбін-індукована полімеризація фібрину;
- 2 - тромбін-індукована полімеризація фібрину в присутності D-димеру;
- 3 - тромбін-індукована полімеризація фібрину в присутності D-димеру разом з D-фрагментом;
- 4 - тромбін-індукована полімеризація фібрину в присутності D-димеру та D-фрагмента в присутності пептиду GHRP.

D-димер, взятий у молярному співвідношенні 1:1 до фібрину, суттєво інгібував полімеризацію, зменшуючи фінальну мутність згустку вдвічі. Не виявлено впливу на лаг-період полімеризації фібрину (рис. 5.6, крива 2). Додавання D-фрагмента в еквімолярній кількості різко збільшувало лаг-період полімеризації: до 160 ± 15 с порівняно з 20 ± 5 с у контролі. Також у цьому випадку ми виявили збільшення кінцевої мутності згустку в порівнянні з системою, що містила лише D-димер, що може свідчити про порушення тривимірної структури згустку (рис. 5.6, крива 3).

Якщо припущення правильне і таке включення третьої D-одиниці відбувається шляхом залучення «B:b»-взаємодій, то інгібіторний ефект D-фрагменту повинен знижуватися внесенням у суміш пептиду GHRP, що конкурує з центром полімеризації «B» за центри полімеризації «b», розташовані у D-регіонах.

Важливо відзначити, що присутність пептиду GHRP не впливала на інгібуючу дію D-димеру на тромбін-індуковану полімеризацію фібрину (рис. 5.6, крива 4). Однак адитивний ефект D-фрагмента майже усувався в присутності пептиду GHRP (рис. 5.6, крива 4). Подовження лаг-періоду полімеризації фібрину під дією додаткового D-фрагмента в присутності GHRP скорочувалося майже вдвічі (90 ± 15 с) порівняно зі системою без GHRP. Ми також не спостерігали суттєвого впливу додавання D-фрагмента на кінцеву мутність фібринового згустку (рис. 5.6, крива 4).

Результати турбідиметричних досліджень узгоджуються з даними по комплексоутворенню і демонструють, що D-фрагмент може втручатися у D-E-D взаємодію в комплексі desAB фібрину та D-димеру, посилюючи інгібуючий антиполімеризаційний ефект останнього. Ми припускаємо, що цей факт є непрямым підтвердженням утворення потрібного комплексу, що включає desAB фібрин, D-димер і D-фрагмент, який може виникати під час полімеризації фібрину.

5.3. Структура полімерів фібрину, утворених за присутності D-димеру та D-фрагменту

Електронна мікроскопія згустків полімерного фібрину, отриманих на етапі виходу кривої на плато за умов, описаних у розділі 5.2, дозволила порівняти інгібіторний ефект D-димеру з ефектом суміші D-димеру з D-фрагментом. Було показано, що фібрили полімерного фібрину не зазнають помітних змін за умов формування у присутності D-димеру. Сформований згусток мав чітку структуру, був помітно розгалужений (рис. 5.7, B).

Імовірно, виступаючи прямим інгібітором полімеризації, фібрину D-димер гальмував цей процес, але все ж володів меншою спорідненістю до молекул мономерного фібрину, аніж інші молекули мономерного фібрину. В результаті, попри меншу швидкість фібриноутворення, згусток формується все ж із протофібрил та фібрил фібрину, без включення D-димеру – тобто після того, як D-димер витісняється зі структури молекулами фібрину.

Іншу картину спостерігаємо за внесення у систему D-димеру та D-фрагменту. Відповідно до описаної вище теорії, D-мономери здатні включаючись у структуру протофібрил та фібрил, не перешкоджаючи їхній побудові. Тому за присутності D-мономеру формуються «дефектні» протофібрили, а з них – фібрили. На рис. 5.7, С помітно структуру такого згустку. Його фібрили є загалом тоншими, спостерігається інтенсивне галуження тонких фібринових ниток. Вочевидь, така порушена структура і призводить до зростання кінцевої мутності згустку фібрину за присутності еквімолярної суміші з D-димеру та D-фрагменту.

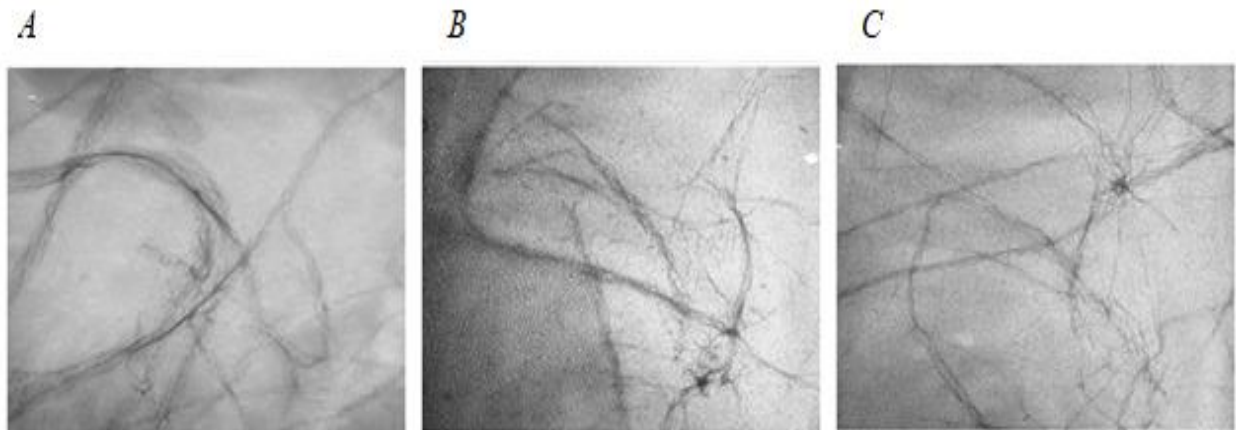


Рис. 5.7. Електронна мікроскопія згустків фібрину, утворених за дії тромбіну на фібриноген в присутності D-димеру або D-димеру разом з D-фрагментом. (А) – полімеризований нативний desAB фібрин. (В) – полімеризований нативний desAB фібрин у присутності D-димеру, взятого в еквімолярному співвідношенні до фібрину. (С) – полімеризований нативний desAB фібрин у присутності D-димеру разом з D-фрагментом, взятих в еквімолярному співвідношенні до фібрину.

5.4. Молекулярне моделювання комплексу desAB фібрин-D-димер-D-фрагмент

Просторову структуру потрійного комплексу desAB фібрин-D-димер-D-фрагмент було змодельовано за допомогою молекулярного докінгу в програмі HDOCK, взявши за основу модель структури протофібрили. Для цього було виконано докінг D-фрагменту до структури, що складається з фібрину, зв'язаного з D-димером за рахунок пари 'A':'a' взаємодій. В результаті докінгу найбільш енергетично приваблива модель характеризувалася наступними взаємодіями: γ -модуль D-фрагменту контактує з β - і γ -модулями однієї половини D-димеру і з γ -модулем іншої половини, тоді як β -модуль D-фрагменту контактує лише з β - і γ -модулями однієї половини D-димеру. Крім того, N-кінцева частина D-фрагменту, що являє собою суперспіральний домен, взаємодіє з суперспіральною частиною E-домену фібрину за допомогою численних водневих зв'язків і Ван-дер-Ваальсових контактів. Виходячи з експериментальних результатів, що взаємодія між D-областю та фібрином зумовлена зв'язуванням "B"-knob з "b"-hole, було змодельовано відсутню частину В β -ланцюга фібрину для реалізації цього контакту. Одержану модель комплексу фібрин desAB - D-димер - D-фрагмент представлено на рисунку 5.8.

Однак, необхідно зазначити, що дана програма, так само як і інші, не були протестовані на ефективність докінгу таких великих протеїнів, що мають велику площу поверхні, доступну для розчинника (SAS) та не містять гідрофобних кишень, що залучаються до взаємодії. Таким чином, незважаючи на логічність даної моди зв'язування, ця модель залишається лише теоретично можливою.

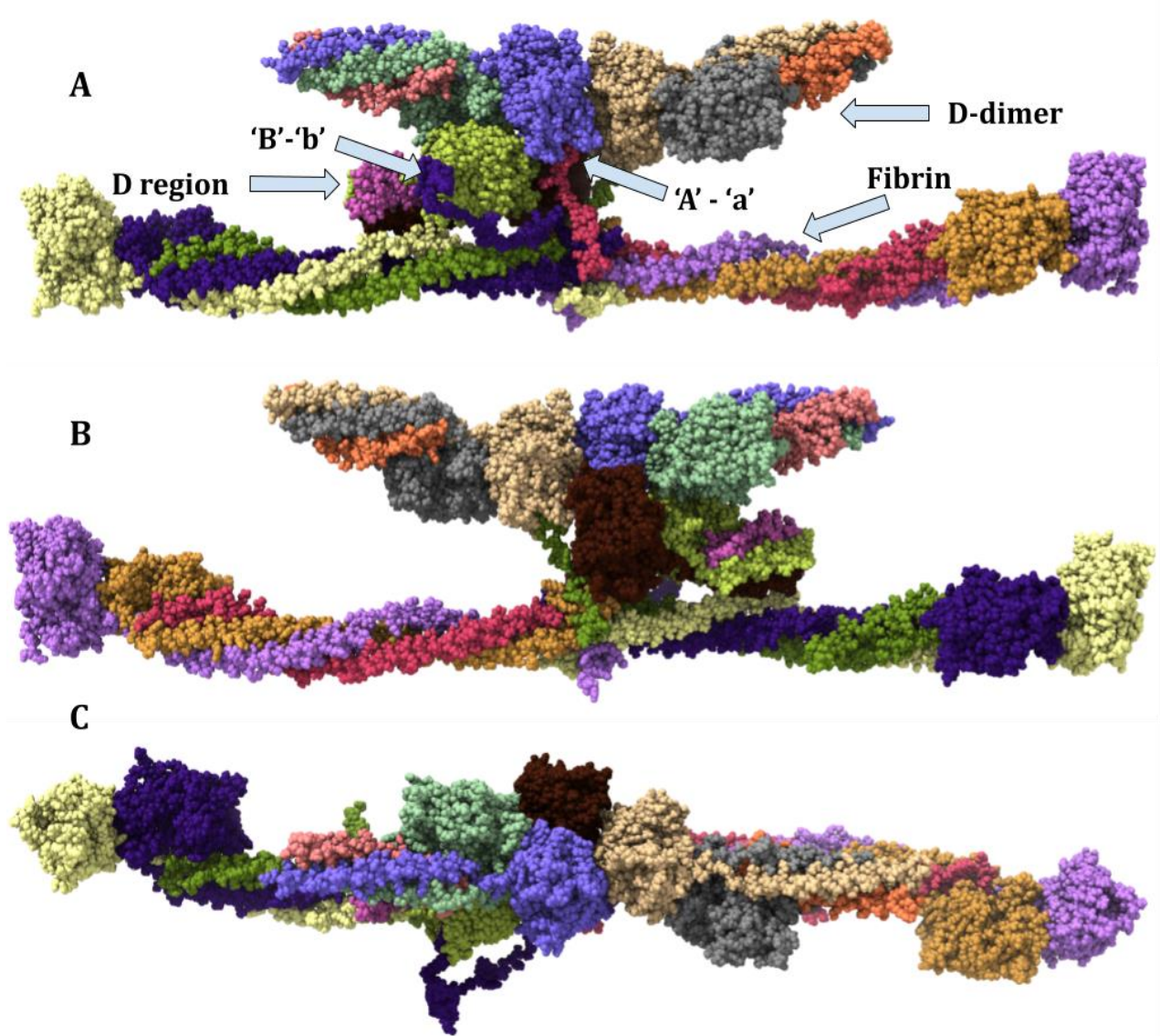


Рис. 5.8. Теоретична модель потрійного комплексу desAB фібрину, D-димеру та D-фрагмента, отримана в результаті молекулярного докінгу за допомогою програмного забезпечення HDOCK. А) вигляд комплексу спереду, Б) вигляд комплексу після його повороту на 180° відносно до проекції з А, В) вигляд зверху на комплекс. Підписи розташування фібрину, D-димеру та D-фрагмента в потрійному комплексі показано на панелі А. Фібрин зв'язаний з D-димером за допомогою двох пар взаємодій 'A' - 'a'. D-фрагмент приєднується до комплексу фібрин - D-димер через взаємодії "B" - "b", а також через численні контакти з D-димером і фібрином. Друга N-кінцева частина В β -ланцюга була опущена, оскільки було незрозуміло, чи взаємодіє вона з D-димером, чи залишається незв'язаною. Візуалізацію виконували в програмі ChimeraX 1.2.5. [109].

Щоб дослідити зміну положення D-димеру по відношенню до молекули фібрину та охарактеризувати протеїн-протеїнові взаємодії, було застосовано молекулярну динаміку. Швидкість розрахунку молекулярної динаміки залежить від розміру досліджуваної молекули та об'єму, який вона буде займати у боксі. Оскільки розміри і форма молекули фібрину передбачають залучення значних розрахункових потужностей, проведення повноатомної молекулярної динаміки такої великої молекули як фібрин суттєво ускладнене. Тому нами було використано крупнозернисту молекулярну динаміку в силовому полі Martini2, при якому 4 важкі атоми амінокислоти об'єднуються в один псевдоатом. Кожен амінокислотний залишок складається з одного "backbone" псевдоатома та від нуля до чотирьох псевдоатомів бічного ланцюга, в залежності від типу амінокислотного залишку. Вторинна структура протеїну впливає як на вибрані типи псевдоатомів, так і на параметри такі як довжина ковалентного зв'язку/кут/двогранні кути. Окрім цього було необхідно врахувати виповнення структури протеїнів комплексу молекулами води. Таким чином, при використанні крупнозернистої молекулярної динаміки відбувається спрощення системи, що впливає на час розрахунку, та на те, що енергетичний ландшафт стає більш "згладженим", що дозволяє за більш короткий термін часу спостерігати конформаційні зміни в протеїні. З іншого боку, це може призвести до нереалістичних конформацій з частковою втратою третинної структури.

Саме це ми і спостерігали при використанні класичного підходу з силовим полем Martini2, при якому порушувалась структура суперспірального регіону молекули фібрину, а також вторинна структура в D-регіонах. Крім того, відбувалося значне зміщення положення "β" і "γ"-вузлів відносно один одного під час молекулярної динаміки, що не узгоджується з експериментальними даними.

Зважаючи на це, додатково було використано ElNeDyn (**Elastic Network in Dynamics**). У цьому підході еластичну сітку (набір гармонічних зв'язків між взаємодіючими ділянками) використовують як структурний каркас для визначення і контролю загальної форми молекули. Потім еластичну сітку

поєднують з крупнозернистим молекулярним силовим полем для опису внутрішньо- та міжмолекулярних взаємодій. Гармонічні зв'язки були створені як для молекул фібрину, D-димеру, так і між центрами полімеризації "A" і "a", що перешкоджало дисоціації фібрину і D-димеру. У випадку молекулярної динаміки фібрин - D-димер - D-фрагмент були застосовані додаткові гармонічні зв'язки в межах D-фрагменту та між центром полімеризації "B" молекули фібрину і центром полімеризації "b" D-фрагменту.

За результатами крупнозернистої молекулярної динаміки комплексу фібрин desAB - D-димер ми спостерігали початок зміщення D-димеру до суперспіральної ділянки однієї половини молекули фібрину через приблизно 40 нс після початку динаміки (рис. 8A). Така зміна положення пояснює причину приєднання лише однієї молекули D-фрагменту до комплексу фібрин - D-димер, що було показано за допомогою денситометрії фракції, що відповідає потрібному комплексу, незважаючи на наявність двох пар центрів полімеризації "B": "b" та наявність двох потенційних сайтів взаємодії, що сформовані поверхнею D-димера і фібрину, і розділених N-кінцевими ділянками A α -ланцюгів фібрину. Такий нахил, однак, неможливий, коли D-димер є частиною 2 молекул фібрину в складі протофібрили через стеричні зіткнення. Подібний результат було отримано в системі desAB фібрин - D-димер - D-фрагмент, в якому також спостерігається нахил D-димеру до молекули фібрину (рис. 5.9, Б). Схоже, що в даній системі D-фрагмент зв'язується з комплексом після того, як D-димер нахилиється до половини молекули фібрину, а не асоціація D-фрагменту з комплексом індукує цей зсув. Проте цей нахил не є обов'язковим для приєднання D-фрагменту, таким чином D-фрагмент може зв'язатися з DD-E тріадою в складі протофібрили.

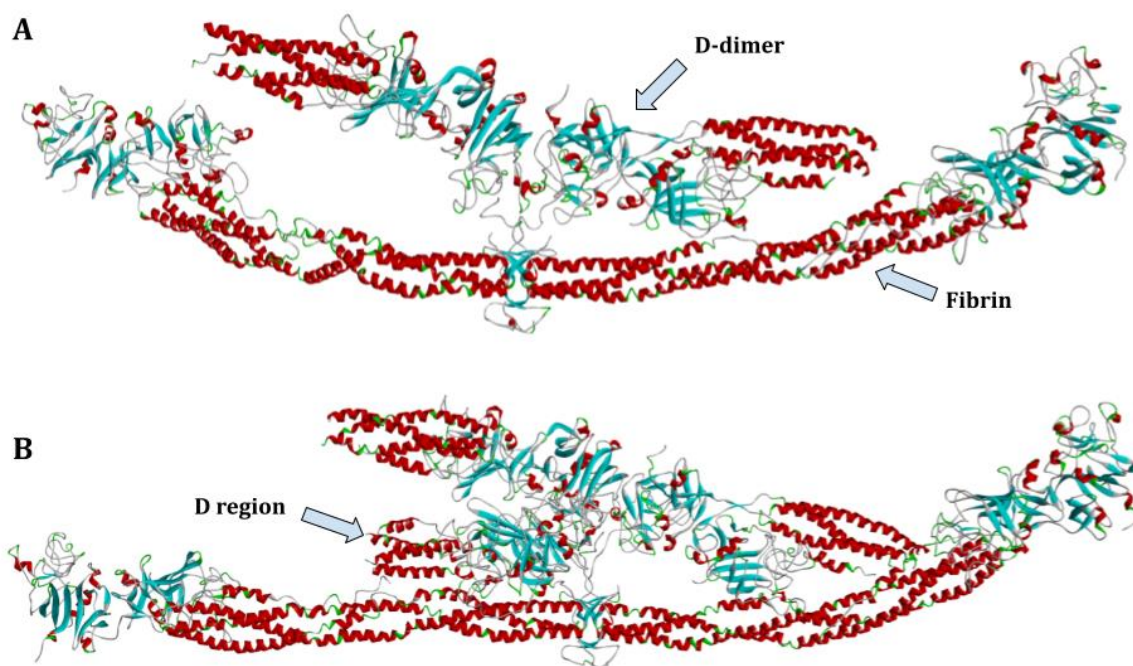


Рис. 5.9. Знімки з крупнозернистої молекулярної динаміки. А) комплекс desAB фібрин - D-димер, Б) комплекс desAB фібрин - D-димер - D-фрагмент. Крупнозернисті структури спочатку було трансформовано у повноатомні за допомогою скрипта `initram.sh` з незначною зміною параметрів. В ході молекулярної динаміки D-димер нахиляється до однієї половини молекули фібрину, що пояснює спостереження, що в комплексі задіяний лише один D-фрагмент. Крім того, цей факт також суперечить варіанту, що D-фрагмент зв'язується з комплексом так само, як і латерально асоційовані протофібрили. Візуалізація виконана в BIOVIA, Dassault Systèmes, Visualizer, 2016.

5.5. Роль D-фрагменту в галуженні протофібрил фібрину

Розгалуження протофібрил бере участь у формуванні тривимірної фібринової сітки, яка є основою кров'яного згустку. Механізм розгалуження протофібрил на сьогоднішній день повністю не встановлений, хоча саме розгалуження на початкових етапах самозбирання фібрину може визначати структуру всієї фібринової сітки.

Існує кілька моделей розгалуження протофібрил. Найпростішою і найочевиднішою є модель тетрамолекулярної точки розгалуження. Вона полягає у розгалуженні двох пар протофібрил, які почали асоціювати латерально (рис. 5.10.A).

Тримолекулярна модель точки розгалуження виникає, коли остання молекула фібрину на кінці протофібрили (так званий "липкий кінець") ініціює розгалуження шляхом взаємодії 'A':'a' з двома різними молекулами фібрину (Рис. 5.10, B). Цей же механізм може забезпечити формування тетрамолекулярної точки розгалуження (рис. 5.10, C).

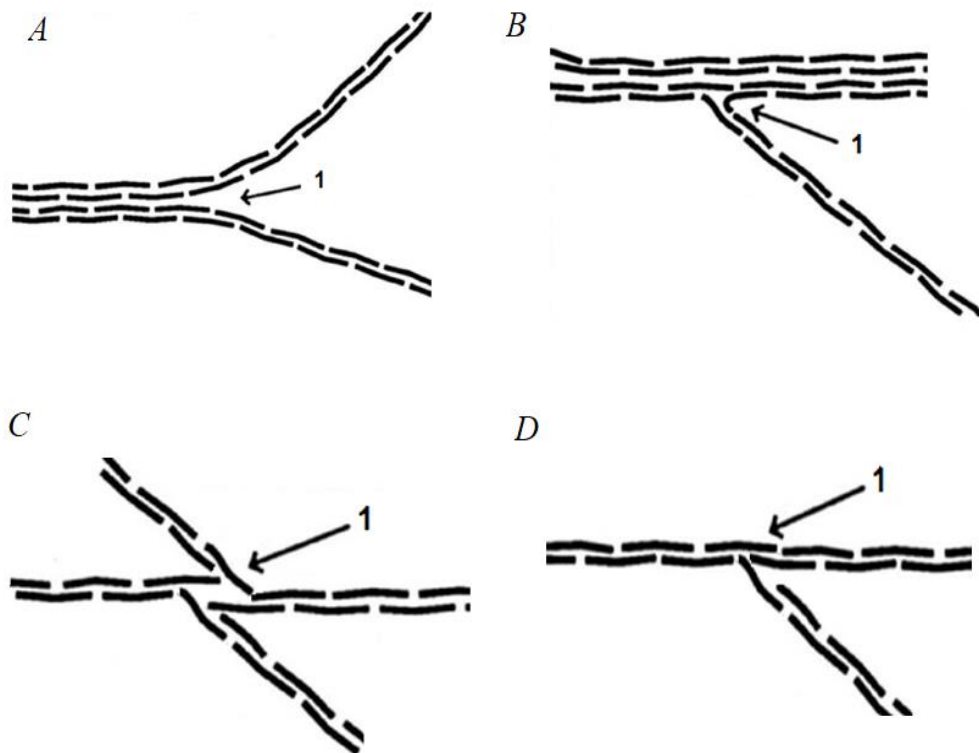


Рис. 5.10. Основні моделі розгалуження протофібрил. (A) Розгалуження двох пар протофібрил, які почали асоціювати латерально. (B) Точка тримолекулярного розгалуження, "A": "a" взаємодія однієї молекули фібрину в протофібрилі з двома різними молекулами фібрину. [C] Точка тетрамолекулярного розгалуження, 'A':'a' взаємодії двох молекул фібрину в протофібрилі з двома різними молекулами фібрину. (D) Включення D-регіону

молекули фібрину, що відноситься до однієї протофібрили, у D-E-D структуру іншої протофібрили, через 'B':'b'-взаємодії.

Отримані результати дозволяють запропонувати ще одну модель галуження протофібрил. Ця модель полягає у включенні D-регіону молекули фібрину, що відноситься до однієї протофібрили, у D-E-D структуру, що належить іншій протофібрилі, через взаємодію центрів полімеризації 'B' та b' (рис. 5.10, D). Безпосереднє спостереження потрійного комплексу desAB фібрину, D-димеру та D-фрагмента дозволило нам припустити такий механізм розгалуження. Виявлений потрійний комплекс безпосередньо моделював потенційну точку розгалуження в протофібрилі: центральна частина desAB фібрину взаємодіє з двома іншими молекулами фібрину, з'єднаними в протофібрилі кінець в кінець, а D-регіон молекули desAB фібрину з іншої протофібрили взаємодіє з центральною молекулою desAB за допомогою 'B'-'b'-взаємодій (Рис. 5.11).

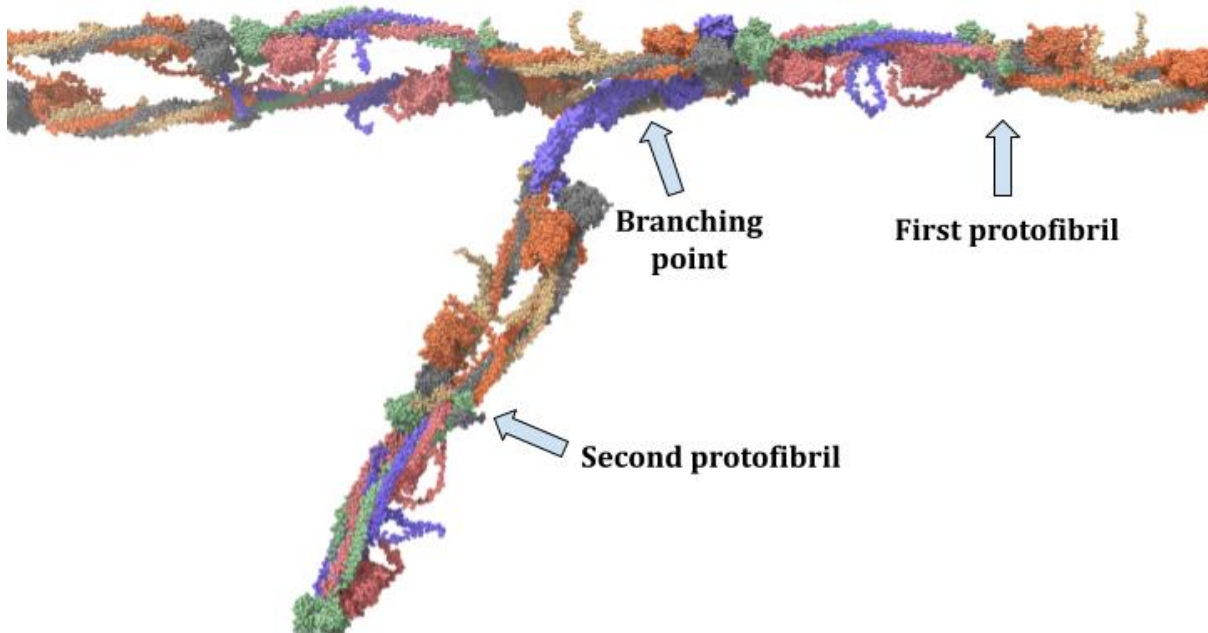


Рис. 5.11. Гіпотетична модель розгалуження протофібрил. Цей тип розгалуження базується на включенні D-регіону, що належить одній протофібрилі, в D-E-D структуру іншої протофібрили. Модель протофібрил було взято з роботи Barsegov et al [101]. У цій моделі D-регіон, який є частиною повної молекули фібрину і являє собою точку розгалуження, належить другій протофібрилі. Візуалізація виконана в програмі ChimeraX 1.2.5.

РОЗДІЛ 6. РОЛЬ ШАРНІРНОЇ ОБЛАСТІ ФІБРИН(ОГЕН)У В ПРОЦЕСАХ ФОРМУВАННЯ ТА ЛАТЕРАЛЬНОЇ АСОЦІАЦІЇ ПРОТОФІБРИЛ ФІБРИНУ

6.1. Вивчення інгібіторної дії пептидів на полімеризацію фібрину

Процес полімеризації фібрину, який призводить до утворення згустку, включає в себе три послідовні етапи: трансформацію фібриногену (Fg) у фібрин під дією тромбіну; формування протофібрил із мономерів фібрину; латеральну асоціацію протофібрил з утворенням фібрилярної сітки полімерного фібрину – основи тромбу. Механізми латеральної асоціації до кінця не з'ясовано. Існує припущення про двостадійну латеральну взаємодію протофібрил, яка здійснюється D-регіонами сусідніх протофібрил. На першому етапі рушійною силою є контакти між γ C-субдоменами (γ 350-360 і γ 370-380) D-регіонів. Другий етап взаємодії супроводжується відщепленням FpV і взаємодією сайтів B:b сусідніх протофібрил. Це призводить до віддалення β C-субдомену від суперспірального конектора і утворення контакту з сусідніми β C-субдоменами за участю ділянок B β 330-375. До компонентів, які залучені в латеральну асоціацію також відносять, α C-регіони та суперспіральну ділянку молекули фібрину [110]. В суперспіральному регіоні міститься шарнірна ділянка, яка відповідає послідовності α 99-110, β 130-155, γ 70-100 [111]. Пізніше було отримано моноклональне антитіло FnI-3C, яке зв'язувалось з молекулою фібрину desAB з високою афінністю та містило епітоп до фрагменту B β 118-134 [112]. Було показано, що FnI-3C інгібувало латеральну асоціації протофібрил, таким чином підтверджуючи важливу роль суперспірального регіону в полімеризації фібрин. Результати подальших досліджень із використанням синтетичних пептидів, що імітують амінокислотну послідовність ділянок фібрин(оген)у B β 109-126 (QTSSSSQFVMVLLKDLWQ), B β 121-138 (LKDLWQKRQKQVKDNENV) і його scrambled-варіанту

(DKWVQVELKKQKRNDLNQ), показали, що сайт, який залучений в процес латеральної асоціації знаходиться в ділянці В β 126-135.

Спираючись на ці дані наша гіпотеза полягала в тому, що оскільки пептиди з β -ланцюга шарнірної ділянки можуть інгібувати полімеризацію фібрину і знаючи, що даний фрагмент є важливим для конформаційної рухливості фібрину, то пептиди з α - та γ -ланцюгів шарнірної ділянки молекули фібрину також можуть проявляти інгібуючий ефект. У зв'язку з цим нами було досліджено вплив синтетичних пептидів А α 91-103, В β 125-135 та γ 69-77, які відповідають амінокислотній послідовності А α 91-103 (MEILRGDFSSANN) В β 126-135 (QKRQKQVKDN) та γ 69-77 (NPDESSKPN), відповідно, на полімеризацію фібрину, як окремо, так і в комбінації.

Вплив пептидів А α 91-103, В β 126-135 та γ 69-77 на полімеризацію фібрину досліджували методом турбідиметрії. Турбідиметричний аналіз полімеризації фібрину проводили в 0,05 М амоній-ацетатному буфері рН 7,4, який містив 0,15 М NaCl та 0,1 мМ CaCl₂. Концентрація фібрину в пробі становила 0,1 мг/мл. Пептиди А α 91-103, В β 126-135 та γ 69-77 вносили в концентраціях від 0,2 до 1,4 мМ. Полімеризацію фібрину індукували АЧТЧ-реагентом (Рис. 6.1).

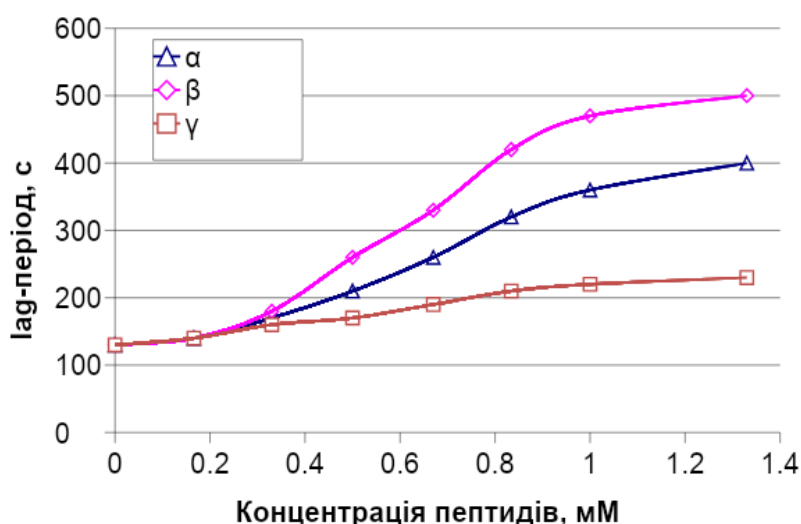


Рис. 6.1. Подовження lag-періоду полімеризації фібрину, індукованої АЧТЧ-реагентом, за присутності пептидів, які імітують фрагменти шарнірної області фібрин(оген)у. β – В β 126-135 (QKRQKQVKDN); α – А α 91-103 (MEILRGDFSSANN); γ – γ 69-77 (NPDESSKPN).

Аналізом полімеризаційних кривих виявлено концентраційну залежність інгібування полімеризації фібрину пептидами. При концентрації 1 мМ пептиду A α 91-103, лаг-період зростає в 3 рази, B β 125-135 - в 4,5 рази, а γ 69-77 лише в 1,75 разів. Внесення до середовища полімеризації 1,4 мМ пептиду B β 125-135 призводило до повного інгібування полімеризації фібрину.

Для додаткової характеристики інгібувальної дії суміші пептидів вивчали їхній ефект на полімеризацію фібрину у системі фібриноген-тромбін з використанням методу турбідиметрії.

Суміш цих пептидів розчиняли у трис-HCl буфері pH 7,4 з 0,15 М NaCl. До лунки планшету вносили розчин пептидів у об'ємі 30 мкл (кінцева концентрація кожного становила 0,33 мМ), донорську плазму крові людини (70 мкл), АЧТЧ-реагент (70 мкл) та інкубували протягом 3 хв при температурі 25 °С. Потім до лунки вносили 130 мкл розчину 25 мМ CaCl₂ у 0,02 М HEPES буфері pH 7,4 з 0,15 М NaCl. Формування фібринового згустку фіксували за зміною мутності середовища інкубації на автоматичній системі вимірів у мікропланшетах за довжини хвилі 405 нм. Вимірювання проводили протягом 10 хв. Інгібування полімеризації фібрину фіксували за подовженням lag-періоду формування фібринового згустку – часу з моменту внесення до середовища інкубації розчину CaCl₂ до початку фази експоненційного зростання мутності середовища III (Рис. 6.2).

Результат свідчить, що внесення кожного із досліджуваних пептидів (кінцева концентрація кожного становить 0,33 мМ) окремо призводила до подовження lag-періоду полімеризації в 1,3-1,4 рази. Водночас синергічна дія трьох пептидів – структурних аналогів шарнірної ділянки молекули фібрин(оген)у (A α 91-103 MEILRGDFSSANN, B β 126-135 QKRQKQVKDN та γ 69-77 NPDESSKPN) викликала зменшення швидкості латеральної асоціації та подовження lag-періоду полімеризації в 2-2,2 рази (Рис. 6.2).

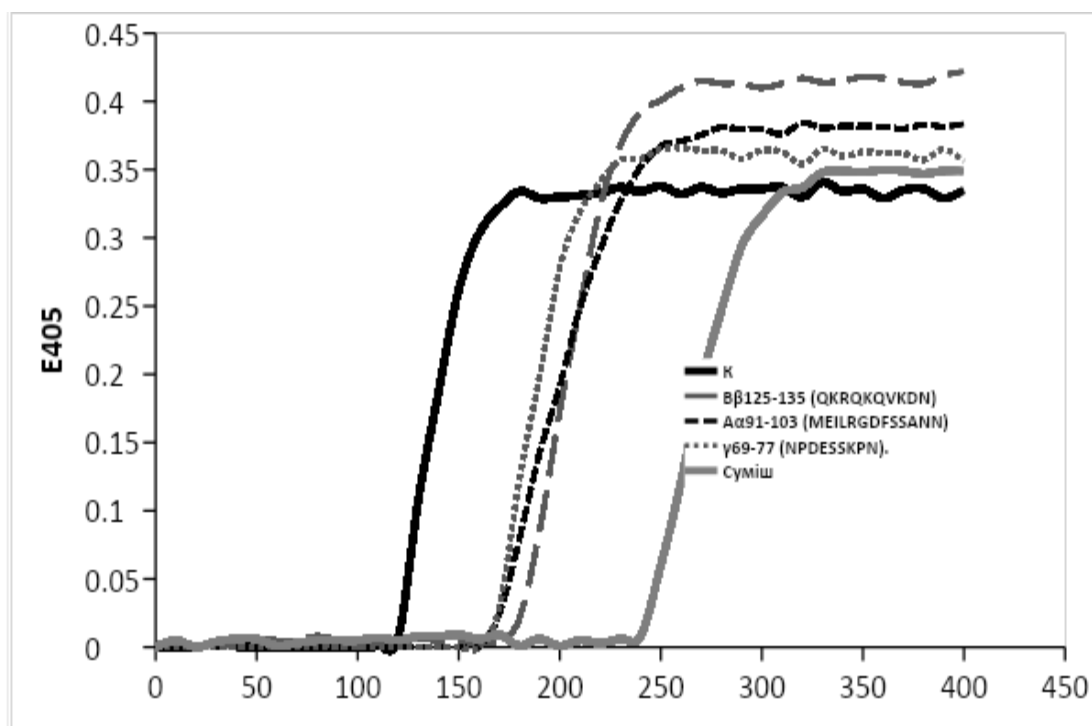


Рис. 6.2. Подовження lag-періоду полімеризації фібрину в плазмі крові, активованої АЧТЧ-регентом, за присутності пептидів (0,33 мМ), які імітують фрагменти шарнірної області фібрин(оген)у, у суміші та окремо: β – B β 125-135 (QKRQKQVKDN), α – A α 91-103 (MEILRGDFSSANN), γ – γ 69-77 (NPDESSKPN).

Подовження lag-періоду пов'язане не з блокуванням центрів полімеризації “А” та “а” (хоча не можна виключати можливість неспецифічної взаємодії), а з відтермінуванням початку латеральної асоціації, оскільки зв'язування пептидів стерично блокує місце розміщення молекули фібрину з іншої протофібрили.

Таким чином, показано інгібіторну дію структурних аналогів суперспіральної ділянки молекули фібрину – пептидів γ 69-77 (NPDESSKPN), B β 125-135 (QKRQKQVKDN) та A α 91-103 (MEILRGDFSSANN) – на процес самоскладання протофібрил. Ефект має синергічний характер та вказує на вагому роль суперспіральної ділянки молекули фібрину на його полімеризацію.

6.2. Молекулярне моделювання

У галузі комп'ютерної структурної біології, коли тривимірна структура протеїну експериментально встановлена або передбачена за допомогою низки *in silico* алгоритмів, ключовим і надзвичайно непересічним завданням є ідентифікація функціонально значущих ділянок. До них відносяться, наприклад, сайти зв'язування низькомолекулярних органічних сполук, протеїнів або ділянки, які зазнають посттрансляційних модифікацій. Для вирішення цих завдань існує велика кількість підходів, характеристика яких не входить до завдань даної роботи. Для визначення можливих сайтів, які залучені в латеральну асоціацію протофібрил і розміщені в суперспіральній ділянці молекули фібрину, нами було використано ScanNet (Spatio-Chemical Arrangement of Neighbors Network), яка являє собою інтерпретовану, багатомасштабну систему глибокого навчання, ретельно розроблену для аналізу протеїнових структур [113]. ScanNet будує модель атомів та амінокислот на основі просторово-хімічного розташування їхніх сусідів і навчена для розпізнавання сайтів зв'язування, що охоплюють взаємодії протеїн-протеїн, протеїн-антитіло та ділянок протеїна, що взаємодіють з внутрішньо неупорядкованими протеїнами.

ScanNet визначив два сайти, що містяться в суперспіральній ділянці, як можливі протеїн-протеїнові контактні зони (Рис. 6.3). Один з таких сайтів був детектований в частині шарнірної ділянки молекули фібрину. До амінокислотних залишків, які можуть приймати участь у взаємодії віднесено: β -ланцюг - Y117, L120, L121, L124-K133, V138 і α -ланцюг - M91, E92, R95, S99. Проте програма не показала, що амінокислотні залишки γ -ланцюга в шарнірній ділянці можуть бути залучені до взаємодії. Другий потенційний сайт був визначений в С-кінцевій частині суперспіральної ділянки. Інтерфейс взаємодії в даному випадку сформований амінокислотними залишками α -ланцюга: D180, K183, Q184, Q187 та β -ланцюга: R166, R169, S170, E173 (Рис. 6.3).

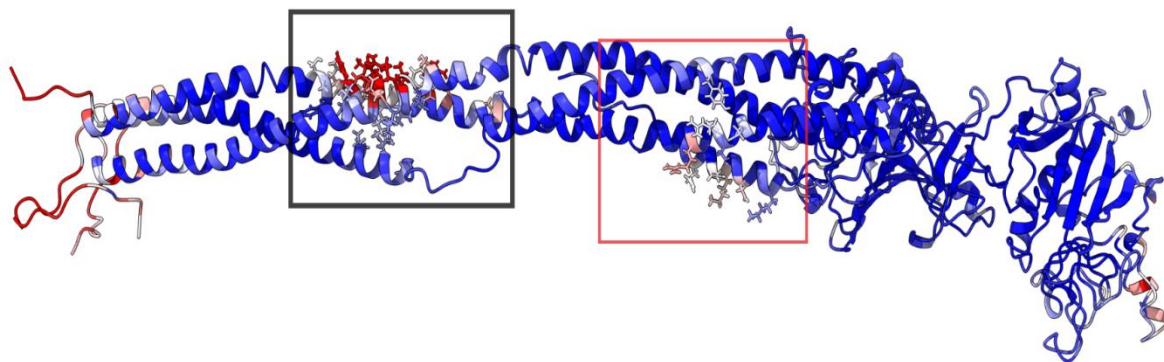


Рис. 6.3. Визначені ScanNetом сайти, які можуть бути залучені до протеїн-протеїнових взаємодій. Чорним квадратом позначено сайт, який відповідає шарнірній ділянці фібрину, червоним - потенційне місце взаємодії пептидів, які імітують фрагменти шарнірної області фібрин(оген)у.

Doolittle запропонував модуль латеральної асоціації протофібрил, за якою протофібрили взаємодіють за рахунок D-регіонів молекул фібрину, що належать різним протофібрилам. При такій взаємодії суперспіральні ділянки наближаються одна до одної взаємодіючи бічними ланцюгами амінокислотних залишків (Рис. 6.4). Таким чином, шарнірна ділянка, що належить молекулі фібрину однієї протофібрили, взаємодіє з С-кінцевою частиною суперспіральної ділянки молекули фібрину іншої протофібрили.

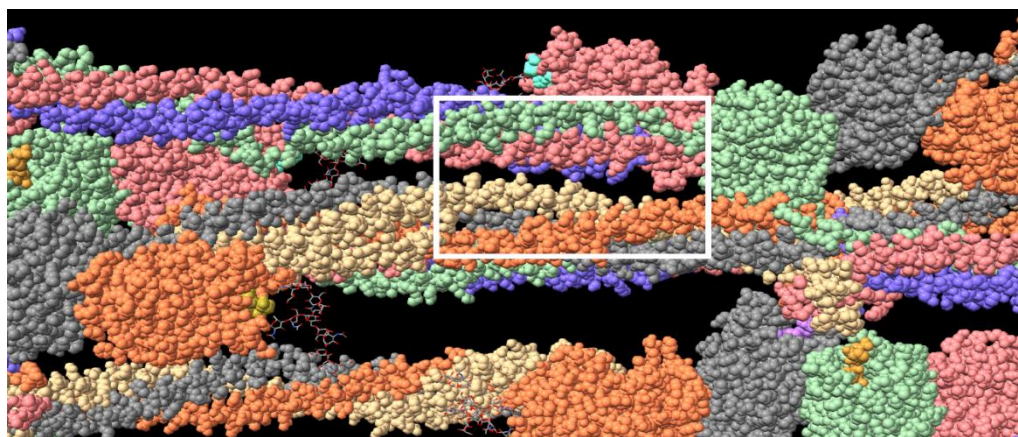


Рис. 6.4. Теоретична модель 2 латерально-асоційованих протофібрил, запропонована [114]. В білому квадраті показано ймовірний інтерфейс

взаємодії між суперспіральними ділянками двох латерально-асоційованих протофібрил.

Отже, було встановлено два сайти взаємодії, що розташовані в суперспіральній ділянці і залучені до латеральної асоціації протофібрил, причому другий сайт являється місцем зв'язування пептидів, які імітують фрагменти шарнірної області фібрин(оген)у, які у свою чергу є частиною першого сайту.

Для молекулярного докінгу нами було отримано конформації пептидів. Пептиди – структурні аналоги фрагментів суперспіральної ділянки молекули фібрин(оген)у $\text{A}\alpha 91\text{-}103 \text{ MEILRGDFSSANN}$, $\text{B}\beta 126\text{-}135 \text{ QKRQKQVKDN}$, $\gamma 69\text{-}77 \text{ NPDESSKPN}$ були відтворені в програмі Rymol, з використанням скрипту `build_seq.py`. Для кожного пептиду було отримано три граничні конформації: α -спіральна, поліпролін-II та витягнута конформації. N- та C-кінцеві амінокислотні залишки були кеповані ацетильною та метильною групами, відповідно.

Повноатомну динаміку пептидів було проведено в програмі Gromacs. Схема роботи однакова для всіх трьох пептидів: підготовлено топології, молекули розміщено в додекаедричному боксі, дистанція від граничних атомів комплексу до стінок боксу не перевищувала 1 нм. Розмір боксу був один для трьох граничних конформацій (обирали бокс, розрахований для витягнутої конформації). Далі проведено енергетичну мінімізацію у вакуумі протягом 1000 кроків. Після чого додано молекули води, йони і повторно запущено енергетичну мінімізацію. Еквілібрування системи проводили послідовно під NVT та NPT умовами з накладанням гармонічних обмежуючих потенціалів на важкі атоми. По завершенню проведено коротку молекулярну динаміку та фінальне еквілібрування у відсутності обмежуючих потенціалів. Останнім кроком є проведення продуктивної молекулярної динаміки протягом 50 нс. Ці етапи повторено для трьох конформацій пептиду. В результаті отримано для кожного пептиду по три траєкторії різних конформацій (Рис.6.5).

Відбір структур проводився за рахунок кластеризації з використанням Dihedral Principal Component Analysis. Для цього три траєкторії були об'єднані в одну, видалено кепуючі групи з траєкторії. Після чого створено файл топології атомів основного ланцюга протеїну і файл траєкторії з відповідними координатами. Наступним етапом було видалення двограних кутів, побудова коваріативної матриці. Оскільки перші два власних векторів (Principal Components) характеризуються найбільшою варіативністю в даних, ми використали їх для аналізу, розраховуючи Potential Mean Force і проєктуючи вектори один на одного для отримання 2D ландшафту вільної енергії. Після чого її було трансформовано в 3D, використовуючи інверсію Больцмана. В результаті були відібрані конформації ідентифіковані PCA: для A α 91-103 отримано 17 конформацій + 3 граничних, для B β 126-135 - 18 + 3 граничних, для γ 69-77 - 12 + 3 граничних (Рис. 6.5).

Отримані конформації були продокеровані в кристалографічну структуру фібрину (PDB ID: 3GHG) за допомогою програм HADDOCK, FlexPepDock, HPEPDOCK [95, 96, 97]. Визначені на попередньому етапі амінокислотні залишки суперспіральної ділянки з другого сайту зв'язування - Q184 та R169, були використані в якості активних амінокислотних залишків (під активними розуміється, що вони прямо залучені у взаємодію з пептидами), таким чином обмежуючи простір для докінгу. Відбір комплексів пептид - протеїн відбувався спираючись на розраховану програмою енергію взаємодії чи score, а також на аналіз водневих зв'язків та сольових містків.

За результатами молекулярного докінгу пептид A α 91-103 MEILRGDFSSANN формує міцний комплекс з α - та β -ланцюгами молекули фібрину, формуючи наступні водневі зв'язки: Met'1 - Glu173(β), Glu'2 - Arg166(β) та Arg169(β), Ser'10 - Ser170(β) та Gln184(α), Asn'12 - Asp180(α), Asn'13 - Lys176(α) (штрихом позначено амінокислотний залишок пептиду, α - та β відповідає ланцюгам протеїну). Окрім водневих зв'язків важливий вклад у стабілізацію комплексу вносять сольові містки між Met'1 - Glu173(β), Glu'2 - Arg166(β) та Arg169(β) та Asn'13 - Lys176(α) (Рис. 6.6).

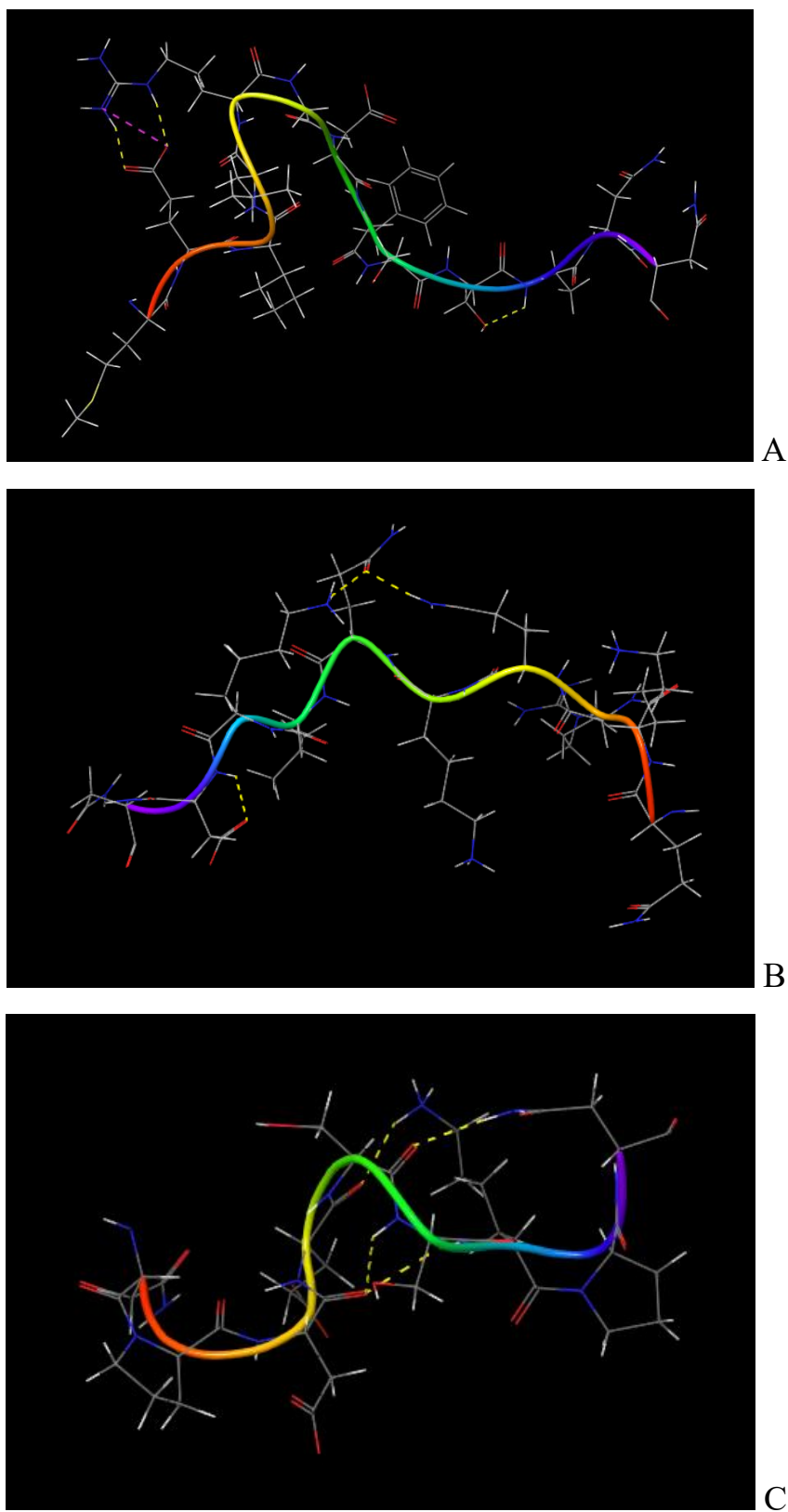


Рис. 6.5. Приклад конфорації пептиду A α 91-103 MEILRGDFSSANN (A), B β 126-135 QKRQKQVKDN (B), γ 69-77 NPDESSKPN (C).

Найкращий результат для пептиду B β 126-135 QKRQKQVKDN було отримано за допомогою серверу FlexPerDock, хоча докінг не був направлений в напрямку другого сайту зв'язування, а відбувався “сліпо” (blind docking). Проте варто зазначити, що даний комплекс “виглядає слабше”, ніж у випадку з A α 91-103. Пептид формує меншу кількість водневих зв'язків, а саме: Arg'4 - Asp177(α) та Asp180(α), Gln'5 - Asp180(α), Lys'9 - Thr306(α), Asn'11 - Ser302(α) і лише один сольовий місток між Arg'4 та Asp180(α) (Рис. 6.7). В цілому, алгоритм зміг правильно розпізнати сайт зв'язування, проте певні функціонально активні групи не залучені до взаємодії.

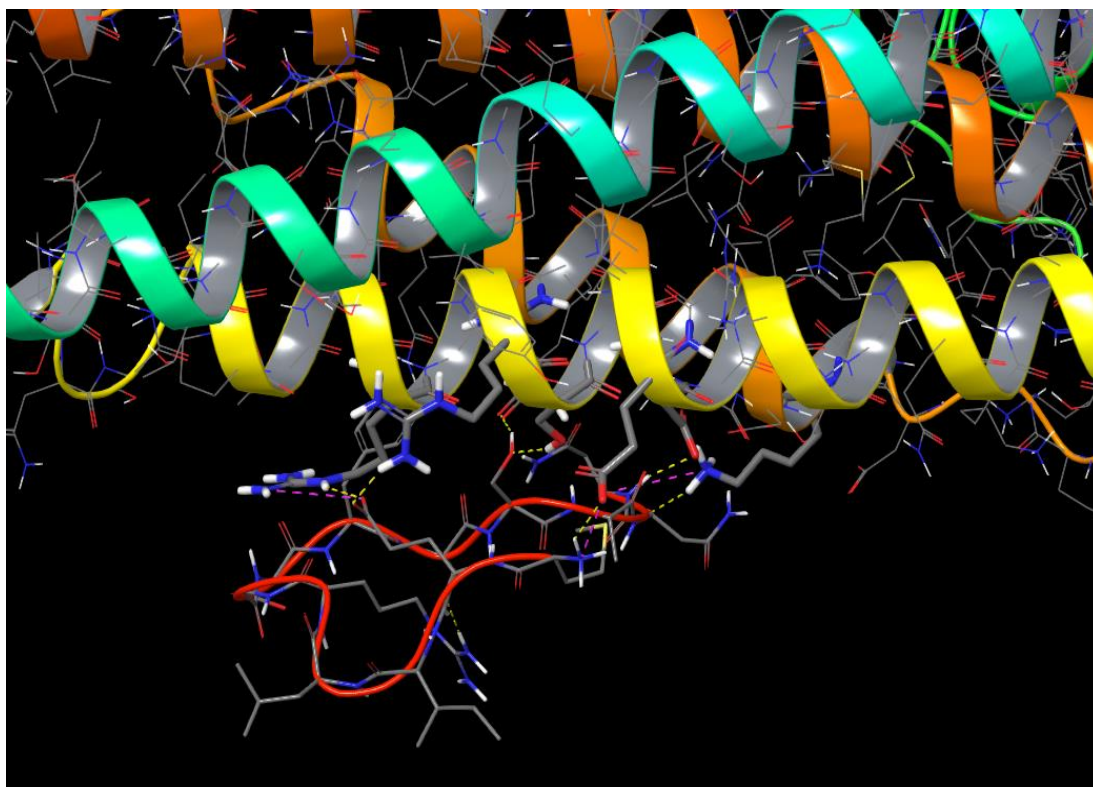


Рис. 6.6. Комплекс пептиду A α 91-103 MEILRGDFSSANN з молекулою фібрину, отриманий за допомогою HPERDOCK. Жовтою пунктирною лінією позначено водневі зв'язки, рожевою - сольові містки між зарядженими амінокислотами.

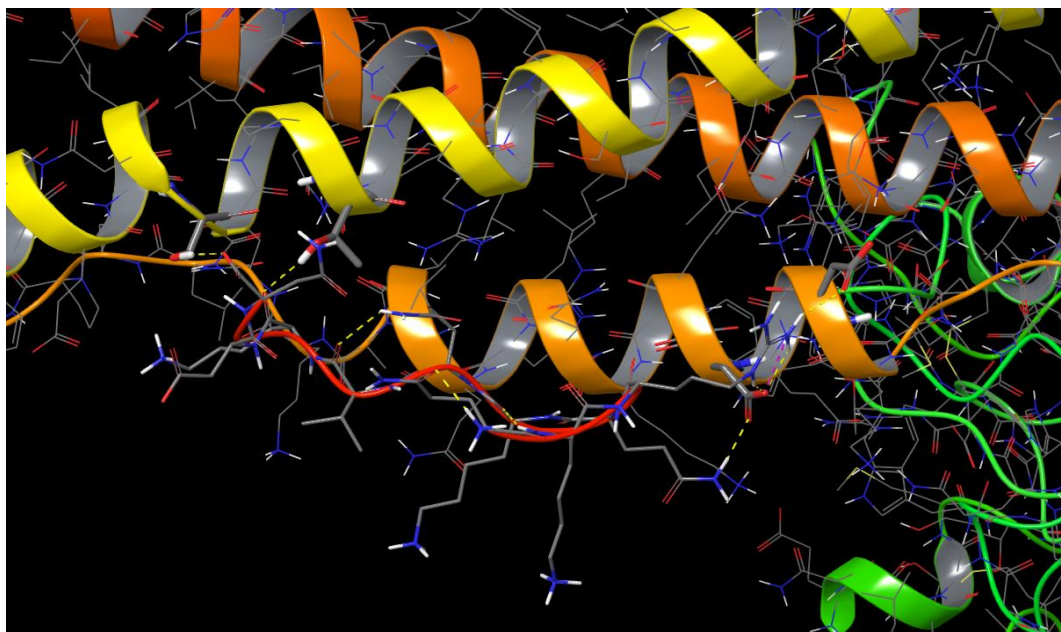


Рис. 6.7. Комплекс пептиду B β 126-135 QKRQKQVKDN з молекулою фібрину, отриманий за допомогою FlexPepDock. Жовтою пунктирною лінією позначено водневі зв'язки, рожевою - сольові містки між зарядженими амінокислотами.

В той же час результати молекулярного докінгу пептиду γ 69-77 NPDESSKPN виявились абсолютно незадовільними: жоден з використаних алгоритмів не зміг визначити позу зв'язування з достатнім скором.

Як ми можемо бачити з результатів молекулярного докінгу пептидів A α 91-103 та B β 126-135 вони формують зв'язки з різними амінокислотними залишками в межах другої контактної зони. Порівнявши моди зв'язування, ми можемо припустити, що при одночасному зв'язуванні з фібрином пептиди починають взаємодіяти один з одним, формуючи водневі зв'язки між акцепторами і донорами водневих зв'язків, які не залучені до взаємодії з протеїном, тим самим додатково стабілізуючи своє положення на поверхні суперспіральної ділянки. Саме це явище пояснює синергічний інгібуючий ефект суміші пептидів на полімеризацію пептидів, встановлений за допомогою турбідиметрії.

РОЗДІЛ 7. ВСТАНОВЛЕННЯ МЕХАНІЗМУ ІНГІБІТОРНОЇ ДІЇ СПОЛУК КАЛІКС[4]АРЕНОВОГО РЯДУ НА ПРОЦЕС ПОЛІМЕРИЗАЦІЇ ФІБРИНУ

7.1. Калікс[4]арени – прямі інгібітори полімеризації фібрину

Оскільки полімеризація фібрину є ключовим процесом у тромбоутворенні, пошук сполук, які б безпосередньо пригнічували фібриноутворення, може відкрити шлях до розробки та впровадження антитромботичних засобів нового типу. Попри перспективність цього напрямку, досі не створено достатньо ефективних, безпечних та доступних інгібіторів полімеризації фібрину, придатних до застосування *in vivo*.

У Інституті органічної хімії НАН України було створено нову сполуку – натрієву сіль 5,11,17,23-біс(дигідроксифосфорил)метилкалікс[4]арену (С-145). У Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України було показано, що ця сполука безпосередньо інгібує полімеризацію фібрину. С-145 може стати основою для створення антитромботичного препарату нового типу, який вибірково інгібуватиме формування полімерного фібрину, таким чином запобігаючи внутрішньосудинному тромбоутворенню.

Було показано, що С-145 зв'язується з «А»-центром полімеризації фібрину, однак точного молекулярного механізму таких взаємодій не було встановлено.

Нами було зроблено припущення, що С-145 зв'язується з центром полімеризації фібрину «А» шляхом електростатичних взаємодій чотирьох заряджених фосфатних груп. При цьому остов молекули надає фосфатним групам оптимальної конформації.

Для перевірки такого припущення та виявлення механізму специфічної дії С-145 на процес полімеризації фібрину було порівняно властивості форм калікс[4]арену (Рис. 7.1), які відрізнялися за кількістю залишків метиленбісфосфонової кислоти з використанням підходів *in vitro* та *in silico*.

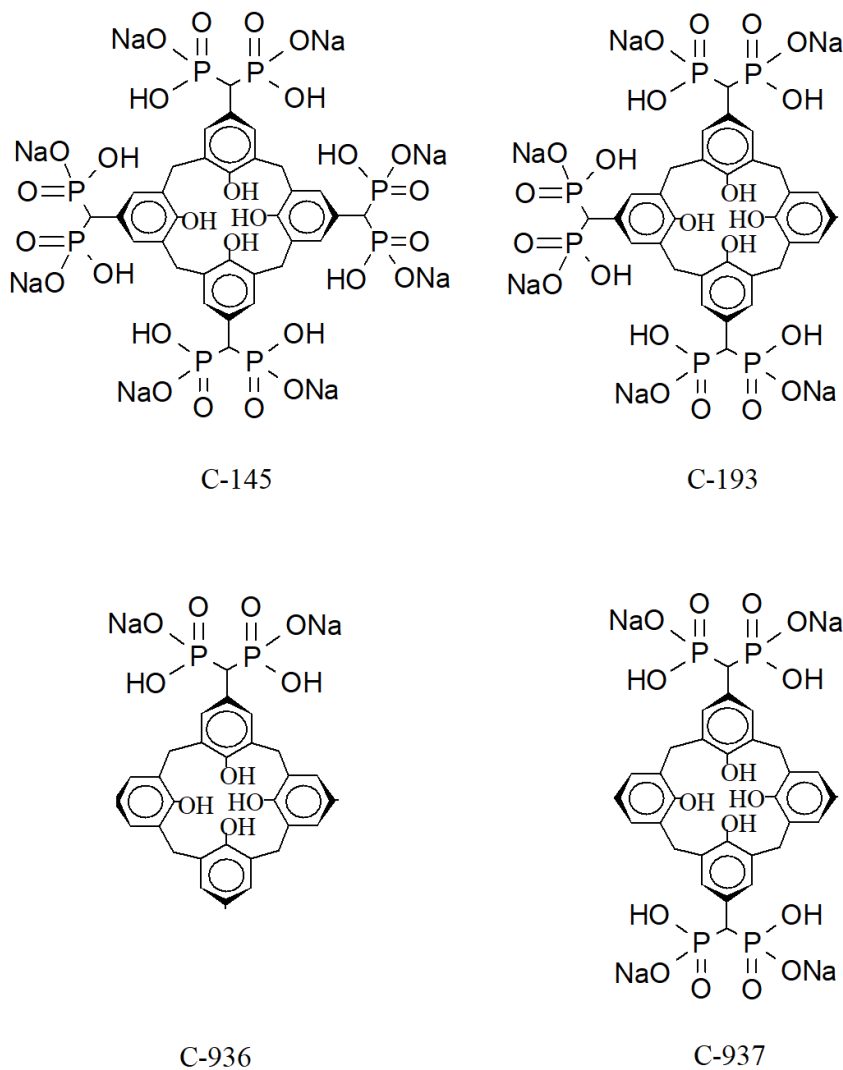


Рис. 7.1. Структурні формули сполук калікс[4]аренового ряду, які відрізняються за кількістю залишків бісфосфонової кислоти.

Для детального аналізу дії інгібіторів на полімеризацію фібрину застосовували турбідиметричний метод визначення зміни мутності середовища. Концентрації калікс[4]аренів визначали методом підбору, першою було обрано концентрацію, яка перевищує терапевтичну концентрацію вдвічі – 75 μM [131].

7.2. Залежність *in vitro* ефективності інгібіторної дії калікс[4]аренів від кількості залишків бісфосфонової кислоти

З метою комплексної оцінки інгібіторної дії на полімеризацію фібрину сполук калікс[4]аренового ряду, які відрізняються за кількістю залишків бісфосфонової кислоти, нами було вирішено провести дослідження у плазмі крові.

Фібриноутворення ініціювали внесенням у плазму крові АЧТЧ-реагенту та розчину хлориду кальцію. Вивчали сполуки калікс[4]аренового ряду в діапазоні концентрацій від 3 до 100 μM .

При цьому окремо порівнювали значення інгібіторної активності для калікс[4]арену С-145 та калікс[4]арену С-193 (з чотирма та з трьома залишками бісфосфонової кислоти відповідно), а також значення інгібіторної активності для калікс[4]арену С-936 та калікс[4]арену С-937 (з двома та з одним залишком бісфосфонової кислоти відповідно) (Рис. 7.2, 7.3, 7.4).

Калікс[4]арен С-145 виявився більш ефективним інгібітором полімеризації фібрину порівняно з С-193, зокрема повністю запобігав формуванню фібринового згустку у плазмі за час спостережень за концентрацій 8 та 15 μM , коли інгібіторна дія С-193 була менш вираженою.

Фактично, посилення інгібіторного ефекту С-145 зі зростанням концентрації понад 15 μM було неможливо детектувати, адже фібринуутворення не відбувалося взагалі (Рис. 7.4). Звичайно, пряме порівняння цих інгібіторів треба було провести більш детально у іншій модельній системі.

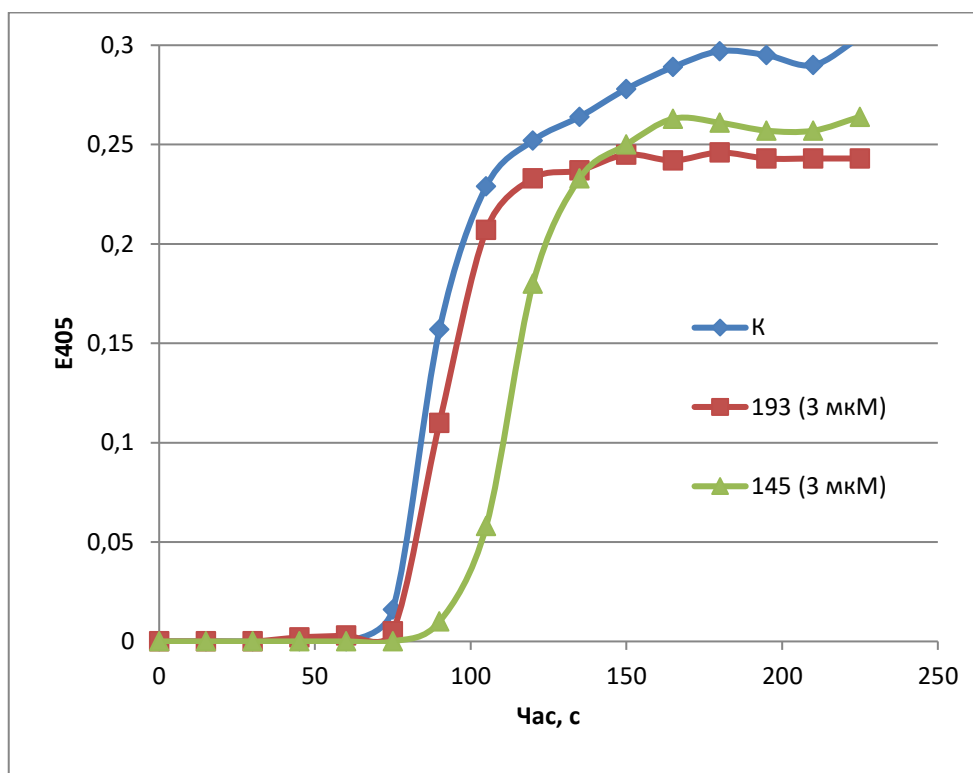


Рис. 7.2. Типова зміна оптичної густини середовища в процесі полімеризації фібрину в плазмі крові людини під дією АЧТЧ-реагенту за присутності 3 μM калікс[4]арену С-145 та калікс[4]арену С-193.

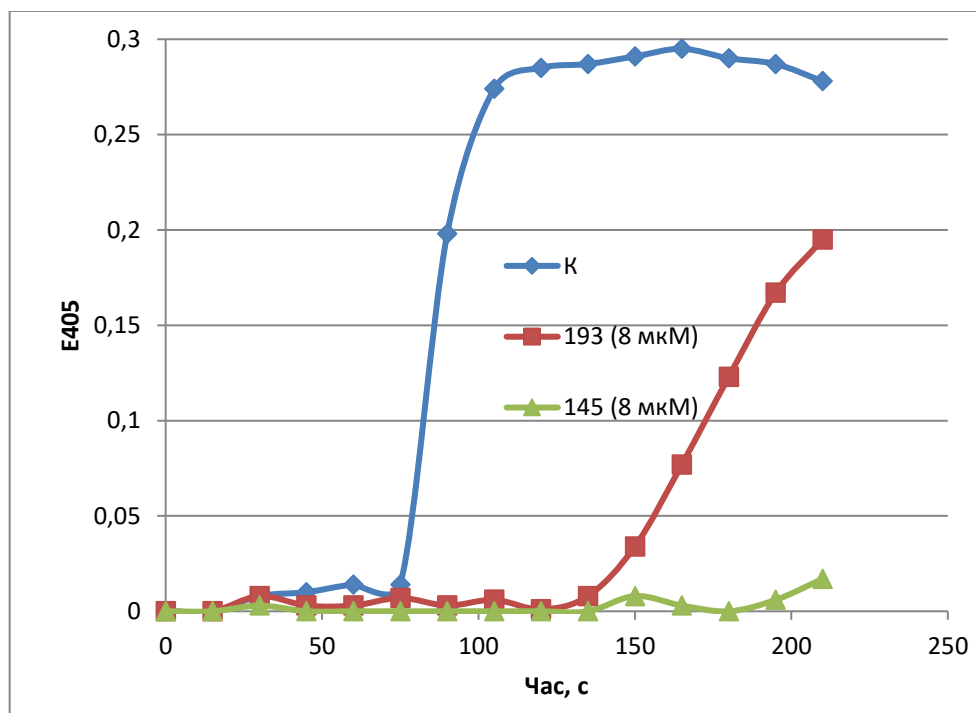


Рис. 7.3. Типова зміна оптичної густини середовища в процесі полімеризації фібрину в плазмі крові людини під дією АЧТЧ-реагенту за присутності 8 μM калікс[4]арену C-145 та калікс[4]арену C-193.

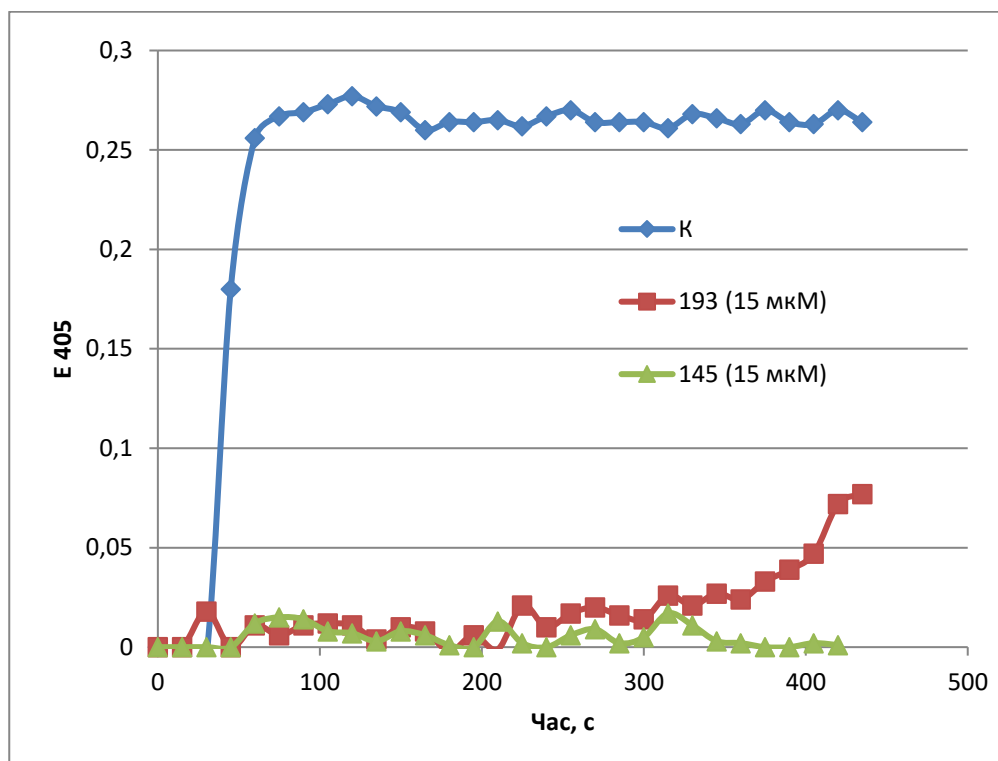


Рис. 7.4. Типова зміна оптичної густини середовища в процесі полімеризації фібрину в плазмі крові людини під дією АЧТЧ-реагенту за присутності 15 μM калікс[4]арену C-145 та калікс[4]арену C-193.

Натомість калікс[4]арени C-936 та C-937 були близькими за здатністю інгібувати полімеризацію фібрину та проявляли максимальну інгібіторну активність за концентрації 100 μM (Рис. 7.5).

З огляду на те, що внесення в систему інгібітора полімеризації фібрину порушувало структуру згустку, для оцінки інгібіторного ефекту сполук було обрано lag-період полімеризації фібрину, який відображає час формування протофібрил, необхідний для початку їхньої латеральної асоціації.

Зведений графік залежності тривалості lag-періоду полімеризації фібрину в плазмі крові від концентрації досліджуваних калікс[4]аренів наведено на рисунку 7.6.

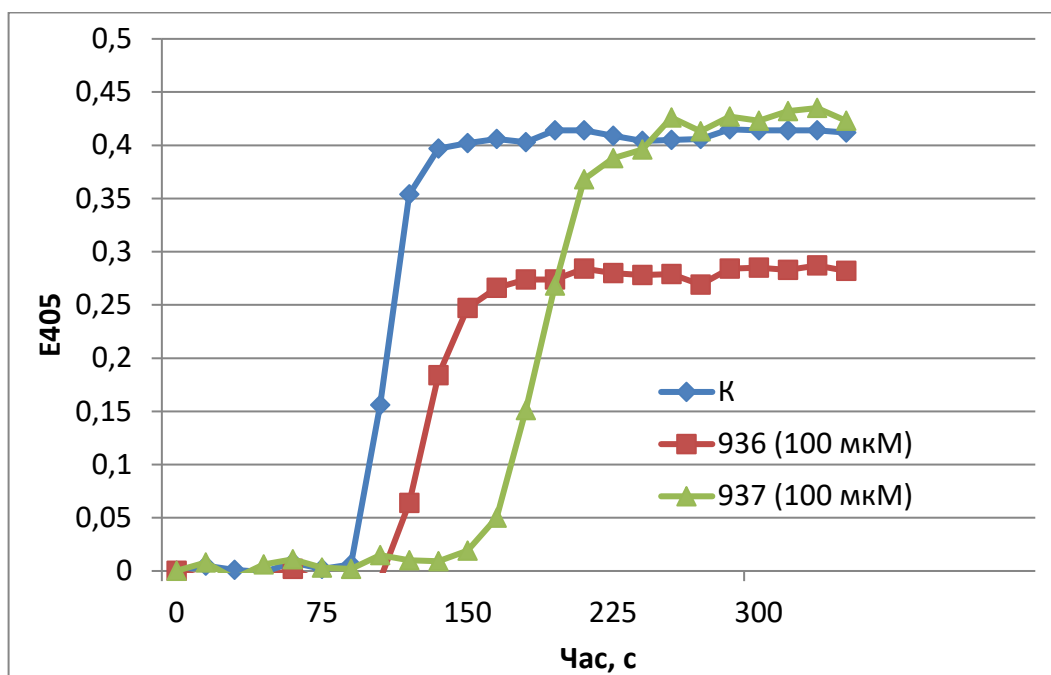


Рис. 7.5. Типова зміна оптичної густини середовища в процесі полімеризації фібрину в плазмі крові людини під дією АЧТЧ-реагенту за присутності 15 μM калікс[4]арену C-936 та калікс[4]арену C-937.

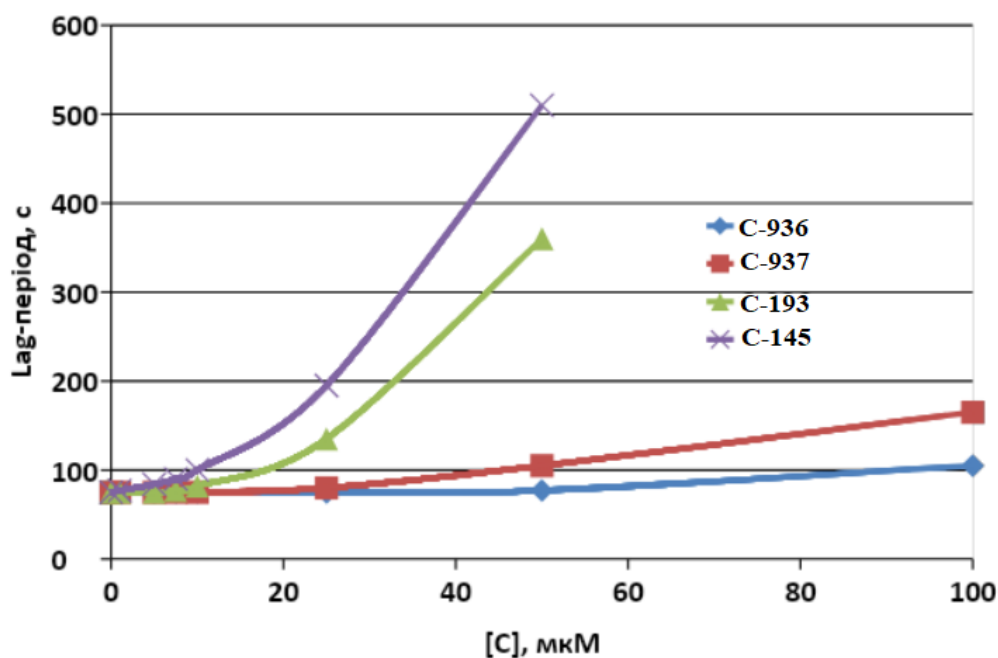


Рис. 7.6. Залежність тривалості lag-періоду полімеризації фібрину в плазмі крові від концентрації калікс[4]аренів C-145, C-193, C-937 та C-936 з чотирма, трьома, двома та одним залишками бісфосфонової кислоти.

Як видно з рис. 7.6, калікс[4]арени C-145 та C-193 мають близьку за значенням інгібіторну активність, як і калікс[4]арени C-937 та C-936. Однак чітко помітна тенденція до зменшення ступеню інгібування полімеризації фібрину залежно від кількості негативно заряджених залишків, причому зменшення кількості бісфосфонових замісників з трьох до двох призводить до зменшення лаг-періоду в 3.6 рази, що неможливо пояснити доступним нам *in vitro* дослідженням.

7.3. Молекулярний докінг сполук калікс[4]аренового ряду до «А» центру полімеризації фібрину

Для дослідження ключових взаємодій між фібрином та калікс[4]аренами C-145, C-193, C937 та C-935 було проведено молекулярний докінг, який дозволяє встановити необхідні для формування комплексу функціональні групи та дає інформацію щодо створення нових варіантів молекули калікс[4]арену з більшою афінністю. Оскільки раніше було встановлено, що калікс[4]арени взаємодіють з “А” центром полімеризації, нами було побудовано відсутній фрагмент А α -ланцюга молекули фібрину, беручи за основу кристалографічну структуру (*PDB ID:3GHG*), в програмі Modeller9.19.

Структури молекул калікс[4]аренів було побудовано і оптимізовано в програмі MarvinSketch версія 21.16.0, ChemAxon (<https://www.chemaxon.com>), після чого було продокеровано в одну з отриманих конформацій протеїну за допомогою веб-серверу SwissDock. Конформації, які в результаті докінгу показали оптимальні показники енергії зв'язування ліганду з мішенню, мали водневі зв'язки та гідрофобні взаємодії з ключовими амінокислотними залишками активного сайту протеїну, були проаналізовані.

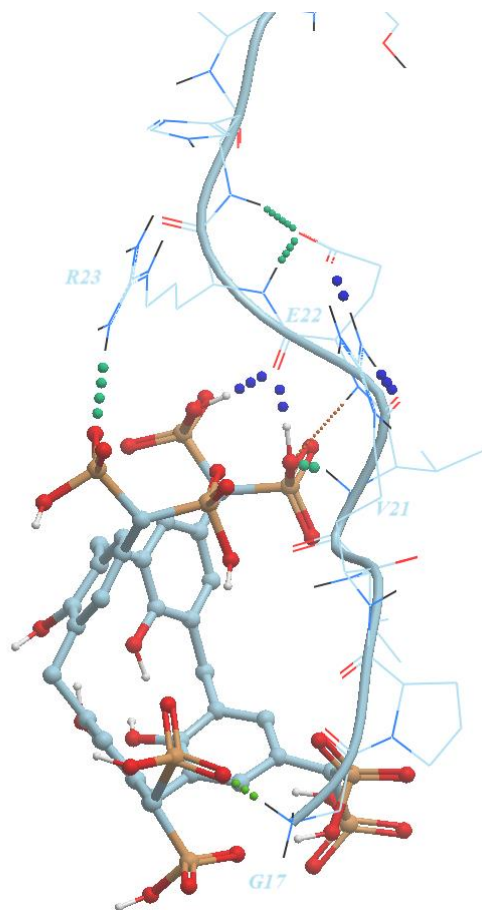


Рис. 7.7 Молекулярний докінг калікс[4]арену С-145 до центру полімеризації “А” молекули фібрину. Сферичними лініями позначені водневі зв'язки, підписи відповідають амінокислотним залишкам, що беруть участь в утворенні цього типу зв'язків.

За результатами докінгу три бісфосфонових залишка калікс[4]арену С-145 беруть участь у взаємодії з α -ланцюгом фібрину, утворюючи водневі зв'язки з Gly17, Val21, Glu22, Arg23 (Рис. 7.7). Цікаво, що Arg19 не був залучений до взаємодії з калікс[4]ареном, на відміну від інших калікс[4]аренів. Однак, оскільки бічний ланцюг Аргініна є надзвичайно лабільними ми впевнені, що Arg19 буде формувати водневі зв'язки і сольові містки з бісфосфоновими залишками ліганду.

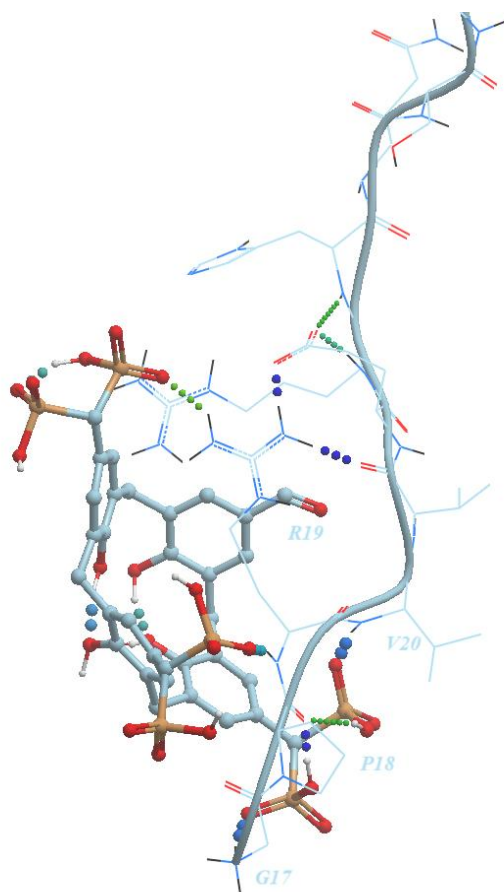


Рис. 7.8. Молекулярний докінг калікс[4]арену С-193 до центру полімеризації “А” молекули фібрину. Сферичними лініями позначені водневі зв'язки, підписи відповідають амінокислотним залишкам, що беруть участь в утворенні цього типу зв'язків.

У той же час комплекс між калікс[4]ареном С-193, що містить 3 бісфосфонові залишки, і фібрином характеризується водневими зв'язками між трьома бісфосфонатним залишком та Gly17, Pro18, Arg19, Val20 (Рис. 7.8). На відміну від калікс[4]арену С-145, С-193 взаємодіє з Arg19, а не з Arg23, але як і в попередньому випадку може взаємодіяти і з другим Аргініном. В цілому, для перевірки такої можливості необхідні додаткові розрахунки у вигляді молекулярної динаміки.

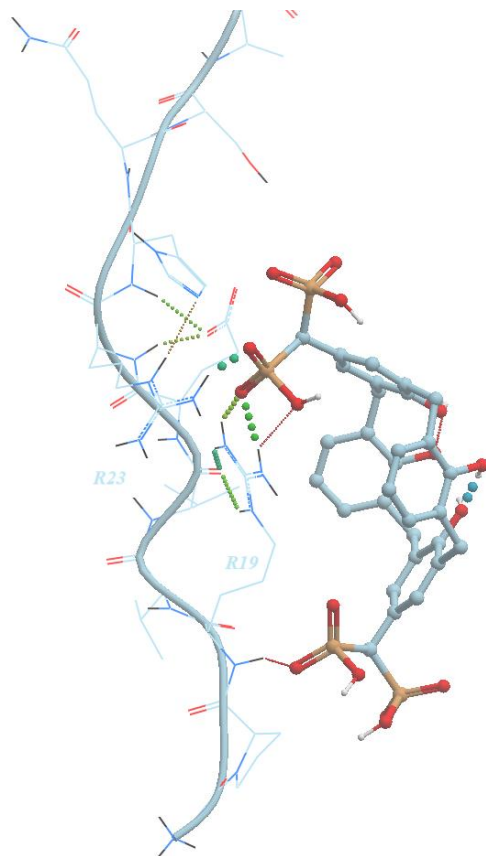


Рис. 7.9. Молекулярний докінг калікс[4]арену С-937 до центру полімеризації “А” молекули фібрину. Сферичними лініями позначені водневі зв'язки, підписи відповідають амінокислотним залишкам, що беруть участь в утворенні цього типу зв'язків.

На відміну від калікс[4]аренів С-145 та С-193, калікс[4]арен С-937 не формує водневий зв'язок з Gly17, проте з іншого боку один з двох бісфосфонових залишків взаємодіє з Arg19 та Arg23 (Рис. 7.9). Це стало можливим за рахунок зміщення “чаши” від N-кінця А α -ланцюга молекули фібрину. Калікс[4]арен С-936 своїм єдиним бісфосфоновим залишком взаємодіє з Arg19 та Arg23, як і С-937 (Рис. 7.10).

Необхідно зазначити, що молекулярний докінг не враховує конформаційну рухливість протеїну, що є критичним в нашому випадку, оскільки N-кінцева ділянка А α -ланцюга є невизначеною в кристалографічних структурах через її неструктурованість та надзвичайно високу рухливість. Тому без врахування цього моменту результати докінгу можуть вважатись лиш приблизними.

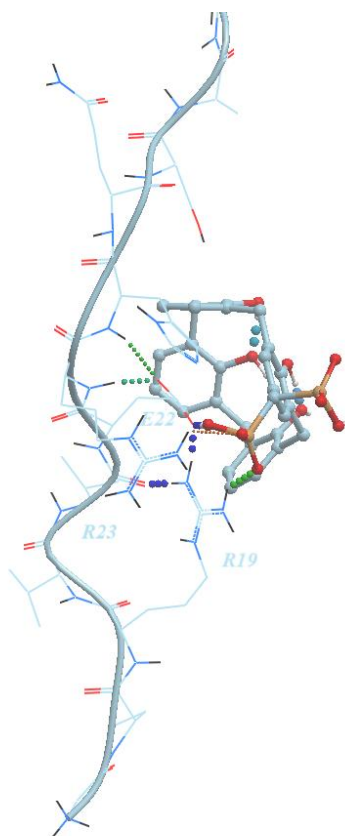


Рис. 7.10. Молекулярний докінг калікс[4]арену С-936 до центру полімеризації «А» молекули фібрину. Сферичними лініями позначені водневі зв'язки, підписи відповідають амінокислотним залишкам, що беруть участь в утворенні цього типу зв'язків.

7.4. Молекулярна динаміка комплексів сполук калікс[4]аренового ряду з «А» центром полімеризації фібрину

Молекулярний докінг є зручним і швидким засобом побудови тривимірних моделей та оцінки принципової можливості міжмолекулярних взаємодій. Однак, для того, щоб робити висновки про міцність таких взаємодій, врахувати можливі конформації молекул-партнерів необхідно проводити молекулярну динаміку, яка є тривалим і ресурсноємним процесом.

Для молекулярної динаміки використовувались комплекси калікс[4]аренів з «А» центром полімеризації фібрину, отримані за допомогою молекулярного докінгу на попередньому етапі.

У випадку з калікс[4]ареном С-145 всі з 4 бісфосфонових залишків залучені у взаємодію з “А” центром полімеризації фібрину (Рис. 7.11). Показано, що 2 бісфосфонових залишка взаємодіють як з Arg19, так і з Arg23, хоча за результатами докінгу С-145 взаємодівав лише з Arg23, що підтверджує необхідність враховувати конформаційну рухливість протеїну. Інші 2 бісфосфонових залишка взаємодіють з позитивно зарядженим N-кінцевим амінокислотним залишком Gly17 та Pro18 (табл.7.1). Цікавим є положення Gly17, який наче занурюється всередину каліксаренової чаші.

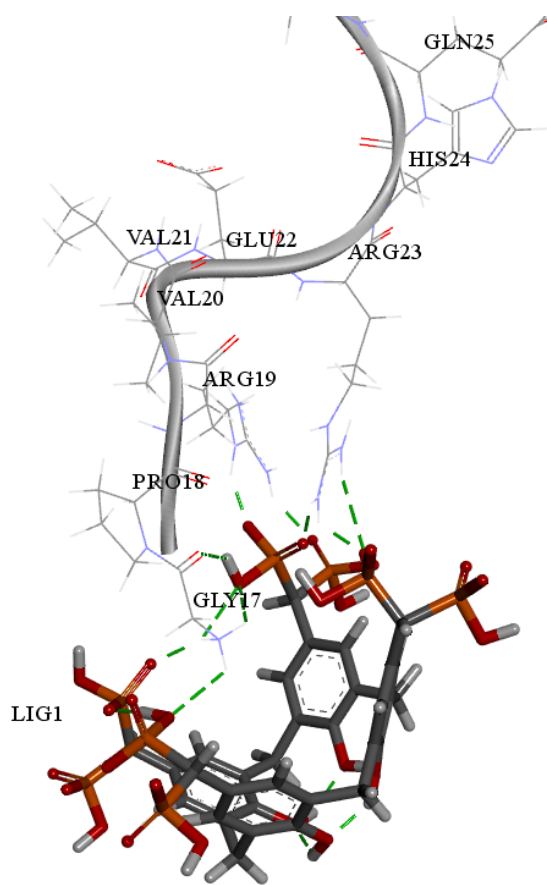


Рис. 7.11. Одна з конформацій молекулярного комплексу калікс[4]арену С-145 з “А” центром полімеризації фібрину, отримана за допомогою молекулярної динаміки. Зеленим пунктиром позначено водневі зв’язки.

Калікс[4]арен С-193 за результатами молекулярної динаміки продемонстрував схожий на С-145 патерн взаємодії (Рис. 7.12). Двома

бісфосфоновими залишками він взаємодіяв з Arg19 та Arg23, а одним - з Gly17 молекули фібрину. Проте на відміну від калікс[4]арену C-145, C-193 не формує стабільний водневий зв'язок з карбонільним Оксигеном Pro18, а короткотривало взаємодіє з Оксигеном бічного ланцюга Glu22. Спираючись на аналіз тривалості існування водневих зв'язків протягом молекулярної динаміки, ми можемо зробити висновки, що калікс[4]арен C-145 формує більш міцний комплекс з α A-ланцюгом фібрину, оскільки водневі зв'язки між бісфосфоновими залишками і амінокислотними залишками протеїну є більш стабільними в порівнянні з калікс[4]ареном C-193 (табл. 7.1).

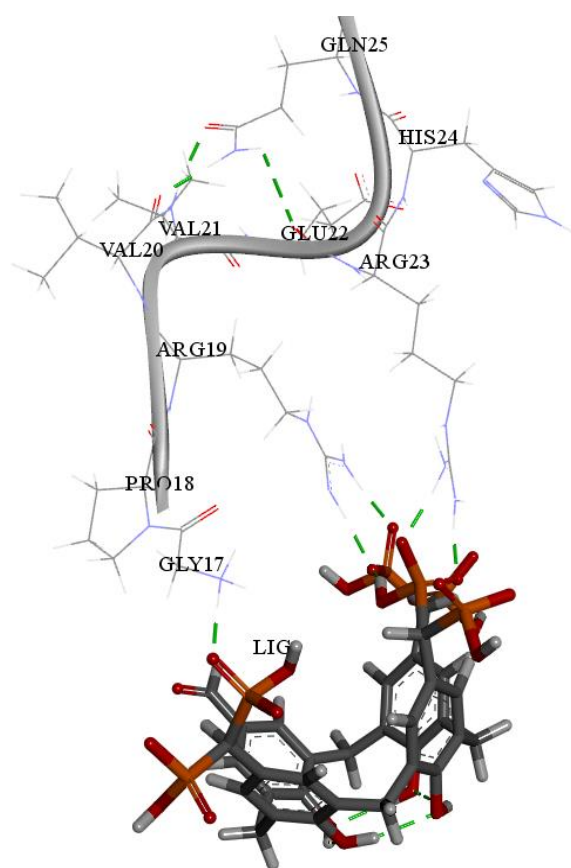


Рис. 7.12. Одна з конформацій молекулярного комплексу калікс[4]арену C-193 з “А” центром полімеризації фібрину, отримана за допомогою молекулярної динаміки. Зеленим пунктиром позначено водневі зв'язки.

Таблиця 7.1. Порівняння тривалості існування водневих зв'язків між амінокислотними залишками "А" центру полімеризації фібрину та калікс[4]аренами C-145 і C-193.

C-145 - фібрин			C-193 - фібрин		
Донор	Акцептор	Тривалість існування, %	Донор	Акцептор	Тривалість існування, %
Gly17, N-H1 Gly17, N-H2	C-145, O17 C-145, O25	61.5 86,1	Gly17, N-H1 Gly17, N-H1	C-193,O12 C-193,O14	64,7 25,0
Arg19, NE-HE Arg19, NH1-HH11, Arg19, NH1-HH11 Arg19, NH2-HH21	C-145, O21 C-145, O18 C-145, O21 C145, O28	88,6 33.9 53.8 16.6	Arg19, NH1-HH11 Arg19, NH1-HH11 Arg19, NH2-HH21 Arg19, NH2-HH21	C-193,O17 C-193,O18 C-193, O9 C-193,O18	65,6 30.3 11.5 79.5
Arg23, NH1-HH11 Arg23, NH1-HH11 Arg23, NH2-HH21 Arg23, NH2-HH22	C-145, O8 C-145, O21 C-145, O8 C145, O9	98.7 95.9 19,2 63.6	Arg23, NE-HE Arg23, NH1-HH11 Arg23, NH1-HH11 Arg23, NH2-HH21 Arg23, NH2-HH21	C-193,O18 C-193, O8 C-193, O7 C-193,O18 C-193, O8 C-193, O9	16,3 87,8 68,2 25.6 25.0 71.7
C-145, O10-H6	Pro18, O	92.2	C-193,O19-H9	Glu22, OE1	10.7
C-145,O22-H10	Gly17, O	11,7	-		

Щоб оцінити міцність взаємодії калікс[4]аренів C-145 та C-193 з α A-ланцюгом фібрину було обчислено так звану non-bonded енергію взаємодії, яка

складається з двох компонентів: short-range кулонівської взаємодії та short-range енергія Леннарда-Джонса. Для калікс[4]арену C-145 середні значення short-range кулонівської взаємодії та short-range енергії Леннарда-Джонса дорівнювали -812.357 kJ/mol та -12.765 kJ/mol, а для калікс[4]арену C-193 — -658.844 kJ/mol та -5.591 kJ/mol, відповідно (Рис. 7.13).

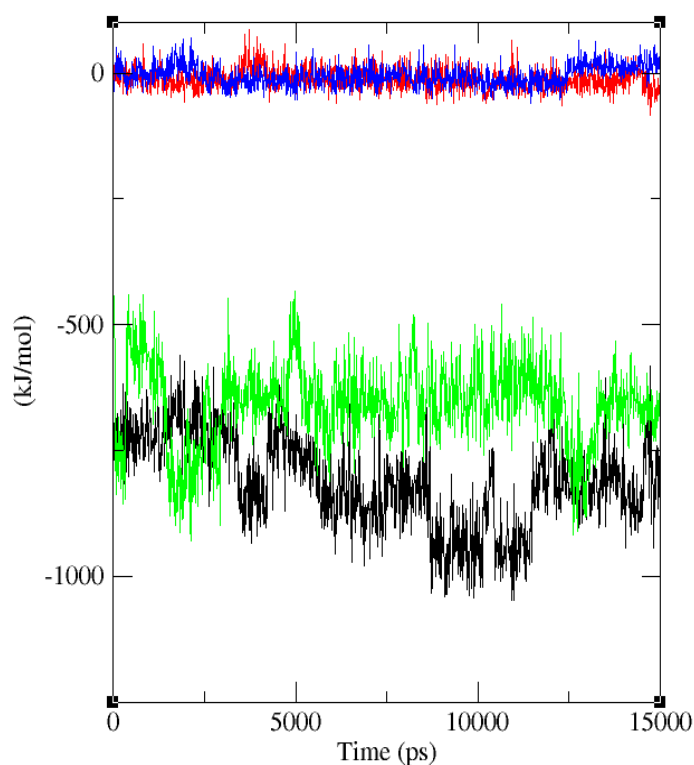


Рис. 7.13. Енергія взаємодії комплексу протеїн-С-145 та протеїн-С-193. Чорною та зеленою лініями позначено кулонівські взаємодії між протеїном та калікс[4]аренами C-145 та C-193, відповідно. Червоною та синьою лініями показано ван дер Ваальсові взаємодії між протеїном та калікс[4]аренами C-145 та C-193, відповідно.

Як ми можемо побачити основний внесок у взаємодію належить електростатичним взаємодіям, саме тому кількість бісфосфонових залишків є детермінуючим. В той же час ван дер Ваальсові взаємодії відігравали мінорну роль в комплексоутворенні, таким чином можна припустити, що основна роль калікс[4]аренової чаші є структурна, тобто вона є каркасом, на якому зафіксовано залишки метиленбісфосфенової кислоти. В той ж час, дані

значення енергії не є вільною енергією чи енергією зв'язування протеїна з лігандом, та є лише приблизними.

Додатково було проведено молекулярну динаміку калікс[4]арену C-936, який містить лише один залишок метиленбісфосфонової кислоти, з α A-ланцюгом молекули фібрину. Показано, що C-936 формує водневі зв'язки лише з залишками Arg19 та Arg23, на відміну від C-145 та C-193, які ще стабільно взаємодіяли з Gly17 та, або з Pro18, або з Glu22, відповідно (Рис. 7.14, табл.7.2). Це спостереження легко пояснюється тим, що окрім водневих зв'язків між фосфатними групами ліганду та гуанідиновими групами Аргінінів, формуються енергетично вигідні сольові містки між цими зарядженими групами.

Було розраховано енергію взаємодії комплексу A α -ланцюга молекули фібрину з калікс[4]ареном C-936 (Рис. 7.14). Середні значення short-range кулонівської взаємодії та short-range енергії Леннарда-Джонса становили - 302.258 kJ/mol та -25.266 kJ/mol. Якщо значення для Ван дер Ваальсових взаємодій для цих трьох калікс[4]аренів майже не відрізнялась, то значення енергії електростатичних взаємодій C-936 менша в 2.7 та 2,2 разів по відношенню до C-145 та C-193, відповідно.

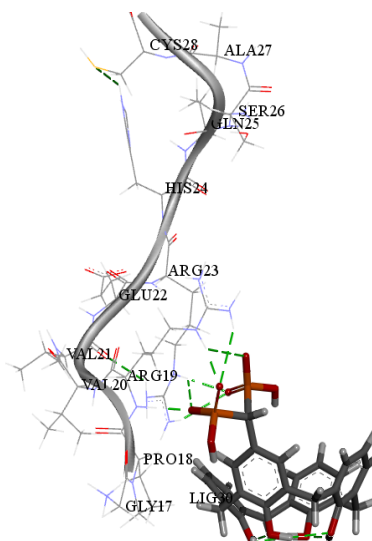


Рис. 7.14. Одна з конформацій молекулярного комплексу калікс[4]арену C-936 з “А” центром полімеризації фібрину, отримана за допомогою молекулярної динаміки. Зеленим пунктиром позначено водневі зв’язки.

Таблиця 7.2. Тривалість існування водневих зв’язків між амінокислотними залишками А α -ланцюга молекули фібрину та калікс[4]ареном C-936.

Донор водневого зв’язку	Акцептор водневого зв’язку	Тривалість існування, %
Arg19, NH1-HH11	C-936, O5	18,79
Arg19, NH1-HH11	C-936, O9	11,46
Arg19, NH1-HH11	C-936, O10	24,72
Arg19, NH2-HH21	C-936, O5	16,66
Arg19, NH2-HH21	C-936, O7	30,78
Arg19, NH2-HH21	C-936, O9	15,26
Arg23, NE-HE	C-936, O5	51,57
Arg23, NH1-HH11	C-936, O7	11,06
Arg23, NH1-HH11	C-936, O9	51,5
Arg23, NH2-HH21	C-936, O10	13,13

7.5. Визначення абсолютної енергії зв'язування калікс[4]арена C-193, C-145 та C-937 за допомогою Umbrella Sampling методу

Для характеристики дії калікс[4]аренів на полімеризацію фібрину було проведено визначення енергії зв'язування (ΔG_{bind}), яка розраховувалась з потенціала середньої сили (PMF), отриманої з серії “umbrella sampling” симуляцій. Було розраховано ряд початкових конфігурацій, кожна з яких відповідає місцю, де ліганд утримується на певній відстані центрів мас двох груп (COM). Дане обмеження дозволяє ліганду досліджувати конфігураційний простір в певній області вздовж реакційної координати. Вікна повинні забезпечувати невелике перекривання позицій лігандів для коректної реконструкції кривої PMF. Значення ΔG - це просто різниця між найвищим і найнижчим значеннями кривої PMF, якщо PMF конвергує до стабільного значення на великій COM відстані. Для розрахунку PMF нами було використано метод Weighted Histogram Analysis Method (WHAM).

ΔG_{bind} було розраховано для трьох калікс[4]аренів: C-145, C-193 та C-937. Для розрахунку використовувалась лише невелика частина молекули фібрину, а саме N-кінцева частина А α -ланцюга - А α 17-29, з метою економії комп'ютерних ресурсів. Ми вважаємо, цю ділянку достатньою для симуляції, оскільки в ній містяться всі амінокислотні залишки залучені до взаємодії з лігандом. Відсутність решти молекули фібрину не повинна впливати на точність розрахунків, оскільки N-кінцева частина А α -ланцюга має вигляд неструктурованого пептиду віддаленого від основної частини протеїну.

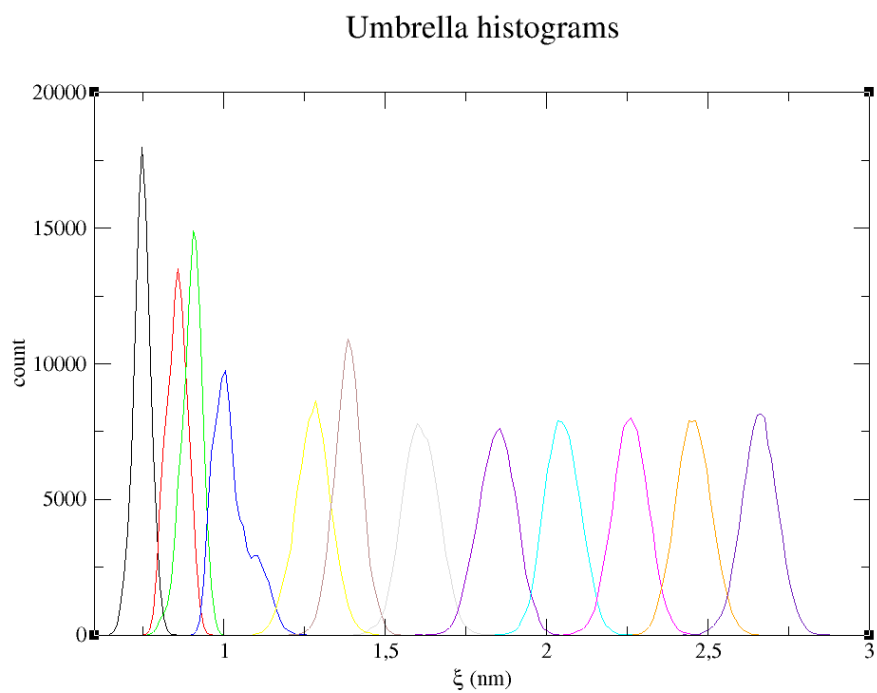


Рис. 7.15. Гістограма umbrella sampling для розрахунку PMF за допомогою WHAM в системі калікс[4]арену C-193 з A α 17-29 молекули фібрину.

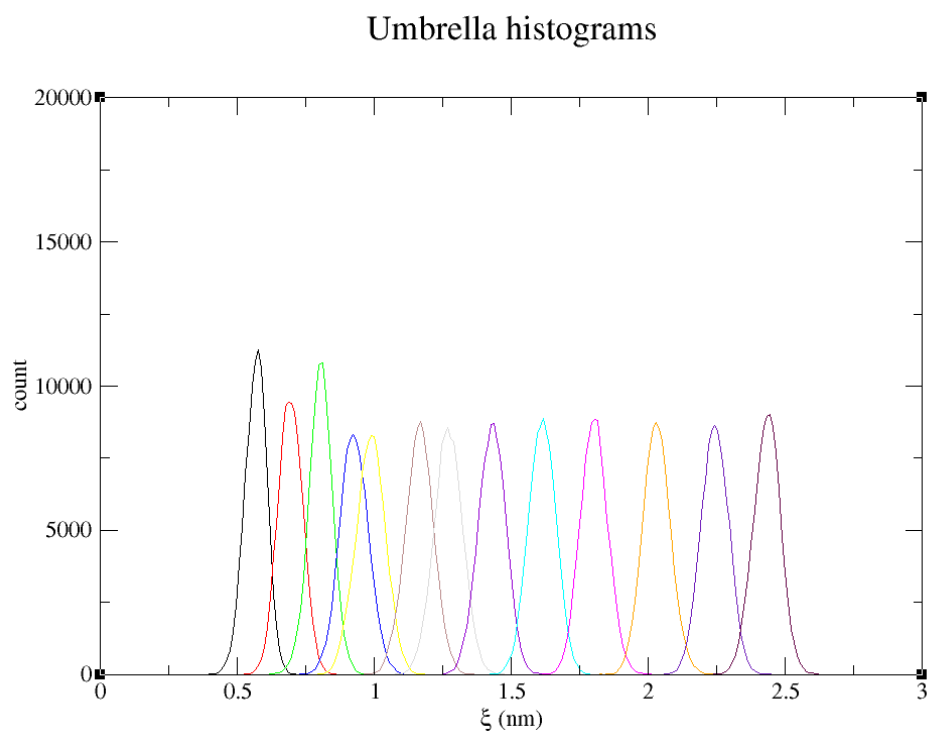


Рис. 7.16. Гістограма umbrella sampling для розрахунку PMF за допомогою WHAM в системі калікс[4]арену C-937 з A α 17-29 молекули фібрину.

Для побудови кривої PMF в системі калікс[4]арену C-193 з A α 17-29 молекули фібрину було використано 12 вікон, в системі калікс[4]арену C-145 з A α 17-29 молекули фібрину - 14 вікна, а в системі калікс[4]арену C-937 з A α 17-29 молекули фібрину - 13 вікон (Рис. 7.15). Ця кількість є достатньою, щоб криві конвергували, і ми могли очікувати коректні результати.

У випадку з калікс[4]ареном C-193, розрахована ΔG_{bind} дорівнювала приблизно -10.0 kcal/mol, а для калікс[4]арену c-145 - приблизно -12,3 kcal/mol (Рис. 7.17 та 7.18).

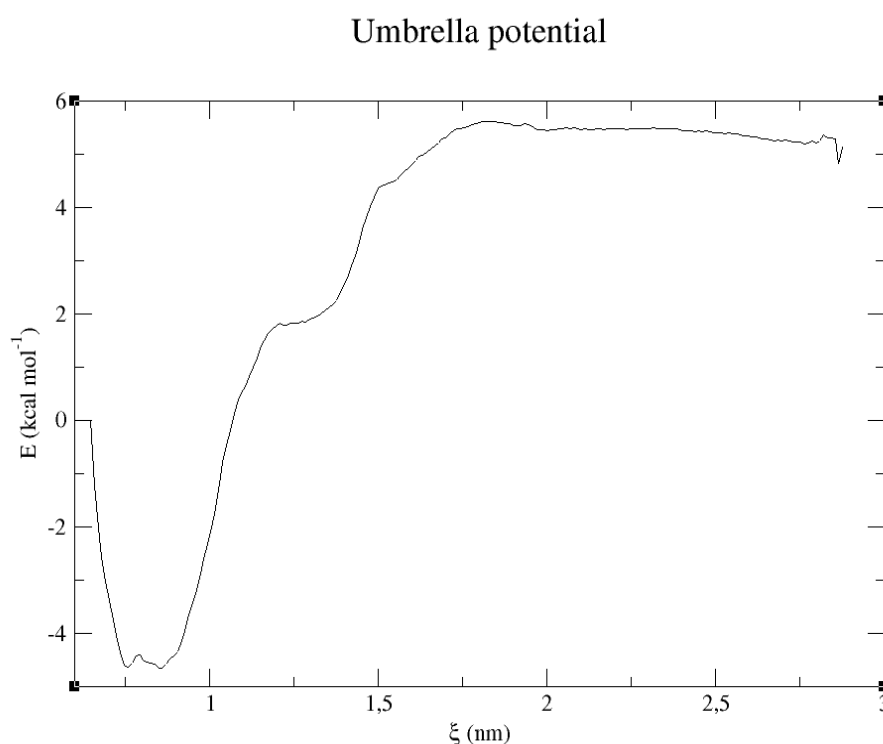


Рис. 7.17. Енергетична крива PMF калікс[4]арену C-193 у комплексі з A α 17-29 молекули фібрину, розрахована за допомогою методу WHAM

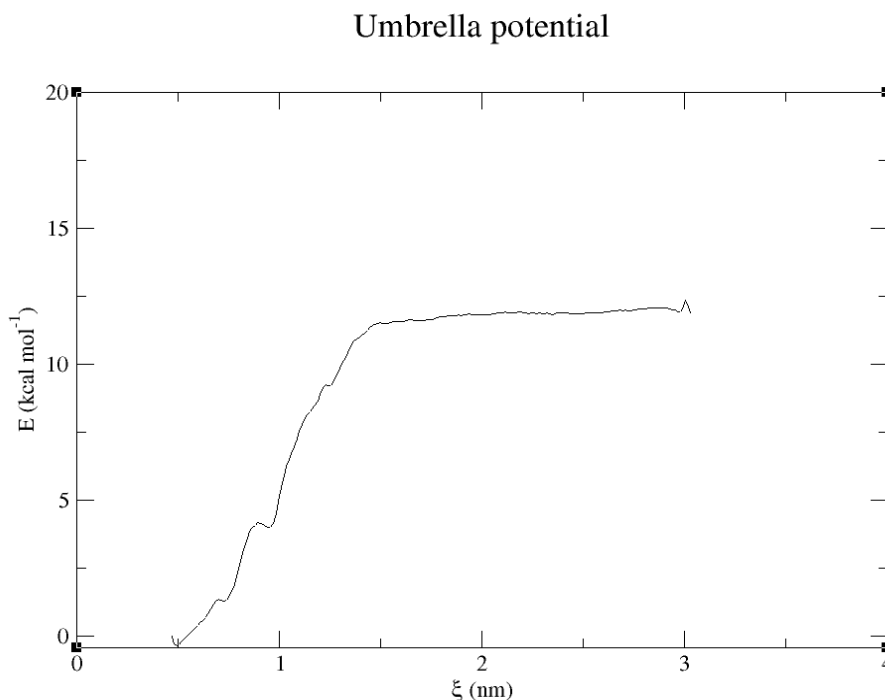


Рис. 7.18. Енергетична крива PMF калікс[4]арену C-145 у комплексі з Aα17-29 молекули фібрину, розрахована за допомогою методу WHAM

Цікавим є низькі значення розрахованої ΔG_{bind} для калікс[4]арену C-937, що становить приблизно - 3,7 kcal/mol. Дана величина є в 3,3 рази меншою за енергію зв'язування калікс[4]арену C-145. Така велика різниця, зрештою, пояснює експеримент із визначенням тривалості lag-періоду полімеризації фібрину в плазмі крові за впливу калікс[4]аренів. Ми спостерігали, що lag-період полімеризації фібрину за присутності C-937 була приблизно в 5 разів меншою, ніж за присутності C-145, при чому різниця в тривалості lag-періода між C-145 і C-193 була незначна, як і між C-937 і C-936. З цього можна зробити припущення, що залишки бісфосфонових кислот діють синергічно при зв'язуванні, оскільки міцність комплексу не є лінійно-залежною від кількості залишків. Отже, калікс[4]арени з одним та двома залишками метиленбісфосфонової кислоти є слабкими "байндерами" з молекулою фібрину, оскільки відсутність великої гідрофобної кишені виключає Ван дер Ваальсові взаємодії, а водневі зв'язки та сольові містки з гуанідиновими групами Аргінінами не є достатнім для міцного комплексоформування. В той же час

додавання лише одного залишка бісфосфонової кислоти до вже двох наявних критично посилює зв'язування.

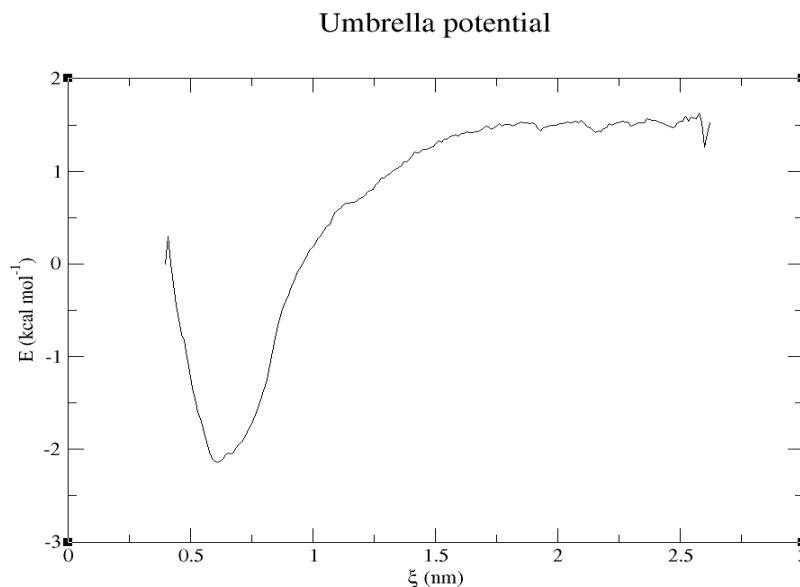


Рис. 7.19. Енергетична крива РМФ калікс[4]арену С-937 у комплексі з Аα17-29 молекули фібрину, розрахована за допомогою методу WHAM.

Таким чином, відповідно до результатів щодо полімеризації фібрину, кількість залишків бісфосфонової кислоти має вирішальне значення для взаємодії калікс[4]аренів з центром «А» полімеризації фібрину, при цьому три залишки бісфосфонової кислоти є мінімально необхідними для стабільних взаємодій.

Дані молекулярної динаміки чітко узгоджуються з експериментальними даними *in vitro*, що чітко свідчить про правильність обраної стратегії аналізу та підтверджує адекватність моделі молекулярних взаємодій калікс[4]аренів з «А»-центром полімеризації фібрину. Ці дані є незамінними для подальшої розробки антитромботичних засобів нового типу із використанням калікс[4]аренової платформи.

РОЗДІЛ 8. ІНГІБІТОРИ ФАКТОРА Ха

8.3. Скринінг низькомолекулярних сполук - потенційних інгібіторів фактора Ха

Для комплексної оцінки впливу синтезованих низькомолекулярних сполук на плазменний гемостаз, на процес активації фактора X та безпосередньо на активність фактора Ха було розроблено дві модельні системи.

В першій модельній системі за присутності досліджуваних сполук активували фактор X в плазмі крові екзогенним активатором з отрути гадюки Russell. В другій модельній системі використовували очищений фактор Ха. В обох модельних системах процес інгібування фактора Ха контролювали за розщепленням хромогенного субстрату S2765.

Біологічний скринінг інгібіторної дії представлених зразків синтезованих низькомолекулярних сполук на фактор Ха проводили в модельній системі з використанням референтної плазми крові і активатора фактора X з отрути гадюки Russell.

Модельна система: 0,05 М трис-HCL буфер pH 7,45, який містив 0,15 М NaCl та $1 \cdot 10^{-3}$ М CaCl_2 , хромогенний субстрат S2765 (Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA 2HCl) у кінцевій концентрації 0,16 мМ, 40 мкл референтної плазми крові та 0,02 мг активатора фактора X з отрути гадюки Russell (RVV). Низькомолекулярні сполуки, що досліджували, додавали у концентрації 50 μM .

Реакційну суміш загальним об'ємом 250 мкл інкубували в термостаті при температурі 37 °C протягом 5 хв. Кількість розщепленого субстрату визначали спектрофотометрично при 405 нм на мікропланшетному спектрофотометрі Thermo Multiskan EX Фінляндія.

Розподіл низькомолекулярних сполук за ефективністю інгібіторної дії на фактор Ха при 50 μM представлено на Рис. 8.1. Проведений аналіз показав, що більшість досліджуваних сполук інгібує активність фактора Ха на 40-60%.

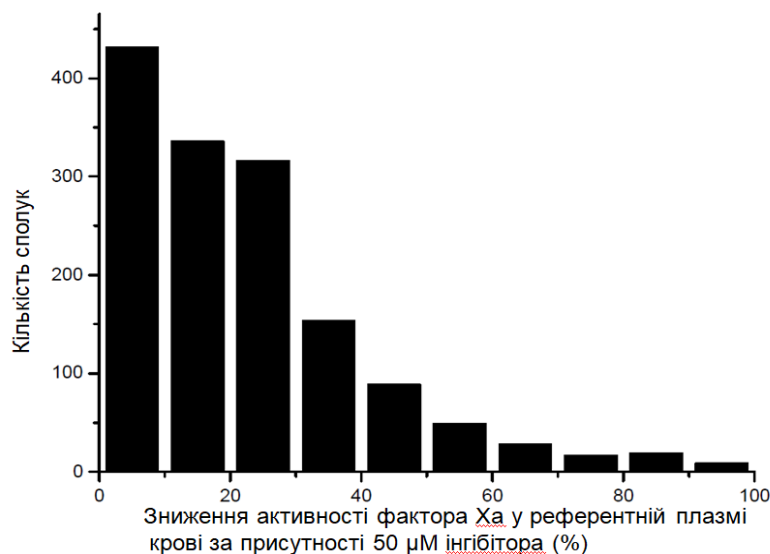


Рис. 8.1. Розподіл низькомолекулярних сполук за ефективністю інгібіторної дії на фактор Ха в плазмі крові людини. Активацію фактора X в референтній плазмі крові проводили активатором з отрути гадюки Russell. Концентрація низькомолекулярних сполук 50 μM.

На наступному етапі досліджень для оцінки інгібіторної дії найбільш ефективних інгібіторів було обрано 59 сполук, за присутності яких виявлено зниження на 70% і більше активності фактору Ха в плазмі крові. Скринінг проводили в наступній модельній системі: 0,05 М трис-HCLбуфер рН 7,45, який містив 0,15 М NaCl, та $1 \cdot 10^{-3}$ М CaCl₂, хромогенний субстрат S2765 (Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA 2HCl) у кінцевій концентрації 0,16 мМ, 0,27 nkat/ml фактора Ха. Низькомолекулярні сполуки, що досліджували, додавали у концентрації 5 μM.

Реакційну суміш інкубували в термостаті при температурі 37 °C протягом 5-20 хв. Кількість розщепленого субстрату визначали спектрофотометрично при 405 нм на мікропланшетному спектрофотометрі Multiskan EX Thermo (Рис. 8.2).

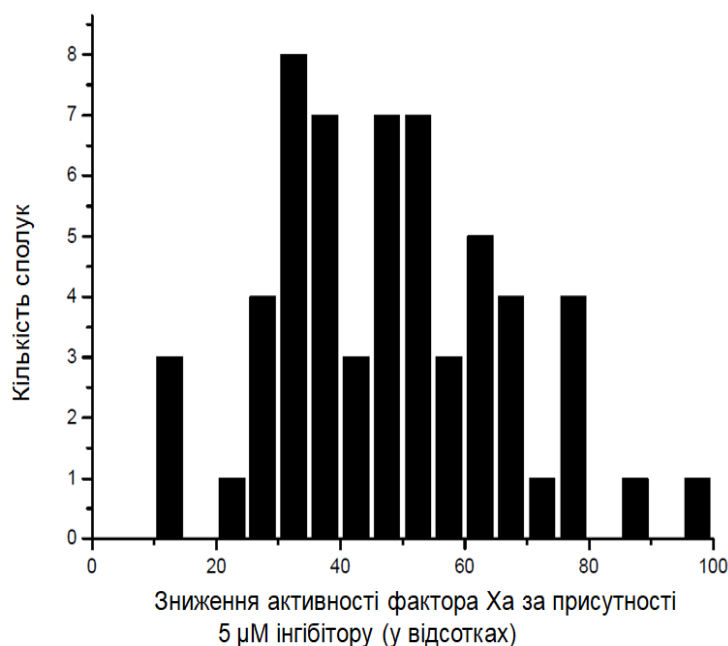


Рис. 8.2. Розподіл низькомолекулярних сполук за ефективністю інгібіторної дії на фактор Ха за концентрації досліджуваних сполук 5 μ M

Таким чином, проведені дослідження показали, що більшість виділених сполук знижують активність фактора Ха від 40% до 60%. Найбільш ефективні інгібітори фактора Ха було вибрано для подальших досліджень *in vivo*.

8.2 Дослідження *in vitro* інгібіторної дії низькомолекулярних сполук на активність Ха та на процес активації тромбоцитів

Для комплексної оцінки дії найбільш ефективні інгібітори фактора Ха на клітинний та плазмовий гемостаз вивчали агрегацію тромбоцитів та зсідання збагаченої тромбоцитами плазми крові людини під дією реагенту АЧТЧ за присутності досліджуваної сполуки.

АЧТЧ-реагент у присутності йонів кальцію активує систему зсідання крові за контактним механізмом через калікреїн-кінінову систему та фактор XII. Послідовна активація факторів зсідання крові призводить до генерації активного фактора Ха, який у свою чергу протеолітично перетворює протромбін на активний тромбін. Тромбін відщеплює від фібриногену фібринопептиди. Фібрин, який при цьому утворюється, здатний до

самоскладання і формує каркас полімерного фібрину – основу тромбу. Водночас, генерований під дією фактора Ха тромбін активує тромбоцити опосередковано PAR-рецепторами. Активація тромбоцитів призводить до їхньої дегрануляції, зміни форми, активації глікопротеїнового комплексу GPIIb/IIIa, який здатен зв'язуватися з фібриногеном та фібрином. Ці взаємодії і забезпечують агрегацію тромбоцитів та формування фібриново-тромбоцитарного тромбу.

Розроблений нами методичний підхід дозволив оцінити інгібіторну дію сполуки, що досліджується, на генерацію тромбіну. Оскільки для активації тромбоцитів та відповідно індукування їхньої агрегації потрібна менша кількість тромбіну, аніж для ініціації фібриноутворення, то ми фіксували двостадійний процес: агрегацію тромбоцитів, вслід за якою відбувалася полімеризація фібрину. Ефект інгібіторів фактора Ха на обидва ці процеси фіксували у одному експерименті за допомогою агрегометра Солар 2110.

Об'єм реакційної суміші складав 0,3 мл. До 0,1 мл збагаченої тромбоцитами плазми крові людини (360 тис клітин в 1 мкл) вносили послідовно 0,1 мл 0,025 М розчину CaCl_2 та 0,1 мл АЧТЧ-реагенту. Кінцева концентрація тромбоцитів у пробі складала 120 тис/мкл, CaCl_2 – 10^{-3} М. Агрегацію тромбоцитів ініціювали АЧТЧ-реагентом. Процес агрегації тромбоцитів вивчали за зміною ступеня світлорозсіювання реакційної суміші, порівняно з вихідним світлорозсіюванням збагаченої тромбоцитами плазми крові людини. Формування полімерного фібрину детектували за різким зменшенням світлорозсіювання, якому передувало фібриноутворення. Кювета агрегометра перебувала під постійним перемішуванням за температури $+37^\circ\text{C}$.

У дослідну пробу перед внесенням CaCl_2 додавали 5 мкл інгібітора фактора Ха, розчиненого у DMSO. У контрольні проби додавали аналогічний об'єм DMSO, оскільки даний розчинник чинить помірну інгібіторну дію на тромбоцити (Рис. 8.3).

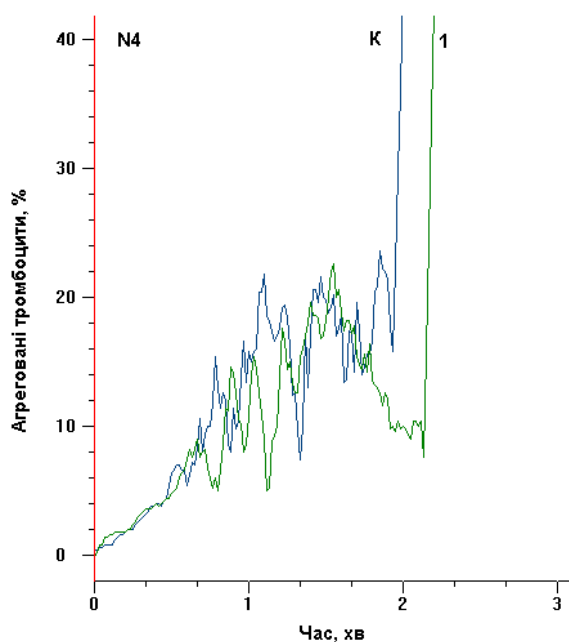


Рис. 8.3. Агрегатограма АЧТЧ-індукованої агрегації тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові людини (К) за присутності інгібітора (5 мкл) фактора Ха. Реакційна суміш (0,3 мл) містить 0.1 мл 0,025 М розчину CaCl_2 , 0.1 мл АЧТЧ-реагенту, 5 мкл DMSO. Зразок номер 1.

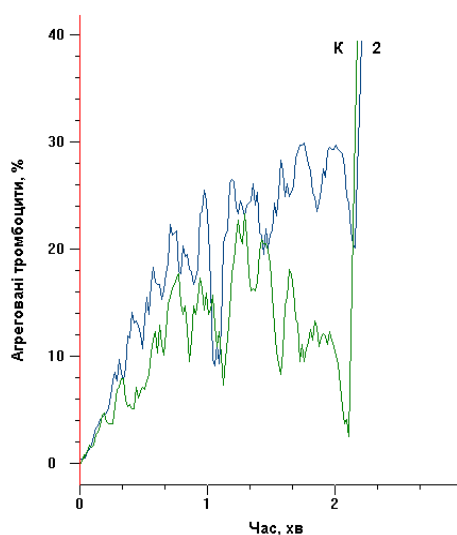


Рис. 8.4. Агрегатограма АЧТЧ-індукованої агрегації тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові людини (К) за присутності інгібітора (5

мкл) фактора Ха. Реакційна суміш (0,3 мл) містить 0.1 мл 0,025 М розчину CaCl_2 , 0.1 мл АЧТЧ-реагенту, 5 мкл DMSO. Зразок №2.

Кінцева концентрація інгібітора фактора Ха у наших експериментах становила 0,15 мг/мл. Для визначення концентраційно залежного ефекту інгібітора використовували вдвічі більшу концентрацію. Для цього експерименту контроль ставили окремо з еквівалентною кількістю DMSO (Рис. 8.4 та 8.5).

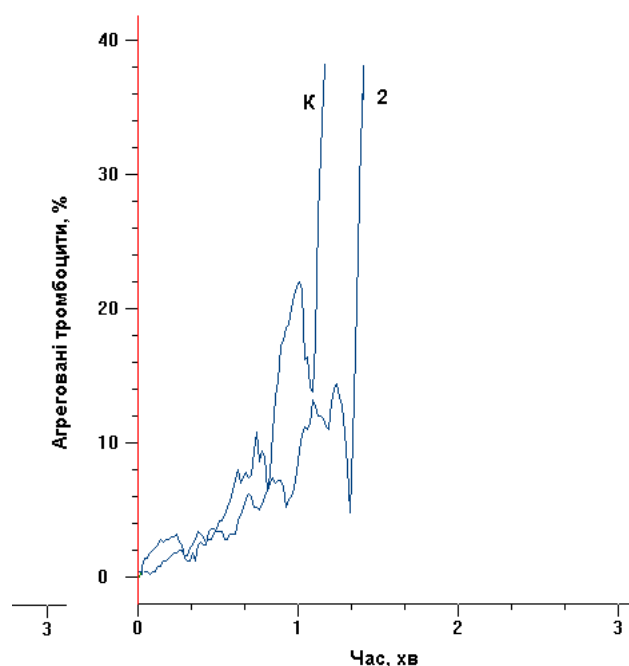


Рис. 8.5. Агрегатограма АЧТЧ-індукованої агрегації тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові людини (К) за присутності інгібітора (5 мкл) фактора Ха. Реакційна суміш (0,3 мл) містить 0.1 мл 0,025 М розчину CaCl_2 , 0.1 мл АЧТЧ-реагенту, 5 мкл DMSO. Зразок №3.

Аналіз агрегатограм, отриманих із використанням різних зразків низькомолекулярних сполук та збагаченої тромбоцитами плазми крові людини, дозволив виявити закономірність дії досліджуваної сполуки на агрегацію тромбоцитів та процес фібриноутворення. Зокрема, у двох випадках (Рис. 8.9, Рис. 8.10) було відмічено помітну дезагрегацію тромбоцитів на $40 \pm 10\%$,

порівняно з максимальним ступенем агрегації тромбоцитів у контрольній пробі. У одному з випадків зменшувався навіть ступінь агрегації тромбоцитів – з 20 % у контролі до 12 % за присутності інгібітора фактора Ха (Рис. 8.6).

Переважаю фібриноутворення у досліджуваних пробах за присутності активатора спостерігали на 20 секунд пізніше, ніж у контролі. А у пробі, наведеній на рис. 8.6, формування полімерного фібрину відмічали після майже повної дезагрегації тромбоцитів.

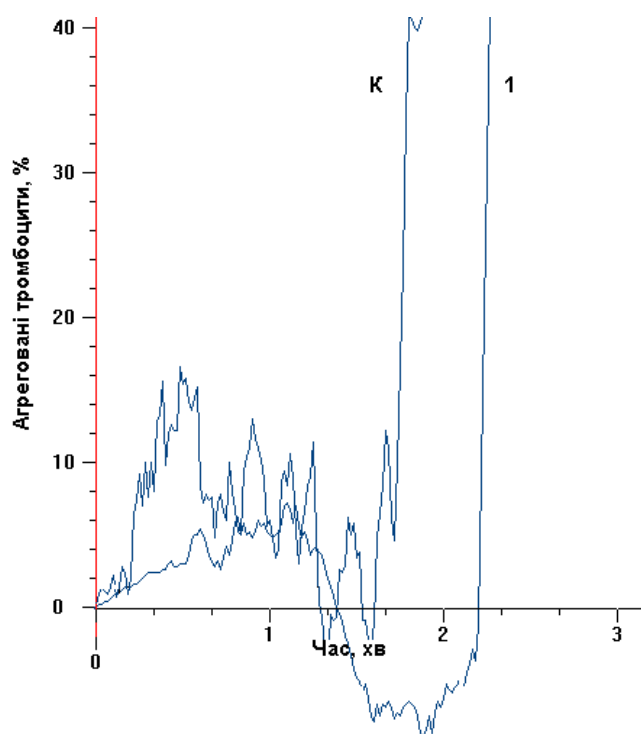


Рис. 8.6 Агрегатограма АЧТЧ-індукованої агрегації тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові людини (К) за присутності інгібітора (10 мкл) фактора Ха. Реакційна суміш (0,3 мл) містить 0.1 мл 0,025 М розчину CaCl_2 , 0.1 мл АЧТЧ-реагенту, 10 мкл DMSO. Зразок №3.

При збільшенні концентрації інгібітора фактора Ха вдвічі, інгібіторний ефект виявився значно більшим. Ступінь агрегації тромбоцитів зменшувався на 70 % порівняно з контролем. Відмічали повну дезагрегацію тромбоцитів, фібриноутворення затримувалося на 40 с.

Таким чином, за присутності інгібітора фактора Ха у збагаченій тромбоцитами плазмі крові людини відбувалося ефективне інгібування

агрегації тромбоцитів та затримка фібриноутворення. Цей процес мав концентраційно залежний характер. Виявлені закономірності свідчать про ефективне гальмування генерації тромбіну внаслідок прямого інгібування фактора Ха. Можна зробити висновок, що застосування апробованого нами інгібітора *in vivo* за умов оптимізації його структури та досягнення повної розчинності у водних розчинах дозволить за потреби суттєво знизити прокоагулянтний потенціал плазми крові.

8.4. Тестування інгібіторів фактора Ха *in vivo*

Для оцінки ефективності дії інгібіторів фактора Ха на клітинний та плазменний гемостаз *in vivo* використовували модель введення інгібіторів щурам. Тварин масою тіла 300 ± 50 г утримували в віварії Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України на стандартному харчовому раціоні. Усі маніпуляції з тваринами проводили згідно з рекомендаціями Європейської конвенції із захисту хребетних тварин та використання їх в експериментальних та інших наукових цілях (Страсбург, 1986 р.). Суміш розчину інгібітора фактора Ха, розчиненому у DMSO, та фізіологічного розчину у співвідношенні 1:5 вводили у хвостову вену щура. Контрольній групі тварин вводили відповідний об'єм суміші DMSO та фізіологічного розчину. Через 1 годину після введення препарату отримували кров щурів пункцією серця.

Отримані зразки плазми крові та плазму крові, збагачену тромбоцитами, використали для дослідження процесу агрегації тромбоцитів та зсідання плазми крові щурів, збагаченої на тромбоцити, під дією реагенту АЧТЧ після введення інгібіторів.

Кінцева концентрація інгібітора фактора Ха у наших експериментах становила 0,25-0,75 мг/кг маси тіла.

Інгібіторний ефект досліджуваних сполук на обидва процеси фіксували у одному експерименті за допомогою агрегометра Солар 2110: до 0,2 мл збагаченої тромбоцитами плазми крові щурів (360 тис клітин в 1 мкл) вносили

послідовно 0,05 мл 0,025 М розчину CaCl_2 та 0,05 мл АЧТЧ-реагенту. Кінцева концентрація тромбоцитів у пробі складала 240 тис/мкл. Агрегацію тромбоцитів ініціювали АЧТЧ-реагентом. Процес агрегації тромбоцитів вивчали за зміною ступеня світлорозсіювання реакційної суміші, порівняно з вихідним світлорозсіюванням збагаченої тромбоцитами плазми крові щурів. Полімеризацію фібрину детектували за різким зменшенням світлорозсіювання, якому передувало фібриноутворення. Кювета агрегометра перебувала під постійним перемішуванням за температури $+37^\circ\text{C}$. Об'єм реакційної суміші складав 0,3 мл.

У контрольних щурів, яким вводили DMSO у розведенні 1:5, спостерігали активацію тромбоцитів, пов'язану з генерацією тромбіну під дією АЧТЧ-реагенту. Помірна агрегація тромбоцитів, яка починалася через 2 хвилини після внесення індуктора, завершилася через 5-6 хв. Ступінь агрегації тромбоцитів сягав 45 %. Подальша інкубація суміші призводила до формування полімерного фібрину через 6-7 хв після внесення індуктора (Рис. 8.7).

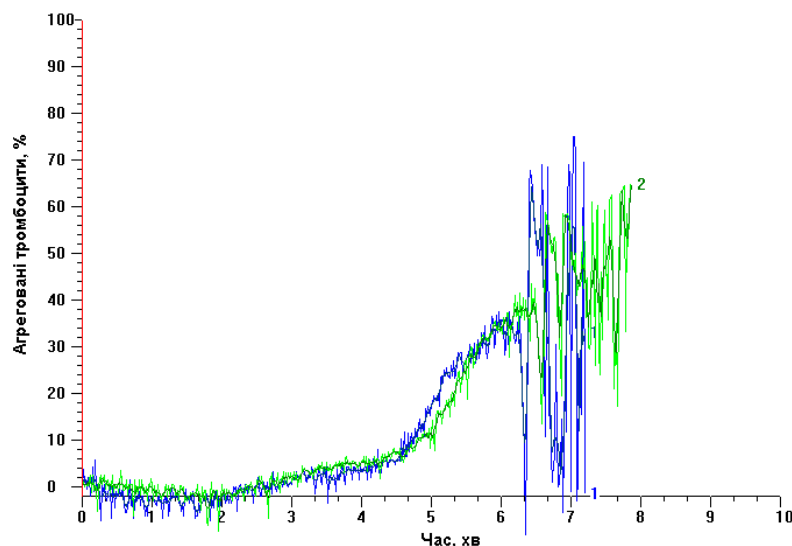


Рис. 8.7 Агрегатограма АЧТЧ-індукованої агрегації тромбоцитів в плазмі крові щурів збагаченої на тромбоцити, яким вводили суміш ДМСО та фізіологічного розчину. Реакційна суміш (0,3 мл) містить 0,05 мл 0,025 М розчину CaCl_2 , 0,05 мл АЧТЧ-реагенту, 200 мкл плазми крові 1 – плазма крові

щурів контрольної групи, 2 – плазма крові щурів, яким вводили суміш ДМСО та фізіологічного розчину.

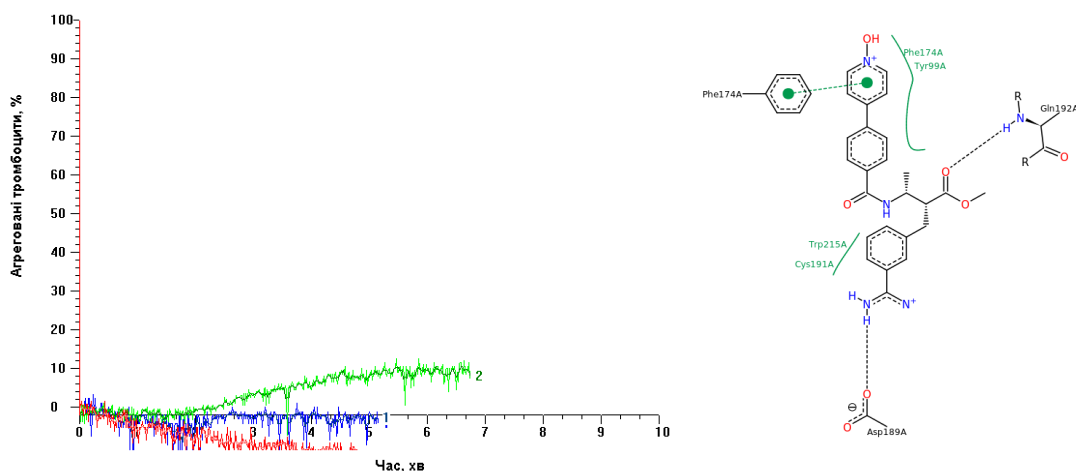


Рис. 8.8. Агрегатограма АЧТЧ-індукованої агрегації тромбоцитів в плазмі крові щурів збагаченої на тромбоцити, яким вводили інгібітор, розчинений в суміші ДМСО та фізіологічного розчину. Реакційна суміш (0,3 мл) містить 0.05 мл 0,025 М розчину CaCl_2 , 0.05 мл АЧТЧ-реагенту, 200 мкл плазми крові. Зелена крива – зразок № 4, червона крива – зразок №5. синя крива – зразок №6.

Аналіз системи зсідання крові щурів, яким вводили препарати інгібіторів фактора Ха, проводили за аналогічною схемою. Показано, що зразки № 5-6 відчутно інгібували агрегацію тромбоцитів, при цьому фібриноутворення не спостерігали взагалі (Рис. 8.8). Зразок № 4 інгібував ступінь агрегації тромбоцитів, знижуючи його до 10 % (проти 45 % у контролі). Зразки №6 і №5 майже повністю інгібували агрегаційну здатність тромбоцитів. Можна зробити висновок, що використані нами інгібітори суттєво гальмують генерацію тромбіну *in vivo*, що свідчить про їхню ефективну дію на коагуляційний каскад на етапі активації протромбіну фактором Ха.

Таким чином, значний інгібіторний ефект досліджуваних сполук на активність фактора Ха було показано також і на моделях *in vivo*. Було виявлене суттєве гальмування генерації тромбіну у плазмі крові тварин, яким сполуки було введено внутрішньовенно. Про це свідчить зниження ступеня агрегації

тромбоцитів та відсутність процесу фібриноутворення у плазмі крові дослідних щурів. В плазмі крові контрольних щурів, яким вводили еквівалентний об'єм розчинника, уже через 6 хв відзначався процес фібриноутворення.

РОЗДІЛ 9. ПОШУК НОВИХ ІНГІБІТОРІВ УРОКІНАЗИ

При дослідженні 3D-структури uPA, а саме її поверхні, можна виділити декілька сайтів зв'язування субстрату (рис. 9.1).

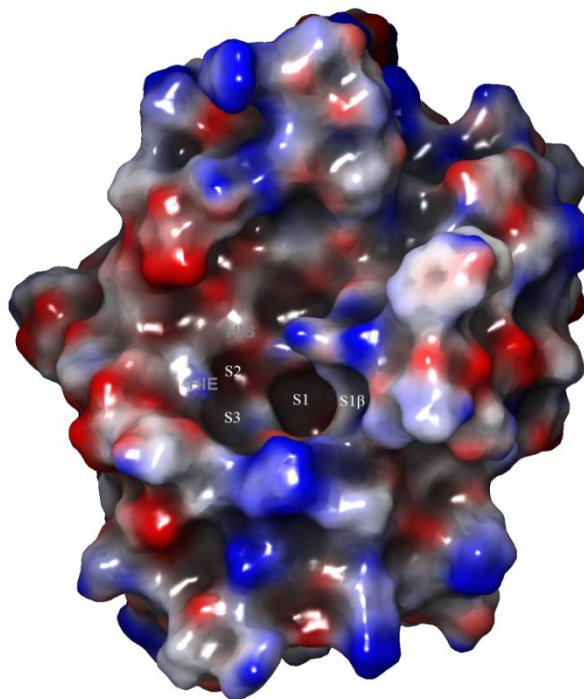


Рис. 9.1. Молекулярна поверхня uPA з сайтами зв'язування, зафарбована за електростатичним потенціалом: червоний — негативний; синій — позитивний. Субстрат-зв'язуючий канал складається з S1, S2 та S3 сайтів. S1β-сайт прилягає до каналу

В першу чергу це негативно заряджена S1-кишеня, яка слугує ідеальним середовищем для зв'язування позитивно заряджених амінокислот, таких як Arg та Lys, що було продемонстровано на кристалографічній структурі PDB ID: 1LMW [115]. У випадку з Arg, бічний ланцюг направлений в S1-кишеню і взаємодіє з Asp₁₈₉ (система нумерації хімотрипсину), утворюючи міцні водневі зв'язки та сольовий місток між NH_2^+ та карбонільним киснем Asp. Додаткові водневі зв'язки можуть бути утворені між гуанідиною групою Arg з O_γ Ser₁₉₀ та між гуанідиною групою і карбонільним киснем Gly₂₁₈. S1-кишеня має високу подібність у представників трипсиноподібних протеїназ,

однак, певної селективності можна досягти в межах цього сайту. У tPA, тромбіна, фактора Ха в 190 позиції розміщено амінокислоту Ala, тоді як в uPA та трипсині – Ser; останній здатний сформувати додатковий водневий зв'язок з Arg. В цілому, більшість синтетичних інгібіторів uPA мають спільну структурну особливість – моно- або біароматичний фрагмент, що заміщений амідиновою, гуанідиною чи аміногрупою, які функціонують як аргініновий міметик. Таким чином, S1-кишеня являється опорною ділянкою, але для підвищення активності і селективності інгібіторів, необхідне залучення інших сайтів.

Одним з варіантів є створення інгібіторів, які будуть направлені в сторону S'1- сайту, сформованого His₅₇. Заміщення в 6-положенні нафтамідину орієнтує вектор молекули в цьому напрямку. Прикладом цього інгібітора слугує 6- [(Z)-аміно(іміно) метил] - N-феніл-2-нафтаміду (закристалізований з протеїном, PDB ID:1OWE) (рис. 9.2 А) [116]. Нафтильна група закорена в S1 - кишені та утворює Ван-дер-Ваальсові контакти з внутрішньою поверхнею сайті, амід NH утворює водневий зв'язок з Ser₂₁₄ Оу через молекулу води, яка міститься у всіх кристалографічних структурах. Карбонільна група амідів взаємодіє з Gln₁₉₂ Nε2, який у свою чергу утворює водневий зв'язок з Lys₁₄₃ Nζ. Саме амід розташовує фенільну групу біля поверхні протеїну та His₅₇, тим самим покращуючи зв'язування ліганду ($K_i=0.631 \mu\text{M}$) через оптимальну гідروفобну взаємодію з протеїном. Розміщення фенільної групи в такому положенні робить її найкращим кандидатом для подальшої модифікації, а саме в мета- і пара- положенні. Навіть невеликі замісники в орто-положенні знижують активність інгібітора через стеричне зіткнення з боковим ланцюгом His₉₉. Ефективність пара-заміщення продемонстроване на прикладі 6-[(Z)-аміно(іміно)метил]-N-[4-(амінометил) феніл]-2-нафтамід (PDB ID:1OWH) (рис. 9.2 Б) [116].

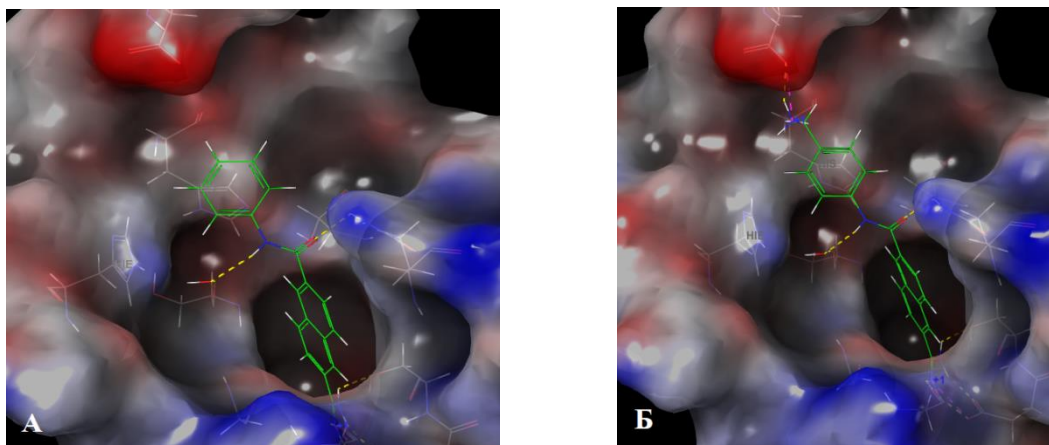


Рис. 9.2. Комплекс інгібітора 6- [(Z) - аміно(іміно) метил] - N - феніл - 2 - нафтаміду в активному сайті uPA (А). Комплекс інгібітора 6 - [(Z) - аміно (іміно) метил] -N-[4-(амінометил) феніл]-2-нафтаміду в активному сайті uPA (Б)

Важливою додатковою характеристикою цього ліганда є сольовий місток між позитивно зарядженою аміногрупою та карбоксильною групою Asp_{60A}, що підвищує активність інгібітора ($K_i = 40$ nM) (рис. 9.3). Аміногрупа відхилена від поверхні протеїну, тим самим чином збільшується відстань до Asp_{60A}, можливо, з метою зробити її максимально доступною для стабілізації розчинником.

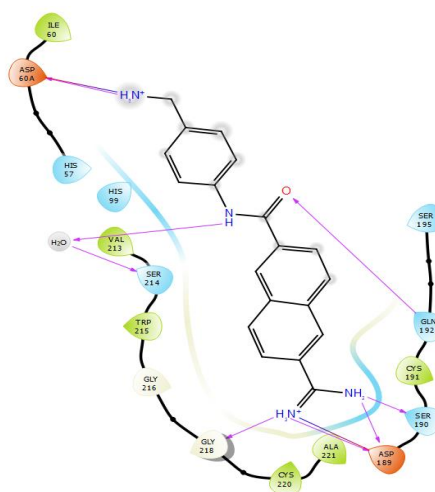


Рис. 9.3. Представлення Н-зв'язків інгібітора 6-[(Z) - аміно(іміно) метил]-N-[4-(амінометил)феніл]-2-нафтаміда з залишками активного центру uPA.

Рожевою стрілкою показано водневий зв'язок, синьою — сольовий місток (умовні позначення будуть використовуватися надалі)

Заміщення фенільної групи на 6-тетрагідроізохіноліни (рис. 9.4.) дозволяє ліганду взаємодіяти з карбоксильною групою Asp_{60A} та при цьому стає можливим розширення молекули в S1'-сайт, тим самим збільшуючи аффінітет. Незаміщений тетрагідроізохінолін підвищує активність інгібітора до $K_i = 16,5$ нМ, а алкільний замісник у вигляді етилової групи додатково забезпечує невелике збільшення активності $K_i = 6,3$ нМ та в 2-3-рази підвищує селективність по відношенню до трипсиноподібних ензимів. Загалом більша частина структури ліганду, а отже, і характер взаємодії з урокіназою аналогічна тим, що були розглянуті вище, однак, розміщення аміногрупи в циклічній структурі ближче до поверхні протеїну та з оптимальною геометрією для взаємодії з Oδ2 Asp_{60A} значно збільшує активність (наномолярна) і селективність інгібітора.

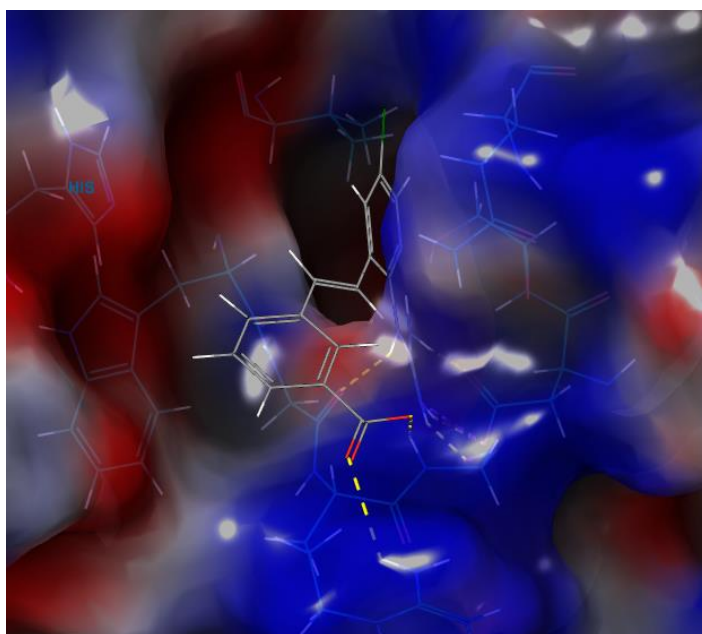


Рис. 9.4. Комплекс інгібітора 6-[аміно(іміно)метил]-N-[(4R)-4-етил-1,2,3,4-тетрагідроізохінолін-6-YL]-2-нафтаміду в активному сайті uPA.

Одним з додаткових сайтів зв'язування інгібітора може слугувати $S_1\beta$ -сайт, який обмежений амінокислотними залишками Gly₂₁₈ та Ser₁₄₆, дисульфідним зв'язком, утвореним Cys₁₉₁ і Cys₂₂₀, боковим ланцюгом Lys₁₄₃ та частиною Gln₁₉₂. 8 позиція нафтамідину направлена прямо в $S_1\beta$ -сайт. $S_1\beta$ -субкишеня містить ряд полярних груп таких як Gln₁₉₂ N Gln₁₉₂ Nε2(Oε1), Lys₁₄₃ Nζ, Ser₁₄₆ Oγ and Ser₁₄₆ O та Gly₂₁₆ O, Gly₂₁₈ N і Gly₂₁₈ O на перетині з S_1 -кишенею. Більше того, розміщена в цьому сайті закристиалізована молекула води утворює водневі зв'язки з Gln₁₉₂ O/N (9.3 Å), Lys₁₄₃ Nζ і можливо Ser₁₄₆ O.

Комплекс молекули 8-бензилкарбаміл – 2-нафтамідин ($K_i = 0.17\mu\text{M}$) з протеїном демонструє ряд важливих взаємодій в цьому сайті. Закристиалізована молекула розчинника не витісняється карбаматом і утворює з карбонільним киснем водневий зв'язок. Карбонільний нітроген, у свою чергу, формує водневий зв'язок з Gly₂₁₆ O. Наряду з гідрофільними взаємодіями, карбаміл знаходиться в межах Ван-дер-Ваальсових контактів з Gly₂₁₈, Cys₁₉₁ — Cys₂₂₀ дисульфідом, Gln₁₉₂ та Ser₁₄₆. Гідрофобні та гідрофільні взаємодії між карбамілом і $S_1\beta$ -сайтом є визначальними для зв'язування бензилкарбамільної групи, оскільки фенільна група направлена в розчинник і невпорядкована на мапі електронної густини (рис. 9.5 Å). Порівняння метил- ($K_i = 0.04\mu\text{M}$) і бензилкарбаматних структур показує, що карбаматна частина кожної молекули однаково взаємодіють з кишенею, на відміну від бензилметилу.

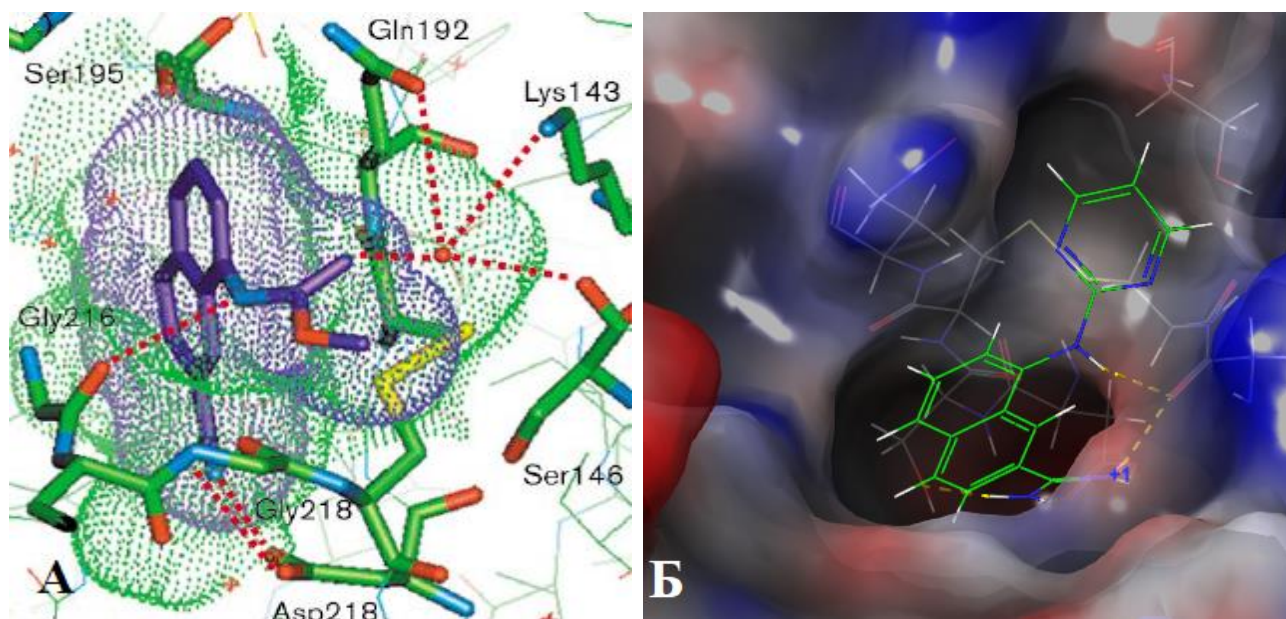


Рис. 9.5. Комплекс інгібітора 8- (бензилкарбаміл) нафтален-2-карбоксимідаміду в активному сайті uPA (А) [121]. Комплекс інгібітора 8- (піримідин-2-іламін) нафтален-2-карбоксимідаміду в активному сайті uPA (Б)

З комплексу (PDB ID: *1SQO*) видно, що 6-членне ароматичне кільце заміщає карбамат і більш оптимально займає $S_1\beta$ -сайт (рис. 9.5(Б). та рис. 9.6.), однак великої різниці в аффінітеті метилкарбамата і амінопіримідилу ($K_i = 0.03\mu\text{M}$) немає [117].

Подальші дослідження було направлено на пошук 8-заміщених гетероциклів, які розміщуються в $S_1\beta$ -сайті. 3-фурил ($K_i = 0,82\ \mu\text{M}$) проявляє більшу активність, ніж 2-фурил ($K_i = 2,1\ \mu\text{M}$), але меншу ніж 3-тетрагідрофуран ($K_i = 0,53\ \mu\text{M}$). В той же час циклоалкани, з'єднані з нафталеном NH-групою, взаємодіяли з uPA погано. В серії піразолів один з гетероатомів піддається впливу розчинника, а другий атом азоту легко піддається заміщенню. Хоча активність незаміщеного піразолу ($K_i = 2,3\ \mu\text{M}$) та метилпіразолу ($K_i = 4,6\ \mu\text{M}$) майже не відрізняється від 2-нафтаміду ($K_i = 5,9\ \mu\text{M}$), проте метилсульфонілпіразол (рис. 9.7.А) не тільки покращує зв'язування з uPA ($K_i = 0,63\ \mu\text{M}$), а й має більшу селективність по відношенню до серинових протеаз.

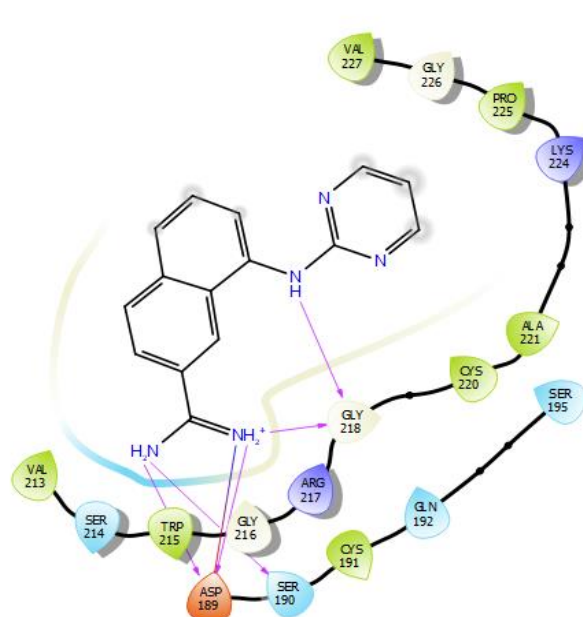


Рис. 9.6. Представлення Н-зв'язків інгібітора 8-(піримідин-2-іламіно) нафтален-2-карбоксимідаміду з залишками активного центру uPA.

На прикладі описаного вище 8-амінопіримідила, NH-група вносить близько 1,5 ккал / моль в енергію зв'язування, а піримідинове кільце - 1,4 ккал/моль, даючи 13- та 10-кратне покращення аффінітету, відповідно. В той же час сульфонілпіразол також характеризується 10-кратним поліпшенням в активності; таким чином, через відсутність більш специфічних взаємодій ця енергія являється приблизним еквівалентом афінності за умови оптимального заповнення S1 β - сайту урокіназного активатора плазміногену.

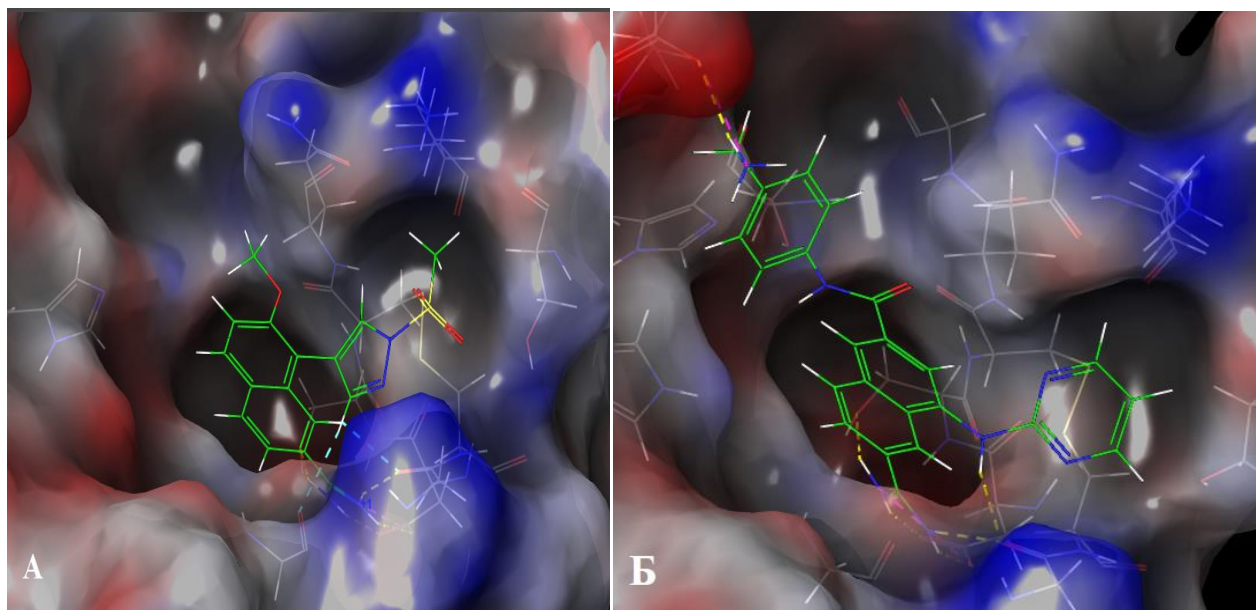


Рис. 9.7. Комплекс інгібітора 7-метокси-8-[1-(метилсульфоніл) -1H-піразол-4-іл] нафтилен-2-карбоксимідаміду(А) та 6 - [(Z) -аміно (іміно) метил] - N- [4- (амінометил) феніл] -4- (піримідин-2-іламіно) -2-нафтаміду (Б) в активному сайті uPA.

Об'єднання інгібітора 6-[(Z) - аміно(іміно) метил]-N- [4-(амінометил) феніл]-2-нафтаміда з амінопіримідиновим фрагментом призвело до утворення високоактивного і селективного інгібітора з $K_i = 0.62$ нМ (рис. 9.7.Б)

Субстрат-зв'язуючий канал складається з S1-кишені, гідрофобної S2-кишені, сформованої переважно бічними ланцюгами His₅₇ та His₉₉, і доступної для розчинника S3-кишені, обмеженою амінокислотним залишком Arg₂₁₇ та вставною петлею з Thr_{97A} і Leu_{97B}. Інгібітори, направлені в ці сайти, повинні мімікрувати зв'язування природного субстрату з урокіназою. Найбільш потужними інгібітором серії 2-піридинілгуанідинових похідних є (3-карбокси)фенілетеніловий аналог (рис.9.8). Більш висока активність ($K_i = 0,17$ μ М) цього інгібітора порівняно з іншими сполуками цього ряду є результатом комбінації ефективних гідрофобних взаємодій в субстрат-зв'язуючому каналі ферменту і водневого зв'язку між карбоксильною групою ліганду і Arg₂₁₇ (рис. 9.9.).

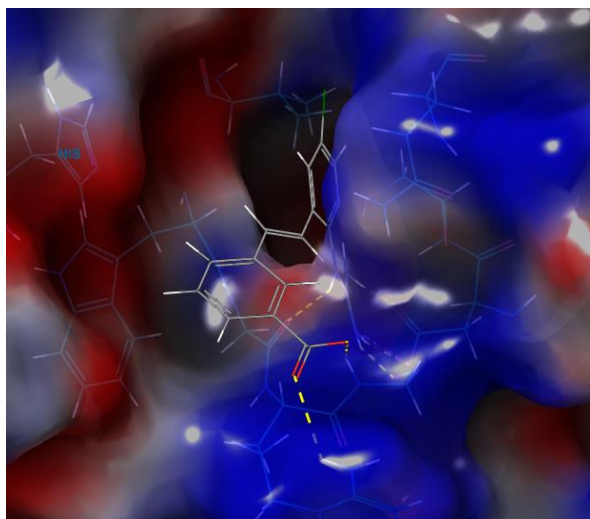


Рис. 9.8. Комплекс інгібітора (3-карбокси)фенілетеніл-2-піридинілгуанідину в активному сайті uPA, отриманий в результаті молекулярного докінгу молекули з протеїном (PDB ID: 1LMW)

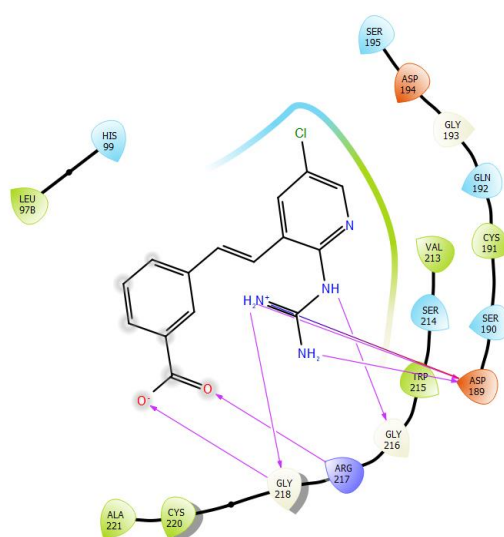


Рис. 9.9. Представлення Н-зв'язків інгібітора (3-карбокси)фенілетеніл- 2-піридинілгуанідину з залишками активного центру uPA

Динаміка ензиму у комплексах з субстратами в активному центрі дає інформацію про механізми взаємодії субстратів з ферментом та особливості структури кишені активного центру. Такі дані висвітлюють структурні особливості каталітичної роботи ферменту та є цінними для дизайну нових інгібіторів ферментативної активності. Тому для трьох комплексів, а саме інгібітора 6- [(Z) - аміно(іміно) метил] - N - феніл - 2 - нафтамід (надалі

комплекс №1), 6 - [(Z) -аміно (іміно) метил] -N- [4- (амінометил) феніл] -4- (піримідин-2-іламіно) -2-нафтаміду (комплекс №2) та (3-карбокси)фенілетеніл-2-піридинілгуанідину (комплекс №3) з урокіназним активатором плазміногену, було виконано молекулярну динаміку.

Для перевірки структурної стабільності було обчислено RMSD та RMSF С-альфа атомів uPA в комплексі з трьома інгібіторами. Значення RMSD зростають до 5 нс на всіх трьох траєкторіях, далі стають більш стабільними і знаходяться в межах ~ 1 -1,4 Å. Це обумовлюється компактною структурою глобули фермента та низькою рухливістю петель. Оскільки значення RMSD суттєво не збільшуються після 5 нс у всіх траєкторіях, останні 10 нс траєкторій було розглянуто як врівноважені та використано для подальшого аналізу.

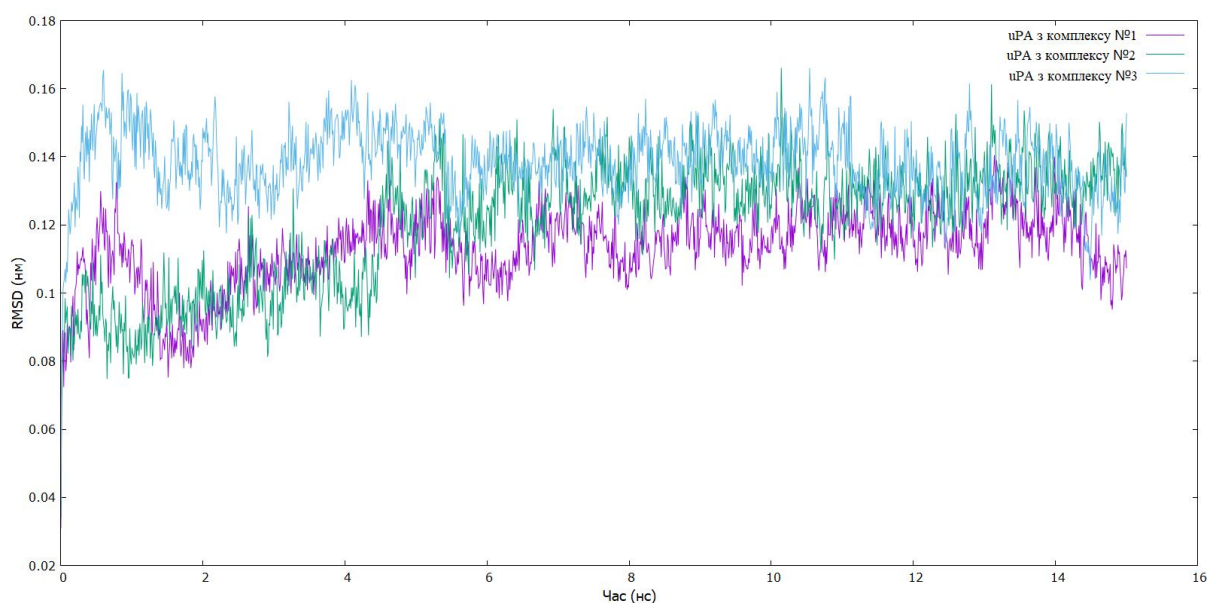


Рис.9.10. RMSD С-альфа атомів урокінази з 3 комплексів протягом 15 нс молекулярної динаміки

З графіку RMSF (рис. 9.11, для зручності наведено лише для 1- і 2-ого комплексів) видно, що до найбільш рухливих елементів протеїну відносяться слабо структуровані петлі на поверхні протеїну, сформовані амінокислотними

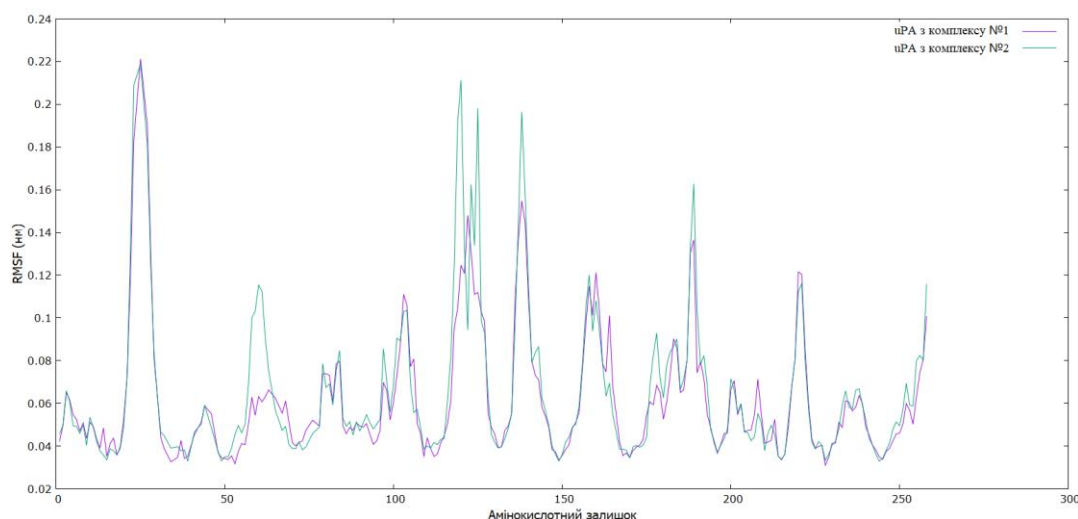


Рис. 9.11. RMSF С-альфа атомів амінокислотних залишків урокінази з 1-го і 2-го комплексів у часовому інтервалі від 5 до 15 нс.

залишками 22-28 (максимальне значення RMSF 0,22 нм), 118-125 (0,21 нм), 136-140 (0,19 нм) та 187-189 (0,16 нм) (номер не за системою нумерації хімотрипсину), але в той же час амінокислоти, що формують активний сайт ферменту, досить нерухливі.

Визначення радіусу гірації протеїну було проведено для оцінки компактності глобули та стабільності фолдингу під час динаміки. Як видно з графіку (рис. 9.12), ензим зберігає відносно стійке значення радіуса, що вказує на стабільність структури.

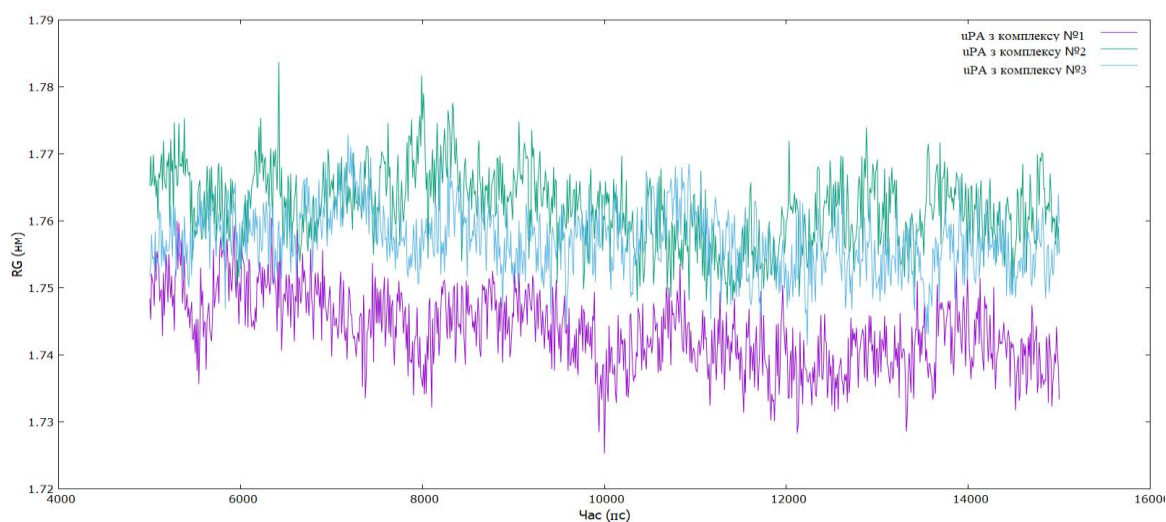


Рис. 9.12. Радіус гірації uPA з трьох комплексів у часовому інтервалі від 5 до 15 нс

Для моніторингу рухливості інгібіторів в активному центрі uPA, було обчислено RMSF для їхніх важких атомів на відрізок траєкторій 5 – 15 нс (рис. 9.13). Інгібітор з комплексу №1 показує найнижчу рухливість атомів в області нафтамідинового фрагмента - значення RMSF для атомів 1-2 та 3-13 становлять 0,02-0,05 нм, в той же час атоми фенільного кільця, розміщеного навпроти His₅₇, проявляють найвищу рухливість - 0,1 -0,13 нм. Рух кільця може бути викликане зміною положення атома C15 (0,13 нм) лінкерної послідовності. Інгібітор з комплексу №2 поводить себе подібно до першого, однак є певні відмінності. Фенільне кільце більш рухливе - значення RMSF становлять від 0,11 нм до 0,13 нм, в той же час, на відміну від попереднього, положення атому карбону досить жорстке, проте карбонільний кисень має значення RMSF 0,11 нм. Інгібітор з комплексу №3 показує найнижчу рухливість атомів серед трьох інгібіторів. До найбільш лабільного фрагменту належить карбоксифеніл зі максимальним значенням RMSF атомів C21 та O18 – 0,1 нм та 0,08 нм, відповідно.

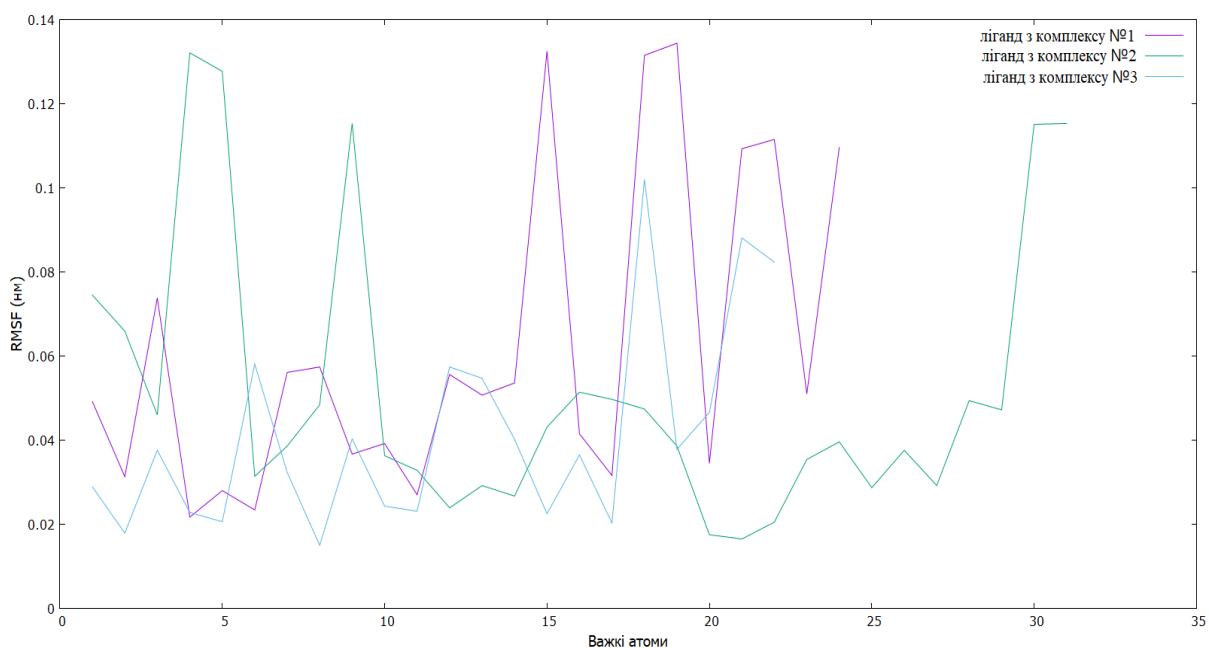


Рис. 9.13 RMSF важких атомів інгібіторів в ході динаміки uPA у комплексах з цими інгібіторами. Пікові значення флуктуацій не перевищують 1,3 Å

Щоб оцінити зв'язування лігандів в активному центрі uPA, було обчислено формування Н-зв'язків між лігандами та ферментом протягом динаміки, а також тривалість існування цих зв'язків протягом останніх 10 нс динаміки ферменту (табл. 9.1).

Таблиця 9.1

Н-зв'язки між інгібіторами та активним центром урокіназного активатора плазміногену під час 15 нс динаміки

Н-зв'язки		Тривалість існування, %
uPA	інгібітор комплексу №1	
Gly 218-O	H191N19	93,9
Asp189-OD2	H192N19	86,7
Asp189-OD1	H182N18	88,7
Asp189-OD2	H182N18	29,2
Gln192-NE2HE21	O35	0,6
Ser190-OG	H181N18	57,9
Asp60A-OD1	H381N38	46,9
Asp60A-OD2	H381N38	58,1
uPA	інгібітор з комплексу №2	
Asp189-OD2	1H28N28	93,9
Asp189-OD1	1H29N29	93,2
Ser190-OG	2H29N29	48,5
Gly 218-O	2H28N28	77,2
Gly 216-O	HN13	28,3
Gln192 NE2HE21	O9	3,6

Asp60A OD2	H1N1	9,1
Asp60A OD1	H1N1	14,5
uPA	інгібітор з комплексу №3	
Asp189-OD2	H28N13	98,2
Asp189-OD1	H29N14	100,0
Ser190 OG	H29N14	33,6
Gly218 O	H35N13	76,3
Gly218 O	H23N1	65,9
Gly216 O	H23N1	20,5
Arg217 NH1	O12	83,5
Arg217 NH2	O18	8,6
Gly218 NH	O18	65,9

Енергії взаємодій інгібіторів з активним центром ферменту (рис. 9.14), було обчислено для періоду з 5 до 15 нс динаміки uPA, за формулою 3.1:

$$E = E_{LJ} + E_C \quad (3.1)$$

де E – енергія взаємодій; E_{LJ} – енергія, яку описано потенціалом Ленард-Джонса; та E_C – енергія, яку описано за законом Кулона.

Енергія взаємодій інгібітора з комплексу №3 є нижчим відносно інгібіторів №1 і №2. Різниця між енергіями взаємодій інгібіторів №3 та №1 становить 102 кДж/моль, різниця між енергіями взаємодій інгібіторів №1 і №2 – 43 кДж/моль. Так різниця зумовлена тим, що інгібітор комплексу №3 утворює міцні довгоіснуючі водневі зв'язки з протеїном, як в S1-кишені, так і з гуанідиною групою Arg₂₁₇. Цікаво, що інгібітор з комплексу №2 показав вищу енергію, порівнюючи з інгібітором №1, хоча значення K_i нижчі більше ніж в 50 разів. Енергія, описана потенціалом Ленард-Джонса, на третину нижча

в інгібітора №2, що вказує на більшу площу взаємодіючої поверхні з ферментом внаслідок контактів з S1 β -сайтом. Однак тривалість існування водневих зв'язків з Asp60A у інгібітора №1 набагато вища, порівнюючи з інгібітором №2. Саме це може бути причиною більш низької енергії, описаної за законом Кулона, для інгібітора №1.

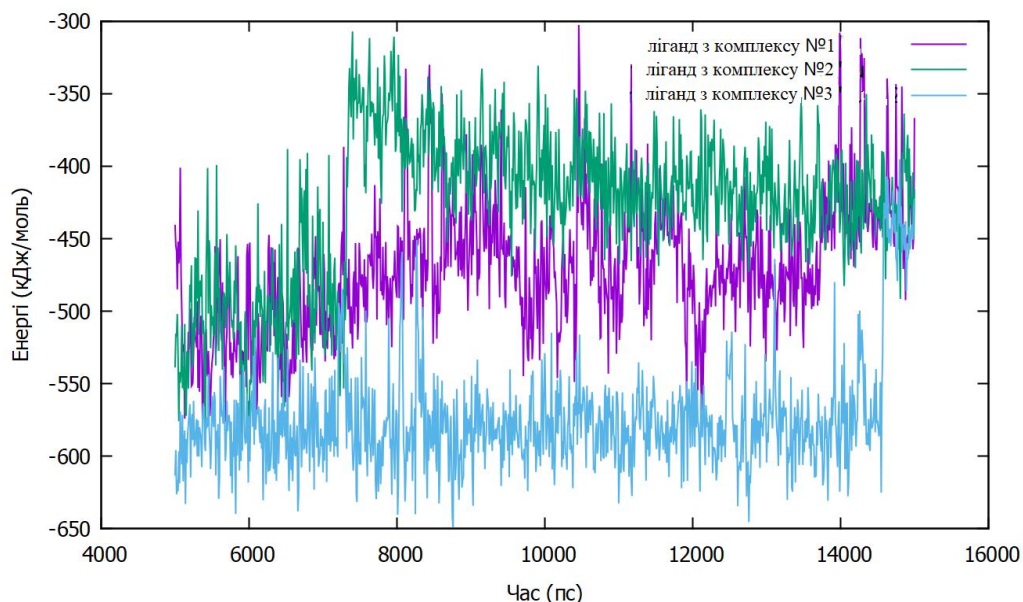


Рис. 9.14. Енергії взаємодії трьох інгібіторів з активним центром uPA в ході динаміки.

Спираючись на експериментальні дані активності інгібіторів, на інформацію, отриману з молекулярної динаміки та візуальну інспекцію, було створено 3 фармакофорні моделі: лінійну, трицентрову та модель, яка мімікрує зв'язування природніх субстратів.

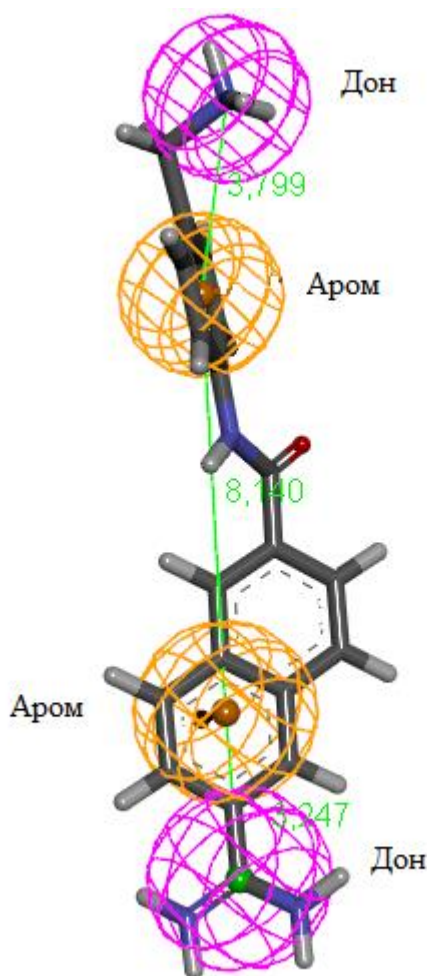


Рис. 9.15. Лінійна фармакофорна модель, побудована на основі інгібітора комплексу №1. Аром - ароматичне кільце, Дон - донор водневих зв'язків, Акц - акцептор водневих зв'язків

Лінійна фармакофорна модель була побудована на основі інгібітора комплексу №1 і містить 4 фармакофорні точки (рис. 9.15). В першу чергу - це ароматичне кільце, що розміщується в S1-кишені, і слугує основою для подальших модифікацій молекули. До ароматичного кільця прилягає донор водневих зв'язків, який забезпечує утворення зв'язків з акцепторами амінокислотних залишків Asp₁₈₉, Gly₂₁₈ та Ser₁₉₀, і може бути представлений аміно-, амідиновою-, чи гуанідиною групою. Дані, отримані з молекулярної динаміки, свідчать про те, що найбільша кількість водневих зв'язків утворюється саме з гуанідиною групою, що значно впливає на енергію зв'язування. Третьою фармакофорною точкою являється ароматичне кільце,

розміщене біля поверхні протеїну та навпроти His₅₇. Розташування фрагменту в цьому положенні покращує зв'язування ліганду з протеїном через оптимальну гідروفобну взаємодію з протеїном і робить його найкращим кандидатом для модифікації в мета- і пара-положеннях. Останньою точкою є донор водневих зв'язків, розміщений біля карбоксильної групи Asp_{60A}, який вносить вагомий внесок в енергію зв'язування інгібітора.

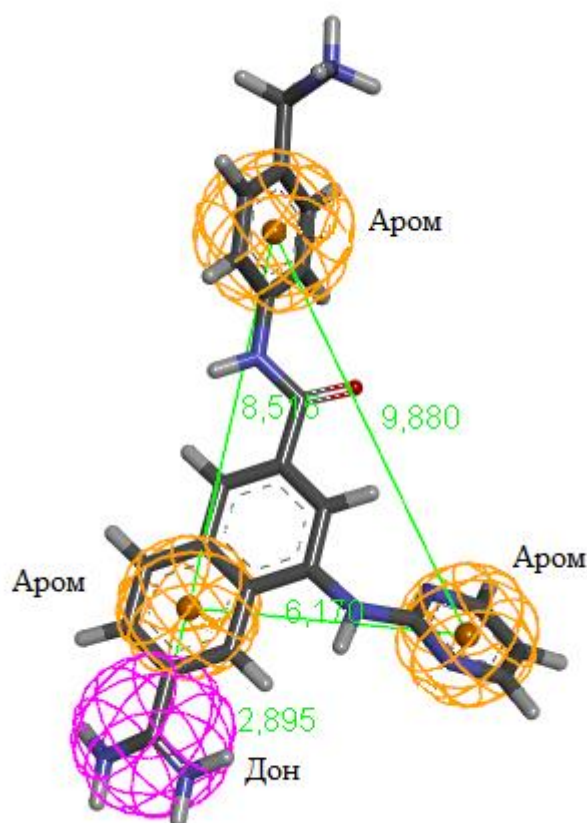


Рис. 9.16. Трицентрова фармакофорна модель, побудована на основі інгібітора комплексу №2

Трицентрова фармакофорна модель була побудована на основі інгібітора комплексу №2 і містила 4 фармакофорні точки (рис. 9.16). Відмінність моделі від попередньої полягає у відсутності донора водневих зв'язків біля Asp_{60A} та у наявності ароматичного кільця в S1 β -сайті. Ароматика в цьому положенні оптимально займає сайт, тим самим формуючи велику кількість Ван-дер-Ваальсових контактів з поверхнею протеїну. Через низьку тривалість існування

водневих зв'язків між карбонільним киснем та Gln208 і між аміногрупою та Ser214 в лінкерній ділянці було вирішено не використовувати ці групи в якості фармакофорних центрів: акцептора та донора водневих зв'язків, відповідно.

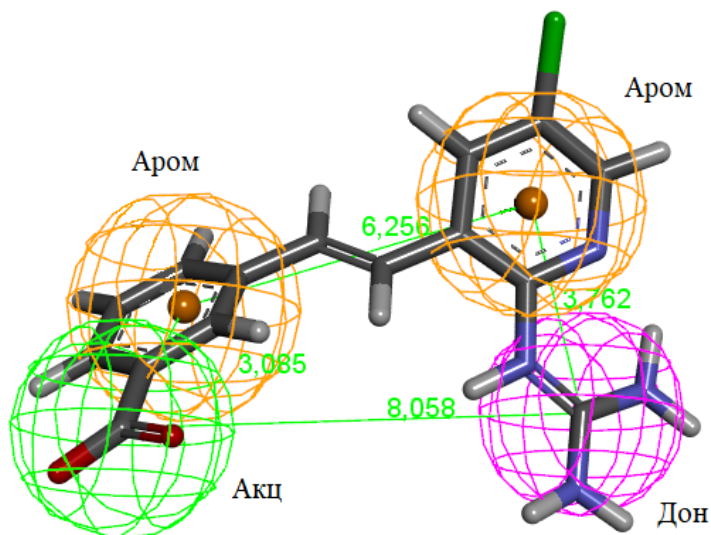


Рис. 9.17. Фармакофорна модель, що мімікрує спосіб зв'язування природного субстрату

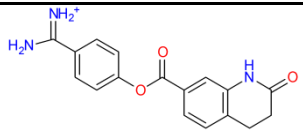
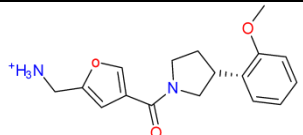
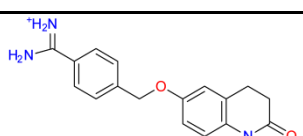
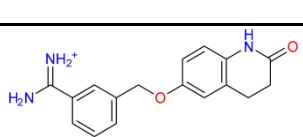
Фармакофорну модель інгібітора, що взаємодіє з урокіназою в субстрат-зв'язуючому каналі та мімікрує спосіб зв'язування природного субстрату, було побудовано на основі інгібітора комплексу №3 (рис. 9.17). Як і в попередніх моделях, ароматичне кільце та донор водневих зв'язків в S1-сайті є обов'язковою умовою для пошуку нових інгібіторів. Два інших фармакофорних центри лежать в S3-сайті. Ароматичне кільце лежить біля поверхні протеїну, утворюючи Ван-дер-Ваальсові контакти з ним, та слугує короною структурою для модифікацій. Акцептор водневих зв'язків прилягає до кільця і має взаємодіяти з гуанідиною групою Arg₂₁₇, оскільки цей зв'язок надзвичайно важливий для активності інгібітора.

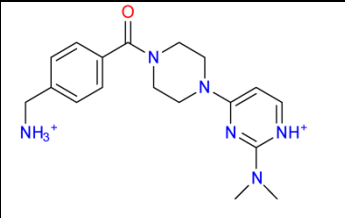
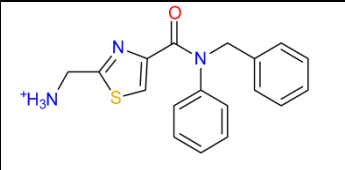
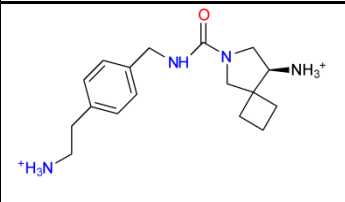
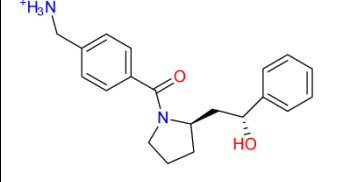
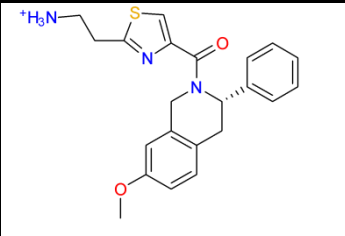
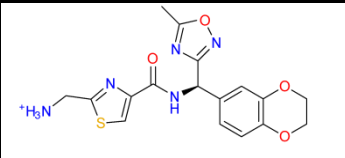
Таким чином, було створено три фармакофорні моделі, що були застосовані при молекулярному докінгу в якості фармакофорних темплейтів.

Вихідна бібліотека низькомолекулярних органічних сполук налічувала 3,2 млн речовин. Оскільки основні групи утворюють водневі зв'язки та сольові

містки з Asp189, який міститься в S1-кишені, яка є досить глибокою, щоб вмістити ароматичні ядра (бензольні кільця або нафталін), ми відібрали молекули, що містили аміно-, амідино- та гуанідинові групи, з'єднані з моно- чи біциклічною структурою аліфатичним лінкером довжиною від 1 до 3 атомів. В результаті бібліотека налічувала 3589 сполук. Потім цю бібліотеку підготували до молекулярного докінгу, в результаті якого було згенеровано 11369 конформерів. Було визначено S1-кишеню та сусідні амінокислотні залишки (Ser190, Gln192, Ser195, Gly193 і Gly216), як центр сітки докінгу і застосовано програму ICM Molsoft для докінгу. Після цього було відібрано 200 сполук, які мали оптимальні значення енергії зв'язування ліганд-протеїн і водневі зв'язки з амінокислотними залишками, що формують S1-кишеню та прилеглу до неї область. Ці ліганди були передоковані за допомогою веб-сервера SwissDock, в результаті чого було відібрано 25 лігандів для тестів *in vitro* (табл. 9.1).

Таблиця 9.1. Обчислена ΔG енергія зв'язування та інгібіторна активність сполук, визначена *in vitro*

	Структура	ΔG енергія зв'язування, kcal/mol	Інгібіторна активність, %
1		-9.411	100.0
2		-8.693	71.3
3		-9.176	67.1
4		-8.857	66.5

5		-8.969	57.5
6		-9.161	49.6
7		-10.080	44.7
8		-9.299	43.9
9		-8.607	37.9
10		-9.280	32.0

Для отриманих сполук з найвищою енергією зв'язування визначали інгібіторну активність з використанням uPA-специфічного хромогенного субстрату S2444 (табл. 9.1). Моді зв'язування найкращих 4 сполук з найвищою інгібувальною активністю показано на рис. 9.18. Для найактивнішої сполуки С1 було визначено значення IC₅₀, яке дорівнювало 2,5±0,8 μМ.

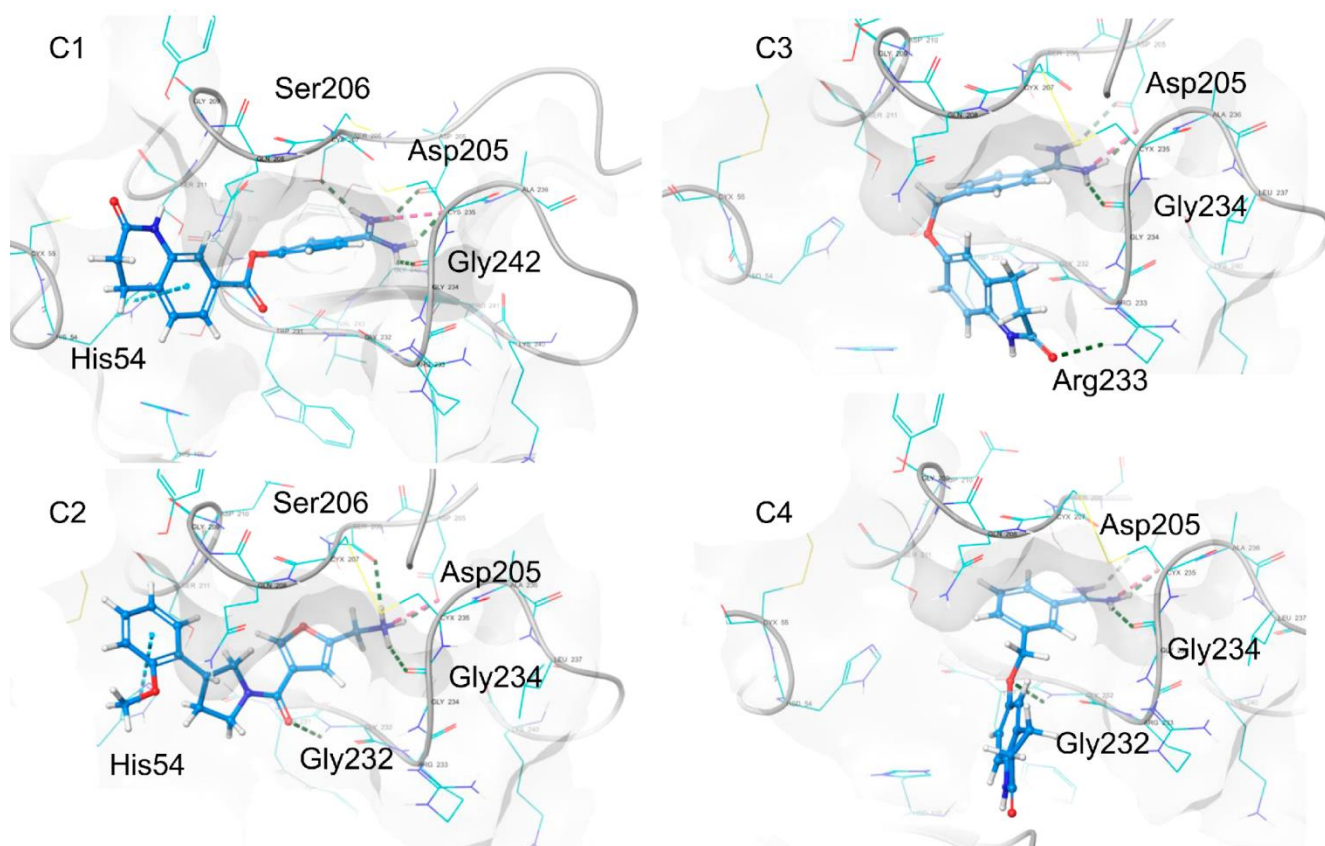


Рис. 9.18. Пози зв'язування інгібіторів з uPA, отримані за допомогою веб-сервера молекулярного докінгу SwissDock: сполуки C1, C2, C3 та C4. Водневі зв'язки показані зеленими пунктирними лініями, а сольові містки – пурпуровими.

Для дослідження поведінки найактивнішого ліганду та його взаємодії в активному сайті було проведено молекулярну динаміку. Аналіз 150 нс траєкторії виявив повільний рух у ділянці зв'язування і надав дані про міжмолекулярні взаємодії між лігандом і протеїном, такі як тривалість існування водневих зв'язків, по якій можна судити про умовну міцність комплексу. Для молекулярної динаміки було використано доковану позицію ліганду C1. Загалом, протягом всієї динаміки інгібітор утворює стабільні водневі зв'язки в S1-кишені між амідиновою групою ліганду та групою амінокислотних залишків Asp205(Asp189), Ser206 (Ser190) та Gly234(Gly219) (99%, 99% та 83% часу відповідно). Більш того, було зафіксовано формування

водневого зв'язку між карбонільним киснемом ліганду і NH-групою Gly232(Gly216) протягом третини динаміки. В той самий час NH-група інгібітора взаємодіяла або з Ser211(Ser195) – 31% динаміки або з Gln208(Gln192) – 13% (Рис. 9.19).

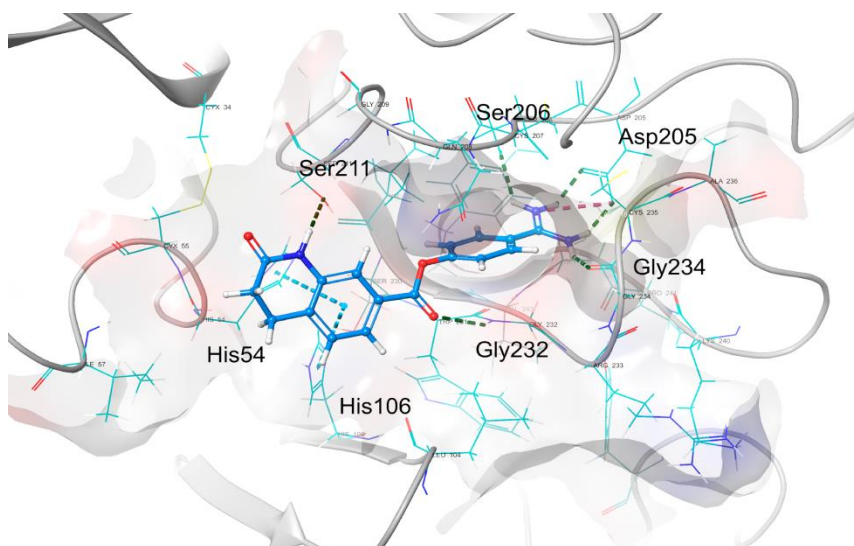


Рис. 9.19. Конформація комплексу uPA-інгібітор C1, отримана з молекулярної динаміки. Водневі зв'язки показані зеленими пунктирними лініями, а сольові містки - пурпуровими.

У відділі сигнальних механізмів клітини Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України було додатково визначено вплив інгібітора C1 на проліферацію ракових клітин MDA-MB-231. MDA-MB-231 є епітеліальною клітинною лінією раку молочної залози людини, яка є високоагресивною та інвазивною лінією і характеризуються надекспресією uPA. Було проведено два незалежних експеримента по 5 повторів в кожному для концентрацій інгібітора 0, 25, 50, 100 та 150 μM . Виміри проводили з інтервалом часу в 24, 48 та 72 годин. Варто зауважити, що при концентрації сполуки в 150 μM ступінь інгібування проліферації був меншим, ніж при концентрації в 25 μM , що може свідчити про непередбачену агрегацію сполук при високих концентраціях сполуки. Спираючись на це, значення при концентрації 150 μM не були

використані при подальших розрахунках. За результатами МТТ-тесту значення $IC_{50} = 24,5 \pm 0,5 \mu M$ (Рис. 9.20).

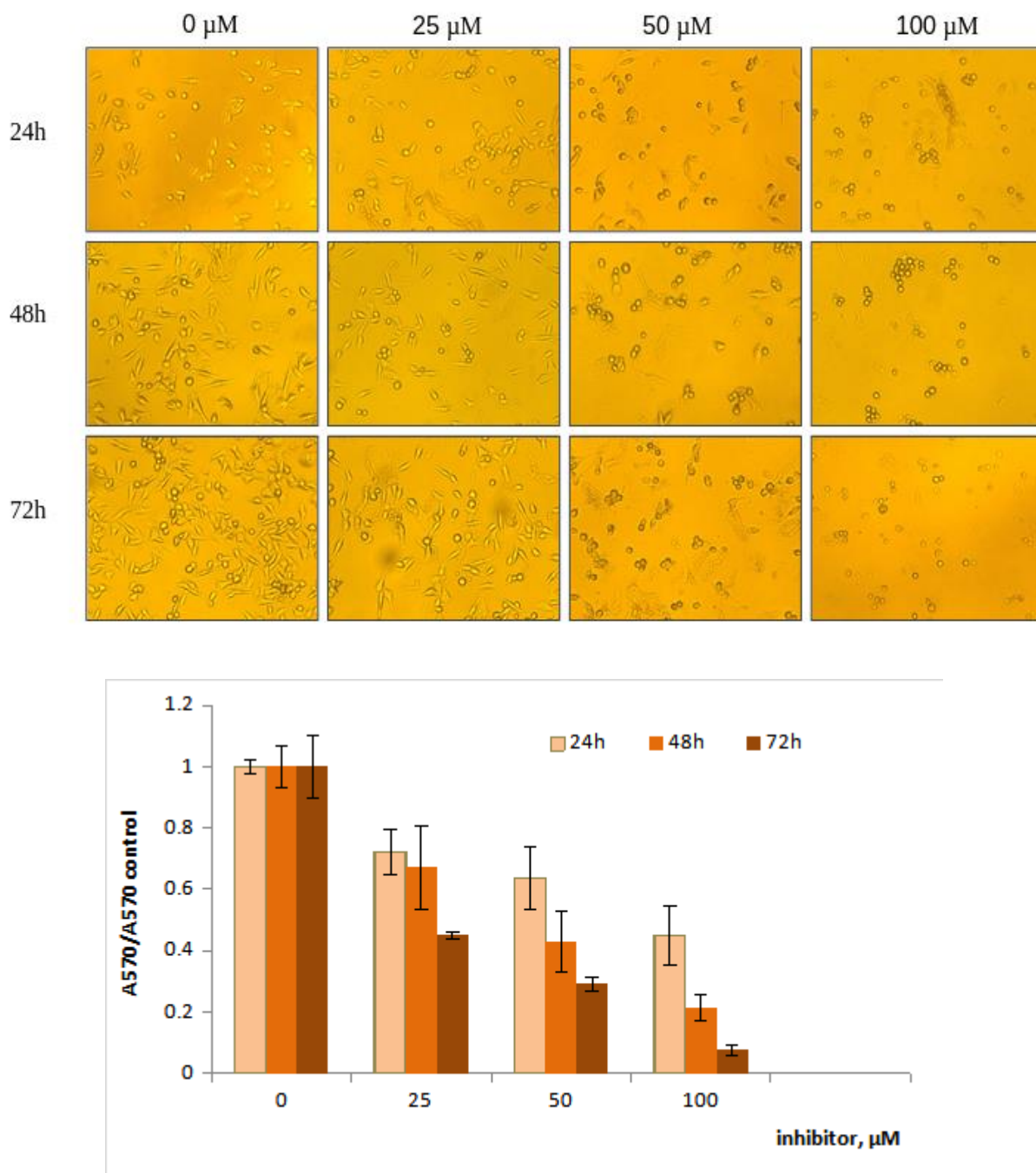


Рис. 9.20. А) Інгібування росту клітин MDA-MB-231 під впливом інгібітору С1. Контрольні (без додавання С1) та експериментальні клітини, які знаходилися у середовищі, яке містило 0, 25, 50 та 100 мкмоль/л С1 протягом 24, 48 та 72 годин, спостерігали та фотографували за допомогою мікроскопу. Б) Ефект інгібітору С1 на клітини MDA-MB-231. Вісь оУ – ступінь інгібування, визначена за допомогою МТТ-тесту; вісь оХ – різні концентрації інгібітору С1.

Таким чином, з використанням докінгу та молекулярної динаміки створено та охарактеризовано низькомолекулярні сполуки, які є ефективними інгібіторами урокінази. Інгібітор, що мав найвищу афінність до активного центру ензиму, ефективно пригнічував проліферацію пухлинних клітин у культурі. Отже, запропоновані сполуки є потенційними неімуногенними та ефективними засобами з антитромботичною та антиметастатичною дією відповідно. Подальше дослідження створених сполук є перспективним для розробки терапевтичних препаратів.

10. Заключение

In silico, докінг, комп'ютерне моделювання, прогнозування структури макромолекул у розчині – це підходи, які відкривають абсолютно нові можливості для біологічної науки. З розвитком штучного інтелекту все більшого поширення набуватимуть віртуальні експерименти, які не лише моделюватимуть молекулярні взаємодії макросполук, але і дозволятимуть прогнозувати ефекти таких взаємодій, оцінювати кінетичні та енергетичні параметри. Достатньо потужні комп'ютери вже зараз здатні за лічені години прогнозувати структури агоністів макромолекул – потенційних лікарських засобів. Однак, без залучення методів класичної біохімії, такі результати лишаються «віртуальними» – лише кропітка та грамотна перевірка може підтвердити або спростувати результати, отримані *in silico*.

З іншого боку, масив накопиченої експериментальної інформації щодо структури та взаємодій макромолекул потребує нових підходів для верифікації. Сучасні методи молекулярної динаміки можуть дозволити провести таку верифікацію даних: засвідчити можливість взаємодій, існування тих чи інших елементів вторинної та третинної структури протеїнів, тощо. У випадку, коли експериментальні дані вказують на існування певної просторової структури, лише *in silico* технології можуть запропонувати варіанти візуалізації.

Саме тому поєднання біоінформатичних підходів з методами класичної біохімії є необхідним як для глибшого розуміння молекулярних механізмів, які лежать в основі біохімічних процесів, так і для забезпечення віртуальних висновків міцним теоретичним підґрунтям. У нашій роботі ми застосували обидва підходи, намагаючись поєднувати їх гармонійно.

Роль «В»-центру полімеризації у побудові тривимірної сітки фібрину.
У 1983 році академіком В.О. Беліцером було опубліковано статтю, у якій представлено дані щодо особливостей комплексоутворення фібрину desAB з D- та DD-фрагментами фібрин(оген)у. Було показано, що комплекси desAB:D

нестабільні, їхня композиція залежить від концентрації D-мономеру в суміші, однак наближається до 1:3 – тобто, з одною молекулою фібрин-мономеру може зв'язатися три D-мономери. Натомість DD-фрагмент формує з фібрином desAB еквімолярний комплекс. Також уперше було продемонстровано утворення еквімолярного комплексу desAB:D:DD у якому на одну молекулу фібрину припадає три D-одиниці [118].

Ця знахідка стала несподіваною для науковців, оскільки за класичною схемою у DDE-тріаді існує чотири точки міжмолекулярного зв'язування. Очікувалося, що стабільний комплекс desAB:DD формуватиметься завдяки зв'язуванню молекули фібрину та двох D-одиниць D-димеру завдяки залученню пари комплементарних сайтів «А»: «а» та «В»:«b». У такому разі імовірним було б залучення у комплекс фібрину з D-димером та D-мономером не трьох, а чотирьох D-одиниць.

Водночас, саме модель взаємодії фібрину з трьома D-одиницями була передбачена раніше за допомогою кінетичного аналізу гальмування полімеризації фібрину фібриногеном і його активними фрагментами (у т.ч. фрагментом D), який було виконано у співпраці В.О. Беліцера та С.О. Костеріна [119].

Авторами запропоновано модель, яка передбачала асиметричне розташування одного з «В»-центрів полімеризації фібрину, що дозволяє приєднувати третю D-одиницю в потрібному комплексі desAB:D:DD завдяки «припасовуванню» фібрину до молекул-лігандів.

На підтвердження залучення «В»:«b» взаємодій до зв'язування у DDE-тріаді можна навести дані по інгібуванню фібриноутворення фібрину desAB фібриногеном [120]. Пептид GHRP, структурний аналог центру полімеризації «В», дещо слабше, ніж аналогічний пептид GPRP, структурний аналог центру полімеризації «А», інгібував формування полімерів фібриногену з N-кінцевим дисульфід ним вузлом фібрину, засвідчуючи участь центру полімеризації «В» у цьому процесі [121]. Дослідження ефектів фібриногену на полімеризацію фібрину desAB та desA дозволило припустити залучення центру полімеризації

«В» у первинній агрегації мономерних молекул фібрину та міжмолекулярних взаємодіях у DDE-тріаді [122].

Наслідком цієї серії робіт стало підтвердження гіпотези двохфазності дії специфічних інгібіторів самоскладання фібрину, відповідно до якої на першій (підготовчій) фазі, яка відповідає самоскладанню протофібрили, повноцінним інгібітором є D-регіон, а на другій (фазі реалізації) саме D-димер діє як сильний конкурентний інгібітор. У основі цього явища лежать конфірмаційні відмінності між D-мономером і ковалентно прошитим D-димером, які забезпечують їхню найбільшу спорідненість до фібрин-мономеру на етапі формування протофібрили та на етапі латеральної асоціації протофібрил відповідно [123].

Застосування нових і традиційних методологічних підходів у нашій роботі дозволило експериментально показати існування потрібного молекулярного комплексу фібрину desAB, D-димеру та D-фрагменту фібрин(оген)у. Тоді як D-димер взаємодіє з фібрином desAB головним чином задяки «А:а» взаємодіям та опціонально «В:в» зв'язкам, мономерний D-фрагмент включається до комплексу фібрину desAB та D-димеру завдяки «В:в» зв'язкам. При цьому було виявлено, що на одну молекулу фібрину в такому комплексі може припадати лише три D-одиниці: одна молекула D-димеру і одна молекула – D-фрагменту. Застосування підходів молекулярної динаміки дозволило не лише підтвердити принципову можливість формування такого комплексу, але й дало змогу обґрунтувати обмеження складу комплексу стеричними перешкодами. За даними обчислень, унаслідок зсуву D-димеру вздовж осі фібрину desAB у комплексі доступним для зв'язування залишається лише один «В»-центр молекули фібрину, а інший є екранованим.

Який фізіологічний сенс може ховатися у формуванні комплексу desAB:D:DD та селективному інгібуванні окремих етапів фібриноутворення різними продуктами розщеплення фібрину? На нашу думку, включення додаткової D-одиниці у DDE-тріаду робить можливим реалізацію унікального раніше неопisanого способу галуження протофібрил. Зокрема, отримані дані

також дозволили візуалізувати одноточкову модель галуження протофібрил, яка реалізовується за умов зв'язування з «В»-центром фібрину у DDE-тріаді D-регіону сусідньої молекули.

Екранування «А»-центрів полімеризації низькомолекулярними сполуками. Вченими Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України та Інституту органічної хімії НАН України вперше відкрито сполуку калікс[4]арен С-145 з унікальною антитромботичною дією. Дослідження здатності калікс[4]аренів модулювати функцію протеїнів шляхом прямого зв'язування з активними сайтами протеїнів дозволило виявити інгібіторну дію калікс[4]арену С-145 на формування фібринового згустку в плазмі крові [124, 125]. Дослідження, які проводились у рамках науково-дослідних проєктів НАН України, виявили причину такого інгібіторного ефекту – пряму взаємодію С-145 з центром «А» полімеризації фібрину, однак молекулярного механізму таких взаємодій розкрито не було [126].

Випробування С-145 на лабораторних тваринах показало збереження антикоагулянтного ефекту сполуки за умов внутрішньовенного та перорального введення [127]. Було також виявлено антиатеросклеротичний та проангіогенний ефект сполуки, що робить С-145 надзвичайно перспективним засобом, що буде поєднувати властивості, що запобігають внутрішньосудинному тромбоутворенню і водночас сприяють регенерації тканин [128,129]. Відповідно до проведених досліджень С-145 належить до малотоксичних сполук за умов перорального введення [130].

Роботи зі створення лікарської форми "Антитромботичний засіб калікс[4]арен С-145", проведені спільно з ТзОВ «Артеріум ЛТД», та доклінічні дослідження за стандартами GLP, проведені на базі Наукового центру превентивної токсикології, харчової і хімічної безпеки імені академіка Л.І. Медведя МОЗ України, офіційно засвідчили відсутність у зазначеного препарату мутагенного та алергенного ефектів і відкривають можливості до його подальших клінічних випробувань і комерціалізації [131].

У ході нашої роботи було проведено дослідження калікс[4]арену C-145 та його аналогів, як молекулярних інгібіторів полімеризації фібрину. Поєднання технологій *in vitro* та *in silico* дозволило дослідити механізм їхньої дії. Зокрема, вперше встановлено, що інгібування полімеризації фібрину сполуками калікс[4]аренового ряду відбувається завдяки зв'язуванню «А»-центру полімеризації фібрину з залишками бісфосфонових кислот калікс[4]арену, при цьому ефективність інгібування залежить від кількості цих залишків. Важливо відмітити, що теоретично обчислена афінність різних калікс[4]аренів (з одним, двома, трьома та чотирма залишками бісфосфонових кислот) відповідає визначеному експериментально інгібіторному ефекту цих сполук на полімеризацію фібрину. Це прямо свідчить про адекватність обраної моделі зв'язування калікс[4]арену C-145 та його аналогів з «А»-центром полімеризації фібрину.

Взаємодії суперспіральних ділянок молекули фібрину. Раніше суперспіральні ділянки фібрину вважалися функціонально інертними і такими, що не беруть участі у полімеризації фібрину. Однак, у Інституті біохімії було виявлено у суперспіральних регіонах молекули фібрину функціонально активний сайт, блокування якого запобігало полімеризації фібрину [112]. Згодом було показано, що у процесах полімеризації фібрину залучено одночасно фрагменти кожного з трьох ланцюгів суперспіральної області: А α , В β та γ [132,133].

Створення просторової моделі дозволило пояснити, як саме ці пептиди запобігають фібриноутворенню, а також і візуалізувати механізм взаємодії суперспіральних ділянок молекули фібрину, запропонований раніше проф. Луговським у співпраці з проф. Дулітлом [134].

Вагомим цей результат є і з практичної точки зору: інгібування полімеризації фібрину пептидами, що імітують послідовність фрагментів фібрину γ 69-77, В β 125-135, А α 91-103, відкриває перспективи створення на їх основі антитромботичного препарату.

Пошук низькомолекулярних інгібіторів ензимів системи гемостазу.

Прикладами використання підходів біоінформатики на початкових етапах експерименту слугує створення специфічних низькомолекулярних інгібіторів урокінази та фактора Ха. Обчислення дозволили сформувати фокусну бібліотеку сполук – потенційних інгібіторів. Без застосування методів *in silico* їхній аналіз був би неможливий через велетенську кількість сполук-кандидатів. Втім, нами було обрано сполуки інгібітори, згодом аналіз *in vitro* дозволив підтвердити їхню ефективність. Важко уявити, наскільки біоінформатика прискорила процес пошуку інгібіторів. Заощаджений час дозволив оперативно перейти до випробування обраних сполук на культурах клітин та *in vivo*.

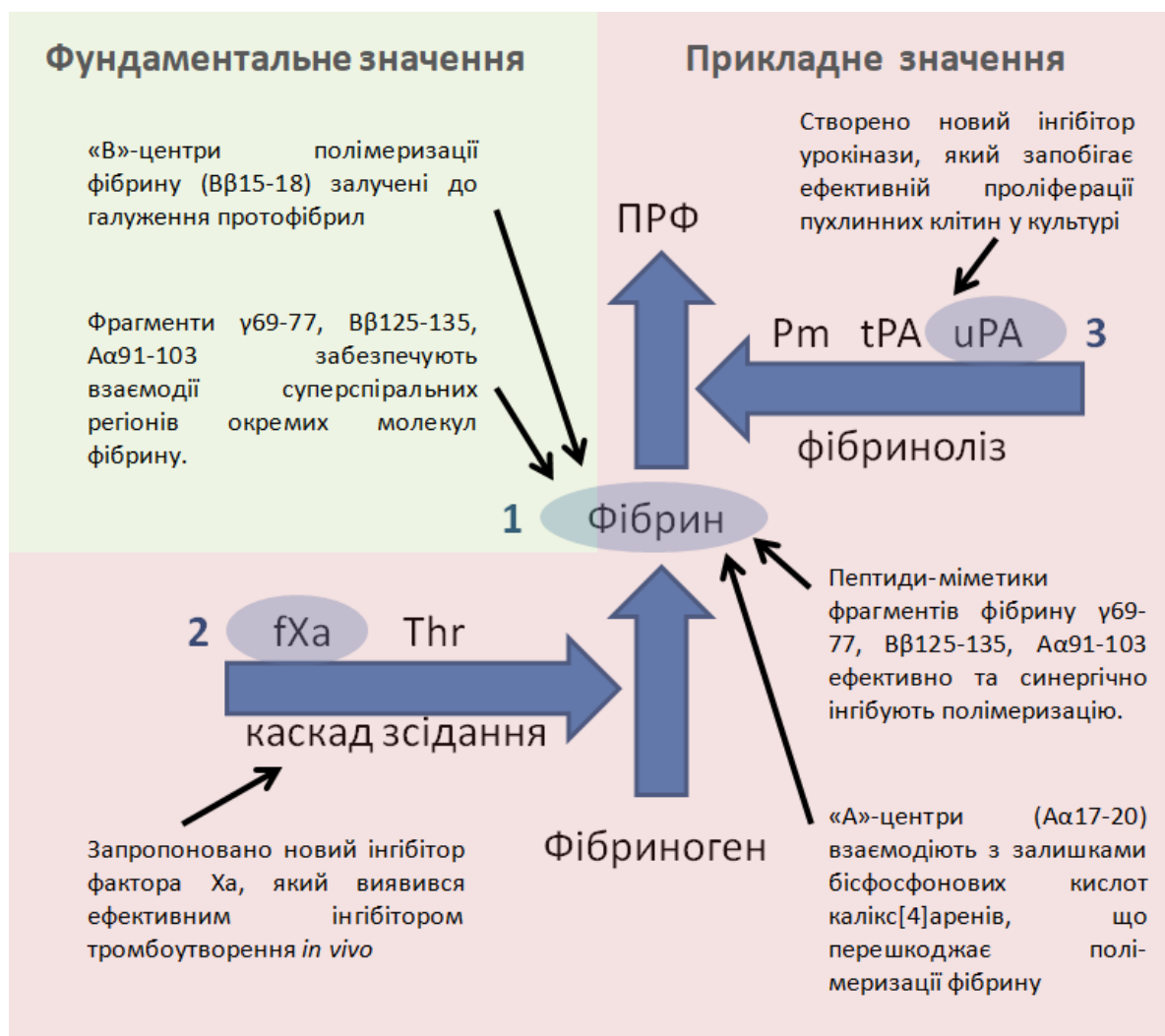


Рис. 10.1. Узагальнена схема прикладних та фундаментальних результатів дисертації.

Зокрема, найефективніший інгібітор фактора Ха виявився придатним для інгібування фібриноутворення за умов внутрішньовенного введення щурам. Інгібітор урокінази, що мав найвищу афінність до активного центру ензиму, ефективно пригнічував проліферацію пухлинних клітин з оверекспресією рецептора урокінази. Подальше дослідження створених сполук є перспективним для розробки терапевтичних препаратів.

Узагальнену схему прикладних та фундаментальних результатів дисертації, досягнення яких стало можливим завдяки поєднанню технологій *in silico* з експериментальними підходами, наведено на рис. 10.1.

Висновки

Поєднання експериментальних підходів *in vitro* з технологіями *in silico* дозволили дослідити молекулярні механізми функціонування окремих сайтів молекули фібрин(оген)у та запропонувати молекулярні інгібітори, здатні взаємодіяти з ними, пригнічуючи полімеризацію фібрину. З використанням аналогічних підходів запропоновано та апробовано високоефективні інгібітори урокінази та фактора Ха.

1. Показано шляхом вивчення комплексоутворення фібрину desAB, D-димеру та D-фрагменту фібрин(оген)у залучення «В»-центрів полімеризації фібрину (B β 15-18) молекул однієї протофібрили до зв'язування D-регіонів молекул сусідніх протофібрил, що можна розглядати як основу нового механізму галуження протофібрил.

2. Доведено з використанням молекулярної динаміки, що фрагменти γ 69-77, B β 125-135 та A α 91-103 забезпечують взаємодії суперспіральних регіонів окремих молекул фібрину, які можуть бути реалізовані в ході латеральної асоціації протофібрил. Завдяки цьому пептиди-міметики вищезазначених фрагментів фібрину ефективно та синергічно інгібують полімеризацію.

3. Доведено, що інгібіторну дію сполук калікс[4]аренового ряду на полімеризацію фібрину обумовлено взаємодіями «А»-центрів полімеризації (A α 17-20) з залишками бісфосфонових кислот калікс[4]аренів, тому критичною для стабільного зв'язування інгібітора є кількість цих залишків.

4. Запропоновано з використанням докінгу та молекулярної динаміки низку інгібіторів урокінази, доведено їхню ефективність *in vitro* та показано їхню здатність ефективно пригнічувати проліферацію пухлинних клітин у культурі.

5. Створено фокусну бібліотеку сполук потенційних інгібіторів фактора Ха. Проведено скринінг *in vitro* та обрано ті з них, які здатні інгібувати активність фактора Ха у розчині та в плазмі крові, проведено успішну апробацію за умов внутрішньовенного введення.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Versteeg, H. H.; Heemskerk, J. W.; Levi, M.; Reitsma, P. H. New Fundamentals in Hemostasis. *Physiol. Rev.* 2013, 93 (1), 327–358. doi:10.1152/physrev.00016.2011.
2. Волков, Г. Л.; Платонова, Т. Н.; Савчук, А. Н.; Горницкая, О. В.; Чернышенко, Т. М.; Краснобрыжая, Е. Н. Современные представления о системе гемостаза; Наукова думка: Киев, 2005; 295 с.
3. Owen, C. A. A History of Blood Coagulation. In: Nichols, W. L., Walter Bowie, E. J., eds. Mayo Foundation for Medical Education and Research: Rochester, MN, 2001;
4. Furie, B.; Furie, B. C. Molecular and Cellular Biology of Blood Coagulation. *N. Engl. J. Med.* 1992, 326 (12), 800-806. doi: 10.1056/NEJM199203193261205.
5. Mackman, N. The role of tissue factor and factor VIIa in hemostasis. *Anesthesia and Analgesia* 2009, 108, 1447–1452. doi:10.1213/ane.0b013e31819bceb1.
6. Sang, Y.; Roest, M.; de Laat, B.; de Groot, P. G.; Huskens, D. Interplay between Platelets and Coagulation. *Blood Rev.* 2021, 46, 100733. doi: 10.1016/j.blre.2020.100733.
7. Reitsma, S. E.; Pang, J.; Raghunathan, V.; Shatzel, J. J.; Lorentz, C. U.; Tucker, E. I.; Gruber, A.; Gailani, D.; McCarty, O. J. T.; Puy, C. Role of Platelets in Regulating Activated Coagulation Factor XI Activity. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2021, 320 (3), C365-C374. doi:/10.1152/ajpcell.00056.2020.
8. Anderson, R.; Theron, A. J.; Steel, H. C.; Nel, J. G.; Tintinger, G. R. ADP-Mediated Upregulation of Expression of CD62P on Human Platelets Is Critically Dependent on Co-Activation of P2Y1 and P2Y12 Receptors. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)* 2020, 13 (12), 420. doi:10.3390/ph13120420.

9. Malý, M. A.; Tomasov, P.; Hájek, P.; Blasko, P.; Hrachovinová, I.; Salaj, P.; Veselka, J. The Role of Tissue Factor in Thrombosis and Hemostasis. *Physiol. Res.* 2007, 56 (6), 685-695. doi:10.33549/physiolres.931054.
10. Hoffman, M.; Monroe, D. M. III. A Cell-Based Model of Hemostasis. *Thromb. Haemost.* 2001, 85 (6), 958-965.
11. Heemskerk, J. W.; Mattheij, N. J.; Cosemans, J. M. Platelet-Based Coagulation: Different Populations, Different Functions. *J. Thromb. Haemost.* 2013, 11 (1), 2-16. doi:10.1111/jth.12045.
12. Ferreira, C.; Sousa, M.; Dusse, L. et al. O Novo Modelo da Cascata de Coagulação Baseado nas Superfícies Celulares e Suas Implicações. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2010, 32 (5). doi: 10.1590/S1516-84842010000500016.
13. Weisel, J. W.; Litvinov, R. I. Fibrin Formation, Structure and Properties. *Sub-Cell. Biochem.* 2017, 82, 405-456. doi:10.1007/978-3-319-49674-0_13.
14. Vu, D.; Neerman-Arbez, M. Molecular Mechanisms Accounting for Fibrinogen Deficiency: From Large Deletions to Intracellular Retention of Misfolded Proteins. *J. Thromb. Haemost.* 2007, 5, 125-131. doi:10.1111/j.1538-7836.2007.02465.x.
15. Litvinov, R. I.; Pieters, M.; de Lange-Loots, Z.; Weisel, J. W. Fibrinogen and Fibrin. *Sub-Cell. Biochem.* 2021, 96, 471-501. DOI: 10.1007/978-3-030-58971-4_15.
16. Mosesson, M. W. Fibrinogen and Fibrin Structure and Functions. *J. Thromb. Haemost.* 2005, 3 (8), 1894-1904. doi:10.1111/j.1538-7836.2005.01365.x.
17. Marsh, J. J.; Guan, H. S.; Li, S.; Chiles, P. G.; Tran, D.; Morris, T. A. Structural Insights into Fibrinogen Dynamics Using Amide Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry. *Biochemistry* 2013, 52 (32), 5491-5502. doi:10.1021/bi4007995.

18. Duval, C.; Ariëns, R. Fibrinogen Splice Variation and Cross-Linking: Effects on Fibrin Structure/Function and Role of Fibrinogen γ' as Thrombomodulin II. *Matrix Biol.* 2017, 60-61, 8-15. doi: 10.1016/j.matbio.2016.09.01.
19. Köhler, S.; Schmid, F.; Settanni, G. The Internal Dynamics of Fibrinogen and Its Implications for Coagulation and Adsorption. *PLoS Comput. Biol.* 2015, 11 (9), e1004346. doi:10.1371/journal.pcbi.1004346.
20. Litvinov, R. I.; Faizullin, D. A.; Zuev, Y. F.; Weisel, J. W. The α -Helix to β -Sheet Transition in Stretched and Compressed Hydrated Fibrin Clots. *Biophys. J.* 2012, 103 (5), 1020-1027. doi:10.1016/j.bpj.2012.07.046.
21. Asselta, R.; Duga, S.; Tenchini, M. L. The Molecular Basis of Quantitative Fibrinogen Disorders. *J. Thromb. Haemost.* 2006, 4 (10), 2115-2129. doi:10.1111/j.1538-7836.2006.02094.x.
22. Yermolenko, I. S.; Lishko, V. K.; Ugarova, T. P.; Magonov, S. N. High-Resolution Visualization of Fibrinogen Molecules and Fibrin Fibers with Atomic Force Microscopy. *Biomacromolecules* 2011, 12 (2), 370-379. doi:10.1021/bm101122g.
23. Kattula, S.; Byrnes, J. R.; Wolberg, A. S. Fibrinogen and Fibrin in Hemostasis and Thrombosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2017, 37 (3), 13-21. doi:10.1161/ATVBAHA.117.308564.
24. Mlynárik, V. Introduction to Nuclear Magnetic Resonance. *Anal. Biochem.* 2017, 529, 4-9. doi:10.1016/j.ab.2016.05.006.
25. Lugovskoy, E.; Kolesnikova, I.; Platonova, T.; Lugovskaya, N.; Litvinova, L.; Kostyuchenko, E.; Chernyshenko, T.; Ganova, L.; Komissarenko, S. Simultaneous Quantification of Soluble Fibrin and D-dimer in Blood Plasma for the Assessment of the Threat of Thrombosis. *Clin. Med.* 2013, 11, 38-44.
26. Stang, L. J.; Mitchell, L. G. Fibrinogen. *Methods Mol. Biol.* 2013, 992, 181-192. doi:10.1007/978-1-62703-339-8_14.

27. Kwaan, H. C.; Lindholm, P. F. Fibrin and Fibrinolysis in Cancer. *Semin. Thromb. Hemost.* 2019, 45 (4), 413-422. doi:10.1055/s-0039-1688495.
28. Brennan, S. O. Variation of Fibrinogen Oligosaccharide Structure in the Acute Phase Response: Possible Haemorrhagic Implications. *BBA Clin.* 2015, 3, 221-226. doi:10.1016/j.bbacli.2015.02.007.
29. Spraggon, G.; Everse, S. J.; Doolittle, R. F. Crystal Structures of Fragment D from Human Fibrinogen and Its Crosslinked Counterpart from Fibrin. *Nature* 1997, 389 (6650), 455-462. doi:10.1038/38947.
30. Kostelansky, M.; Bolliger-Stucki, B.; Betts, L.; Gorkun, O.; Lord, S. B β Glu397 and β Asp398 but not β Asp432 Are Required for "B:B" Interactions. *Biochemistry* 2004, 43, 2465-2474.
31. Doolittle, R. F.; Pandi, L. Binding of Synthetic B Knobs to Fibrinogen Changes the Character of Fibrin and Inhibits Its Ability to Activate Tissue Plasminogen Activator and Its Destruction by Plasmin. *Biochemistry* 2006, 45 (8), 2657-2667. doi:10.1021/bi0524767.
32. Riedel, T.; Suttner, J.; Brynda, E.; Houska, M.; Medved, L.; Dyr, J. E. Fibrinopeptides A and B Release in the Process of Surface Fibrin Formation. *Blood* 2011, 117 (5), 1700-1706. doi:10.1182/blood-2010-08-300301.
33. Yamazumi, K.; Doolittle, R. F. The Synthetic Peptide Gly-Pro-Arg-Pro-Amide Limits the Plasmin Digestion of Fibrinogen in the Same Fashion as Calcium Ion. *Protein Sci.* 1992, 1 (12), 1719-1720. doi:10.1002/pro.5560011220.
34. Brennan, S. O.; Davis, R. L.; Mosesson, M. W.; Hernandez, I.; Lowen, R.; Alexander, S. J. Congenital Hypodysfibrinogenaemia (Fibrinogen Des Moines) Due to a γ 320Asp Deletion at the Ca^{2+} Binding Site. *Thromb. Haemost.* 2007, 98 (2), 467-469.
35. Pechik, I.; Yakovlev, S.; Mosesson, M. W.; Gilliland, G. L.; Medved, L. Structural Basis for Sequential Cleavage of Fibrinopeptides upon Fibrin Assembly. *Biochemistry* 2006, 45 (11), 3588-3597. doi:10.1021/bi0525369.

36. Bowley, S. R.; Okumura, N.; Lord, S. T. Impaired Protofibril Formation in Fibrinogen Gamma N308K Is Due to Altered D:D and "A:a" Interactions. *Biochemistry* 2009, 48 (36), 8656-8663. doi:10.1021/bi900239b.
37. Magatti, D.; Molteni, M.; Cardinali, B.; Rocco, M.; Ferri, F. Modeling of Fibrin Gels Based on Confocal Microscopy and Light-Scattering Data. *Biophys. J.* 2013, 104 (5), 1151-1159. doi:10.1016/j.bpj.2013.01.024.
38. Chernysh, I. N.; Nagaswami, C.; Purohit, P. K.; Weisel, J. W. Fibrin Clots Are Equilibrium Polymers That Can Be Remodeled without Proteolytic Digestion. *Sci. Rep.* 2012, 2, 879. doi:10.1038/srep00879.
39. Matsuo, T.; Kobayashi, H.; Kario, K.; Suzuki, S. Fibrin D-dimer in Thrombogenic Disorders. *Semin. Thromb. Hemost.* 2000, 26 (1), 101-107. doi:10.1055/s-2000-9811.
40. Samuelson, B. T.; Cuker, A. Measurement and Reversal of the Direct Oral Anticoagulants. *Blood Rev.* 2017, 31 (1), 77-84. doi:10.1016/j.blre.2016.08.006.
41. DeAnglis, A. P.; Nur, I.; Gorman, A. J.; Meidler, R. A Method to Measure Thrombin Activity in a Mixture of Fibrinogen and Thrombin Powders. *Blood Coagul. Fibrinolysis* 2017, 28 (2), 134-138. doi:10.1097/MBC.0000000000000560.
42. Yegneswaran, S.; Banerjee, Y.; Fernández, J. A.; Deguchi, H.; Griffin, J. H. Lyso-Sulfatide Binds Factor Xa and Inhibits Thrombin Generation by the Prothrombinase Complex. *PLoS One* 2015, 10 (8), e0135025. doi:10.1371/journal.pone.0135025.
43. Koklic, T.; Chattopadhyay, R.; Majumder, R.; Lentz, B. R. Factor Xa Dimerization Competes with Prothrombinase Complex Formation on Platelet-like Membrane Surfaces. *Biochem. J.* 2015, 467 (1), 37-46. doi:10.1042/BJ20141177.
44. Pozzi, N.; Di Cera, E. Prothrombin structure: unanticipated features and opportunities. *Expert Review of Proteomics* 2014, 11, 653-655. doi:10.1586/14789450.2014.971763.

45. Brown, M. A.; Stenberg, L. M.; Stenflo, J. Coagulation Factor Xa. *Handbook of Proteolytic Enzymes* 2013, 2908-2915. doi:10.1016/B978-0-12-382219-2.00642-6.
46. Turpie, A. G.; Bauer, K. A.; Eriksson, B. I.; Lassen, M. R. Fondaparinux vs Enoxaparin for the Prevention of Venous Thromboembolism in Major Orthopedic Surgery: A Meta-Analysis of 4 Randomized Double-Blind Studies. *Arch. Intern. Med.* 2002, 162 (16), 1833-1840. doi:10.1001/archinte.162.16.1833.
47. Marcy, T. R.; Truong, T.; Rai, A. Comparing Direct Oral Anticoagulants and Warfarin for Atrial Fibrillation, Venous Thromboembolism, and Mechanical Heart Valves. *Consult. Pharm.* 2015, 30 (11), 644-656. doi:10.4140/TCP.n.2015.644.
48. Haas, S.; Bode, C.; Norrving, B.; Turpie, A. G. Practical Guidance for Using Rivaroxaban in Patients with Atrial Fibrillation: Balancing Benefit and Risk. *Vasc. Health Risk Manag.* 2014, 10, 101-114. doi:10.2147/VHRM.S55246.
49. Greig, S. L.; Garnock-Jones, K. P. Apixaban: A Review in Venous Thromboembolism. *Drugs* 2016, 76 (15), 1493-1504. <https://doi.org/10.1007/s40265-016-0644-6>.
50. Klibanov, O. M.; Phan, D.; Ferguson, K. Drug Updates and Approvals: 2015 in Review. *Nurse Pract.* 2015, 40 (12), 34-44. doi:10.1097/01.NPR.0000473071.26873.3c.
51. Milling, T. J., Jr.; Kaatz, S. Preclinical and Clinical Data for Factor Xa and "Universal" Reversal Agents. *Am. J. Emerg. Med.* 2016, 34 (11S), 39-45. doi:10.1016/j.ajem.2016.09.052.
52. Carriero, M. V.; Franco, P.; Vocca, I.; Alfano, D.; Longanesi-Cattani, I.; Bifulco, K.; Mancini, A.; Caputi, M.; Stoppelli, M. P. Structure, function and antagonists of urokinase-type plasminogen activator. *Front. Biosci.* 2009, 14 (10), 3782-3794. doi:10.2741/3488.

53. Mahmood, N.; Mihalcioiu, C.; Rabbani, S. A. Multifaceted Role of the Urokinase-Type Plasminogen Activator (uPA) and Its Receptor (uPAR): Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Applications. *Front. Oncol.* 2018, 8, 24. doi:10.3389/fonc.2018.00024.
54. Fowler, B.; Mackman, N.; Parmer, R. J.; Miles, L. A. Binding of Human Single Chain Urokinase to Chinese Hamster Ovary Cells and Cloning of Hamster U-PAR. *Thromb. Haemost.* 1998, 80 (1), 148-154.
55. Kugler, M. C.; Wei, Y.; Chapman, H. A. Urokinase Receptor and Integrin Interactions. *Curr. Pharm. Des.* 2003, 9 (19), 1565-1574. doi:10.2174/1381612033454658.
56. Duffy, M. J. The Urokinase Plasminogen Activator System: Role in Malignancy. *Curr. Pharm. Des.* 2004, 10 (1), 39-49. doi:10.2174/1381612043453559.
57. Naldini, L.; Tamagnone, L.; Vigna, E.; Sachs, M.; Hartmann, G.; Birchmeier, W.; Daikuhara, Y.; Tsubouchi, H.; Blasi, F.; Comoglio, P. M. Extracellular Proteolytic Cleavage by Urokinase Is Required for Activation of Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor. *EMBO J.* 1992, 11 (13), 4825-4833. doi:10.1002/j.1460-2075.1992.tb05588.x.
58. Zheng, P.; Zou, R.; Liu, Y. Source of Plasminogen Activator in Rhesus Monkey Semen and Its Possible Role in Sperm Capacitation. *Sheng Li Xue Bao* 2001, 53 (1), 45-50.
59. Ulisse, S.; Baldini, E.; Sorrenti, S.; D'Armiento, M. The Urokinase Plasminogen Activator System: A Target for Anti-Cancer Therapy. *Curr. Cancer Drug Targets* 2009, 9 (1), 32-71. doi:10.2174/156800909787314002.
60. Islam, I.; Yuan, S.; West, C. W.; Adler, M.; Bothe, U.; Bryant, J.; Chang, Z.; Chu, K.; Emayan, K.; Gualtieri, G.; Ho, E.; Light, D.; Mallari, C.; Morser, J.; Phillips, G.; Schaefer, C.; Sukovich, D.; Whitlow, M.; Chen, D.; Buckman, B. O. Discovery of selective urokinase plasminogen activator

- (uPA) inhibitors as a potential treatment for multiple sclerosis. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2018, 28, 3372-3375. doi:10.1016/j.bmcl.2018.09.001.
61. Fuhrman, B. The Urokinase System in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2012, 222 (1), 8–14. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2011.10.044.
 62. Schmitt, M.; Wilhelm, O. G.; Reuning, U.; Krüger, A.; Harbeck, N.; Lengyel, E.; Graeff, H.; Gänsbacher, B.; Kessler, H.; Bürgle, M.; Stürzebecher, J.; Sperl, S.; Magdolen, V. The Urokinase Plasminogen Activator System as a Novel Target for Tumour Therapy. *Fibrinol. Proteol.* 2000, 14 (2-3), 114–132. doi:10.1054/fipr.2000.0079
 63. Ding, Y.; Niu, W.; Zheng, X.; Zhou, C.; Wang, G.; Feng, Y.; Yu, B. Plasminogen activator, urokinase enhances the migration, invasion, and proliferation of colorectal cancer cells by activating the Src/ERK pathway. *J. Gastrointest. Oncol.* 2022, 13 (6), 3100-3111. doi:10.21037/jgo-22-1215.
 64. Kwaan, H. C.; Lindholm, P. F. Fibrin and Fibrinolysis in Cancer. *Semin. Thromb. Hemost.* 2019, 45 (4), 413–422. doi:10.1055/s-0039-1688495.
 65. Choong, P. F.; Nadesapillai, A. P. Urokinase Plasminogen Activator System: A Multifunctional Role in Tumor Progression and Metastasis. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 2003, (415 Suppl), S46-S58. doi:10.1097/01.blo.0000093845.72468.bd.
 66. Zhu, C.; Jiang, L.; Xu, J.; Ren, A.; Ju, F.; Shu, Y. The Urokinase-Type Plasminogen Activator and Inhibitors in Resectable Lung Adenocarcinoma. *Pathol. Res. Pract.* 2020, 216 (4), 152885. doi:10.1016/j.prp.2020.152885.
 67. Niu, F. Y.; Jin, C.; Ma, L.; Shi, Y. X.; Li, X. S.; Jiang, P.; Gao, S.; Lin, J. R.; Song, Y. Urokinase Plasminogen Activator Predicts Poor Prognosis in Hepatocellular Carcinoma. *J. Gastrointest. Oncol.* 2021, 12 (4), 1851–1859. doi:10.21037/jgo-21-343.
 68. Banys-Paluchowski, M.; Witzel, I.; Aktas, B.; Fasching, P. A.; Hartkopf, A.; Janni, W.; Kasimir-Bauer, S.; Pantel, K.; Schön, G.; Rack, B.; Riethdorf, S.; Solomayer, E. F.; 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. doi:10.1038/s41598-018-37259-2.
69. Kumar, A. A.; Buckley, B. J.; Ranson, M. The Urokinase Plasminogen Activation System in Pancreatic Cancer: Prospective Diagnostic and Therapeutic Targets. *Biomolecules* 2022, 12 (2), 152. doi:10.3390/biom12020152.
 70. El Salamouni, N. S.; Buckley, B. J.; Ranson, M.; Kelso, M. J.; Yu, H. Urokinase Plasminogen Activator as an Anti-Metastasis Target: Inhibitor Design Principles, Recent Amiloride Derivatives, and Issues with Human/Mouse Species Selectivity. *Biophysical Reviews* 2022, 14 (1), 277–301. doi:10.1007/s12551-021-00921-7.
 71. Roodbeen, R.; Paaske, B.; Jiang, L.; Jensen, J. K.; Christensen, A.; Nielsen, J. T.; Huang, M.; Mulder, F. A.; Nielsen, N. C.; Andreasen, P. A.; Jensen, K. J. Bicyclic peptide inhibitor of urokinase-type plasminogen activator: mode of action. *Chembiochem* 2013, 14 (16), 2179–2188. doi:10.1002/cbic.201300335.
 72. Buckley, B. J.; Aboelela, A.; Minaei, E.; Jiang, L. X.; Xu, Z.; Ali, U.; Fildes, K.; Cheung, C. Y.; Cook, S. M.; Johnson, D. C.; Bachovchin, D. A.; Cook, G. M.; Apte, M.; Huang, M.; Ranson, M.; Kelso, M. J. 6-Substituted Hexamethylene Amiloride (HMA) Derivatives as Potent and Selective Inhibitors of the Human Urokinase Plasminogen Activator for Use in Cancer. *J. Med. Chem.* 2018, 61 (18), 8299–8320. doi:10.1021/acs.jmedchem.8b00838.
 73. Zhu, M.; Gokhale, V. M.; Szabo, L.; Munoz, R. M.; Baek, H.; Bashyam, S., Hurley, L. H., Von Hoff, D. D., & Han, H. Identification of a Novel Inhibitor of Urokinase-Type Plasminogen Activator. *Mol. Cancer Ther.* 2007, 6 (4), 1348–1356. doi:10.1158/1535-7163.MCT-06-0520.

74. Masucci, M.T.; Minopoli, M.; Di Carluccio, G.; Motti, M.L.; Carriero, M.V. Therapeutic Strategies Targeting Urokinase and Its Receptor in Cancer. *Cancers* 2022, 14, 498. doi:10.3390/cancers14030498.
75. Chernyshenko, V.; Shteinberg, K.; Lugovska, N.; Ryzhykova, M.; Platonova, T.; Korolova, D.; Lugovskoy, E. "Preparation of highly-concentrated autologous platelet-rich plasma for biomedical use." *Ukr. Biochem. J.* 2019, 91(2), 19-27. doi:10.15407/ubj91.02.019.
76. Varetska, T.V. Microheterogeneity of Fibrinogen. Cryofibrinogen. *Ukr. Biochem. J.* 1960, 32 (2), 13-24.
77. Pozdnjakova, T.M.; Musjalkovskaja, A.A.; Ugarova, T.P.; Protvin, D.D.; Kotsjuruba, V.N. On the properties of fibrin monomer prepared from fibrin clot with acetic acid. *Thromb. Res.* 1979, 16, 283-288. doi:10.1016/0049-3848(79)90292-5.
78. Korolova, D.S.; Syrko, M.; Stohnii, Y.; Chernyshenko, T.; Gogolinska, G. Standardization of the protein calibrators isolation methodology for thrombophilia markers detecting immunodiagnostic test systems. *Biotechnol. Acta* 2022, 15, 6, 61-68. doi:10.15407/biotech15.06.061.
79. Masci, P.P.; Whitaker, A.N.; Winzor, D.J. A simple chromatographic procedure for the purification of the D dimer fragment from crosslinked fibrin. *Anal. Biochem.* 1985, 147, 1, 128-135. doi:10.1016/0003-2697(85)90018-1.
80. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976, 72, 248-254. doi.org:10.1006/abio.1976.9999.
81. Sedmac, K.; Grossberg, S. Use of perchloric acid solution in the Coomassie Brilliant Blue G-250 Bradford staining method. *Anal. Biochem.* 1977, 79 (3), 544-552.

82. Brunelle, J. L.; Green, R. One-dimensional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (1D SDS-PAGE). *Methods Enzymol.* 2014, 541, 151-159. doi: 10.1016/B978-0-12-420119-4.00012-4.
83. Weber, K.; Osborn, M. The reliability of molecular weight determination by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 1973, 248 (1), 313-316.
84. Weisel, J. W.; Nagaswami, C. Computer modeling of fibrin polymerization kinetics correlated with electron microscope and turbidity observations: clot structure and assembly are kinetically controlled. *Biophys J.* 1992, 63, 111-128. doi:10.1016/S0006-3495(92)81594-1.
85. Belitser, V. A.; Pozdnjakova, T. M.; Platonova, T. N.; Vovk, E. V. Fibrin-fragment D complex formation. *Thrombosis Research*, 1981, 21, 565-572. [https://doi.org/10.1016/0049-3848\(81\)90257-7](https://doi.org/10.1016/0049-3848(81)90257-7).
86. Müller, M. F.; Ris, H.; Ferry, J. D. Electron microscopy of fine fibrin clots and fine and coarse fibrin films. Observations of fibers in cross-section and in deformed states. *J. Mol. Biol.* 1984, 174, 369-384. doi:10.1016/0022-2836(84)90343-7.
87. Gershkovich, A. A.; Kibirev, V. K. Khromogennye i fluorogennye peptidnye substraty proteoliticheskikh fermentov [Chromogenic and fluorogenic peptide substrates of proteolytic enzymes]. *Bioorg. Khim.* 1988, 14, 1461-1488. PMID: 3071368
88. Budzynski, A. Z. Chromogenic Substrates in Coagulation and Fibrinolytic Assays. *Lab. Med.* 2001, 32 (7), 365-368.
89. Комісаренко, С.В.; Чернищенко, В.О.; Корольова, Д.С.; Грищук, В.І.; Штайнберг, К.М. Метод концентрування тромбоцитів аутологічної плазми крові для клітинної терапії та його клінічне випробування. Інформаційне видання «Національна академія наук України у 2019 році», 2020, 21-22.
90. Born, G. V. R.; Cross, M. J. The aggregation of blood platelets. *J Physiol* 1963, 168 (1), 178–195. doi: 10.1113/jphysiol.1963.sp007185.

91. Castellone, D. Inhibitor identification in the coagulation laboratory. *Laboratory Medicine* 2013, 44 (4), 118-120.
92. Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Couch, G. S.; Greenblatt, D. M.; Meng, E. C.; Ferrin, T. E. UCSF Chimera - a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* 2004, 25 (13), 1605-1612. DOI: 10.1002/jcc.20084.
93. Webb, B.; Sali, A. Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. *Curr. Protoc. Bioinf.* 2016, 54, 5.6.1-5.6.37. DOI: 10.1002/cpbi.3.
94. Grosdidier, A.; Zoete, V.; Michielin, O. SwissDock, a Protein-Small Molecule Docking Web Service Based on EADock DSS. *Nucleic Acids Res.* 2011, 39, 270-277. DOI: 10.1093/nar/gkr366.
95. Dominguez, C.; Boelens, R.; Bonvin, A. M. HADDOCK: A Protein-Protein Docking Approach Based on Biochemical or Biophysical Information. *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 1731–1737. DOI: 10.1021/ja026939x.
96. London, N.; Raveh, B.; Cohen, E.; Fathi, G.; Schueler-Furman, O. Rosetta FlexPepDock Web Server—High Resolution Modeling of Peptide-Protein Interactions. *Nucleic Acids Res.* 2011, 39, 249–253. DOI: 10.1093/nar/gkr431.
97. Zhou, P.; Jin, B.; Li, H.; Huang, S. Y. HPEPDOCK: A Web Server for Blind Peptide-Protein Docking Based on a Hierarchical Algorithm. *Nucleic Acids Res.* 2018, 46, 443–450. DOI: 10.1093/nar/gky357.
98. Yan, Y.; Zhang, D.; Zhou, P.; Li, B.; Huang, S. Y. HDock: A Web Server for Protein-Protein and Protein-DNA/RNA Docking Based on a Hybrid Strategy. *Nucleic Acids Res.* 2017, 45, 365–373. DOI: 10.1093/nar/gkx407.
99. Abraham, M. J.; Murtola, T.; Schulz, R.; Páll, S.; Smith, J. C.; Hess, B.; Lindahl, E. GROMACS: High Performance Molecular Simulations through Multi-level Parallelism from Laptops to Supercomputers. *SoftwareX* 2015, 1–2, 19–25. DOI: 10.1016/j.softx.2015.06.001.

100. Zoete, V.; Cuendet, M. A.; Grosdidier, A.; Michielin, O. SwissParam: A Fast Force Field Generation Tool for Small Organic Molecules. *J. Comput. Chem.* 2011, 32 (11), 2359–2368. DOI: 10.1002/jcc.21816.
101. Zhmurov, A.; Protopopova, A. D.; Litvinov, R. I.; Zhukov, P.; Weisel, J. W.; Barsegov, V. Atomic Structural Models of Fibrin Oligomers. *Structure* 2018, 26 (6), 857-868.e4. DOI: 10.1016/j.str.2018.04.005.
102. Monticelli, L.; Kandasamy, S. K.; Periole, X.; Larson, R. G.; Tieleman, D. P.; Marrink, S. J. The MARTINI Coarse-Grained Force Field: Extension to Proteins. *J. Chem. Theory Comput.* 2008, 4 (5), 819-834. DOI: 10.1021/ct700324x.
103. Periole, X.; Cavalli, M.; Marrink, S. J.; Ceruso, M. A. Combining an Elastic Network With a Coarse-Grained Molecular Force Field: Structure, Dynamics, and Intermolecular Recognition. *J. Chem. Theory Comput.* 2009, 5 (9), 2531-2543. DOI: 10.1021/ct9002114.
104. Páll, S.; Abraham, M. J.; Kutzner, C.; Hess, B.; Lindahl, E. Tackling Exascale Software Challenges in Molecular Dynamics Simulations with GROMACS; In *Solving Software Challenges for Exascale*; Markidis, S., Laure, E., Eds.; Springer International Publishing: Switzerland, London, 2015; pp 3-27.
105. Wassenaar, T. A.; Pluhackova, K.; Böckmann, R. A.; Marrink, S. J.; Tieleman, D. P. Going Backward: A Flexible Geometric Approach to Reverse Transformation from Coarse Grained to Atomistic Models. *J. Chem. Theory Comput.* 2014, 10 (2), 676–690. doi: 10.1021/ct400617g.
106. Lemkul, J. A.; Bevan, D. R. Assessing the stability of Alzheimer's amyloid protofibrils using molecular dynamics. *J. Phys. Chem. B* 2010, 114 (4), 1652–1660. doi: 10.1021/jp9110794.
107. Ferrenberg, A. M.; Swendsen, R. H. Optimized Monte Carlo data analysis. *Phys. Rev. Lett.* 1989, 63 (12), 1195–1198. doi: 10.1103/PhysRevLett.63.1195.

108. Ngo, S. T.; Vu, K. B.; Bui, L. M.; Vu, V. V. Effective Estimation of Ligand-Binding Affinity Using Biased Sampling Method. *ACS Omega* 2019, 4 (2), 3887–3893. doi: 10.1021/acsomega.8b03258.
109. Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Meng, E. C.; Couch, G. S.; Croll, T. I.; Morris, J. H.; Ferrin, T. E. UCSF ChimeraX: Structure Visualization for Researchers, Educators, and Developers. *Protein Sci.* 2021, 30 (1), 70–82. doi: 10.1002/pro.3943.
110. Weisel, J. W.; Litvinov, R. I. Fibrin Formation, Structure and Properties. *Subcell. Biochem.* 2017, 82, 405–456. doi: 10.1007/978-3-319-49674-0_13.
111. Köhler, S.; Schmid, F.; Settanni, G. The Internal Dynamics of Fibrinogen and Its Implications for Coagulation and Adsorption. *PLoS Comput. Biol.* 2015, 11, e1004346. doi: 10.1371/journal.pcbi.1004346.
112. Lugovskoy, E. V.; Gritsenko, P. G.; Kolesnikova, I. N.; Lugovskaya, N. E.; Komisarenko, S. V. A Neoantigenic Determinant in Coiled Coil Region of Human Fibrin Beta-Chain. *Thromb. Res.* 2009, 123, 765-770. doi: 10.1016/j.thromres.2008.08.024.
113. Tubiana, J.; Schneidman-Duhovny, D.; Wolfson, H. J. ScanNet: An Interpretable Geometric Deep Learning Model for Structure-Based Protein Binding Site Prediction. *Nat. Methods* 2022, 19, 730–739. doi: 10.1038/s41592-022-01490-7.
114. Yang, Z.; Mochalkin, I.; Doolittle, R. F. A Model of Fibrin Formation Based on Crystal Structures of Fibrinogen and Fibrin Fragments Complexed with Synthetic Peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2000, 97, 14156-14161. doi: 10.1073/pnas.97.26.14156.
115. Spraggon, G.; Phillips, C.; Nowak, U. K.; Ponting, C. P.; Saunders, D.; Dobson, C. M.; Stuart, D. I.; Jones, E. Y. The Crystal Structure of the Catalytic Domain of Human Urokinase-Type Plasminogen Activator. *Structure* 1995, 3, 681-691. doi: 10.1016/s0969-2126(01)00203-9.
116. Wendt, M. D.; Rockway, T. W.; Geyer, A.; McClellan, W.; Weitzberg, M.; Zhao, X.; Mantei, R.; Nienaber, V. L.; Stewart, K.; Klinghofer, V.; Giranda,

- V. L. Identification of Novel Binding Interactions in the Development of Potent, Selective 2-Naphthamidine Inhibitors of Urokinase. Synthesis, Structural Analysis, and SAR of N-Phenyl Amide 6-Substitution. *J. Med. Chem.* 2004, 47, 303-324. doi: 10.1021/jm0300072.
117. Wendt, M. D.; Geyer, A.; McClellan, W. J.; Rockway, T. W.; Weitzberg, M.; Zhao, X.; Mantei, R.; Stewart, K.; Nienaber, V.; Klinghofer, V.; Giranda, V. L. Interaction with the S1 beta-pocket of urokinase: 8-heterocycle substituted and 6,8-disubstituted 2-naphthamidine urokinase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2004, 14, 3063-3068. doi: 10.1016/j.bmcl.2004.04.030.
118. Белицер, В. А.; Платонова, Т. Н.; Позднякова, Т. М. Различие между комплексами, образуемыми мономерным фибрином с фрагментом Д и димером Д. *Укр. Биохим. Журн.* 1983, 55, 243-249.
119. Белицер, В. А.; Варецкая, Т. В.; Костерин, С. А. О механизме торможения полимеризации фибрина фибриногеном и его активными фрагментами. *Биохимия* 1980, 45, 157-163.
120. Угарова, Т. П.; Калихевич, В. Н.; Ардемасова, З. А.; Белицер, В. А. Роль комплементарных центров E2 и D2 в реакции между фибрином и фибриногеном. *Биохимия* 1987, 52, 255-264.
121. Позднякова, Т. М.; Рыбачук, В. Н.; Ильина, А. В. и др. Влияние пептидов – структурных аналогов NH₂-концевых участков альфа и бета-цепей фибрина на специфическое связывание NH₂-концевого дисульфидного узла фибрина с фибриногеном. 1986, 58, 10-16.
122. Белицер, В. А.; Луговской, Э. В.; Угарова, Т. П.; Дерзская, С. Г. Взаимодействие фибриногена с двумя формами фибрина, различающимися по степени активации тромбином. *Биохимия* 1985, 50, 1336-1341.
123. Платонова, Т. М.; Мусьялковская, А. А.; Толстых, В. М.; Белицер, В. А. Торможение сборки фибрина фрагментом D, полученным из фибриногена, и его димером из стабилизированного фибрина.

- Подтверждение двухфазности эффекта торможения. Биохимия 1980, 45, 1780-1787.
124. Komisarenko, S. V.; Kosterin, S. O.; Lugovskoy, E. V.; Kalchenko, V. I. Calixarene Methylene Bisphosphonic Acids as Promising Effectors of Biochemical Processes. Український біохімічний журнал 2013, 85 (6), 106-128.
 125. Cherenok, S. O.; Yuschenko, O. A.; Gritsenko, P. G.; Lugovskoy, E. V.; Koshel, T. A. Synthesis of Calixarene-Methylenebisphosphonic Acids and Their Influence on Fibrin Polymerization. Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements 2010, 186 (4), 964-965. doi:10.1080/10426507.2010.521212.
 126. Lugovskoy, E. V.; Gritsenko, P. G.; Koshel, T. A.; Koliesnik, I. O.; Cherenok, S. O.; Kalchenko, O. I.; Kalchenko, V. I.; Komisarenko, S. V. Calix[4]arene Methylenebisphosphonic Acids as Inhibitors of Fibrin Polymerization. FEBS J. 2011, 278 (8), 1244-1251. doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08045.x.
 127. Chernyshenko, V. O.; Korolova, D. S.; Nikolaienko, T. V.; Dosenko, V. E. et al. Calix[4]arene C-145 Effects on Cellular Haemostasis. Biotechnologia Acta 2019, 9 (3), 37-43. doi: 10.15407/biotech9.03.037.
 128. Chernyshenko, V. O.; Korolova, D. S.; Dosenko, V. E.; Pashevin, D. O. et al. Calix[4]arene C-145 Effects on Plasma Haemostasis. Pharm. Anal. Acta 2015, 6, 1000406. doi: 10.15407/biotech9.03.037.
 129. Chernyshenko, V.; Didkivskyi, V.; Savchuk, O.; Cherenok, S.; Silenko, O.; Negelia, A.; Kasatkina, L.; Pirogova, L.; Yusova, O.; Kalchenko, V.; Garmanchuk, L.; Grinenko, T.; Lugovskoy, E. Head-to-Head Comparison of Calix[4]arene Bis-Phosphonic Acid C-145 and Its Sulfur-Containing Analog as Hemostasis Effectors. Ukr. Biochem. Journ. 2018, 90, 37.
 130. Didkivskyi, V. A.; Pavlenko, A. O.; Marunych, R. Y.; Selikhova, A. O.; Cherenok, S. O.; Todosiuk, T. P.; Shevchenko, S. M. HPLC Detection of

Antithrombotic Calix[4]arene in Blood Plasma of Animals. *Biotechnologia Acta* 2022, 15 (2), 51-52

131. Комісаренко, С.; Чернишенко, В.; Дідківський, В. Створення прототипу лікарського препарату "Антитромботичний засіб калікс[4]арен С-145" та його доклінічні дослідження. Національна академія наук України у 2021 році. Видавничий дім «Академперіодика» НАН України: Київ, 2021, 19.
132. Lugovskoi, E.; Makogonenko, Y.; Urvant, L.; Gritsenko, P.; Kolesnikova, I. The fibrin B β 125-135 site is involved in the lateral association of protofibrils. *Ukr. Biochem. J.* 2020, 92 (3), 33-45. doi:10.15407/ubj92.03.033.
133. Pozniak, T. A., Urvant, L. P., Gritsenko, P. G., Chernishov, V. I., Pydiura, N. A., Lugovskoi, E. V., & Komisarenko, S. V. (2014). Inhibition of fibrin polymerization by synthetic peptides corresponding to A α 195-205 and γ 69-77 sites of fibrin molecule. *Ukrainian Biochemical Journal*, 86(4), 119–125. doi:10.15407/ubj86.04.119
134. Chernyshenko, V. O. Men of the molecules. *Ukr. Biochem. J.* 2020, 92 (3), 86-90. doi:10.15407/ubj92.03.086.