

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

РЕВКА ОЛЬГА ВОЛОДИМИРІВНА

УДК 577.151.6:612.115

**КООРДИНУВАННЯ ПРОЦЕСІВ ТРОМБОУТВОРЕННЯ ТА
ФІБРИНОЛІЗУ ЗА УЧАСТІ КЛІТИН КРОВІ**

03.00.04 – біохімія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2020

Дисертацією є рукопис.

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

Науковий
керівник:

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

Офіційні
опоненти:

доктор біологічних наук, професор
Верьовка Сергій Вікторович,
завідувач лабораторії біохімії ДУ «Інститут
отоларингології ім. О.С. Коломійченка НАМН України»

доктор біологічних наук, старший науковий співробітник
Дворщенко Катерина Олександрівна,
завідувач НДЛ «Біохімії» відділення біологічних і
біомедичних технологій ННЦ «Інститут біології та
медицини» Київського національного університету імені
Тараса Шевченка

Захист дисертації відбудеться “16” листопада 2020 р. о 14 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.240.01 в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України за адресою: 01054, м. Київ, вул. Леонтовича, 9.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України за адресою: 01054, м. Київ, вул. Леонтовича, 9.

Автореферат розіслано “ ” _____ 2020 року.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
кандидат біологічних наук

Н.П. Карлова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми дослідження. Система гемостазу забезпечує збереження крові у рідкому стані, а в разі необхідності – зупинку кровотечі. До її складу входять протилежно спрямовані взаємопов'язані системи згортання крові та фібринолізу, а також система протеїну С, яка бере участь у підтримці балансу між ними [Луговской, 2013; Versteeg, 2015]. Надмірна активація системи згортання крові призводить до патологічного тромбоутворення, що супроводжується розвитком серцево-судинних захворювань – однієї з основних причин смертності у світі, тоді як надмірна активація системи фібринолізу пов'язана з ризиком розвитку геморагій.

Процес утворення та лізису фібринових згустків контролюється численними взаємодіями плазмових компонентів систем згортання крові та фібринолізу. Каскад послідовних реакцій активації факторів згортання крові спрямований на генерування тромбіну і перетворення розчинного фібриногену на нерозчинний полімерний фібрин, який формує каркас тромбу [Palta, 2014; O'Donnell, 2019]. Фібринолітична система відповідає за розчинення фібринових згустків. Фібрин є субстратом ключового ензиму системи фібринолізу плазміну та одночасно кофактором реакції активації плазміногену тканинним активатором плазміногену (t-PA) [Hudson, 2017].

На сьогоднішній день основні молекулярні механізми утворення фібринових згустків та їх деградації фібринолітичною системою встановлено. Разом з тим, не менш важливу роль у функціонуванні системи гемостазу відіграє його клітинна ланка; зокрема, тромбоцити, моноцити і нейтрофіли активно залучаються до процесів тромбоутворення та тромболізису.

Так, активація тромбоцитів призводить до утворення тромбоцитарних агрегатів за участі фібриногену. На поверхні активованих тромбоцитів акумулюються теназний та протромбіназний комплекси, які відповідають за генерування тромбіну [Podopletova, 2016; Agbani, 2015]. Разом з тим, тромбоцити, що експонують фосфатидилсерин, здатні зв'язувати на плазматичній мембрані плазміноген [Whyte, 2015] та сприяти активації одноланцюгової урокінази та плазміногену [Baeten, 2010]; ретракція згустку, яка забезпечується тромбоцитами, також впливає на процес фібринолізу [Whyte, 2017]. Таким чином, тромбоцити є безпосередніми учасниками гемостазу.

Лейкоцити також беруть участь у регуляції тромбоутворення та тромболізису [Swystun, 2016]. Моноцити та нейтрофіли секретують тканинний фактор, який запускає зовнішній каскад згортання крові [Chen, 2013; Nakamura, 2004]. Еластаза нейтрофілів підсилює їх прокоагулянтну дію, пригнічуючи інгібітор шляху тканинного фактору та антикоагулянти антитромбін і активований протеїн С [Toshiaki, 2014]. Нейтрофіли здатні вивільнювати та утримувати на своїй поверхні маркери, асоційовані з ядерним пошкодженням (до яких відносять гістони, зовнішньоклітинні пастки нейтрофілів та ін.) [Chow, 2010], які концентрують на собі прокоагулянтні ефектори та активують контактний шлях згортання крові. Моноцити і нейтрофіли регулюють активність

тромбоцитів та ендотелійних клітин [Bruhl, 2012; Darbousset, 2012]. Водночас лейкоцити експресують урокіназу, її рецептор uPAR та рецептори плазміногену, тобто здатні модулювати фібриноліз [Kunigal, 2003; Das, 2010].

Отже, взаємозв'язок плазмової та клітинної ланок гемостазу є беззаперечним, проте механізми координування та узгодження різноспрямованих процесів формування та лізису фібринових згустків клітинами крові залишаються нез'ясованими. Тому дослідження цього питання має бути важливим кроком на шляху кращого розуміння регулювання системи гемостазу, відкриття нових можливостей для корекції її функціональних порушень, розробки нових та вдосконалення існуючих методів діагностики.

Об'єкт дослідження. Об'єктом дослідження є клітини крові (тромбоцити, моноцити та нейтрофіли) і протеїни систем згортання крові та фібринолізу.

Предмет дослідження. Предметом дослідження є процеси утворення та лізису фібринового згустку за участі тромбоцитів, моноцитів та нейтрофілів.

Методи дослідження. Методи препаративної біохімії, методи виділення клітин крові, фізико-хімічні (спектрофотометрія, турбідиметрія, електрофорез), хроматографічні, імунохімічні, методи конфокальної мікроскопії та проточної цитометрії, визначення активності ензимів за хромогенним субстратом та статистичні методи.

Мета та завдання дослідження. З'ясувати молекулярні механізми координування процесів тромбоутворення та фібринолізу за участі клітин крові.

Відповідно до мети було поставлено наступні завдання:

1. Дослідити модифікуючий вплив клітин крові (тромбоцитів, моноцитів, нейтрофілів) на швидкість процесів тромбоутворення та фібринолізу в плазмі.
2. Вивчити можливість активації протеїну C на поверхні клітин крові та роль утвореного активного протеїну C в регуляції процесів утворення і лізису фібринових згустків.
3. Визначити участь тромбоцитів в утворенні та лізисі фібринових згустків з використанням конфокальної мікроскопії.
4. Дослідити взаємодію плазміногену та тканинного активатора плазміногену з нативними і агоніст-індукованими тромбоцитами, вивчити кінетику активації плазміногену різними активаторами на їх поверхні та визначити вплив тромбоцитів на швидкість гідролізу фібрину.
5. Вивчити модифікуючий вплив протромбінового комплексу на швидкість активації плазміногену тканинним активатором на поверхні тромбоцитів.
6. Проаналізувати зміни параметрів кривої оптичного поглинання процесу утворення та лізису фібринового згустку в безтромбоцитній та збагаченій тромбоцитами плазмі у хворих з резистентною артеріальною гіпертензією.

Наукова новизна одержаних результатів. В досліді *in vitro* вперше показано, що моноцити збільшують швидкість формування фібринового згустку, зміщуючи гемостатичний баланс процесів згортання та лізису фібринових згустків в бік тромбоутворення. Нейтрофіли однаково ефективно прискорюють

утворення та лізис фібринових згустків, зменшуючи загальний час існування фібринового згустку вдвічі.

Вперше з використанням методу конфокальної мікроскопії в реальному часі показано, що тромбоцити виступають центрами полімеризації фібрину та просторової організації структури фібринового згустку, що сприяє прискоренню та координуванню у просторі та часі процесів утворення фібрину і фібринолізу та обмежує розмір тромбу та час його існування.

Методами конфокальної мікроскопії та спектрофлуориметрії показано, що нативні тромбоцити здатні зв'язувати тканинний активатор плазміногену. Вперше встановлено, що взаємодія тканинного активатора плазміногену з тромбоцитами здійснюється фібрин-залежним та фібрин-незалежним шляхом.

Встановлено кількість плазміну, що генерується з сорбованого на поверхні активованих тромбоцитів плазміногену за дії ендогенних (тканинного активатора і урокінази) та екзогенних (стрептокінази) активаторів.

Вперше визначено окремі молекулярні механізми, за якими клітини крові координують утворення та лізис фібринових згустків, а саме:

- ендотелій-незалежний шлях активації протеїну С, за якого активація протеїну С відбувається безпосередньо на поверхні тромбоцитів, моноцитів та нейтрофілів;
- ефекторна дія компонентів протромбінового комплексу на активацію плазміногену тканинним активатором в присутності активованих тромбоцитів;
- організація структури фібринового згустку шляхом утворення агрегатів тромбоцитів, вбудованих у фібриновий каркас; акумулювання на їх поверхні фібрину та фібрин-асоційованих плазміногену і тканинного активатора плазміногену, з формуванням центрів ініціації фібринолізу.

Практичне значення роботи. Визначення кількісних параметрів кривої оптичного поглинання процесу утворення та лізису фібрину в плазмі, збагаченій тромбоцитами, у порівнянні з безклітинною плазмою дає змогу оцінити баланс між прокоагулянтною та антикоагулянтною дією тромбоцитів і може бути інформативним для скринінгової оцінки гемостатичних порушень у хворих з резистентною артеріальною гіпертензією.

Отримані результати щодо високого рівня плазміну, що утворюється на поверхні тромбоцитів при активації плазміногену стрептокіназою, можуть бути корисними при виборі стратегії лікування пацієнтів, інфікованих β -гемолітичними стрептококами, та проведенні тромболітичної терапії стрептокіназою.

Особистий внесок здобувача. Представлена робота є завершеним дослідженням, що виконане автором відповідно до індивідуального навчального плану аспіранта протягом 2015-2019 років. Здобувачем самостійно отримано необхідні для дослідження протеїнові препарати, зокрема, плазміноген та desAB-фібрин. Основна частина досліджень проведена разом з с.н.с. відділу хімії та біохімії ферментів к.б.н. Паталах І.І. Дослідження кінетики активації та зв'язування компонентів фібринолізу на поверхні тромбоцитів проведено разом з с.н.с. відділу хімії та біохімії ферментів к.б.н. Юсовою О.І. Дослідження з

використанням методу конфокальної мікроскопії проведено на базі відділу фізичної хімії Медичного університету Білостоку, м. Білосток, Польща, в рамках гранту FEBS Collaborative Developmental Scholarship. Постановка наукових задач, аналіз та обговорення отриманих результатів проведено спільно з с.н.с. відділу хімії та біохімії ферментів к.б.н. Паталах І.І. та науковим керівником, завідуючим відділом хімії та біохімії ферментів, д.б.н. Гриненко Т.В. Друковані праці підготовлено за безпосередньої участі автора.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертація відповідає основному плану науково-дослідних робіт відділу хімії та біохімії ферментів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України: тема «Механізми регуляції плазміноген/плазміном міжмолекулярних та міжклітинних взаємодій в системі гемостазу за норми та патології» (ДР№ 0113U003203, 01.01.2013 – 31.12.2017); тема «Механізми регуляції внутрішньоклітинних сигнальних мереж, міжклітинних та міжмолекулярних взаємодій» (ДР№ 0112U002624, 01.01.2012 – 31.12.2016); тема «Молекулярні та клітинні механізми реалізації дії плазміноген/плазмінової системи за норми та патології» (ДР№0118U000377, 01.01.2018 – 31.12.2022); тема «Біохімічні механізми контролю системних міжклітинних взаємодій, регулювання сигнальних мереж та клітинних функцій за умов норми та патологічних станів» (ДР№ 0117U004344, 01.01.2017 – 31.12.2021). Частину роботи було виконано в рамках гранту FEBS Collaborative Developmental Scholarship.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертації були представлені на VIII Міжнародній конференції молодих вчених «Від молекули до біосфери» (Харків, Україна, 2013), Конференції-конкурсі молодих учених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології» (Київ, Україна, 2016), Міжнародній конференції «Актуальні проблеми сучасної біохімії» (Львів, Україна, 2016, відмічено премією), Bridges in Life Sciences, RECOOP 13th Annual Scientific Conference (Загреб, Хорватія, 2018), Конференції-конкурсі молодих учених «Modern aspects of Biochemistry and Biotechnology» (Київ, Україна, у 2018 та 2019 роках, відмічено премією), FEBS 3+ Meeting – XIth Parnas Conference – Young Scientist Forum «Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine» (Київ, Україна, 2018), «Youth and progress of biology», XV International scientific conference for students and PhD students, dedicated to the 135th anniversary of J. Parnas (Львів, Україна, 2019, відзначено премією), XII Українському біохімічному конгресі (Тернопіль, Україна, 2019), а також доповідались на наукових семінарах Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України та відділу хімії і біохімії ферментів.

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 5 статей в українських та закордонних фахових виданнях, 10 тез доповідей у збірках наукових конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається з анотації, переліку опублікованих робіт за темою дисертаційної роботи, вступу, огляду літератури (1 розділ), експериментальної частини (2 розділи),

заключення, висновків та списку джерел літератури (162). Робота представлена на 169 сторінках, містить 39 рисунків та 1 таблицю.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури

В огляді літератури висвітлено сучасні відомості про функціонування систем згортання крові та фібринолізу, структуру і функції плазміногену та його активаторів, систему протеїну С. Висвітлено дані про участь моноцитів та нейтрофілів у процесах згортання крові та фібринолізу, а також про структуру та функції тромбоцитів, субпопуляції тромбоцитів, сигнальні шляхи, що запускаються при їх активації, та роль тромбоцитів у процесах утворення та лізису фібринових згустків.

Матеріали та методи досліджень

Кров умовно здорових донорів отримували згідно договору співпраці з Центром крові Головного військового клінічного шпиталю Міністерства оборони України. Для аналізу параметрів кривої згортання та лізису плазми, збагаченої тромбоцитами для хворих з резистентною артеріальною гіпертензією отримували кров пацієнтів, що проходили лікування у Національному Науковому Центрі «Інститут кардіології ім. М. Д. Стражеска» НАМН України. Від усіх донорів було отримано інформовану згоду на проведення досліджень.

Glu-плазміноген людини отримували з цитратної плазми крові методом афінної хроматографії на лізин-сефарозі [Deutsch, 1970]. Фібриноген людини одержували з цитратної плазми крові методом фракційного висолювання сульфатом натрію [Варецька, 1961]. desAB-фібрин отримували обробкою фібриногену тромбіном за присутності *n*-хлормеркурійбензоату натрію та ϵ -амінокапронової кислоти [Варецька, 1965]. Чистоту одержаних протеїнів перевіряли методом PAGE електрофорезу за присутності SDS [Laemmli, 1970] або за низьких значень рН [Panim, 1969].

Тромбоцити виділяли із цільної крові умовно здорових донорів, яка містила антикоагулянт, методом диференціального центрифугування або гель-фільтрації на Сефарозі 2В [Gear, 2001]. Кількість клітин у фракціях і їх життєздатність оцінювали за допомогою агрегометра «SOLAR AT-02» (Білорусь) з використанням пакету програм «Агрегометр 2.0». Виділення лейкоцитів проводили із цільної крові умовно здорових донорів, яка містила антикоагулянт, методом диференціального центрифугування. Їх розділяли на фракції, збагачені на моноцити та нейтрофіли, на градієнтному розчині фікол-урографіну [Fuss, 2013].

Активацію протеїну С (РС) оцінювали за рівнем амідолітичної активності, яку визначали за швидкістю вивільнення *n*-нітроаніліну з хромогенного субстрату S-2366 в присутності моноцитів, нейтрофілів та тромбоцитів. Реакційне середовище містило РС (0,4 мкг/мл), тромбін (0,15 NIH од./мл), S-2366 (0,6 мМ)

та клітини: моноцити (1,5 млн/мл), нейтрофіли (1,5 млн/мл) або тромбоцити (300 млн/мл).

Дослідження впливу моноцитів, нейтрофілів та тромбоцитів на процеси утворення і лізису фібринових згустків в плазмі крові оцінювали за зміною оптичної густини при довжині хвилі 405 нм з використанням мікрорідера Multiscan-2000 (Фінляндія). Згусток формували в лунках мікропланшет, в які послідовно додавали 0,05 М трис-НCl буфер з 0,15 NaCl, 50 мкл безклітинної плазми, 20-40 од./мл тканинного активатора плазміногену (t-PA) (використовували одноланцюговий рекомбінантний препарат “Актилізе” (Boeinger, Німеччина)), суспензію кожного з виду клітин: 1 млн/мл нейтрофілів або моноцитів та 300 млн/мл тромбоцитів. Процес згортання плазми ініціювали додаванням CaCl₂ до кінцевої концентрації 8 мМ і/або 0,33 NIH од. чи 0,017 NIH од. тромбіну (Sigma-Aldrich, США). Об'єм реакційної суміші становив 0,15 мл.

Вплив тромбоцитів на полімеризацію та гідроліз des-AB-фібрину досліджували при 350 нм із застосування турбідиметричного методу. Фібриновий згусток утворювали при 37°C в термостатованій кюветі спектрофотометра, в яку послідовно додавали 0,05 М трис-НCl буфер (рН 7,4), що містив 0,13 М NaCl та 1 мМ CaCl₂, 15 мкг/мл Glu-плазміногену, 5 од./мл t-PA, 1 NIH од./мл тромбіну, 50 млн/мл тромбоцитів. Реакцію полімеризації ініціювали додаванням 1-2 % розчину в 0,125 % оцтовій кислоті des-AB-фібрину – 200 мкг/мл.

Шляхом аналізу отриманих кривих визначали ряд параметрів: максимальну мутність фібринового згустку за максимальним значенням поглинання, лаг-період – за часом, необхідним для початку полімеризації, швидкість утворення згустку – за тангенсом кута нахилу дотичної до висхідної ділянки кінетичної кривої, швидкість лізису згустку – за тангенсом кута нахилу дотичної до низхідної ділянки кривої. Проміжок часу від досягнення максимального поглинання до моменту зменшення максимального поглинання наполовину визначали як час напівлізису згустку. Проміжок часу від ініціації полімеризації до повного розчинення згустку – як час існування згустку.

Кінетику активації Glu-плазміногену різними активаторами – тканинним активатором, урокіназою та стрептокіназою – досліджували за швидкістю вивільнення плазміном *n*-нітроаніліну з хромогенного субстрату S-2251. Реакційне середовище містило 0,05 М трис-НCl буфер (рН 7,4) з 0,13 М NaCl та 1 мМ CaCl₂, 250 нМ Glu-плазміноген, 1,25 нМ активатор, 3 мМ S-2251. Для визначення впливу тромбоцитів до реакційної суміші додавали інтактні або попередньо активовані 1 NIH од. тромбіну протягом 5 хв тромбоцити, в кількості 400 млн/мл.

Взаємодію FITC-міченого Glu-плазміногену з тромбоцитами визначали методом протокової цитофлуориметрії. Активацію тромбоцитів (100 млн/мл) здійснювали тромбіном (2 NIH од./мл). Відмиті нативні та активовані клітини інкубували з FITC-плазміногеном (1 мМ). Взаємодію t-PA з тромбоцитами досліджували методом флуоресцентної спектроскопії з використанням одержаних антитіл проти t-PA та вторинних FITC-мічених антитіл проти IgG

кроля. Взаємодію FITC-міченої стрептокінази з тромбоцитами досліджували за аналогічною методикою для FITC-плазміногену. Інкубація нативних та тромбін-активованих клітин з FITC-стрептокіназою проводилась в присутності та у відсутності 1 мкМ Glu-плазміногену.

Для дослідження ролі тромбоцитів у процесах утворення та лізису фібрину методом конфокальної мікроскопії в реальному часі використовували протокову камеру, що відтворює умови потоку крові (5 мл/год). Джерелом тромбоцитів була свіжа цитратна кров донорів, в яку безпосередньо перед проходженням через камеру додавали хлорид кальцію (0,75 мМ) та хлорид магнію (3 мМ). Для візуалізації утворення полімерного фібрину та зв'язування плазміногену на фібрин-тромбоцитарних мікроагрегатах використовували мічений фібриноген Alexa Fluor 488 (16 мкг/мл), мічений плазміноген Alexa Fluor 647 (120 нМ), анексин V, мічений Alexa Fluor-488 або Alexa Fluor-647 (1:100). За допомогою конфокального мікроскопу в реальному часі вивчали динаміку стимульованого колагеном формування полімерного фібрину та зв'язування плазміногену. Для вивчення динаміки процесу тромбоутворення та наступного фібринолізу, у кров, окрім міченого фібриногену, попередньо додавали t-РА (10 нМ). Дослідження зв'язування t-РА з тромбоцит-фібриновими мікроагрегатами проводили в такій самій системі, що відтворює умови потоку крові. Утворені тромбоцит-фібринові агрегати, промивали буфером, що містив t-РА (140 нМ), після чого вивчали за допомогою конфокального мікроскопу. Дослідження участі тромбоцитів в утворенні фібринового згустку у статичних умовах проводили з використанням камери Ibidi μ -Slide VI, до якої у рівних співвідношеннях додавали трис-HCl буфер (0.05 М, pH 7,4), плазму, збагачену тромбоцитами (до якої попередньо було додано мічений фібриноген Alexa Fluor 488 (16 мкг/мл)), та суміш хлориду кальцію (8 мМ) і тромбіну (0,017 NIH од./мл), якою ініціювали згортання. У контрольних зразках, відповідно, використовувалась безтромбоцитна плазма. Конфокальні зображення структури згустку отримували через 15 та через 60 хвилин після ініціації згортання.

Статистична обробка усіх результатів проводилась з використанням пакету програм MS Office Excel 2016. До роботи включено результати експериментів, допустима похибка яких не перевищувала 5 % ($p \leq 0,05$). Представлені на рисунках дані є типовими для серій повторюваних дослідів (не менше трьох у кожній серії).

Результати досліджень та їх обговорення

Дослідження модифікуючого впливу моноцитів, нейтрофілів та тромбоцитів на процеси утворення та лізису полімерного фібрину в плазмі. Процеси полімеризації і наступної деградації фібрину досліджували турбідиметричним методом. Для вивчення впливу клітин крові на процес згортання та лізису плазми використовували два підходи. Внесенням тромбіну, який відщеплює від фібриногену фібринопептиди А та В, ініціювали перетворення фібриногену на фібрин та процес його полімеризації. Додаванням

CaCl_2 у цитратну плазму активували каскад кальцій-залежних стадій внутрішнього шляху згортання крові.

При ініціації згортання плазми тромбіном в присутності моноцитів та нейтрофілів форма кривої полімеризації та лізису фібрину практично не відрізнялась від контролю (рисунок 1, А). Отже, клітини практично не впливали на процес фібриноутворення, ініційований тромбіном.

На рисунку 1, Б представлено динаміку процесів утворення і лізису фібринового згустку плазми без та в присутності моноцитів і нейтрофілів при ініціації згортання іонами кальцію. За таких умов, наявність клітин призводила до скорочення лаг-фази у 4 рази та зменшення часу існування згустку в 1,6 та 2 рази в присутності моноцитів та нейтрофілів, відповідно.

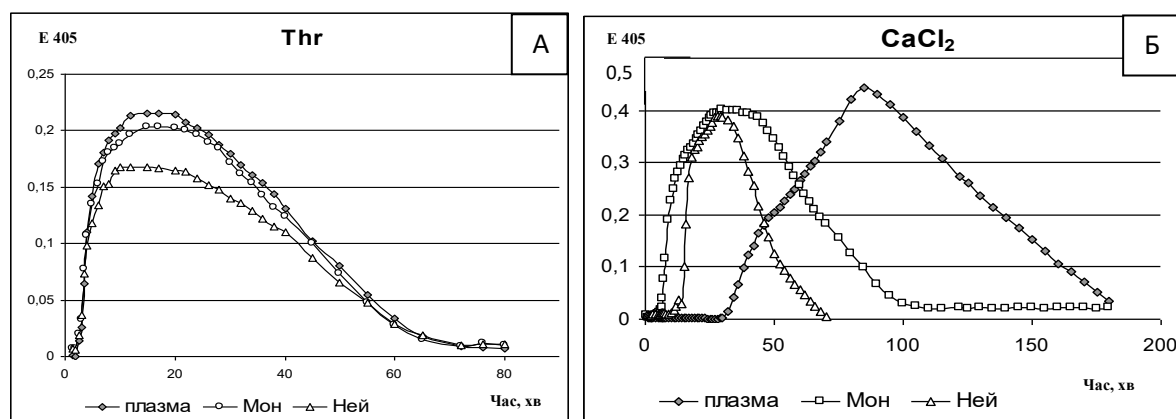


Рисунок 1. Динаміка утворення та лізису фібринових згустків, сформованих в плазмі крові в присутності моноцитів та нейтрофілів (1 млн/мл). Згортання ініціювали тромбіном (0,33 НН од./мл) (А) або CaCl_2 (8 мМ) (Б) у цитратній плазмі, що містила попередньо доданий t-РА (20 од./мл). Контроль – безклітинна плазма крові

За отриманими кінетичними кривими розраховано швидкості процесів утворення та лізису фібринового згустку за присутності моноцитів та нейтрофілів (рисунок 2).

При ініціації процесу фібриноутворення тромбіном зміни швидкості в присутності клітин були статистично недостовірними. Натомість у рекальцифікованій плазмі моноцити збільшували швидкість згортання на 130 % і швидкість лізису - на 26 %, проявляючи більш виражену прокоагулянтну дію. Нейтрофіли при цьому зумовлювали практично рівноцінне підвищення швидкостей згортання і лізису (на 130 % і 118 %, відповідно), тобто не змінювали гемостатичний баланс, але ефективно прискорювали процеси утворення та лізису фібрину, тим самим скорочуючи загальний час існування фібринового згустку.

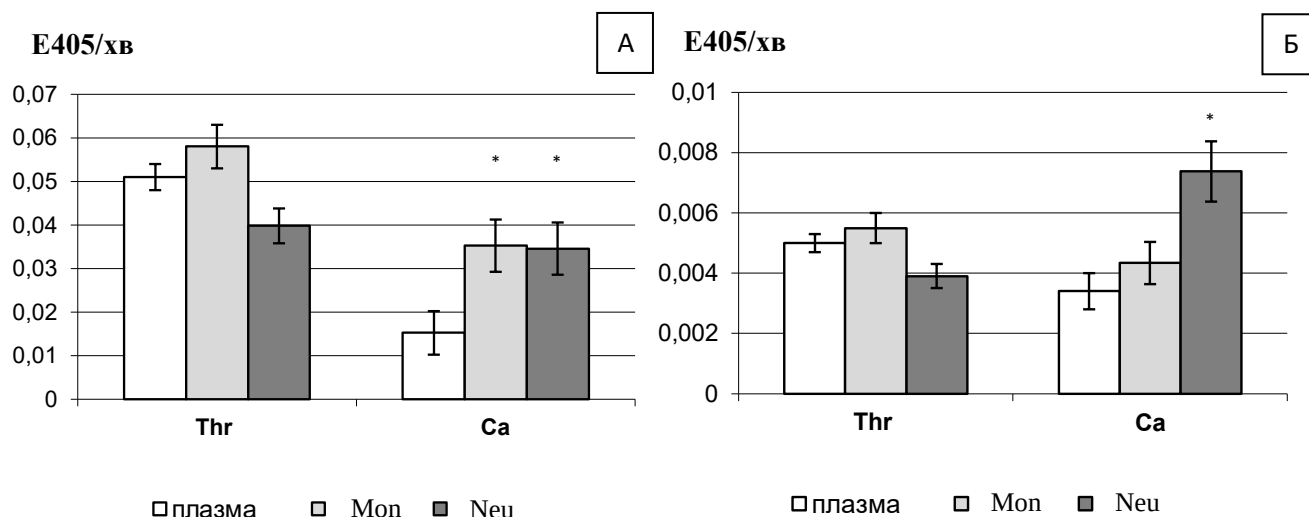


Рисунок 2. Вплив моноцитів (Mon) та нейтрофілів (Neu) на швидкість утворення (А) та лізису (Б) фібринових згустків. Формування фібринових згустків ініціювали тромбіном (Thr) або хлоридом кальцію (Ca) у цитратній плазмі, що містила попередньо доданий t-PA. Дані представлені у вигляді $M \pm SD$. * - $p \leq 0,05$ ($n > 3$)

На рисунку 3 представлено динаміку процесів утворення і лізису фібринового згустку з рекальцифікованої плазми в присутності тромбоцитів. Наведені дані свідчать, що тромбоцити у фізіологічній концентрації зменшують лаг-фазу у 5 разів та вдвічі скорочують час існування згустку. Окрім того, вони збільшують швидкість згортання плазми у 2,9 разів.

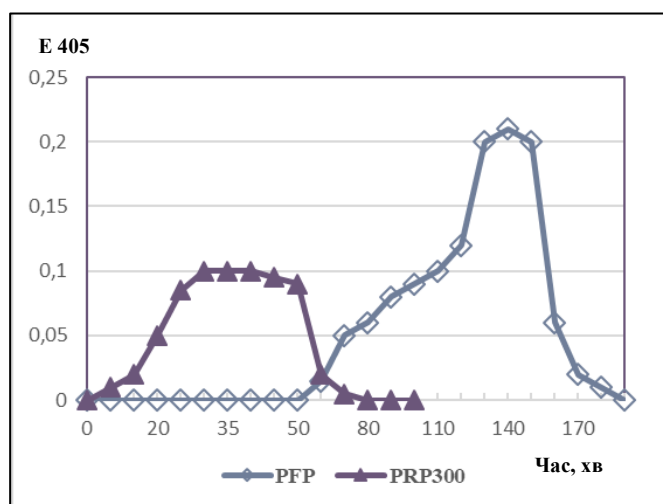


Рисунок 3. Динаміка утворення та лізису фібринових згустків плазми крові в присутності тромбоцитів (300 млн/мл), PRP300. Згортання ініціювали CaCl_2 (8 мМ) у цитратній плазмі, що містила попередньо доданий t-PA (40 од./мл). Контроль – безклітинна плазма крові (PFP)

Отже, клітини крові (моноцити, нейтрофіли та тромбоцити) модифікують фібриноутворення та фібриноліз, змінюючи швидкість утворення та лізису фібринового згустку та зменшуючи час його існування. З'ясування того, які саме механізми можуть лежати в основі регуляції клітинами крові процесів утворення та розчинення фібринового згустку, стало завданням подальших досліджень.

Дослідження активації протеїну С на поверхні клітин крові та роль активованого протеїну С в регуляції процесів утворення та лізису фібринових згустків. Однією з систем, яка бере участь у регуляції гемостатичного балансу, є система протеїну С. Активований протеїн С проявляє антикоагулянтну активність, інактивуючи фактори згортання крові Va та VIIIa. Окрім того, йому притаманна профібринолітична дія: він утворює комплекс з інгібітором активатора плазміногену PAI-1, тим самим зменшуючи його інгібіторну активність.

Відомо, що активація протеїну С тромбіном відбувається на поверхні ендотелійних клітин за участі кофактора – тромбомодуліну. Разом з тим, тромбомодулін було виявлено й на поверхні клітин крові, зокрема, моноцитів, нейтрофілів та тромбоцитів. Ймовірно, що тромбоутворення створює передумови для активації PC в об'ємі згустку. Однак, нині можливість існування такого механізму ще не досліджено.

Для визначення можливості активації протеїну С на клітинах крові в процесі тромбоутворення та наступного лізису, фібринові згустки отримували з цільної крові без додавання та в присутності тканинного активатора плазміногену та/або протеїну С. Утворення згустків відбувалося спонтанно або ж його ініціювали додаванням екзогенного тромбіну. В обох випадках у відсутності екзогенного тканинного активатора та протеїну С згустки не розчинялись протягом 24 год.

За спонтанного утворення згустку, в присутності протеїну С окремо або в поєднанні з тканинним активатором плазміногену через 24 год спостерігали повний лізис фібринових згустків (рисунок 4, А). При ініціації утворення згустків додаванням тромбіну внесення протеїну С сприяло лізису згустку (кінцева маса згустку становила близько 18 % в порівнянні з контролем). Більш того, внесення протеїну С в поєднанні з тканинним активатором плазміногену значно підсилювало його дію, призводячи до практично повного лізису згустку (остаточна маса деградованих згустків зменшувалась до 5 % порівняно з контролем), тобто протеїн С проявляв також свою профібринолітичну дію (рисунок 4, Б).

Таким чином, отримані результати свідчать про активацію проензиму протеїну С на поверхні клітин в об'ємі згустку крові.

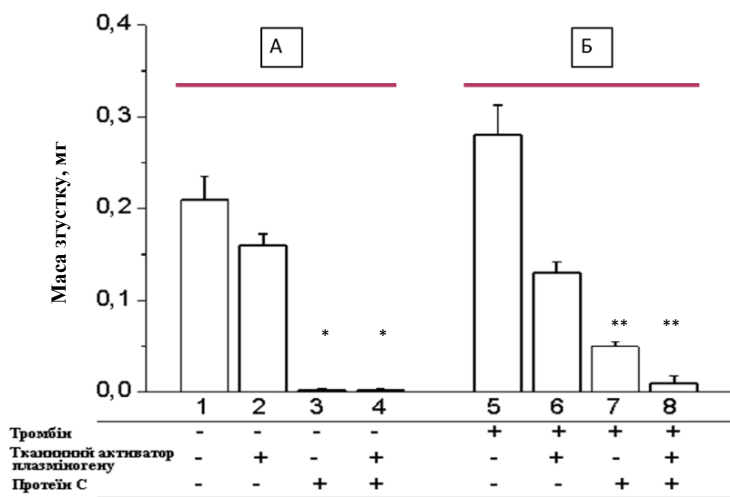


Рисунок 4. Маса згустків, утворених з цільної крові без та в присутності тканинного активатора плазміногену (1,7 од./мл) та/або протеїну С (0,27 мкг/мл) через 24 год від ініціації згортання. А – спонтанно утворені згустки, Б – згустки, утворені екзогенним тромбіном (1 NIH од./мл). * - $p < 0,05$ – відносно варіанту 1; ** - $p < 0,05$ – відносно варіанту 5 ($n > 3$)

Безпосереднє залучення клітин крові до активації проензиму протеїну С було підтверджено дослідями в суспензії клітин (моноцитів, нейтрофілів та тромбоцитів), активованих тромбіном після додавання комерційного препарату протеїну С, де утворення активованого протеїну С реєстрували за гідролізом хромогенного субстрату S-2366. В присутності клітин вже на 5-ій хв відбувалося перетворення протеїну С на його активовану форму, найбільш ефективно в присутності тромбоцитів (рисунок 5).

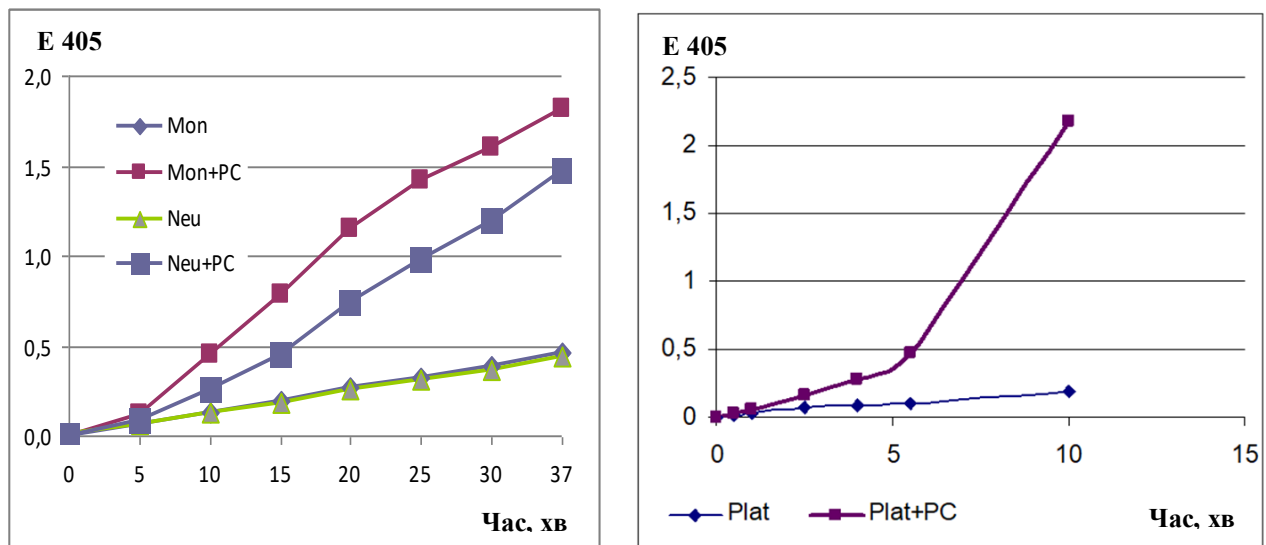


Рисунок 5. Генерування активованого протеїну С (APC) в реакційному середовищі, яке містить проензим PC (0,4 мкг/мл), тромбін (0,15 NIH од./мл), специфічний для протеїну С хромогенний субстрат S-2366 в присутності моноцитів (Mon), нейтрофілів (Neu) та тромбоцитів (Plat)

Отже, за участі моноцитів, нейтрофілів та тромбоцитів відбувається утворення функціонально активного протеїну С, що здатен чинити як антикоагулянтну, так і профібринолітичну дію. Таким чином, ми вперше показали існування ендотелій-незалежного шляху активації протеїну С.

Вивчення ролі тромбоцитів у формуванні та лізисі фібринового згустку з використанням конфокальної мікроскопії. Відомо, що тромбоцити в процесі тромбоутворення акумулюють на своїй поверхні плазміноген та сприяють його активації. Проте, їх безпосередня участь в утворенні фібринової сітки та роль в розчиненні фібринових згустків залишається недостатньо вивченою. Тому наступним завданням було дослідити вплив тромбоцитів на процес полімеризації фібрину та лізис фібринового згустку за допомогою конфокальної мікроскопії в реальному часі.

В окремій серії дослідів в статичних умовах отримували згустки з плазми, збагаченої тромбоцитами, у яку додавали фібриноген, мічений Alexa Fluor-488. З'ясували, що в процесі утворення згустку тромбоцити формують агрегати, на яких концентрується значна кількість фібрину. Інша частина фібринового каркасу впорядкована таким чином, що утворює «тяжі» та проміжки між агрегатами, об'єднуючи їх у сітку. Отже, тромбоцити є своєрідними «організаційними центрами», навколо яких відбувається структуризація згустку.

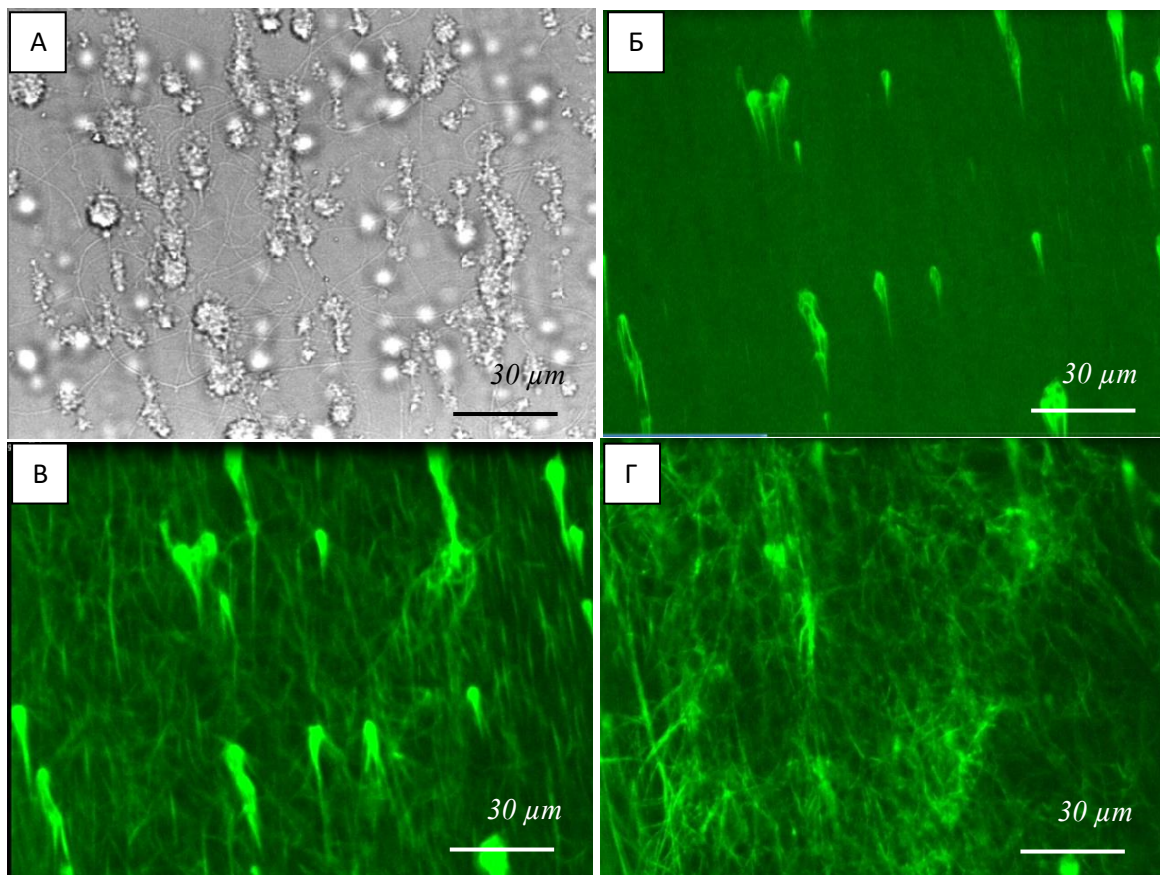


Рисунок 6. Дані конфокальної мікроскопії формування полімерного фібрину в цільній крові з додаванням Alexa Fluor-488-міченого фібриногену (зелений колір): А – мікроагрегати тромбоцитів на колагені у видимому світлі; утворення полімерного фібрину на мікроагрегатах стимульованих колагеном тромбоцитів через 0 сек (Б), 60 сек (В) та 150 сек (Г)

Активацію тромбоцитів та утворення мікроагрегатів стимулювали колагеном, абсорбованим на склі протокової камери. Дані, представлені на рисунку 6, свідчать, що мікроагрегати тромбоцитів виступають центрами полімеризації фібрину: ініціюють утворення фібрину на своїй поверхні з подальшим формуванням фібринової сітки в просторі між мікроагрегатами.

Візуалізацію зв'язування плазміногену і його тканинного активатора з тромбоцитами та фібрином проводили з використанням Alexa Fluor-647. Тромбоцити, що експонують фосфатидилсерин, виявляли за допомогою анексину V, міченого Alexa Fluor-647. Субпопуляцію тромбоцитів, що експонують фосфатидилсерин, спостерігали вже протягом перших 180 сек контакту крові з колагеном (рисунок 7). В процесі формування тромбоцитарних мікроагрегатів, утворення фібрину та посилення активації тромбоцитів, кількість анексин V-позитивних клітин зростає.

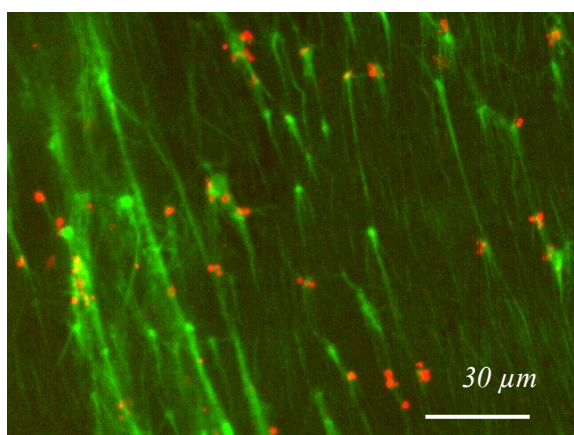


Рисунок 7. Дані конфокальної мікроскопії утворення полімерного фібрину на мікроагрегатах тромбоцитів через 180 сек після стимуляції колагеном. Тромбоцити, що експонують фосфатидилсерин, виявляли анексином V, міченим Alexa Fluor-647 (червоний колір). Фібриноген мітили Alexa Fluor-488 (зелений колір)

Акумуляцію плазміногену на тромбоцит-фібринових мікроагрегатах спостерігали вже за 30 сек після появи фібринових волокон. Плазміноген в основному колокалізувався з фібрином на мікроагрегатах тромбоцитів, а в подальшому – з фібрином у просторі між ними (рисунок 8).

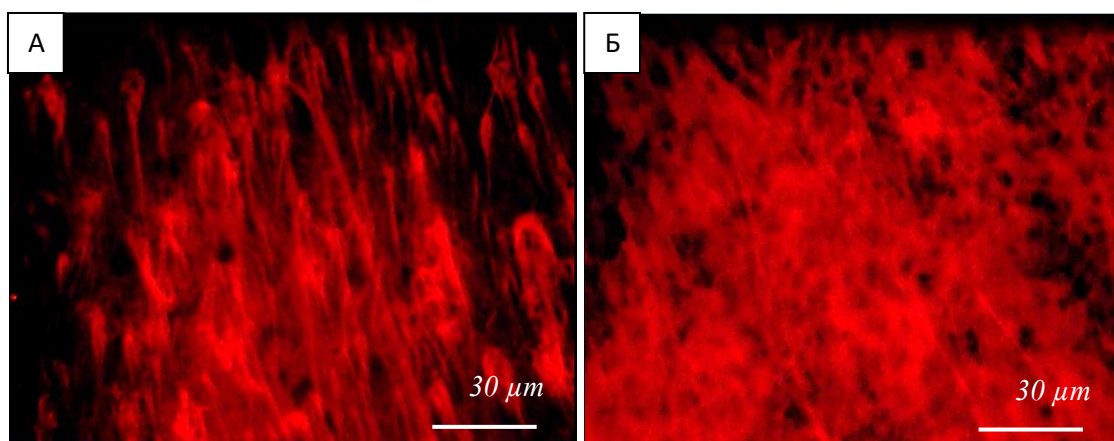


Рисунок 8. Дані конфокальної мікроскопії міченого Alexa Fluor-647 плазміногену (червоний колір), зв'язаного з фібрином через 90 сек (А), 180 сек (Б) після утворення мікроагрегатів стимульованих колагеном тромбоцитів

На мікроагрегатах тромбоцитів, утворених на колагені, також виявляли тканинний активатор плазміногену, кількість якого значно зростала після активації тромбоцитів іономіцином (рисунок 9).

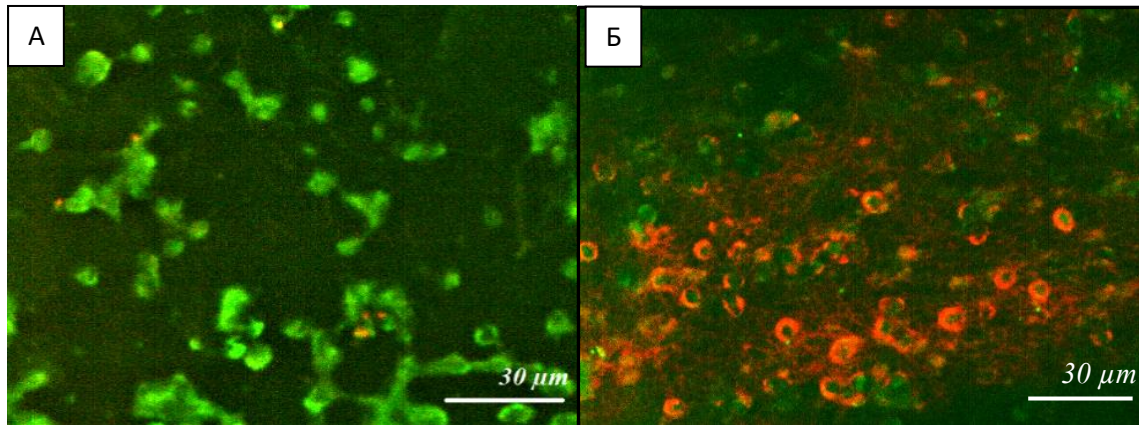


Рисунок 9. Дані конфокальної мікроскопії зв'язування міченого Alexa Fluor-647 тканинного активатора плазміногену (червоний колір) на поверхні мікроагрегатів стимульованих колагеном тромбоцитів (мічені DiOC6, зелений колір) до (А) та після стимуляції іономіцином (Б)

Процес лізису досліджували з одночасним внесенням плазміногену, міченого Alexa Fluor-647, та анексину V, міченого Alexa Fluor-488, до цільної крові, що містила попередньо доданий тканинний активатор плазміногену. Через 16 хв після ініціації утворення мікроагрегатів починався лізис полімерного фібрину, який повністю розчинявся через 30-40 хв. Слід зазначити, що лізис полімерного фібрину в першу чергу спостерігали навколо скупчення тромбоцитів, які експонували фосфатидилсерин (рисунок 10).

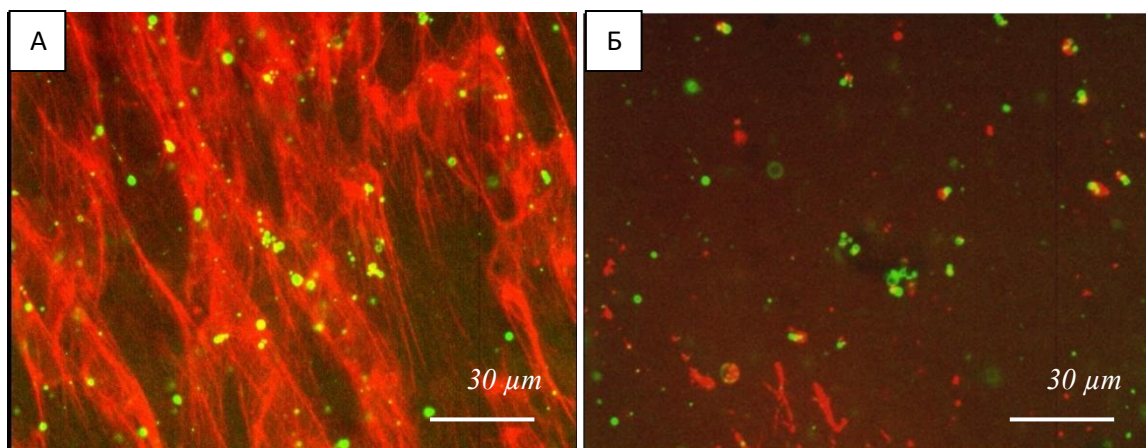


Рисунок 10. Дані конфокальної мікроскопії лізису полімерного фібрину в цільній крові з попередньо внесеним тканинним активатором плазміногену, з додаванням міченого Alexa Fluor-647 плазміногену (червоний колір) і міченого Alexa Fluor-488 анексину V (зелений колір) через 16 хв (А) та через 30 хв (Б) після утворення мікроагрегатів стимульованих колагеном тромбоцитів

Отже, методом конфокальної мікроскопії нами вперше показано, що тромбоцити безпосередньо беруть участь в полімеризації фібрину. Вони виступають центрами ініціації утворення фібрину та організаційними центрами, які структурують фібриновий згусток. В той же час, зв'язуючи плазміноген та тканинний активатор плазміногену на своїй поверхні, активовані тромбоцити виступають осередками ініціації процесу лізису згустку.

Вивчення взаємодії плазміногену та його активаторів з нативними та агоніст-стимульованими тромбоцитами та визначення впливу тромбоцитів на швидкість лізису desAB-фібрину. Методом протокової цитометрії ми показали, що плазміноген акумулюється на поверхні відмитих тромбоцитів, причому кількість зв'язаного плазміногену зростає на агоніст-стимульованих тромбоцитах (рисунок 11). Інкубація неактивованих клітин із FITC-міченим плазміногеном призводить до збільшення кількості подій з флуоресцентним сигналом на 67 %. При цьому інтенсивність флуоресценції збільшується у 3 рази, що свідчить про сорбцію FITC-міченого плазміногену на поверхні ізольованих тромбоцитів. У групі тромбін-активованих клітин фіксували збільшення кількості FITC-плазміноген-позитивних клітин на 75 %, тоді як інтенсивність флуоресценції зростала у 6,5 разів.

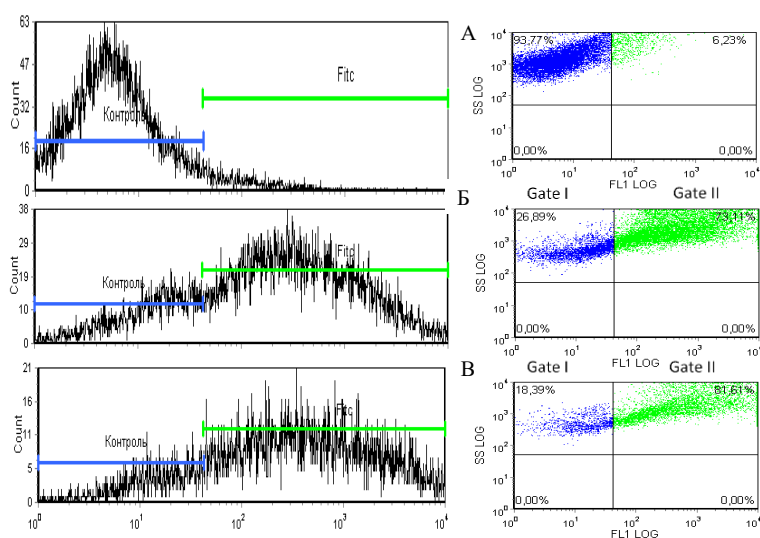


Рисунок 11. Гістограми флуоресценції та крапкові діаграми розподілу тромбоцитів: ізольованих (А), ізольованих за взаємодії з FITC-плазміногеном (Б); тромбін-активованих за взаємодії з FITC-плазміногеном (В)

Здатність тромбоцитів зв'язувати плазміноген на своїй поверхні також визначали за амідолітичною активністю плазміну з використанням хромогенного субстрату S-2251. В реакційному середовищі, що містило ізольовані або тромбін-стимульовані тромбоцити через 60 хв після додавання тканинного активатора плазміногену виявляли незначну амідолітичну активність, яка значно зростає при одночасному додаванні активатора та плазміногену. Причому рівень активності за присутності стимульованих тромбоцитів був вдвічі вище такого ізольованих клітин (рисунок 12).

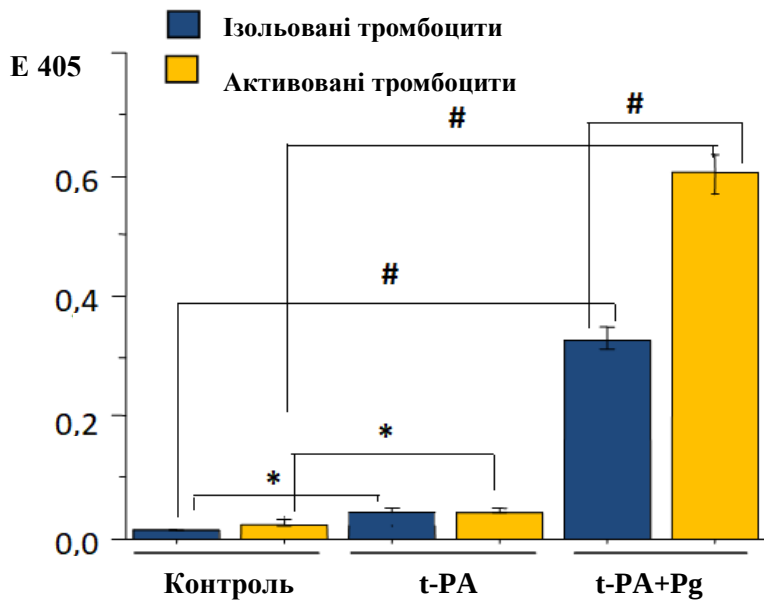


Рисунок 12. Амідолітична активність плазміноген/плазміну, асоційованого з поверхнею ізолюваних та тромбін-стимульованих тромбоцитів (4×10^6 клітин/мл) без (контроль) та за присутності t-PA (1 од./мл) або t-PA і плазміногену (23 мкг/мл). * - $p \leq 0,05$; # - $p \leq 0,01$ ($n \geq 3$)

Одержані результати свідчать, що тромбоцити, які циркулюють в кровотоці, несуть на своїй поверхні незначну кількість плазміногену, тоді як тромбін-індукована активація веде до експонування плазміноген-зв'язувальних сайтів на їх плазматичній мембрані.

Зв'язування плазміногену з тромбоцитами є дозозалежним процесом. При збільшенні кількості проензиму в середовищі реакції насичення сайтів зв'язування плазміногену на плазматичній мембрані нативних і тромбін-активованих клітин має місце за 0,5 та 0,1 мкМ концентрації, відповідно (рисунок 13).

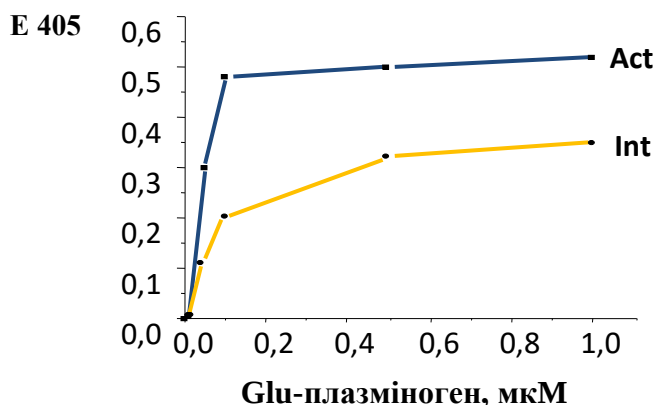


Рисунок 13. Зв'язування Glu-плазміногену з ізолюваними (Int) та активованими (Act) тромбоцитами в залежності від концентрації проензиму

Детекцію тканинного активатора плазміногену на поверхні тромбоцитів, ізолюваних з донорської крові, проводили методом спектрофлуориметрії з використанням антитіл до тканинного активатора плазміногену та вторинних FITC-мічених антитіл. Дослідження проводили на тромбоцитах, одержаних із зразків крові чотирьох різних донорів. Контролем слугували тромбоцити, які

інкубували з вторинними антитілами. Інтенсивність флуоресценції в аналізованих та контрольних пробах відрізняється в 5-12 разів (рисунок 14), що свідчить про зв'язування антитіл до t-PA зі своїм антигеном, сорбованим на поверхні клітин. Різниця в інтенсивності сигналу в окремих зразках пояснюється індивідуальними особливостями донорів. Таким чином, за допомогою антитіл проти t-PA на плазматичній мембрані ізолюваних неактивованих тромбоцитів виявлено тканинний активатор, що свідчить про наявність на поверхні тромбоцитів, які циркулюють у кровотоці, специфічних сайтів зв'язування для цього протеїну.

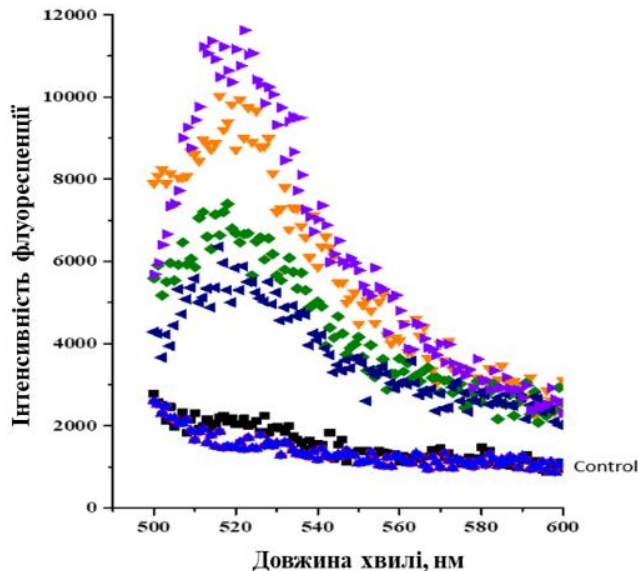


Рисунок 14. Детекція тканинного активатора плазміногену на поверхні ізолюваних тромбоцитів з використанням кролячих антитіл до t-PA та вторинних FITC-мічених антикролячих антитіл. В якості контролю (control) наведено спектр флуоресценції клітин без антитіл до тканинного активатора плазміногену. В досліді використано тромбоцити чотирьох донорів

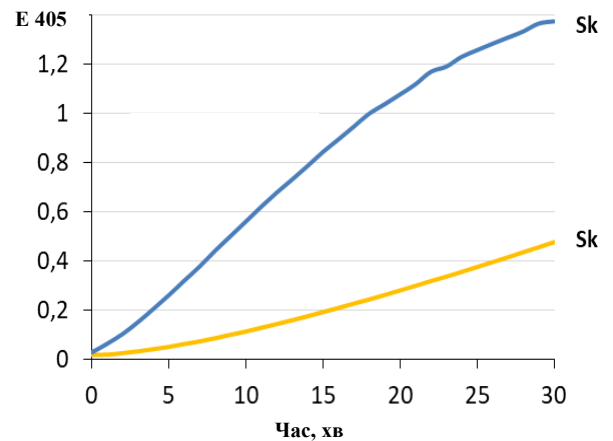
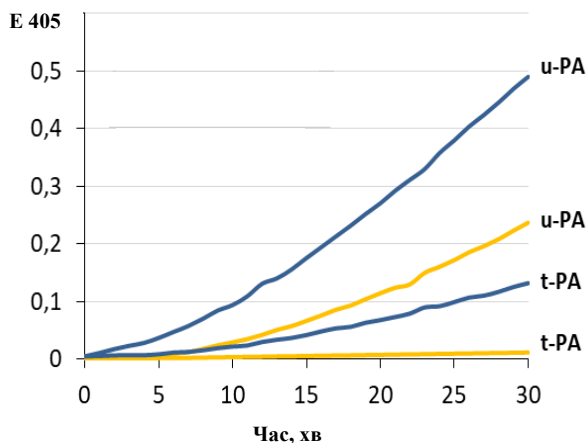


Рисунок 15. Кінетика активації Glu-плазміногену (250 нМ) тканинним активатором (t-PA), урокіназою (u-PA) та стрептокіназою (Sk) за молярного співвідношення активатора до зимогену 1:200 без (жовтий колір) та в присутності (синій колір) тромбін-стимульованих тромбоцитів (400 млн/мл)

Дослідження кінетики активації Glu-плазміногену за його насичуючої концентрації різними активаторами в присутності агоніст-стимульованих тромбоцитів показало, що тромбоцити найбільш ефективно стимулюють реакцію активації плазміногену стрептокіназою і проявляють більш

слабкий, майже однаковий ефект при дії урокінази та тканинного активатора (рисунок 15).

Виходячи з отриманих кінетичних кривих була розрахована кількість плазміну, що утворюється в реакційному середовищі без та в присутності клітин. Кількість ензиму визначали за зміною оптичної густини реакційного середовища на лінійній ділянці кінетичної кривої і розраховували за формулою $(\Delta E_{405} : \Delta t) / 0,002$, де 0,002 – встановлена експериментально величина поглинання *n*-нітроаніліну, що вивільняється за гідролізу хромогенного субстрату 1 нМ плазміном за 1 хв.

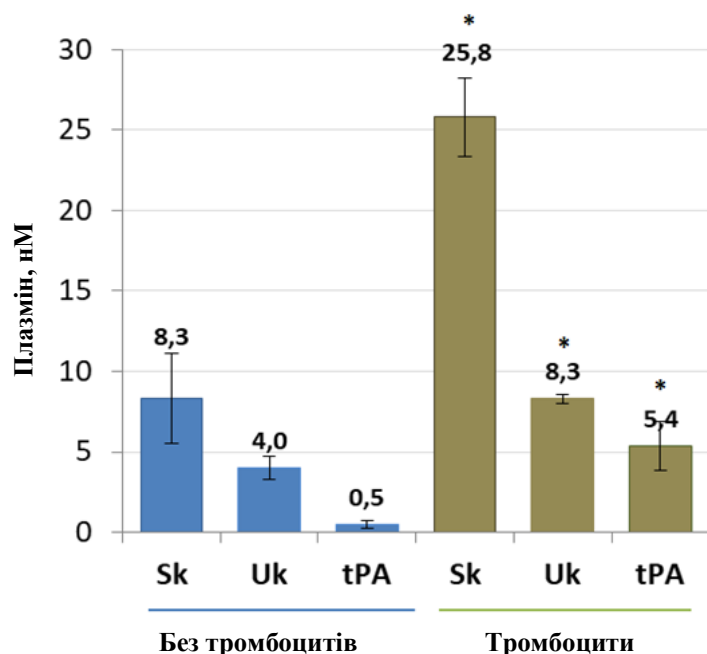


Рисунок 16. Кількість плазміну, що утворюється в реакційному середовищі при активації 250 нМ Glu-плазміногену стрептокіназою, урокіназою і тканинним активатором за молярного співвідношення активатора до зимогену 1:200 без та в присутності тромбоцитів.
* - $p \leq 0,05$ ($n > 3$)

Дані, представлені на рисунку 16, свідчать, що в присутності агоніст-стимульованих тромбоцитів за активації плазміногену стрептокіназою, урокіназою та тканинним активатором утворюється 25,8 нМ, 8,3 нМ та 5,4 нМ плазміну, відповідно.

Модуючий вплив тромбоцитів на полімеризацію та гідроліз desAB-фібрину Glu-плазміногеном, активованим тканинним активатором, представлено на рисунку 17. Використання desAB-фібрину дає змогу оцінити дію тромбоцитів на процес фібринолізу окремо від впливу на утворення полімерного фібрину. Показано, що за фізіологічного співвідношення в реакційному середовищі концентрацій desAB-фібрину, плазміногену та активатора, тромбоцити суттєво зменшують час напівлізису (з $30,33 \pm 4,7$ до $23,33 \pm 0,47$ хв) і загальний час існування згустку (з $38,33 \pm 2,36$ до $31,6 \pm 2,36$ хв). Ймовірно, прискорення гідролізу desAB-фібрину в присутності тромбоцитів зумовлено їх впливом на реакцію активації плазміногену тканинним активатором. Про це свідчить спричинене тромбоцитами скорочення часу початку лізису з $23,0 \pm 4,2$ хв у безтромбоцитарному середовищі до $13,3 \pm 3,4$ хв в присутності клітин. Разом з тим, полімеризація desAB-фібрину в присутності

тромбоцитів супроводжується додатковим збільшенням оптичної густини згустку, обумовленим його ретракцією.

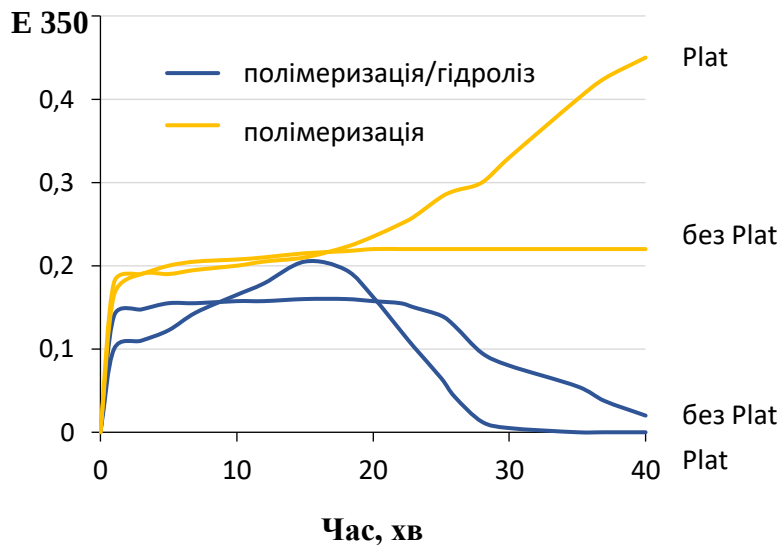


Рисунок 17. Полімеризація та гідроліз desAB-фібрину (200 мкг/мл) Glu-плазміногеном (15 мкг/мл), активованим t-PA (5 од./мл) без та в присутності стимульованих тромбіном (1 NIH од./мл) тромбоцитів (Plat) (50 млн/мл)

З наведених результатів випливає, що тромбоцити здатні залучатись до регуляції фібринолітичного процесу шляхом зв'язування на їх поверхні плазміногену та активаторів з наступним утворенням плазміну.

Одержані дані щодо зв'язування плазміногену і його тканинного активатора на поверхні активованих тромбоцитів, здатності тромбоцитів прискорювати активацію плазміногену та забезпечувати більш ефективний гідроліз фібрину дозволяють запропонувати наступний механізм профібринолітичної дії тромбоцитів. Плазмін, генерований на поверхні тромбоцитів, асоційованих з полімерною сіткою фібрину, забезпечує утворення примембранного шару частково гідролізованого фібрину з презентованими С-кінцевими залишками лізіну, що є сайтами зв'язування плазміногену і тканинного активатора. В такий спосіб у мікрооточенні тромбоцитів має місце підвищення локальної концентрації плазміногену і тканинного активатора з наступним утворенням плазміну, що обумовлює швидкий лізис фібринових згустків навколо тромбоцитарних мікроагрегатів.

Дослідження модифікуючого впливу протромбінового комплексу на швидкість активації плазміногену тканинним активатором в присутності активованих тромбоцитів. Відповідно до сучасних уявлень, плазміноген переважно зв'язується з прокоагулянтними тромбоцитами, що експонують фосфатидилсерин, на поверхні яких збираються теназний та протромбіназний комплекси, що відповідають за утворення активованого фактора згортання крові X та тромбіну, відповідно. Особливий інтерес представляють дані про те, що протеїни коагуляції, а саме активований фактор згортання крові X, може виконувати роль сайту зв'язування для плазміногену [Pryzdial, 1996; Talbot, 2010].

Дані, наведені на рисунку 18, свідчать, що протромбіновий комплекс може впливати на генерування плазміну на поверхні тромбоцитів, причому більш ніж вдвічі підвищує швидкість активації за участі тромбін-стимульованих тромбоцитів. Використання інгібітора фактора Ха рівароксабану зменшує стимулюючий вплив протромбінового комплексу, що дозволяє припустити, що саме фактор Ха відіграє важливу роль у взаємодії компонентів плазміноген-плазмінової системи з тромбоцитами.

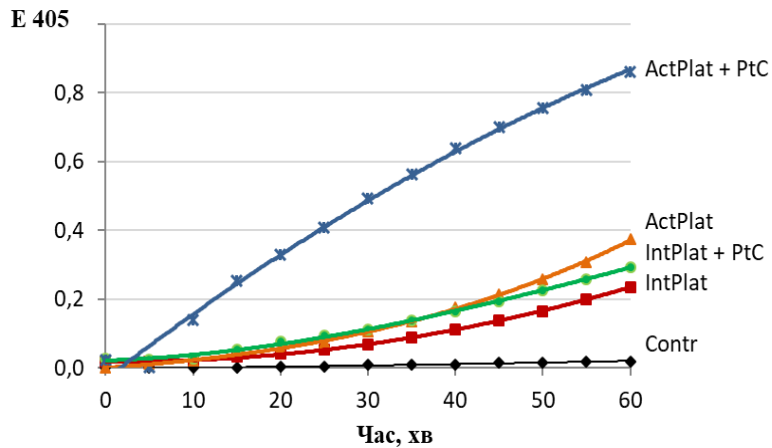


Рисунок 18. Кінетика активації Glu-плазміногену (23 мкг/мл) тканинним активатором (5 од.) на ізолюованих (IntPlat) і тромбін-індукованих (ActPlat) тромбоцитах без та в присутності протромбінового комплексу (PtC) (100 мкг/мл). В якості контролю (Contr) наведена крива активації Glu-плазміногену тканинним активатором в безклітинному середовищі

Таким чином, протеїни протромбінового комплексу стимулюють реакцію активації плазміногену тканинним активатором плазміногену на поверхні активованих тромбоцитів, що свідчить про можливість протромбінового комплексу виступати в якості рецептора для плазміногену та тканинного активатора плазміногену.

Аналіз зміни кількісних параметрів кривої оптичного поглинання в процесі утворення та лізису фібрину в безтромбоцитарній і збагаченій тромбоцитами плазмі у хворих з резистентною артеріальною гіпертензією. Відомо, що за ряду патологій, зокрема, при артеріальній гіпертензії, спостерігається порушення функціонування системи фібринолізу внаслідок підвищення як вмісту, так і активності PAI-1, а також значного зниження активності t-PA [Tabak, 2009]. Представлені нами дані про модифікуючий вплив тромбоцитів на утворення та лізис фібринових згустків свідчать, що тромбоцити здатні додатково суттєво змінювати загальний гемостатичний потенціал. Тому наступним завданням було оцінити зміни кількісних параметрів кривої оптичного поглинання в процесі утворення та лізису фібрину у безтромбоцитарній плазмі (PFP) та плазмі, збагаченій тромбоцитами (PRP) в умовно здорових донорів та пацієнтів з артеріальною гіпертензією.

Контрольні параметри кривої утворення та лізису фібринового згустку донорських PFP та PRP порівнювали з аналогічними параметрами, які оцінювали для пацієнтів з артеріальною гіпертензією. При додаванні в PRP 40 од./мл t-PA зміни параметрів між донорами та пацієнтами були найбільш значущими.

Статистично значуще збільшення значень майже всіх параметрів згортання плазми крові (особливо для PRP) у пацієнтів порівняно з донорами свідчить про розвиток гіперкоагуляційних симптомів при гіпертонії. Разом з тим, як у донорів, так і у пацієнтів, тромбоцити скорочували час існування фібринового згустку, що узгоджується з нашими попередніми результатами, проте, у пацієнтів такий ефект був значно менш виражений, що дозволяє припустити наявність в них дисфункції тромбоцитів. Параметром, який дозволяє охарактеризувати загальний гемостатичний потенціал, обрано площу під кривою згортання та лізису фібринового згустку (AUC), розраховану як інтеграл. Збільшення значення площі під кривою для тромбоцитвмісного згустку порівняно зі згустком, отриманим з безтромбоцитної плазми, тобто співвідношення $AUC_{PRP}/AUC_{PFP} > 1$, оцінювали як перехід локального гемостатичного балансу до прокоагулянтного стану. Відповідно, зниження величини AUC для PRP ($AUC_{PRP}/AUC_{PFP} < 1$) розглядалося як зсув гемостатичного балансу у бік профібринолітичних процесів. При додаванні у плазму 40 од./мл t-PA у донорів тромбоцити зміщували гемостатичний баланс у бік профібринолітичних процесів: співвідношення $AUC_{PRP}/AUC_{PFP} = 0,42$. Натомість у пацієнтів в присутності тромбоцитів гемостатичний баланс зміщувався у бік прокоагулянтних процесів, що підтверджується співвідношенням $AUC_{PRP}/AUC_{PFP} = 1,2$.

Таким чином, оскільки тромбоцити здатні модифікувати процеси фібриноутворення та фібринолізу, ми рекомендуємо використовувати плазму, збагачену тромбоцитами, для оцінки кількісних параметрів кривої оптичного поглинання процесу утворення та лізису фібрину, що може бути інформативним для скринінгової оцінки гемостатичних порушень у хворих з резистентною артеріальною гіпертензією.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі досліджено регуляцію процесів утворення та лізису фібринових згустків за участі клітин крові: моноцитів, нейтрофілів та тромбоцитів. Визначено окремі молекулярні механізми, за якими клітини крові забезпечують узгоджений перебіг протилежно спрямованих процесів тромбоутворення та фібринолізу. Отримані результати є важливими для розуміння ролі клітин крові у координуванні утворення та розчинення тромбів, що може бути використано для розробки нових та вдосконалення існуючих методів діагностики та лікування патологічних станів, пов'язаних з розвитком серцево-судинних захворювань.

1. Встановлено, що разом з прокоагулянтною функцією, клітини крові (моноцити, нейтрофіли та тромбоцити) здатні впливати й на процес лізису,

- виконуючи кофакторну функцію в реакції t-PA-залежної активації плазміногену та продукування плазміну.
2. Показано, що активація протеїну С в об'ємі згустку, утвореного з цільної крові, сприяє t-PA-індукованому лізису полімерного фібрину та скорочує час існування згустку. Вперше доведено існування ендотелій-незалежного шляху активації протеїну С клітинами крові в присутності кальцію та тромбіну завдяки наявному на їх поверхні тромбомодуліну.
 3. Вперше в умовах потоку крові за допомогою конфокальної мікроскопії встановлено, що тромбоцити безпосередньо беруть участь в полімеризації фібрину, як структурні центри формування фібринового згустку. Активовані тромбоцити зв'язують плазміноген та t-PA на своїй поверхні фібрин-залежним та фібрин-незалежним шляхом, в такий спосіб виступаючи осередками ініціації процесу лізису навколо тромбоцитарних мікроагрегатів.
 4. Показано, що ізольовані тромбоцити практично не несуть на своїй поверхні плазміноген, проте зв'язують тканинний активатор плазміногену; агоніст-індукована активація веде до експонування плазміноген-зв'язувальних сайтів та збільшення сайтів зв'язування тканинного активатора плазміногену на їх плазматичній мембрані. Виявлено, що тромбоцити стимулюють реакцію активації плазміногену t-PA, урокіназою та стрептокіназою та збільшують швидкість гідролізу des-AB-фібрину.
 5. Запропоновано наступний механізм залучення тромбоцитів до процесів утворення та лізису фібринового згустку. Плазмін, генерований на поверхні тромбоцитів, асоційованих з полімерною сіткою фібрину, забезпечує утворення примембранного шару частково гідролізованого фібрину з презентованими С-кінцевими залишками лізину, які є сайтами зв'язування плазміногену і t-PA. В такий спосіб відбувається додаткове утворення плазміну, що обумовлює швидкий лізис фібринових згустків навколо тромбоцитарних мікроагрегатів.
 6. Вперше виявлено, що протеїни протромбінового комплексу, зв'язані на поверхні тромбоцитів, які експонують фосфатидилсерин, збільшують швидкість активації плазміногену тканинним активатором. Рівароксабан частково пригнічує ефект протеїнів протромбінового комплексу, що вказує на залучення фактора згортання Ха до взаємодії з протеїнами системи активації плазміногену.
 7. Для виявлення порушень гемостатичного балансу у хворих з резистентною артеріальною гіпертензією запропоновано визначати кількісні параметри кривої оптичного поглинання утворення та лізису фібрину у безтромбоцитарній плазмі та плазмі, збагаченій тромбоцитами.

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Patalakh I, Talanov S, **Revka O**, Drobotko T. Activation of protein C in the *in vitro* thrombolysis. Fiziol Zh. 2015; 61(4):78-84. *(Дисертантка брала участь у дослідженні активації протеїну C в процесі тромболізу згустків, отриманих з цільної крові, аналізі експериментальних даних, написанні та оформленні статті).*
2. Patalakh I, **Revka O**, Drobotko T. Endothelium-independent activation of protein C in whole blood. Int. J. Phys. Pathophys. 2016; 7(3):1-9. *(Дисертантка брала участь у дослідженні ендотелій-незалежного шляху активації протеїну C, аналізі експериментальних даних, написанні та оформленні статті).*
3. **Revka O**, Drobotko T, Patalakh I. Participation of monocytes and neutrophils in regulation of hemostatic balance. "Current problems in biochemistry": Book of articles/ NAS of Belarus 2016; 2:227-233. *(Дисертантка брала участь у дослідженні впливу моноцитів та нейтрофілів на процес утворення та лізису фібринового згустку з використанням методу аналізу форми кривої згортання/лізису, отриманої для згустку плазми, аналізувала експериментальні дані, брала участь у написанні та оформленні статті).*
4. Patalakh I, **Revka O**, Kuchmenko O, Matova O, Drobotko T, Grinenko T. Clot formation and lysis in platelet rich plasma of healthy donors and patients with resistant hypertension. Ukr. Biochem. J. 2018; 90(2):67-75. *(Дисертантка брала участь у вивченні особливостей згортання збагаченої тромбоцитами плазми хворих на резистентну артеріальну гіпертензію, аналізі експериментальних даних, у написанні та оформленні статті).*
5. Grinenko T, Yusova O, **Revka O**, Patalakh I, Yatsenko T. Fibrinolysis regulation by platelets retaining plasminogen and tissue-type plasminogen activator on their surface. Ukr. Biochem. J. 2019; 91(6):38-48. *(Дисертантка приймала участь в отриманні тромбоцитів, Glu - плазіногену та desAB-фібрину з крові людини, вивченні впливу тромбоцитів на процес лізису фібринового згустка, утвореного з desAB-фібрину, у статистичній обробці та аналізі експериментальних даних, та у написанні і оформленні статті).*
6. **Revka O.**, Goncharuk M.N. Structural and functional interaction between protein C and ceruloplasmin. "Biology: from molecule to biosphere", Proc. Of the VIII international conference of young scientists (December 3-6, 2013, Kharkiv, Ukraine), 2013, p. 334.
7. Patalakh I., **Revka O.**, Drobotko T. Protein C activation in cell-associated fibrin clots promotes fibrinolysis. Ukr. Biochem. J., 2014, Vol. 86, № 5 (suppl.1)
8. **Revka O.** Influence of blood cells on coagulation and fibrinolysis of fibrin clot. Role of protein C in this processes // Actual problems of biochemistry and biotechnology – 2016. Book of abstracts // Kyiv, 2016, 72 p.

9. **Revka O.**, Patalakh I., Grinenko T. Platelets influence coagulation and fibrin lysis thereby regulating hemostatic balance. *Visnyk of the Lviv university. Series biology.*, 2016, Vol. 73., p. 257.
10. **Revka O.**, Patalakh I., Kuchmenko O., Matova O., Drobotko T., Grinenko T. Clot formation and lysis in platelet rich plasma of healthy donors and patients with resistant hypertension. *Book of abstracts RECOOP 13th annual scientific conference/ Zagreb, Croatia, 2018*, p.56.
11. **Revka O.** Biochemical mechanisms of fibrin clot formation and subsequent lysis regulation by platelets. *Ukr. Biochem. J.*, 2018, Vol. 90, №3, p.130.
12. **Revka O.**, Patalakh I., Grinenko T. Platelets in coordination of coagulation and fibrinolysis. *Ukr. Biochem. J.*, 2018., Vol. 90, special issue, p. 159.
13. **Revka O.**, Patalakh I., Misztal T., Marcińczyk N., Gołaszewska A., Grinenko T. Interplay of platelet procoagulant and profibrinolytic activity in thrombus formation and lysis. *Proceedings of Young scientists' conference "Modern aspects of Biochemistry and Biotechnology – 2019"*, *Ukr. Biochem. J.*, 2019, Vol. 91, №2, P. 77-78.
14. **Revka O.**, Patalakh I., Misztal T., Marcińczyk N., Gołaszewska A., Grinenko T. Platelets as coordination centers of fibrin formation, structuring of fibrin network and initiation of fibrinolysis. "Youth and Progress of Biology": XV International scientific conference for students and PhD students, dedicated to the 135th anniversary of J. Parnas (Lviv, April 9–11, 2019): abstracts. – Lviv, 2019. – P. 47.
15. Patalakh I., **Revka O.**, Drobotko T., Grinenko T. Platelets provide spatiotemporal coordination between coagulation and fibrinolysis in a developing fibrin clot. *Medical and Clinical Chemistry (2019)*, Vol. 21, 3(80), P. 122-123 (Proceedings of the XII Ukrainian Biochemical Congress, Ternopil, Ukraine).

АНОТАЦІЯ

Ревка О.В. “Координування процесів тромбоутворення та фібринолізу за участі клітин крові”. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія. – Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ, 2020.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню ролі клітин крові – моноцитів, нейтрофілів та тромбоцитів у координуванні процесів утворення фібрину та фібринолізу. Вперше показано, що моноцити збільшують швидкість формування фібринового згустку, зміщуючи гемостатичний баланс процесів згортання/лізису фібринових згустків в бік тромбоутворення. Нейтрофіли з однаковою ефективністю прискорюють утворення та лізис фібринових згустків, зменшуючи загальний час існування фібринового згустку вдвічі.

Вперше продемонстровано, що тромбоцити виступають центрами полімеризації фібрину та просторової організації структури фібринового

згустку, що сприяє прискоренню та координуванню у просторі та часі процесів фібриноутворення і фібринолізу та обмежує розмір тромбу і час його існування.

Показано, що тромбоцити, які циркулюють в кровотоці, практично не несуть на своїй поверхні Glu-плазміноген, натомість зв'язують тканинний активатор плазміногену. Агоніст-стимульовані тромбоцити набувають здатності зв'язувати плазміноген та підвищувати кількість абсорбованого тканинного активатора. Взаємодія плазміногену та тканинного активатора з тромбоцитами здійснюється за фібрин-залежним та фібрин-незалежним шляхом.

Встановлено кількість плазміну, що генерується з сорбованого на поверхні активованих тромбоцитів плазміногену за дії ендогенних (тканинного активатора і урокінази) та екзогенних (стрептокінази) активаторів.

Вперше визначено деякі молекулярні механізми, за якими клітини крові координують утворення та лізис фібринових згустків. До цих механізмів відносяться:

- ендотелій-незалежний шлях активації протеїну С, за якого активація протеїну С відбувається безпосередньо на поверхні тромбоцитів, моноцитів та нейтрофілів;
- стимуляція реакції активації плазміногену тканинним активатором плазміногену компонентами протромбінового комплексу на поверхні активованих тромбоцитів, і, відповідно, підсилення генерування плазміну;
- структуризація тромбоцитами фібринового згустку, акумуляція на їх поверхні фібрину, з яким зв'язуються плазміноген і тканинний активатор плазміногену та формуються центри ініціації лізису фібринового згустку;
- здатність тромбоцитів прискорювати фібриноліз.

Для виявлення порушень гемостатичного балансу у хворих з резистентною артеріальною гіпертензією запропоновано визначати кількісні параметри кривої оптичного поглинання утворення та лізису фібрину у безтромбоцитарній плазмі та плазмі, збагаченій тромбоцитами.

Отримані результати є важливими для розуміння ролі клітин крові у координуванні утворення та розчинення тромбу, що може бути використаним для розробки нових та вдосконалення існуючих методів діагностики та лікування патологічних станів, пов'язаних з розвитком серцево-судинних захворювань.

Ключові слова: тромбоутворення, фібриноліз, тромбоцити, моноцити, нейтрофіли, плазміноген/плазмінова система, тканинний активатор плазміногену, протеїн С

SUMMARY

Revka O.V. "Coordination of thrombus formation and fibrinolysis by blood cells". – Manuscript.

Thesis for a candidate degree in biological sciences (Doctor of Philosophy), specialty 03.00.04 "Biochemistry" – O. V. Palladin Institute of Biochemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2020.

Present PhD thesis highlights the investigation of the role of blood cells - monocytes, neutrophils and platelets - in coordination of thrombus formation and thrombolysis.

For the first time it has been shown that monocytes have a direct impact on the formation of a fibrin clot, shifting the hemostatic balance of the coagulation/lysis process towards thrombus formation. Neutrophils equally accelerate the formation and lysis of fibrin clots, reducing the overall lifetime of the fibrin clot by half.

Using the method of real-time confocal microscopy, it has been shown for the first time that platelets act as centers of fibrin polymerization and organization of the fibrin clot structure, which promotes the acceleration and spatiotemporal coordination of coagulation and fibrinolysis and limits the size and lifetime of thrombus.

By using flow cytometry and enzymatic activity determination methods it has been shown that platelets circulating in the bloodstream do not carry Glu-plasminogen on their surface but are able to bind it after activation. Confocal microscopy and spectrofluorimetry have demonstrated for the first time that native platelets are able to bind tissue plasminogen activator, and it has been shown that the interaction of tissue plasminogen activator with platelets is possible through fibrin-dependent and fibrin-independent mechanisms.

The amount of plasmin generated on the surface of activated platelets by the action of endogenous (tissue plasminogen activator and urokinase) and exogenous (streptokinase) activators has been established.

For the first time new molecular mechanisms by which blood cells coordinate the formation and lysis of fibrin clots have been identified. These mechanisms include:

- endothelium-independent pathway of protein C activation, in which protein C activation occurs directly on the surface of platelets, monocytes and neutrophils;
- stimulation of plasminogen activation by tissue plasminogen activator by components of the prothrombin complex in the presence of activated platelets, and, accordingly, enhancement of plasmin generation;
- structuring of fibrin clot by platelets, and accumulation of fibrin on their surface, where plasminogen and tissue plasminogen activator can be bound to form centers of lysis initiation;

For the evaluation of the complex effects of different platelet activities, a new method has been proposed, using platelet-rich plasma in clot waveform analysis. Investigation on platelet-rich plasma samples from patients with arterial hypertension have shown the suitability of such an approach for more adequate evaluation of the balance between procoagulant and anticoagulant processes in the plasma (including platelet-mediated) and, as a consequence, for more reliable differentiation of healthy donors and hypertension patients which should improve therapeutic approaches.

The obtained results are important for understanding the role of blood cells in coordination of thrombus formation and dissolution, which can be used to improve existing and develop new methods for the diagnosis and treatment of pathological conditions associated with the development of cardiovascular diseases.

Key words: thrombus formation, fibrinolysis, platelets, monocytes, neutrophils, plasminogen/plasmin system, tissue plasminogen activator, protein C.