

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

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

Удовенко Анастасія Вадимівна

УДК 577.112.083; 577.151.45

ДИСЕРТАЦІЯ

Регулювання активності тромбіну і плазміну в процесі формування і
розчинення згустку в плазмі крові людини

091 – Біологія

09 – Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

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

_____ / А.В.Удовенко /

Науковий керівник: Макогоненко Євген Митрофанович, доктор біологічних
наук, професор

Київ 2026

АНОТАЦІЯ

Удовенко А.В. Регулювання активності тромбіну і плазміну в процесі формування і розчинення згустку в плазмі крові людини. 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, 2026.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню процесів, які лежать в основі формування і розчинення фібринових згустків. Для аналізу зв'язків між формуванням та розчиненням згустку та активацією протромбіну і плазміногену були розроблені методи визначення активності ензимів, які характеризують коагуляційну компоненту активності тромбіну і фібринолітичну активність плазміну на момент повного розчинення згустку в плазмі крові людини.

В процесі дослідження було знайдено, що фібрилярна структура згустку важлива для підтримки активації протромбіну на стадії ініціації зсідання. Фібриноген, під впливом фібриногенази із отрути щитомордника *Agkistrodon halys halys* втрачає більш ніж на порядок здатність підтримувати активацію протромбіну.

Встановлено, що, накопичений на стадії ініціації у згустках, тромбін необхідний для стадії ампліфікації активності тромбіну і перемикає процесу активації системи зсідання на її гальмування. Надлишок тромбіну, який звільняється із згустку на стадії ампліфікації зсідання, зв'язується з FV, FVIII і FXI, що викликає сплеск амідазної активності.

Запропоновано новий спосіб підрахунку активності і концентрації тромбіну в методі TGA, який дозволяє визначити концентрацію тромбіну в кожній момент тромбограми до і після точки перелому кривої.

Аналіз зв'язку процесу активації протромбіну і формування фібринового згустку та активації системи фібринолізу показав, що початок активації системи фібринолізу настає в період завершення формування фібрилярної структури згустку. Це дозволяє припустити, що механізм взаємодії сайтів полімеризації фібрину desA функціонує таким чином, що в процесі зсідання останнього, йде конкурентне витіснення компонентів фібринолітичної системи на поверхню сформованих фібрил згустку, де вони створюють активаційні тріади Glu-Pg–фібрин–Glu-Pm, які запускають механізм фібринолізу.

З використанням методу турбідиметричного аналізу структури фібрил показано, що щільність протофібрил у фібрилі може змінюватись в залежності від ініціатора зсідання плазми крові. Це вказує на те, що параметр щільності протофібрил потенційно може бути використаний для діагностичних цілей.

Таким чином, в в ході виконання дисертаційної роботи було виявлено нові зв'язки між:

- активацією протромбіну і формуванням згустку у часі на стадії ініціації зсідання плазми крові АЧТЧ реагентом або тканинним фактором;
- тривимірною структурою згустку і швидкістю активації протромбіну на стадії ініціації процесу формування згустку;
- механізмом формування структури фібрил і механізмом формування активаційних тріад Glu-Pg–фібрин–Glu-Pm фібринолітичної системи, що носить конкурентний характер.

Ключові слова: полімеризація фібрину, фібриноген, тромбін, активація плазміногену, плазмін, турбідиметрія, електронна мікроскопія, запалення, розчинний фібрин, гемостаз, зсідання крові, фібриноліз, антитіла, діагностика.

ANNOTATION

Udovenko A.V. Regulation of Thrombin and Plasmin activity during clot formation and dissolution in human blood plasma. Qualifying scientific work submitted as a manuscript.

This PhD thesis is devoted to the investigation of the processes underlying the formation and dissolution of fibrin clots. To analyze the relationships between clot formation and dissolution and the activation of prothrombin and plasminogen, methods were developed for determining the activity of enzymes characterizing the coagulation component of thrombin activity and the fibrinolytic activity of plasmin at the moment of complete clot dissolution in human blood plasma.

During the study, it was found that the fibrillar structure of the clot is important for supporting prothrombin activation at the initiation stage of coagulation. Fibrinogen, upon exposure to fibrinogenase from the venom of *Agkistrodon halys halys*, loses more than an order of magnitude of its ability to support prothrombin activation.

It was established that thrombin accumulated within clots during the initiation stage is required for the amplification stage of thrombin activity and for switching the process of coagulation system activation to its inhibition. Excess thrombin released from the clot during the amplification stage of coagulation binds to FV, FVIII, and FXI, which causes a burst of amidolytic activity.

A novel method for calculating thrombin activity and concentration in the thrombin generation assay (TGA) was proposed, which allows the determination of thrombin concentration at every point of the thrombogram before and after the breakpoint of the curve.

Analysis of the relationship between the process of prothrombin activation and fibrin clot formation and the activation of the fibrinolytic system showed that the onset of fibrinolytic system activation occurs during the period of completion of the fibrillar clot structure formation. This suggests that the mechanism of interaction

of fibrin desA polymerization sites functions in such a way that, during clot formation, components of the fibrinolytic system are competitively displaced onto the surface of the formed clot fibrils, where they create Glu-Pg–fibrin–Glu-Pm activation triads that initiate the mechanism of fibrinolysis.

Using a turbidimetric method for the analysis of fibril structure, it was shown that the density of protofibrils within a fibril can vary depending on the initiator of blood plasma coagulation. This indicates that the protofibril density parameter may potentially be used for diagnostic purposes.

Thus, during the course of this dissertation research, new relationships were identified between:

- prothrombin activation and clot formation over time at the initiation stage of blood plasma coagulation induced by an APTT reagent or tissue factor;
- the three-dimensional structure of the clot and the rate of prothrombin activation at the initiation stage of the clot formation process;
- the mechanism of fibril structure formation and the mechanism of formation of the Glu-Pg–fibrin–Glu-Pm activation triads of the fibrinolytic system, which is competitive in nature.

Keywords: fibrin polymerization, fibrinogen, thrombin, plasminogen activation, plasmin, turbidimetry, electron microscopy, inflammation, soluble fibrin, haemostasis, blood coagulation, fibrinolysis, antibodies, diagnostics.

ПЕРЕЛІК ПУБЛІКАЦІЙ

1. P. Yu. Tsap, G. K. Gogolinskaia, T. M. Platonova, R. Yu. Marunych, **A. V. Udovenko**, Ye. M. Makogonenko. Influence of fibrin D and DD fragments on fibrinogen and fibrinogen fragment X polymerization initiated by thrombin or ancistron. *Biotechnologia Acta*. 2022. Vol. 15, no. 3. P. 20–28. DOI: 10.15407/biotech15.03.023.

*Цап П.Ю., - планування експериментів, аналіз дослідів, написання статті,
Гоголінська Г.К., – виділення фібриногену і його фрагментів;*

Платонова Т.М., – планування дослідів; обговорення результатів;

Марунич Р.Ю., – хроматографічний аналіз, обговорення результатів;

Удовенко А.В., – турбідиметричний аналіз, характеристика фрагментів;

Макогоненко Є.М. – ідея дослідження, аналіз результатів, написання статті.

2. **Udovenko A. V.** Determination of thrombin and plasmin activity in human blood plasma using the turbidimetric curve of clot formation and dissolution. *Biotechnologia Acta*. 2023. Vol. 16, no. 2. P. 50–52. DOI: 10.15407/biotech16.02.050.

Удовенко, А.В. – виконання експериментальної частини, написання статті.

3. **A. Udovenko**, Y. Makogonenko, D. Korolova, V. Chernyshenko, S. Komisarenko. Formation and elimination of soluble fibrin and D-dimer in the bloodstream. *Croatian Medical Journal*. 2023. Vol. 64, no. 6. P. 421–429. DOI: 10.3325/cmj.2023.64.421. (Q2).

Удовенко А. – підготовка статті до друку, аналіз даних;

Макогоненко Є. – основна ідея дослідження, аналіз даних, написання статті;

Корольова Д. – аналіз даних; написання статті;

Чернишенко В. – аналіз даних, написання статті, загальне керівництво;

Комісаренко С. – загальне керівництво.

4. **A. Udovenko**, Y. Makogonenko, O. Hornytska, O. Yusova, V. Chernyshenko. Determination of thrombin and plasmin activity using the turbidimetric analysis of clot formation and dissolution in human blood plasma. Ukrainian Biochemical Journal. 2024. Vol. 96, no. 2. P. 19–26. DOI: 10.15407/ubj96.02.019 (**Q4**).

Удовенко А. – виконання експериментальної частини, написання та підготовка статті до друку;

Макогоненко Є. – основна ідея дослідження, планування експериментів, аналіз даних та написання статті;

Горницька О. – експерименти з тромбіном, аналіз даних; написання статті;

Юсова О. – виділення і характеристика плазмін(оген), аналіз даних;

Чернишенко В. – обговорення результатів та загальне керівництво.

5. Ye. Makogonenko, V. Chernyshenko, V. Bardyk, **A. Udovenko**, S. Komisarenko. Paralogism in method of Thrombin Generation Assay (TGA) in human blood plasma. Ukr. Biochem. J. 2025; Volume 97, Issue 1, Jan-Feb, pp. 75-79. DOI: 10.15407/ubj97.01.075 (**Q4**).

Є. Макогоненко – основна ідея дослідження, планування експериментів, аналіз результатів та написання статті;

В. Чернишенко – аналіз даних, загальне керівництво;

В. Бардик – аналіз даних та написання статті;

А. Удовенко – турбідиметричний аналіз, аналіз результатів та написання статті;

С. Комісаренко – обговорення результатів, загальне керівництво.

ПЕРЕЛІК ТЕЗ ДОПОВІДЕЙ НА КОНФЕРЕНЦІЯХ

1. **A. Udovenko**, A. Pavlenko, K. Baidakova. Diagnostic algorithm for the assessment of hemostasis system condition. FEBS Congress 2024, P36032.

A. Удовенко – виконання експериментальної частини, аналіз результатів та написання статті;

A. Павленко – виконання експериментальної частини, аналіз результатів;

K. Байдакова – виконання експериментальної частини, аналіз результатів.

2. **Anastasiia V. Udovenko**, Yevgen M. Makogonenko, Volodymyr O. Chernyshenko. Role of Fibrinogen in Regulation of Thrombin Generation. Journal of Thrombosis and Haemostasis. ISFP/IFRS Corfu meeting 2025.

A. Удовенко – експериментальна робота, аналіз даних, написання статті;

Є. Макогоненко – основна ідея дослідження, планування експериментів та написання статті;

В. Чернишенко – аналіз даних, загальне керівництво.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	12
ВСТУП	14
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	20
1.1 Система гемостазу плазми крові людини	20
1.2 Система зсідання та механізм формування фібринового згустку	27
1.3 Система фібринолізу та механізм розчинення фібринового згустку	33
1.4 Фібриновий згусток як регулятор балансу зсідання і розчинення фібринового згустку в плазмі крові	36
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	40
2.1 Реактиви та матеріали	40
2.2. Методи	41
2.2.1 Отримання плазми з крові донорів	41
2.2.2 Дефібринована плазма донорів	41
2.2.3 Отримання фібриногену	41
2.2.4 Визначення концентрації фібриногену спектрофотометричним методом	42
2.2.5 Полімеризація фібриногену	43
2.2.6 Визначення концентрації фібриногену в плазмі крові	44
2.2.7 Визначення амідолітичної активності ензимів	44
2.2.8 Турбідиметрія	45
2.2.9 Визначення величин параметрів формування і розчинення згустку з використанням ТДК	46

2.2.10 Метод визначення генерації тромбіну (TGA) та швидкості зсідання плазми крові, що ініціюється тканним фактором	47
2.2.11 Розрахунок діаметру та маса/довжина відношення фібрил фібринового згустку	51
2.2.12 Імуноферментний аналіз	52
2.2.13 Електрофоретичне розділення протеїнів у ПААГ	53
2.2.14 Електронна мікроскопія	54
2.2.15 Статистичний аналіз	55
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.	56
Розділ 3.1 Визначення активності тромбіну і плазміну в плазмі крові людини з застосуванням турбідиметричної кривої формування і розчинення згустку.	56
3.1.1 Визначення активності тромбіну в плазмі крові людини	57
3.1.2 Визначення активності плазміну в плазмі крові людини	62
Розділ 3.2 Паралогізм у методі аналізу генерації тромбіну (TGA) в плазмі крові людини	65
Розділ 3.3. Дослідження зв'язку між формуванням структури згустку і генерацією тромбіну на стадії ініціації зсідання плазми крові. Роль фібриногену і фібрину в ініціації зсідання плазми крові	72
Розділ 3.4 Дослідження зв'язку між формуванням, розчиненням згустку і генерацією тромбіну і плазміну в плазмі крові людини	80
3.4.1. Зв'язок між генерацією тромбіну та стадіями формування структури фібринового згустку	81
3.4.2. Зв'язок між генерацією плазміну та стадіями формування структури фібринового згустку	89
Розділ 3.5 Розрахунок діаметру та маса/довжина відношення фібрил фібринового згустку.	99

3.5.1 Турбідиметрична характеристика згустку, що утворюється з фібриногену та плазми крові під дією тромбіну, АЧТЧ-реагенту і TF.	99
Розділ 3.6 Характеристика стану системи гемостазу пацієнтів з опіками.	111
РОЗДІЛ 4. Заключна частина.	124
ВИСНОВКИ	130
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	132
ДОДАТОК 1	148

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АТІІІ – антитромбін ІІІ;

АТІІІ-Не – комплекс антитромбіну ІІІ з гепарином;

c-1 f μзгусток – поперечно зшитий FXІІІа фібриновий мікрозгусток у плазмі крові;

c-1 fclot – поперечно зшитий FXІІІа фібриновий згусток;

DDE – DDE-тріада;

ЕЗ – продукт плазмін-опосередкованого розщеплення DDE-тріади – фрагмент Е з відщепленими ВβN-доменами;

ЕС – ендотеліальні клітини;

ЕТР – ендогенний тромбіновий потенціал;

f (FІa) – фібрин;

fdesA – фібрин із відщепленими обома FpA;

fdesAB – фібрин із відщепленими FpA та FpB;

Fg (FІ) – фібриноген;

FpA – фібринопептид А фібриногену;

FpB – фібринопептид В фібриногену;

FSAP – протеїнааза, що каталізує перетворення FVІІ у FVІІa (Factor VII Activating Protease);

Glu-Pg – глу-плазміноген;

HMWK – високомолекулярний кініноген;

HMWPDF – високомолекулярні продукти деградації поперечно зшитого фібрину;

KK – калікреїн;

РАІ-1 – інгібітор активатора плазміногену І типу;

РС (PrC) – протеїн С;

РСa (РСa) – активований протеїн С (ЕС 3.4.21.69);

РСa*PS – комплекс активованого протеїну С з протеїном S;

Plt – тромбоцити;

PK – прекалікреїн;

Pm – плазмін (ЕС 3.4.21.7);

PGA – метод аналізу генерації плазміну;

RPC – рецептор протеїну C;

sf (SF) – розчинний фібрин;

sf-Fg – комплекс розчинного фібрину з фібриногеном;

TAFI – тромбін-активованій інгібітор фібринолізу;

ТДК – турбідиметричні криві;

TF – тканинний фактор;

TFPI α – інгібітор шляху тканинного фактора (альфа-ізоформа);

TGA – метод аналізу генерації тромбіну

TM – тромбомодулін;

t-PA – тканинний активатор плазміногену (ЕС 3.4.21.68);

Tr (FIIa, Thr) – тромбін (ЕС 3.4.21.5);

α 2-AP – α 2-антиплазмін;

α 2-МГ – альфа-2-макроглобулін.

ВСТУП

Актуальність. Система гемостазу плазми крові людини є потужним молекулярним механізмом, направленим на підтримку цілісності та відновлення прохідності серцево-судинної системи у випадку її порушення. В плазмі крові її основними компонентами є система зсідання крові та система розчинення – фібринолізу.

Провідна роль в активації системи гемостазу належить системі зсідання крові, оскільки її активація призводить до утворення фібринового згустку. Активація системи зсідання крові відбувається, переважно, по зовнішньому або, рідше, по внутрішньому шляхам коагуляції з залученням FVIIa, FIXa та FXa, які активують протромбін у тромбін. Останній трансформує фібриноген у desA і desAB форми фібрину, які шляхом самоскладання утворюють сітку фібринового згустку.

Фібринолітична система не є самодостатньою і самостійною. Система фібринолізу має активний прямий ензиматичний активатор плазміногену – t-PA, проте її здатність активувати плазміноген повністю залежить від структури полімерного фібрину. Такі форми фібрину, як розчинний фібрин, протофібрили та протофібрили на стадії латеральної асоціації в плазмі крові не здатні ініціювати активацію плазміногену. Тільки на тривимірній полімерній сітці фібринового згустку може формуватися активаційна тріада Glu-Pg – фібрин – t-PA, в якій t-PA активує Glu-Pg в Glu-Pm шляхом розщеплення пептидного зв'язку R561-V562.

Важливим аспектом дослідження було відтворення цілісної картини динаміки ініціації, ампліфікації та завершення формування структури фібринового згустку в плазмі крові, з'ясування ролі тромбіну на усіх стадіях його формування, з'ясування зв'язку між формуванням структури згустку і активацією фібринолітичної системи та динамікою зміни активності плазміну в ході розчинення згустку. Важливим також було питанням локалізації

структур в згустку, на яких формуються активаційні тріади фібринолітичної системи – Glu-Pg-фібрин-t-PA, та молекулярний механізм їх формування. Важливим було оцінити протофібрилярну структуру фібринового згустку.

Для дослідження динаміки формування структур фібринового згустку було використано турбідиметричні методи аналізу, визначення амідазної активності тромбіну і плазміну у часі – тромбограми для активності тромбіну та плазмінограми для активності плазміну, які дозволяють відслідковувати активності ензимів в процесах формування і розчинення фібринового згустку. Для визначення протофібрилярної структури згустку було використано метод Carr і Hermans.

В процесі активації системи гемостазу активація систем зсідання крові і фібринолізу відбувається неодноразово. Як відомо, для активації фібринолітичної системи необхідна структура фібринового згустку, яка здатна утворитися тільки на заключній стадії формування фібрилярної структури згустку. В зв'язку з тим, що Glu-Pg може зв'язуватися з усіма формами фібрину, (але не на всіх активуватися) починаючи від фібрин-мономеру, постає важливе питання, яка ймовірна причина затримки активації фібринолізу. Це питання також пов'язане з визначенням активності плазміну в процесі руйнування згустку в плазмі крові, яке могло б дати відповідь про активність плазміну (системи фібринолізу) в певні моменти розчинення згустку плазми крові.

Цей аспект дослідження є важливим, оскільки може бути використаний як параметр стану системи фібринолізу. В діагностичній практиці існує певна прогалина в методах визначення активності плазміну як показника активності фібринолітичної системи. Розробка методу отримання плазмінограм для визначення активності плазміну в процесі формування і розчинення фібринового згустку в плазмі крові виглядає перспективною для заповнення цієї прогалини.

Незважаючи на величезне збільшення наших знань, що стосуються взаємного переплетення процесів в системі гемостазу, багато з того, що стосується молекулярних механізмів біологічних функцій фібриногену та фібрину, залишається не відомим, включаючи основні аспекти згортання, фібринолізу та міцності фібринових згустків. Ще менше відомо про патофізіологічне застосування фібриногену, фібрину та фібринових згустків. Тому дослідження щодо системи гемостазу продовжують залишатися актуальними.

Мета і завдання дослідження. Метою роботи було дослідження зв'язку між генерацією активності тромбіну і плазміну та формуванням і розчиненням фібринового згустку у плазмі крові людини.

Відповідно до мети було поставлено такі завдання:

1. Розробити методи визначення активності тромбіну та плазміну в плазмі крові з використанням методів турбідиметрії;
2. З'ясувати роль фібриногену і фібрину в ініціації активації системи зсідання плазми крові;
3. Удосконалити спосіб розрахунку активності і концентрації тромбіну в TGA методі;
4. Дослідити зв'язок між активністю тромбіна і формуванням та розчиненням фібринового згустку;
5. Дослідити зв'язок між активністю плазміна і формуванням та розчиненням фібринового згустку;
6. Дослідити зв'язок між діаметром та кількістю протофібрил у фібрилі при утворенні згустку.
7. Охарактеризувати стан системи гемостазу у пацієнтів з опіковою травмою.

Об'єктом дослідження є система гемостазу плазми крові людини.

Предметом дослідження є активація ключових компонентів системи зсідання крові (протромбіну) і фібринолізу (плазміногену) та її зв'язок з формуванням і розчиненням фібринового згустку в плазмі крові людини.

Методи дослідження: спектроскопія, турбідиметрія, електронна мікроскопія, ІФА, виділення і очистка протеїнів, електрофоретичний та ензиматичний аналіз тромбіну і плазміну, метод аналізу генерації тромбіну (TGA), метод аналізу генерації плазміну (PGA), метод аналізу параметрів турбідиметричних кривих формування і розчинення згустків плазми крові, метод розрахунку діаметру, маса-довжина відношення і кількості протофібрил у фібрилі згустку.

Наукова новизна одержаних результатів. Встановлено, що тривимірна структура фібринового згустку на стадії ініціації активації системи зсідання необхідна для забезпечення швидкої і ефективної генерації тромбіну та переходу системи в стадію ампліфікації. Сформульовано гіпотезу про механізм підтримання балансу між формуванням та розчиненням структури фібринового згустку в плазмі крові людини. Показано зв'язок у часі між закінченням формування фібрил фібринового згустку і початком ініціації активації системи фібринолізу на них. Припускається, що фібрили є тими структурами, на яких реалізується баланс між системами зсідання та розчинення згустку плазми крові. Вперше висловлено думку про те, що механізм взаємодії сайтів полімеризації фібрину desA функціонує таким чином, що в процесі зсідання останнього, йде конкурентне витіснення компонентів фібринолітичної системи на поверхню сформованих фібрил згустку, де вони створюють активаційні тріади Glu-Pg-фібрин-Glu-Pm, які запускають механізм фібринолізу.

Практичне значення одержаних результатів. Розроблено метод визначення активності тромбіну, використовуючи коагуляційну компоненту активності ензиму в плазмі крові. Сформульовані нові уявлення про умови рівноваги процесів зсідання і розчинення згустку, які дають ширшу можливість вибирати ефектори для регуляції балансу між системою зсідання та системою розчинення структури згустку та перевірити експериментально межі їх застосування.

Особистий внесок здобувача.

Тему, мету та завдання роботи було сформульовано дисертантом спільно з науковим керівником д.б.н., професором, Є.М. Макогоненко. Результати досліджень, виконаних безпосередньо автором, представлені в розділах 3.2; 3.4; 3.5; 3.6. Підрозділ 3.3 виконано за участі с.н.с. Юсової О.І., підрозділ 3.7 виконано за участі с.н.с. Корольової Д.С. Електронно-мікроскопічні дослідження здійснено спільно з м.н.с. Є.П. Кучерявим. Турбідиметричні, спектофотометричні дослідження виконано дисертантом самостійно. Аналіз результатів досліджень та їх узагальнення здійснено спільно з проф. Є.М. Макогоненко.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційну роботу виконано на базі Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України в рамках проєктів НДР: № 0224U000653 «Взаємодії компонентів системи: гемостазу: на клітинному та молекулярному рівні в процесі формування та елімінації тромбу» (2019 – 2023 рр.). № 0124U000251 «Дослідження та пошук способів регуляції молекулярних механізмів внутрішньосудинного та екстрасудинного тромбоутворення» (2024 – 2028 рр.).

Апробація результатів дисертації.

Дисертант представив результати виконання дисертаційної роботи на міжнародних та вітчизняних конференціях. Зокрема на:

1. Актуальні проблеми біохімії та біотехнології, Київ, Травень 25, 2023;
2. 19th RECOOP Bridges in Life Sciences Conference, April 11-12, 2024 - Bratislava, Slovakia;
3. 48 Congress of the Federation of European Biochemical Societies (FEBS), June 29 - July 3 2024, Milano, Italy;
4. Biomolecular Horizons 2024 Congress, 22-26 September 2024, Melbourne, Australia;
5. 27th Congress of the International Society for Fibrinolysis and Proteolysis (ISFP/PA) and 28th Workshop of the International Fibrinogen Research Society (IFRS), 28 September - Thursday 2 October 2025, Corfu, Greece.

Публікації. Матеріали дисертації опубліковано у 5 наукових статтях у фахових виданнях (1 – у закордонних та 4 – у вітчизняних виданнях) в тому числі 3 статті у наукових виданнях, індексованих міжнародними наукометричними базами даних Scopus та Web of Science: Q2 – 1 стаття, Q4 – 2 статті), в 2 тезах доповідей на наукових конференціях.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота має загальноприйнятну структуру, яка включає анотацію, вступ, огляд літератури, матеріали і методи досліджень, результати досліджень та їх обговорення, заключний розділ та висновки, список використаних джерел, що містить 144 посилання, додаток. Дисертаційна робота викладена на 149 сторінках, містить 36 рисунків та 15 таблиць.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Система гемостазу плазми крові людини

Гемостаз – це еволюційно складений захисний механізм, призначений для забезпечення цілісності судинної системи шляхом здійснення локальної тромботичної відповіді у разі її ушкодження. Гемостаз забезпечує: закриття ушкоджених судин, підтримання крові в рідкому стані та видалення тромбів після відновлення судинної стінки. Система гемостазу - біологічна система, що здійснює, за необхідності, швидку та ефективну зупинку кровотечі. Ця система є еволюційно висококонсервативною: від *zebrafish* до людини, і ключову роль у ній відіграє система зсідання крові. Сучасна концепція гемостазу базується на інтеграції клітинних і молекулярних механізмів, у межах якої коагуляційний каскад є центральним у формуванні стабільного фібринового тромбу [1, 2]. Гемостаз характеризується здатністю швидко (протягом хвилин) зупиняти кровотік кровотечу навіть із великих ушкоджених судин, водночас зберігаючи кров у рідкому стані в судинному руслі. Це забезпечується скоординованою взаємодією взаємопов'язаних ланок гемостазу: судинно-тромбоцитарної, коагуляційної, антикоагулянтної та фібринолітичної, що відображає динамічну інтеграцію клітинних елементів крові (тромбоцитів, ендотеліоцитів, еритроцитів) із гуморальними факторами системи [3].

Процес зсідання крові включає три стадії: первинний (тромбоцитарний) гемостаз, коагуляційний гемостаз та фібриноліз. Первинний гемостаз є результатом взаємодій між тромбоцитами, рецепторами ендотеліальних клітин стінки судини і адгезивними протеїнами, що призводить до формування первинного тромбоцитарного тромбу. Вторинний гемостаз пов'язаний із активацією протеїнів системи зсідання крові, основу яких складають коагуляційні фактори, результатом чого є утворення тромбіну та

трансформація фібриногену у фібрин і формування фібринового згустку, який стабілізує первинний тромб і закріплює його в місці пошкодження судини. Антикоагулянтна система, основу якої складають інгібітори коагуляційних факторів (протеїни C і S, антитромбін III, TFPI, ін.) забезпечує регуляцію активності системи зсідання шляхом контролю активності комплексів гемостатичних ензимів, обмежуючи ріст і стабілізацію згустку та перешкоджає їх розповсюдження в системі кровообігу. Фібриноліз, в свою чергу, підтримує баланс між утворенням і лізисом згустку та сприяє нормальному кровообігу. За узгодженої взаємодії цих механізмів досягається рівновага в системі гемостазу, і вона перебуває в спокої, тоді як порушення гемостатичної рівноваги призводить до розвитку гемостатичних порушень (кровотечі або тромбозу). Гемостатичні компоненти функціонують як інтегрована система і не є ізольованими між собою. Так, фактор фон Віллебранда (vWF) виконує дві ключові біологічні функції: забезпечує адгезію та агрегацію тромбоцитів і слугує транспортером та стабілізатором коагуляційного фактора VIII. VWF бере участь як у первинному, так і у вторинному гемостазі. У первинному гемостазі vWF забезпечує адгезію та агрегацію тромбоцитів шляхом взаємодії з субендотеліальним колагеном і тромбоцитарним глікопротеїном GPIba. У вторинному гемостазі vWF стабілізує фактор VIII, запобігаючи його протеолітичній деградації та знижуючи швидкість кліренсу з плазми крові. Порушення функції vWF призводить до комбінованого дефекту первинного та вторинного гемостазу, що клінічно проявляється кровоточивістю [1-4]. Фібриноген, який є субстратом тромбіну та попередником фібрину, також виконує адгезивну функцію, забезпечуючи агрегацію активованих тромбоцитів шляхом взаємодії з активованими P₂U₁ рецепторами. Таким чином, фібриноген залучено до регуляції як вторинного, так і первинного гемостазу [5-7].

Згідно клітинній моделі гемостазу, фактори коагуляції реагують між собою на специфічних ділянках клітинних поверхонь, функціональні

властивості яких визначаються залежно від експресії поверхневих рецепторів. Сучасна клітинна модель гемостазу, на відміну від класичної каскадної моделі, підкреслює активну роль клітинних поверхонь, які не лише слугують місцем перебігу реакцій, а й здійснюють контроль генерації тромбіну. Процес гемостазу включає чотири послідовні фази: ініціацію, ампліфікацію, пропagaцію (поширення) та термінацію. Ініціація відбувається на клітинах, що експресують тканинний фактор, ампліфікація – на поверхні активованих тромбоцитів, поширення – на фосфоліпідній мембрані повністю активованих тромбоцитів [8].

Таким чином, гемостаз є інтегрованою системою, що ґрунтується на складних біохімічних механізмах і координованих взаємодіях між судинним ендотелієм, плазмовими факторами зсідання та клітинними компонентами крові, насамперед тромбоцитами.

Структурно система гемостазу включає гуморальні (плазмові) та клітинні компоненти крові. До клітинних елементів належать ендотеліальні клітини, тромбоцити, еритроцити та інші формені елементи крові. Центральною ланкою гемостазу є система зсідання крові, яка об'єднує плазмові фактори зсідання та їх інгібітори (антитромбін III, TFPI), фактор фон Віллебранда, фібрoneктин, а також тромбоцити, залучені до формування тромбу. Коагуляційний процес базується на складній мережі тривимірних структурних взаємодій і тонко регульованих механізмів. Застосування кріоелектронної мікроскопії дозволило розкрити структуру коагуляційних факторів, що суттєво поглибило розуміння їх функцій [9-13].

Функціонально із системою зсідання взаємодіють система фібринолізу, антикоагулянтна система (переважно система протеїну C), калікреїн-кінінова система та білки-інгібітори – α 2-антиплазмін (α 2-AP), інгібітор активатора плазміногену I типу (PAI-1) і тромбін-активованого інгібітору фібринолізу TAFI (карбоксипептидаза U) [2, 14, 15], що узагальнено представлено на **рис. 1**.

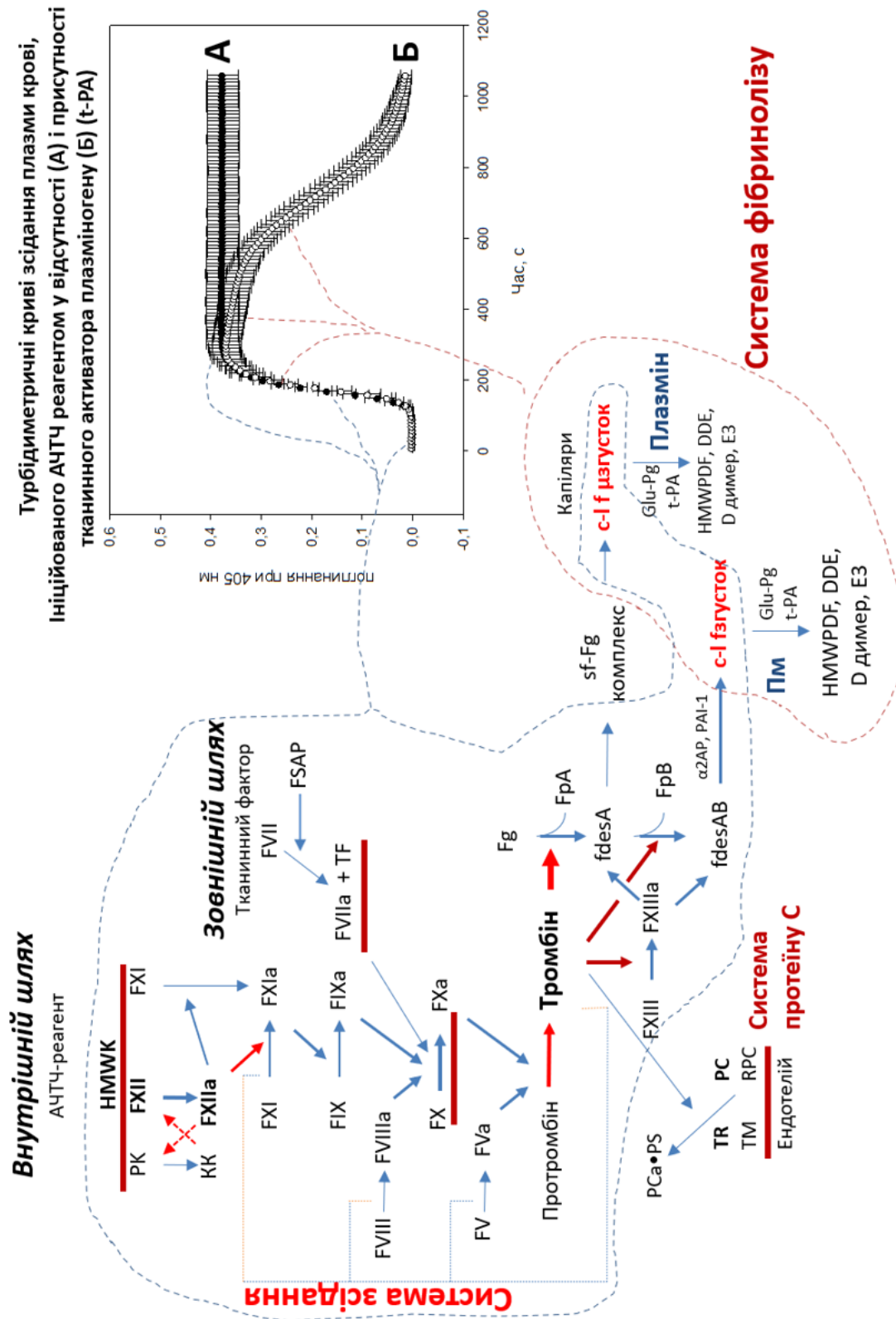


Рис. 1. Схема молекулярних взаємодій в процесі активації системи зсідання крові і пов'язаних з нею систем фібринолізу і протеїну С та турбідиметричні криві зсідання плазми крові, ініційованого АЧТЧ реагентом у відсутності (А) і присутності тканинного активатора плазміногену (t-PA)(Б).

На **рис. 1.** представлено узагальнену схему молекулярних взаємодій під час активації гуморальної системи зсідання крові та функціонально пов'язаних із нею систем – фібринолізу, протеїну С і калікреїн-кінінової, де:

РК – прекалікреїн; КК – калікреїн; НМВК – високомолекулярний кініноген; FXIII, FXII, FXI, FX, FIX, FVIII, FVII, FV, FII (протромбін), FI (Fg, фібриноген) – неактивовані фактори коагуляційного каскаду; TF – тканинний фактор; FSAP – протеїназа, що каталізує перетворення FVII у FVIIa.

FXIIIa, FXIIa, FXIa, FXa, FIXa, FVIIIa, FVIIa, FVa, Tr (тромбін, FIIa), FIa (f, фібрин) – активовані форми факторів зсідання.

FpA – фібринопептид А фібриногену; FpB – фібринопептид В фібриногену; fdesA – фібрин із відщепленими обома FpA; fdesAB – фібрин із відщепленими FpA та FpB.

$\alpha 2$ -AP – $\alpha 2$ -антиплазмін; PAI-1 – інгібітор активатора плазміногену I типу; PC – протеїн С; RPC – рецептор протеїну С; ТМ – тромбомодулін; PCa*PS – комплекс активованого протеїну С з протеїном S.

sf – розчинний фібрин; sf-Fg – комплекс розчинного фібрину з фібриногеном; c-1 fclot – поперечно зшитий FXIIIa фібриновий згусток; Glu-Pg – глу-плазміноген; t-PA – тканинний активатор плазміногену; c-1 f μ згусток – поперечно зшитий FXIIIa фібриновий мікрозгусток у плазмі крові.

НМВPDF – високомолекулярні продукти деградації поперечно зшитого фібрину; DDE – DDE-тріада; E3 – продукт плазмін-опосередкованого розщеплення DDE-тріади – фрагмент E з відщепленими B β N-доменами. Червона лінія вказує, що підкреслені нею реакції відбуваються на фосфоліпідній негативно зарядженій поверхні клітинних мембран чи мікрочастинок.

Співіснування у межах гемостазу протилежно спрямованих процесів тромбоутворення та фібринолізу лежить в основі концепції динамічної рівноваги між формуванням і лізисом тромбів у плазмі крові, актуальної в сучасних уявленнях [16-17]. Дефіцит або зниження активності

прокоагулянтних компонентів – зокрема факторів зсідання крові (за винятком FXII), фактора фон Віллебранда або тромбоцитів – призводить до розвитку кровоточивих станів, таких як гемофілія чи хвороба фон Віллебранда. Натомість недостатність антикоагулянтних систем, включно з дефіцитом протеїну С, протеїну S або антитромбіну III, а також надмірна активність прокоагулянтних факторів асоціюються з підвищеним ризиком тромбозу. Запобігти кровотечі або тромбозу можливо шляхом відновлення балансу гемостазу. Водночас клінічні дані свідчать, що більшість патологічних станів, асоційованих із тромбозами або кровотечами, можуть бути скориговані шляхом впливу на систему зсідання без прямого регуляторного втручання у фібриноліз [18].

Порушення цілісності ендотелію ініціює гемостатичну відповідь, яка включає формування тромбу [19]. Активація коагуляційного каскаду відбувається переважно через експресію тканинного фактора (TF) у позасудинному компартменті. Комплекс TF–FVIIa ініціює зовнішній шлях зсідання з утворенням FXa та генерацією тромбіну [5, 20, 21]. Згідно з клітинною моделлю гемостазу, ініціація, ампліфікація та заключна стадія коагуляції реалізуються на поверхні клітин, насамперед активованих тромбоцитів [9, 22, 23].

Наразі сформульовано модель функціонування системи гемостазу, що поєднує клітинні механізми та білкові фактори зсідання у процесах формування і лізису тромбів [24-26]. За фізіологічних умов ушкодження судинної стінки та тканин супроводжується локальною активацією комплексу TF–FVIIa, локалізованого у пошкоджених тканинах і плазмі крові [27, 28].

За патологічних станів без прямого ушкодження судин ініціація гемостазу відбувається за участю комплексу FVIIa–TF, асоційованого з прокоагулянтними мікрочастинками плазми крові. Формування таких мікровезикул індукується медіаторами запалення [13, 29, 30]. Джерелами TF-

вмісних мікрочастинок є тромбоцити, ендотеліальні клітини, моноцити та продукти клітинного некрозу.

Проферменти внутрішнього шляху зсідання можуть активуватися під дією калікреїну, металопротеїназ та інших протеїназ крові [2, 29-33]. Кінцевим етапом активації системи гемостазу є утворення тромбіну – центрального ферменту коагуляційного каскаду, який через механізми позитивного зворотного зв'язку активує фактори V, VIII та IX, каталізує перетворення фібриногену у полімерний фібрин – структурну основу тромбу, а також ініціює активацію системи протеїну C, TAFI та опосередковано системи фібринолізу [34, 35].

Після реалізації гемостатичної функції активується система фібринолізу. Плазмін, утворений із плазміногену за участі тканинного та урокіназного активаторів плазміногену (tPA та uPA), забезпечує деградацію фібрину, тоді як PAI-1 і α 2-антиплазмін обмежують надмірний лізис згустку [36, 37]. Ендогенний фібриноліз є недостатньо ефективним при інфарктах, тромбоемболіях і мозкових інсультах унаслідок послідовної, а не синхронної активації коагуляції та фібринолізу, що зумовлює обмежену ефективність пізнього введення t-PA [38, 39].

Порушення регуляції системи гемостазу призводить до розвитку гіпо- або гіперкоагуляційних станів. Тромбоз розглядається як активний патогенетичний чинник прогресування серцево-судинних, запальних та інфекційних захворювань [40]. Таким чином, активація системи гемостазу може мати як фізіологічний захисний характер, так і патологічні наслідки, сприяючи органному ушкодженню та прогресуванню захворювань [41].

1.2. Система зсідання та механізм формування фібринового згустку

Коагуляційний процес являє собою каскад послідовних протеолітичних реакцій, спрямованих на формування тромбу. Його функціональне призначення полягає у швидкому обмеженні крововтрати та стабілізації тромбоцитарної пробки шляхом формування фібринової сітки. Відомі два шляхи ініціації коагуляції – зовнішній (шлях тканинного фактора) та внутрішній (контактна активація), які активуються незалежно, але сходяться на рівні генерації активованого фактору X (FXa) і подальшого утворення тромбіну, що забезпечує трансформацію фібриногена у фібрин [30].

Зовнішній шлях коагуляції ініціюється експозицією тканинного фактора (TF) у разі ушкодження судинної стінки. TF утворює комплекс із активованим фактором VII (TF-FVIIa – зовнішня теназа), який каталізує активацію факторів X (FXa) та IX (FIXa). Активований FIX у комплексі з кофактором FVIIIa формує внутрішню теназу, що додатково підсилює генерацію FXa. FXa у присутності іонів Ca^{2+} взаємодіє з активованим фактором V (FVa), утворюючи протромбіназний комплекс, який каталізує перетворення протромбіну на тромбін [42, 43].

Внутрішній (контактна активація) шлях коагуляції ініціюється активацією фактору XII (FXIIa) за участі високомолекулярного кініногену та прекалікρείну плазми. FXIIa сприяє утворенню калікреїну та активує фактор XI (FXIa), який, у свою чергу, каталізує перетворення FIX у FIXa з подальшим формуванням комплексу внутрішньої тенази та генерацією FXa. Незважаючи на обмежену роль контактного шляху у фізіологічному гемостазі *in vivo*, сучасні дані свідчать про його значущий внесок у патологічне тромбоутворення, зокрема за участі нейтрофільних позаклітинних пасток і поліфосфатів [44].

Обидва шляхи коагуляції об'єднуються на стадії активації коагуляційного фактора X, який активує протромбін у тромбін – центральний фермент коагуляційного каскаду, який визначає не лише кількість, але й структурні характеристики фібринового згустку [45].

Тромбін є багатофункціональною сериною протеїназою і центральним ефектором системи гемостазу [46]. Його основною функцією є забезпечення зсідання крові шляхом утворення фібринового згустку, необхідного для збереження цілісності судинної системи [6, 7, 47]. Після завершення формування згустку тромбін перемикається на активацію антикоагулянтної системи протеїну C через інактивацію теназного та протромбіназного комплексів, що запобігає надмірному поширенню коагуляції [8, 48].

Функціональна багатогранність тромбіну зумовлена часовою та просторовою компартменталізацією його дії. Регуляція активності тромбіну здійснюється через взаємодію з рецепторами, зокрема рецепторами, активованими протеїназами (PAR), рецепторами ліпопротеїнів низької щільності, а також через зв'язування з тромбомодуліном, компонентами глікокаліксу та судинним ендотелієм [49-50]. Це забезпечує перемикання тромбіну між прокоагулянтними та антикоагулянтними функціями залежно від локальних умов.

У сучасній клітинній моделі гемостазу процес зсідання крові розглядається як послідовність стадій ініціації, ампліфікації, пропагації та термінації, остання визначається ендогенним тромбіновим потенціалом плазми крові [51]. Найбільш важливою є фаза ініціації, під час якої активність тромбіну функціонально обмежена та спрямована переважно на перетворення фібриногену на фібрин без істотного впливу на інші субстрати ензиму [52]. На стадії ініціації комплекс тканинного фактора з активованим фактором VII (TF–FVIIa) формує зовнішній теназний комплекс і каталізує активацію факторів X і IX. Утворений FXa у взаємодії з FVa формує протромбіназний комплекс (Va–Ха–Ca²⁺), що забезпечує генерацію тромбіну.

Фаза ампліфікації – це проміжний етап зсідання крові. На цій стадії невелика кількість тромбіну, утворена під час фази ініціації, діє як потужний каталізатор, активуючи тромбоцити та коагуляційні фактори для підготовки продукування великої кількості тромбіну на наступному етапі пропagaції [53, 54]. Сформований тромбін активує тромбоцити та фактори V, VIII і XI, що призводить до формування внутрішнього теназного комплексу FIXa–FVIIIa. Цей комплекс каталізує активацію FX зі значно вищою ефективністю порівняно із зовнішнім теназним комплексом, що спричиняє різке зростання генерації тромбіну [51-54].

Надлишкова генерація тромбіну, що спостерігається як *in vitro*, так і *in vivo* за умов масивної кровотечі, необхідна для швидкого завершення формування згустку та стабілізації його поверхні [25]. Це пов'язано з активацією фактору XIII до FXIIIa та подальшим ковалентним зшиванням фібрину через γ - γ ланцюги, включенням до структури згустку α 2-антиплазміну та PAI-1, активацією тромбоцитів і зшиванням рецепторів IIb/IIIa з полімерним фібрином. Сукупність цих процесів забезпечує формування механічно міцної та протейназостійкої поверхні тромбу [55].

Тромбінова активність, що формується в осередку ушкодження, є ключовим показником інтенсивності роботи системи зсідання. При цьому надлишок тромбіну генерується після моменту утворення згустку, у зв'язку з чим час зсідання крові не є адекватним показником тромбінової активності.

Кількісне визначення тромбінової активності здійснюється шляхом вимірювання кількості продукту, що утворюється при розщепленні штучного субстрату тромбіну під час коагуляції. Отриманий показник є пропорційним площі під кривою генерації тромбіну, яка відповідає ендogenous тромбіновому потенціалу (ЕТП). Крива генерації тромбіну (тромбограма) відображає інтегральну активність усієї системи зсідання крові. Характер реалізованого *in vitro* механізму залежить від застосованого тригера; найбільш

наближеними до фізіологічних умов вважають дослідження зсідання цільної крові або плазми за наявності низьких концентрацій тканинного фактора [51].

Активність тромбіну може оцінюватися або за швидкістю перетворення фібриногену на фібрин, або за інтенсивністю гідролізу хромогенного субстрату. На етапі ініціації зсідання амідазна активність тромбіну є зниженою, що пояснюється конкуренцією пептидного субстрату з фібриногеном за активний центр ферменту. Крім того, пептидні продукти, що вивільняються тромбіном у мікромолярних концентраціях, здатні інгібувати утворення протофібрил та їх латеральну асоціацію, імовірно, шляхом блокування взаємодії полімеризаційних сайтів A–a фібрину desA. Водночас тромбін, завдяки багатосайтовій взаємодії з фібриногеном, після відщеплення фібринопептидів A залишається зв'язаним із фібриновим субстратом – мономерами, олігомерами та протофібрилами фібрину – зберігаючи при цьому каталітичну активність щодо фібриногену. Хромогенний підхід є методично простішим, однак при аналізі плазми крові його інформативність обмежується неспецифічним розщепленням тромбінового субстрату іншими тромбіноподібними сериновими протеїназами системи гемостазу, зокрема ферментами контактної фази.

Ключовим субстратом тромбіну є фібриноген – плазмовий глікопротеїн, що складається з трьох пар поліпептидних ланцюгів A α , B β та γ , які кодуються генами FGA, FGB та FGG. Структурно молекула фібриногену включає центральну E-область, дві D-області, α C-області та B β N-області. Тромбін зв'язується з фібриногеном через екзосайт I та відщеплює фібринопептид A з N-кінців A α -ланцюгів, що призводить до утворення мономерів фібрину desA та експозиції полімеризаційних сайтів, які ініціюють самоскладання фібринових структур. Аналогічний тип фібрину desA може утворюватися під дією батроксобіну – тромбіноподібної серинової протеїнази, яка селективно вивільняє лише фібринопептид A з фібриногену. Мономери фібрину desA об'єднуються у олігомери за рахунок взаємодій типу «knob-hole» та контактів

у зонах D–E і D–D, з подальшим формуванням дволанцюгових протофібрил. Паралельно відбувається прискорення відщеплення фібринопептиду В (FrB; B β 1–14), що сприяє латеральній асоціації протофібрил за участі «knob» В, «hole» b та α C-регіонів і призводить до формування фібринових фібрил. Заключним етапом є ковалентне зшивання α C-регіонів фібрину фактором FXIIIa, унаслідок чого утворюється стабільний нерозчинний фібриновий згусток [56, 57].

Структурні властивості фібринового згустку суттєво відрізняються між собою залежно від умов його утворення. За фізіологічних умов ушкодження судин паралельно з утворенням тромбоцитарної «пробки» завдяки високій швидкості активації, концентруванню і локалізації тромбіну та активованих тромбоцитів і фібриногену на пошкоджених ділянках судин фібриноген швидко трансформується в фібрин desAB з формуванням фібринової сітки, що локально зміцнює тромб, який закриває пошкоджену ділянку [14, 58, 59]. Натомість за хронічних патологічних станів, особливо на ранніх стадіях, генерація тромбіну має системний і повільний характер, відбувається у суб- та наномолярних концентраціях і призводить до утворення фібрину desA в дуже маленьких концентраціях з утворенням розчинного фібрину.

Самоскладання останнього в протофібрили і далі – в згусток гальмується в плазмі крові високою концентрацією фібриногену. В результаті утворюються короткі фібрин desA – фібриноген комплекси (розчинний фібрин) [59-64]. Наявність розчинного фібрину в плазмі крові одночасно з іншими патологічними факторами, як вважають, створює загрозу утворення тромбів у кровотоці, що може призводити до інсультів, тромбоемболій та інфарктів. Тому присутність у плазмі крові розчинного фібрину є важливим діагностичним показником стану системи гемостазу пацієнта, а його вміст вказує на ступінь залучення системи гемостазу в патологічні процеси.

Розчинний фібрин представлений короткими олігомерами фібрину desA (менше 16 мономерів), які формують комплекси з фібриногеном і циркулюють

у плазмі крові. Висока концентрація фібриногену перешкоджає подальшій полімеризації таких структур у протофібрили та фібринові згустки [59-67]. Олігомери утворюються шляхом з'єднання молекул фібрину desA за типом «обличчям-до-обличчя» зі зсувом на половину довжини молекули внаслідок взаємодії полімеризаційних сайтів А-а та С-с. Кожна нитка олігомеру частково прошивається фактором XIIIa по С-кінцях γ -ланцюгів (γ 397– γ 411), які контактують кінець-до-кінця між сусідніми D-доменами молекул фібрину.

«Липкі» кінці олігомерів фібрину desA здатні зв'язувати молекули фібриногену через взаємодію А-а та, ймовірно, С-с сайтів полімеризації. Це суттєво обмежує подальше подовження олігомерів, формування протофібрил і їх латеральну асоціацію з утворенням фібринових фібрил і мікрогустків.

Олігомери фібрину desA здатні зв'язувати компоненти фібринолітичної системи, зокрема глу-плазміноген з низькою спорідненістю ($KD \sim 40$ мкМ) і тканинний активатор плазміногену (t-РА) з високою спорідненістю ($KD \sim 2,0$ нМ), однак не стимулюють активацію глу-плазміногену з утворенням глу-плазміну [12]. Унаслідок цього деградація фібрину до кінцевих продуктів лізису – DDE тріад, а потім до DD-димерів, D- та E3-фрагментів – істотно сповільнена [68].

Слід зазначити, що наявність γ' -ланцюгів фібрину (довжиною 427 амінокислотних залишків), які слабо прошиваються FXIIIa, приблизно у 8 % D-доменів молекул перешкоджає формуванню γ 1411– γ 2411 прошивок у близько 16 % сусідніх молекул фібрину. Це, ймовірно, впливає на кінцеву концентрацію DD-димерів у плазмі крові [69].

Таким чином, наявність розчинного фібрину у плазмі крові вказує на ризик внутрішньосудинного тромбоутворення і розглядається як чутливий діагностичний маркер активації системи зсідання гемостазу та рівня її залучення в патологічний процес.

1.3. Система фібринолізу та механізм розчинення фібринового згустку.

Подібно до коагуляційного каскаду, система фібринолізу перебуває під багаторівневим контролем, який здійснюється за участю кофакторів, інгібіторів та клітинних рецепторів [70]. Центральним ферментом системи фібринолізу є плазмін – серинова протеїназа, яка утворюється з неактивного попередника плазміногену. Існують два основні активатори плазміногену – t-РА, який синтезується та вивільняється ендотеліальними клітинами та u-РА, який продукується переважно моноцитами, макрофагами та клітинами епітелію судин [71]. На відміну від t-РА, u-РА має нижчу спорідненість до плазміногену, не потребує фібрину як кофактора та за фізіологічних умов реалізує свою активність переважно в екстраваскулярному просторі. Обидва активатори після утворення комплексів з рецептором, подібним до рецептора ліпопротеїнів низької щільності (LDL), підлягають кліренсу в печінці [72].

Активність утвореного плазміну обмежується інгібіторами серпінового типу, насамперед α_2 -антиплазміном, тоді як активація плазміногену, опосередкована t-РА та u-РА, пригнічується інгібітором активаторів плазміногену PAI-1. Важливою особливістю системи фібринолізу є наявність позитивного зворотного зв'язку: утворений плазмін підсилює власну генерацію шляхом протеолітичного перетворення одноланцюгових форм t-РА та u-РА на їх дволанцюгові, ензиматично активні аналоги [73].

Стандартний метод визначення функціональної активності плазміногену передбачає визначення у плазмі за наявності надлишку стрептокінази, яка утворює комплекс із плазміногеном. Останній здатний активувати молекули Glu-Pg шляхом розщеплення Val560-Arg561 пептидного зв'язку з експозицією його активного центру. Згенеровану плазмінову активність оцінюють за гідролізом хромогенного субстрату, специфічного для плазміну (S-2251) [74].

У плазмі крові плазмін швидко інактивується альфа-2-антиплазміном. Генерація плазміну потребує формування потрійних комплексів між активатором плазміногену, плазміногеном і матрицями, якими можуть бути поверхні клітин та полімерного фібрину. Фібрин у цьому випадку виконує потрійну функцію: надає сайти зв'язування t-PA та Glu-Pg для формування активаційної тріади, надає субстрат для згенерованого плазміну і захищає плазмін від інактивуючої дії $\alpha 2$ -AP [70].

За фізіологічних умов фібрин утворює матрикс для стабілізації тромбоцитарної пробки і не підлягає видаленню. Протеоліз фібрину прискорюється за наявності С-кінцевих залишків лізину, що експонуються на його поверхні та розпізнаються лізин-зв'язувальними сайтами крінглових доменів плазміногену [76]. Це призводить до підвищення концентрації зв'язаного t-PA і Glu-Pg, що суттєво підсилює активацію останнього. t-PA селективно зв'язується з фібрином і ініціює фібринолітичний процес на відміну від u-PA, який відіграє провідну роль у патологічних процесах, пов'язаних з руйнуванням міжклітинного матриксу і тканинним ремоделюванням [77].

Процеси утворення фібринового згустку та його лізису є тісно пов'язаними та, як вважають, перебувають у стані динамічної рівноваги. Концентрація розчинного фібрину в плазмі крові відображає рівень активації системи зсідання і залежить від фоновієї генерації тромбіну [78]. Тривалий час вважалося, що між концентраціями розчинного фібрину та D-димеру існує кореляційний зв'язок як між маркерами активації коагуляційної та фібринолітичної систем. Однак дані літератури не підтверджують такої залежності [65, 79].

Показано, що раніше описані кореляції між рівнями розчинного фібрину та D-димеру значною мірою зумовлені обмеженнями аналітичних методів, які не дозволяли відрізнити нативний розчинний фібрин від високомолекулярних продуктів деградації згустку, що містять, прошиті FXIIIa, D-димери. Водночас

концентрації цих маркерів суттєво відрізняються: у нормі рівень розчинного фібрину становить близько 3 мкг/мл, тоді як D-димеру – близько 100 нг/мл; за патологічних станів ці показники зростають відповідно до 10–100 мкг/мл і близько 100-500 нг/мл. Відсутність кореляції між їх концентраціями свідчить про різні механізми регуляції цих показників у плазмі крові.

Хоча вважається, що джерелом D-димеру є деградація фібрину фібринолітичною системою, результати ряду досліджень свідчать, що олігомери фібрину desA у комплексі з фібриногеном, які утворюють розчинний фібрин, не здатні ефективно стимулювати активацію зв'язаного з ними Glu-плазміногену t-PA-залежним шляхом [80]. Структури, здатні активувати Glu-плазміноген, формуються на наступному етапі полімеризації, а саме - латеральної асоціації протофібрил, коли формується фібрилярна структура згустку [35]. У цьому випадку Glu-плазміноген і t-PA локалізуються на поверхні фібрил з утворенням активаторного комплексу Glu-Pg-фібрин-t-PA, а лізис згустку розпочинається з поверхні згустку [81].

Утворення фібринових мікрозгустків з розчинного фібрину є малоймовірним у великих судинах через високу швидкість кровотоку та ефективне перемішування крові. Натомість у судинах мікроциркуляторного русла, де швидкість потоку зменшується до кількох міліметрів за секунду, а співвідношення площі поверхні ендотелію до об'єму крові зростає на порядки, створюються умови для взаємодії олігомерів розчинного фібрину між собою та з поверхнею ендотелію. Загальна площа ендотеліального шару судин становить 4000–7000 м², а кількість клітин сягає $\sim 10^{13}$ [82].

Показано, що в В β N-домени фібрину desA наявна ділянка зв'язування з гепарином, яка може опосередковувати взаємодію розчинного фібрину з глікокаліксом ендотелію [83-85]. Водночас понад 90 % активності t-PA синтезується в артеріолах і венулах, тоді як лише близько 3 % – у капілярах [86]. Однак у капілярному руслі концентрація t-PA у просвіті судини може бути вищою за рахунок геометричних особливостей мікросудин. Сукупність

цих факторів сприяє формуванню активаторних комплексів на поверхні фібринових мікрозгустків, активації Glu-плазміногену до плазміну та подальшому руйнуванню згустку з утворенням кінцевих продуктів деградації – DDE-триад, які згодом перетворюються на DD-димери та E3-фрагменти після відщеплення B β N-доменів у системі кровообігу [59, 83, 87].

1.4. Фібриновий згусток як регулятор балансу зсідання і розчинення фібринового згустку в плазмі крові.

Концепція рівноваги в системі гемостазу ґрунтується на припущенні, що полімерний фібрин, сформований внаслідок активації системи зсідання, має бути узгодженим з кількістю фібрину, елімінованого фібринолітичною системою. Початкові стадії деградації полімерного фібрину desAB як у непрошитому, так і в поперечно прошитому фактором XIIIa згустку реалізуються за подібними молекулярними механізмами [68, 80].

Фібрин у фібринолізі виконує подвійну роль – слугує як кофактором, так і субстратом для фібринолітичного ферменту плазміну, що зумовлює залежність чутливості згустку до лізису від його ультраструктури. Тонкі фібринові волокна забезпечують повільнішу tPA-опосередковану генерацію плазміну, тому згустки з щільно упакованою тонковолокнистою сіткою є більш резистентними до фібринолізу. Виявлено на перший погляд парадоксальний характер цього взаємозв'язку між товщиною фібринових волокон і сприйнятливістю згустків до фібринолітичного розщеплення [88, 89].

Натомість згустки, сформовані за низьких концентрацій тромбіну, характеризуються товстими волокнами і, відповідно, підвищеною сприйнятливістю до лізису. Ці дані свідчать про те, що хоча генерація

плазміну відбувається на окремих волокнах, рух через тривимірну мережу фібрину обмежує швидкість активності плазміну.

У поперечно прошитому FXIIIa фібриновому згустку плазмін, що утворюється *in situ* з Glu-плазміногену, після відщеплення α C-регіонів здійснює протеоліз α -, β - та γ -ланцюгів фібрину в шарнірних ділянках ($A\alpha 91-103$, $B\beta 125-135$, $\gamma 69-77$), що призводить до формування великих фрагментів полімерного фібрину та кінцевих продуктів деградації – DDE-тріад [14]. Ці спостереження свідчать про те, що B-b сайти полімеризації взаємодіють у межах однієї протофібрили, як було раніше запропоновано Дуліттлом [90], унаслідок чого пептидні зв'язки K42–A43 β B-ланцюга в поперечно прошитому полімерному фібрині є малодоступними для дії плазміну. Безпосереднім попередником D-димеру в структурі прошитого фібрину є DDE-тріада [63]. Подальший протеоліз із відщепленням поліпептидних фрагментів 1(15)–42 та $B\beta$ N-доменів E-регіонів у складі DDE-тріад зумовлює їх розпад з утворенням кінцевих продуктів – D-димерів та E3-фрагментів. Сукупність цих даних вказує на відсутність прямої кореляції між концентраціями розчинного фібрину та D-димеру, при цьому обов'язковою проміжною стадією є формування фібринових мікрозгустків.

Структурна організація олігомерів у складі розчинного фібрину істотно відрізняється від структури протофібрил полімерного фібрину. Це зумовлено значним надлишком концентрації фібриногену порівняно з desA-фібрином, відсутністю активованих B- та b-сайтів полімеризації, а також формуванням комплексів між α C-регіонами та $B\beta$ N-доменами в молекулі desA-фібрину [59, 91]. За цих умов конформація desA-фібрину в олігомерному комплексі є близькою до структури фібриногену, що зумовлює подібну послідовність їх протеолітичного руйнування *in vitro*. Спочатку Glu-плазмін відщеплює α C-регіони, після чого – фрагменти 1–42 $B\beta$ N-доменів E-регіонів, причому гідроліз обох субстратів відбувається з порівнянною швидкістю. Надалі плазмін послідовно розщеплює α -, β - та γ -ланцюги в шарнірній зоні

суперспіральної ділянки, що завершується утворенням кінцевих продуктів – D-, DD- та E3-фрагментів полімерного фібрину.

Оскільки FXIIIa не здатний забезпечити повне зшивання D-регіонів у розчинному фібрині через наявність γ' -ланцюгів приблизно у 8 % молекул фібриногену, очікувана концентрація D-димеру, що утворюється, потенційно є нижчою за концентрацію розчинного фібрину. Це може пояснювати відносно менший рівень D-димеру порівняно з початковою концентрацією розчинного фібрину в плазмі крові.

Ранні порушення балансу між утворенням і розчиненням фібринового згустку є характерною ознакою тяжкої травми, зокрема опікової, та мають істотне прогностичне значення. У більшості досліджень продемонстровано ранню активацію фібринолізу, яка розглядається як один із ключових чинників летальності у травмованих пацієнтів. Основним механізмом цього явища вважають масивне вивільнення тканинного активатора плазміногену (tPA) з ушкоджених ендотеліальних клітин, що призводить до посиленої деградації фібрину та активації фібриногенезу.

Важливим лабораторним маркером цього процесу є D-димер, підвищення рівня якого відображає інтенсивність утворення та розпаду фібринового згустку. Показано, що у пацієнтів з опіковими травмами рівень D-димеру зростає вже при надходженні до стаціонару та асоціюється з тяжкістю ураження. Раннє підвищення D-димеру корелює з розвитком несприятливих клінічних наслідків, зокрема кровотеч, дисемінованого внутрішньосудинного зсідання та летального результату [92].

Важливо, що концентрації E3-фрагменту та DD-димеру мають корелювати між собою; за таких умов E3-фрагмент може розглядатися як додатковий маркер стану системи гемостазу поряд із D-димером. Співвідношення концентрацій DD/E3 відображає інтенсивність утворення та деградації як прошитих, так і непрошитих FXIIIa фібринових згустків у плазмі крові та може слугувати показником стабільності фібринового згустку.

Показано також, що важливим і незалежним чинником, який визначає концентрації розчинного фібрину та D-димеру в плазмі, є їх елімінація з кровотоку. Цей процес включає транспорт через ендотеліальний бар'єр у міжклітинний простір, поглинання клітинами крові та інтерналізацію за участю рецепторів MAC-1 і LDL-рецепторів клітин ретикулоендотеліальної системи.

Встановлено, що період напіввиведення desA-фібрину, desAB-фібрину, фібриногену та D-димеру становить відповідно 2, 8, 8 і 9 годин. Водночас молекулярні механізми та відносний внесок кожного з цих шляхів у кліренс фібриногену, розчинного фібрину, D-димеру та продуктів деградації фібриногену (X-, Y-, D- та E-фрагментів) залишаються недостатньо з'ясованими [93-97].

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Реактиви та матеріали

В роботі були використані такі реагенти: NaCl, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, NaOH, HCl, CaCl₂, трис [тригідроксиметиламіноетан] Sigma-Aldrich, St. Louis, США), HEPES [2-[4-[2-гідроксиетил]піперазин-1-іл]етансульфонова кислота, TEMED, ДСН, Кумассі G-250, оцтова кислота, маркерні протеїни («Fermentas», США), Твін-20 («Serva», Німеччина. Gly-Pro-Arg-Pro пептид, гепарин, гепарин – Сефароза, Супердекс 200, PD-10 колонки, центрифужні концентратори 10, 30, 50 кДа, тромбін (Sigma-Aldrich, St. Louis, США), S2238 (Chromogenix), S2251 тромбіновий і плазміновий субстрати (Chromogenix), АЧТЧ – реагент (Sigma-Aldrich, St. Louis, США), Thromborel (Siemens, Germany) уранілацетат («Agar Scientific», Великобританія), мідні сіточки з формвар-карбоновим покриттям 200 mesh («Polysciences», США), 96-коміркові планшети («Greiner Microlon», США), Пептидний субстрат Gly-Pro-Arg-Pro (GPRP) Sigma-Aldrich (St. Louis, США), ліофілізована плазма крові донорів (Siemens, Erlangen, Germany).

Тромбіноподібний фермент очищали з отрути *Agkistrodon halys halys* методом афінної хроматографії з використанням Blue-Sepharose (Sigma-Aldrich, St. Louis, США) [93]. Фібриноген виділяли з плазми крові людини, стабілізованої додаванням цитрату натрію, відповідно до методу [94].

Контрольна донорська плазма крові та плазма крові пацієнтів з опіковою травмою була надана Національною медичною академією післядипломної освіти імені П. Л. Шупика Міністерства охорони здоров'я України (м. Київ). Усі дослідження проводили відповідно до принципів Гельсінської декларації. Дослідження були схвалені Комісією з питань етики Національної медичної академії післядипломної освіти імені П. Л. Шупика Міністерства охорони здоров'я України (протокол № 8 від 11.05.2018).

2.2. Методи

2.2.1. Отримання плазми з крові донорів

Забір крові здійснювали натще з вени із використанням катетера типу «метелик» калібру G23, під'єданого до шприца, що містив 3.8 % розчин цитрату натрію (у співвідношенні 1 частина цитрату натрію до 9 частин крові). Після відбору крові вміст шприца обережно перемішували. Надалі, після від'єднання катетера, цитратну кров повільно переносили до поліетиленової пробірки з метою подальшого проведення центрифугування. Відокремлення плазми від формених елементів здійснювали шляхом центрифугування крові при 1500 g упродовж 30 хвилин. Отриману плазму (супернатант) розподіляли на аліквоти та зберігали за $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.2.2. Дефібринована плазма донорів

Дефібриновану плазму отримували *ex tempore* шляхом додавання тромбіноподібного ферменту, виділеного з отрути *Agkistrodon halys halys*. Після 30-хвилинної інкубації плазми з цим ферментом у концентрації 0,02 мг/мл при температурі $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ відбувався селективне відщеплення А α -ланцюгів фібриногену, тоді як В β - та γ -ланцюги залишалися інтактними [93].

2.2.3. Отримання фібриногену

Фібриноген людини одержували з плазми крові методом багатоетапного фракційного висолювання сульфатом натрію (Na_2SO_4) відповідно до описаної методики [94]. До безпротромбінової плазми крові, одержаної додаванням BaSO_4 , додавали 1 М гліциновий буфер (pH 9.5), що містив 0.1 М NaCl, у

співвідношенні 1:9 за умов безперервного перемішування. За цих умов до плазми крові поступово, по краплях, додавали 16% розчин Na_2SO_4 (520–680 мл на 1 л плазми) до утворення дрібнодисперсного осаду, який відокремлювали центрифугуванням при 1400 g протягом 15 хв.

Отриманий супернатант піддавали подальшому осадженню фібриногену шляхом поетапного додавання 16% розчину Na_2SO_4 до досягнення його кінцевої концентрації 8,5%, після чого проводили центрифугування при 1200 g упродовж 15 хв. Осад, що утворився, розчиняли у 0,2 М розчині NaCl та повторно піддавали фракційному висолюванню додаванням рівного об'єму 16% Na_2SO_4 з подальшим центрифугуванням при 1200 g протягом 20 хв. Після цього осад повторно розчиняли у 0,2 М NaCl .

До одержаного розчину додавали 1/5 об'єму 0.5 М калій-фосфатного буфера (pH 6.5), після чого фібриноген знову осаджували додаванням рівного об'єму 16% Na_2SO_4 та відокремлювали центрифугуванням при 1200 g упродовж 20 хв. Осад розчиняли у 0.15 М NaCl , після чого концентрацію фібриногену доводили до 1% та інкубували розчин при 4 °C протягом 16 год для видалення кріофібриногену. Після холодової інкубації розчин центрифугували при 1400 g протягом 15 хв при 4° C; кріофібриноген при цьому залишався в осаді. До супернатанту додавали рівний об'єм 16% Na_2SO_4 і повторно центрифугували при 1200 g протягом 15 хв. Отриманий осад розчиняли у 0,15 М NaCl до досягнення концентрації фібриногену 25–30 мг/мл. Одержаний препарат фібриногену зберігали при температурі –20 °C до подальшого використання.

2.2.4. Визначення концентрації фібриногену спектрофотометричним методом

Концентрацію фібриногену визначали спектрофотометричним методом за оптичною густиною при довжині хвилі 280 та 320 нм. Вимірювання проводили у кварцових кюветах з довжиною оптичного шляху 1 см. Зразки фібриногену попередньо розбавляли до 0,2-0,4 одиниць оптичної густини. Розрахунок концентрації здійснювали з використанням коефіцієнта молярного поглинання для фібриногену людини ($\epsilon = 1,506$ для 1 мг/мл розчину), з поправкою на фонове поглинання відповідного буфера. Концентрацію фібриногену розраховували за формулою 2.1 виражаючи результат у мг/мл плазми крові (N – число розбавлень).

$$C_{Fg} = (E_{280} - E_{320}) * N / 1,506 \quad (2.1)$$

2.2.5. Полімеризація фібриногену

Здатність фібриногену полімеризуватися оцінювали турбідиметричним методом за зміною мутності середовища при 405 нм із використанням спектрофотометра СФ2000. Реакції проводили у 0,02 М HEPES буфері з 0,15 N NaCl, pH 7,4, що містив 0,1 – 0,5 мг/мл фібриногену, 25 мМ CaCl₂ та 0,1 NIH/мл тромбіну у загальному об'ємі 400 мкл. Кінетику полімеризації аналізували шляхом розрахунку часу затримки (lag time), максимальної швидкості росту мутності (V_{max}) та кінцевої мутності на основі турбідиметричних кривих.

2.2.6. Визначення концентрації фібриногену в плазмі крові

Концентрацію фібриногену (Fg) у плазмі крові визначали методом, розробленим у відділі структури і функції білка Інституту біохімії НАН України. У пробірку, що містила 800 мкл 0,02 М фосфатного буфера, який містив 0,15 М NaCl, (pH 7,4), послідовно додавали 100 мкл плазми крові та 100 мкл анцистрону з активністю 1 NIH/мл. Суміш ретельно перемішували та інкубували при 37 °С протягом 30 хв. Після інкубації сформований фібриновий згусток вимотували на скляну паличку та тричі промивали 0,15 М розчином NaCl. Залишки розчину ретельно видаляли, після чого згусток розчиняли у 2 мл 1.5% розчину оцтової кислоти. Оптичну густину розчину визначали при довжинах хвиль 280 та 320 нм відносно 1,5% оцтової кислоти, яку використовували як контроль.

Концентрацію фібриногену розраховували за формулою 2.2:

$$C_{Fg} \text{ (мг/мл)} = (A_{280} - A_{320}) \times 25 / 1,5 \text{ (2.2)}$$

де:

A_{280} – оптична густина при 280 нм;

A_{320} – оптична густина при 320 нм;

1,5 – питомий коефіцієнт поглинання фібриногену (о.о./ (мг/мл));

25 – коефіцієнт розбавлення плазми.

2.2.7. Визначення амідолітичної активності ензимів

Амідолітичну активність ензимів визначали з використанням синтетичних субстратів [95]: для тромбіну – S2238, плазміну – S2251. Реакцію проводили в 0,02 М HEPES буфері (pH 7,4), що містив 0,15 М NaCl, 0,005% – твін-20 при кімнатній температурі.

Для проведення реакції в спектрофотометричну кювету послідовно вносили хромогенний субстрату до кінцевої концентрації 0,3 mM, ініціатор процесу зсідання плазми крові АЧТЧ-реагент (суміш елагової кислоти з фосфоліпідами) - 50 мкл, або ТФ (тканинний фактор) – 1 мкл, або тромбін 0,1 – 1 NIH у мл. Для активації фібринолітичної системи додавали t-PA до концентрації 10-75 IU/мл, потім вносили досліджуваний зразок плазми та буфер до кінцевого об'єму інкубаційного середовища 400 мкл. Реакцію зсідання ініціювали додаванням 100 мкл 0,025 М розчину CaCl_2 .

Вивільнення р-нітроаніліну реєстрували спектрофотометрично при довжині хвилі 405 нм. Для розрахунку концентрації рNA використовували коефіцієнт його молярної екстинкції $\epsilon = 1,06 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

2.2.8. Турбідиметрія

Дослідження зсідання плазми крові проводили турбідиметричним методом шляхом реєстрації зростання оптичної густини фібринового згустку при 405 або 495 нм за допомогою спектрофотометра SF-2000 [96]. Формування згустку здійснювали у пластикових кюветах, в які послідовно додавали 0,02 М HEPES-буфер, що містив 0,15 М NaCl, 0.005% Tween-20, pH 7,4, 40 або 133 мкл плазми крові, а також 50 мкл АРТТ-реагенту або 1,0 мкл тканинного фактора або 0,1-0,25 NIH од./мл тромбіну.

При визначенні впливу амідазної активності тромбіну або плазміну на формування і розчинення згустку плазми крові використовували хромогенний субстрат S2238 або S2251 у кінцевій концентрації 0,3 mM. Процес зсідання ініціювали додаванням 100 мкл CaCl_2 до кінцевої концентрації 6,2 mM і реєстрували при 495 нм. Загальний об'єм реакційної суміші становив 400 мкл.

2.2.9. Визначення величин параметрів формування і розчинення згустку з використанням турбідиметричних кривих

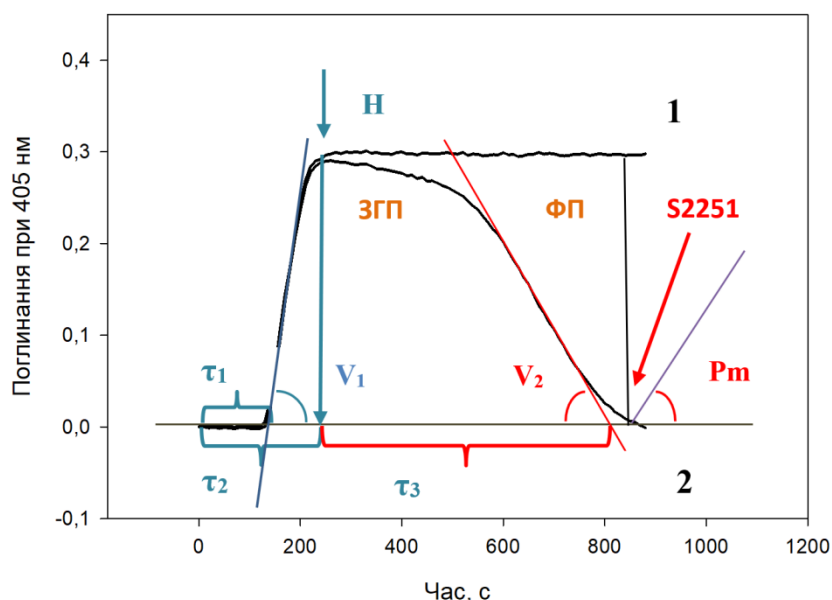


Рис. 2.1. Визначення величин параметрів формування і розчинення згустку з використанням ТДК. Турбідиметричні криві зсідання плазми крові людини, що ініційовані *in vitro* АЧГЧ-реагентом, ТФ або тромбіном у відсутності (1) і присутності (2) t-РА. Параметри турбідиметричної кривої, що характеризують формування (позначені синім кольором) і розчинення (позначені червоним кольором) фібринового згустку в плазмі крові: τ_1 – лаг-період формування протофібрил – с; V_1 – швидкість латеральної асоціації протофібрил у фібрили – $\text{tg } \alpha$, H – максимальна мутність згустку та точка рівноваги між зсіданням та розчиненням згустку; τ_2 – час формування фібринового згустку системою зсідання – с; V_2 , $\text{tg } \beta$ – максимальна швидкість гідролізу фібринового згустку; τ_3 – тривалість фази розчинення згустку; P_m – момент додавання субстрату плазміну у реакційне середовище і крива його амідазної активності в момент повного розчинення згустку.

Параметри τ_1 , τ_2 , τ_3 визначали як різницю у часі (с) на вісі X між кінцевою і початковою точкою параметру. Параметри V_1 , V_2 , P_m визначали як $\operatorname{tg}\alpha$ (кута дотичної до максимальної швидкості латеральної асоціації протофібрил), $\operatorname{tg}\beta$ (кута дотичної до максимальної швидкості розчинення згустку), P_m як $\operatorname{tg} \gamma$ (кута кривої амідазної активності P_m в момент повного розчинення згустку). ЗП – потенціал зсідання плазми крові - площа під кривою зсідання плазми у відсутності t-РА; ЗГП – загальний гемостатичний потенціал – площа під кривою формування і розчинення згустку; ФП – фібринолітичний потенціал – різниця між ЗП і ЗГП, $\text{ЗП} - \text{ЗГП} = \text{ФП}$ (рис. 2.1).

2.2.10. Метод визначення генерації тромбіну (TGA) та швидкості зсідання плазми крові, що ініціюється тканним фактором.

Активність і концентрацію тромбіну в TGA методі визначали з використанням пептидного субстрату з p-NA міткою – S2238 (H-D-Phe-Pip-Arg-pNA). В кювету послідовно додавали 0,02 М HEPES, що містив 0,15 М NaCl, 0,005% – твін-20, рН 7,4, 40 або 133 мкл плазми крові для розбавлення у 1:10 та 1:3 раз відповідно, S2238 до концентрації 0,3 мМ, 1 мкл Thromborel, що містив TF, і реакцію зсідання плазми крові ініціювали додаванням 25 мМ CaCl_2 до концентрації 6,2 нМ. Об'єм реакційного середовища 0,4 мл. Поглинання світла p-NA міткою реєстрували з використанням спектрофотометра C2000 при 405 нм. Визначали першу похідну для отриманої тромбограми, яка відповідала амідазній активності згенерованого тромбіну в кожний момент реакції (рис. 2.2).

Для перерахунку амідазної активності тромбіну в його концентрацію використовували коефіцієнт перерахунку, який отримали із калібрувальної кривої побудованої в координатах: вісь Y – амідазна активність тромбіну при

A_{405} за S2238, вісь X – концентрація тромбіну (NIH од./мл, нМ). В якості стандарту тромбіну використали Thrombin (Sigma) з питомою активністю 1000 NIH од./мг білка або 1 NIH од. на 1 мкг/мл білка (28 нМ білка). Концентрація тромбіну 1 нМ мала амідазну активність 0,0356 NIH од./мл.

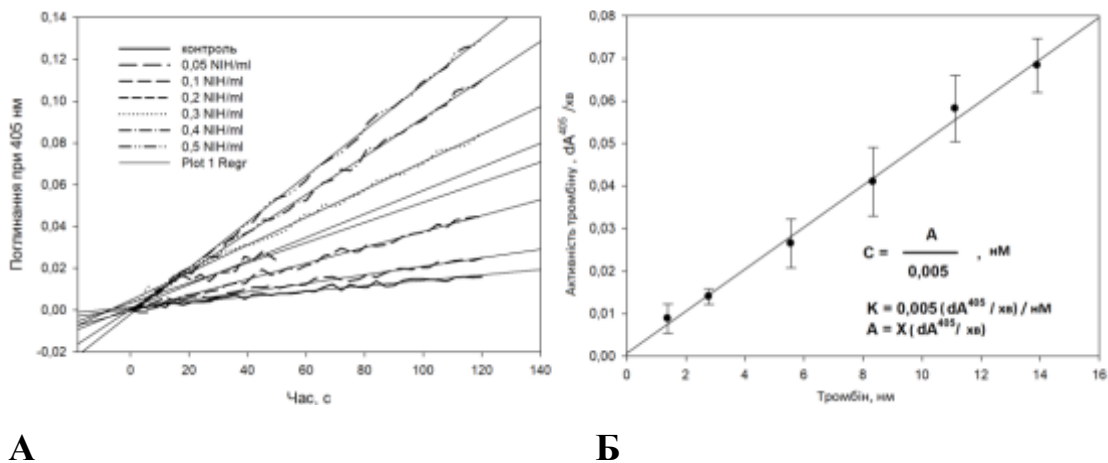


Рис. 2.2. Залежність швидкості розщеплення S2238 субстрату від концентрації тромбіну (А) і побудована калібрувальна крива залежності активності тромбіну, що виражається в ($\Delta A_{405}/\text{хв}$), від концентрації тромбіну (нМ) (Б).

На основі цих даних була розрахована величина коефіцієнту, який дає можливість визначати концентрацію тромбіну в усі моменти реакції активації протромбіну, включаючи ділянку після точки перегину.

$$K = 0,005 (\Delta A_{405}/\text{хв})/\text{нМ}, A = \Delta A_{405}/\text{хв} \quad (2.3)$$

$$C = \frac{A (\Delta A_{405}/\text{хв})}{K (d\Delta A_{405}/\text{хв})/\text{нМ}} = XX, \text{ нМ} \quad (2.4)$$

Дослідження часової взаємозалежності між формуванням згустку (ініційованим тканинним фактором (TF)) та генерацією тромбіну на стадії ініціації (рис. 2.3) показало, що амідазна активність тромбіну з'являється одночасно із завершенням формування плазмового згустку. Це свідчить про

часову послідовність між появою фібринового згустку та активністю тромбіну, що вказує на роль фібриногену/фібрину в регуляції активації протромбіну на стадії ініціації.

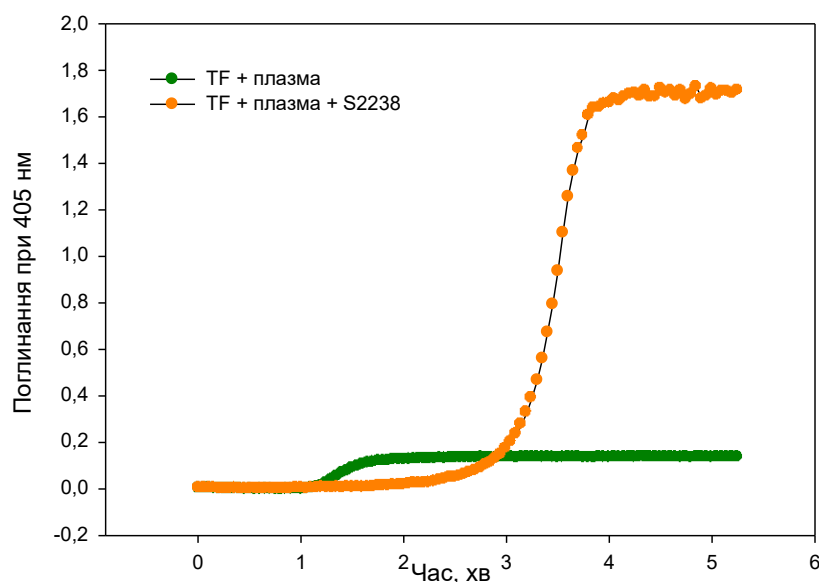


Рис. 2.3 Турбідиметрична крива зсідання плазми крові (темно-зеленого коліру) та спектрофотетична крива активації протромбіну за звільненням рNA із S2238 субстрату (оранжева крива), що ініціюються тканинним фактором.

З використанням коефіцієнту «К» була побудована крива залежності концентрації тромбіну в реакційному середовищі від часу, темно-червона крива (**рис. 2.4**). Приймаючи до уваги, що початкова концентрація протромбіну при розведенні плазми 1:10, була ~ 140 нМ, то в момент точки перегину було активовано 25 нМ (17,8 %), а на кінець спостереження – 46 нМ або 40 % наявного протромбіну.

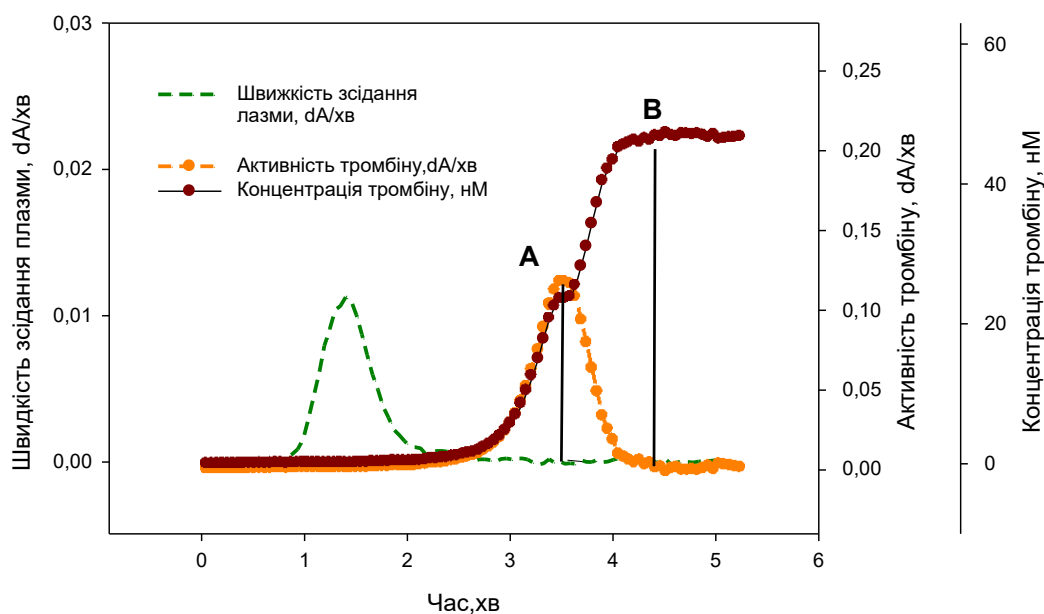


Рис. 2.4 Аналіз турбідиметричної і спектрофотометричної кривих зсідання плазми (зелений колір) і генерації тромбіну, розрахована без (темно-червоний колір) і з урахуванням (помаранчевий колір) зростання активності після точки перегину кривої.

Висхідна ділянка концентрації тромбіну після точки перегину (максимальної активності тромбіну) була розрахована з використанням рівняння

$$A = A_{\text{т.п.}} + (A_{\text{т.п.}} - A_i) \quad (2.5)$$

де:

A – концентрація тромбіну, що зростає після точки перегину,

$A_{\text{т.п.}}$ – значення концентрації тромбіну в точці перегину,

A_i – значення концентрації тромбіну, що падають до 0 після точки перегину.

Точка А на темно-червоній кривій відповідає концентрації тромбіну, що дорівнює 25 нМ, визначену за TGA методом. Точка В відповідає концентрації тромбіну 46 нМ, розраховану з використанням усієї тромбограми 1 – темно-червоний колір.

Запропонований підхід дозволяє визначити концентрацію тромбіну, що залишився в середовищі в кожний момент реакції генерації тромбіну.

$$mA = C * V = 25 \text{ nm} * 0,4 \text{ ml} = 10 \text{ nmole} = 360 \text{ ng тромбіну}$$

$$mB = C * V = 46 \text{ nm} * 0,4 \text{ ml} = 18,4 \text{ nmole} = 662 \text{ ng тромбіну}$$

2.2.11. Розрахунок діаметру та маса/довжина відношення фібрил фібринового згустку

Для аналізу фібрилярної структури фібринового згустку використовується підхід Carr–Hermans, [97] у межах якого застосовується рівняння (2.6):

$$\frac{c}{\tau \lambda^3} = \frac{N_A}{(\frac{88}{15})\pi^3 n (\frac{dn}{dc})^2 \mu} \left[1 + \frac{23}{27} \pi^2 n^2 d^2 \frac{1}{\lambda^2} \right] \quad (2.6)$$

що включає складові $C/\tau \lambda^3$ та $1/\lambda^2$. Побудова графіків у координатах $C/\tau \lambda^3$ (вісь Y) та $1/\lambda^2$ (вісь X) дає змогу визначити два параметри – перетин із віссю Y (intercept) та тангенс кута нахилу прямої до осі X (slope). Отримані значення використовують для розрахунку їх ефективного діаметра (d) (2.7) та маса-довжина відношення фібрил (μ) (2.8). Усі величини використовують в системі СГС (CGS).

Алгоритм дослідження фібрилярної структури фібринового згустку включає такі етапи:

1. Формування стабільного фібринового згустку протягом 30 хв за кімнатної температури.
2. Отримання спектральної залежності мутності від довжин хвиль в діапазоні 540–820 нм;
3. Переведення усіх даних в систему CGS;
4. Побудову залежності каламутності згустку від довжини хвилі;
5. Побудову графіка Carr–Hermans у координатах $C/\tau \lambda^3$ vs $1/\lambda^2$ з визначенням параметрів intercept та slope;

6. Розрахунок діаметра фібрил і масо-довжинного відношення фібринової сітки згустку.

Carr-Hermans:

$$d = \sqrt{\frac{77}{23}} \frac{1}{n^2 \pi^2} \frac{\text{slope}}{\text{yintercept}} \quad (2.7)$$

$$\mu = \frac{N_A}{\left(\frac{88}{15}\right) \pi^3 n \left(\frac{dn}{dc}\right) \text{yintercept}} \quad (2.9)$$

знаходження величин **d** та **μ** параметрів фібринової фібрили з використанням величин **intercept** і **slope** параметрів.

2.2.12. Імуноферментний аналіз

Визначення концентрацій D-димеру та розчинного фібрину в плазмі крові проводили імуноензимним методом (ELISA) з використанням моноклональних антитіл, отриманих у відділі молекулярної імунології Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України. Як capture-антитіла для сорбції на полістирольному мікропланшеті застосовували D-димер-специфічні моноклональні антитіла ІІІ-3b та фібрин-специфічні моноклональні антитіла І-3С відповідно. У якості tag-антитіл використовували біотинільовані моноклональні антитіла ІІ-4d, епітоп яких локалізований у D-доміні фібриногену. Антитіла І-3С розводили у 0,02 М HEPES-буфері, рН 7,4, що містив 0,3 М NaCl, до концентрації 0,01 мг/мл і вносили в лунки мікропланшету. Інкубацію проводили протягом 16 год при +4 °С. Після цього лунки тричі промивали 0,01 М калій-фосфатним буфером, рН 7,4, з додаванням 0,14 М NaCl, 0,05 % Tween-20 та 0,02 % TPS для видалення незв'язаного білка. Блокування неспецифічних сайтів зв'язування здійснювали шляхом інкубації лунок з 3.5 % розчином знежиреного молока в TPS протягом 1 год при 37 °С, після чого проводили триразове промивання TPS. До кожної лунки вносили по 0.1 мл плазми крові, розведеної у 10 разів,

та інкубували протягом 1 год при 37 °C. Далі лунки знову тричі промивали TPS. Для детекції в лунки вносили по 0.1 мл біотинільованих моноклональних антитіл II-4d у концентрації 2 мкг/мл та інкубували протягом 1 год. Після триразового промивання TBS додавали кон'югат стрептавідин–пероксидаза хрому (HRP), розведений у 5000 разів у TPS, і інкубували ще 1 год. Після завершення інкубації лунки тричі промивали TBS та додавали по 100 мкл субстратного розчину, що містив 0,05 М калій-фосфатний буфер (pH 6,0), 0,03 % перекису водню та 0,04 % о-фенілендіаміну. Реакцію проводили протягом 30 хв до появи забарвлення та зупиняли додаванням 50 мкл 2 N H₂SO₄. Оптичну густину в лунках мікропланшету вимірювали при довжині хвилі 492 нм з використанням мікропланшетного рідера Thermo Multiskan EX (Німеччина).

2.2.13. Електрофоретичне розділення протеїнів у ПААГ

Електрофоретичне розділення протеїнів здійснювали за методом Леммлі [101]. Із застосуванням трис–гліцинової буферної системи. Розподільні гелі з різним вмістом акриламід у готували з використанням гелевого буфера (на 250 мл: 22,71 г Tris, 0,5 г ДСН, 1 мл TEMED, pH 8,8). Концентруючий гель (4%) готували з гелевого буфера (на 100 мл: 3,029 г Tris, 0,2 г ДСН, 0,4 мл TEMED, pH 6,8) з додаванням 1,4 мл дистильованої води, 0,4 мл 40% акриламід та 0,2 мл 1,5% персульфату амонію.

Електродний буфер містив 6 г/л Tris, 28,8 г/л гліцину та 1 г/л ДСН. Електрофорез проводили за сили струму 19 мА для концентруючого гелю та 35 мА для розподільного гелю. Підготовку зразків до електрофорезу здійснювали шляхом додавання до протеїнового розчину з концентрацією 1 мг/мл буфера для зразків, що містив 2% SDS, 5% сахарози або гліцерину та бромфеноловий синій як індикатор фронту міграції. Зразки прогрівали до

кипіння; для відновлення дисульфідних зв'язків перед нагріванням проводили обробку 5% β -меркаптоетанолом упродовж 10 хв.

Електрофоретичне розділення виконували при силі струму 19 мА для концентруючого гелю та 36 мА для роздільного гелю. Після завершення електрофорезу гелі фарбували у розчині, що містив 0,125% Кумасі Brilliant Blue G-250 у 25% ізопропанолі та 10% оцтовій кислоті, протягом 10 хв. Знебарвлення гелів проводили у 2–8% розчині оцтової кислоти до повного видалення фону.

Чутливість методу становила близько 1 мкг протеїну. Для визначення молекулярної маси протеїнів використовували стандартні маркери з відомими молекулярними масами (Fermentas, Європейський Союз): набір № SM0671 (170, 130, 100, 72, 55, 40, 33, 24, 17 кДа) та набір № SM0431 (116, 66,2, 45, 35, 25, 18,4, 14,4 кДа).

2.2.14. Електронна мікроскопія

Попередньо сформовані згустки полімерного фібрину аналізували методом трансмісійної електронної мікроскопії (ТЕМ) негативно контрастованих препаратів із застосуванням окремих модифікацій методики. Підготовку зразків для електронно-мікроскопічного дослідження проводили аналогічно процедурі, використаній у турбідиметричному аналізі полімеризаційних властивостей фібрину. Для негативного контрастування застосовували 1% водний розчин уранілацетату.

Сітки для електронної мікроскопії попередньо покривали плівкою формвару в дихлоретані та зміцнювали шаром напиленого вуглецю з використанням вакуумного випарювача HUS-5GB. У процесі реакції полімеризації зразки відбирали через 30 та 300 с, після чого аліквоти доводили до концентрації білка 7 мкг/мл. Отриманий розчин об'ємом 10 мкл наносили

на вуглецево-покриті сітки та через 2 хв обробляли 1% розчином ураніацетату.

Після інкубації сітки дворазово промивали: спочатку 100 мМ амоній-ацетатним буфером (рН 7,9), а потім 10 мМ амоній-ацетатним буфером (рН 8,5). Надлишок рідини видаляли фільтрувальним папером. Для додаткового контрастування на поверхню тефлонового блоку наносили краплину контрастувального розчину, на яку накладали сітку; через 1 хв контрастер видаляли за допомогою водноструменевого насоса.

Електронно-мікроскопічні зображення отримували при збільшеннях 20 000–50 000× із використанням електронного мікроскопа Н-600 (Hitachi, Японія) за прискорювальної напруги 75 кВ [57].

2.2.15. Статистичний аналіз

Математичну обробку та аналіз отриманих експериментальних даних виконували за допомогою пакету програм Excel 2019. Визначали середнє значення величин параметрів і їх стандартне відхилення.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

РОЗДІЛ 3.1 Визначення активності тромбіну і плазміну в плазмі крові людини з застосуванням турбідиметричної кривої формування і розчинення згустку

Тромбін і плазмін є ензимами кінцевого етапу активації системи зсідання та фібринолізу плазми крові людини, відповідно. Їх концентрації вказують на ступінь функціональної готовності кожної із систем реагувати на порушення в системі гемостазу. Співвідношення швидкості утворення та розчинення згустку плазми *in vitro* характеризує ступінь рівноваги між системами зсідання і фібринолізу. Тромбін, окрім основної функції – трансформації фібриногену у фібрин, активує тромбоцити, розщеплюючи їх PAR-рецептори, прискорює внутрішній шлях каскаду зсідання, активуючи FXI, FV і FVIII, активує ендотеліоцити, систему протеїна C, TAFI, впливає на проникність гемато-енцефалічного бар'єру [98].

Багатофункціональність тромбіну спонукала розробку численних методів визначення його концентрації в плазмі крові з використанням переважно амідазної активності ензиму по відношенню до пептидних субстратів з рНА та флюоресцентними мітками [99, 100, 102, 103].

Однак було показано, що крива амідазної активності тромбіну не співпадає з такою зростання мутності, яка відображає формування структури фібринового згустку в процесі зсідання плазми. Амідазна активність тромбіну в лаг-період відсутня, оскільки пептидний субстрат конкурує з фібриногеном за активний центр тромбіну. З іншого боку пептид, який вивільняється тромбіном в μM концентраціях може інгібувати формування протофібрил і їхню латеральну асоціацію, ймовірно, блокуючи взаємодію А-а сайтів полімеризації фібрину desA. Тромбін завдяки багатосайтовій взаємодії з фібриногеном після відщеплення фібринопептидів А залишається зв'язаним з

фібриновим субстратом – мономерами, олігомерами і протофібрилами фібрину, при цьому зберігаючи активність до фібриногену [104].

Тому метод визначення швидкості утворення і концентрації тромбіну за його амідазною активністю не відображає активності і концентрації тромбіну, утвореного на початковій стадії зсідання плазми крові, в якій формуються протофібрили і активність тромбіну направлена тільки на утворення фібрину і протофібрил фібрину. В лаг-періоді тромбін проявляє максимальну активність по відношенню до головного субстрату – фібриногену, при цьому швидкість формування протофібрил залежить від концентрації тромбіну [104].

Тому одним із завдань нашого дослідження було розробити спосіб визначення коагуляційної компоненти активності тромбіну, що утворюється протягом лаг-періоду (τ), використовуючи турбідиметричну криву формування і розчинення згустку плазми крові. В той же час аналіз фази розщеплення згустку плазми крові фібринолітичною системою дав можливість визначати концентрації утвореного плазміну за його амідазною активністю в момент повного розчинення структури згустка.

Таким чином, методи визначення концентрації тромбіну і плазміну дозволять на рівні активності ензимів характеризувати стан системи гемостазу людини в нормі та за різних патологій [104, 105].

Розділ 3.1.1 Визначення активності тромбіну в плазмі крові людини.

Для визначення концентрації тромбіну та плазміну було використано турбідиметричні криві формування та розчинення згустку плазми крові, зареєстровані при 405 нм з використанням спектрофотометра. Визначення швидкості утворення і активності тромбіну проводили на основі параметру τ , а плазміну – вимірюючи безпосередньо в кюветі його амідазну активність в момент повного розчинення згустку.

Параметр τ характеризує час утворення протофібрил і виражається в секундах [76]. Стадія формування протофібрил в процесі формування згустку плазми, що ініціюється АЧТЧ реагентом, є однією з найскладніших, оскільки послідовно охоплює активацію внутрішнього шляху системи зсідання, активацію протромбіну з утворенням тромбіну, відщеплення від фібриногену тромбіном фібринопептидів А з утворенням фібрину desA, активацію тромбіном FXIII, самоскладання молекул фібрину desA з формуванням двонитчастих протофібрил з частковою прошивкою FXIIIa по γ - γ ланцюгам сусідніх DD модулів і початок відщеплення від протофібрил фібринопептидів В [94]. Ензиматичні перетворення, що відбуваються на стадії формування протофібрил, охоплюють майже всю систему зсідання.

Слід зазначити, що на величину τ впливають також такі фактори, як: зміна концентрації фібриногену $\downarrow$, іонів $\text{Ca}^{2+}\uparrow$, $\text{Cl}^-\downarrow$, $\text{Na}^+\uparrow$, а також протеїнів, що включаються в згусток FXIIIa ($\alpha 2$ -AP, фібрoneктин, PAI-1) [14, 64]. Подальша доля фібрину desA визначається величиною активності тромбіну, що утворився: за низької активності тромбіну і високої концентрації фібриногену фібрин desA утворює комплекси і олігомери з фібриногеном $\text{Fg}-(\text{desA})_n\text{-Fg}$, які є розчинним фібрином і маркером активованого стану системи зсідання [61, 64]. За високої концентрації тромбіну, коли починають відщеплюватися фібринопептиди В і олігомери фібрину досягають довжини у 8 пар мономерів фібрину desA, починається наступний етап полімеризації фібрину – процес латеральної асоціації протофібрил у фібрили і формування тривимірної структури згустку [14, 94, 96].

Параметр τ є інтегральним показником здатності системи гемостазу плазми крові активувати протромбін у тромбін, трансформувати фібриноген у фібрин і формувати протофібрили, придатні до наступного етапу – формування фібрилярної сітки тромбу. Важливим позитивним аспектом цього підходу є те, що на відміну від визначення загальної активності тромбіну, як ензиму, при використанні пептидного субстрату з амідазною чи

флюоресцентною міткою, ми визначаємо специфічну коагуляційну компоненту активності тромбіну, направлену тільки на перетворення фібриногену у фібрин.

Слід зазначити, що активність утвореного тромбіну визначається швидкістю формування протофібрил, яка в свою чергу прямо пов'язана зі структурою згустку, що формується [106, 107].

В підході, що пропонується, є перевага над визначенням активності тромбіну з використанням пептидного субстрату, міченого флюорофором. Амідазна активність тромбіну, хоча і дозволяє відслідковувати активність і концентрацію тромбіну на всьому шляху його утворення і існування в плазмі крові, не може бути безпосередньо пов'язана зі стадіями формування фібринового згустку чи з іншими функціями тромбіну в плазмі крові.

Для побудови калібрувальної кривої був використаний тромбін з питомою активністю у 1000 NIH на 1 мг білка. Реакцію зсідання плазми крові проводили в 0,02 M HEPES буфері, pH 7.4, що містив 0,15 M NaCl та 0,005% твін-20, розбавлену в 10 разів плазму, 6,2 mM CaCl₂, і ініціювали додаванням тромбіну до вказаної концентрації. На **рис. 3.1** наведено типовий результат експерименту, на якому представлено серію турбідиметричних кривих, які використали для визначення величин τ .

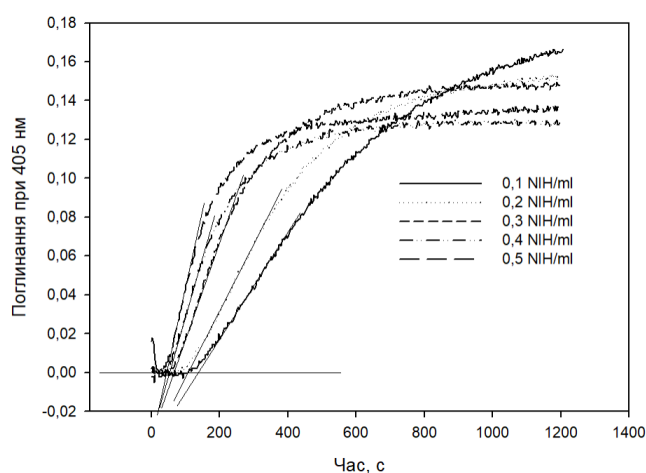


Рис. 3.1 Турбідиметричні криві, одержані шляхом активації зсідання плазми донорської крові серією концентрацій стандартного тромбіну від 0,1 до 0,5 NIH одиниць в 1 мл реакційного середовища, (n=4).

Одержані величини τ були використані для побудови калібрувальної кривої в координатах $1/\tau$ (V) – [Thr] (швидкість формування протофібрил в с^{-1} vs концентрації тромбіну, яка виражена в одиницях активності тромбіну – NIH – в 1 мл реакційного середовища), **рис. 3.2**.

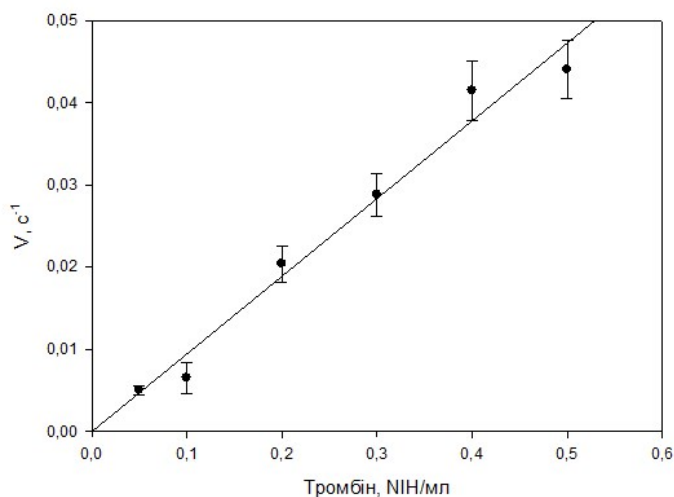


Рис. 3.2 Калібрувальна крива, побудована на основі параметра τ_1 ($V = 1/\tau_1$) ТДК формування і розчинення згустку плазми крові здорових донорів, для визначення концентрації тромбіну в плазмі крові людини, (n=4).

Питома активність тромбіну, який був використаний для побудови калібрувальної кривої, становила 1000 NIH на 1 мг білка, що відповідало активності 1 NIH на 1 μ г білка тромбіну або 1 NIH в 1 мл реакційного середовища, яка відповідала концентрації тромбіну 28 нМ. Так, в **таб. 3.1** наведені величини $\tau_1 = 92,4 \pm 5,83 \text{ с}^{-1}$, що відповідає швидкості формування протофібрил $0,0108 \text{ с}^{-1}$ і концентрації тромбіну $0,114 \pm 0,0071 \text{ NIH}$ в 1 мл, відповідало їх молярним концентраціям 6,34 нМ. Концентрація протромбіну в середовищі в наших умовах становить $\sim 0,140 \text{ }\mu\text{M}$ приймаючи концентрацію протромбіну в плазмі крові 100 мкг/мл. Концентрація утвореного тромбіну складає $(6,34 \text{ нМ}/140 \text{ нМ}) \cdot 100\% = 4,5\%$ від наявного протромбіну. Оскільки на завершальному етапі формування протофібрил майже весь фібриноген перетворюється на фібрин, то для цього достатньо активувати 4,5% від загальної концентрації протромбіну. При цьому швидкість активації протромбіну становить 0,69 нм/с.

Таблиця 3.1

Величини параметрів турбідиметричних кривих формування і розчинення згустків плазми крові, ініційованих АЧТЧ реагентом, за відсутності (А) і в присутності (В) t-РА (n=4).

А

$\tau_1, \text{с}$	$V_1, \text{о.о./с}$	$H, \text{о.о.}$	$\tau_2, \text{с}$	СР, о.о.*с
$90,4 \pm 9,25$	$0,0041 \pm 0,00019$	$0,096 \pm 0,0091$	$161 \pm 18,6$	$25,0 \pm 2,69$

В

$\tau_1, \text{с}$	$V_1, \text{о.о./с}$	$H, \text{о.о.}$	$\tau_2, \text{с}$	$\tau_3, \text{с}$	$\tau_3, \text{с}$	$\tau_3, \text{с}$	$V_2, \text{о.о./с}$	Рm, $\mu\text{г/мл}$	ЗГП, о.о.*с	ЗП, о.о.*с	ФП, о.о.*с
$92,4 \pm 5,83$	$0,0052 \pm 0,0018$	$0,089 \pm 0,0010$	$181 \pm 12,9$	$731 \pm 19,9$	$549 \pm 44,4$	198 ± 37	$- 0,00032 \pm 0,000072$	$1,25 \pm 0,086$	$17,5 \pm 2,22$	$25,0 \pm 2,69$	$7,82 \pm 1,77$

Таким чином, використання параметру τ турбідиметричної кривої формування і розчинення згустку дозволяє визначати концентрацію протромбіну, що активується у тромбін, і середню швидкість активації протромбіну в плазмі крові, зсідання якої ініціює АЧТЧ реагент.

Розділ 3.1.2 Визначення активності плазміну в плазмі крові людини.

Визначення концентрації плазміну, що утворюється в плазмі крові, зсідання якої ініціюється АЧТЧ реагентом, планували провести з використанням параметру L (час напівжиття згустку), який відображає час напівруйнування згустку і величина якого лінійно залежить від концентрації плазміну у системі із очищених протеїнів плазми крові, що було успішно використано для дослідження процесу активації Glu- та Lys-плазміногену у фібриновому згустку, що формується [108]. Однак, отримана в плазмі крові для плазміну калібрувальна крива мала дуже низький нахил і не могла бути використана для оцінки активності плазміну, що утворюється в процесі активації системи фібринолізу [109, 110].

Тому для визначення швидкості активації плазміногену і активності (концентрації) плазміну, що утворюється в плазмі крові за час формування згустку та повного його розчинення фібринолітичною системою, було вибрано більш простий підхід, **рис. 3.3**.

Активність утвореного плазміну визначали в момент, коли тривимірну структуру згустку було повністю зруйновано, і оптична густина досягла нульового значення. В цей момент в кювету вносили субстрат S2251 до концентрації 0,3 мМ і реєстрували поглинання при 405 нм протягом ~ 2 хвилин.

Лінійна залежність зростання оптичної густини середовища від часу вказує на закінчення процесу активації плазміногену, що пов'язано з

руйнуванням фібрилярної структури згустку і втратою стимулюючих активацію плазміногена структур [35, 77], а також відсутністю процесу інгібування плазміну [108, 109]. Подальший розрахунок активності плазміну, що утворився за час існування згустку, проводимо, спираючись на питому амідазну активність стандартного плазміну.

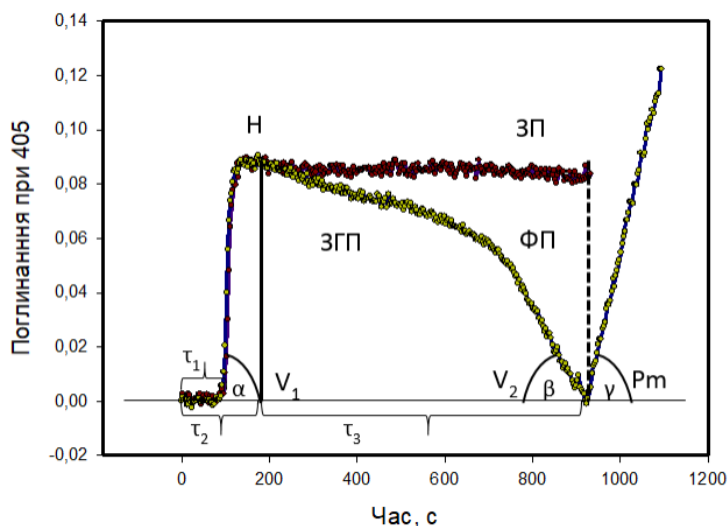


Рис. 3.3. Визначення активності тромбіну і плазміну, що утворюються в процесі формування і розчинення фібринового згустку в плазмі крові за присутності доданого t-PA і пептидного субстрату S 2251 (H-D-Val-Leu-Lys-pNA), з використанням параметру τ та амідазної активності плазміну в момент повного розчинення згустку (V). τ_1 – лаг- період формування згустку, τ_2 – час формування згустку, τ_3 – час розчинення згустку, V_1 – швидкість латеральної асоціації протофібрил (дорівнює $\tan \alpha$), H – максимальна мутність згустку, момент введення субстрату плазміну в розчинений згусток, V_2 – максимальна швидкість розчинення згустку (дорівнює $\tan \beta$), P_m – амідазна активність утвореного плазміну (дорівнює $\tan \gamma$). ЗП, ЗГП і ФП – зсідуючий, загальний та фібринолітичний потенціал системи гемостазу плазми крові, що дорівнює площі відповідно під кривою зсідання (ЗП), формування та розчинення (ЗГП) згустку та їх різниці (ФП).

Встановлено, що амідазна (субстрат S-2251) активність такого плазміну з повністю активованими активними центрами та без залишків плазміногену становить при 405 нм 33,0 о. р-нітроаніліну, що вивільняється ензимом, на 1 мг білка стандарту плазміну за 1 хвилину. Концентрація плазміну в момент вимірювання становитиме

$$C = \frac{\Delta E_{405} \text{ о.о.}}{N_{\text{хв}} * 0,033 \text{ о.о./} \left(\frac{\mu\text{г}}{\text{мл}} * \text{хв} \right)} = \frac{\Delta E_{405}}{N * 0,033} \mu\text{г/мл} \quad (3.1)$$

Де:

$N_{\text{хв}}$ – час вимірювання активності плазміну в хвилинух;

ΔE_{405} – зростання оптичної густини в кюветі за час вимірювання при 405 нм;

0,033 о.о./($\mu\text{г/мл} * \text{хв}$) – питома амідазна активність 1 $\mu\text{г/мл}$ стандарту плазміну за 1 хв з S-2251 (Val-Leu-Lys-pNA).

У 4 незалежних експериментах на основі ТДК були знайдені такі значення τ і P_m для тромбіну і плазміну відповідно: $92,4 \pm 5,83 \text{ с}^{-1}$ і $1,25 \pm 0,086 \mu\text{г/ml}$, що відповідало їх молярним концентраціям 6,34 нМ і 14,7 нМ, **рис 3.3**. Враховуючи, що концентрація протромбіну та Glu-Pg у реакційному середовищі становила 140 та 1400 нМ відповідно, % концентрації активованого тромбіну та плазміну до такої їх проферментів становило 4,5% та 1,05 % відповідно. Співвідношення концентрації тромбіну до плазміну становило $\sim 1:2,31$. Для утворення протофібрил виявилось достатнім активувати $\sim 4,5\%$ наявного протромбіну, що близько до отриманих раніше значень [76], а для повного розчинення згустку – 1,05% концентрації Glu-Pg. Час формування згустку складав 181 с, а час розчинення фібринолітичною системою згустку – 731 с, їх відношення дорівнювало 1 до 4,04. Середня швидкість активації протромбіну в лаг періоді складала 0,069 нМ/с, а середня швидкість активації плазміногену – 0,02 нМ/с. відношення швидкості активації протромбіну до такої плазміногену становить 3,45.

Представлені на **рис. 3.3** ТДК дозволяють визначити гемостатичні потенціали плазми крові людини. Одним із важливих параметрів є відношення ЗП/ФП, яке характеризує стан рівноваги в системі гемостазу: $25 : 8.72 = 3,2$. Привертає увагу те, що відношення концентрації тромбіну до плазміну – 2,31 та відношення швидкості активації протромбіну до такої плазміногену становить – 3,45 близькі за величиною до відношення ЗП/ФП і потенційно можуть бути незалежними параметрами, що характеризують стан рівноваги системи гемостазу плазми крові людини.

Запропоновані методи кількісної оцінки балансу між системами зсідання і фібринолізу у плазмі крові в модельних системах в умовах *in vitro* можуть доповнювати існуючі методи. Розроблено методи визначення концентрації тромбіну, що ґрунтується на використанні параметру τ турбідиметричної кривої формування і розчинення згустку, та плазміну – за його амідазною активністю, визначеною в момент повного розчинення фібринового згустку. Ці методи дозволяють на рівні активності ензимів охарактеризувати стан системи гемостазу людини в нормі та за різних патологій.

Розділ 3.2. Паралогізм у методі аналізу генерації тромбіну (TGA) в плазмі крові людини

Тромбін, як центральний ензим системи зсідання, забезпечує цілісність і нормальне функціонування організму. Активність ензиму в кожний момент реакції активації системи зсідання характеризує ефективність її роботи та пов'язаних з нею процесів формування і стабілізації тромбу, систем протеїну С, калікреїн-кінінової системи та активованого тромбіном інгібітору фібринолізу (ТАFI), вплив на тромбоцити, ендотелій стінки судин. Реєстрація генерації активності тромбіну під дією ініціаторів зсідання крові – тканинного фактору і АЧТЧ-реагенту, дає важливу ранню інформацію про стан системи

гемостазу. Розроблений на цій основі метод аналізу генерації тромбіну (TGA) дає можливість визначати ендogenous зсідуючий потенціал плазми крові, його баланс з антизсідуючою активністю плазми і здатність адекватно реагувати на порушення цього балансу [103, 111]. З огляду на це діагностичне і прогностичне значення методу визначення генерації тромбіну в плазмі і крові пацієнтів має, за даного часу, надзвичайно важливе значення.

Досліджуючи зв'язок у часі між активністю тромбіну і плазміну і структурою згустку при його формуванні і розчиненні в плазмі крові людини [110], ми побачили можливість запропонувати ще один варіант розрахунку параметрів тромбограми, яку отримують при аналізі генерації тромбіну за TGA методом. У розділі представлено результати побудови тромбограми з урахуванням концентрації тромбіну, генерованої до точки перегину.

На **рис 3.4** наведено результати дослідження генерації тромбіну, що утворюється в плазмі крові донорів і пацієнтів *in vitro* (помаранчева крива) і тромбограма залежності концентрації тромбіну в реакційному середовищі від часу реакції (темно-червона крива).

При порівнянні експериментально отриманої кривої зростання р-NA сигналу, **рис 3.4**, та його перетвореної форми – тромбограми, звертає на себе увагу те, що на тромбограмі в точці перегину, відбувається перехід від зростання концентрації тромбіну до її зменшення. У той же час, після точки перегину величина р-NA сигналу продовжує зростати, що вказує на зростання сумарної активності тромбіну і, отже, концентрації тромбіну.

Очевидно, що в ході перерахунку активності генерованого тромбіну після точки перегину з використанням калібрувальної кривої у концентрацію тромбіну в реакційному середовищі (темно-червона крива), зменшення приросту активності тромбіну (приросту концентрації тромбіну) було представлено, як зменшення його концентрації в середовищі. Вочевидь, що під час розрахунку тромбограми виникла логічна помилка. Зменшення приросту концентрації тромбіну після точки перегину, **рис 3.4** було інтерпретовано як

зменшення загальної концентрації тромбіну в середовищі. Окрім цього, концентрація тромбіну, генерованого в системі до точки перегину, не враховувалася під час побудови ділянки тромбограми після точки перегину.

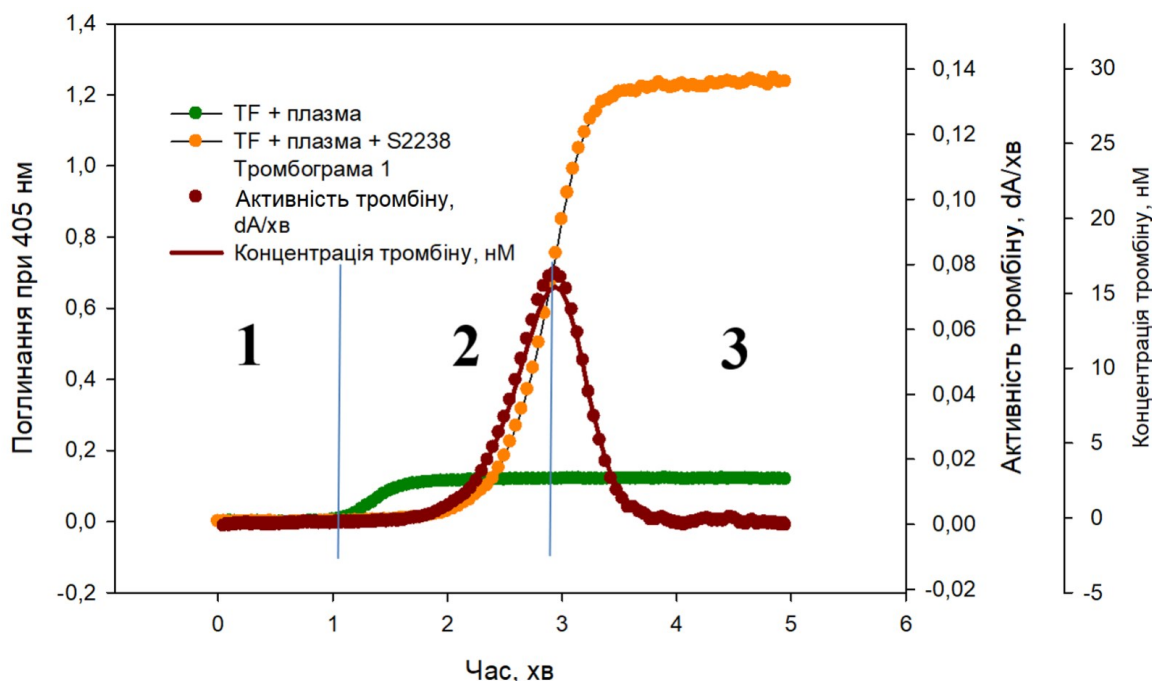


Рис 3.4. Зміна сигналу мітки в часі, що відображає генерацію тромбіну в плазмі крові, яка ініціюється тканинним фактором і CaCl_2 (1 – фаза ініціації, 2 – фаза ампліфікації та 3 – результуюча фаза). Вивільнення p-NA мітки – помаранчева крива, зсідання плазми крові – темно-зелена крива, перша похідна від вивільнення мітки – темно-червона крива.

Внаслідок цієї помилки порушується форма кривої залежності концентрації тромбіну від часу (тромбограми) як показано на **рис.3.5**, і слідує помилковий висновок про те, що концентрація тромбіну в реакційному середовищі після точки перегину зменшується в результаті дії інгібітору шляху тканинного фактора (TFPI α), активованого протеїну С (PCa), антитромбіну III (АТІІІ) і альфа-2-макроглобуліну ($\alpha 2$ -МГ), а не зростає, як показано на **рис 3.4**, **рис 3.5**. Більше того, виникає протиріччя в тому, що на тому самому часовому відрізку сумарний сигнал p-NA збільшується, а

сумарна концентрація тромбіну прагне нуля, на **рис 3.4, рис 3.5**. Тому не можна розглядати низхідну частину тромбограми 1 після точки перегину, як стадію гальмування генерації тромбіну інгібіторами, оскільки зменшується тільки приріст активності тромбіну, а сумарна активність і концентрація тромбіну продовжують збільшуватися, на **рис 3.4, рис 3.5**. Запропонована інтерпретація графіків може бути доповнена такими міркуваннями. Крива на **рис 3.4** представляє динаміку процесу звільнення тромбіном мітки з p-NA субстрату, яка залежить не тільки від концентрації тромбіну, а й від концентрації субстратів тромбіну, а саме фібриногену та p-NA субстрату, який до моменту виходу кривої на плато, ймовірно, вичерпується, як і на **рис 3.5**. Представлена на **рис 3.4** перша похідна величини зростання p-NA сигналу відповідає активності тромбіну в кожен момент реакції. Для переведення активності тромбіну в концентрацію необхідно скористатися калібрувальною кривою залежності активності тромбіну по відношенню до pNA субстрату vs концентрації тромбіну. Тому тромбограма 1 на **рис 3.4**, представляючи за формою залежність активності тромбіну від часу, не може адекватно відображати зміну концентрації тромбіну в кюветі *in vitro*. Після проходження точки перегину зростання концентрації p-NA мітки починає зменшуватися внаслідок, ймовірно, виснаження запасу субстрату, збільшення автолізу тромбіну та, малоймовірно, дії інгібіторів тромбіну. Тому розрахунок концентрації тромбіну на підставі величин активності тромбіну є помилковим, оскільки не включає величину активності (читай концентрації) тромбіну в момент точки перегину реакції. У зв'язку з цим низхідна частина тромбограми вказує не на зниження приросту активності тромбіну, а на зниження концентрації тромбіну, що є ненавмисною помилкою, **рис 3.4, рис 3.5 Б**. Внаслідок цього ендогенний тромбіновий потенціал (ЕТР) як і висота піку концентрації тромбіну визначається з помилкою.

Розглядаючи лаг-період кривої (стадію ініціації) не враховують дуже важливий момент у методі TGA – зв'язок між етапами формування структури

згустку в плазмі крові та фазами процесу генерації тромбіну. Порівнюючи стадії формування згустку, а саме формування протофібрил, їх латеральну асоціацію та формування фібрилярної структури та фазу ініціації активації протромбіну, було виявлено, що закінчення формування структури згустку збігається з початком прискорення генерації тромбіну, **рис 3.5 А** [112]. Це означає, що весь фібриноген як субстрат генерованого тромбіну в кюветі перетворюється на фібриновий згусток і утворює тверду фазу – сітку фібрил згустку, на яких сорбується тромбін із збереженням фібриноген-трансформуючої та амідазної активності [113]. У цій фазі TFP1 α не робить на активацію протромбіну суттєвого інгібуючого впливу, оскільки: а) утворення FVIIa–TF, FVIIa–TF/FXa комплексів [20] та активація FX у FXa та FIX у FIXa, що по суті об'єднує зовнішній та внутрішній шляхи активації протромбіну, відбувається на фосфоліпідній поверхні, а інгібування тромбіну TFP1 α – в плазмі, в різних фазах гетерогенної системи [114]; в) концентрація фібриногену у плазмі значно перевищує концентрацію TFP1 α – відповідно від ~ 900 до ~ 6000 нМ (залежно від розведення плазми в комірці мікроплашки) та 2 нМ [115], тому тромбін, звільняючись з фосфоліпідної поверхні, у плазмі взаємодіє спочатку з фібриногеном [106]. Хоча тромбін утворюється в незначних концентраціях, що підтверджується наявністю лаг-фази, **рис 3.5 А**, його дія спрямована тільки на фібриноген, як основний субстрат, і є достатньою для формування згустку.

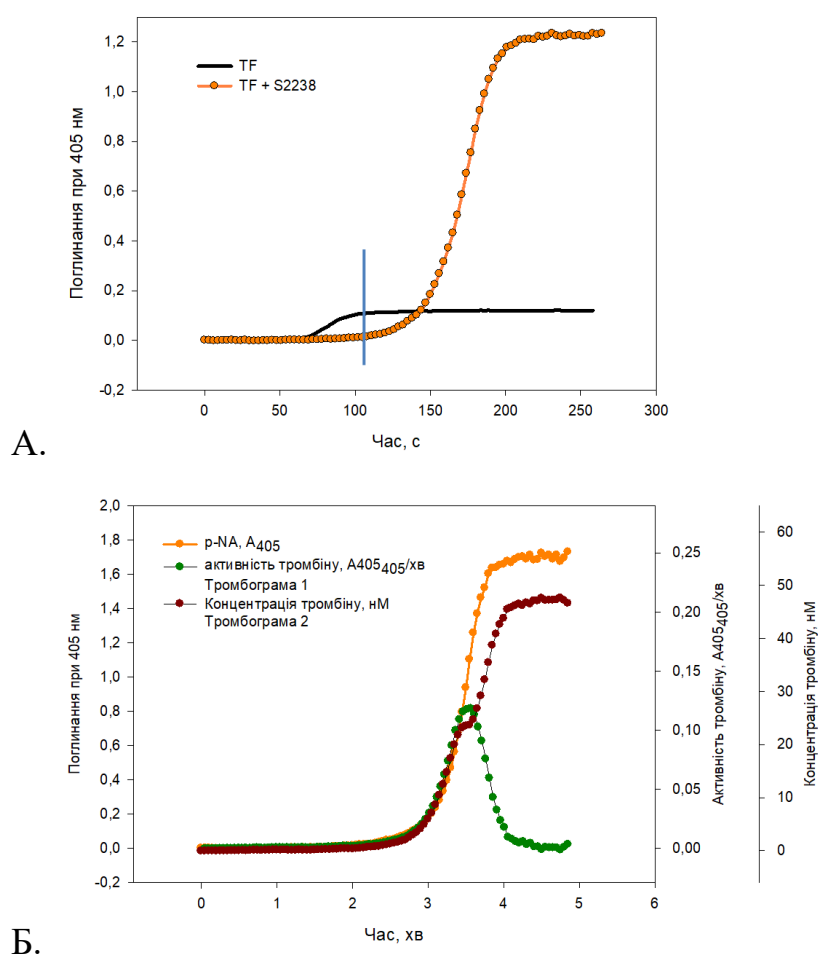


Рис 3.5. Турбідиметрична крива зсідання плазми крові донора, ініційована TF у присутності CaCl_2 та крива вивільнення p-NA мітки з тромбінового субстрату S2238 (помаранчева лінія), отримана в тих же умовах (А). Тромбограми, побудовані на основі кривої звільнення p-NA мітки із тромбінового субстрату S2238 з використанням традиційного розрахунку TGA (тромбограма 1, зелений колір) та з урахуванням концентрації тромбіну після точки перегину кривої зростання мітки (тромбограма 2, темно-червоний колір) (Б). Розрахунок концентрації тромбіну з урахуванням його концентрації в точці перегину наведено в розділі "Матеріали і методи" [117].

Після повного перетворення фібриногену на фібриновий згусток з'являється деякий надлишок тромбіну, який перемикається на активацію FVIII, FV та FXI з утворенням теназного та протромбіназного комплексів.

Поява теназного та протромбіназного комплексів викликає «спалах» у швидкості утворення тромбіну та стрімке зростання амідазної активності, що спостерігається на **рис 3.4, рис 3.5** [116, 117].

«Спалах» у швидкості утворення тромбіну після перетворення всього фібриногену на фібрин та формування згустку може здатися втратою контролю над активацією протромбіну, оскільки концентрація фібриногену на цей момент є вичерпаною. Однак, його можна також розглядати як біологічний механізм, що використовується системою зсідання для формування міцної межі між пошкодженою тканиною і плазмою крові або навколишнім середовищем.

Тромбін у високій концентрації формує фібриновий тонковолокнистий згусток з ковалентно включеними білками: $\alpha 2$ -AP, PAI-1, фібринектином, поперечно-прошитими FXIIIa α C-регіонами фібрину, глікопротеїновим рецептором тромбоцитів α IIb β 3 та іншими білками тромбоцитів, що утворює стійку до дії фібринолітичної системи і інших протеаз «прикордонну» структуру згустку, необхідну для ініціації регенеративних процесів у пошкоджених тканинах.

Слід зазначити, що в умовах *in vitro* тромбомодулін та гепарин у плазмі донорів у комірках мікроплашки в нормі відсутні [116]. Тому низхідну ділянку кривої на **рис 3.5** не можна було повною мірою пояснити лише дією PCa та АТШ. Більше того, $\alpha 2$ -макроглобулін ($\alpha 2$ -МГ) зберігає амідазну активність тромбіну після захоплення його в комплекс [118].

Привертає увагу той факт, що друга фаза активації протромбіну – ампліфікація, розгортається в плазмі крові, що знаходиться усередині фібринового згустку, сформованого в осередках мікроплашки *in vitro* або, імовірно, в згустку, утвореному в пошкодженій судині, на її стінках або в місці пошкодження тканин та виливу крові *in vivo*. Очевидно, незважаючи на високі концентрації тромбіну, що спостерігаються *in vitro*, не можна очікувати великого викиду надлишкового тромбіну за межі згустку *in vivo*, оскільки

фібрин згустку, тромбоцити, компоненти глікокаліксу та інші білки будуть утримувати його в тромбі, що формується, а молекули тромбіну, які потрапили в плазму за межами згустку, будуть інактивовані комплексом антитромбіну III з гепарином (АТІІІ-He), $\alpha 2$ -МГ і зв'язані іншими компонентами плазми крові [120].

Таким чином, головна проблема методу TGA полягає в тому, що в низхідній ділянці тромбограми (**рис 3.4**) з'являється помилка при перерахунку активності тромбіну в його концентрацію. Тому ці концентрації тромбіну було додано до концентрації у точці «перегину», якою закінчується ліве плече тромбограми, **рис 3.5**, для отримання істинного значення концентрації тромбіну та розрахунку величин інших параметрів кривої генерації тромбіну у плазмі крові людини.

Запропоновано підхід, який дозволяє визначити концентрацію та прослідкувати динаміку активності тромбіну в кожний момент реакції формування фібринового згустку.

3.3. Дослідження зв'язку між формуванням структури згустку і генерацією тромбіна на стадії ініціації зсідання плазми крові. Роль фібриногену і фібрину в ініціації зсідання плазми крові.

Тромбін в якості основного ензиму системи гемостазу забезпечує зсідання крові і утворення тромбів для підтримки цілісності судинної системи. Після формування згустку *in vitro* його активність додатково зростає внаслідок активації теназного та протромбіназного комплексів системи зсідання плазми крові. В умовах *in vivo* поліфункціональність тромбіну реалізується в залежності від його концентрації, у часі і шляхом компартменталізації дії в різних відділах серцево-судинної системи. Тому визначення активності тромбіну в процесі його генерації *in vitro* є важливим діагностичним методом

для оцінки активності компонентів системи зсідання і визначення стану системи гемостазу.

Під час фази активації системи зсідання – ампліфікації – активність тромбіну найвища, що пов'язано з закінченням трансформації фібриногену у фібрин і насиченням тромбіном сайтів зв'язування тромбіну на полімерному фібрині, але найбільш складною і важливою для генерації тромбіну і формування фібринового згустку є фаза ініціації, за якої активність утворюваного тромбіну зосереджена тільки на трансформації фібриногена у фібрин, формуванні фібринового згустку і не проявляється на інших субстратах ензиму.

Припускається, що надмірна концентрація тромбіну, який утворюється в межах фібринового згустку як *in vitro*, так і *in vivo* у випадках великих виливів крові, необхідна для швидкого завершення формування згустку і його поверхні. Завдяки відсутності амідазної активності у фазі ініціації активації системи зсідання, дослідженню взаємозв'язку між формуванням фібринового згустку і формуванням тромбіну приділялося менше уваги, ніж подальшим фазам генерації тромбіну [51].

У цьому розділі представлені результати дослідження зв'язку у часі між стадіями формування структури згустку та генерацією тромбін у плазмі крові людини в умовах *in vitro*.

Дослідження зв'язку у часі між формуванням згустку та генерацією тромбіну на стадії ініціації активації системи зсідання показало, **рис 3.6**, що в обох системах на стадії ініціації активації зсідання початок реєстрації генерації тромбіну за його амідазною активністю збігається у часі із завершенням формування згустку в плазмі крові. Генерація тромбіну різко прискорюється в обох системах після закінчення формування структури згустку [121, 122].

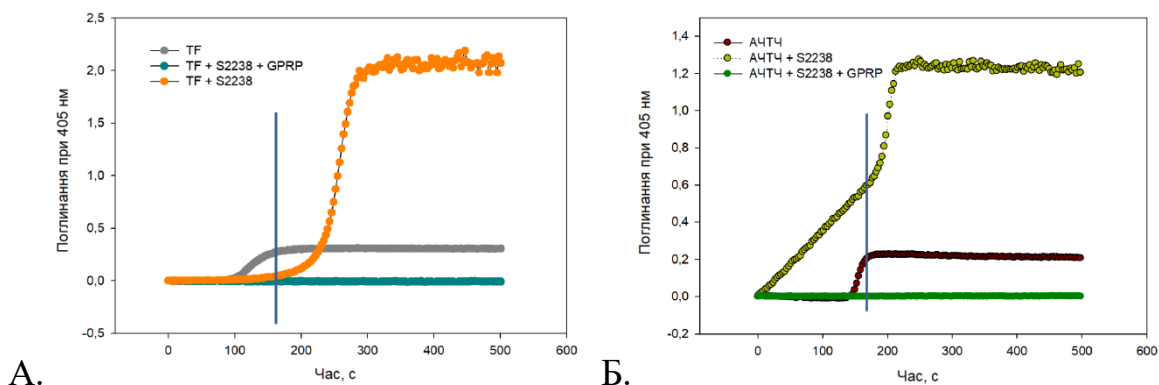


Рис 3.6. Порівняльний аналіз зсідання плазми крові та росту амідазної активності в плазмі крові, активацію якої ініціює тканинний фактор (Тромборель) (TF, А) або АЧТЧ-реагент (Б). Кожна крива є усередненою двох повторів незалежно від проведених дослідів, а саме: турбідиметричний аналіз процесу зсідання плазми крові у відсутності S2238 (темно-сірий колір); аналіз генерації тромбіну у присутності S2238 (оранжева – ліворуч, світло-зелена праворуч); обидва попередні досліди у присутності 1 мМ GPRP пептида (темно-зелена крива). Вертикальні відрізки на кожному графіку вказують на те, що прискорення росту амідазної активності в кожній із систем співпадає з закінченням формування фібрилярної структури згустку.

В системі з АЧТЧ-реагентом спостерігається високий рівень спонтанної активності, яка, ймовірно, належить трьом ензимам, здатним активуватися під дією АЧТЧ-реагенту, а саме: FXII, прекалікрену і FXI, які після активації гідролізують тромбіновий субстрат S2238. Кінетика розщеплення S2238 вказує на одномоментну і повну активацію АЧТЧ-реагентом усіх неспецифічних ензимів, **рис 3.6 Б**.

Отриманий результат вказує на існування послідовності у часі появи фібринового згустку та амідазної активності згенерованого тромбіну, а саме: згенерований системою ініціації зсідання тромбін починає проявляти свою амідазну активність в період завершення формування фібринового згустку в плазмі крові. Це може свідчити про зв'язок у часі між генерацією тромбіну та

стадіями формування згустку в плазмі крові людини, зсідання якої ініціює ТФ або АЧТЧ реагент, і в свою чергу може вказувати на участь фібриногену і фібрину в регуляції ініціації активації протромбіну.

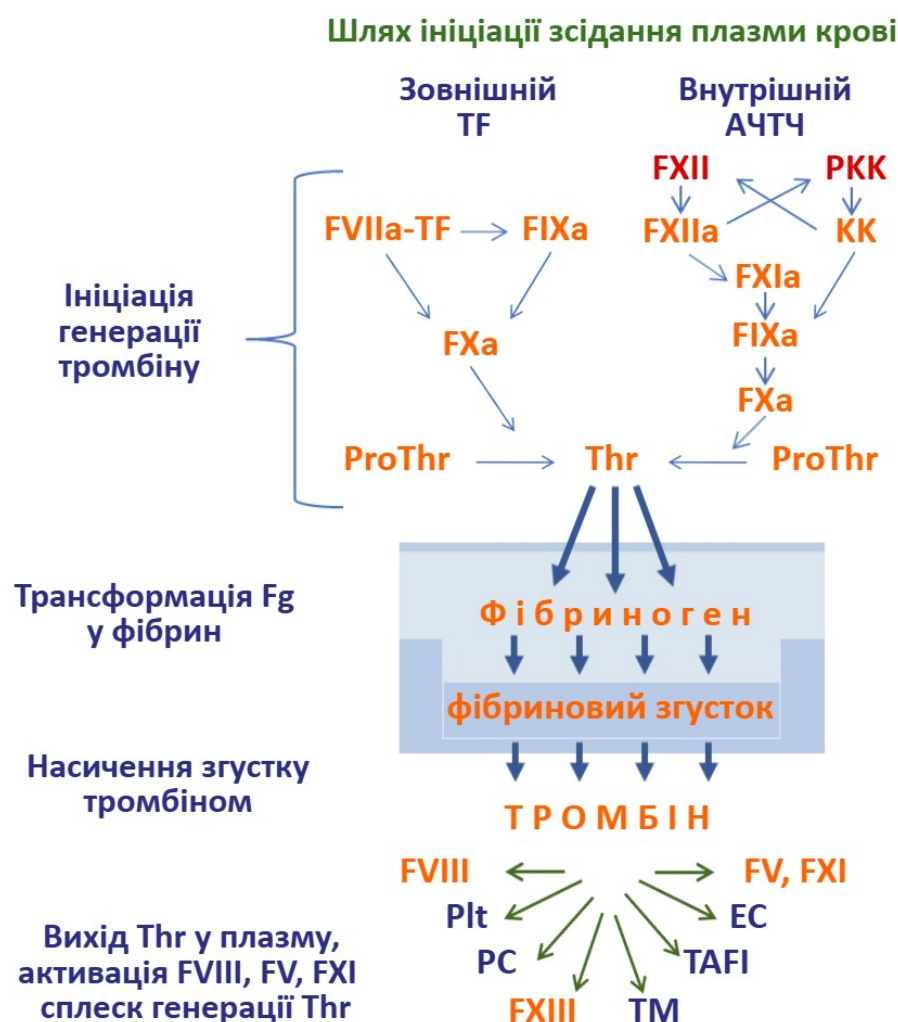


Рис 3.7. Схема ініціації генерації тромбіну і подальшої участі тромбіну в реакціях стадії ініціації зсідання плазми крові. На рисунку представлена послідовність реакцій ініціації генерації тромбіну, починаючи з реакцій утворення ТФ-FVIIa-FXa і FIXa-FXa комплексів, формування згустку та участь його структур у генерації тромбіну. Plt – тромбоцити, ЕС – ендотеліальні клітини, PC – протеїн С, TAFI – активований тромбіном інгібітор фібринолізу, FXIII – трансглютаміназа, TM – тромбомодулін.

Фібриноген знаходиться на межі між системою активації протромбіну у тромбін, який генерується під дією TF-FVIIIa-FXa і FIXa-FXa комплексів, і формуванням фібринового згустку, **рис 3.7**. Концентрація фібриногену у плазмі в нормі коливається в межах 5,88 – 11,76 мкМ. На початку стадії ініціації зсідання Fg є єдиним субстратом тромбіну, який трансформується у desA-фібрин і останній починає формувати полімерні структури згустку, **рис 3.7**. Субстрат S2238 не може вплинути на ці процеси внаслідок слабкої спорідненості до тромбіну та слабого впливу на формування протофібрил в процесі полімеризації фібрину [118]. Тому S2238 не є конкурентом фібриногену для тромбіну і амідазна активність останнього не проявляється на цій стадії.

Слід зазначити, що відщеплення фібринопептидів A і утворення desA-фібрину відбувається при нМ концентраціях тромбіну. Формування desA-фібринових протофібрил і їх латеральна асоціація стимулює відщеплення фібринопептидів B і формування desAB-фібринових фібрил і згустку в цілому. Амідазна активність тромбіну починає проявлятися тільки після утворення фібринового згустку, як це чітко видно на **рис 3.6** (розведення плазми крові 1:10). За час латеральної асоціації протофібрил та завдяки високій спорідненості тромбіну до фібрину, що формується та сформованого у згусток, генерований тромбін насичує ділянки зв'язування на фібринових фібрилах згустку, перетворюючи його на депо тромбіну і починає вивільнятися у міжфібрилярний простір згустку, викликаючи сплеск амідазної активності, **рис 3.6** [123, 124].

Підвищення концентрації тромбіну у міжфібрилярному просторі згустку *in vitro*, перемикає дію тромбіну на активацію FVIII, FV і FXI, які утворюють теназний (FVIIIa-FIXa-FXa-PL) і протромбіназний (FVa-FXa-PL) комплекси, викликаючи «спалах» у зростанні амідазної активності тромбіну. Ймовірно, що у такий спосіб фібриноген і фібрин послідовно і у різних формах регулюють ініціацію активації системи зсідання.

Слід зазначити, що за слабкої активації протромбіну, фібриноген може блокувати полімеризацію desA-фібрину на стадії розчинного фібрину, що, в свою чергу, загальмує формування протофібрил і фібринового згустку як депо тромбіну, необхідного для подальшої активації процесу ініціації зсідання плазми крові.

Для з'ясування ролі структури полімерного фібрину у ініціації генерації тромбіну, ми використали високо специфічний інгібітор формування полімерного фібрину – GPRP пептид. Як свідчать дані, представлені на **рис 3.8**, 1 мМ GPRP повністю пригнічував не тільки формування згустку в плазмі крові, ініційоване TF або АЧТЧ-реагентом, але і повністю гальмував у обох системах стадію ініціації генерації амідазної активності тромбіну протягом часу спостереження.

На відміну від донорської плазми крові, у дефібринованій плазмі крові (TF-FVIIa)-FXa та FIXa-FXa комплекси не мали лаг-фази і майже лінійно і значно повільніше активували генерацію тромбіну. На **рис 3.8** представлена крива генерації тромбіну, ініційованої тканинним фактором. У дефібринованій плазмі крові вивільнення p-NA мітки із S2238 тромбінового субстрату за 250 с склала ~ 0,4 о.о. при 405 нм. В той же час в плазмі крові донорів за присутності тканинного фактору або АЧТЧ-реагенту увесь S2238 субстрат руйнувався відповідно за 250 і 230 с, **рис 3.8**. Цей результат свідчить, що комплекси TF-FVIIa-FXa і FIXa-FXa в плазмі крові у відсутності полімерного фібрину (згустку) є слабкими активаторами генерації тромбіну.

З іншого боку цей дослід вказує на абсолютну необхідність участі фібриногену і фібринового згустку у забезпеченні швидкої і ефективної генерації тромбіну у донорській плазмі, **рис 3.8**.

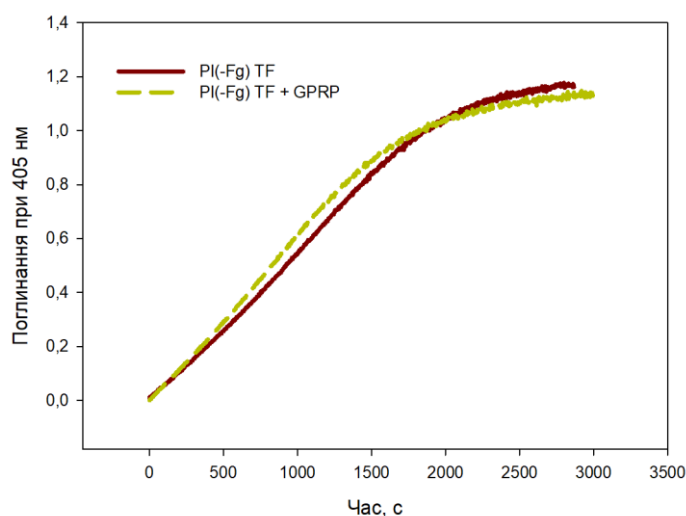


Рис 3.8. Вплив 1 мМ GPRP пептиду на генерацію тромбіну, яку ініціює тканинний фактор у дефібринованій плазмі крові людини.

Відсутність впливу 1 мМ GPRP пептиду на генерацію тромбіну в дефібринованій плазмі крові є прямим доказом необхідності фібрину у формі згустку для ефективної ініціації генерації тромбіну. Механізм участі фібринового згустку у стимуляції активації протромбіну не повністю з'ясований і потребує подальших досліджень.

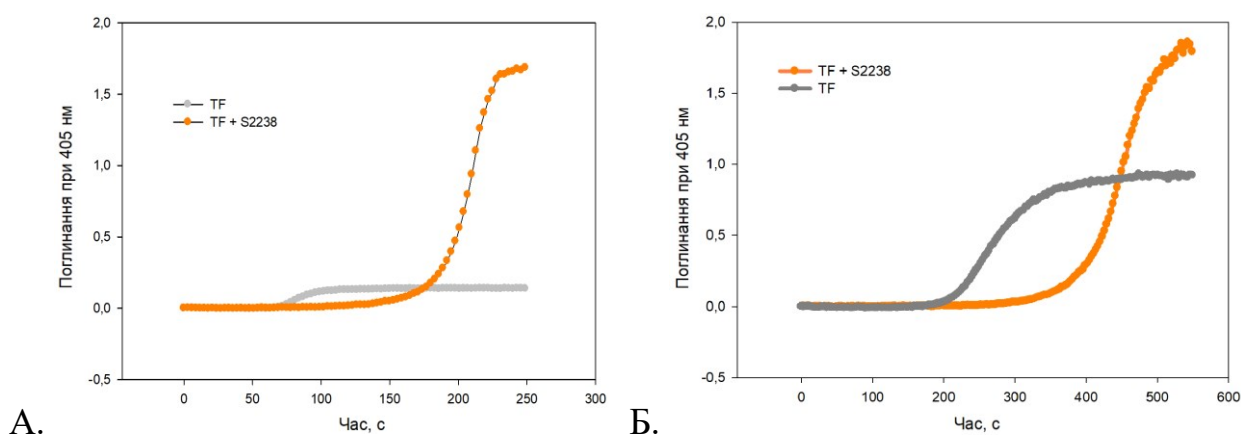


Рис 3.9. Вплив розведення плазми крові на параметри активації зсідання та ініціації генерації тромбіну у плазмі крові, зсідання якої ініціює тканинний фактор (Тромборель) А – розведення 1:10; Б – розведення 1:3.

Для з'ясування впливу розведення плазми крові на формування згустку та ініціацію генерації тромбіну, **рис 3.9**, порівняли початок реєстрації генерації тромбіну за амідазною активністю у системі плазма + S2238 + TF. Він становив 410 с при розведенні плазми 1:3, а лаг-період до початку формування згустку становив 210 с. У розведеній 1:10 плазмі крові лаг-період для згустку становив 73 с, а для амідазної активності – 200 с. Зменшення концентрації фібриногену у розведеній 1:10 плазмі крові прискорювало генерацію тромбіну. Ці дані підтверджують наше припущення про те, що фібриноген виступає не тільки субстратом для тромбіну, але і одночасно інгібітором процесу полімеризації фібрину [119], оскільки збільшує лаг-період для утворення згустку у 3 рази. Очевидно, інгібування процесу полімеризації фібрину фібриногеном зменшується при розбавленні концентрації фібриногену у 10 разів в більшій мірі, ніж при розбавленні у 3 рази. По-друге, ємність фібринового згустку, як резервуара тромбіну, при розбавленні плазми у 3 рази значно перевершує концентрацію згенерованого тромбіну, що збільшує час насичення згустку тромбіном і подовжує час формування теназного і протромбіназного комплексів у 2 рази, а значить і сплеск амідазної активності в плазмі крові. Генерація тромбіну за амідазною активністю виявляється і починає прискорюватися одночасно із закінченням формування фібрилярної структури згустку. Очевидно, що тривимірна структура полімерного фібрину необхідна для накопичення тромбіну. Згусток служить як депо для тромбіну, яке забезпечує реалізацію поліфункціональних можливостей тромбіну, **рис 3.7**.

Як згадувалось раніше, після насичення згустку тромбіном його надлишок перемикається на активацію FVIII, FV і FXI факторів з утворенням теназного і протромбіназного комплексів. Останні викликають сплеск активності тромбіну, що необхідно для завершення формування згустку і тромбу. В умовах *in vitro* це дозволяє визначити важливі діагностичні параметри генерації тромбіну, а саме: лаг-період ініціації генерації тромбіну, максимальну швидкість активації протромбіну, максимальну активність і

концентрацію тромбіну, ендogenous тромбіновий потенціал плази крові пацієнта. В умовах *in vivo* висока концентрація тромбіну необхідна для активації тромбоцитів, завершення формування згустку і формування поверхневої структури тромбу, стійкої до дії протеолітичних ензимів і системи фібринолізу.

Активація генерації тромбіну на стадії ініціації активації системи зсідання – процес, цілком спрямований на формування фібринового згустку. Виявлений у зв'язку з формуванням фібринового згустку характер генерації тромбінової активності може вказувати на стан балансу між активацією системи зсідання і системи анти-зсідання гемостазу плазми крові.

Виявлено зв'язок між активністю (концентрацією) тромбіну і стадіями формування фібринового згустку. Показано, що на етапі ініціації тромбін трансформує фібриноген у фібрин і тому не проявляє амідазної активності, а на стадії ампліфікації – перемикається на активацію факторів VIII, V і XI, що супроводжується спалахом амідазної активності.

3.4. Дослідження зв'язку між формуванням, розчиненням згустку і генерацією тромбіну і плазміну в плазмі крові людини

Відщеплення тромбіном F_rA і F_rB не лише експонує А- та В-сайти полімеризації, але й формує ділянки зв'язування для Glu-Pg і t-PA на полімерному фібрині з подальшим утворенням активаторних комплексів Glu-Pg–фібрин–t-PA. Показано, що Glu-Pg зв'язується за участі крингла K5 з ділянкою 148-160 α -ланцюга фібрину (за участі K159) [80]. Нещодавно знайдено нову ділянку зв'язування (R175) на α -ланцюзі фібрину для K5 плазміногену [125]; для t-PA відомий сайт зв'язування розташований на ділянці γ 312-324. Однак Glu-Pg, асоційований із протофібрилами, не активується t-PA. Це пояснюють, по-перше, багатосайтовим механізмом

формування протофібрил desA-фібрину, за якого латеральна асоціація молекул desA/desAB-фібрину витісняє Glu-Pg і t-PA із ділянок зв'язування. По-друге, на ізольованих протофібрилах не формується повноцінний комплекс Glu-Pg-фібрин-t-PA, необхідний для генерації дволанцюгового Glu-Pm із відкритою конформацією. У системах очищених протеїнів показано, що латеральна асоціація протофібрил сприяє активації Glu-Pg t-PA [126, 127]. Натомість у плазмі крові білки, здатні взаємодіяти з фібрином, зокрема фібронектин, альбумін, α 2-антиплазмін, PAI-1 та α 2-макроглобулін, обмежують зв'язування Glu-Pg і t-PA з фібрином, зміщуючи процес активації на поверхню фібрил; при цьому на стадії латеральної асоціації протофібрил активації Glu-Pg не спостерігається [128].

Завданням цього розділу було дослідження зв'язку між стадіями формування структури згустку та генерацією тромбіну та плазміну у плазмі крові людини в умовах *in vitro*. Молекулярні механізми генерації тромбіну аналізували, досліджуючи зростання його активності та концентрації на усіх стадіях активації системи зсідання плазми крові. Зв'язок між активацією системи фібринолізу та стадіями формування і розчиненням згустку плазми крові досліджували, визначаючи активність плазміну за субстратом S2251 у згустках, зсідання яких було ініційовано АЧТЧ-реагентом або TF, у присутності доданого у плазму t-PA і реєструючи ріст у реакційному середовищі p-NA сигналу плазміну при 405 нм.

3.4.1.Зв'язок між генерацією тромбіну та стадіями формування структури фібринового згустку

Ініціація генерації тромбіну в плазмі крові людини TF чи АЧТЧ реагентом, має двофазний характер [129-130], **рис 3.10**. На першій стадії ініціації, або у лаг-фазі, активність тромбіну не проявляється, але потім

відбувається різке збільшення амідазної активності ензиму, яке називають «спалахом» активації протромбіну. Нам важливо було простежити зв'язок між зростанням активності тромбіну і формуванням структури згустку в плазмі крові у часі.

Перша стадія – ініціація активації системи зсідання плазми крові, відбувається двома шляхами – внутрішнім, що ініціюється АЧТЧ реагентом і пов'язаним з активацією калікреїн-кінінової системи, і зовнішнім, де ініціатором є тромбопластин, що містить тканинний фактор [131]. Як свідчать представлені на **рис 3.10.** результати, на обох шляхах ініціації системи зсідання поява амідазної активності тромбіну спостерігається в період закінчення формування фібрилярної структури фібринових згустків. На цій стадії до ініціації активації системи зсідання TF залучаються три ензими (FIXa, FVIIa, FXa) та кофактор – TF, а до ініціації активації системи зсідання АЧТЧ-реагентом – п'ять ензимів та кофактор (FXIa, KK, FIXa, FVIIa, FXa та HWK), що, ймовірно, впливає на швидкість формування протофібрил, що відображається на довжині лаг-періоду [132].

Розходження піків зсідальної та амідазної активності для TF та зближення їх для АЧТЧ реагенту на стадії ампліфікації, **рис 3.10**, можна пояснити високим рівнем неспецифічної амідазної активності, яку викликають на стадії ініціації ензими внутрішнього шляху активації протромбіну. Амідазна активність тромбіну починає стрімко зростати в обох системах після вичерпання фібриногену, як субстрату тромбіну, коли закінчується формування фібринової сітки згустку і до активації протромбіну долучається теназний та протромбіназний комплекс і FXIa, завдяки утворенню надлишку тромбіну в цих системах.

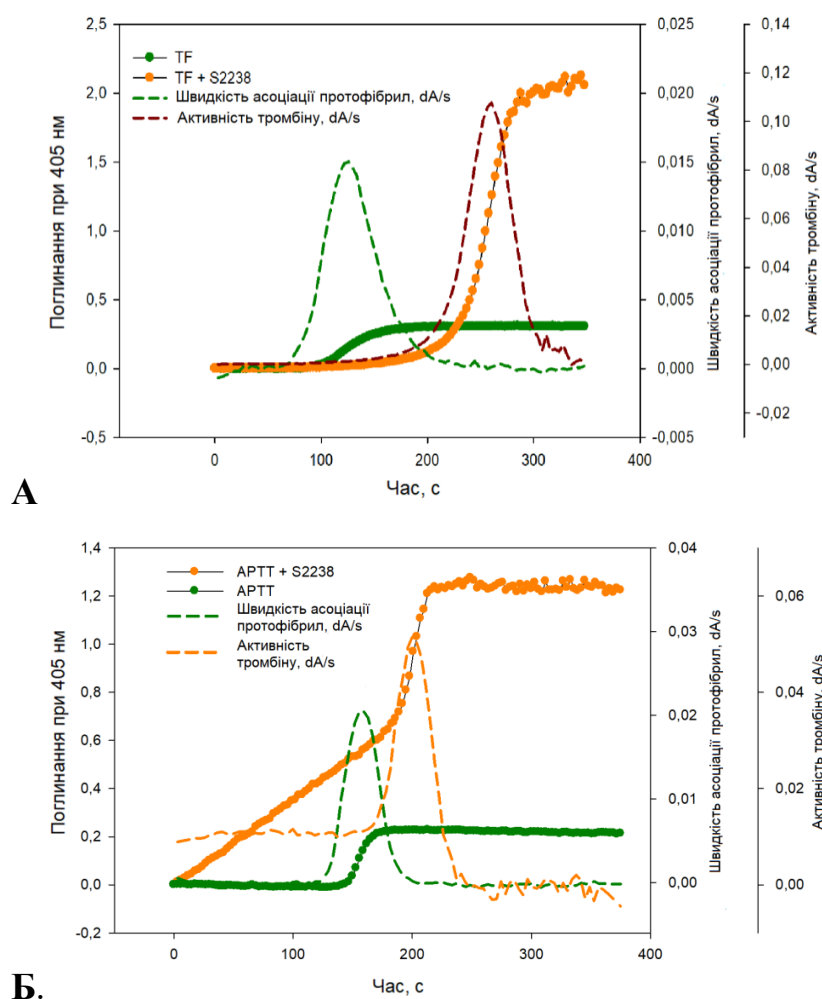


Рис 3.10. Зв'язок між стадіями формування фібринового згустку та генерації тромбіну, що ініціюється тканинним фактором (TF) (А), або АЧТЧ реагентом, що містить елагову кислоту та фосфоліпіди (Б) в плазмі крові людини. Зеленим кольором позначено турбідиметричні криві формування згустку – суцільні лінії, помаранчевим кольором – криві амідазної активності в обох системах; пунктирною зеленою лінією – швидкість формування згустків, а пунктирною помаранчевою лінією – амідазну активність тромбіну в обох системах. Піки амідазної активності і активності зсідання плазми крові вказують на відстань у часі між цими процесами.

Як свідчать дані, представлені на **рис 3.11**, р-NA субстрат тромбіну S2238 і продукти його гідролізу ензимом не впливають на амідазну активність

тромбіну, а лише інгібують першу стадію зсідання плазми крові, формування протофібрил.

В системі з АЧТЧ реагентом за участі наночастинок елагової кислоти конформаційно активуються проензими FXII і FXI та функціонально пов'язаний з ними калікреїн, які неспецифічно гідролізують амідазний субстрат тромбіну [130]. Високий рівень неспецифічної амідазної активності зближує піки швидкостей зсідання плазми та амідазної активності тромбіну, що викликається взаємним впливом амідазної та зсідальної активності тромбіну одне на одного. Ми знайшли, що на стадії ініціації системи зсідання субстрат тромбіну S2238 гальмує процес формування протофібрил з IC50% рівною 38 нМ, **рис 3.11**. При цьому величина сигналу турбідиметричній кривій формування згустку та кривій амідазної активності тромбіну при зростанні концентрації S2238 додаються аддитивно, **рис 3.11**.

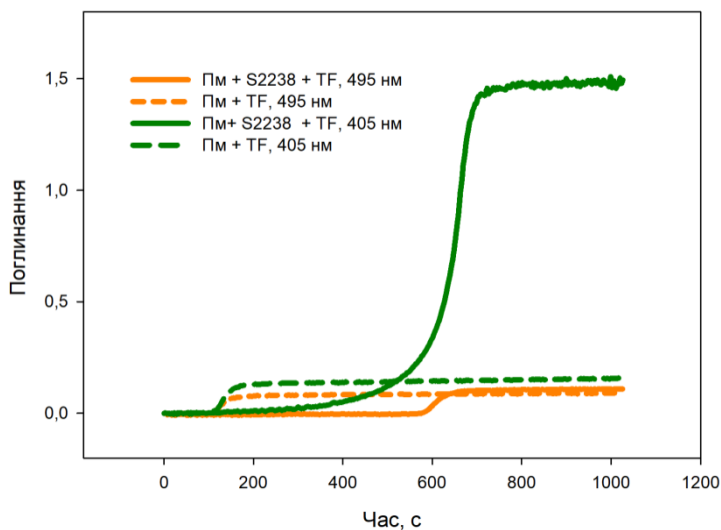


Рис 3.11. Тромбограма генерації тромбіну, яка реєструється при двох довжинах хвиль 405 та 495 нм.

Важливо відмітити, що продукти руйнування тромбіном амідазного субстрату S2238 і сам субстрат не впливають на величину каламутності згустку. Очевидно, інгібуюча дія субстрату та продуктів його гідролізу

проявляється тільки на рівні формування протофібрил. Електронно-мікроскопічні дослідження згустків показали, що формування структури згустку тільки гальмується, а товщина фібрил та частота їх галуження змінюється не суттєво (рис 3.12, рис 3.13).

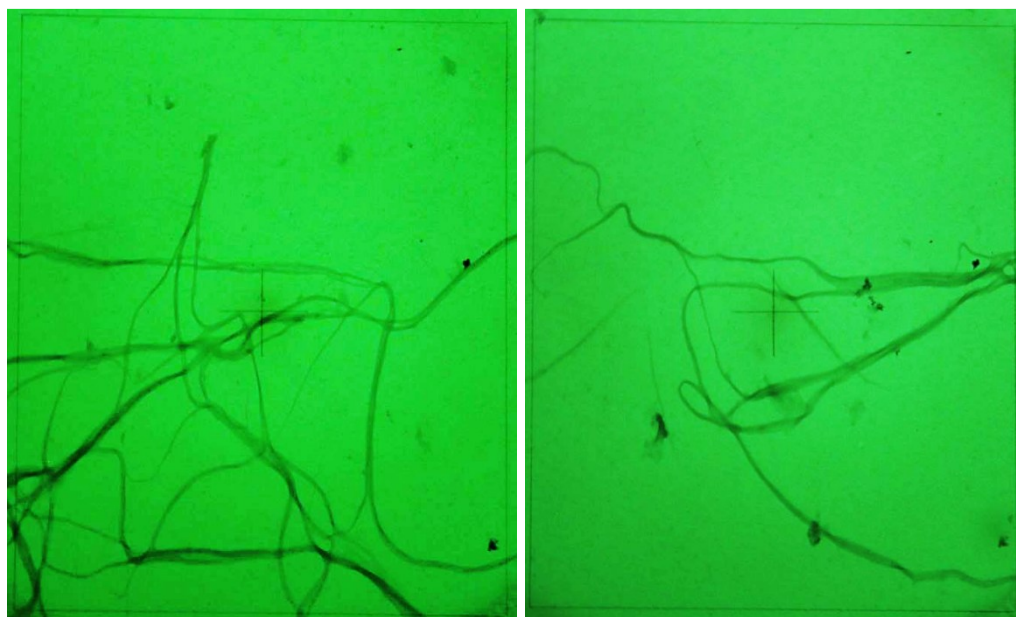
**А****Б**

Рис 3.12. Електронна мікроскопія фібринового згустку, утвореного в системі фібриноген-TF в амоній-форміатному буфері (0,05 М) рН 7,8, без (А) та з тромбіновим хромогенним субстратом S2238 (Б). Концентрація фібриногену складала 0,3 мг/мл, полімеризацію ініціювали тканинним фактором. Згустки для аналізу фіксували у точці досягнення максимальної мутності. Збільшення 1x25000.

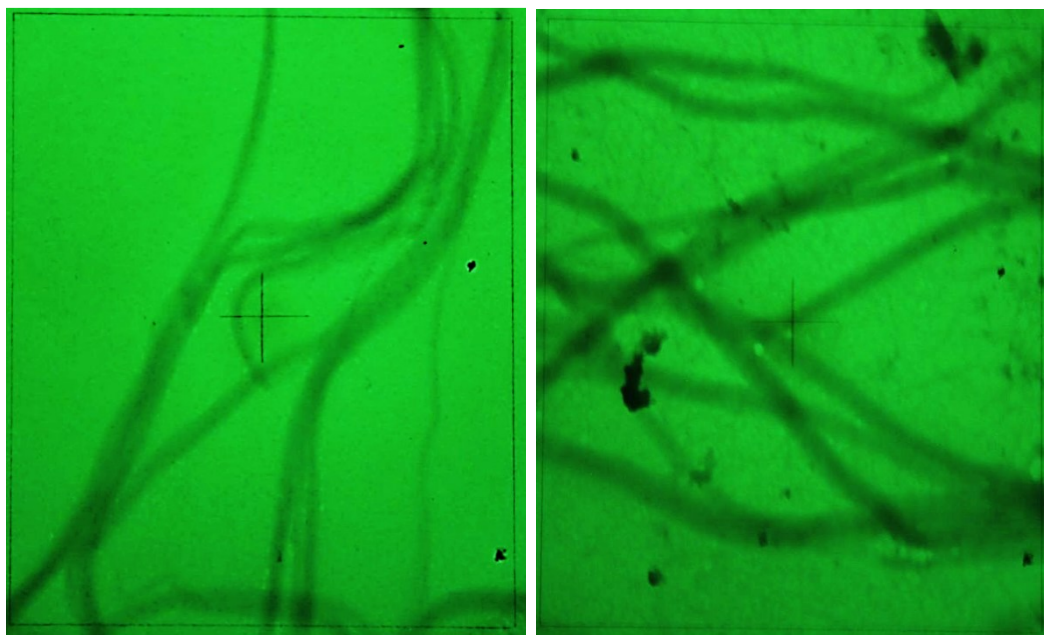


Рис 3.13. Електронна мікроскопія фібринового згустку, утвореного в системі фібриноген-TF в амоній-форміатному буфері (0,05 М) рН 7,8, без (А) та з тромбіновим хромогенним субстратом S2238 (Б). Концентрація фібриногену складала 0,3 мг/мл, полімеризацію ініціювали тканинним фактором. Згустки для аналізу фіксували у точці досягнення максимальної мутності. Збільшення 1x50000.

Після досягнення концентрації субстрату у 100 мкМ активність тромбіну переходить у стадію резольуції, яка характеризується припиненням приросту генерації тромбіну та виходом сигналу (суми каламутності згустку та поглинання р-NA) на плато. Як показано на **рис 3.14**, приріст активності тромбіну майже зупиняється, хоча в реакційному середовищі спостерігається значний надлишок субстрату. Це може бути наслідком вичерпання запасу протромбіну в середовищі реакції, інактивації згенерованого тромбіну внаслідок, найбільш ймовірно, його автолізу, а також впливу продуктів гідролізу, концентрація яких досягає рівня 0.1 мМ.

Амідазна активність тромбіну збільшується лінійно в межах концентрації S2238 від 10 до 100 мкМ, **рис 3.14**. Величина каламутності згустку не впливала істотно на амідазну активність тромбіну, що генерується,

в межах цих концентрацій. При концентрації S2238 більше 100 мкМ досягається плато амідазної активності у плазмі крові, що містить близько 140 нМ протромбіну, внаслідок, ймовірно, перетворення всього запасу протромбіну на тромбін, на що вказує залишок не гідролізованого S2238 субстрату у середовищі реакції.

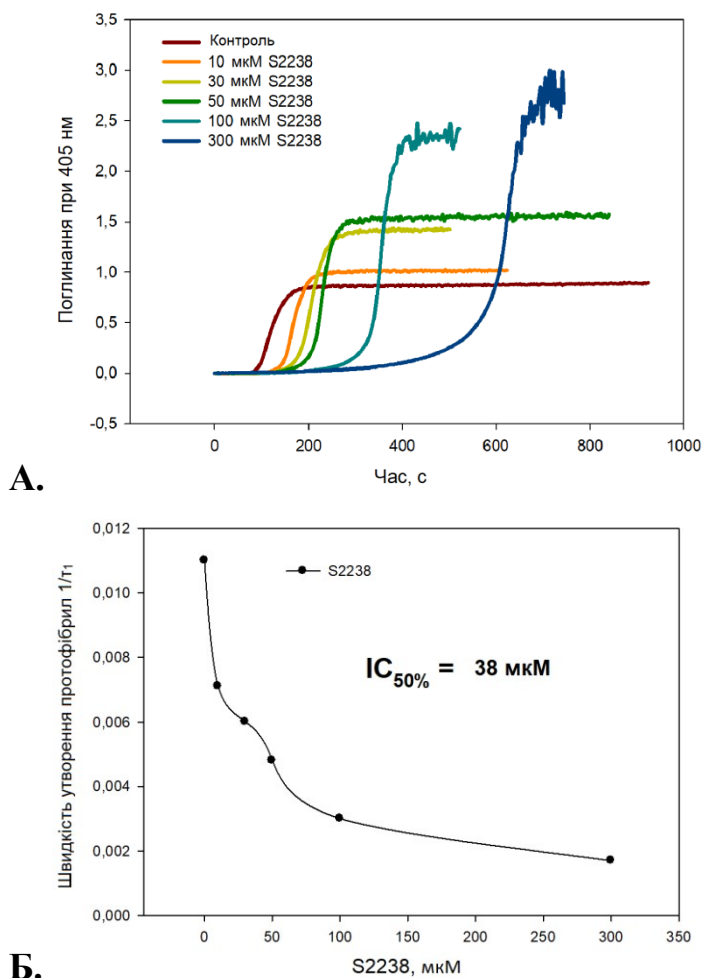


Рис 3.14. Вплив зростаючої концентрації субстрату тромбіну S2238 на криву генерації тромбіну (А) та на швидкість формування протофібрил (Б), що ініціюється TF в плазмі крові людини, ($n=3$).

Утворений у плазмі крові згусток, несуттєво впливає на поглинання світла р-NA. Розсіяння світла утвореним згустком є постійним і не впливає на розщеплення субстрату генерованим тромбіном на стадії ампліфікації зсідання крові. На відміну від стадії ініціації зсідання плазми крові,

результуюча крива стадії ампліфікації дає сумарну криву поглинання та каламутності згустку відповідно р-NA та фібрилами фібринового згустку (**рис 3.15**).

Вихід кривої росту активності тромбіну на плато відбувається після 100 мкМ концентрації субстрату. Приріст сигналу майже повністю гальмується, не зважаючи на наявність біля 45% субстрату тромбіну, ($n=3$).

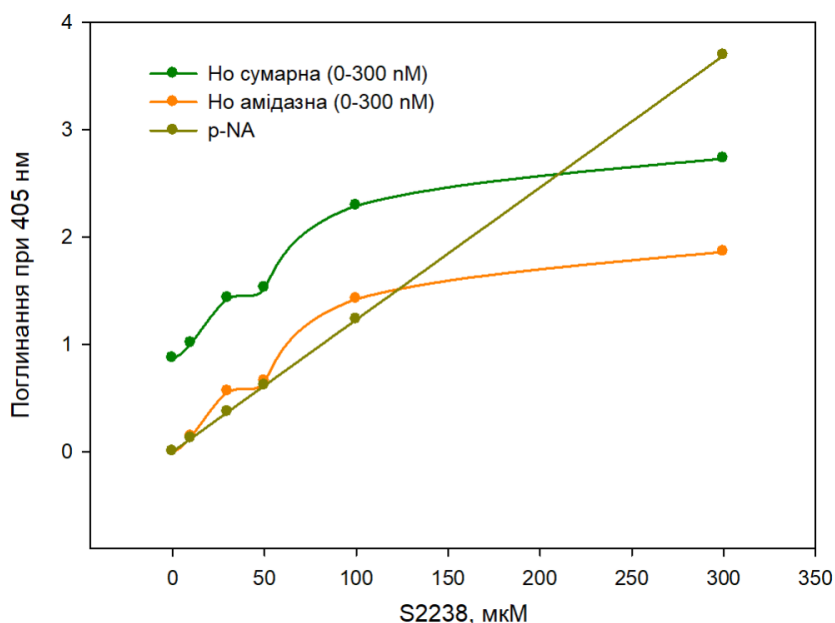


Рис 3.15. Вплив концентрації S2238 та продуктів його гідролізу тромбіном на сумарний сигнал реакційного середовища (максимальне поглинання згустком та р-NA міткою, що вивільняється).

Встановлено, що інгібуюча дія субстрату S2238 та продуктів його гідролізу проявляється тільки на рівні формування протофібрил. Отримані дані свідчать, що фаза ініціації активації системи зсідання (ініціації генерації тромбіну) пов'язана з трансформацією фібриногену у фібрин згустку, який накопичує цей тромбін; спалах у активності тромбіну в обох системах спричиняється надлишком тромбіну, що з'являється після насичення ділянок зв'язування тромбіну на фібрині згустку і стимулює формування теназного, протромбіназного комплексів у міжфібрилярному просторі згустку; інгібування формування протофібрилярної структури фібринового згустку на

стадії ініціації генерації тромбіну призводить до сильного пригнічення швидкості генерації тромбіну; втрата генерованим тромбіном активності на стадії резолюції, ймовірно, пов'язана з декількома причинами, а саме: зменшенням (або вичерпанням) концентрації протромбіну, зменшенням концентрації S2238 субстрату тромбіну, накопиченням продуктів гідролізу субстрату та їх впливом на активність тромбіну та формування протофібрил, а також з автолізом накопиченого тромбіну.

3.4.2. Зв'язок між генерацією плазміну та стадіями формування структури фібринового згустку

Формування фібринового згустку пов'язане також з його регуляторним впливом на активацію плазміногену у плазмі та механізм розчинення фібринового згустку [133-136].

Ми провели аналіз динаміки активації Glu-Pg t-PA в процесі формування і розчинення фібринового згустку в плазмі крові донорів. Порівняння амідазної активності Glu-Pm в обох системах, що ініціюють активацію системи зсідання в плазмі крові – АЧТЧ-реагенту або TF, показало, що ініціація зсідання плазми АЧТЧ-реагентом викликає у лаг-стадії появу в плазмі крові неспецифічної ензиматичної активності, яка руйнує плазміновий субстрат S2251 і не пов'язана з фібринолітичною системою, **рис. 3.16 А, Б**. Цей факт погоджується з отриманими раніше даними в системах із очищених протеїнів – фібрину, Glu-Pg та t-PA про те, що на стадії формування протофібрил не створюються структури, на яких може утворюватися активаторний комплекс – Glu-Pg-фібрин-t-PA, який розщеплює Arg561-Val562 пептидний зв'язок з утворенням Glu-Pm.

На стадії латеральної асоціації завершення формування згустку різко зростає амідазна активність, проте вона не належить білкам системи

фібринолізу, на що вказує збіг кривих амідазної активності у присутності і відсутності t-PA, **рис. 3.16 А**. На відміну від активації Glu-Pg t-PA у системі із очищених протеїнів (Fg, Glu-Pg і t-PA), реєстрація амідазної активності плазміну в згустках плазми крові починається значно пізніше, а саме на початку розчинення структури фібринового згустку, **рис. 3.16 А, Б, таб. 3.2**. Слід зазначити, що стрибок амідазної активності після лаг-фази формування згустку є сумою неспецифічної амідазної активності та каламутності згустку, що формується. При цьому фібринолітична активність плазміну з'являється в системі з TF раніше, ніж в системі з АЧТЧ реагентом, відповідно на 262 ± 15 та 440 ± 78 с, **таб. 3.3**. Подальша поведінка кривих фібринолітичної активності Glu-Pm відрізняються. Для АЧТЧ реагенту, **рис. 3.16 А**, вона вказує на зростання амідазної активності, що, можливо, пов'язане з утворенням підщепленого F1Xaδ фактора, який здатен стимулювати активацію Glu-Pg t-PA у Pm і концентрація якого зростає [137]. У випадку TF крива амідазної активності Glu-Pm демонструє тенденцію до виходу на плато, **рис. 3.16 Б**, що вказує на зменшення швидкості зростання концентрації сайтів для активації Glu-Pg t-PA внаслідок, ймовірно, руйнування структури фібринового згустку (αC-регіонів) утвореним Glu-Pm. Слід відмітити, що рівень амідазної активності на плазмінограмі плазми з АЧТЧ реагентом співпадає з таким для плазми з TF, після віднімання спонтанної амідазної активності в АЧТЧ плазмі, відповідно $26 - 16,4 = 9,6$ нМ та 10,07 нМ у плазмі з TF, **таб. 3.4**.

Пауза в активації Glu-Pg t-PA в обох системах, очевидно, викликана присутністю α2-AP, який з одного боку, інгібує вільний Glu-Pm, та руйнування плазміном αC-регіонів, що з іншого боку пов'язано зі збільшенням концентрації сайтів зв'язування для Glu-Pg і t-PA, у фібриновому згустку, і, як наслідок, утворення активаторних комплексів Glu-Pg-фібрин-t-PA, що прискорює утворення Glu-Pm і розчинення згустку.

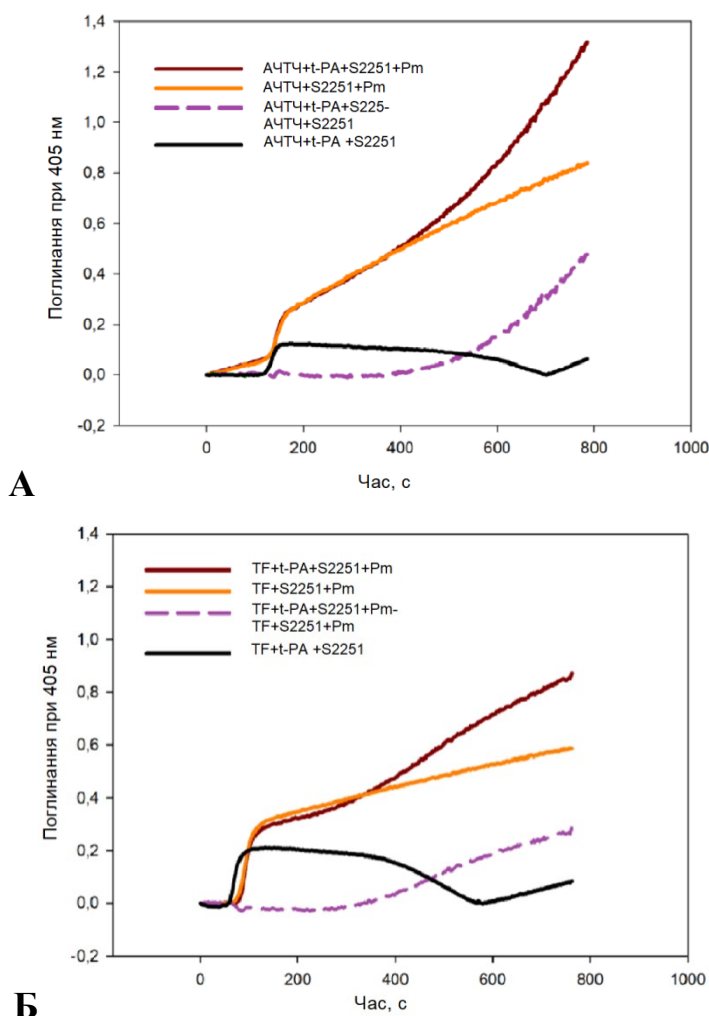


Рис. 3.16. Активація Glu-Pg у Glu-Pm під дією t-PA у згустках, формування яких було ініційоване реагентом АЧТЧ (А) або під впливом тканинного фактора (Б) у плазмі крові людини. Темно-сірою лінією позначено турбідиметричні криві формування і розчинення фібринового згустку (розведення 1:10 плазми крові), з додаванням 0,3 мМ S2251 на етапі розчинення згустку, 75 IU/мл t-PA та 6,2 мМ CaCl₂ за присутності АЧТЧ-реагента (А) або TF (Б); оранжевою лінією позначено спонтанну амідазну активність у плазмі крові, що ініціюється АЧТЧ (А) або TF (Б) реагентами; темно-коричневою лінією позначено сумарну амідазну активність у присутності 0,3 мМ S2251, 75 IU/мл t-PA та 6,2 мМ CaCl₂, що ініціюються АЧТЧ (А) або TF (Б) реагентами; буряковим кольором позначено переривчасту лінію, що представляє різницю між загальною та спонтанною активністю – активність Pm в плазмі крові (плазмінограма) (n=4).

Важливо розглянути ті процеси, що відбуваються в плазмі крові донорів, інформацію про які ми отримуємо на основі параметрів турбідиметричних кривих та тромбо- і плазмінограм амідазної активності тромбіну і плазміну. З цією метою було вибрано 14 параметрів, 11 із них були коагуляційні, отримані на основі ТДК, а три інші визначали концентрацію Thr, Pm і їх відношення – **таб. 3.2, таб. 3.3, таб. 3.4.**

Першим та одним із важливих параметрів є лаг-період тромбіно- і плазмінограм, позначається як τ_1 і визначає час формування протофібрил згустку. З одного боку він є показником функціонування системи ініціації генерації тромбіну гуморальною системою зсідання плазми крові, яка включає для TF (FVIIa-FIXa-FXa і FVIIa-FXa) та для АЧТЧ-реагент (KK, FXIIa, FXIa, FIXa, FXa, НМWK). З іншого боку швидкість формування протофібрил вказує на структуру фібрил згустку, що формується у фазі ініціації, а саме: за малої швидкості формуються переважно товщі фібрили, ніж за великої швидкості [131-134]. На поверхні товстих фібрил формується «шар» з більшою щільністю молекул Glu-Pg та t-PA, що забезпечує більшу швидкість активації системи фібринолізу. Формування сітки α C-регіонів, включення в неї α 2-AP і PAI-1 інгібіторів під дією FXIIIa відстає у часі від активації Glu-Pg t-PA, що робить такий згусток більш вразливим до дії фібринолітичної системи. Таким чином, величина τ_1 вказує на стан функціональної активності системи ініціації зсідання плазми крові, структуру і діаметр фібрил згустку, що формується, та їх потенціальну чутливість до дії фібринолітичної системи.

Два наступних параметри: V_1 та H , знаходяться у протиріччі з концентрацією тромбіну, яку ми визначаємо розробленим нами турбідиметричним методом [138], оскільки концентрація тромбіну з АЧТЧ реагентом менша, ніж з TF, відповідно 3.11 та 5.94 нМ, враховуючи обернену залежність величини каламутності згустку від активності Thr. Ми припускаємо, що різниця у величинах параметрів між АЧТЧ реагентом і TF, як ініціаторами зсідання плазми, полягає у наявності великої концентрації

елагової кислоти та фосфоліпідів у препараті АЧТЧ реагенту, яку він вносять в реакційне середовище. Останні несуть великий негативний заряд і впливають на взаємодію компонентів системи зсідання і фібринолізу, прискорюючи побічні процеси активації проензимів. Цей негативний вплив змінює величини коагуляційних параметрів зсідання і фібринолізу для плазми крові донорів, **таб. 3.2, таб. 3.3, таб. 3.4**, і потенційно може впливати на величини параметрів системи гемостазу у пацієнтів з підвищеним рівнем ліпідів та ліпопротеїнів. Це важливе питання, яке потребує окремого дослідження.

Важливими параметрами ТДК є точка максимальної каламутності згустку, яка вказує на момент досягнення рівноваги між процесами зсідання і розчинення згустку плазми крові, що вимірюється часом τ_2 – від початку процесу зсідання до моменту рівноваги і τ_3 – часом розчинення згустку – від моменту рівноваги до моменту повного розчинення структури згустку. У сумі ці величини разом дають час існування згустку.

Таблиця 3.2.

Параметри турбідиметричних кривих процесів зсідання і розчинення згустку плазми крові донорів, які ініціює АЧТЧ реагент та ТF у присутності t-РА.

	АЧТЧ, с	ТF, с
τ_1 , с	$91,4 \pm 5,8$	$53,5 \pm 5,6$
Thr, nM	$3,17 \pm 0,19$	$5,94 \pm 0,68$
V_1 , $\Delta A/c$	$0,0052 \pm 0,0018$	$0,0092 \pm 0,0019$
H_1 , A	$0,089 \pm 0,01$	$0,236 \pm 0,018$
τ_2 , с	187 ± 12	134 ± 15
τ_3 , с	$551 \pm 16,3$	412 ± 18
τ_3 / τ_2	$4,07 \pm 0,15$	$3,12 \pm 0,15$
$\tau_3 + \tau_2$, с	720 ± 20	547 ± 18
$V_2 - \Delta A/c$	$-0,00032 \pm 72 \times 10^{-5}$	$-0,0012 \pm 0,0002$
Pm, nM	$14,72 \pm 0,11$	$10,8 \pm 0,04$
Pm/Thr	4,63	$1,84 \pm 0,31$
ЗГП, A*t	$17,5 \pm 2,2$	$78,5 \pm 29,6$
ФП, A*t	$7,82 \pm 1,77$	$40,4 \pm 8,3$
ЗП, A*t	$25 \pm 2,69$	$120 \pm 15,1$
ЗП/ФП	$3,19 \pm 0,37$	$2,92 \pm 0,22$

Час розчинення структури згустку, що ініціюється ТF у $3,12 \pm 0,15$ рази довший за час його формування. Це пов'язано з тим, що трансформація фібриногену у desA фібрин відбувається у гомогенній системі – розчині фібриноген з концентрацією 1 мкМ та концентрації Thr $5,94 \pm 0,68$ нМ, що становить відношення 166:1 (М:М). При цьому тромбін сорбується на desA фібрині та у вигляді комплексу продовжує відщеплювати FpA та FpB до закінчення формування згустку. Це дає перевагу системі зсідання у швидкості

формування структури згустку, що виглядає як загальна властивість системи зсідання плазми крові – спочатку формується структура фібринового згустку у плазмі крові, а за нею з інтервалом у часі з'являється амідазна активність плазміну, що вказує на активацію системи фібринолізу.

Показано [78], що в процесі формуванням структури згустку Glu-Pg і t-PA витісняються структурами згустку на поверхню фібрил, де вони здатні сформувати активаційні тріади Glu-Pg-фібрин-t-PA, в яких утворюється Glu-Pm. Як і у випадку генерації тромбіну згенерований Glu-Pm в першу чергу атакує α C-регіони фібрину і не розщеплює S2251. Ця стадія є вирішальною для долі згустку. За наявності високої активності FXIIIa, підвищеної концентрації α 2-AP і PAI-1 інгібіторів, останні ковалентно зв'язуються FXIIIa з α C-регіоном і інгібують новоутворений Glu-Pm, що в свою чергу інгібує розчинення згустку. За високої концентрації t-PA та низьких концентрацій α 2-AP і PAI-1 інгібіторів новоутворений Glu-Pm розчиняє згусток.

На **рис. 3.16** показано, що амідазна активність плазміну з'являється на 262 ± 15 с для TF та 440 ± 78 с реакції для АЧТЧ реагенту, **табл. 3.2**. До цього моменту ділянки спонтанної і Glu-Pm-залежної амідазної активності співпадають, **рис. 3.16 А**. Надалі амідазна активності у випадку ініціації АЧТЧ реагентом експоненціально зростає, що вказує на ріст концентрації плазміну. У випадку TF вона проявляє тенденцію до виходу на плато, що вказує на завершення активації Glu-Pg t-PA, ймовірно, у зв'язку з руйнуванням фібринової компоненти активаційної тріади Glu-Pg-фібрин-t-PA. Слід сказати, що амідазна активність, що спостерігається у випадку АЧТЧ реагенту, значно перевищує таку для TF, **табл. 3.4**. Проте час руйнування згустку для TF і амідазна активність Glu-Pm менші за такі для АЧТЧ реагенту, що вказує на більшу ефективність фібринолізу, що ініціюється TF.

Таблиця 3.3.

Тривалість окремих стадій формування та розчинення структури згустку плазми крові, яку ініціюють АЧТЧ реагент або TF (Тромборель) у присутності t-РА, n = 4.

	АЧТЧ, с	TF, с
Тривалість формування протофібрил	91,4 ± 5,83	53 ± 5,6
Тривалість зсідання згустку	181 ± 12,9	134 ± 15
Тривалість розчинення згустку	551 ± 16,3	417 ± 26
Тривалість існування згустку	720 ± 20,2	550 ± 27
Початок реєстрації амідазної активності Pm	440 ± 78	262 ± 15

Тривалість формування протофібрил торкається важливої проблеми – структурної організації фібрил фібринового згустку. Швидкість формування протофібрил залежить від швидкості утворення FXa, активності згенерованого тромбіну і концентрації фібриногену, як конкурентного субстрату пептидним S2238 та S2251 хромогенним субстратам тромбіну або плазміну, відповідно. Ці питання будуть розглянуті в наступному розділі.

Таблиця 3.4.

Активність різних фракцій плазміну в момент повного розчинення згустку фібринолітичною системою плазми крові, що активується t-РА.

Формування згустку ініціює АЧТЧ реагент або TF (Тромборель), n=4.

	АЧТЧ, нМ (NIH од/мл)	TF, нМ (NIH од/мл)
Сумарна амідазна активність Pm	40,1 ± 7,7 (1,4 ± 0,27)	26,55 ± 12,25 (0,94 ± 0,44)
Спонтанна амідазна активність Pm	16,4 ± 7,1 (0,58 ± 0,25)	9,63 ± 0,44 (0,34 ± 0,016)
Плазмінограма амідазної активності Pm	26,0 ± 13,7 (0,93 ± 0,49)	10,7 ± 9,9 (0,38 ± 0,35)
Амідазна активність Pm в момент повного розчинення згустку	15,5 ± 3,0 (0,55 ± 0,11)	9,87 ± 1,15 (0,35 ± 0,041)

1 nM розчин тромбіну має активність 0.0356 NIH/ml.

Таким чином, дослідження зв'язку між стадіями утворення фібринового згустку і динамікою генерації тромбіну і плазміну у плазмі крові людини *in vitro* свідчить про те, що закінчення формування згустку співпадає з початком «спалаху» швидкості активації тромбіну; «спалах» швидкості активації тромбіну, ймовірно, важливий для стабілізації згустку і його поверхні та для активації антизсідальної системи плазми крові; пауза у активації Glu-Pg після формування згустку має анти-фібринолітичну направленість і важлива для стабілізації структури згустку.

У випадку ініціації TF утворення згустку в плазмі крові на стадії формування протофібрил та їхньої латеральної асоціації не спостерігається прояву амідазної активності Glu-Pm на відміну від системи зсідання із очищених протеїнів (Fg, Glu-Pg та t-РА). Це пов'язано з тим, що формування

структури згустку, а саме латеральна асоціація протофібрил у присутності інших протеїнів плазми крові (фібронектину, $\alpha 2$ -AP, фактору Вільбранта, альбуміну, FXIIIa, та ін.) блокує сайти зв'язування Glu-Pg та t-PA на протофібрилах і витісняє формування активаторних комплексів на поверхню фібрил – завершену структуру фібринового згустку. Припускається [80], що α C-регіони полімерного фібрину згустку залучені до активації Glu-Pg t-PA і стають мішенню для початку розщеплення сформованої структури згустку, утворення надлишкової концентрації Glu-Pm і появи його зростаючої амідазної активності, **рис. 3.16 Б.**

Багатоетапність процесу формування фібринового згустку показує, що фібриновий згусток на стадії ініціації активації системи зсідання виконує роль депо тромбіну, що захищає ензим від інактивації інгібіторами та сприяє росту його концентрації для реалізації фази ампліфікації, яка необхідна для завершення стабілізації згустку та генерації в ньому антизсідальної активності. В той же час механізм формування структури згустку блокує утворення активаційної тріади – Glu-Pg–фібрин–t-PA – ендогенної фібринолітичної системи до моменту завершення побудови фібрилярної сітки згустку і витісняє фібринолітичний процес на поверхню фібрил. Це може вказувати на механізм реалізації балансу між процесами формування і розчинення полімерної компоненти фібринового згустку. Ймовірно, що структура фібринового згустку відіграє вирішальну роль у реалізації балансу між процесами формування і розчинення фібринового згустку системами зсідання і фібринолізу гуморальної складової плазми крові.

Показано, що для стадії ініціації і ампліфікації характерна пауза активації плазміногену, що є необхідною умовою для стабілізації структури згустку. Після досягнення точки балансу вирішується доля згустку: чи почнеться його розчинення плазміном, чи згусток залишиться стабільним. У системі з АЧТЧ реагентом і з тканинним фактором величини точок балансу співпадають.

3.5 Розрахунок діаметру та маса/довжина відношення фібрил фібринового згустку.

3.5.1 Турбідиметрична характеристика згустку, що утворюється з фібриногену та плазми крові під дією тромбіну, АЧТЧ-реагенту і TF.

Структурні особливості фібринової сітки згустку, а саме розмір пор і структура фібринових волокон та довжина волокна, діаметр, співвідношення маси до довжини та кількість протофібрил у фібрилі, контролюються багатьма факторами, включаючи концентрації ферментів, швидкість кровотоку та іншими компонентами плазми крові. Окрім того, багато патологічних станів, наприклад інфаркт міокарда, ішемічний інсульт та венозна тромбоемболія призводять до утворення тромбів зі зміненими структурними властивостями. Тому важливо розробити відповідні методи визначення мікроструктури згустків, що утворюються *in vivo*. Турбідиметрія, що базується на вимірюванні каламутності розчинів та гелів на різних довжинах хвиль є широко використовуваним підходом у вивчення будови і функції згустків плазми крові, включаючи тромб і розглядається як перспективний метод для діагностичних та прогностичних оцінок стану системи гемостазу пацієнтів [139-142].

Розглянемо деякі особливості процесу утворення фібринового згустку в плазмі крові, зсідання якої активується АЧТЧ реагентом і отримані турбідиметричні криві, представлені на **рис. 3.17**. Згустки формували в пластикових кюветах, в які послідовно додавали 0,05 М HEPES буфер, що містив 0,15 М NaCl, 0,005% твін-20, (рН 7,4), 40 μ л плазми крові, 50 μ л АЧТЧ-реагенту, 1 мкл TF або 0,1 NIH тромбіну. Процес зсідання плазми ініціювали додаванням 100 мкл 25 мМ CaCl₂.

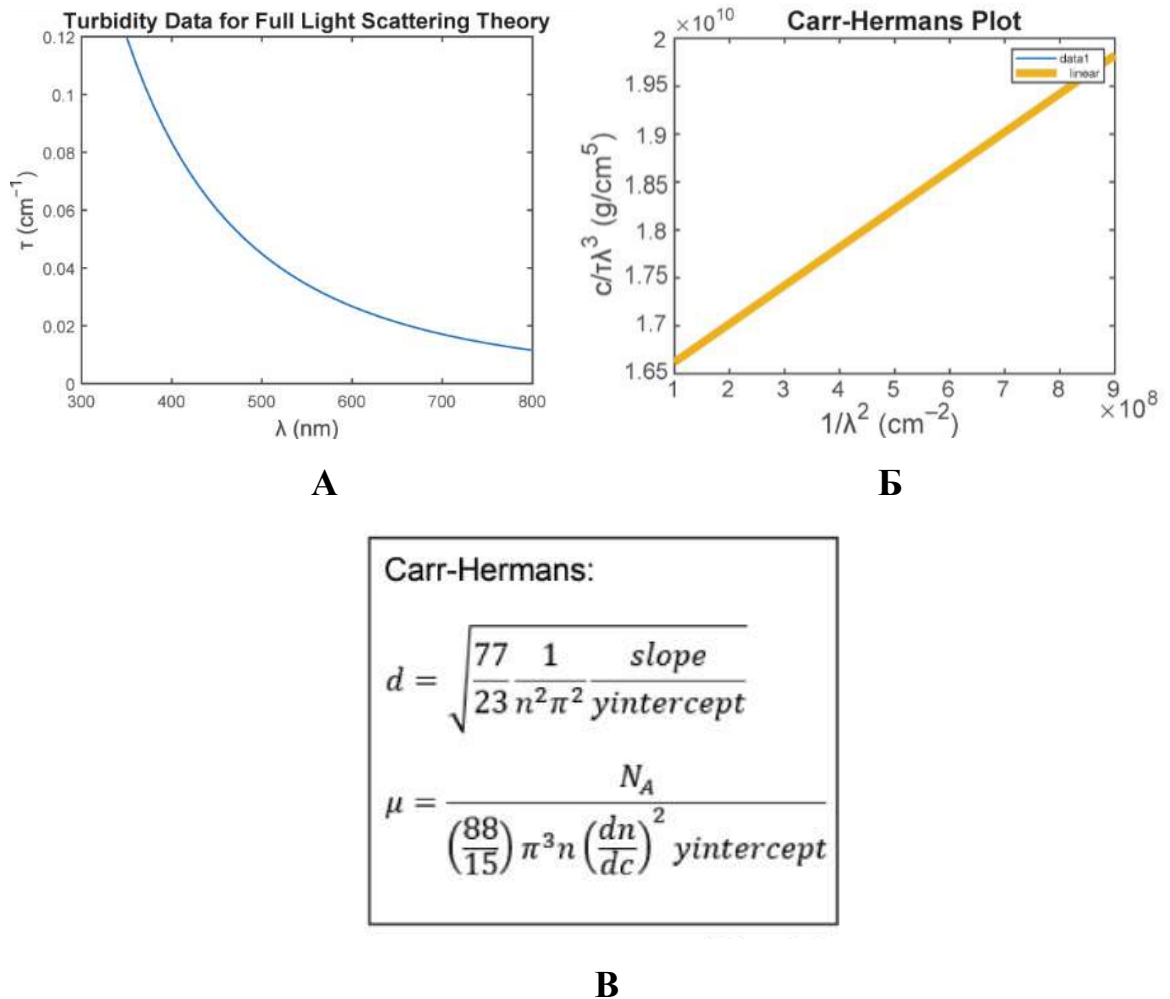


Рис. 3.17. Основні етапи визначення величин d та μ параметрів структури фібринової фібрили з використанням константних значень $n = 1,237$ та $dn/dc = 0.185$ за методом Carr and Hermans [137]. А – графік залежності величини каламутності згустка від довжини хвилі. Б – побудова графіку залежності $C/\tau\lambda^3$ vs $1/\lambda^2$ і апроксимація кривої до лінійної шляхом лінійної регресії. Визначення величин параметрів intercept і slope для кривої графіка Carr and Hermans. В – знаходження величин d та μ параметрів фібринової фібрили з використанням величин intercept і slope параметрів.

Полімеризація розбавленої плазми має деякі особливості. Лаг-період формування згустку, що відповідає часу формування протофібрил, збільшується, а швидкість формування протофібрил зменшується з ростом концентрації фібриногену і протеїнів плазми крові, **таб. 3.5**. Проте швидкість

латеральної асоціації протофібрил зростає зі збільшенням концентрації фібриногену. Це дозволяє припустити, що в розбавленій плазмі швидкість активації внутрішнього шляху зсідання АЧТЧ-реагентом вища за таку в плазмі крові з більш високою концентрацією фібриногена і протеїнів плазми, які є інгібіторами полімеризації фібрину. При цьому підвищення концентрації фібриногену і протеїнів плазми крові гальмує процес росту протофібрил, що призводить до збільшення їхньої довжини і концентрації.

Збільшення довжини і концентрації протофібрил пришвидшує латеральну асоціацію протофібрил і збільшує діаметр фібрил завдяки включенню в протофібрили інших протеїнів плазми, а в цілому – сприяє зростанню каламутності згустку, **рис. 3.18, таб. 3.5**. Слід додати, що величини параметрів процесу зсідання плазми крові збільшуються не лінійно, а з прискоренням, яке пов'язане з активацією факторів зсідання та наявністю компонентів-стимуляторів в каскаді реакцій процесу активації протромбіну.

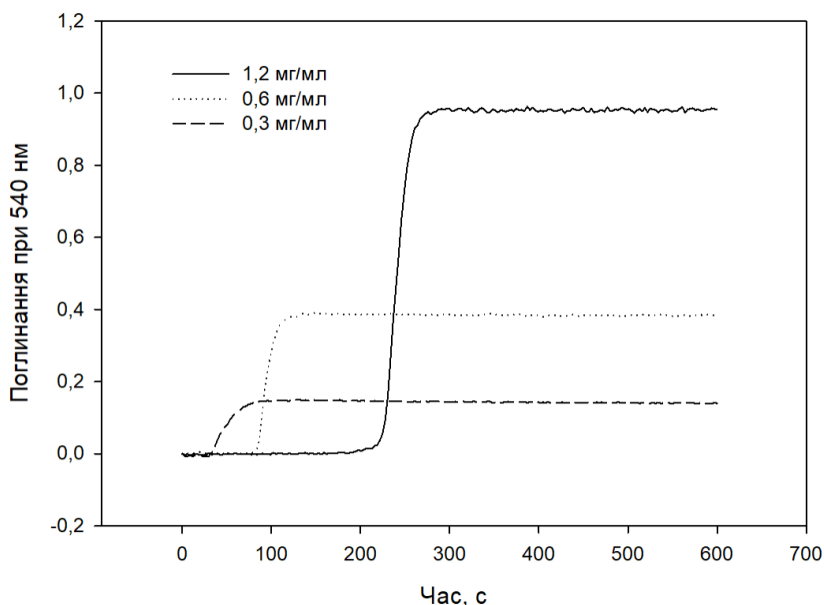


Рис. 3.18. Залежність каламутності турбідиметричних кривих зсідання плазми крові, що ініціюється АЧТЧ реагентом, від концентрації фібриногену і плазми крові (n=3).

Таблиця 3.5.

Залежність величини параметрів кривої зсідання крові, ініційованого АЧТЧ-реагентом, і концентрацією фібриногену в плазмі крові.

Fg, мг/мл	0,3	0,6	1,2
τ, с	30±6	82±11	221±35
V, 1/см*с	0,0033±0,0007	0,0058±0,00015	0,031±0,008
H, см⁻¹	0,15±0,02	0,39±0,11	0,960±0,107

Використовуючі отримані турбідиметричні криві каламутності згустків, ліанерізовані за допомогою функції лінійної регресії та константні величини n та (dn/dc) , визначали за рівняннями Carr and Hermans величини параметрів d і μ фібринових фібрил і кількість в них протофібрил, **таб. 3.6**.

Стабільні фібринові згустки плазми крові отримали, інкубуючи сформовані під дією АЧТЧ, TF реагентами або тромбіном згустки в плазмі крові донорів протягом 30 хв при кімнатній температурі. За цей час формуються частково прошиті фактором XIIIa фібрили фібринової сітки. Далі були зареєстровані турбідиметричні криві розсіювання світла згустками в діапазоні довжин хвилі від 500 до 820 нм з використанням СФ 2000 спектрофотометра, **рис. 3.19**.

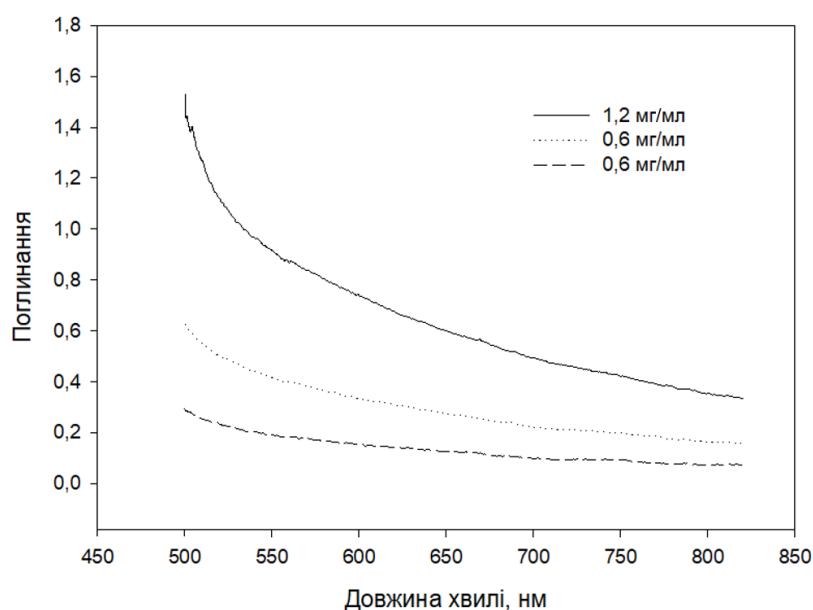


Рис. 3.19. Залежність каламутності згустків плазми крові донорів, утворення яких ініційоване АЧТЧ реагентом, від довжини хвилі в межах 500 до 820 нм.

Для визначення проміжних параметрів intercept і slope, необхідних для розоахунку величин d і μ фібринових фібрил, важливо було побудувати графіки Carr і Hermans в координатах $C/\tau\lambda^3$ vs $1/\lambda^2$. З використанням програми SigmaPlot були розраховані величини цих виразів, і побудовані графіки залежності $C/\tau\lambda^3$ від $1/\lambda^2$, **рис. 3.20**. Отримані криві були лінеаризовані за допомогою функції лінійної регресії. Величини Intercept складала $1 \cdot 10^{9-10}$ g/cm⁵. Величину tg кута нахилу кривої до осі X-ів – slope, знаходили, використовуючи координати двох точок на лінеаризованій кривій [97]:

$$\text{Slope} = \frac{Y_2 - Y_1}{X_2 - X_1}, \text{ g/cm}^3 \quad (3.1)$$

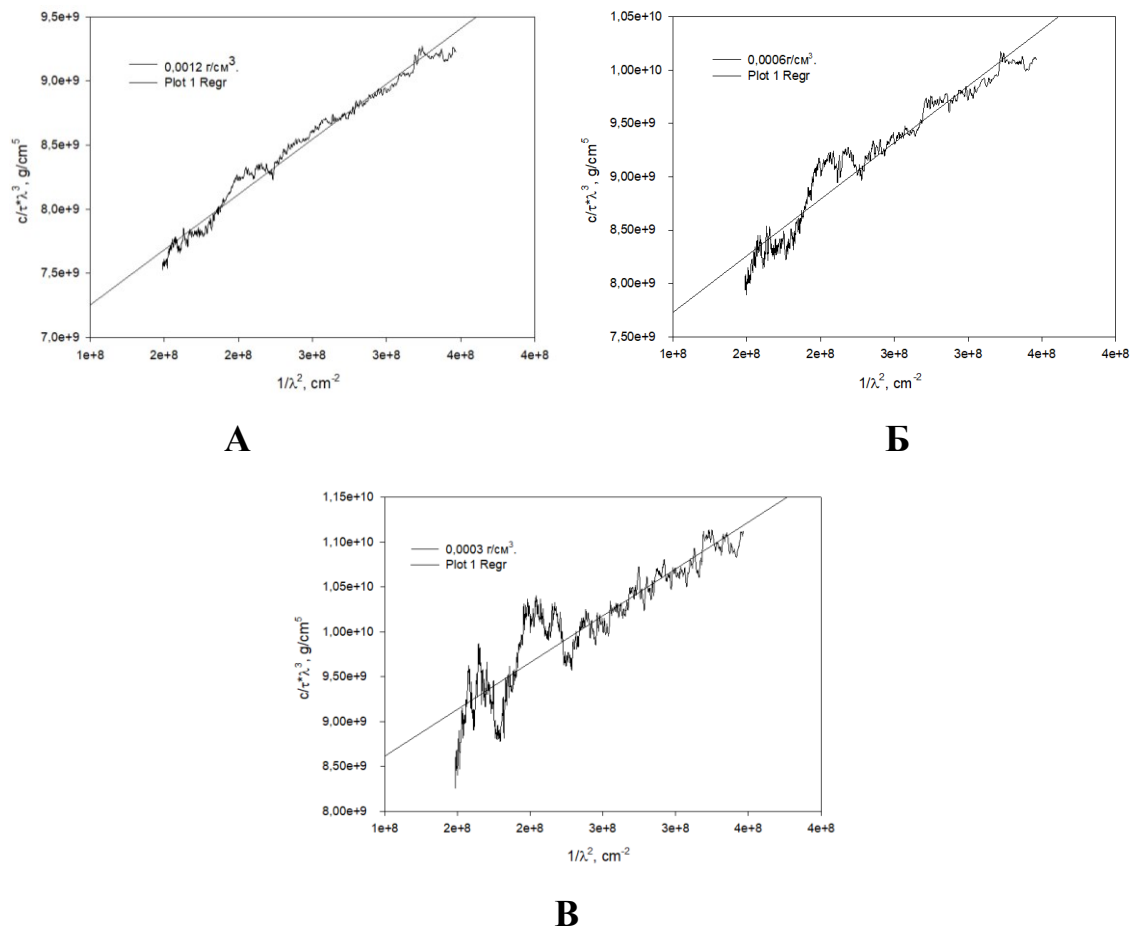


Рис. 3.20. Графік Carr-Hermans, що лінеаризує турбідиметричні дані для визначення величин d і μ в плазмі крові, ініціалізованої АЧТЧ реагентом. Концентрація фібриногену: А) 1,2 мг/мл; Б) 0,6 мг/мл; В) 0,3 мг/мл.

Вводячи константні значення коефіцієнту заломлення води та приросту коефіцієнту заломлення води, відповідно $n = 1,327$ та $(dn/dc) = 0,1895$ у формулу для розрахунку діаметра фібринової фібрили, наведеної у **рис. 3.17 В**, отримуємо значення їх діаметрів у см, **рис. 3.20**. Для переведення у нанометри перемножуємо на 10^{-7} ($1 \text{ см} = 1 \cdot 10^7 \text{ nm}$). В **таб. 3.6** подані параметри, які характеризують стуктуру фібрил в згустках плазми, зсідання якої ініціалізовано АЧТЧ, тканинним фактором та тромбіном.

Таблиця 3.6.

Параметри ліанерізованих кривих залежності $C/\tau\lambda^3$ від $1/\lambda^2$ та розрахованих на їх основі величин діаметру фібрил (d) і відношення маса-довжина (μ) для фібрил згустків плазми крові, зсідання яких було ініційовано тромбіном, АЧТЧ реагентом та тканинним фактором.

	АЧТЧ 50 мкл			TF^a 1 мкл		ТРОМБІН^b 0,25 НІН/мл	
Fg, мг/мл	0,3	0,6	1,2	0,5	1	0,5	1
Intercept, г/см⁵	8,6 *10 ⁹	7,7 *10 ⁹	7,25 *10 ⁹	18,3 *10 ⁹	19,8 *10 ⁹	2,71 *10 ¹⁰	2,71 *10 ¹⁰
Slope, г/см³	1,1	9,2	8,7	6,2	95,2	53,5	62,5
d, нм	48	150	150	79	314	193	201
μ, Да/см *10¹²	6,1	6,8	7,2	2,9	2,7	1,9	2,0
n	41	47	50	21	19	13	14

*а – тканинний фактор фірми Simens Tromborel; b – фібриноген фірми Simens.

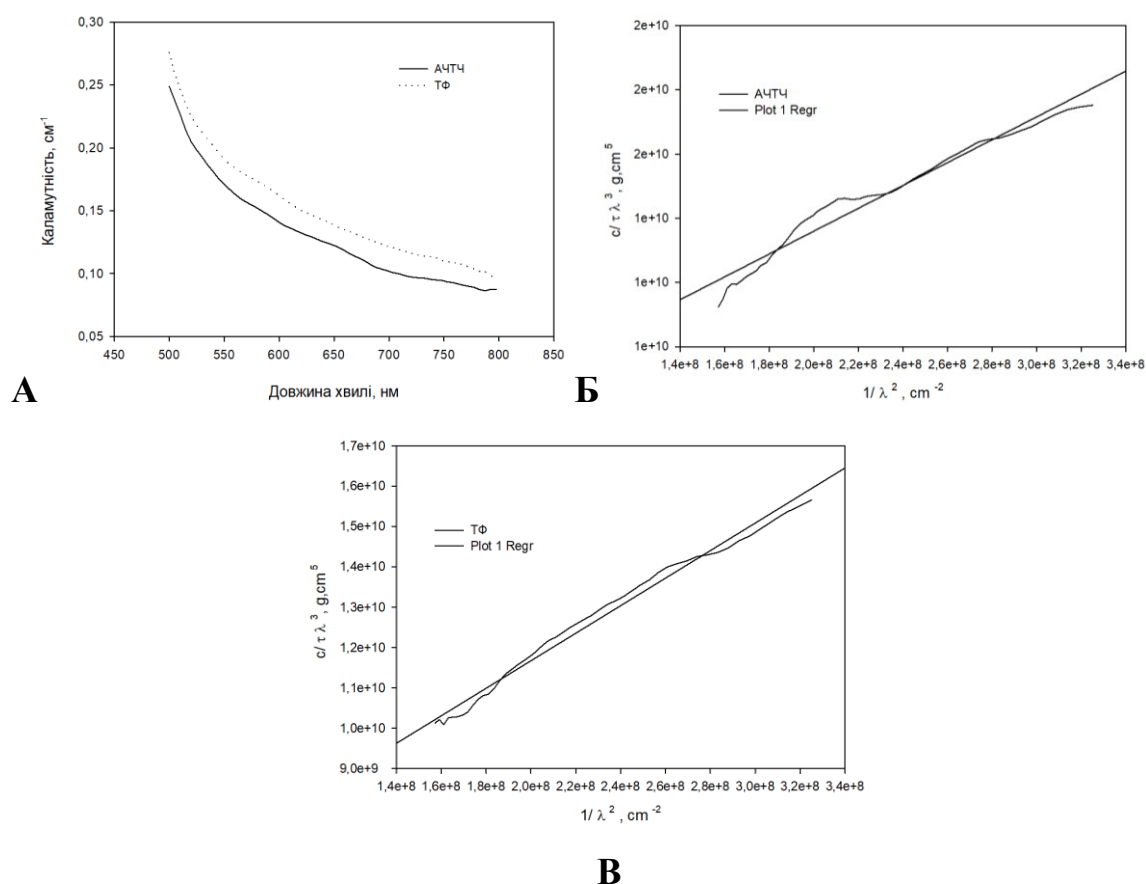


Рис. 3.21. Турбідиметричні криві залежності каламутності згустків, зсідання яких ініціюється АЧТЧ реагентом та ТФ і графіки Carr-Hermans, що лінеарізують турбідиметричні дані для визначення величин d і μ у згустках плазми крові, згортання якої ініційовано АЧТЧ-реагентом або ТФ. Концентрація фібриногена в плазмі – 0,5 мг/мл.

Наведені в **таблиці 3.6** дані дозволяють розглянути протофібрилярну структуру фібрил фібринових згустків, формування яких у плазмі крові ініціювали тромбіном, АЧТЧ реагентам або тканинним фактором.

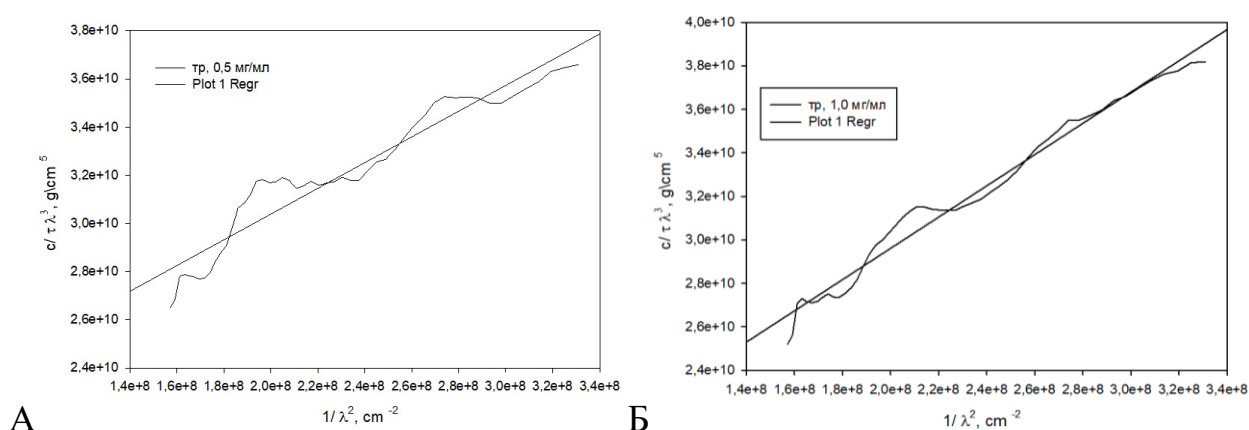


Рис. 3.22. Турбідиметричні криві залежності каламутності згустків, зсідання яких ініціюється тромбіном і графіки Carr-Hermans, що лінеарізують турбідиметричні дані для визначення величин d і μ . Концентрація фібриногена в плазмі – 0,5 (А) і 1,0 мг/мл (Б).

Аналіз даних, представлених в **таблиці 3.6**, свідчить, що діаметр фібринових фібрил знаходиться межах 14-314 нм, що співпадає з даними літератури. Тромбін формує найтовщі фібрили (~ 200 нм), проте найменшої щільності ~ 14 протофібрил на фібрилу. Найбільша щільність протофібрил у фібрилах спостерігалась у плазмі крові здорових донорів ініційованої АЧТЧ реагентом, де кількість протофібрил і величина параметру маса-довжина були найбільшими. У такій плазмі АЧТЧ реагент з ростом концентрації фібриногену сприяв формуванню товстих фібрил (48, 150, 150 нм), з більшою кількістю протофібрил (41, 47, 50) і при цьому величина маса-довжина параметру майже не змінювалась.

Цікавим аспектом **таблиці 3.6** є те, що зі скороченням в плазмі крові шляху активації системою зсідання протромбіну від АЧТЧ–калікреїн–FXIa–FIXa–FXa–протромбін–тромбін і TF-FVIIa–FIXa–FXa–протромбін–тромбін до тромбіну структура згустку змінюється від тонших фібрил до більш товстих з меншою кількістю протофібрил і меншою величиною маса-довжина параметру. Це спостереження дозволяє зробити припущення про те, що тромбін формує згустки з меншою щільністю протофібрил у фібрилах, які

мають меншу міцність і стійкість до фібринолізу. Тому величини d і μ параметрів можуть бути потенційними показниками механічної міцності згустку і його стійкості до дії фібринолітичної системи плазми крові.

Для характеристики динаміки формування та розчинення згустку важливим було прослідкувати зміну діаметру фібринових фібрил, їх кількості та величини маса/довжина параметру. Для цього були записані спектри залежності величини каламутності згустку від довжини хвилі в різні моменти часу формування та розчинення згустку. Згустки формували при розведенні плазми 1:10 з кінцевою концентрацією фібриногена 0,3 мг/мл і активності t-РА 10 IU/мл. Спектри були записані на 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000 та 2500 с інкубації згустку. На **рис. 3.23 А** запису спектру позначені стрілкою. Діаметри фібрил показані в **таблиці 3.7**.

Приведена на **рис. 3.23 А** турбідиметрична крива одночасно є і плазмінотограмою, оскільки демонструє криву, яка має невелику відмінність від приведених рвніше плазмінотрам. На 800 с спостерігається невелике відхилення кривої мутності, яка далі починає повільно зростати. В цей момент, як ми вважаємо, досягається точка рівноваги процесів зсідання та розчинення згустку і починається активація Glu-Pg у плазмін, що супроводжується відщепленням 45 кДа α C-регіонів (224-610) з послідуною взаємодією з E регіоном ДДЕ тріади, що призводить до ущільнення останньої і збільшення каламутності згустку. З цього моменту і до 2500 с продовжує наростати концентрація і активність Glu-Pm, руйнується, але не розпадається структура згустку і відбувається трансформація Glu-Pm у Lys-форму, яка скріплює і утримує фрагменти фібрили до моменту розпаду. Доказом цього є потужний “сплеск” мутності на тромбограмі на 3000 с, коли відбувається розпад структури згустку. Важливим фактом є утримання згустком фібрилярної структури у цілісності майже до моменту розпаду, про що свідчать діаметри фібрил.

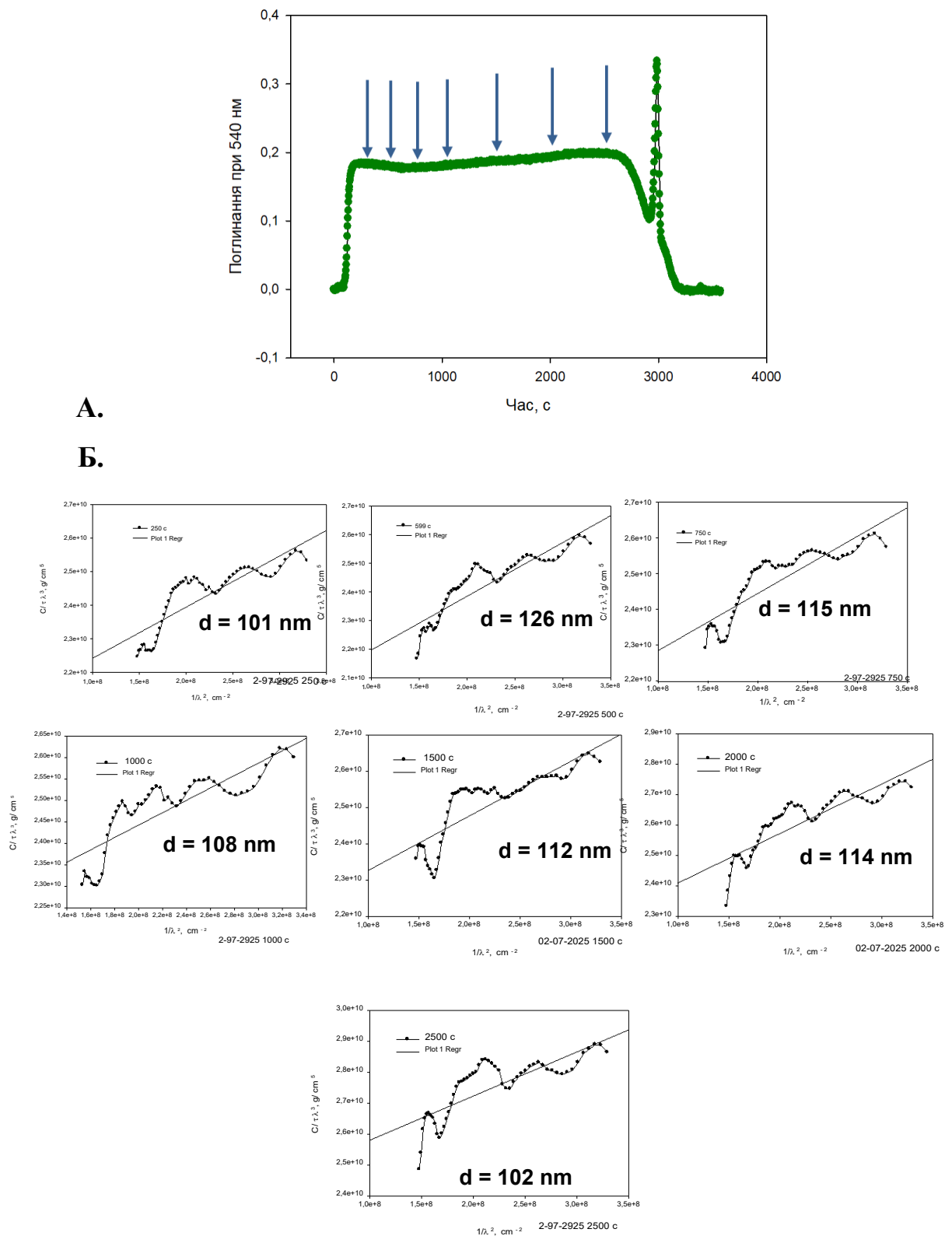


Рис. 3.23. Аналіз протофібрилярної структури згустку, зсідання якого ініціюється TF і який формується і розчиняється фібринолітичною системою плазми крові, що активується t-PA (10 IU/ml) *in situ*. Крива каламутності згустку, Б – криві визначення d протофібрил в указані моменти часу ($n=3$).

Таблиця 3.7.

Параметри фібрил фібринової сітки згустку плазми крові, що ініціюється TF і розчиняється під дією t-PA (10 IU/ml).

t, c	250	500	750	1000	1500	2000	2500
d, nm	101	126	115	108	112	114	102
Intercept, 1*10¹⁰ г/см	2,2	2,2	2,3	3,35	2,32	2,4	2,6
μ, Da/cm *10¹¹	1,9	1,9	2	2,04	2,01	2,08	2,25
n	32	32	30	29	28	29	27

Існує думка, що каламутність згустка не пов'язано з його структурою [139-142]. Автори вважають, що одно-хвильова турбідиметрія не є структурним методом, а скоріше визначає концентрацію фібриногену. Однак, фібринографія, реєструючи останній етап коагуляційного каскаду, може бути використана для оцінки стану системи гемостазу за гіпо- чи гіперкоагуляційних захворюваннях.

Таким чином, для плазми крові, зсідання якої ініціюється АЧТЧ реагентом, TF або тромбіном, визначені величини d і μ параметрів знаходяться в межах, описаних в літературі. Знайдено, що у плазмі, зсідання якої ініціюється АЧТЧ реагентом, формуються фібрили більшого діаметру з найбільшою щільністю протофібрил. У плазмі, зсідання якої ініційоване тромбіном, формуються найтовщі фібрили з найменшою щільністю протофібрил. Показано, що в плазмі крові зі скороченням шляху активації системи зсідання від АЧТЧ, TF до тромбіну збільшується діаметр фібрил проте зменшується в них кількість протофібрил і величина маса/довжина параметру.

Висловлено припущення про те, що параметр щільність протофібрил у фібрилі, який вказує на механічну міцність і стійкість до фібринолізу згустку, потенційно може бути використаний для діагностичних цілей.

3.6 Характеристика стану системи гемостазу пацієнтів з опіками

Рани та ураження органів і тканин при опіках супроводжуються тривалим перебігом запальних реакцій, що значно ускладнює лікування та погіршує загальний стан постраждалих. Травматичне ушкодження тканин у поєднанні зі стресовою відповіддю організму спричиняє передусім активацію системи гемостазу, формуючи стан гіперкоагуляції як у серцево-судинній системі, так і на рівні організму загалом.

Завданням дослідження було відстеження змін функціонального стану системи гемостазу у постраждалих від моменту госпіталізації до відділення невідкладної допомоги та впродовж двох тижнів лікування в опіковому стаціонарі. Оцінку стану гемостазу здійснювали із використанням високоспецифічних молекулярних маркерів коагуляційної та фібринолітичної ланок, зокрема розчинного фібрину (SF), D-димеру (DD) та рівня фактора X системи зсідання крові. Для аналізу динаміки утворення і лізису згустків, а також співвідношення між коагуляційними та фібринолітичними процесами застосовували турбідиметричний метод вимірювання параметрів формування і розчинення згустків плазми крові (ТДК).

Гемостатичний потенціал плазми крові визначали турбідиметричним методом шляхом реєстрації розсіяння світла фібриновим згустком при 405 нм на мікрорідері Multiscan. Згусток формували у лунках мікропланшету, в які послідовно додавали 0,05 М HEPES буфер, рН 7,4, що містив 0,15 М NaCl, 70 мкл плазми крові, t-РА до кінцевої концентрації 75 IU/мл і АЧТЧ реагент.

Процес зсідання плазми ініціювали додаванням 25 мМ CaCl_2 . Кінцевий об'єм реакційної суміші становив 300 мкл.

Концентрацію розчинного фібрину і D-димеру в плазмі крові визначали з застосуванням імуноферментного аналізу за допомогою тест-систем, розроблених в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України (**рис. 3.24, рис. 3.26, рис. 3.28, рис. 3.30**) [143, 144].

Було проаналізовано стан системи гемостазу 4 пацієнтів із різним ступенем опікового ураження. Пацієнт 1 отримав загальну високовольтну електротравму, електроопіки II-III ст, уражено 6% верхніх кінцівок, тулуба, сідниць, правої стопи. На **рис. 3.24** показані рівні молекулярних маркерів стану системи гемостазу – розчинного фібрину (SF) і D-димеру (DD) на 4й день після опікової травми (08.11), на 8-й (12.11) та на 17-й день (21.11).

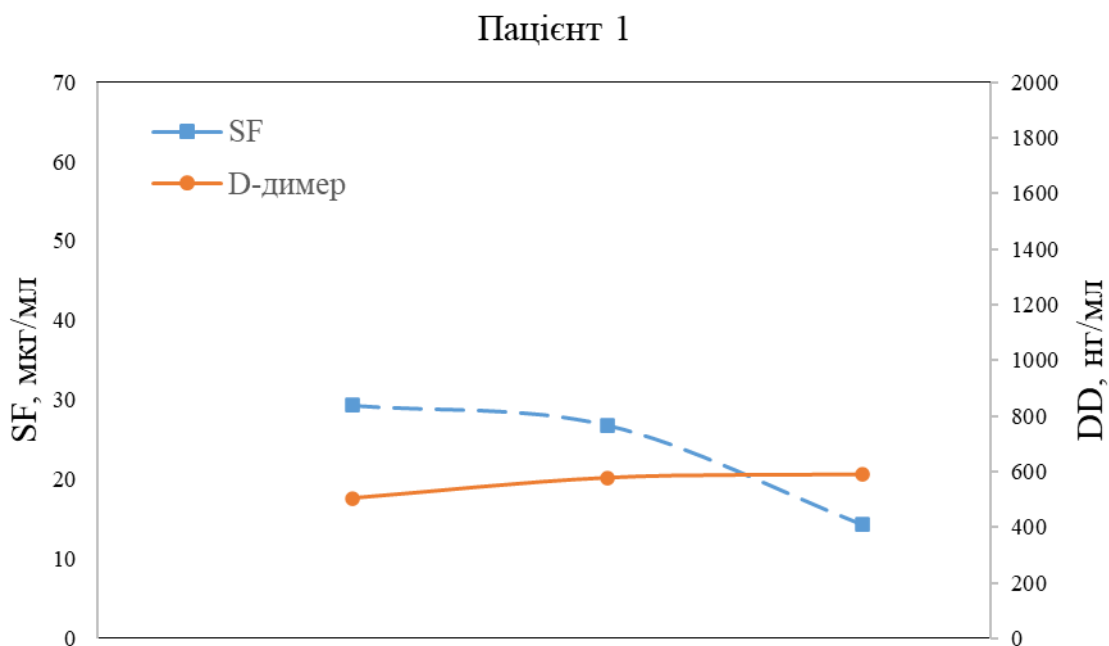


Рис. 3.24. Концентрації молекулярних маркерів, що характеризують стан системи зсідання (SF) та системи фібринолізу (DD) пацієнта 1 (по осі X точки відображають дні від госпіталізації).

Таблиця 3.8

Відношення концентрації молекулярних маркерів пацієнта 1 до
концентрації у донорів.

	SF, мкг/мл	DD, нг/мл	FX, %
Контроль	3	50	100
8.11	$29,3/3 = 9,8$	$504/50 = 10$	$120/100 = 1,2$
12.11	$26,8/3 = 8,9$	$577/50 = 11,5$	$130/100 = 1,3$
21.11	$14,3/3 = 4,8$	$589/50 = 11,8$	$140/100 = 1,4$

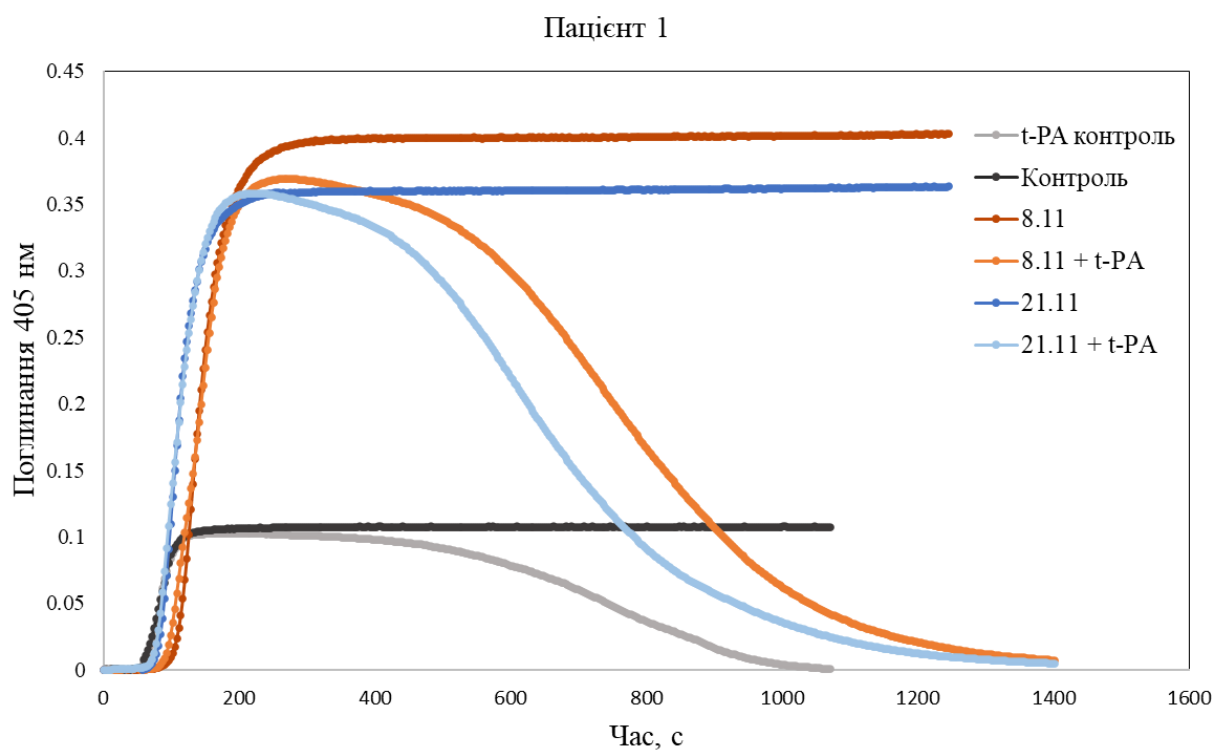


Рис. 3.25. Турбідиметричні криві формування і розчинення згустку у присутності і відсутності t-PA у донорів та пацієнта 1 на 4й та на 17й день після отримання опікової травми.

Таблиця 3.9

Величини параметрів ТДК плазми крові пацієнта 1, виражені відносно
відповідних значень у донорів

	τ, с	τ, с + t- РА	ЗП	ЗГП	ФП	Н	Н + t-РА
Контроль	54	54	106	65	40	0,1	0,1
8.11	1,72	1,55	4,77	3,69	6,52	3,75	3,61
12.11	1,23	1,23	4,41	3,13	6,4	3,37	3,5

Концентрація розчинного фібрину (**рис. 3.24, таб. 3.8**) у пацієнта на час відбору крові майже на порядок перевищує норму і знаходилася на рівні 29,8 μг/мл. На 17-й день його рівень зменшився удвічі. В той же час концентрація D-димеру перевищила норму у 11,8 разів. Зменшення концентрації розчинного фібрину вказує на зменшення активності процесів зсідання в плазмі крові, а зростання концентрації D-димеру свідчить про активацію системи фібринолізу, що спрямовано на розчинення згустків, утворених під час закриття рани. Напрямки цих процесів вказують на зменшення запального процесу та збалансоване функціонування системи гемостазу в плазмі крові.

В той же час рівень фібриногену, на який вказує мутність згустку (параметр Н), майже не змінився, (**рис. 3.25, таб. 3.8 та 3.9**). Можна припустити, що фібриноген перемикається з закриття рани на участь у процесах регенерації органів і тканин, що їх утворюють, формування разом з іншими протеїнами матриць і судин мікроциркуляторної системи – капілярів, артеріол і венул.

Слід відмітити, що збільшення лаг-періоду формування протофібрил, що пов'язано з ростом концентрації фібриногену, та подовження часу існування згустку на ~300 с з 1100 до 1400 с, що, ймовірно, пов'язано з підвищеною концентрацією інгібіторів (α2-AP, PAI-1) у плазмі крові пацієнта.

Важливо відмітити незначний рівень активності фактору X системи гемостазу, що вказує на низький рівень факторів запалення, які ініціюють генерацію тромбіну.

Таким чином, система гемостазу пацієнта 1 на початку досліджень знаходиться у зоні гіперкоагуляції за концентраціями розчинного фібрину та D-димеру та гемостатичними потенціалами ТДК. Проте можна відмітити тенденцію зрушень у напрямку до відновлення стану рівноваги в системі гемостазу.

Пацієнт 2 отримав опік окропом I-II А ступеню, уражено 20% поверхні тіла, передня черевна стінка, обидва стегна, зовнішні статеві органи. На **рис. 3.26** показані рівні молекулярних маркерів стану системи гемостазу – розчинного фібрину і D-димеру на 2й день після отримання опікової травми (06.11) та через тиждень (12.11).

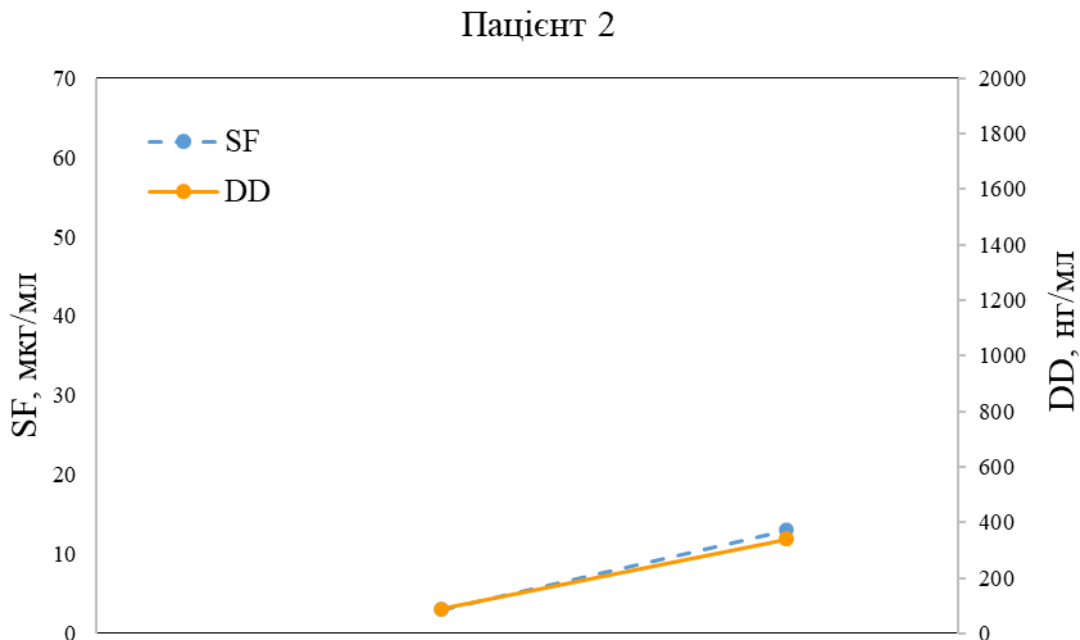


Рис. 3.26. Концентрації молекулярних маркерів, що характеризують стан системи зсідання (SF) та системи фібринолізу (DD) плазми крові пацієнта 2 (по осі X точки відображають дні від госпіталізації).

Таблиця 3.10

Відношення концентрації молекулярних маркерів пацієнта 2 до
концентрації маркерів у донорів.

	SF, мкг/мл	DD, нг/мл	FX, %
Контроль	3	50	100
06.11	$3/3 = 1$	$88/50 = 1,76$	$62/100 = 62 \%$
12.11	$13/3 = 4,33$	$340/50 = 6,8$	$126/100 = 126\%$

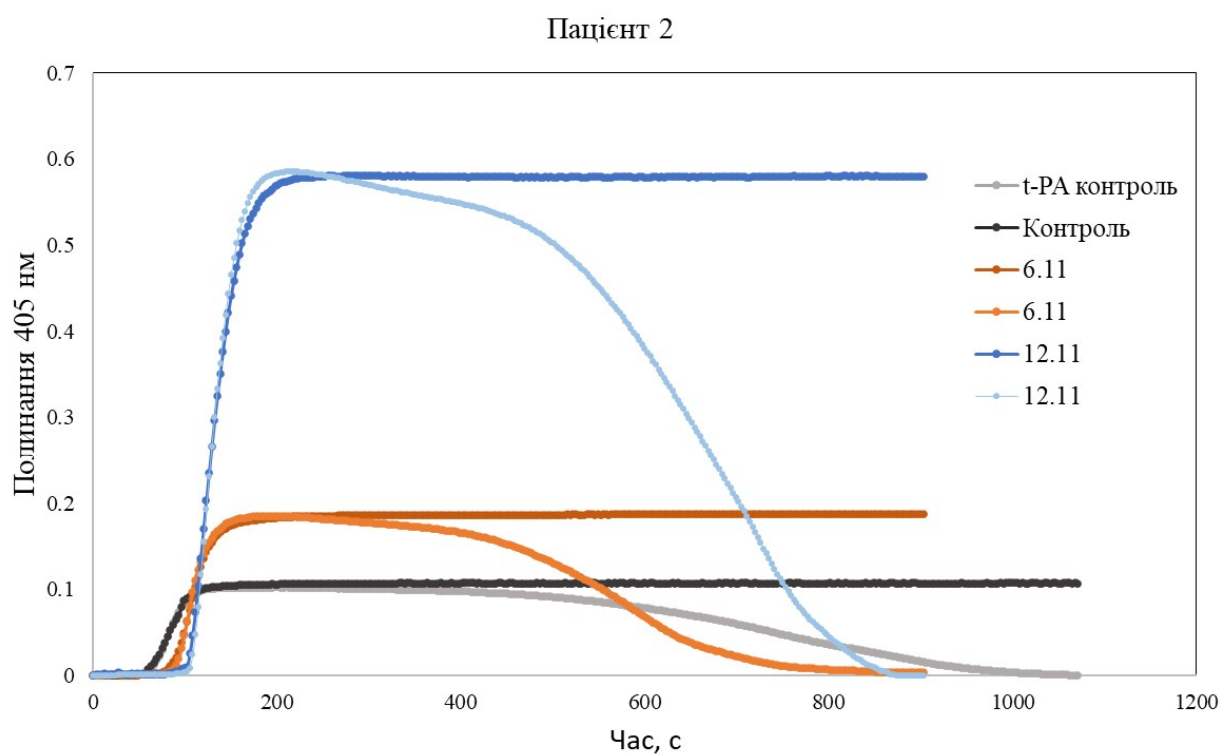


Рис. 3.27. Турбідиметричні криві формування і розчинення згустку у присутності і відсутності t-РА у донорів та пацієнта 2 на 2й та на 7й день після отримання опікової травми.

Таблиця 3.11

Величини параметрів ТДК плазми крові пацієнта 2, виражені відносно
відповідних значень у донорів

	τ, с	τ, с + t-PA	ЗП	ЗГП	ФП	Н	Н + t- PA
Контроль	54	54	106	65	40	0,1	0,1
06.11	1,5	1,5	1,4	1,27	1,6	1,72	1,81
12.11	1,83	1,88	4,2	4,23	3,93	5,48	5,73

Пацієнт 2 отримав опік, що не супроводжувався пошкодженням органів чи тканин організму. Тому на час відбору крові концентрації молекулярних маркерів та параметри ТДК були близькими до норми, за винятком фактору Х, концентрація якого у плазмі крові впала до 62% від норми. Ймовірно, це могло бути пов'язаним зі стресом. Також скоротився час існування згустку на ~200 с, збільшився час формування протофібрил у 1,5 рази і у 1,7-1,8 рази зросла каламутність згустку.

На турбідиметричній кривій привертає увагу зменшення фібринолітичного потенціалу у порівнянні зі зсідальним потенціалом і ЗГП, **таблиця 3.12**, збільшення нахилу кривої на відрізку розчинення фібринового згустку та зменшення часу існування згустку (**рис. 3.28**).

Отримані дані вказують на те, що фібринолітичний потенціал плазми крові перевищує її інгібіторну здатність, що може свідчити про активний процес регенерації тканин.

Пацієнт 3 отримав загальну високовольтну електротравму (електроопік), II-III ступеню, 2%, обох кінцівок. На **рис. 3.28** показані рівні молекулярних маркерів стану системи гемостазу – розчинного фібрину і D-димеру на 4й день після опікової травми (08.11), на 8-й (12.11) та на 17-й день (21.11).

Таблиця 3.12

Відношення концентрації молекулярних маркерів пацієнта 3 до
концентрації у донорів.

	SF, мкг/мл	DD, нг/мл	FX, %
Контроль	3	50	100
08.11	$18/3 = 6$	$454/50 = 9,08$	$62/100 = 62 \%$
12.11	$25,5/3 = 8,5$	$917/50 = 18,3$	$126/100 = 126\%$
21.11	$65/3 = 21,7$	$4000/50 = 80$	$110/100 = 110\%$

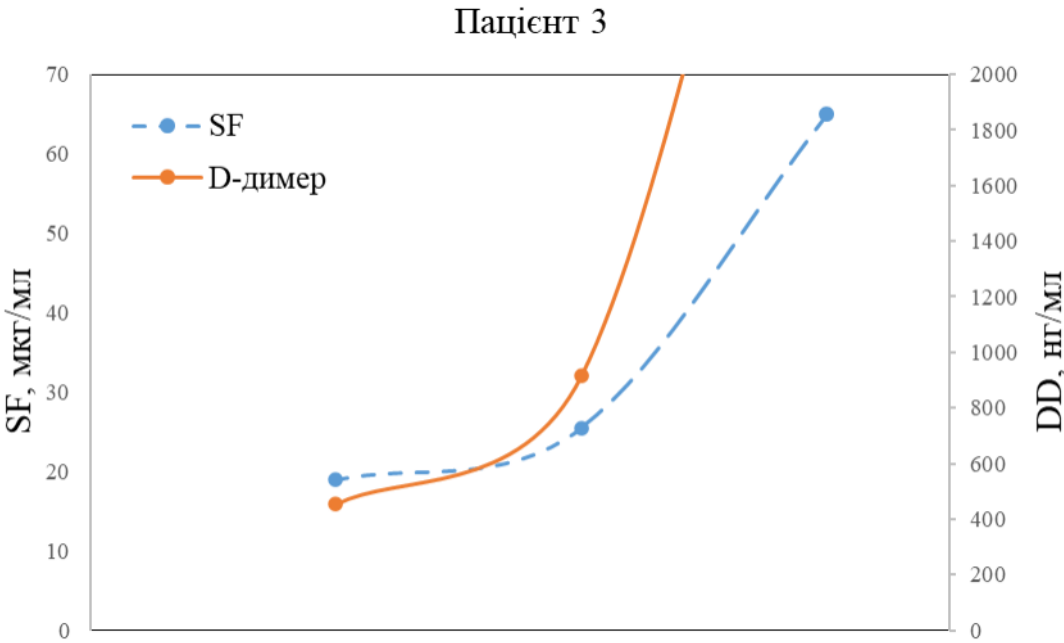


Рис. 3.28. Концентрації молекулярних маркерів, що характеризують стан системи зсідання (SF) та системи фібринолізу (DD) плазми крові пацієнта 3 (по осі X точки відображають дні від госпіталізації).

Таблиця 3.13

Величини параметрів ТДК плазми крові пацієнта 3, виражені відносно
відповідних значень у донорів

	τ, c	$\tau, c + t-PA$	ЗП	ЗГП	ФП	Н	Н + t-PA
Контроль	54	54	106	65	40	0,1	0,1
08.11	1,16	1,22	1,27	3,04	4,02	4,18	3,76
12.11	—	—	—	—	—	—	—
21.11	1,22	1,22	3,68	2,68	4,02	3,87	3,53

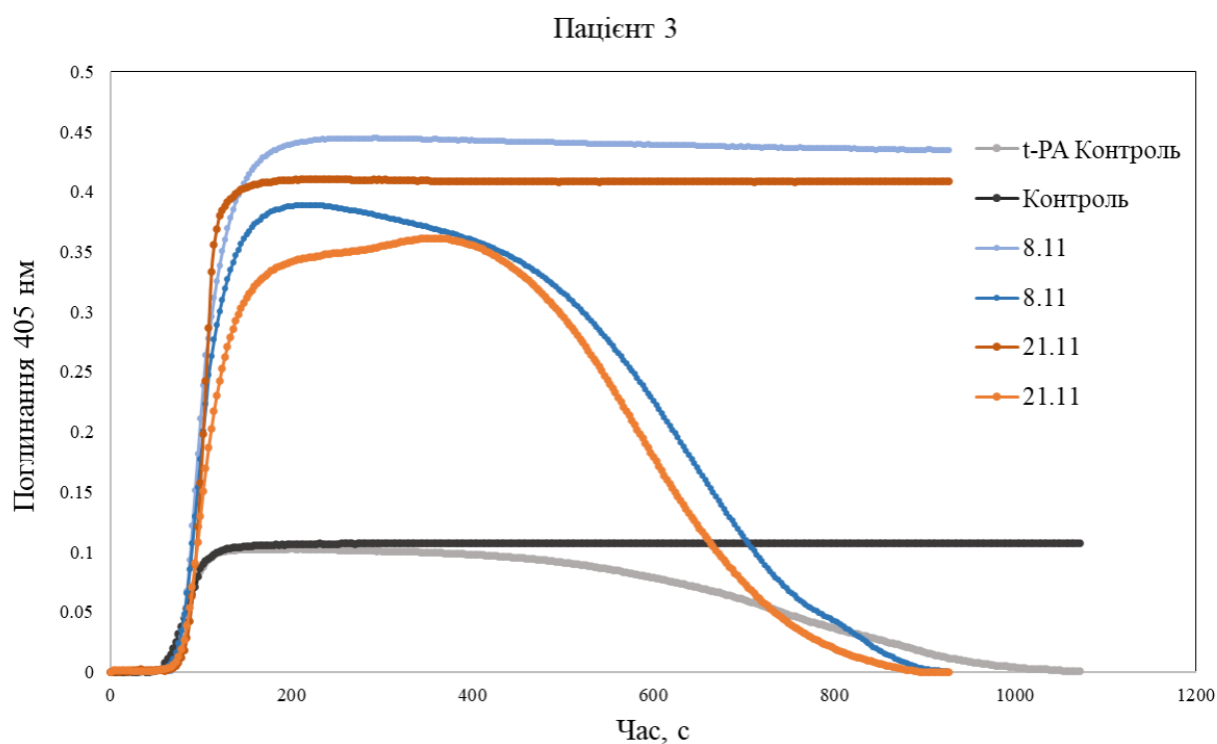


Рис. 3.29. Турбідиметричні криві формування і розчинення згустку у присутності і відсутності t-PA в плазмі крові у донорів та пацієнта 2 на 4й та на 8й день після отримання опікової травми.

На час забору крові у постраждалого пройшло 4 доби після отримання електротравми і опіку кінцівок. За 4 доби концентрація SF зросла у 6 разів, D-

димеру у 9,1 разів, а активність FX зменшилася до 62% від норми, **таблиця 3.12**. Ймовірно, що зміни в концентраціях сталися за рахунок протеїнів гострої фази системи гемостазу крові та стресу організму в цілому. За 5 наступних діб концентрація SF зросла мало, D-димеру збільшилася у 2 рази, а активність FX зросла на 26 % більше норми, **таблиця 3.12**.

Різке підвищення концентрацій молекулярних маркерів відбулося за наступні 9 діб, що можна пояснити приєднанням процесу запалення до реакції системи гемостазу. Концентрація SF зросла у 21,7 рази, D-димеру збільшилася у 80 разів, а активність FX зросла на 10 % від норми, **таблиця 3.12**. Можна припустити, що підвищення концентрації SF відбувається за рахунок вивільнення у кров тканинного фактору, який міститься у мікроезикалах тромбоцитів, ендотеліоцитів, клітин крові, у першу чергу лейкоцитів, що ініціює спалах у генерації тромбіну і як наслідок росту розчинного фібрину. Стрибок у концентрації D-димеру відбувається за рахунок росту SF як субстрату протеїназ клітин крові і активації фібринолітичної системи.

Слід відмітити незвичну форму ТДК, отриманої для плазми крові від 21.11 (**рис. 3.29**). «Пагорб» на ТДК, що з'являється на 400 с у фазі розчинення згустку плазми крові вказує на наявність Ліз-форми плазміногену і Ліз-плазміну. Це вказує на зменшення інгібіторної активності плазми крові пацієнта, а саме концентрації $\alpha 2$ -АР та PAI-1 і участь фібринолітичної системи в протеолітичних процесах.

Пацієнт 4 отримав опік полум'ям II-III ступеню, 18% лівої верхньої кінцівки, тулуба. На **рис. 3.30** показані рівні молекулярних маркерів стану системи гемостазу – розчинного фібрину і D-димеру на 1й день після опікової травми (12.11), на 10-й (21.11) та на 19-й день (30.11).

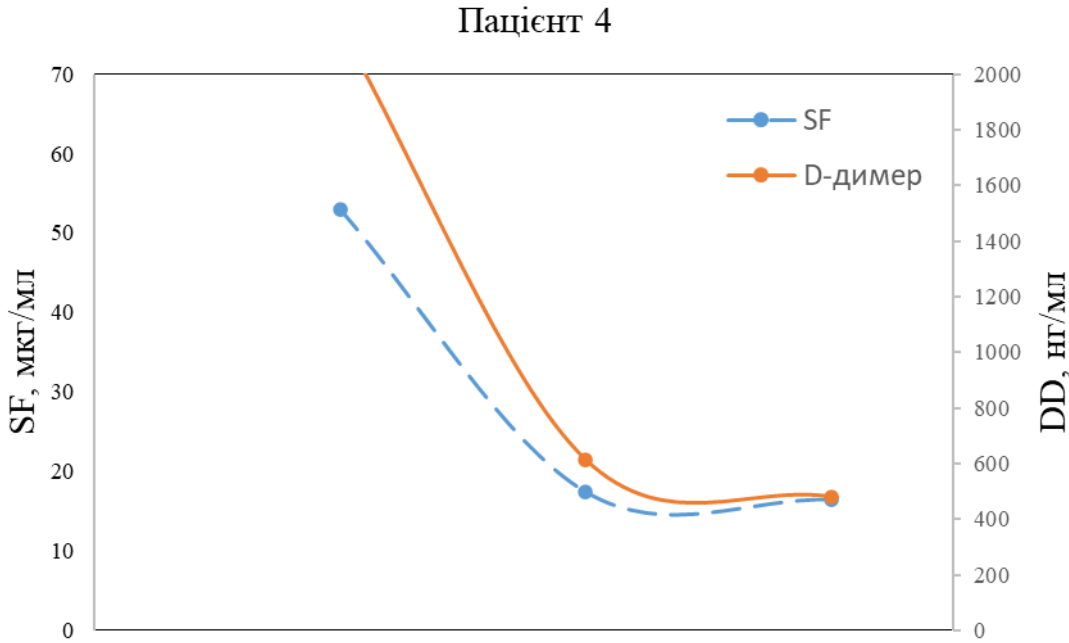


Рис. 3.30. Концентрації молекулярних маркерів, що характеризують стан системи зсідання (SF) та системи фібринолізу (DD) пацієнта 4 (по осі X точки відображають дні від госпіталізації).

Таблиця 3.14

Відношення концентрації молекулярних маркерів в плазмі крові пацієнта 4 до концентрації в плазмі крові донорів

	SF, мкг/мл	DD, нг/мл	FX, %
Контроль	3	50	100
12.11	$53/3 = 17,6$	$2170/50 = 43,4$	$75/100 = 75 \%$
21.11	$17,5/3 = 5,83$	$614/50 = 12,3$	$105/100 = 105\%$
30.11	$16,5/3 = 5,5$	$480/50 = 9,6$	$84/100 = 84\%$

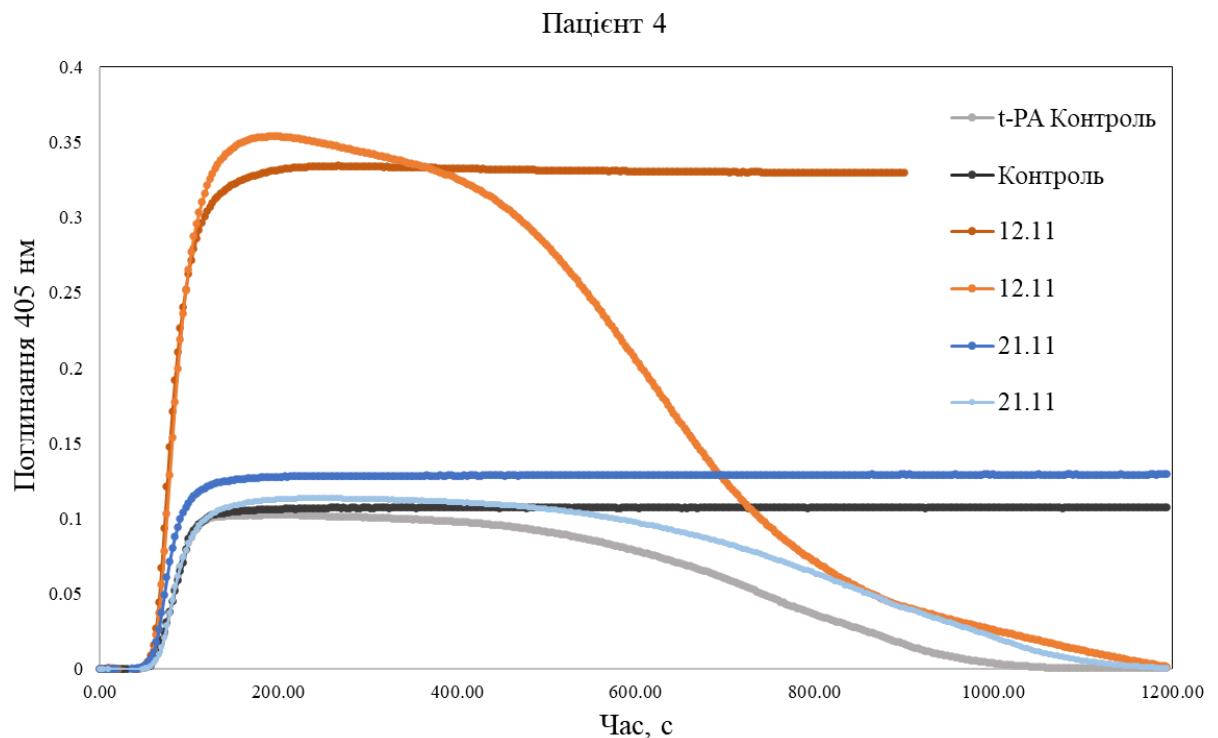


Рис. 3.31. Турбідиметричні криві формування і розчинення згустку у присутності і відсутності t-PA в плазмі крові у донорів та пацієнта 2 на 4й та на 8й день після отримання опікової травми.

Таблиця 3.15

Величини параметрів ТДК плазми крові пацієнта 4, виражені відносно відповідних значень у донорів

	τ, с	τ, с + t-PA	ЗП	ЗГП	ФП	Н	Н + t-PA
Контроль	54	54	106	65	40	0.1	0.1
12.11	1	1,05	3,49	3,07	4,17	3,33	3,27
21.11	0,94	0,94	1,4	1,26	1,52	1,2	1,11

На опік полум'ям, без травми організм постраждалого відповів активацією системи зсідання, а саме: підвищився рівень концентрації фібриногену (параметр Н, **таблиця 3.15**). Відбувся спалах генерації тромбіну, рівень розчинного фібрину перевищив норму у 17,6 разів, система фібринолізу

була активована, ймовірно, викидом ендотеліальними клітинами t-PA у плазму, викликаним ростом концентрації тромбіну і, як результат, ростом концентрації D-димеру у 43,4 рази. За період до 21.11 показники стану системи гемостазу значно зменшилися і наблизилися до норми.

Отримані дані дозволяють припустити, що організм постраждалого відреагував тільки короткочасною активацією системи зсідання і фібринолізу без залучення запальних процесів.

Таким чином, молекулярні маркери стану системи гемостазу можна розглядати як такі, що дозволяють розділити ступінь залучення процесів запалення, гіперкоагуляції і фібринолізу в загальний патологічний процес. Показано, що параметри турбідиметричної кривої узгоджуються з вмістом молекулярних маркерів стану системи зсідання крові і фібринолізу у пацієнтів з опіковою травмою.

РОЗДІЛ IV. ЗАКЛЮЧНА ЧАСТИНА.

Наявність процесу активації системи зсідання та фібринолізу проявляється та може бути відстежено завдяки амідазній активності тромбіну і плазміну в плазмі крові. В свою чергу активація протромбіну і формування тромбіну має наслідком трансформацію фібриногену у фібрин desA, потім у desAB з подальшим спонтанним формуванням згустку. На перший погляд зв'язок між концентрацією тромбіну і структурою фібринового згустку, який спонтанно формується, закінчується. Проте дослідження показали, що взаємодія процесу активації проензимів і формування та розчинення згустку продовжується, розширюючи свої напрями.

Тромбін паралельно з відщепленням FpA продовжує активувати зв'язаний з фібрин(оген)ом FXIII у FXIIIa, який зміцнює протофібрили і залишається адсорбованим на протофібрилах. В процесі їх формування та латеральної асоціації тромбін відщеплює FpB, чим прискорює формування завершених протофібрил і вивільняє α C-регіони, підсилюючи процес латеральної асоціації. Одночасно тромбін насичує сайти зв'язування на фібрилах згустку і його надлишок з'являється у міжфібрилярному просторі сформованого згустку. Таким чином, закінчення формування фібрилярної структури згустку призводить до прискорення в активації протромбіну, яке виглядає спалахом в амідазній активності на тромбограмі в TGA аналізі. Надлишковий тромбін активує FVIII і FV з утворенням теназного і протромбіназного комплексів, які на 3 порядки прискорюють активацію протромбіну у тромбін. *In vivo* за наявності експонованого на поверхні ендотеліальних клітин тромбомодуліну тромбін активує систему протеїну C. Останній в комплексі з протеїном S розщеплює фактори VIIIa і Va в теназному і протромбіназному комплексах і гасить спалах активності FIIa виконуючи таким чином функцію антизсідання в системі гемостазу.

Протягом дослідження зв'язку між ініціацією амідазної тромбінової активності і формуванням структури згустку встановлено, що фібриноген у формі згустку виступає як резервуар тромбіну, необхідний для регуляції швидкості формування структури фібринового згустку. Фібриноген не є пасивним учасником формування структури фібринового згустку. Зв'язуючи тромбін на стадії ініціації зсідання плазми крові, він захищає його від інактивації інгібіторами TFPI, α 2-МГ, АТШ-Не. Завдяки цьому згусток накопичує активний тромбін, необхідний для стадії ампліфікації активності тромбіну, що важливо для закінчення формування структури згустку і перемикання процесу активації системи зсідання на процес її гальмування.

Ми виявили, що фібрилярна структура згустку надзвичайно важлива для підтримки ефективної активації протромбіну. Втрата здатності формувати фібрилярну структуру згустку призводить до втрати більш ніж на порядок швидкості формування згустку, як свідчать результати дослідів з фібриногеном, інактивованим фібриногеназою, очищеною із отрути щитомордника *Agkistrodon halys halys* [93]. З іншого боку, сам фібриноген виступає як регулятор активації протромбіну. У випадку недостатньої активності ініціаторів зовнішнього і внутрішнього шляхів активації протромбіну (FVIIa-FXa та FIXa-FXa) утворюється незначна концентрація тромбіну, яка в свою чергу недостатньо трансформує фібриноген у фібрин desA і формування протофібрил останнім інгібується фібриногеном як Антитромбіном I за рахунок "а" сайтів полімеризації фібриногену. На початковій стадії захворювання це сприяє утворенню розчинного фібрину, що вказує на наявність патологічного процесу в організмі пацієнта.

Розроблені нами методи визначення активності тромбіну та плазміну, які утворюються в процесі формування і розчинення згустку в плазмі крові людини, дають можливість кількісно охарактеризувати коагуляційну компоненту активності тромбіну на стадії ініціації утворення згустку і фібринолітичну активність плазміну в момент повного розчинення згустку.

Отримані параметри є важливими динамічними характеристики процесу формування і розчинення згустку у плазмі крові людини, а саме: вони визначають швидкість активації протромбіну на стадії ініціації системи зсідання, концентрацію тромбіну на момент закінчення формування протофібрил; активність і концентрацію плазміну в точці повного розчинення тривимірної структури згустку, швидкість активації плазміногену в фазі руйнування структури згустку; час формування та розчинення тривимірної структури згустку. Показано, що відношення величин активності тромбіну до активності плазміну близькі за величиною до відношення потенціалів зсідання та фібринолізу і часу формування та розчинення тривимірної структури згустку. Запропоновані методи кількісної оцінки балансу між системами зсідання і фібринолізу у плазмі крові в модельних системах в умовах *in vitro* можуть доповнювати існуючі методи.

Знайомлячись з методом TGA ми помітили, що в низхідній ділянці тромбограми, **рис. 3.4**, з'являється неточність при перерахунку активності тромбіну в його концентрацію. Ми запропонували, щоб отримані у правій частині тромбограми 1 концентрації тромбіну, які є приростом концентрації тромбіну у всій системі, додавати до загальної концентрації тромбіну в ході її розрахунку **рис. 3.5А**. Була знайдена формула для перерахунку низхідної ділянки кривої після точки перегину у висхідну. На тлі зростання р-NA сигналу після точки перегину приріст активності тромбіну на цій ділянці кривої зменшується, що тромбограма 1 реєструє, як зменшення концентрації тромбіну в системі, **рис. 3.4**. Тому ці зменшенн концентрації тромбіну було додано до величини концентрації у точці “перегину”, якою закінчується ліве плече тромбограми, **рис. 3.5**. Приклад розрахунку концентрації наведено у розділі 3.2.

Багатоетапність процесу формування фібринового згустку показує, що фібриновий згусток на стадії ініціації активації системи зсідання виконує роль депо тромбіну, що захищає ензим від інактивації інгібіторами та сприяє росту

його концентрації для реалізації фази ампліфікації, яка необхідна для завершення стабілізації згустку та генерації в ньому антизсідальної активності. В той же час механізм формування структури згустку блокує утворення активаційної тріади – Glu-Pg–фібрин–t-PA – ендогенної фібринолітичної системи до моменту завершення побудови фібрилярної сітки згустку, що витісняє фібринолітичний процес на поверхню фібрил. Останній факт наближає нас до розуміння механізму реалізації балансу між процесами формування і розчинення полімерної компоненти фібринового згустку. Ймовірно, що фібрилярна структура фібринового згустку відіграє вирішальну роль у реалізації балансу між процесами формування і розчинення фібринового згустку системами зсідання і фібринолізу гуморальної складової плазми крові.

Генерація тромбіну за амідазною активністю починає прискорюватися одночасно із закінченням формування фібрилярної структури згустку. Очевидно, що тривимірна структура полімерного фібрину необхідна для накопичення тромбіну. Згусток служить як депо тромбіну, яке забезпечує реалізацію поліфункціональних можливостей останнього, **рис. 3.6**.

Як згадувалось раніше, після насичення згустку тромбіном його надлишок перемикається на активацію VIII, V і XI факторів з утворенням теназного і протромбіназного комплексів. Останні викликають сплеск активності тромбіну, що необхідно для завершення формування згустку і тромбу. В умовах *in vitro* це дозволяє визначити важливі діагностичні параметри генерації тромбіну, а саме: лаг-період ініціації генерації тромбіну, максимальну швидкість активації протромбіну, максимальну активність і концентрацію тромбіну, ендогенний тромбіновий потенціал плази крові пацієнта. В умовах *in vivo* висока концентрація тромбіну необхідна для активації тромбоцитів, завершення формування згустку і формування поверхневої структури тромбу, стійкої до дії протеолітичних ензимів і системи фібринолізу.

Активация генерации тромбина на стадии инициации активации системы свертывания – процесс, целиком направленный на формирование фибринового сгустка. Виявлений у зв'язку з формуванням фибринового сгустку характер генерации тромбиновой активности может указывать на стан баланса между активацией системы свертывания и системы анти-свертывания гемостаза плазмы крови, раздел 3.3.

Дослідження зв'язку між стадіями утворення фибринового сгустку і динамікою генерации тромбина і плазміну у плазмі крові людини *in vitro* свідчить про те, що закінчення формування сгустку співпадає з початком «спалаху» швидкості активации тромбина; «спалах» швидкості активации тромбина, ймовірно, важливий для стабілізації сгустку і його поверхні та для активации антизсідальної системи плазми крові; пауза у активации Glu-Pg після формування сгустку має анти-фібринолітичну направленість і важлива для стабілізації структури сгустку.

У випадку інициации TF утворення сгустку в плазмі крові на стадії формування протофібрил та їхньої латеральної асоціації не спостерігається прояву амідазної активності Glu-Pm на відміну від системи свертывання із очищених протеїнів (Fg, Glu-Pg та t-PA). Це пов'язано з тим, що формування структури сгустку, а саме латеральна асоціація протофібрил у присутності інших протеїнів плазми крові (фібронектину, α 2-AP, фактору Вільбранта, альбуміну, FXIIIa) блокує сайти зв'язування Glu-Pg та t-PA на протофібрилах і витісняє формування активаторних комплексів на поверхню фібрил – завершену структуру фибринового сгустку. Припускається, що α C-регіони полімерного фібріну сгустку залучені до активации Glu-Pg t-PA і стають мішенню для початку розщеплення сформованої структури сгустку, утворення надлишкової концентрації Glu-Pm і появи його зростаючої амідазної активності, **рис. 3.10**.

Для плазми крові, свертывання якої ініціюється АЧТЧ реагентом, TF або тромбином, визначені величини d і μ параметрів знаходяться в межах від 50 до 315 нм. У плазмі, свертывання якої ініціюється АЧТЧ реагентом, формуються

фібрили середнього діаметру з найбільшою щільністю протофібрил. У плазмі, зсідання якої ініційоване тромбіном, формуються найтовщі фібрили з найменшою щільністю протофібрил. Показано, що в плазмі крові зі скороченням шляху активації системи зсідання від АЧТЧ, ТГ до тромбіну збільшуватиметься діаметр фібрил проте зменшується в них кількість протофібрил і величина маса/довжина параметру. Висловлено припущення про те, що параметр щільність протофібрил у фібрилі, який вказує на механічну міцність і стійкість до фібринолізу згустку, потенційно може бути використаний для діагностичних цілей.

ВИСНОВКИ

У роботі встановлено, що тривимірна фібрилярна структура фібринового згустку є ключовим чинником ефективної генерації тромбіну на стадії ініціації коагуляції та забезпечує перехід системи до фази ампліфікації. Показано, що фібриновий згусток виконує функцію локального депо тромбіну, захищаючи ензим від інактивації інгібіторами плазми та підтримуючи його концентрацію, необхідну для активації факторів V, VIII і XI та подальшої стабілізації згустку. Встановлено часовий взаємозв'язок між завершенням формування фібрилярної структури згустку і початком активації фібринолізу, що свідчить про координовану взаємодію коагуляційної та фібринолітичної ланок гемостазу. Показано, що механізми формування та латеральної асоціації протофібрил обмежують формування фібринолітичних комплексів усередині структури згустку та зміщують активацію плазміногену на поверхню фібрил. Отримані результати свідчать про конкурентний характер взаємодії між процесами формування фібрилярної структури фібрину та активації фібринолізу. Виявлено, що параметри структурної організації фібрил залежать від шляху ініціації зсідання та можуть визначати механічні властивості й чутливість згустку до фібринолізу. Розроблено та модифіковано методичні підходи до кількісного визначення активності тромбіну, плазміну та концентрації тромбіну в межах тромбограми, що розширює можливості оцінки динамічного балансу між процесами зсідання і фібринолізу в плазмі крові.

1. Розроблено методи визначення концентрації тромбіну, що ґрунтується на використанні параметру τ турбідиметричної кривої формування і розчинення згустку, та плазміну – за його амідазною активністю, визначеною в момент повного розчинення фібринового згустку. Ці методи дозволяють на рівні активності ензимів охарактеризувати стан системи гемостазу людини в нормі та за різних патологій;

2. Запропоновано підхід, який дозволяє визначити концентрацію та прослідкувати динаміку активності тромбіну в кожний момент реакції формування і розчинення фібринового згустку;
3. Виявлено зв'язок між активністю (концентрацією) тромбіну і стадіями формування фібринового згустку. Показано, що на етапі ініціації тромбін трансформує фібриноген у фібрин і не проявляє амідазної активності, а на стадії ампліфікації – перемикається на активацію факторів VIII, V і XI, що супроводжується спалахом амідазної активності. Це явище важливе для стабілізації згустку і його поверхні та для активації антизгортаючої системи плазми крові;
4. Показано, що фібриновий згусток на стадії ініціації активації системи зсідання виконує роль депо тромбіну; надлишок останнього ініціює спалах в рості активності тромбіну.
5. Вперше запропоновано гіпотезу про конкуренцію компонентів формування згустку (desA і desAB) з компонентами системи фібринолізу (Glu-Pg і t-PA) за фібрили згустку.
6. Сформульовано гіпотезу про механізм формування структури згустку, який гальмує активацію ендогенної фібринолітичної системи і витісняє фібринолітичний процес на поверхню фібрил згустку.
7. Показано, що параметри турбідиметричної кривої корелюють з вмістом молекулярних маркерів стану системи зсідання крові і фібринолізу.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Barcellona D., Marongiu F. The hemostatic system. 1st Part. Journal of Pediatric and Neonatal Individualized Medicine. 2020. Vol. 9, no. 1. P. e090106. DOI: 10.7363/090106.
2. Versteeg H. H., Heemskerk J. W. M., Levi M., Reitsma P. H. New Fundamentals in Hemostasis. Physiological Reviews. 2013. Vol. 93. P. 327–358. DOI: 10.1152/physrev.00016.2011.
3. LaPelusa A., Dave H. D. Physiology, Hemostasis. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL) : StatPearls Publishing, 2023.
4. Luo G.-P., Xia B. N., Wu Y. Y.-Z. von Willebrand Factor: More Than a Regulator of Hemostasis and Thrombosis. Acta Haematologica. 2012. Vol. 128. P. 158-169.
5. Yermolenko I.S, Gorkun O.V, Fuhrmann A., Podolnikova N.P, Lishko V.K, et al. The Assembly of Nonadhesive Fibrinogen Matrices Depends on the α C Regions of the Fibrinogen Molecule. Journal of Biological Chemistry. 2012. Vol. 287, no. 50. P. 41979-41990.
6. Pieters M., Wolberg A. S. Fibrinogen and fibrin: An illustrated review. Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis. 2019. Vol. 3, no. 2. P. 161-172.
7. Crossen J., Shankar K. N., Diamond S. L. Investigating thrombin-loaded fibrin in whole blood clot microfluidic assay via fluorogenic peptide. Biophysical Journal. 2023. Vol. 122, no. 4. P. 697-712. DOI: 10.1016/j.bpj.2023.01.008.
8. Troisi R., Balasco N., Autiero I., Sica F., Vitagliano L. New insight into the traditional model of the coagulation cascade and its regulation: illustrated review of a three-dimensional view. Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis. 2023. Vol. 7, no. 6. P. 102160.
9. Hoffman M., Monroe D. M. Cell-based model of hemostasis. Thrombosis and Haemostasis. 2001. Vol. 85, no. 6. P. 958-965.

10. Weisel J. W., Litvinov R. I. Red blood cells: the forgotten player in hemostasis and thrombosis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2019. Vol. 17, no. 2. P. 271-282.
11. Furie B., Furie B. C. In vivo thrombus formation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2007. Vol. 5, Suppl. 1. P. 12-17.
12. McMichael M. New models of hemostasis. *Topics in Companion Animal Medicine*. 2012. Vol. 27, no. 2. P. 40-45.
13. Stassen J. M., Arnout J., Deckmyn H. The hemostatic system. *Current Medicinal Chemistry*. 2004. Vol. 11, no. 17. P. 2245-2260.
14. La Corte A. L. C., Philippou H., Ärience R. A. S. Role of fibrin structure in thrombosis and vascular disease. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*. 2011. Vol. 83. P. 75-126.
15. Arnout J., Hoylaerts M. F., Lijnen H. R. Haemostasis. *Handbook of Experimental Pharmacology*. 2006. No. 176, Pt. 2. P. 1-41. DOI: 10.1007/3-540-36028-x_1.
16. Zuo Yu, Estes S.K, Ali R.A, Gandhi A.A, Yalavarthi S., et al. Prothrombotic autoantibodies in serum from patients hospitalized with COVID-19. *Science Translational Medicine*. 2020. Vol. 12, no. 570. DOI: 10.1126/scitranslmed.abd3876.
17. Margetic S. Inflammation and haemostasis. *Biochemia Medica*. 2012. Vol. 22, no. 1. P. 49-62.
18. Baglin T. P., Carrell R. W., Church F. C. Crystal structures of native and thrombin-complexed heparin cofactor II reveal a multistep allosteric mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002. Vol. 99, no. 17. P. 11079-11084.
19. Łukasik Z. M., Makowski M., Makowska J. S. From blood coagulation to innate and adaptive immunity: the role of platelets in the physiology and pathology of autoimmune disorders. *Rheumatology International*. 2018. Vol. 38, no. 6. P. 959-974.

20. Mackman N. Role of tissue factor in hemostasis and thrombosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2004. Vol. 24, no. 6. P. 1015-1022.
21. Zelaya H., Rothmeier A. S., Ruf W. Tissue factor at the crossroad of coagulation and cell signaling. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2018. Vol. 16, no. 10. P. 1941-1952.
22. Cheng L., Wei G.-W., Leil T. Review of quantitative systems pharmacological modeling in thrombosis. *Communications in Information and Systems*. 2019. Vol. 19, no. 3. P. 219-240. DOI: 10.4310/cis.2019.v19.n3.a1.
23. Fogelson A. L., Neeves K. B. Fluid Mechanics of Blood Clot Formation. *Annual Review of Fluid Mechanics*. 2015. Vol. 47. P. 377-403.
24. Bendjeddou A., Brodo L., Falaschi M., Tiezzi E.B.P. A Computational Model of the Secondary Hemostasis Pathway in Reaction Systems. *Mathematics*. 2024. Vol. 12, no. 15. P. 2422. <https://doi.org/10.3390/math12152422>.
25. Tanaka K. A., Key N. S., Levy J. H. Blood coagulation: hemostasis and thrombin regulation. *Anesthesia and Analgesia*. 2009. Vol. 108, no. 5. P. 1433-1446.
26. Akbulut A. C., Arisz R.A, Baaten C C F M J, Baidildinova G., Barakzie A. et al. Blood Coagulation and Beyond: Position Paper from the Fourth Maastricht Consensus Conference on Thrombosis. *Thrombosis and Haemostasis*. 2023. Vol. 123, no. 8. P. 808-839. DOI: 10.1055/a-2052-9175
27. Mackman N., Tilley R. E., Key N. S. Role of the Extrinsic Pathway of Blood Coagulation in Hemostasis and Thrombosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2007, Vol. 27, no. 8.
28. Grover S. P., Mackman N. Tissue factor in atherosclerosis and atherothrombosis. *Atherosclerosis*. 2020. Vol. 307. P. 80-86.
29. Owens A. P. III, Mackman N. Microparticles in Hemostasis and Thrombosis. *Circulation Research*. 2011. Vol. 108, no. 10. P. 1284-1297.
30. Al-Koussa H., AlZaim I., El-Sabban M.E. Pathophysiology of Coagulation and Emerging Roles for Extracellular Vesicles in Coagulation Cascades and

- Disorders. *Journal of Clinical Medicine*. 2022. Vol. 11. P. 4932. doi: 10.3390/jcm11164932.
31. Levi M., Poll T., Büller H. R. Bidirectional Relation Between Inflammation and Coagulation. *Circulation*. 2004. Vol. 109. P. 2698-2704.
 32. Witkowski M., Landmesser U., Rauch U. Tissue factor as a link between inflammation and coagulation. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 2016. Vol. 26, no. 4. P. 297-303.
 33. Cui Y., Zheng L., Jiang M., Jia R., Zhang X., et al. Circulating microparticles in patients with coronary heart disease and its correlation with interleukin-6 and C-reactive protein. *Molecular Biology Reports*. 2013. Vol. 40. P. 6437–6442. DOI: 10.1007/s11033-013-2758-1.
 34. Di Cera E. Thrombin. *Molecular Aspects of Medicine*. 2008. Vol. 29, no. 4. P. 203–254. DOI: 10.1016/j.mam.2008.01.001.
 35. Bauer R., Hansen S., Jones G.R., Suenson E., Thorsen S., Øgendal L. Fibrin structures during tissue-type plasminogen activator-mediated fibrinolysis studied by laser light scattering: relation to fibrin enhancement of plasminogen activation / R. Bauer [et al.]. *European Biophysics Journal*. 1994. Vol. 23. P. 239–252. DOI: 10.1007/BF00213574
 36. Katz J. M., Tadi P. Physiology, Plasminogen Activation. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL) : StatPearls Publishing, 2022.
 37. Chapin J. C., Hajjar K. A. Fibrinolysis and the control of blood coagulation. *Blood Reviews*. 2015.
 38. Gue Y. X., Gorog D. A. Importance of Endogenous Fibrinolysis in Platelet Thrombus Formation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017. Vol. 18, no. 9. P. 1850.
 39. Scarlatescu E., Iba T., Maier C.L, Moore H., Othman M. Deranged Balance of Hemostasis and Fibrinolysis in Disseminated Intravascular Coagulation: Assessment and Relevance in Different Clinical Settings. *Anesthesiology*. 2024. Vol. 141, no. 3. P. 570-583. doi: 10.1097/ALN.0000000000005023.

40. Klavina P. A., Leon G., Curtis A.M, Roger J S P. Dysregulated haemostasis in thrombo-inflammatory disease. *Clinical Science (London)*. 2022. Vol. 136, no. 24. P. 1809-1829. DOI: 10.1042/CS20220208.
41. Jing H., Wu X., Xiang M., et al. Pathophysiological mechanisms of thrombosis in acute and long COVID-19. *Frontiers in Immunology*. 2022. Vol. 13. P. 992384. doi: 10.3389/fimmu.2022.992384.
42. Wood J.P., Ellery P.E.R., Maroney S.A., Mast A.E. Biology of tissue factor pathway inhibitor. *Blood*. 2014. Vol. 123, no. 19. P. 2934-2943. DOI: 10.1182/blood-2013-11-512764.
43. Wood J.P, Bunce M.W, Maroney S.A., et al. Tissue factor pathway inhibitor-alpha inhibits prothrombinase during the initiation of blood coagulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013. Vol. 110, no. 44. P. 17838-17843. doi: 10.1073/pnas.1310444110.
44. Smith S. A., Travers R. J., Morrissey J. H. How it all starts: initiation of the clotting cascade. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 2015. Vol. 50, no. 4. P. 326-336.
45. Chaudhry R., Killeen R. B., Babiker H. M. Physiology, Coagulation Pathways. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL) : StatPearls Publishing, 2025.
46. Al-Amer O. M. The role of thrombin in haemostasis. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*. 2022. Vol. 33, no. 3. P. 145-148. DOI: 10.1097/MBC.0000000000001130.
47. Risan R.A., Belcher H.A., Ramanujam R.K., et al. Comprehensive Analysis of the Role of Fibrinogen and Thrombin in Clot Formation and Structure for Plasma and Purified Fibrinogen. *Biomolecules*. 2024. Vol. 14, no. 2. P. 230. DOI: 10.3390/biom14020230
48. Park S., Park J. K. Back to basics: the coagulation pathway. *Blood Research*. 2024. Vol. 59. P. 35.
49. Suzuki K. Thrombomodulin: A key regulator of intravascular blood coagulation, fibrinolysis, and inflammation, and a treatment for disseminated intravascular

- coagulation. Proceedings of the Japan Academy, Series B, Physical and Biological Sciences. 2025. Vol. 101, no. 2. P. 75-97.
- 50.Olgasi C., et al. Hemostasis and endothelial functionality: the double face of coagulation factors. *Haematologica*. 2024. Vol. 109, no. 7. P. 2041-2048.
 - 51.Depasse F., et al. Thrombin generation assays are versatile tools in blood coagulation analysis: A review of technical features, and applications from research to laboratory routine. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2021. Vol. 19, no. 12. P. 2907-2917.
 - 52.Wolberg A. S., Campbell R. A. Thrombin Generation, Fibrin Clot Formation and Hemostasis. *Transfusion and Apheresis Science*. 2008. Vol. 38, no. 1. P. 15-23.
 - 53.Lakshmanan H. H. S., et al. Revised model of the tissue factor pathway of thrombin generation: Role of the feedback activation of FXI. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2022, Jun;20(6):1350-1363. doi: 10.1111/jth.15716. Epub 2022 Apr 8.
 - 54.Sidonio Jr. R. F., et al. Thrombin generation and implications for hemophilia therapies: A narrative review. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis*. 2022. Vol. 7, no. 1. P. 100018.
 - 55.Rijken D. C., Uitte de Willige S. Inhibition of Fibrinolysis by Coagulation Factor XIII. *BioMed Research International*. 2017. Vol. 2017. P. 1209676.
 - 56.Medved L., Yakovlev S. Structure and function of fibrinogen B β N-domains. *Ukrainian Biochemical Journal*. 2020. Vol. 92, no. 3.
 - 57.Weisel J. W., Litvinov R. I. The biochemical and physical process of fibrinolysis and effects of clot structure and stability on the lysis rate. *Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry*. 2008. Vol. 6, no. 3. P. 161-180.
 - 58.Weisel J. W., Litvinov R. I. Fibrin as a Versatile Fibrous Biopolymer. *Subcellular Biochemistry*. 2026. Vol. 113. P. 413-473. DOI: 10.1007/978-3-032-05273-5_13.

- 59.Луговской Е. В., Макогоненко Е. М., Комисаренко С. В. Молекулярные механизмы образования и разрушения фибрина. Київ: Наукова думка, 2013. 232 с.
- 60.Dempfle C. E. The use of soluble fibrin in evaluating the acute and chronic hypercoagulable state. *Thrombosis and Haemostasis*. 1999. Vol. 82, no. 2. P. 673-683.
- 61.Rötter J., Preissner K. T., Müller-Berghaus G. Soluble fibrin consists of fibrin oligomers of heterogeneous distribution. *European Journal of Biochemistry*. 1986. Vol. 155, no. 3. P. 583-588.
- 62.Belitser V. A. Fibrinogen B (soluble fibrinogen), its nature and methods of determination. *Laboratornoe Delo*. 1980. No. 9. P. 529-532.
- 63.Henschen A., McDonagh J. Fibrinogen, fibrin and factor XIII. *Blood coagulation* / ed. by R. F. A. Zwaal, H. C. Hemker. 1986. P. 171-241.
- 64.Mosesson M. W., Siebenlist K. R., Meh D. A. The structure and biological features of fibrinogen and fibrin. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2001. Vol. 936. P. 11-30.
- 65.Cesarman-Maus G., Hajjar K. A. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *British Journal of Haematology*. 2015.
- 66.Flood V. H., Scott J. P. *Bleeding and Thrombosis. Nelson Pediatric Symptom-Based Diagnosis*. 2018.
- 67.Bu G., Warshawsky I., Schwartz A. L. Cellular receptors for the plasminogen activators. *Blood*. 1994. Vol. 83, no. 12. P. 3427-3436.
- 68.Hoylaerts M., et al. Kinetics of the activation of plasminogen by human tissue plasminogen activator. Role of fibrin. *Journal of Biological Chemistry*. 1982. Vol. 257, no. 6. P. 2912-2919.
- 69.Budzynski A. Z. Chromogenic Substrates in Coagulation and Fibrinolytic Assays. *Laboratory Medicine*. 2001. Vol. 32.
- 70.Flick M. J., Bugge T. H. Plasminogen-receptor KT: plasminogen activation and beyond. *Blood* 2016.

71. Law R. H. P., et al. X-ray crystal structure of plasmin with tranexamic acid-derived active site inhibitors. *Blood Advances*. 2017. Vol. 1, no. 12. P. 766-771.
72. Whyte C. S., Mutch N. J. uPA-mediated plasminogen activation is enhanced by polyphosphate. *Haematologica*. 2021. Vol. 106, no. 2. P. 522-531.
73. Koga S. A novel molecular marker for thrombus formation and life prognosis-clinical usefulness of measurement of soluble fibrin monomer-fibrinogen complex (SF). *Rinsho Byori*. 2004. Vol. 52, no. 4. P. 355-361.
74. Сторожук Б. Г., та ін. Загальний гемостатичний потенціал плазми крові і його зв'язок із деякими молекулярними маркерами системи гемостазу у хворих на хронічні захворювання нирок VD стадії. *Український біохімічний журнал*. 2018. Т. 90, № 5. С. 60-70.
75. Suenson E., Petersen L. C. Fibrin and plasminogen structures essential to stimulation of plasmin formation by tissue-type plasminogen activator. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1986. Vol. 870. P. 510-519.
76. Sakharov D. V., Rijken D. C. Superficial Accumulation of Plasminogen During Plasma Clot Lysis. *Circulation*. 1995. Vol. 92, no. 7. P. 1883-1890.
77. Levin E. G., del Zoppo G. J. Localization of tissue plasminogen activator in the endothelium of a limited number of vessels. *American Journal of Pathology*. 1994. Vol. 144. P. 855-861.
78. Medved L., Nieuwenhuizen W. Molecular mechanisms of initiation of fibrinolysis by fibrin. *Thrombosis and Haemostasis*. 2003. Vol. 89, no. 3. P. 409-419.
79. Rahbar E., et al. Endothelial glycocalyx shedding and vascular permeability in severely injured trauma patients. *Journal of Translational Medicine*. 2015. Vol. 13. P. 117.
80. Weinbaum S., Tarbell J. M., Damiano E. R. The structure and function of the endothelial glycocalyx layer. *Annual Review of Biomedical Engineering*. 2007. Vol. 9. P. 121-167.

81. Udovenko A., Makogonenko Y., Korolova D., Chernyshenko V., Komisarenko S. Formation and elimination of soluble fibrin and D-dimer in the bloodstream. *Croatian Medical Journal*. 2023. Vol. 64, no. 6. P. 421-429. DOI: 10.3325/cmj.2023.64.421.
82. Walker J. B., Nesheim M. E. The molecular weights, mass distribution, chain composition, and structure of soluble fibrin degradation products released from a fibrin clot perfused with plasmin. *Journal of Biological Chemistry*. 1999. Vol. 274, no. 8. P. 5201-5212.
83. Kattula S., Byrnes J. R., Wolberg A. S. Fibrinogen and fibrin in hemostasis and thrombosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2017. Vol. 37, no. 3. P. e13-e21.
84. Wolberg A. S. Fibrinogen and fibrin: synthesis, structure, and function in health and disease. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2023. Vol. 21, no. 11. P. 3005-3015. DOI: 10.1016/j.jtha.2023.08.014.
85. 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000. Vol. 97, no. 26. P. 14156-14161.
86. Луговской Е. В., та ін. Розчинний фібрин: молекулярна структура і кількісне визначення. *Лабораторна діагностика*. 2006. № 3 (37). С. 3-11.
87. Позняк Т. А., та ін. Зміни просторової орієнтації α C-регіонів в молекулі фібриногену під час його трансформації у полімерний фібрин. *Доповіді НАН України*. 2012. № 5. С. 163-168.
88. Huang S., et al. Identification of early coagulation changes associated with survival outcomes post severe burns from multiple perspectives. *Scientific Reports*. 2024. Vol. 14. P. 10457.
89. Gonda S. R., Shainoff J. R. Adsorptive endocytosis of fibrin monomer by macrophages: evidence of a receptor for the amino terminus of the fibrin alpha

- chain. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1982. Vol. 79, no. 15. P. 4565-4569.
90. Simon D. I., et al. Fibrin(ogen) is internalized and degraded by activated human monocytoïd cells via Mac-1 (CD11b/CD18): a nonplasmin fibrinolytic pathway. Blood. 1993. Vol. 82, no. 8. P. 2414-2422.
 91. Languino L. R., et al. Fibrinogen mediates leukocyte adhesion to vascular endothelium through an ICAM-1-dependent pathway. Cell. 1993. Vol. 73, no. 7. P. 1423-1434.
 92. Bugge T. H., et al. Urokinase-type plasminogen activator is effective in fibrin clearance in the absence of its receptor or tissue-type plasminogen activator. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1996. Vol. 93, no. 12. P. 5899-5904.
 93. Gornitskaia O. V., Rovinskaya I. N., Platonova T. N. Purification and characterization of the fibrinolytic enzyme from Agkistrodon halys halys venom. Ukrainian Biochemical Journal. 2002. Vol. 74. P. 42-49.
 94. Варецька Т. В. Мікрогетерогенність фібриногену. Кріо-фібриноген. Український біохімічний журнал. 1960. Т. 32, № 1. С. 13-24.
 95. Gallimore M J, Friberger P. Chromogenic peptide substrate assays and their clinical applications. Blood Rev, 1991 Jun;5(2):117-27. doi: 10.1016/0268-960x(91)90044-d.
 96. Storozhuk N. V., et al. Overall hemostatic potential of blood plasma and its connection to molecular markers of the hemostasis system in patients with stenosis of coronary artery. Ukrainian Biochemical Journal. 2021. Vol. 93, no. 5. P. 31-42.
 97. Carr M. E., Alving B. M. Effect of fibrin structure on plasmin-mediated dissolution of plasma clots. Blood Coagulation and Fibrinolysis. 1995. Vol. 6, no. 6. P. 567-573. DOI: 10.1097/00001721-199509000-00011

98. Crawley J. T. B., Zanardelli S., Chion C. K. N. K., Lane D. A. The central role of thrombin in hemostasis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2007. Vol. 5, Suppl. 1. P. 95-101. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2007.02500.x
99. Matsumoto T., Nogami K., Shima M. Simultaneous measurement of thrombin and plasmin generation to assess the interplay between coagulation and fibrinolysis. *Thrombosis and Haemostasis*. 2013. Vol. 110. P. 761-768. DOI: 10.1160/TH13-04-0345.
100. Verhagen M. J. A., Valke L. L. F. G., Schols S. E. M. Thrombin generation for monitoring hemostatic therapy in hemophilia A: A narrative review. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2022. Vol. 20. P. 794-805. DOI: 10.1111/jth.15640
101. Schägger H, von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfatepolyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*. 1987;166(2):368-79. DOI: 10.1016/0003-2697(87)90587-2.
102. Hemker H. C., et al. Calibrated Automated Thrombin Generation Measurement in Clotting Plasma. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*. 2003. Vol. 33. P. 4-15. DOI: 10.1159/000071636.
103. Tripodi A. Thrombin generation assay and its application in the Clinical Laboratory. *Clinical Chemistry*. 2016. Vol. 62. P. 699-707. DOI: 10.1373/clinchem.2015.248625.
104. Udovenko A. V. Determination of thrombin and plasmin activity in human blood plasma using the turbidimetric curve of clot formation and dissolution. *Biotechnologia Acta*. 2023. Vol. 16, no. 2. P. 50-52. DOI: 10.15407/biotech16.02.050.
105. Udovenko A., Makogonenko Y., Hornytska O., Yusova O., Chernyshenko V. Determination of thrombin and plasmin activity using the turbidimetric analysis of clot formation and dissolution in human blood plasma. *Ukr. Biochem. J*. 2024; 96(2), P. 19-26. DOI: 10.15407/ubj96.02.019.

106. Hulshof A.-M., et al. Thrombin-Fibrin(ogen) Interactions, Host Defense and Risk of Thrombosis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. Vol. 22. P. 2590. DOI: 10.3390/ijms22052590.
107. Weisel J.W. Fibrinogen and fibrin. *Adv Protein Chem*, 2005;70:247-99. doi: 10.1016/S0065-3233(05)70008-5.
108. Fredenburgh J.C, Nesheim M.E. Lys-plasminogen is a significant intermediate in the activation of Glu-plasminogen during fibrinolysis in vitro. *J Biol Chem*, 1992 Dec 25;267(36):26150-6.
109. Wiman B., Collen D. On the kinetics of reaction between human antiplasmin and plasmin. *European Journal of Biochemistry*. 1978. Vol. 84, no. 2. P. 573-578.
110. Sottrup-Jensen L. Alpha-macroglobulins: structure, shape, and mechanism of proteinase complex formation. *Journal of Biological Chemistry*. 1989. Vol. 264, no. 20. P. 11539-11542.
111. Tripodi A. The Long-Awaited Whole-Blood Thrombin Generation Test. *Clinical Chemistry*. 2012. Vol. 58. P. 1173-1175.
112. Udovenko A., Makogonenko Ye. The relationship between activity of thrombin and plasmin and structure of the clot during its formation and dissolution in human blood plasma. 26th IUBMB-17th FAOBMB Congress, Melbourne, Australia, 22-26 September 2024.
113. Kremers R. M., Wagenvoort R. J., Hemker H. C. The effect of fibrin(ogen) on thrombin generation and decay. *Thrombosis and Haemostasis*. 2014. Vol. 112. P. 486-494.
114. Maroney S. A., Mast A. E. New insights into the biology of tissue factor pathway inhibitor. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2015. Vol. 13. P. S200-S207. DOI: 10.1111/jth.12897.
115. Miyazawa K., Fogelson A. L., Leiderman K. Inhibition of platelet-surface-bound proteins during coagulation under flow I: TFPI. *Biophysical Journal*. 2023. Vol. 122, no. 1. P. 99-113. DOI: 10.1016/j.bpj.2022.11.023.

116. Roberts H. R., Hoffman M., Monroe D. M. A cell based model of thrombin generation. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. 2006. Vol. 32, Suppl. 1. P. 32-38.
117. Ye. Makogonenko, V. Chernyshenko, V. Bardyk, A. Udovenko, S. Komisarenko. Paralogism in method of Thrombin Generation Assay (TGA) in human blood plasma. *Ukr. Biochem. J.* 2025; Volume 97, Issue 1, Jan-Feb, pp. 75-79. DOI: 10.15407/ubj97.01.075.
118. Dydek E. V., Chaikof E. L. Simulated Thrombin Generation in the Presence of Surface-Bound Heparin and Circulating Tissue Factor. *Annals of Biomedical Engineering*. 2016. Vol. 44, no. 4. P. 1072-1084. DOI: 10.1007/s10439-015-1377-5.
119. Hemker H. C., Kremers R. Data management in thrombin generation. *Thrombosis Research*. 2013. Vol. 131, no. 1. P. 3-11. DOI: 10.1016/j.thromres.2012.10.011.
120. Zhu S., Lu Y., Sinno T., Diamond S. L. Dynamics of Thrombin Generation and Flux from Clots during Whole Human Blood Flow over Collagen/Tissue Factor Surfaces. *Journal of Biological Chemistry*. 2016. Vol. 291, no. 44. P. 23027-23035. DOI: 10.1074/jbc.M116.754671.
121. Tsap P. Yu., Gogolinskaia G. K., Platonova T. M., Marunych R. Yu., Udovenko A. V., Makogonenko Ye. M. Influence of fibrin D and DD fragments on fibrinogen and fibrinogen fragment X polymerization initiated by thrombin or ancistron. *Biotechnologia Acta*. 2022. Vol. 15, no. 3. P. 20-28. <https://doi.org/10.15407/biotech15.03.023>.
122. Anastasiia V. Udovenko, Yevgen M. Makogonenko, Volodymyr O. Chernyshenko. Role of Fibrinogen in Regulation of Thrombin Generation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. ISFP/IFRS Corfu meeting 2025.
123. Valke L. L. F. G., Rijpma S, Meijer D, et al. Thrombin generation assays to personalize treatment in bleeding and thrombotic diseases. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 2022. Vol. 9. DOI: 10.3389/fcvm.2022.1033416.

124. Mosesson M. W. Antithrombin I. Inhibition of fibrin formation. *Thrombosis and Haemostasis*. 2003. Vol. 89, no. 1. P. 9-12.
125. Wolberg A. S. Fibrinogen and fibrin: synthesis, structure, and function in health and disease. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2023. Vol. 21, no. 11. P. 3005-3015. DOI: 10.1016/j.jtha.2023.08.014.
126. Kollman J. M., et al. Crystal structure of human fibrinogen. *Biochemistry*. 2009. Vol. 48, no. 18. P. 3877-3886. DOI: 10.1021/bi802205g.
127. Suenson E., Petersen L. C. Fibrin and plasminogen structures essential for plasmin formation by tissue plasminogen activator. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1986. Vol. 870, no. 3. P. 510-519.
128. Weizel J. W., et al. Interaction of plasminogen with polymerized fibrin and its derivatives, monitored with a photoaffinity cross-linked and electron microscopy. *Journal of Molecular Biology*. 1994. Vol. 225, no. 3. P. 1117-1135.
129. Berry L. R., Chan A. K. Thrombin generation. *Methods in Molecular Biology*. 2013. Vol. 992. P. 139–154. DOI: 10.1007/978-1-62703-339-8_11.
130. Grover S. P., Mackman N. Intrinsic Pathway of Coagulation and Thrombosis Insights From Animal Models. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2019. Vol. 39. P. 331-338. DOI: 10.1161/ATVBAHA.118.312130.
131. Grover S. P., Mackman N. Tissue Factor: An Essential Mediator of Hemostasis and Trigger of Thrombosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2018 Apr;38(4):709-725. doi: 10.1161/ATVBAHA.117.309846. Epub 2018 Feb 8.
132. Visser M., Heitmeier S., Ten Cate H., Spronk H. M. H. Role of Factor XIa and Plasma Kallikrein in Arterial and Venous Thrombosis. *Thrombosis and Haemostasis*. 2020. Vol. 120, no. 6. P. 883-993. DOI: 10.1055/s-0040-1710013.
133. Medcalf R. L. What drives "fibrinolysis"? *Hamostaseologie*. 2015. Vol. 35, no. 4. P. 303-310. DOI: 10.5482/HAMO-14-10-0050.

134. Gabriel D. A., Muga K., Boothroyd E. M. The effect of fibrin structure on fibrinolysis. *Journal of Biological Chemistry*. 1992. Vol. 267, no. 34. P. 24259-24263.
135. Collet J. P., et al. Influence of fibrin network conformation and fibrin fiber diameter on fibrinolysis speed: dynamic and structural approaches by confocal microscopy. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2000. Vol. 20, no. 5. P. 1354-1361.
136. Mutch N. J., Medcalf R. L. The fibrinolysis renaissance. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2023. Vol. 21, no. 12. P. 3304-3316.
137. Schmidt A. E., Vadivel K., Whitelegge J., Bajaj S. P. Plasmin-mediated proteolysis of human factor IXa in the presence of calcium/phospholipid: Conversion of procoagulant factor IXa to a fibrinolytic enhancer. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2020. Vol. 18, no. 5. P. 1171-1182. DOI: 10.1111/jth.14773.
138. Chernyshenko VO, Chernyshenko TM, Korolova DS, et al. Non-enzymatic activation of prothrombin induced by interaction with fibrin β 26-42 region. *Acta Biochimica Polonica*. 2015; 62(3): 517-522. doi: 10.18388/abp.2014_896
139. Carr M. E., Hermans J. Size and Density of Fibrin Fibers from Turbidity. *Macromolecules*. 1978. Vol. 11, no. 1. DOI: 10.1021/ma60061a009.
140. Belcher H. A., Guthold M., Hudson N. E. What is the diameter of a fibrin fiber? *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis*. 2023. Vol. 7, no. 5. P. 100285. DOI: 10.1016/j.rpth.2023.100285.
141. Belcher H. A., Litwa K., Guthold M., Hudson N. E. The Applicability of Current Turbidimetric Approaches for Analyzing Fibrin Fibers and Other Filamentous Networks. *Biomolecules*. 2022. Vol. 12, no. 6. P. 807. DOI: 10.3390/biom12060807.
142. Ferri F., et al. Size and Density of Fibers in Fibrin and Other Filamentous Networks from Turbidimetry: Beyond a Revisited Carr-Hermans Method,

- Accounting for Fractality and Porosity. *Macromolecules*. 2015. Vol. 48, no. 15. P. 5423-5432. DOI: 10.1021/acs.macromol.5b00893.
143. Lugovskoi E. V., et al. Quantification of D-dimer and soluble fibrin in blood plasma of patients with ischemic heart disease and hypotension. *Ukrainian Biochemical Journal*. 2004. Vol. 76, no. 6. P. 136-145.
144. Lugovskoi E. V., et al. Soluble fibrin and D-dimer at normal pregnancy and pregnancy with risk of miscarriage. *Ukrainian Biochemical Journal*. 2006. Vol. 78, no. 4. P. 120-129.

Додаток 1

Список публікацій за темою дисертації

1. P. Yu. Tsap, G. K. Gogolinskaia, T. M. Platonova, R. Yu. Marunych, **A. V. Udovenko**, Ye. M. Makogonenko. Influence of fibrin D and DD fragments on fibrinogen and fibrinogen fragment X polymerization initiated by thrombin or ancistron. *Biotechnologia Acta*. 2022. Vol. 15, no. 3. P. 20–28. DOI: 10.15407/biotech15.03.023.

*Цап П.Ю., - планування експериментів, аналіз дослідів, написання статті,
Гоголінська Г.К., – виділення фібриногену і його фрагментів;*

Платонова Т.М., – планування дослідів; обговорення результатів;

Марунич Р.Ю., – хроматографічний аналіз, обговорення результатів;

Удовенко А.В., – турбідиметричний аналіз, характеристика фрагментів;

Макогоненко Є.М. – ідея дослідження, аналіз результатів, написання статті.

2. **Udovenko A. V.** Determination of thrombin and plasmin activity in human blood plasma using the turbidimetric curve of clot formation and dissolution. *Biotechnologia Acta*. 2023. Vol. 16, no. 2. P. 50–52. DOI: 10.15407/biotech16.02.050.

Удовенко, А.В. – виконання експериментальної частини, написання статті.

3. **A. Udovenko**, Y. Makogonenko, D. Korolova, V. Chernyshenko, S. Komisarenko. Formation and elimination of soluble fibrin and D-dimer in the bloodstream. *Croatian Medical Journal*. 2023. Vol. 64, no. 6. P. 421–429. DOI: 10.3325/cmj.2023.64.421. (Q2).

Удовенко А. – підготовка статті до друку, аналіз даних;

Макогоненко Є. – основна ідея дослідження, аналіз даних, написання статті;

Корольова Д. – аналіз даних; написання статті;

Чернишенко В. – аналіз даних, написання статті, загальне керівництво;

Комісаренко С. – загальне керівництво.

4. **A. Udovenko**, Y. Makogonenko, O. Hornytska, O. Yusova, V. Chernyshenko. Determination of thrombin and plasmin activity using the turbidimetric analysis of clot formation and dissolution in human blood plasma. Ukrainian Biochemical Journal. 2024. Vol. 96, no. 2. P. 19–26. DOI: 10.15407/ubj96.02.019 (**Q4**).

Удовенко А. – виконання експериментальної частини, написання та підготовка статті до друку;

Макогоненко Є. – основна ідея дослідження, планування експериментів, аналіз даних та написання статті;

Горницька О. – експерименти з тромбіном, аналіз даних; написання статті;

Юсова О. – виділення і характеристика плазмін(оген), аналіз даних;

Чернишенко В. – обговорення результатів та загальне керівництво.

5. Ye. Makogonenko, V. Chernyshenko, V. Bardyk, **A. Udovenko**, S. Komisarenko. Paralogism in method of Thrombin Generation Assay (TGA) in human blood plasma. Ukr. Biochem. J. 2025; Volume 97, Issue 1, Jan-Feb, pp. 75-79. DOI: 10.15407/ubj97.01.075 (**Q4**).

Є. Макогоненко – основна ідея дослідження, планування експериментів, аналіз результатів та написання статті;

В. Чернишенко – аналіз даних, загальне керівництво;

В. Бардик – аналіз даних та написання статті;

А. Удовенко – турбідиметричний аналіз, аналіз результатів та написання статті;

С. Комісаренко – обговорення результатів, загальне керівництво.