

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
імені ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

На правах рукопису

**АНДРІАНОВА Катерина Сергіївна**

УДК 577.152.3:612.115

**ДОСЛІДЖЕННЯ ОКРЕМИХ ЛАНОК ПРОЦЕСУ ФІБРИНОЛІЗУ ЗА  
УМОВ МОДЕЛЮВАННЯ *IN VITRO***

03.00.04 – біохімія

**Дисертація  
на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук**

Науковий керівник:  
доктор біологічних наук,  
старший науковий співробітник  
ВЕРЬОВКА Сергій Вікторович,

Київ 2011

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	5
ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	11
1.1. Взаємодія ендотелію, імунокомпетентних клітин і гуморальної ланки системи гемостазу під час запалення	11
1.2. Роль структури згустку у забезпеченні його фізіологічних функцій	21
1.3. Механізми гідролізу фібринового згустку за фізіологічних умов	31
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	35
2.1. Методологія дослідження	35
2.2. Матеріали та реагенти	41
2.3. Методи дослідження	42
2.3.1. Одержання білкових препаратів	42
2.3.1.1. Очищення плазміногену	42
2.3.1.2. Активація плазміногену	45
2.3.1.3. Фрагментація молекули плазміногену панкреатичною еластазою та очищення одержаних фрагментів	46
2.3.1.4. Інгібування активного центру мініплазміногену	49
2.3.1.5. Одержання фібриногену	49
2.3.1.6. Одержання продуктів деградації фібрину (ПДФ)	50
2.3.1.7. Одержання дезААВВ-фібрин-мономеру (розчинного фібрину)	51
2.3.1.8. Одержання тромбіну	52
2.3.1.9. Одержання антитромбіну III	56
2.3.1.10. Одержання $\alpha_2$ -макроглобуліну	57
2.3.2. Одержання гідроксикислот	59
2.3.2.1. Окиснення ліпідів	60
2.3.2.2. Відокремлення фракції гідроксикислот	60
2.3.2.3. Визначення вмісту гідроксикислот	61

2.3.3. Методи визначення функціональної активності білків	62
2.3.3.1. Казеїнолітичний метод визначення активності (міні)плазміну	62
2.3.3.2. Казеїнолітичний метод визначення активності трипсину	63
2.3.3.3. Метод визначення активності трипсину з використанням синтетичного субстрату БАПНА	64
2.3.3.4. Визначення інгібіторної активності препарату $\alpha_2$ -макроглобуліну	65
2.3.3.5. Визначення коагуляційної активності препарату тромбіну	65
2.3.3.6. Визначення інгібіторної активності антитромбіну III	66
2.3.4. Електрофоретичні методи	67
2.3.4.1. Електрофорез у поліакриламідному гелі	67
2.3.4.2. Ензим-електрофорез	69
2.3.5. Електронна мікроскопія	69
2.3.6. Визначення концентрації білка	70
2.3.7. Турбідиметрія	71
2.3.7.1. Статична система турбідиметрії	73
2.3.7.2. Динамічна система турбідиметрії	75
2.3.8. Математична обробка результатів	76
РОЗДІЛ 3. ДИНАМІЧНА СИСТЕМА ДОСЛІДЖЕННЯ ФІБРИНОЛІЗУ	77
3.1. Розробка установки для моделювання фібринолізу в умовах реального потоку	77
3.2. Порівняння результатів, одержаних у стаціонарній і динамічній системах моделювання фібринолізу	80
РОЗДІЛ 4. ВПЛИВ ПРОДУКТІВ І ЧИННИКІВ ЗАПАЛЕННЯ НА УТВОРЕННЯ ТА ЛІЗИС ФІБРИНОВОГО ЗГУСТКУ	92
4.1. Характеристика препарату $\alpha_2$ -макроглобуліну	92
4.2. Швидкість утворення та лізису фібринового згустку за присутності $\alpha_2$ -макроглобуліну	94

4.3. Характеристика препарату гідроксикислот	95
4.4. Вплив гідроксикислот на швидкість утворення та лізису фібринового згустку	96
4.5. З'ясування можливості взаємодії $\alpha_2$ -макроглобуліну та гідроксикислот у регуляції утворення та лізису згустку	99
4.6. Електронно-мікроскопічне дослідження структури згустку, утвореного за наявності гідроксикислот	101
4.7. Вплив продуктів деградації фібрину на лізис фібринового згустку	104
<b>РОЗДІЛ 5. ВПЛИВ ПРОДУКТІВ ЕЛАСТОЛІЗУ МОЛЕКУЛИ ПЛАЗМІНОГЕНУ НА ЛІЗИС ФІБРИНОВОГО ЗГУСТКУ</b>	<b>108</b>
5.1. Еластазна активність у зоні запалення та фрагментація молекули плазміногену	108
5.2. Вплив кринглових структур молекули плазміногену на лізис фібринового згустку	110
5.3. Вплив мініплазміногену на лізис фібринового згустку	112
5.4. Дослідження можливості поєднання ефектів гальмування фібринолізу мініплазміногеном і вільними крингловими структурами	115
5.5. З'ясування механізмів гальмівного ефекту мініплазміногену	119
<b>РОЗДІЛ 7. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ</b>	<b>124</b>
<b>ВИСНОВКИ</b>	<b>133</b>
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ</b>	<b>134</b>

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

IL-1	- інтерлейкін-1
IL-6	- інтерлейкін-6
NF-κB	- ядерний фактор «капа-бі»; англ. <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i> , <i>NF-κB</i> — універсальний фактор транскрипції, який контролює експресію генів імунної відповіді, апоптозу та клітинного циклу
TFPI	- інгібітор тромбопластин-залежного шляху активації системи зсідання крові
АКС	- антикоагулянтна система
α1-ІІІ	- α1 – інгібітор протеїназ
К 1-5	- 1 по 5 крингли молекули плазміногену
к. о.	- казеїнолітична одиниця
м-Пг	- мініплазміноген
ПАІ	- інгібітор активаторів плазміногену
ПАР	- протеїназоактивований рецептор
Пг	- плазміноген
ПДФ	- продукти деградації фібрину
СК	- стрептокіназа
ТАФІ	- тромбін-активований інгібітор фібринолізу
ТМ	- тромбомодулін
тПА	- тканинний активатор плазміногену
ТФ	- тканинний фактор, тромбопластин, тромбокіназа
уПА	-активатор плазміногену урокіназного типу
уПАР	- рецептор активатору плазміногену урокіназного типу
ФНП-α	- фактор некрозу пухлин-α

## ВСТУП

**Актуальність теми.** Характерною ознакою синдрому запалення є зміна фенотипу ендотелію з тромборезистентного на тромбопластичний, активація системи зсідання крові та утворення настінкових внутрішньосудинних фібринових депозитів [12]. Подібні зміни системи гемостазу показано як для патологій різної етіології, зокрема інфарктів, злоякісного процесу, пневмоній, ускладнень вагітності тощо [1-4].

Нині вже можна вважати остаточно доведеним, що такі депозити є нормальною та необхідною умовою розвитку синдрому запалення та забезпечення ремоделювання тканин. Насьогодні є доведеними такі функції фібринових депозитів як утворення матриксу для адгезії та міграції ендотеліальних і стовбурових клітин, фібробластів тощо; регуляція проліферативної, секреторної та міграційної активності клітин; накопичення факторів росту у зоні регенерації; локалізація зони запалення; регуляція статусу стінок кровоносних судин [115].

Зважаючи на ці функції фібринових депозитів, для клінічної практики почали розробляти препарати фібринових гелів [117]. Зокрема, їх застосовують як гемостатичний клей під час пошкодження тканин і заклеювання судин під час операцій; засоби доставки та депонування терапевтичних препаратів і клітин до місця пошкодження; промоутери диференціації клітин та ремоделювання тканин. Відтак останнім часом з'явилася значна кількість робіт, присвячених способам подовження життя фібринових депозитів. Зокрема, застосовують іммобілізацію до фібринового гелю інгібіторів серинових протеїназ, наприклад апротеніну [5]. Водночас такі способи є не зовсім безпечними з огляду на можливе потрапляння інгібіторів до кровоносного русла. Тож цілком очевидним є той факт, що з'ясування фізіологічних механізмів утворення та утримання фібринових депозитів у зоні запалення наразі є досить актуальним.

Дослідження механізмів фібринолізу у статичних системах дало змогу охарактеризувати основні компоненти плазміноген/плазмінової системи, з'ясувати природу їхньої взаємодії між собою та з фібрином, конкретизувати етапи деградації згустку. Проте вони не дали змоги з'ясувати механізми драматичного гальмування фібринолізу, яке зафіксовано *in vivo* під час запалення. Така розбіжність між результатами, одержаними *in vitro* та *in vivo* обумовила необхідність створення динамічних систем дослідження фібринолізу. Протягом останніх двох десятиліть було створено чимало динамічних моделей, проте жодна з них не давала змоги адекватно змодельовати фізіологічні умови гідролізу згустку під час запалення.

Окрім того, поза увагою дослідників досі лишалася можливість регуляції швидкості фібринолітичного процесу продуктами та чинниками запалення, такими як білки гострої фази, продукти пероксидного окиснення ліпідів, секретовані імунокомпетентними клітинами білки тощо. Хоча для деяких з них показано можливість зв'язуватися з фібрином або компонентами плазміноген/плазмінової системи, тож можна було припустити їхню здатність регулювати процесу фібринолізу. Нами було вивчено можливий вплив на швидкість гідролізу згустку тих з речовин, для яких було доведено можливість взаємодіяти з учасниками фібринолітичного процесу.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.**  
Представлена дисертаційна робота – завершене дослідження, виконане автором відповідно до програми експериментальних досліджень, спланованих, проведених та узагальнених протягом 2005-2010 років. Роботу проведено в рамках виконання НДР “Аномальний лізис фібринового згустку за різних патологічних станів” (№ державної реєстрації 0104U003275, 2004-2005), НДР “Дослідження регуляції утворення та гідролізу фібринових згустків” (№ державної реєстрації 0106U002049, 2006-2008) та НДР “Механізми формування та деградації тромбу. Розробка алгоритмів

діагностики порушень систем зсідання крові та фібринолізу” (№ державної реєстрації 0104U003276, 2009-2013).

**Мета і завдання дослідження.** Метою роботи було дослідження окремих ланок фібринолізу за умов експериментальної моделі *in vitro*

Для досягнення мети було поставлено такі завдання:

1. Розробити експериментальну модель дослідження окремих ланок фібринолізу в умовах динамічного потоку, наближених до фізіологічних і порівняти процеси фібринолізу за статичних та динамічних умов.

2. Визначити вплив на швидкість гідролізу згустку  $\alpha_2$ -макроглобуліну.

3. З’ясувати вплив на перебіг фібринолітичного процесу гідрокислот, як невід’ємних компонентів запальних процесів.

4. Дослідити можливість участі продуктів деградації фібрину в процесі гідролізу згустку.

5. Вивчити вплив продуктів еластазного гідролізу молекули плазміногену на швидкість гідролізу фібринового згустку в умовах реального потоку.

*Об’єкт досліджень* – фібриновий згусток, що руйнується в умовах динамічного потоку

*Предмет дослідження* – взаємодії компонентів плазміноген/плазмінової системи.

*Методи дослідження* – під час виконання роботи було використано хроматографічні, спектрофотометричні, електрофоретичні, електронно-мікроскопічні методи.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Розроблено та опрацьовано експериментальну модель динамічної системи дослідження фібринолізу з адекватним моделювання фізіологічних умов.

Розмежовано внесок у швидкість гідролізу згустку плазмін(оген)у, інкопорованого до згустку під час утворення, та вільного – з потоку.

Доведено, що гідроксикислоти та  $\alpha_2$ -макроглобулін не відіграють суттєвої ролі у регуляції фібринолізу *in vivo*.

З'ясовано регуляторну значимість для фібринолізу вільних кринглових структур та мініплазміногену, які є еластазними фрагментами молекули плазміногену.

**Практичне значення одержаних результатів.** Результати роботи мають діагностичну значимість для підбору засобів тромболітичної терапії та контролю перебігу відповідних патологій. З'ясовані в роботі механізми регуляції швидкості деградації згустку в зоні запалення є підґрунтям для розробки якісно нової тромболітичної терапії.

Розроблена динамічна система дослідження фібринолізу в умовах реального потоку може бути широко використана у лабораторній практиці вивчення взаємодії фібрину з компонентами плазміноген/плазмінової системи, білками плазми крові, форменими елементами тощо.

**Особистий внесок здобувача.** Всі дані, представлені в роботі одержано безпосередньо здобувачем. Розробка та опрацювання динамічної моделі дослідження фібринолізу проведено спільно з Вартановим В. Г., Горошніковою Т. В. та Сломінським О. Ю.

Аналіз одержаних даних, обговорення та інтерпретацію результатів проведено спільно з науковим керівником д.б.н., ст.н.с. Верьовкою С. В., к.б.н. Андріановим С. І. та к.б.н. Петіком А. В. Друковані праці підготовлено за безпосередньої участі автора.

**Апробація результатів дисертації.** Результати досліджень були представлені на міжнародній школі-конференції молодих учених «Системная биология и биоинженерия», ІХ та Х Українських біохімічних з'їздах Конференції молодих учених „Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2010”, а також доповідались на засіданнях кафедри біохімії біологічного факультету Київського національного університету імені Тараса Шевченка та наукових семінарах відділу структури і функції білка Інституту біохімії імені О.В. Палладіна.

**Публікації.** За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 7 наукових праць, з яких 3 статті у фахових періодичних виданнях, затверджених переліком ВАК України та 4 тези доповідей у збірниках наукових конференцій.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, результатів та їх обговорення, які викладено у трьох розділах, аналізу та узагальнення результатів, висновків, списку використаних джерел (285 найменування). Роботу викладено на 157 сторінках друкованого тексту та проілюстровано 30 рисунками, 6 формулами та 6 таблицями.

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### **1.1. Взаємодія ендотелію, імунокомпетентних клітин і гуморальної ланки системи гемостазу під час запалення**

За нормальних умов рідкий стан крові підтримують ендотеліальні клітини завдяки своїм тромборезистентним властивостям, обумовленим системою протеїну С, експресією на поверхні клітин інгібітору тромбопластин-залежного шляху активації системи зсідання крові (TFPI) та специфічного рецептору уПА (урокіназного протеїназоактивованого рецептору – уПАР), а також синтезом та секрецією активаторів плазміногену тканинного та урокіназного типу (тПА та уПА відповідно), простацикліну тощо [6, 7].

До системи протеїну С входять тромбомодулін, власне протеїн С, ендотеліальний рецептор протеїну С (EPCR), протеїн S та інгібітор протеїну С [8]. Тромбомодулін є специфічним рецептором ендотеліальних клітин, який в разі появи вільного тромбіну зв'язує його, елімінуючи таким чином з кровоносного русла. Зв'язаний тромбін втрачає здатність гідролізувати фібриноген, проте здатен активувати протеїн С [9]. Протеїн S не є необхідним для активації системи, але, будучи кофактором протеїну С, значно прискорює його зв'язування з EPCR та активацію [10]. Надалі протеїн С специфічно гідролізує фактор V, перериваючи внутрішній шлях активації коагуляції [11]. Таким чином, система протеїну С виконує подвійну функцію: з одного боку елімінує активний тромбін з плазми, зв'язуючи його з тромбомодуліном, з другого – перериває шлях активації тромбіну завдяки гідролізу фактору Va.

Секретований ендотеліальними клітинами TFPI утворює четвертинний комплекс з тканинним фактором (ТФ), факторами VIIa та Ха з подальшою інтерналізацією комплексу [12]. За нормальних умов TFPI залишається зв'язаним з вуглеводним компонентом протеогліканів зовнішньої мембрани ендотеліальних клітин – глікозаміногліканами, внаслідок чого забезпечено високий рівень інгібування комплексу ТФ–VIIa–Ха [13]. Постульовано, що у вільному стані інгібіторні властивості TFPI є значно слабшими, аніж на поверхні клітини, хоча достеменно це не підтверджено [14].

У досліджах на культурі клітин було показано, що усі ендотеліальні клітини, незалежно від їхнього походження, синтезують тканинний активатор плазміногену (тПА) [15]. Продукцію ендотеліоцитами тПА *in vitro* регульовано багатьма зовнішніми стимулами. Реалізується така регуляція як на рівні транскрибування генів і його синтезу, так й інтенсивності секреції з клітини. Зростання рівня тПА в плазмі крові за різних патологій дає змогу зробити припущення, що така ж регуляція відбувається й *in vivo*. Показано також існування зворотнього зв'язку: на поверхні ендотеліальних клітин виявлено рецептори до тПА, найвідомішим з яких є анексин II [16].

Синтезу ендотеліальними клітинами активатора плазміногену урокіназного типу (уПА) за нормальних умов досі не зафіксовано. Показано експресію уПА ендотеліоцитами у місцях пошкодження судини або ангиогенезу [17]. З огляду на величезний масив даних з участі уПА у забезпеченні міграції фібробластів і злоякісних клітин [18, 19], з цих дослідів було зроблено припущення щодо його участі у міграції також і ендотеліальних клітин в рамках ремоделювання тканин [20]. Рецептор уПА (уПАР) експресовано не лише на ендотеліальних клітинах, а й на клітинах інших типів. уПАР є тридоменним білком, заякореним у біліпідному шарі за допомогою глікофосфатидилінозитулу. Окрім участі у забезпеченні міграції клітин, за що йшлося вище, він відіграє, можливо, певну роль у регуляції фібринолізу. Принаймні, *in vitro* показано, що після зв'язування

одноланцюгової молекули уПА (саме така форма є поширеною в плазмі крові) відбувається зростання рівня активації плазміногену. Враховуючи, що у зв'язаному стані уПА є захищеною від дії інгібіторів активаторів плазміногену (ПАІ), ПАІ-1 та ПАІ-2, в разі реалізації цього механізму *in vivo* це дає змогу пролонгувати дію активатора та призводить, очевидно, до суттєвого зростання локальної концентрації плазміну [21]. Принагідно слід зауважити, що на багатьох типах клітин, у тому числі ендотеліальних клітинах, виявлено сайти зв'язування для плазміногену. Плазміноген, зв'язаний на поверхні ендотеліальних клітин, може бути активованим як уПА, так і тПА, причому плазмін в такому разі захищено від дії  $\alpha_2$ -антиплазміну [22].

Характерною ознакою синдрому запалення є індукція низки докорінних змін властивостей ендотелію, і таким чином локального статусу судин та біохімічного складу крові. Універсальний месенджер запалення гістамін індукує процеси пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ), що супроводжується появою біоактивних сполук, зокрема гідроксикислот [23, 24]. Який фермент ініціює утворення гідроксикислот *in vivo* досі достеменно не з'ясовано, можливими тригерами ПОЛ у зоні запалення виступають ліпооксигенази, циклооксигенази, цитохром P<sub>450</sub> залежні монооксигенази, мієлопероксидази тощо [25-31]. Гідроксикислоти справляють не лише руйнівний вплив на мембрану, а відтак і на функціонування клітини, вони також виступають індукторами запалення, а також попередниками простагландинів [32].

Окрім безпосереднього впливу на фізико-хімічні властивості зовнішньої мембрани ендотеліальних клітин, гідроксикислоти здатні взаємодіяти з декількома типами рецепторів. Зокрема показано їхнє зв'язування з рецепторами, зв'язаними з G-білком (GPCR) [33, 34]; простагландиновими рецепторами [35]; рецепторами, що активують проліферацію пероксисом [36]. Найповніше охарактеризованим специфічним

рецептором гідроксикислот на ендотеліоцитах є лектиноподібний рецептор окиснених ліпопротеїдів низької щільності-1 (LOX-1) [37]. Рецепторною взаємодією обумовлено регуляцію гідроксикислотами синтезу ІЛ-6, ІЛ-8, хемоатрактантного білку моноцитів-1 (MCP-1), онкогенного фактору росту  $\alpha$  (GRO $\alpha$ ), прозапальних білків макрофагів MIP-1 $\alpha$  та MIP-1 $\beta$ , хемокіну CXCL3 тощо [38-44].

Стимульовані гістаміном, чужорідними антигенами, токсинами, ліпополісахаридами тощо моноцити секретують медіатори запалення, зокрема ІЛ-1, ІЛ-6 та фактор некрозу пухлин [45, 46]. Вони пригнічують синтез протеогліканів, за допомогою яких TFPI, антитромбін та EPCR закріплено на поверхні клітини [12]. З зовнішньої мембрани ендотеліальних клітин також повністю інтерналізується тромбомодулін, пригнічується його синтез аж до репресії транскрипції його гену [47]. Однак хоча цитокіни запалення індукують інтерналізацію тромбомодуліну, у плазмі крові залишається його розчинна форма [48]. Було показано, що саме розчинна форма ТМ здатна активувати білок, відомий під назвою тромбін-активований інгібітор фібринолізу (ТАФІ), а утворення комплексу ТМ-тромбін посилює цю активацію [49]. ТАФІ – це прокарбоксіпептидазо-В-подібна молекула, яка в активованому стані відщеплює С-кінцеві залишки фібрину, що призводить до втрати на ньому сайтів зв'язування плазміногену/плазміну та тПА та, відповідно, до затягування фібринолізу [50].

Медіатор запалення ІЛ-6 є також необхідним для індукції синтезу тканинного фактору (ТФ) або тромбопластину [51, 52]. ТФ є трансмембранним глікопротеїном, який в разі контакту клітини з плазмою крові утворює комплекс з фактором VII, активуючи останній. Комплекс ТФ-фактор VIIа своєю чергою активує фактори X і IX системи зсідання крові [53, 54]. Після перетворення фактору X на Xа утворений потрійний комплекс ТФ–VIIа–Xа ще деякий час утримується на поверхні ендотеліальної клітини. Було показано участь цього комплексу у передачі сигналу всередину клітини через рецептори PAR-1 і PAR-2 за розвитку запальних процесів [55].

*In vitro* експресію ТФ ендотеліальними клітинами здатні індукувати різні речовини, зокрема тромбін, ендотоксин, деякі цитокіни, гідроксикислоти тощо [56]. Цікавим є те, що ТФ за таких обставин локалізовано, переважно, з нижнього боку ендотеліоцитів та між клітинами [57]. Однак експресія ТФ ендотеліоцитами *in vivo* досі дискутується. Принаймні наразі є факти як на користь такої експресії [58], так і заперечення її наявності [59-61]. Проте не піддається сумніву експресія ТФ у зоні запалення активованими моноцитами та макрофагами [62, 63]. Причому моноцити відшаровують ділянки мембрани з експресованим ТФ, насичуючи тим самим плазму крові везикулами, здатними активувати утворення згустку [64]. Таку секрецію, окрім медіаторів запалення, індукують тромбоцити та гранулоцити за Р-селектин-залежним механізмом [61, 65, 66], а Р-селектин своєю чергою здатні секретувати клітини ендотелію, активовані тромбіном [67]. Крім того, нещодавно було виявлено в плазмі крові розчинну форму ТФ та показано секрецію такої форми в культурі ендотеліальних клітин під впливом медіаторів запалення [68].

Вплив цитокінів запалення на систему зсідання крові суттєво посилюють гідроксикислоти. Зокрема в експериментах на культурі ендотеліальних клітин показано, що гідроксикислоти стимулюють експресію ТФ [69], пригнічують транскрипцію гену ТМ [70], напряду зв'язуються з С-кінцем TFPI, тим самим інгібуючи його дію [71], активують тромбоцити за відмінним від тромбоцитаактивуючого фактору механізмом [72].

Поряд з експресією прокоагулянтних білків під впливом медіаторів запалення посилюється синтез інгібіторів фібринолізу. Так у культурі, ендотеліальні клітини у великій кількості продукують ПАІ-1 [73]. Він є асоційованим з позаклітинним матриксом, який стабілізує його активність. Синтез ПАІ-1 стимулюють численні агенти, зокрема тромбін, ендотоксин, різні цитокіни, ліпопротеїн (а), продукти пероксидного окиснення ліпідів тощо [74]. Цікаво, що зазвичай *in vivo* основним джерелом ПАІ-1 є печінка,

тоді як ендотеліальні клітини у нормі практично або і зовсім його не секретують. Проте під час запалення синтез ПАІ-1 здійснюється ендотеліальними клітинами незалежно від місця їхнього розташування.

Прокоагулянтна активність ендотеліального моношару посилюється також в разі індукції апоптозу, коли в просвіті судин з'являються мікрочастки активованих чи апоптичних клітин. Показано ймовірність утворення мікрочасток тромбоцитами, гранулоцитами, еритроцитами, ендотеліоцитами тощо [75]. Збільшення в цільній крові кількості мікрочасток ендотеліального походження зафіксовано за різних патологічних станів, зокрема венозній тромбоемболії [76], стенозі аорти [77], розсіяному склерозі [78] тощо. На поверхні таких мікрочасток експоновано велику кількість негативно заряджених фосфоліпідів, необхідних для активації факторів зсідання крові та генерації тромбіну. Крім того, для них показано експресію ТФ, причому за умов запалення кількість мікрочасток з експонованим ТФ суттєво зростає [79]. Було показано, що мікрочастки, утворені ендотеліальними клітинами під впливом ФНП- $\alpha$ , здатні індукувати коагуляцію за тромбопластиновим шляхом [80]. На поверхні мікрочасток ендотеліального походження було показано також експресію мультимерів фактору фон Віллебранда та сайтів зв'язування цієї білкової молекули, що призводить до посилення агрегації тромбоцитів та підвищення їхньої стабільності [81, 82]. В умовах *in vitro* було показано прямий прокоагулянтний вплив апоптичних ендотеліальних клітин [83], однак чи реалізується цей вплив *in vivo* достеменно невідомо.

Активована внаслідок цитокін-залежного впливу ендотелію та моноцитів система зсідання крові своєю чергою виступає продуцентом вторинних месенджерів запалення, зокрема можна згадати регуляцію статусу ендотеліальних клітин через активацію родини протеїназоактивованих рецепторів (ПАР) тромбіном і факторами зсідання. До цієї родини належать ПАР-1, ПАР-2, ПАР-3 та ПАР-4 рецептори, локалізовані в різних типах

клітин [84, 85]. На ендотеліальних клітинах показано експресію всіх чотирьох типів [86]. Вже низькі концентрації тромбіну здатні активувати ПАР-1, тоді як для активації ПАР-3 і ПАР-4 необхідні його високі концентрації. Окрім тромбіну активувати ПАР здатні комплекс ТФ-VІа фактор, Ха фактор, активований протеїн С тощо. Слід зазначити, що фактори VІа, ІХа, Ха, ХІа, ХІІа здатні активувати і ПАР-2, який не взаємодіє з тромбіном [87]. Механізм активації ПАР полягає у відщепленні протеїназою N-кінця рецептора. Відщеплений фрагмент зв'язується зі специфічним сайтом рецептора, активуючи його, а через нього білок G, з яким рецептор є міцно зв'язаним [84]. Таким чином, ПАР не беруть безпосередньої участі в індукції чи активації коагуляції, а виступають як типові регуляторні рецептори. Активація тромбіном ПАР-1 у культурі клітин призводить до цілої низки змін експресії тромборезистентних та тромбопластичних молекул, включаючи ТФ, ПАІ-1, простагландин, NO тощо, а також до руйнування міжклітинних контактів [88]. Можна припустити, що це є механізм індукції утворення міжендотеліальних пор, характерних для стінок судин у зоні запалення. Тромбін через активацію ПАР-1 є мітогенним для ендотеліоцитів, фібробластів і гладеньких м'язових клітин, а також хемотаксичним для моноцитів [89].

Контроль за рівнем тромбіну є найважливішою ланкою у підтриманні балансу між нативною тромборезистентною та індукованою тромбопластичною активностями ендотелію [90]. Тромбін (КФ 3.4.4.13) належить до класу серинових протеїназ і бере участь як у процесах коагуляції, так і в антикоагулянтних процесах [91]. Тромборезистентні властивості тромбіну полягають у активації нейрогуморальної антикоагулянтної системи (АКС) [92] та системи протеїну С, стимуляції секреції ендотеліальними клітинами антиагрегатних простагландинів і тканинного активатора плазміногену. До прокоагулянтних властивостей тромбіну належать стимуляція секреції ендотеліальними клітинами адгезивних білків, відщеплення від фібриногену фібринопептидів А та В, що

призводить до утворення фібринового згустку, перетворення фактору XIII у фактор XIIIa, індукція адгезії лейкоцитів до стінки судини й агрегації клітин та активація тромбоцитів [93]. Активовані тромбоцити секретують вміст своїх гранул і лізосом. Зокрема, з лізосомальних гранул в просвіт судин вивільнюються колагеназа, N-ацетил- $\beta$ -глюкозамінідаза,  $\beta$ -глюкуронідаза,  $\beta$ -гліцерофосфатаза,  $\alpha$ -манозидаза, активатор плазміногену, катепсини, проеластаза, еластаза тощо [91].

Подібні ферменти секретують і активовані нейтрофіли, активація яких відбувається під впливом медіаторів запалення. Одними із таких медіаторів виступають фібрин і продукти його деградації, для яких було показано наявність спеціалізованого рецептору на моноцитах і нейтрофілах, а саме  $\alpha_M\beta_2$  (Mac-1) рецептору [94]. Зв'язування D-домена молекули фібрин(оген)у із цим рецептором на поверхні нейтрофіла призводить до значних змін в клітині, зокрема вивільнення кальцію, активацію NF- $\kappa$ B, підвищення активності кіназ, дегрануляції, зміни у кількості молекул адгезії на поверхні клітини, зростанню міграції та зниженню апоптозу [95-97]. Активовані таким чином нейтрофіли секретують мієлопероксидазу, лізоцим, колагеназу, протеїназу-3, катепсини G, B і D, желатиназу, N-ацетил- $\beta$ -глюкозамінідазу,  $\beta$ -глюкуронідазу,  $\beta$ -гліцерофосфатазу,  $\alpha$ -манозидазу, лактоферин, білок, що зв'язує вітамін B<sub>12</sub>, еластазу тощо [98].

Отже, у зоні запалення різко підвищується рівень гідролітичних ферментів, зокрема еластази. Роль еластази у процесах фібринолізу є подвійною: з одного боку, вона безпосередньо здатна гідролізувати фібриновий згусток, а з іншого – гідролізуючи молекулу плазміногену призводить до утворення мініплазміногену та ангіостатинів [99].

Плазміноген є неактивним попередником дволанцюгової серинової протеїнази – плазміну (КФ 3.4.21.7), яка є основним ферментом фібринолізу та учасником багатьох фізіологічних і патологічних процесів: тканинної диференціації, міграції клітин, ангіогенезу, тощо [100]. Нативний

плазміноген є одноланцюговим глікопротеїдом з молекулярною масою 92 кДа, що містить близько 2% вуглеводів. Розщеплення лише одного пептидного зв'язку ( Arg<sub>561</sub> - Val<sub>562</sub>) у плазміногені призводить до утворення активного ферменту – плазміну, тобто утворюється дволанцюгова молекула, яку складено з важкого А-ланцюга (60 кДа) та легкого В-ланцюга (25 кДа), з'єднаних між собою двома дисульфідними містками: Cys<sub>548</sub> - Cys<sub>666</sub> і Cys<sub>558</sub> - Cys<sub>666</sub> (завдяки другому S-S зв'язку ділянку молекули, яка атакується активаторами плазміногену, розташовано у вузькій петлі). Характерною ознакою молекули плазміногену є наявність п'яти кринглів – петлеподібних структур, що містять приблизно 80 амінокислотних залишків і стабілізуються трьома дисульфідними містками кожна [101]. Схожі структури було описано ще для шести білкових молекул, а саме протромбіну, ліпопротеїну А, фактору XII, тПА, уПА та фактору росту гепатоцитів [91].

У дослідях *in vitro* еластазний гідроліз молекули плазміногену призводить до утворення трьох структур: кринглів 1-3 (К 1-3), кринглу 4 (К 4) та легкого ланцюгу плазміногену з п'ятим кринглом (К 5) – мініплазміногену [102]. Слід зазначити, еластазний гідроліз молекули плазміногену проходить двоетапно за двома можливими сценаріями: першочергове відщеплення К 1-3 з утворенням ангіостатину 1-3 та Val<sub>355</sub>-плазміногену з подальшим відщепленням від останнього четвертого кринглу й перетворенням його на мініплазміноген; першочергове відщеплення кринглів 1-4 (К 1-4) з утворенням ангіостатину 1-4 й мініплазміногену з подальшим розщепленням ангіостатину 1-4 на ангіостатин 1-3 та К 4. Враховуючи, що *in vivo* ангіостатин зафіксовано щонайменше у двох ізоформах (1-3 та 1-4), найімовірніше еластазний гідроліз молекули плазміногену у зоні запалення проходить за подібними сценаріями [103]. Загалом питання походження ангіостатину та варіацій його ізоформ дебатуються і понині. Показано, що в разі протеолізу молекули плазміногену не еластазою, а калікреїнами, металопротеїназами чи автолізу за присутності донорів вільних

сульфгідрильних груп, окрім канонічних ангіостатинів 1-3 та 1-4, можуть утворюватися такі екзотичні ізоформи як К 2-3; К 1-4.5; К 5 тощо [103-108].

Показано, що ангіостатин є потужним інгібітором ангіогенезу *in vivo*. В експериментах *in vitro* показано здатність ангіостатину активувати ендотеліальні клітини, ініціювати апоптоз та інгібувати їхню міграцію [109]. Акцепторами ангіостатину на ендотеліоцитах є АТФ-синтетаза, ангіомотин, інтегрини тощо. Було охарактеризовано внесок кожного кринглу у функціонування всієї молекули ангіостатину і показано, що найпотужніший вплив на інгібування проліферації ендотеліальних клітин справляє К1 (більше 50% всієї активності), слабший – К 3, ще слабший – К 2; для К 4 не показано жодної цитостатичної активності. Більше того, ізоформа ангіостатину 1-3 здатна до активнішого інгібування росту ендотелію, ніж ангіостатин 1-4 [110]. Ангіостатин 1-5 та ізольований К 5, також справляють виражений антиангіогенний ефект [111, 112]. Пригнічення ангіостатином неоваскуляризації тканин призводить до гальмування ремоделювання тканин, росту злоякісних пухлин і запобігає розвитку метастазів [113, 114].

Отже, цитокіни запалення індукують зміну тромборезистентних властивостей ендотелію на тромбопластичні, активацію макрофагами, моноцитами та ендотеліальними клітинами системи зсідання крові з постійним утворенням фібрину протягом усього процесу запалення. Другою характерною рисою синдрому запалення є насичення зони активації тромбоцитів і нейтрофілів протеїназами різної природи та специфічності. Водночас слід зауважити, що жодна з секретованих протеїназ не є специфічною до фібрину, тоді як, скажімо, для гідролізу колагену базальної мембрани нейтрофіли продукують специфічні металопротеїнази. Отже, можна зробити висновок, що зміни, індуковані цитокінами запалення, спрямовано на утворення та утримання фібринових депозитів на стінках кровоносних судин.

## **1.2. Роль структури згустку у забезпеченні його фізіологічних функцій**

Протягом останнього десятиріччя доведено, що утворення внутрішньосудинних фібринових депозитів відіграє важливу роль у регуляції статусу судин під час розвитку синдрому запалення [115]. Насьогодні є доведеними такі функції фібринових депозитів як утворення матриксу для адгезії та міграції ендотеліальних і стовбурових клітин, фібробластів тощо; регуляція проліферативної, секреторної та міграційної активності клітин; накопичення факторів росту у зоні регенерації; локалізація зони запалення; регуляція статусу стінок кровоносних судин.

Тож не дивно, що фібриноген належить до так званих білків гострої фази. До цього класу віднесено білки плазми крові, чия концентрація істотно зростає протягом 4-6 годин після пошкодження тканини чи індукції запалення [116]. Зростання концентрації фібриногену вкупі зі згадуваними в Розділі I зміною властивостей ендотелію та активацією системи зсідання крові практично за будь-яких патологій призводить до утворення внутрішньо-судинних фібринових депозитів, покликаних забезпечити нормальний перебіг процесу регенерації.

Зважаючи на вже згадані функції фібринових депозитів у реалізації синдрому запалення, для клінічної практики почали розробляти препарати фібринових гелів. Зокрема, насьогодні фібринові гелі застосовують як гемостатичний клей під час пошкодження тканин; засіб доставки терапевтичних засобів та клітин до місця пошкодження; промोутер диференціації клітин та ремоделювання тканин, в тому числі й завдяки забезпеченню тривимірної структури, що полегшує таке ремоделювання [117]. Тож цілком очевидним є той факт, що з'ясування механізмів утворення та утримання фібринових депозитів у зоні запалення наразі є досить актуальним.

Фібрин(оге)н, головна частина будь-якого депозиту, є мультидоменним глікопротеїном завдовжки 45 нм з молекулярною масою 340 кДа. Молекулу фібриногену складено з двох однакових субодиниць, кожна з яких містить по три поліпептидні ланцюги –  $A\alpha$ ,  $B\beta$  та  $\gamma$ . N-кінці всіх шести ланцюгів формують центральний E домен. Надалі по три ланцюги розходяться у протилежних напрямках, формуючи суперспіральну структуру, стабілізовану дисульфідними містками. C-кінцеві фрагменти ланцюгів  $B\beta$  та  $\gamma$  формують дистальні D-фрагменти, тоді як  $A\alpha$ -ланцюгів – формують  $\alpha C$ -домени, що лишаються асоційованими з E-фрагментом аж до початку утворення полімерного фібрину [118].

Процес полімеризації фібриногену за нормальних умов ініціює відщеплення тромбіном N-кінцевого фрагменту  $A\alpha$ -ланцюгів, так званих фібринопептидів A [119]. Розщеплення тромбіном зв'язків  $Arg_{16}-Gly_{17}$   $A\alpha$ -ланцюгів призводить до утворення дез- $AA$  фібрину та експонуванню сайту полімеризації  $E_A$ , до складу якого входять амінокислотні залишки  $\alpha$ -ланцюга з 17 по 20 –  $Gly-Pro-Arg-Val$  (GPRV) та залишки  $\beta$ -ланцюга з 15 по 42 [120]. Сайти  $E_A$  взаємодіють з комплементарними їм сайтами полімеризації  $D_a$  сусідніх молекул фібрину, розташованих між 337 і 379 амінокислотними залишками  $\gamma$ -ланцюга [121]. Така взаємодія ініціює появу протофібрил, утворених двома паралельно розташованими молекулами мономерного фібрину, що напівперекривають одна одну [122]. Подальша асоціація протофібрил можлива у двох напрямках: латерально, коли асоціюють дві протофібрили, та еквілатерально, коли асоціація відбувається за участі трьох протофібрил. Результатом такої взаємодії є утворення фібрили, складеної з чотирьох та більше молекул мономерного фібрину. Еквілатеральна взаємодія призводить до розгалуження фібрил з утворенням тривимірної сітки. Відсоток еквілатеральної асоціації зростає за низьких концентрацій тромбіну та повільного відщеплення фібринопептиду A, а згустки, утворені за таких умов, мають більшу щільність [118].

Відщеплення N-кінцевих фрагментів В $\beta$ -ланцюгів – фібринопептидів В є значно повільнішим, аніж А [122]. Результатом відщеплення перших чотирнадцяти амінокислотних залишків  $\beta$ -ланцюгів є експонування сайту полімеризації E<sub>B</sub>, складеного амінокислотними залишками з 15 по 18 – Gly-His-Arg-Pro (GHRP). Сайти E<sub>B</sub> взаємодіють з комплементарними їм сайтами полімеризації D<sub>B</sub> сусідніх молекул фібриногену, розташованих у  $\beta$ -ланцюзі D-домену [123]. Така взаємодія ініціює перебудову  $\beta$ <sub>C</sub>-ділянки D-домену та формування міжмолекулярних  $\beta$ <sub>C</sub>: $\beta$ <sub>C</sub> контактів, що посилює латеральну асоціацію протофібрил [124].

Важливу роль у процесах самозбирання фібрину відіграють і  $\alpha$ C-домени. По відщепленню фібринопептиду А вони втрачають зв'язок з E-фрагментом і беруть участь у латеральній асоціації протофібрил, пришвидшуючи цей процес та утворюючи первинні контакти між молекулами фібрину і протофібрилами [125].

Участь у процесах самозбирання фібрину беруть і ділянки, розташовані у  $\gamma$ -ланцюзі D-домену, так звані  $\gamma$ <sub>XL</sub>- та D:D-сайти [126]. Роль  $\gamma$ <sub>XL</sub>-сайтів полягає у формуванні міжмолекулярних контактів  $\gamma$ -ланцюгів, що полегшує їхнє подальше прошивання фактором XIIIa. D:D-сайти, розташовані на зовнішньому боці D-домену фібрин(оген)у між 275 і 300 залишками  $\gamma$ -ланцюга, забезпечують правильне розташування сусідніх молекул фібрину у процесі полімеризації [127].

Додаткової стабілізації фібриновому згустку надає утворення фактором XIIIa ковалентних зв'язків  $\gamma/\gamma$  й  $\alpha/\alpha$  між ланцюгами сусідніх молекул. Окрім того показано як міжмолекулярне [128], так і внутрішньомолекулярне [129] прошивання XIIIa фактором  $\gamma/\alpha$ -ланцюгів. Наслідком такого прошивання є збільшення механічної стійкості згустку, забезпечення структурної цілісності фібринових волокон і зростання резистентності до лізису плазміном. Фактор XIII є трансглутаміназою, яка циркулює у кровоносному руслі у вигляді тетрамера A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>, зв'язаного з  $\gamma$ -ланцюгом фібриногену [130]. Його активує

одночасно з відщепленням фібринопептидів від молекули фібриногену тромбін. Відщеплення 37 N-кінцевих амінокислотних залишків субодиниці А призводить до дисоціації інгібіторних субодиниць В [131]. Каталітична активність фактора XIIIa полягає в утворенні ізопептидних зв'язків між  $\epsilon$ -аміногрупами залишків Lys та  $\gamma$ -карбоксигрупами залишків Gln. Прошивання між  $\gamma$ -ланцюгами проходить за одним сайтом між Lys<sub>406</sub> і Gln<sub>398</sub> та/або Gln<sub>399</sub>, є досить швидким процесом, що потребує низьких концентрацій ферменту і відбувається на стадії формування протофібрил. Натомість прошивання між  $\alpha$ -ланцюгами є процесом значно повільнішим, для реалізації якого необхідні далеко вищі концентрації фактору XIIIa. Залишки Gln, що беруть участь в утворенні  $\alpha$ -полімерів, локалізовано у 221, 237, 328, 366 положеннях, залишки Lys – 208, 219, 224, 418, 427, 429, 446, 448, 508, 539, 556, 580, 583, 601 та 606 положеннях [132]. *In vivo* структуру  $\alpha$ -полімерів ускладнено внаслідок додаткового вшивання до згустку таких білків плазми крові, як фібронектин,  $\alpha_2$ -антиплазмін, ТАФІ, фактор фон Віллебранда тощо [133].

Структура фібринового згустку не є сталою – її визначають багато чинників. Зокрема, *in vitro* показано вплив іонної сили розчину, рН, наявності та концентрації тих чи тих катіонів і аніонів, декстранів, колагену, альбуміну, гомоцистеїну, аспірину, метформіну тощо [134]. Хоча за різних патологічних станів доведено можливість зміни у тканинах іонної сили, рН тощо [135], висока буферна ємність крові та особливі властивості альбуміну [136] обумовлюють високу стабільність цих показників у плазмі [137]. Відповідно для обговорення можливої структури внутрішньосудинного згустку *in vivo* варто залучати лише дані стосовно впливу біологічних макромолекул.

В умовах *in vitro* показано, що за різних концентрацій фібриногену формуються згустки, відмінні за своєю структурою [138]. За низьких концентрацій фібриногену згусток складено з товстих фібрил, оскільки за низької концентрації фібрин-мономеру та протофібрил зростає ймовірність еквілатеральної асоціації. Натомість, за високих концентрацій – діаметр

фібрил є значно тоншим, що, вірогідно, обумовлено прискореним формуванням фібрин-мономеру. В умовах *in vivo*, як відомо, концентрація фібриногену є величиною досить лабільною. Окрім згаданого вище зростання рівня фібриногену як одного з білків гострої фази за розвитку запалення, на концентрацію фібриногену впливають і такі чинники як вік, дієта, прийом ліків, паління, алкогольна залежність, індекс ваги тіла, фізичні навантаження, стать, пора року тощо [139].

Також вагомий вплив на структуру згустку мають і генетичні чинники.. Показано зміну структури фібринових згустків за генетичних відмінностей в молекулі фібриногену, фактору XIIIa тощо. Зокрема, у здорових людей виявлено генетичний поліморфізм молекули фібриногену за двома сайтами: заміна Thr<sub>312</sub> Aα ланцюга на Ala [140] та Arg<sub>448</sub> Bβ ланцюга на Lys [141]. Заміна Thr<sub>312</sub> Aα ланцюга на Ala спричинює певну конформаційну перебудову з експонуванням додаткових сайтів прошивки фактору XIIIa. В умовах *in vitro* зафіксовано зміну структури фібринового згустку за присутності Ala<sub>312</sub>, а саме збільшення діаметру фібрил та міцності згустку [140]. Щодо прямого впливу заміни Arg<sub>448</sub> Bβ ланцюга на Lys, то на сьогодні є як роботи, які постулюють такий вплив [142], так і такі, що його спростовують [143]. Однак доведеним є той факт, що обидві заміни збільшують ризик розвитку серцево-судинних захворювань [134].

Інші відомі заміни амінокислотних залишків у молекулі фібриногену призводять до спадкових захворювань, відомих як дисфібриногенемії. Характерною їхньою ознакою є дефектне самоскладання фібрину, а відтак і зміна структури згустку. Зокрема мутації в Aα ланцюзі фібриногену, коли Arg<sub>554</sub> замінено на Cys за синдрому Дусарта [144], або Ser<sub>532</sub> – на Cys за «Каракас V» [145], призводять до утворення щільних згустків, складених із тонких фібрил. Дефектну полімеризацію фібрил зафіксовано й за мутацій γ-ланцюгів [121].

Проте навіть у однойцевих близнюків гетерогенність фенотипів фібринових згустків становить 39-46% [146]. Поліморфізм фібриногену, навіть за генетичної однорідності, визначено можливістю альтернативного сплайсингу його молекули. Так у близько 8-15% молекул фібриногену  $\gamma$ -ланцюг на 12-16 амінокислотних залишків довший, внаслідок чого одержав назву  $\gamma$ -ланцюг [130]. Причому *in vivo*  $\gamma$ -ланцюги у складі молекули фібриногену наявні лише як гетеродимери  $\gamma/\gamma$ . Показано вплив таких гетеродимерів на структуру згустку, а саме формування за їхньої присутності щільніших гелів з меншим діаметром фібрил [147]. Також наявність  $\gamma$ -ланцюгів у складі молекули фібрин(оген)у змінює характер її взаємодії як з фактором XIII, так і з  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -рецепторами тромбоцитів [148].

Альтернативним сплайсингом обумовлено появу і такої форми молекули фібриногену як фібриноген-420 з молекулярною масою 420 кДа внаслідок подовження на 236 амінокислотних залишків  $A\alpha$ -ланцюга ( $\alpha_E$ ) [149]. Такі  $A\alpha$ -ланцюги, на відміну від  $\gamma$ , є гомодимерами [150]. Згідно деяких припущень молекули фібрину з  $\alpha_E$ -ланцюгами під час формування згустку включаються лише до поверхневих фібрил, хоча механізмів розрізнення такими молекулами фібрил на поверхні та в тілі згустку не показано [149]. Присутність таких молекул фібриногену також обумовлює зміну структури згустку, зокрема формування тонших фібрил та більшої кількості сайтів галуження. На  $\alpha_E$ -ланцюзі показано наявність сайту зв'язування  $\beta_2$ -інтегринів лейкоцитів та постульовано, що вони можуть відігравати певну роль у механізмах клітинної адгезії [151].

Генетичний поліморфізм фактору XIIIа також обумовлює зміну структури згустку. Зокрема, заміна в субодиниці А Val<sub>34</sub> на Leu за фізіологічних концентрацій фібрин(оген)у та фактору XIII призводить до формування фібрил меншого діаметру та відповідно менш пористих фібринових гелів [152]. Відомо, що така зміна структури згустку призводить до зростання ризику розвитку тромбозів, однак на ділі ця генетична заміна *in*

*vivo* носить протективний характер [153]. Таку суперечність було розв'язано по з'ясуванні того факту, що за високих концентрацій фібриногену, характерних для синдрому запалення, присутність Leu в структурі фактору XIIIa обумовлює формування згустків з більшим діаметром фібрил та більшими порами [154].

Ключову роль у модулюванні структури згустку відіграє і концентрація тромбіну. Так в умовах *in vitro* за низьких концентрацій тромбіну зафіксовано формування згустків із більшим діаметром фібрил та пористістю, тоді як за високих – діаметр фібрил був значно меншим, а самі гелі – щільнішими [155]. Загалом щодо впливів концентрацій фібриногену та тромбіну слід зауважити, що вирішальним є співвідношення їхніх концентрацій, тож залежність структури згустку для цих факторів є ідентичною [138].

В умовах *in vivo* до структури фібринового згустку включаються й інші білки плазми крові, різні типи клітин та компоненти базальної мембрани пошкоджених ендотеліоцитів. Таке включення можливе як специфічне за рахунок вшивання фактору XIII або взаємодії зі специфічними сайтами зв'язування, так і неспецифічне внаслідок механічного захоплення тривимірною сіткою фібрину [156]. Всі з названих чинників потенційно здатні модулювати структуру згустку. Зокрема таке модулювання показано за присутності еритроцитів [157], плазіногену та його тканинного активатору [158], секреторного компоненту тромбоцитів – поліфосфату [159], фактору тромбоцитів-4 [160], катіонних пептидів лейкоцитів [161], імуноглобулінів G [162], компонентів базальної мембрани – колагену IV типу, ламініну та дерматан сульфату [163], амілоїдного пептиду  $\beta$  [164] тощо.

Зміни структури згустку призводять до варіабельності його стійкості як механічної, так і до дії гідролітичних ферментів, а також модулюють фільтраційну здатність фібрину. Відповідно, зміни білкового складу плазми, характерні для того чи того виду запалення, обумовлюють певну різницю

фізико-хімічних характеристик фібринового депозиту, а відтак і відмінності ступеню обводненості зони запалення, вибору стовбурових клітин тощо. Незмінною характеристикою для всіх видів запалення є зростання рівня фібриногену та локальної концентрації активного тромбіну, внаслідок чого формуються тонковолокнисті щільні згустки.

Така структура згустків перетворює їх на достатньо ефективний фільтр для білків плазми крові, покликаний компенсувати зростання проникності стінок кровоносних судин внаслідок ретракції ендотелію. Принаймні таку компенсацію було показано під час дослідження проникності стінки судин у динаміці розвитку карциноми Льюїс [165].

В умовах *in vitro* показано здатність фібрин(оген)у специфічно зв'язуватись з клітинами, зокрема ендотеліоцитами, міоцитами гладеньких м'язів, кератиноцитами, фібробластами, лейкоцитами тощо. Таке зв'язування є можливим завдяки наявності на клітинах рецепторів до фібрин(оген)у інтегринової та неінтегринової природи [166]. До інтегринових рецепторів фібрин(оген)у належать  $\alpha_M\beta_2$ -рецептори лейкоцитів,  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -рецептори тромбоцитів,  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$  та  $\alpha_5\beta_1$ -рецептори ендотеліальних клітин та фібробластів тощо [115]. До неінтегринових рецепторів фібрин(оген)у належать васкулярний ендотеліальний кадгерин, ICAM-1, P-селектин, GPIIbа тощо [166]. Будучи димерною молекулою, фібриноген може одночасно зв'язуватись з двома різними типами клітин та полегшувати таким чином міжклітинні взаємодії [167].

Адгезія ендотеліоцитів до фібрин(оген)у відбувається через зв'язування його RGD-сайтів, канонічного біля С-кінця  $\alpha$ -ланцюга в положеннях 572-574 та гіпотетичного на N-кінці у положенні 95-97, з інтегриновим рецептором  $\alpha_v\beta_3$  [168]. Крім того, показано високоспецифічну ділянку зв'язування на С-кінці  $\gamma$ -ланцюга молекули фібриногену з тим же рецептором [169]. Також є можливою взаємодія  $\alpha_5\beta_1$ -рецептору ендотеліоцитів з RGD(S)-сайтами молекули фібрин(оген)у [170]. Перехресна

зшивка  $\alpha$ C-доменів під час утворення фібринового згустку сприяє інтегрин-залежній взаємодії клітин та внутрішньоклітинному сигналінгу, результатом чого є посилення адгезії та міграції клітин [171]. У досліджах на культурі мікроваскулярних ендотеліоцитів людини показано, що фібриноген своєю чергою посилює експресію  $\alpha_v\beta_3$ -рецепторів, сприяючи таким чином міграції клітин [172].

На ендотеліальних клітинах існують також рецептори фібрин(оген)у неінтегринової природи. Зокрема, показано зв'язування ICAM-1 з 117–133 амінокислотними залишками  $\gamma$ -ланцюга молекули фібрин(оген)у [173]. Охарактеризовано неінтегриновий рецептор ендотеліальних клітин, який специфічно зв'язується з 15-42 залишками  $\beta$ -ланцюга фібрину [174]. Взаємодія між  $\beta$  15-42 послідовністю фібрин(оген)у та рецептором ендотеліальних клітин – васкулярним ендотеліальним кадгерином – спричинює адгезію, розпластування та проліферацію ендотеліоцитів на фібриновому матриксі, сприяючи таким чином ангиогенезу [175]. Причому показано, що взаємодія димерної послідовності  $(\beta$  15-66)<sub>2</sub> з цим кадгерином є набагато афіннішою [176], що вказує на залучення у взаємодію з васкулярним ендотеліальним кадгерином двох послідовностей сусідніх молекул фібрину.

Окрім RGD-сайтів на молекулі фібрин(оген)у присутні також сайти специфічної взаємодії з тромбоцитами. Зокрема, показано дві високоспецифічні ділянки зв'язування на С-кінці  $\gamma$ -ланцюга молекули фібриногену (AGVD та P3 сайти) з інтегриновими рецепторами тромбоцитів  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_{IIb}\beta_3$  [177]. Зв'язування з  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -рецептором тромбоцитів індукує зміну конформаційної структури молекули фібриногену, що призводить до формування ще одного сайту зв'язування - RIBS-1, складеного з 373–385 амінокислотних залишків  $\gamma$ -ланцюга [178].

На активованих нейтрофілах та моноцитах також експонується високоафінний рецептор до фібрин(оген)у –  $\alpha_M\beta_2$  (Mac-1), який відіграє

важливу роль у забезпеченні розвитку синдрому запалення [179]. Функцією цього рецептору є не стільки адгезія до матриксу, скільки регуляція активності клітини. Зокрема взаємодія Mac-1 з фібрином стимулює міграцію лейкоцитів; фагоцитоз; дегрануляцію; впливає на рівень синтезу цитокінів і хемокінів; модулює активність фактору транскрипції NF-κB тощо [95-97]. Зв'язування Mac-1 рецептору з фібрин(оген)ом проходить за двома сайтами, розташованими на ділянці γ-ланцюга, який входить до складу D-домену молекули – P1 (190-202 амінокислотні залишки) та P2 (377-395 залишки) [180], причому зв'язування з полімерним фібрином відбувається з набагато вищою авідністю, аніж із вільним фібриногеном [181].

Однак роль фібринового матриксу не обмежено лише забезпеченням адгезії та міграції клітин. На кожній молекулі фібрину розташовано специфічні сайти зв'язування фактору росту ендотелію, основного фактору росту фібробластів, фактору росту фібробластів-2, які, будучи експонованими у просторі судини, захоплюють з плазми крові названі фактори росту, сприяючи таким чином різкому збільшенню їхньої локальної концентрації у зоні регенерації [182-184]. Більше того, було показано, що таке захоплення є необхідним для забезпечення ангіогенезу [185]. Фактор росту тромбоцитарного походження (PDGF) та трансформуючий фактор росту-β в комплексі з фібрином та фібронектином забезпечують експресію необхідних рецепторів, міграцію та проліферацію фібробластів у зоні запалення [186, 187].

Таким чином варіабельність структури фібринових згустків передбачено самою структурою молекули фібриногену та характером її взаємодії з фактором XIII та іншими білками плазми крові. Така варіабельність обумовлює можливість тонкої регуляції експонування тих чи тих сайтів адгезії, доступність плазміновому гідролізу та протеолізу іншими ферментами тощо. Саме такими особливостями можна пояснити різні

тривалість життя фібрину та об'єм фібринових депозитів за різних типів запалення.

### **1.3. Механізми гідролізу фібринового згустку за фізіологічних умов**

До фібринолітичної або, як її останнім часом називають, плазміноген/плазмінової системи належать плазміноген, активатори тканинного та урокіназного типу, інгібітори плазміну та активаторів плазміногену, карбоксипептидаза В (ТАФІ). За фізіологічних умов плазміноген перетворюється на активний фермент плазмін двома різними типами активаторів: – тканинним активатором та урокіназою [101], проте у модельних системах з повним вилученням активаторів було показано повільну активацію плазміногену до плазміну [188]. Постульовано, що повільним активатором плазміногену виступає фактор XIIa системи зсідання крові [189]. Деякі автори до активаторів плазміноген/плазмінової системи відносять також і калікреїн, який перетворює одноланцюгову урокіназу на дволанцюгову [190]. Хоча слід зазначити, що роль вищезгаданих факторів зсідання крові та калікреїну у фізіологічному фібринолізі насьогодні вважають несуттєвою [189, 190]. Активність фібринолітичної системи контролювано різними інгібіторами: ПАІ-1 і ПАІ-2 діють на рівні активації, впливаючи на активність тканинного активатора та урокінази;  $\alpha_2$ -антиплазмін регулює активність плазміну; а ТАФІ визначає швидкість фібринолітичного процесу через регуляцію взаємодії плазмін(оген)у з фібрином.

Молекулу плазміногену складено з легкого та важкого ланцюгів, об'єднаних двома дисульфідними містками. В разі розщеплення активаційного зв'язку легкий ланцюг формує SP-домен з активним центром. Важкий ланцюг участі у формуванні активного центру не бере, його роль обмежено формуванням некаталітичних ділянок взаємодії з фібрином, тПА

та  $\alpha_2$ -антиплазміном, винесених на крингли. На К 1-4 молекули плазмін(оген)у розташовано лізин-зв'язуючі ділянки, які здатні специфічно взаємодіяти з лізином, на К 5– ділянку, здатну специфічно взаємодіяти з аргініном. Така будова дає змогу чітко позиціонувати молекулу плазмін(оген)у відносно його субстрату фібрину, специфічного інгібітору  $\alpha_2$ -антиплазміну та активаторів [191].

N-кінцевою амінокислотою нативного проферменту є Glu, а карбоксикінцевою – Asn. За N-кінцевою амінокислотою нативну форму прийнято називати Glu-плазміногеном. В разі присутності незначної плазмінової активності відбувається частковий гідроліз молекул плазміногену з відщепленням N-кінцевого поліпептиду, з утворенням частково деградованої форми проферменту – Lys-плазміногену. Жорстку конформацію Glu-плазміногену забезпечено взаємодією між К 1 і SP-доменом, внаслідок якої практично повністю заблоковано лізин-зв'язувальні ділянки К 1-4. Гідроліз N-кінцевої ділянки молекули плазміногену призводить до втрати здатності К 1 взаємодіяти з SP-доменом і спричинює перехід до Lys-форми, для якої є характерною відкрита конформація з повною доступністю лізин-зв'язувальних ділянок [192].

За активації плазміногену *in vivo* відповідальні два типи активаторів – тканинного та урокіназного типу. Вони є сериновими протеїназами з вузькою специфічністю дії – каталізують гідроліз єдиного пептидного зв'язку Arg<sub>561</sub>-Val<sub>562</sub> в молекулі плазміногену [101]. Функцією тПА є активація плазміногену для здійснення фібринолізу. Відповідно, його здатність до активації тісно пов'язано з наявністю фібрину: на фібриновій матриці тПА активує плазміноген у 1000 разів швидше, ніж у розчині [91]. Натомість урокіназу більшою мірою задіяно до регуляції ремоделювання тканини, тому її активність жодним чином не пов'язано з наявністю чи відсутністю фібрину [191]. Зате багато типів клітин мають специфічні рецептори до урокінази, на яких не лише посилюється її активаторна здатність, а й виявляються

гідролітичні властивості ширшого спектру до багатьох інших білків, до того ж у зв'язаному стані вона є захищеною від дії специфічних інгібіторів [21].

$\alpha_2$ -Антиплазмін – основний фізіологічний інгібітор плазміну з класу серпінів, тобто здатен формувати необоротні комплекси з ферментом-мішенню [193]. Взаємодія з активним центром призводить до розщеплення реакційного пептидного зв'язку інгібітора з утворенням ковалентного зв'язку між серином активного центру ферменту та Арг<sub>376</sub>-Мет<sub>377</sub> амінокислотних залишків реакційного центру інгібітора [191]. Показано ковалентну іммобілізацію інгібітора на  $\alpha$ C-доменах молекули фібрину у процесі полімеризації згустку за участю фактору XIIIa [133]. *In vitro* плазмін здатні інгібувати усі відомі інгібітори серинових протеїназ, проте *in vivo* показано наявність лише двох типів фермент-інгібіторних комплексів: близько 95% плазмінової активності елімінується у вигляді комплексу з  $\alpha_2$ -антиплазміном і 5% – з  $\alpha_2$ -макроглобуліном [194]. Слід зазначити, що  $\alpha_2$ -антиплазмін не здатен інгібувати плазмін, зв'язаний на фібриновому матриці [195], хоча є певні свідчення стосовно можливості  $\alpha_2$ -антиплазміну впливати на формування тріадного комплексу фібрин-плазміноген-тПА [196]. Щодо  $\alpha_2$ -макроглобуліну певних свідчень відносно залежності його інгібіторної активності від наявності чи відсутності фібрину поки немає.

Під час полімеризації на фібрині в області D-доменів експонуються первинні центри зв'язування Глу-плазміногену, комплементарні низькоафінній ділянці К 5. Слід зазначити, що кількість таких сайтів є вкрай обмеженою, що суттєво уповільнює ініціацію фібринолізу. Проте, в разі наявності у зоні фібриноутворення протеолітичної активності або по ініціації гідролізу фібрину, внаслідок розщеплення  $\alpha$ C-доменів в окремих молекулах фібрин-мономеру утворюються нові центри зв'язування плазміногену, комплементарні К 4. Взаємодія з ними призводить до конформаційних змін в молекулі Глу-плазміногену, внаслідок яких деблокується взаємодія ділянок К 1-3 з фібрином, і збільшення кількості сорбованого на фібриновому згустку

проферменту. Тоді ж, на стадії розщеплення  $\alpha$ C-доменів молекул фібрину, збільшується швидкість активації Глу-плазміногену тканинним активатором та гідролізу полімерного фібрину [197].

Хоча стадії ініціації взаємодії плазміногену з фібрином та його активації є основними лімітуючими, регуляція фібринолізу є можливою і на стадії гідролізу полімерного фібрину. В цьому контексті найчастіше згадують ТАФІ, хоча це й не є цілком правомірним. Вузька специфічність карбоксипептидази В лише до С-кінцевих лізинів фібрину звужує її інгібіторну потенцію радше до стадії ініціації, коли наявність експонованих лізинових залишків є критичною для початкової взаємодії молекул плазміногену та фібрину [50, 197]. Надалі взаємодія К 1-3 з фібрином є можливою з усіма лізиновими залишками молекули фібрину, тож наявність чи відсутність С-кінцевих залишків перестає бути критичною [198]. Далеко важливішими для регуляції швидкості гідролізу полімерного фібрину є структура фібринового гелю та наявність включених компонентів. Зокрема, відомо, що згустки, сформовані товстими фібрилами гідролізуються значно швидше, ніж тонкі фібрили прозорих гелів. [199].

З включених компонентів насамперед слід згадати продукти еластолізу молекули плазміногену. У досліджах *in vitro* показано гальмівний вплив кринглових структур на швидкість фібринолізу, хоча внесення мініплазміногену пришвидшувало гідроліз [200]. Подібним до впливу кринглових структур був й ефект ліпопротеїну (а), що є власне логічним з огляду на його структуру, представлену полімеризованими кринглами [201]. Серед інгібіторів гідролізу слід згадати й гістидин-багатий білок, що у системах *in vitro* також призводив до затягування часу фібринолізу [202].

Загалом можна сказати, що регуляція швидкості гідролізу згустку є направленою виключно на гальмування, здебільшого через екранування сайтів зв'язування молекули плазміногену на фібрині структурами, подібними чи тотожними крингловим структурам плазміногену.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

#### 2.1. Методологія дослідження

З'ясування ролі внутрішньосудинних тромбозів як однієї з причин смертності за різних патологій обумовило спалах інтересу до розробки різних видів антитромботичної терапії, отже й до інтенсивного дослідження плазміноген/плазмінової системи зокрема та фібринолітичного процесу в цілому. Насьогодні є достатньо вивченими механізми взаємодії компонентів плазміноген/плазмінової системи між собою та з фібрином. Досить вичерпно з'ясовано механізми активації фібринолізу, гідролізу фібрину та елімінації вільного плазміну з кровоносного русла. Десятиліття кропіткої праці дослідників було увінчано формулюванням теорії активаційного каскаду Глу-плазміногену, згідно якої початкова взаємодія Глу-плазміногену з фібрином можлива лише сайтом зв'язування К 5 [197]. Взаємодія К 5 з фібриновим матриксом спричинює певні конформаційні перебудови у молекулі Глу-плазміногену, які призводять до експонування К 4. Зв'язуючись за двома сайтами, К 4 і К 5, молекула плазміногену переходить на іншу ділянку на молекулі фібрину, внаслідок чого сайт початкової взаємодії вивільнюється для інших молекул плазміногену. Водночас така взаємодія спричинює подальшу конформаційну перебудову, яка завершується експонуванням К1-3 та дає змогу повноцінного зв'язування молекул плазміногену та фібрину з формуванням тріадного активаційного комплексу плазміноген-фібрин-тканинний активатор [215].

Водночас слід зазначити, що дослідження у статичних системах не дали змоги настільки ж ґрунтовно вивчити механізми регуляції активації плазміногену та гідролізу фібрину. До такого висновку спонукає порівняння

результатів гальмування фібринолізу, одержаних *in vitro*, коли час зтягування лізису згустку можна виразити у відсотках, з драматичним зтягуванням, показаним *in vivo*, скажімо, на прикладі людей з множинною мієломою. На цій моделі показано зтягування лізису фібринового згустку з 5 хвилин у нормі до 48 годин у хворих [162]. На прикладі мишей з карциною Льюїс доведено, що подібне драматичне зтягування часу лізису згустку відбувається на тлі різкого зростання у плазмі крові активного тПА, отже, активації плазміноген/плазмінової системи [203]. Оскільки досліди у статичних системах не дали відповіді на ці питання, є зрозумілим великий інтерес, який останнім часом у світі надають створенню динамічних систем дослідження фібринолізу.

Прообразами таких систем можна вважати проточні системи дослідження агрегації тромбоцитів. Протягом останніх 20 років їх було створено чимало, з дослідженням потоку у трубках та ізольованих судинах [204-206]. Проте жодна з таких систем не виявилася придатною для дослідження фібринових депозитів, навіть взаємодії полімерного фібрину з тромбоцитами. Єдине, що вдалося вивчити – це взаємодію тромбоцитів з розчинним фібрином [207]. Сказане можна віднести і до систем дослідження впливу параметрів потоку на фізіологічний статус ендотеліоцитів [208]. Нездоланною проблемою для всіх таких систем стало забезпечення стабільного потоку після відкладення фібрину.

З огляду на сказане є зрозумілим, чому досі динамічні системи дослідження фібринолізу у світі є одиничними. Зокрема, можна згадати динамічну систему, запропоновану Komogowicz і співавторами [99]. Фібриновий згусток формували у шприці довкола голки, вкритої поліетиленом. По досягненні максимальної величини світлорозсіювання голку виймали, а до утвореного каналу з обох боків під'єднували трубки з внутрішнім діаметром, відповідним діаметру каналу. Буферний розчин з компонентами фібринолітичної системи прокачували перистальтичним

насосом крізь утворений канал. Лізис згустку реєстрували за накопиченням продуктів деградації фібрину. Суттєвим недоліком цієї системи є механічне пошкодження згустку після його утворення, що з огляду на модель активаційного каскаду є вкрай неприпустимим, оскільки таким чином виникають додаткові сайти зв'язування плазміногену. Відповідно, таке моделювання не можна вважати цілком фізіологічним. Значно фізіологічнішим є формування каналу під тиском, відповідним систолічному тиску крові [209].

Іншою спробою створення динамічної моделі стало формування згустку з цільної крові у камері, стінки якої було змащено спеціальним клеєм з там, щоб фібрин прилипав до стінок, залишаючи вільною центральну зону. Рідину продавлювали насосом через утворений канал з фіксацією цілісності згустку під мікроскопом [210]. Проте абсолютно нефізіологічні умови формування згустку, скопійовані з умов одержання сироваток крові, певна алогічність в умовах стимулювання фібринолізу, нефізіологічні значення параметрів потоку та недостатньо чіткий спосіб фіксації результатів робить цю модель надто недосконалою для реального дослідження фібринолізу.

Слід зазначити, що використання фіксації рівня світлорозсіювання є адекватним способом оцінювання розміру згустку, проте не дає змоги досліджувати зміни щільності згустку протягом його лізису, розмір фрагментів, які відщеплюються від згустку тощо. Відтак було запропоновано декілька методів способів фіксації параметрів фібринолізу, заснованих на сучасних технологіях, найцікавішими з яких є використання магнітного резонансу [211] та конфокальної мікроскопії [212]. Окремої уваги заслуговують спроби комп'ютерного моделювання процесу гідролізу згустку на підставі уже наявних даних [213].

На таких моделях було вивчено можливість та швидкість утворення каналів у разі тиску рідини на згусток. Було показано, що швидкість протікання рідини є визначальною для транспортування екзогенного тПА до

згустку та утворення у ньому каналів вільного протікання рідини [211]. Цікавою обставиною є з'ясування нерівномірності швидкості, з якою потік крові транспортує розчинені у плазмі білки та суспендовані у ній форменні елементи крові. Принаймні тПА, кон'югований з еритроцитами діставався згустку значно швидше, аніж тПА, розчинений у плазмі [212]. За допомогою фіксації щільності фібринового згустку методом магнітного резонансу було з'ясовано пряму залежність між проникністю згустку для білків плазми крові та наявністю у ньому каналів [211].

Дослідженням гідролізу згустку плазміном, мініплазміном та еластазою в умовах динамічного потоку було виявлено значне затягування часу лізису порівняно зі статичними системами, якщо протеїнази не було інкорпоровано до згустку під час його утворення [99]. Дещо дивною видається порівняно незначна розбіжність швидкості гідролізу згустку плазміном та мініплазміном, тоді як у статичних системах вона різнилась на порядок [214]. Хоча слід зважити, що у цій системі механічне пошкодження згустку утворювало значну кількість додаткових сайтів зв'язування плазміногену, що могло спотворити реальну картину взаємодії плазміну/мініплазміну з фібрином.

Отже, досі не вдалося створити адекватних систем дослідження фібринолізу в умовах динамічного потоку. Без відповіді поки що лишаються питання механізмів гальмування лізису фібрину у зоні запалення та пролонгування часу напівжиття фібринових депозитів. Основним недоліком створених досі динамічних моделей є спроба змодельовати лише той очевидний факт, що у кровоносному руслі до регуляції швидкості фібринолізу залучено такий фізичний чинник, як тиск крові. Проте ігнорування можливої участі у регуляції лізису згустку його структур, включених компонентів, умов транспортування до згустку компонентів плазміноген/плазмінової системи та їхнє вимивання зі згустку разом з продуктами гідролізу робить усі такі системи надто однобічними.

Під час дослідження у динамічній системі необхідно змоделювати основні параметри кровотоку в реальних судинах. Характеристики, яким згідно даним фізіології має бути відповідною така установка, наведено в таблиці 2.1 [216].

Таблиця 2.1

*Фізіологічні параметри системи кровообігу*

Судина	Лінійна швидкість, см/сек	Радіус судини, мм	Товщина стінки, мм	Середній тиск, мм рт. ст.	Опір, %*	Ємність, %*
Аорта	20	13	2	100	3	<1
Артерії	5	2	1	90	19	15
Артеріоли	0,3	0,06	0,03	60	47	3
Капіляри	0,03	0,005	0,001	30	27	7
Венули	3	0,01	0,002	15	4	12
Вени	10	0,5	0,5	10	<1	63

\* - За 100% прийнято сумарні розміри систем

З таблиці видно, що параметрами кровообігу, здатними модулювати фібриноліз, є лінійна швидкість, середній тиск та опір. Оскільки тромбоутворення в аорті та артеріях є крайніми, нефізіологічними випадками, основні вимоги до установки слід сформулювати в рамках параметрів артеріол, капілярів, венул і вен. Відповідно основними вимогами до установки є можливість варіювати швидкість потоку від 0,3 до 100 мм/сек, забезпечувати перепад тиску від 10 до 60 мм рт. ст. (1,3-6 кПа) з опором від 0 до 50%. Крім того, для характеристики динамічного потоку дуже важливими є такі величини, як *shear rate* та *shear stress* [217]. *Shear rate* українською мовою можна перекласти як "швидкість деформації зсуву", ця фізична

величина описує залежність тиску рідини на перешкоду від лінійної швидкості та радіусу протоки. Її розраховують за формулою (2.1):

$$\gamma = \frac{4Q}{\pi R^3}, \quad (2.1)$$

де  $Q$  – лінійна швидкість,  $R$  – радіус судини.

*Shear stress* своєю чергою можна перекласти як «напруга зсуву». Ця фізична величина описує силу, з якою тисне рідина у будь-якій точці потоку. Її обчислюють за формулою (2.2):

$$\tau = \mu\gamma, \quad (2.2)$$

де  $\mu$  – в'язкість розчину,  $\gamma$  – швидкість деформації зсуву.

За фізіологічних умов у судинах величина швидкості деформації зсуву коливається від  $50 \text{ c}^{-1}$  для дрібних судин до  $500 \text{ c}^{-1}$  – для великих [218, 219]. Фізіологічний рівень величини напруги зсуву становить близько 0,3 Па для дрібних та великих судин [220, 221].

Методологією нашої роботи стало створення динамічної системи, здатної моделювати фізіологічні умови фібринолізу; порівняння даних, одержаних та такій системі з даними, одержаними у статичних системах, з тим, щоб сформулювати алгоритм перенесення результатів статичних систем на ситуацію *in vivo*, та з'ясування механізмів гальмування гідролізу фібрину.

## 2.2. Матеріали та реагенти

У роботі було використано:

1. натуральну сировину: пасту фракції донорської крові II+III за Коном, пасту фракції донорської крові III за Коном, плазму крові людини (Київський міський центр крові, Україна), соняшникову олію неосвітлену (Україна);
2. комерційні білки: еластазу,  $\alpha$ -казеїн, трипсин, гепарин (Sigma-Aldrich, США), контрикал (AWD, Німеччина), стрептокіназу (Kabikinase, Pharmacia, Швеція), тканинний активатор плазміногену (Genentech, США), желатин (Хімлаборреактив, Україна), маркери для електрофорезу: LMW-kit з молекулярними масами 94 кДа (фосфорилаза В), 67 кДа (альбумін), 43 кДа (овальбумін), 30 кДа (ангідраза), 20,1 кДа (соєвий інгібітор трипсину), 14,4 кДа (лактальбумін) (Amersham Bioscience, США); та PageRuler – набір рекомбінантних прокаріотичних білків з молекулярними масами 170 кДа, 130 кДа, 100 кДа, 72 кДа, 55 кДа, 40 кДа, 35 кДа, 25 кДа, 15 кДа та 10 кДа (Fermentas, США).
3. реагенти:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NaOH}$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{NaN}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , натрію какодилат, натрію ацетат, цитрат натрію,  $\text{BaSO}_4$ ,  $\text{HCl}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ , сечовина, L-лізин, гліцин,  $\xi$ -амінокапронову кислоту, льодяну оцтову кислоту, трихлороцтову кислоту, фосфорновольфрамову кислоту, ПЕГ 6000 (поліетиленгліколь з молекулярною масою 5-7 Да), ацетон, гексан, бензол, хлороформ, ізопропіловий спирт, етиловий спирт, метиловий спирт, бромфеноловий синій, амідочорний, глутаровий альдегід, (Хімлаборреактив, Україна);  $\text{OsO}_4$ , уранілацетат, трис (2-аміно-2-(гідроксиметил)-1,3-пропандіол), Кумасі,  $\beta$ -меркаптоетанол, ЕДТА (етилендіамінтетраоцтову кислоту), стандарти метилових ефірів гідроксикислот, p-NPGV (п-нітрофенілгуанідинбензоат), БАПНА (N-

- бензоїл-DL-аргінін-р-нітроанілін), OV-1 (Sigma-Aldrich, США); ДС-натрію, ТЕМЕД (тетраметилетилендіамін), акриламід, метилен-біс-акриламід, амонію персульфат, тритон X-100 (Amersham Biosciences, США); епоксидну смолу: EPON 812 (Serva, Німеччина) – EPON Märter DDSA (Fluka, Швейцарія) – ARALDITE CY 212 (AGAR, Англія) – DMP-30 (AGAR, Англія); вуглець, цитрат свинцю (AGAR, Англія);
4. матеріали: предметні сітки (AGAR, Англія); формварову плівку (Sigma-Aldrich, США);
  5. сорбенти: Chromosorb W/HP (Sigma-Aldrich, США), гепарин-сефарозу, лізин-сефарозу, Zn-сефарозу, DEAE-сефарозу, Sephadex G-25, Sephadex G-75, Superdex G-75, Superdex G-200 (Amersham Biosciences, США); гіпс, силікагель КСК-2 (Хімекспо, Росія).

Усі реагенти мали кваліфікацію чистоти не нижчу за «хч».

## **2.3. Методи дослідження**

### **2.3.1. Одержання білкових препаратів**

#### **2.3.1.1. Очищення плазміногену [222]**

Протягом останнього часу методика одержання плазміногену з плазми крові на лізин-сефарозі з використанням високої афінності лізин-зв'язувальних ділянок кринглових структур до лізину є класичною [222]. У нашому випадку довелося доповнити її розробкою умов екстракції плазміногену з пасти фракції донорської крові II+III за Коном і приведення

екстракту до кондицій придатних для хроматографування, перше ніж переходити до етапу афінної хроматографії.

Плазміноген одержували з пасти фракції донорської крові II+III за Коном афінною хроматографією на лізин-сефарозі. 50 г пасти екстрагували протягом 1 години у 20 мМ натрій-фосфатному буфері, рН 7.4, з вмістом 0.15М NaCl у співвідношенні 1:10. Суміш центрифугували за 7.5 тис. об/хв протягом 1 години на центрифuzі Jouan CR-412 (Франція). Супернатант фільтрували через фільтрувальний папір і наносили на колонку з лізин-сефарозою.

Попередньо колонку почергово промивали дистильованою водою; 1М NaCl у 20 мМ натрій-фосфатному буфері, рН 7.4; 20 мМ  $\xi$ -амінокапроною кислотою в цьому ж буфері; знову водою (все по 2 об'єми); та 5 об'ємами 20 мМ натрій-фосфатному буфері, рН 7.4, з вмістом 0.15М NaCl.

По нанесенні препарату колонку відмивали від неспецифічно сорбованого білка врівноважуючим буфером. Елюцію проводили 20 мМ  $\xi$ -амінокапроною кислотою в 20 мМ натрій-фосфатному буфері, рН 7.4;. Одержаний плазміноген висолювали  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  з кінцевим насиченням розчину до 41%, осад зберігали при температурі 4°C. Всі етапи очистки проводили при температурі 4°C.

Висолені фракції плазміногену суспендували, зливали в одну сумарну фракцію та добре перемішували. Розчин центрифугували за 10 тис. об/хв протягом 40 хв при температурі 4°C на центрифuzі Jouan CR-412 (Франція). Осад розчиняли у 50мМ трис-лізиновому буфері, рН 9.0, з вмістом 1мМ ЕДТА, 100мМ NaCl до повної прозорості розчину. Надалі його центрифугували за 8 тис. об/хв протягом 20 хв. при температурі 4°C на центрифuzі Jouan CR-412 (Франція).

Знесолення супернатанту проводили методом гель-фільтрації на колонці 16/15, запакованої сорбентом Sephadex G-25 (Pharmacia, Швеція).

Колонку попередньо врівноважували 20 мМ трис-НСІ буфером, рН 7.4, з вмістом 0.15М NaCl.

Питома казеїнолітична активність одержаного препарату плазміногену становила 21-25 к.о./мг. Методом електрофорезу за Лемлі суттєвих домішок у препараті не виявлено (рис. 2.1, А); методом ензим-форезу виявлено дві гідролітично активні фракції, відповідні за молекулярною масою Глу- та Ліз-формам плазміногену (рис. 2.1, Б).

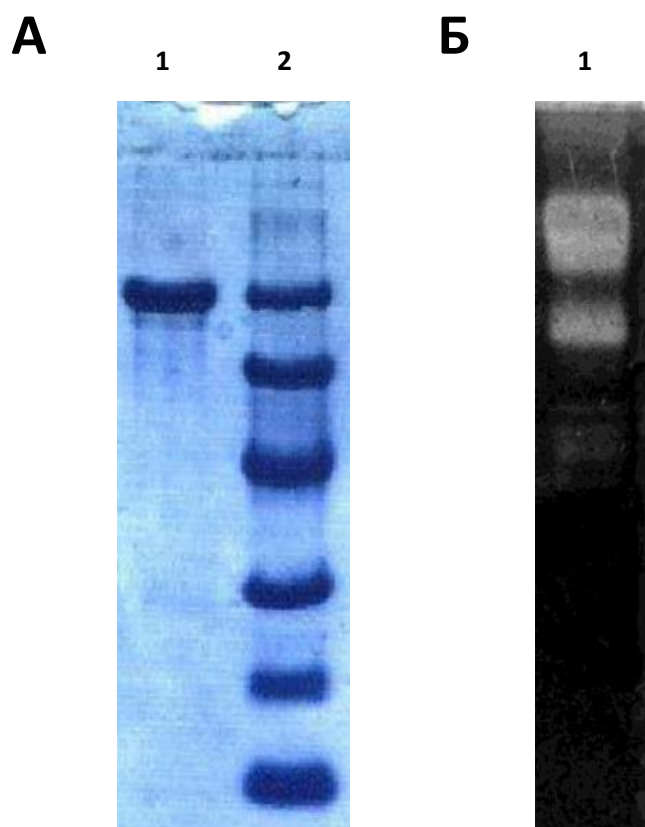


Рис. 2.1. Електрофореграма препарату плазміногену: А –методом електрофорезу в ПААГ з ДС-Na, Б – методом ензим-форезу. 1 – нативний плазміноген; 2 – маркери LMW-kit.

### 2.3.1.2. Активація плазміногену [223]

Для одержання препаратів чистого плазміну найефективнішим є використання як активатора стрептокінази – екзогенного специфічного активатору плазміногену, синтезованого стрептококами. Перевагою стрептокінази є відсутність потреби для активації наявності фібрину, що дає змоги уникнути контамінації препарату фібрином і продуктами його деградації.

Для характеристики активності препарату стрептокінази використовували міжнародні одиниці, де 1 одиниця дорівнює активності 0.002700 мг стандартної стрептокінази [224], хоча фірма Sigma-Aldrich, США дає власне розшифрування фізичного змісту стрептокіназної одиниці – це така кількість стрептокінази, яка за еталонних концентрацій фібриногену, тромбіну та плазміногену за рН 7.5 при 37<sup>0</sup> С призводить до лізису згустку протягом 10 хв. Для характеристики активності препарату плазміну використовували казеїнолітичні одиниці (к.о.), де 1 к.о. - така кількість ферменту, яка вивільнює 450 мкг розчинного в 10% розчині трихлороцтової кислоти тирозину за 1 год. в умовах експерименту.

Препарат плазміногену переводили у трис-лізиновий буфер (50 мМ трис-НСІ, 20мМ L-лізин, 1 мМ ЕДТА, 100 мМ NaCl), рН 9,0 з 25% вмістом гліцерину. Активацію проводили розчином стрептокінази, з розрахунку 25 од. на 1 к.о. плазміну, при температурі 25<sup>0</sup> С протягом 2 годин. Реакцію зупиняли додаванням гліцерину до кінцевої концентрації 50% та охолодженням до температури -20<sup>0</sup>С. Одержані препарати зберігали в тому ж буфері з вмістом 50% гліцерину при температурі -20<sup>0</sup>С.

Активність плазміну контролювали електрофоретично, методом ензим-електрофорезу та вимірюючи казеїнолітичну активність.

### 2.3.1.3. Фрагментація молекули плазміногену панкреатичною еластазою та очищення одержаних фрагментів [225]

Еластазний гідроліз молекули плазміногену може проходити двома шляхами: першочергове відщеплення К 1-3 та Val<sub>355</sub>-плазміногену з подальшим відщепленням від останнього четвертого кринглу й перетворенням його на мініплазміноген; першочергове відщеплення К 1-4 й мініплазміногену з подальшим розщепленням К 1-4 на К 1-3 та К 4. Відповідно, варіюючи умови гідролізу, можна одержати суміші кринглів К 1-4, К 1-3 та К 4. Оскільки для нас було важливим одержати чистий мініплазміноген, ми зупинилися на умовах гідролізу, підібраних таким чином, щоб по завершенні реакції суміш не містила проміжних продуктів.

Водночас під час проведення гідролізу еластазою молекули плазміногену слід вживати максимальних запобіжних заходів аби не допустити активації плазміногену до плазміну. Зазвичай цього досягають насиченням реакційної суміші апротиніном – інгібітором трипсиноподібних ферментів, який ефективно інгібує плазмін, але не еластазу. Нами було використано апротинін-вмісний фармацевтичний препарат контрикал, згідно методики [225].

Поділ продуктів еластазі достатньо ефективно можна провести послідовним поєднанням афінної хроматографії на лізин-сефарозі з гель-фільтрацією. Це дає змогу також очистити продукти реакції від еластази та контрикалу.

До розчину плазміногену, концентрацією 3.0 мг/мл, у 50мМ трис-НСІ буфері з вмістом 100мМ NaCl, рН 8.0, додавали інгібітор плазміну – контрикал (5 тис. од/мл) та панкреатичну еластазу у співвідношенні до плазміногену 1:50. Інкубували протягом 6 годин при температурі 25°C, реакцію гідролізу зупиняли додаванням 10мМ розчину p-NPGB (п-

нітрофенілгуанідинбензоату) у співвідношенні 10:1 відносно концентрації плазміногену.

Гідролізат знесолювали гель-фільтрацією на колонці 16/15, запакованої сорбентом Sephadex G-25 (Pharmacia, Швеція). Попередньо колонку промивали трьома об'ємами води та врівноважували трьома об'ємами 50мМ трис-НСІ буферу з вмістом 100мМ NaCl, рН 8.0. Елюцію проводили тим же буфером.

Елюат наносили на колонку з лізин-сефарозою, попередньо врівноважену 50мМ трис-НСІ буфером з вмістом 100мМ NaCl, рН 8.0. Колонку промивали тим же буфером та збирали фракцію мініплазміногену. Фракцію кринглів елюювали з колонки розчином 0.2М  $\xi$ -амінокапронової кислоти у 50 мМ натрій-фосфатному буфері, рН 7.5.

Фракцію мініплазміногену (38 кДа) очищали від еластази (25 кДа), контрикалу (12 кДа) і р-NPGB методом гель-фільтрації на колонці 16/15, запакованої сорбентом Sephadex G-25 (Pharmacia, Швеція). Попередньо колонку промивали трьома об'ємами води та врівноважували 50 мМ трис-НСІ буфером з вмістом 100 мМ NaCl, рН 7.4.

Чисті препарати кринглів 1-3 та кринглу 4 отримували за тих самих умов методом гель-фільтрації на колонці 26/70, запакованої сорбентом Superdex G-75 (Pharmacia, Швеція).

Одержані препарати кринглів 1-3, кринглу 4 (рис. 2.2, А) та мініплазміногену (рис. 2.2, Б) були електрофоретично чистими; питома казеїнолітична активність мініплазміногену становила 30-35 к.о./мг. Протеїнолітичну гомогенність мініплазміну контролювали методом ензим-форезу (рис. 2.3).

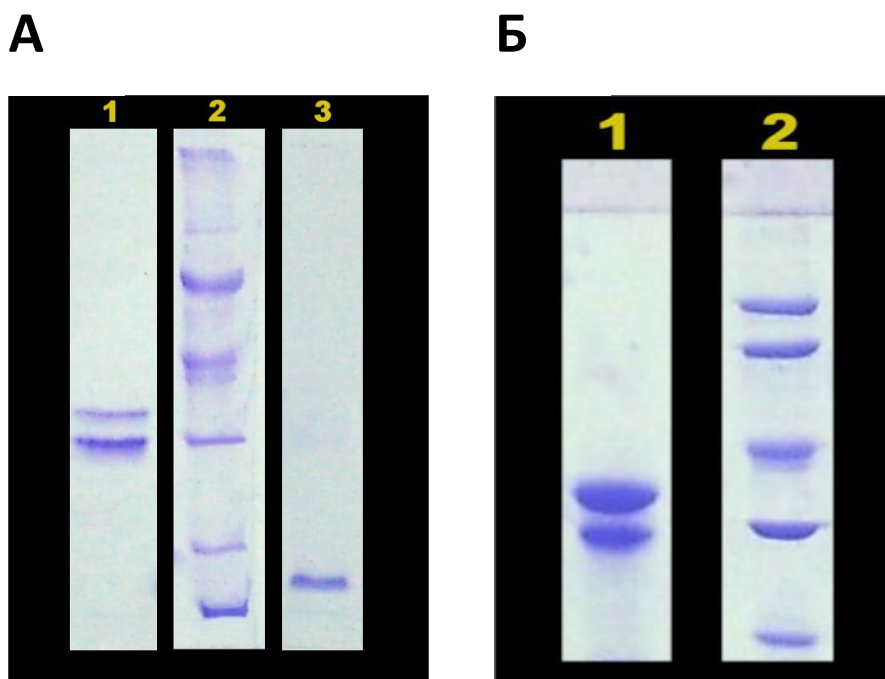


Рис. 2.2. Електрофореграма розділених продуктів еластолізу. А: 1-крингли 1-3; 2-маркерні білки; 3-крингл 4. Б: 1-міні-плазміноген; 2-маркерні білки LMW-kit.

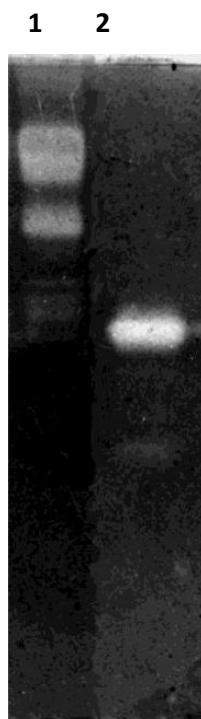


Рис. 2.3. Ензим-електрофореграма активних ферментів: 1-плазмін; 2-міні-плазмін.

#### 2.3.1.4. Інгібування активного центру мініплазміногену [226]

Для інгібування мініплазміну з різних варіантів було обрано p-NPGB (п-нітрофенілгуанідинбензоат) з двох причин. Насамперед p-NPGB ацилює серин активного центру, внаслідок чого інгібування є необоротним. Водночас завдяки низькій молекулярній масі інгібітор не створює стеричних перешкод для взаємодії молекули ферменту з різними білками, не лише для лізин-, аргінін-зв'язувальних ділянок кринглів, а й для допоміжних сайтів SP-домену.

До розчину мініплазміногену, концентрацією 1,2 мг/мл та питомою казеїнолітичною активністю 30 к.о./мг у 20мМ трис-НСІ буфері, рН 7.4, з вмістом 150мМ NaCl та 1.5 мМ CaCl<sub>2</sub>, додавали стрептокіназу у співвідношенні 1 к.о. ферменту/25 од. Розчин інкубували протягом 1 години при кімнатній температурі. Реакцію гідролізу зупиняли додаванням 10мМ розчину p-NPGB у співвідношенні 10:1 відносно концентрації мініплазміногену.

Звільнення від надлишку інгібітору проводили методом гель-фільтрації на колонці 16/15, запакованої сорбентом Sephadex G-25 (Pharmacia, Швеція). Колонку попередньо промивали трьома об'ємами дистильованої води та врівноважували 20 мМ трис-НСІ буфером, рН 7.4 з вмістом 0.15 М NaCl та 1.5 мМ CaCl<sub>2</sub>. Елюцію проводили тим же буфером.

#### 2.3.1.5. Одержання фібриногену [227]

В разі одержання плазміногену з плазми крові важливим є насамперед звільнитися від протромбінового комплексу. Класичним способом такого звільнення є використання бетч-хроматографії, заснованої на спорідненості барію до кальцій-зв'язувальних ділянок Гла-доменів вітамін К залежних білків, зокрема протромбіну, факторів VII, IX, X системи зсідання крові. Це

дає змогу запобігти перетворенню фібриногену на фібрин під час подальшого висолювання. Молекули фібриногену достатньо добре переносять як висолювання так і подальше розчинення, єдиною проблемою під час проведення робіт є їхня висока здатність до агрегації. Аби запобігти цьому усі роботи проводилися акуратно, з тим, щоб не допустити різкого струшування розчину.

До охолодженої плазми додавали суспензію  $\text{BaSO}_4$  у воді (сухий  $\text{BaSO}_4$  насипали у воду, залишали на 20-30 хв для гідратації, зливали надлишкову воду) з розрахунку 90 г  $\text{BaSO}_4$  на 1 л плазми. Перемішували на льодовій бані при  $4^\circ\text{C}$  протягом 20-30 хв. Сіль барію видаляли центрифугуванням протягом 10 хв на центрифугі Jouan CR-412 (Франція) за 25 тис. об/хв при температурі  $4^\circ\text{C}$ .

До безтромбінової плазми додавали 1/10 об'єму 1 М гліцинового буферу, рН 9.0 (9.0-9.3), ретельно перемішували та вносили краплями за постійного перемішування 16% розчин  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  до його кінцевої концентрації 5-6% (до появи у розчині осаду – так званої “0” фракції). “0” фракцію видаляли центригуванням протягом 1 години за 2.5 тис. об/хв при температурі  $4^\circ\text{C}$  на центрифугі Jouan CR-412 (Франція).

До супернатанту вносили краплями за постійного перемішування 16% розчин  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  до його кінцевої концентрації 8.5%. Розчин центрифугували протягом 30 хв за 2.5 тис. об/хв при температурі  $4^\circ\text{C}$  на центрифугі Jouan CR-412 (Франція). Осад фібриногену розчиняли в 0,2 М  $\text{NaCl}$ .

Електрофоретично в 7,5 % ПААГ з DS-Na фібриноген був гомогенним (рис. 2.4). Вміст фібриногену, здатного до зсідання під дією тромбіну, становив 95-98 %.

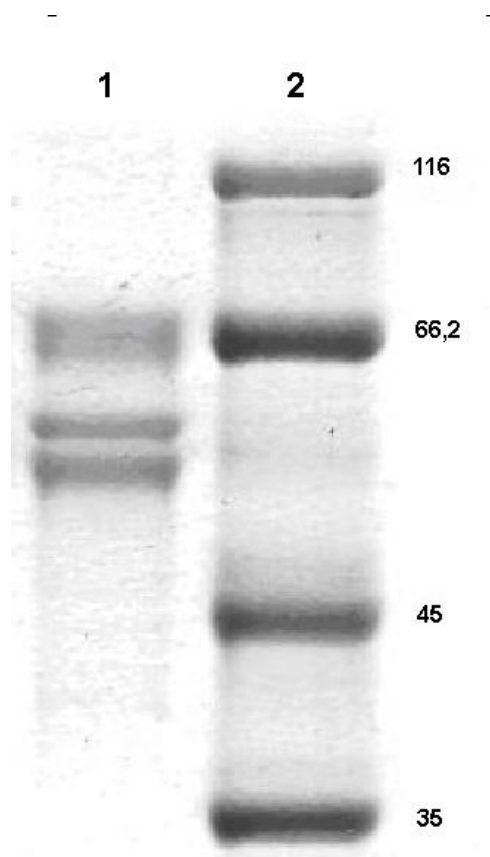


Рис. 2.4. Електрофореграма препарату фібриногену за присутності 2%  $\beta$ -меркаптоетанолу. 1 – фібриноген; 2 – маркери.

#### 2.3.1.6. Одержання продуктів деградації фібрину (ПДФ)

Загально прийняті методики одержання продуктів деградації фібрину у нашому випадку були не досить добрими, оскільки не давали змоги адекватно змодельювати суміш ПДФ безпосередньо на виході з фібринового згустку. Нами було застосовано спосіб накопичення ПДФ в обмеженому об'ємі проточного буферу динамічної системи протягом лізису різної кількості згустків.

Одержана таким способом суміш, окрім ПДФ, містила також певну кількість вільного плазміну, вимитого зі згустку протягом гідролізу. Проте, згідно одержаних нами даних, зі співвідношення часу напівлізису згустку

інкорпорованим та вільним плазміном ця активність не впливала на кінцеві результати експерименту.

ПДФ одержували гідролізом полімерного фібрину у 20 мМ трис-НСІ буфері, рН 7.4, з вмістом 150 мМ NaCl і 1.5 мМ CaCl<sub>2</sub>. Концентрація фібриногену, включеного до згустку становила 1.5 мг/мл або 4.4 мкМ, плазміногену - 9 мкг/мл або 0.1 мкМ, тромбіну – 30 НІН і тканинного активатору плазміногену – 385 ІУ. Збільшення концентрації ПДФ досягали повторним гідролізом згустків з використанням як проточного буферу розчину ПДФ, зібраних раніше.

Накопичення ПДФ детектували спектрофотометрично, вимірюючи оптичну густину розчину за довжини хвилі 280 нм та контролювали електрофоретично (рис. 2.5).

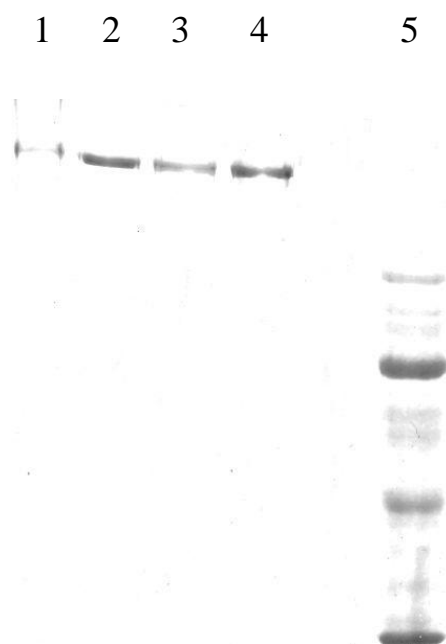


Рис. 2.5. Електрофореграма ПДФ. 1-4 –серії ПДФ, нумерація за зростанням концентрації; 5 – маркерні білки LMW-kit.

### 2.3.1.7. Одержання дезААВВ-фібрин-мономеру (розчинного фібрину) [228]

В основу одержання фібрин-мономеру покладено здатність полімерного фібрину дисоціювати в оцтовій кислоті та переходити до розчинного мономерного стану. Оскільки єдиною завадою такої дисоціації може бути лише ковалентне прошивання протофібрил трансглутаміназою – фактором XIII, – згустки полімерного фібрину формували з попереднім інгібуванням трансглутаміназної активності. Враховуючи високу здатність мономерного фібрину до асоціації з формуванням протофібрил усі роботи з ним проводили на льодовій бані, максимально акуратно, запобігаючи струшуванню розчину.

У пробірки наливали по 10 мл 1% розчину фібриногену та додавали 30 мл 0.15 М NaCl. Для інгібування фактору XIII системи зсідання крові додавали інгібітор трансглутаміназ – параклормеркурійбензоат до кінцевої концентрації 35 мкг/мл. Суміш інкубували на водяній бані протягом 10-15 хвилин при 37<sup>0</sup> С. По інкубації до неї додавали розчин тромбіну з розрахунку 1 NIH/1 мг фібриногену та інкубували у термостаті протягом 4 годин при 37<sup>0</sup> С. Надалі суміш охолоджували до кімнатної температури. Сформовані згустки накручували на скляні палички та переносили у пробірки з 50 мл 0.15 М NaCl. Згустки тричі промивали протягом 10-15 хвилин щоразу у фізіологічному розчині, змінюючи його.

Після промивання згустки переносили до попередньо охолоджених на льоду центрифужних пробірок з вмістом 5 мл 0.125% розчину оцтової кислоти в кожній. Під час розчинення згустку до пробірки через певні проміжки часу доливали розчин оцтової кислоти до утворення 2% розчину фібрину. Потому розчин центрифугували протягом 30 хвилин за 4 тис. об/хв при температурі 0<sup>0</sup> С на центрифусі Jouan CR-412 (Франція).

Задля досягнення високого ступеня чистоти проводили переосадження одержаного фібрин-мономеру. Для цього осад відкидали, а супернатант розливали по 3 мл у пробірки. До розчину фібрин-мономеру додавали по 42 мл 60 мМ натрій-фосфатного буферу, рН 6.0-6.1. Враховуючи високу лабільність молекули фібрин-мономеру, аби запобігти її денатурації йонну силу буферу попередньо доводили до 3,5 мС/см додаванням NaCl. Суміш інкубували протягом 2 годин при кімнатній температурі. Сформовані згустки накручували на скляні палички та повторювали всі етапи, описані вище.

Після проведення трьох переосаджень одержували очищений препарат фібрин-мономеру. Його зберігали при 4<sup>0</sup> С протягом 3-4 тижнів. Для роботи фібрин-мономер розчиняли у 20 мМ трис-HCl буфері, рН 7.4, з вмістом 150 мМ NaCl і 1.5 мМ CaCl<sub>2</sub>, з обов'язковим додаванням до нього ПДФ і фібриногену для формування фізіологічних стабільних асоціатів фібриноген/олігомери фібрину/ПДФ, які, власне, й мають назву розчинного фібрину.

#### 2.3.1.8. Одержання тромбіну [229]

В основу хроматографічного методу одержання тромбіну покладено його здатність з високою афінністю зв'язуватися з гепарином. Перше, ніж наносити екстракт на афінну колонку його збагачували за допомогою методу іоно-обмінної хроматографії на DEAE-сефарозі. Надалі проводили хроматографію на гепарин-сефарозі. Звільнення від антитромбіну III відбувалося завдяки різній спорідненості протромбіну та антитромбіну до гепарину. Використання хроматографічного методу замість традиційного методу бетч-хроматографії з сульфатом барію дає змогу домогтися вищого рівня виходу білка з більшим ступенем чистоти.

Тромбін одержували з пасти фракції донорської крові III за Коном. 50 г пасти екстрагували протягом 1 години у 30 мМ трис-HCl буфері, рН 7.8, з

вмістом 150 мМ NaCl та 4% ПЕГ 6000 у співвідношенні 1:10 при кімнатній температурі. Екстракт центрифугували протягом 30 хвилин за 4 тис. об/хв при температурі 4<sup>0</sup> С на центрифугі Jouan CR-412 (Франція). Супернатант фільтрували через фільтрувальний папір і наносили на колонку з DEAE-сефарозою.

Попередньо колонку врівноважували 150 мМ NaCl, рН 7.0, при температурі 4<sup>0</sup> С. Від неспецифічно сорбованого білка колонку відмивали тим же розчином. Елюцію проводили 500 мМ NaCl, рН 7.0. Для досягнення фізіологічних значень іонної сили елюат розводили втричі. Активацію протромбіну до тромбіну проводили 25% цитратом натрію протягом 2 годин при температурі 4<sup>0</sup> С. По активації проводили зміну буферу методом гель-фільтрації на колонці 16/15, запакованої сорбентом Sephadex G-25 (Pharmacia, Швеція). Колонку попередньо промивали трьома об'ємами дистильованої води та врівноважували 150 мМ NaCl, рН 7.0. Елюцію проводили тим же розчином.

Подальше очищення препарату тромбіну проводили афінною хроматографією на гепарин-сефарозі. Колонку врівноважували 150 мМ NaCl, рН 7.0. По нанесенні препарату колонку відмивали від неспецифічно сорбованого білка тим же розчином. Елюцію проводили 500 мМ NaCl, рН 7.0.

З метою зміни буферу використовували метод гель-фільтрації на колонці 16/15, запакованої сорбентом Sephadex G-25 (Pharmacia, Швеція). Колонку попередньо промивали трьома об'ємами дистильованої води та врівноважували 20 мМ трис-НСl буфером, рН 7.4, з вмістом 0.15 М NaCl. Елюцію проводили тим же буфером.

Активність одержаного препарату тромбіну становила 1400 NIH/мл.

### 2.3.1.9. Одержання антитромбіну III [230]

Для одержання антитромбіну III було використано його високу спорідненість до гепарину. На відміну від протромбіну, стабільність антитромбіну III є далеко нижчою, внаслідок чого одержати активний препарат з пасти фракцій донорської крові за Коном не є можливим. Відтак за натуральну сировину було використано донорську плазму крові.

Завдяки далеко вищій, аніж у протромбіну, спорідненості до гепарину антитромбін III зазвичай одержують одностадійно, без використання іонообмінної хроматографії [230]. Традиційну хроматографічну методику одержання антитромбіну III було модифіковано нами, що дало змогу домогтися вищого ступеня чистоти препарату.

До 250 мл донорської плазми додавали 125 мл 50 мМ трис-НСІ буферу, рН 7.4, з вмістом 10 мМ цитрату натрію та 0.2 М NaCl. Очищення препарату антитромбіну III проводили афінною хроматографією на гепарин-сефарозі. Колонку врівноважували 50 мМ трис-НСІ буфером, рН 7.4, з вмістом 10 мМ цитрату натрію та 0.2 М NaCl. По нанесенні препарату колонку відмивали від неспецифічно сорбованого білка 50 мМ трис-НСІ буфером, рН 7.4, з вмістом 10 мМ цитрату натрію та 0.3 М NaCl. За такої концентрації NaCl з гепарину елюються в тому числі білки нижчої, аніж у антитромбіну, спорідненості до гепарину – протромбін і фактор X системи зсідання крові. Елюцію проводили 50 мМ трис-НСІ буфером, рН 7.4, з вмістом 10 мМ цитрату натрію та 2 М NaCl.

З метою зміни буферу використовували метод гель-фільтрації на колонці 16/15, запакованої сорбентом Sephadex G-25 (Pharmacia, Швеція). Колонку попередньо промивали трьома об'ємами дистильованої води та врівноважували 20 мМ трис-НСІ буфером, рН 7.4, з вмістом 0.15 М NaCl. Елюцію проводили тим же буфером.

Активність препарату антитромбіну III контролювали згідно 2.3.3.6. Чистоту одержаного препарату контролювали електрофоретично (рис. 2.6).



Рис. 2.6. Електрофореграма препарату антитромбіну III. 1. – антитромбін III, 2 – маркери PageRuler (Fermentas, США)..

#### 2.3.1.10. Одержання $\alpha_2$ -макроглобуліну [231]

Очищення  $\alpha_2$ -макроглобуліну з пасти фракції донорської крові II+III за Коном проводили у три стадії. Оскільки  $\alpha_2$ -макроглобулін належить до групи білків плазми крові з надвисокою молекулярною масою (720 кДа) це дало змогу досить легко відокремити його від більшості білків екстракту методом гель-фільтрації. Подальше збагачення фракції було проведено методом іонообмінної хроматографії. В основу остаточного очищення  $\alpha_2$ -макроглобуліну покладено наявність у його структурі сайтів зв'язування металів. Зокрема, серед високомолекулярних білків плазми крові лише він здатен зв'язуватися з цинком.

Пасту фракції донорської крові II+III за Коном екстрагували у 25 мМ трис-НСІ буфері, рН 7.4, з вмістом 150мМ NaCl протягом 30 хв. при температурі 4<sup>0</sup>С. Отриману суміш центрифугували протягом 45 хвилин за 7,5 тис. об/хв при температурі 4<sup>0</sup> С на центрифусі Jouan CR-412 (Франція).

Відокремлення високомолекулярної фракції проводили методом гель-фільтрації одержаного супернатанту на колонці колонці 26/75, запакованої сорбентом Superdex G-200 (Pharmacia, Швеція). Колонку врівноважували 25 мМ трис-НСІ буфером, рН 7.4, з вмістом 150мМ NaCl. Елюцію проводили тим же буфером.

Вилучення  $\alpha_2$ -макроглобуліну з високомолекулярної фракції проводили методом іонообмінної хроматографії. Іонну силу елюату після гель-фільтрації доводили до 4-4.5 мС/см і наносили на колонку з DEAE-сефарозою, врівноважену 25 мМ трис-НСІ буфером, рН 8.1, з аналогічним показником іонної сили. Від неспецифічно сорбованого білка колонку відмивали тим же буфером. Елюцію проводили лінійним градієнтом від 0 до 300 мМ NaCl у 25 мМ трис-НСІ буфері, рН 8.1.

Остаточне очищення препарату проводили методом катіон-хелатної хроматографії. Колонку з Zn-сефарозою попередньо промивали трьома об'ємами дистильованої води та врівноважували 25 мМ трис-НСІ буфером, рН 7.4, з вмістом 0.15 М NaCl. Елюат після іонної хроматографії доводили до рН 7.4 та наносили на колонку, від неспецифічно сорбованого білка відмивали врівноважуючим буфером. Елюцію проводили ступінчатим градієнтом 25 мМ трис-НСІ буфера, рН 7.4, з вмістом 50 мМ ЕДТА.

Зміну буферу з одночасним звільненням від деградованих форм інгібітора проводили методом гель-фільтрації на колонці 16/15, запакованої сорбентом Sephadex G-75 (Pharmacia, Швеція). Колонку попередньо промивали трьома об'ємами дистильованої води та врівноважували 25 мМ

трис-НСІ буфером, рН 7.4, з вмістом 0.15 М NaCl. Елюцію проводили тим же буфером.

Чистоту одержаного препарату контролювали електрофоретично (рис. 2.6). Препарат мав чистоту не менше 96%, згідно обрахунку за допомогою програмного пакету TOTAL LAB (Amersham-Pharmacia, США).

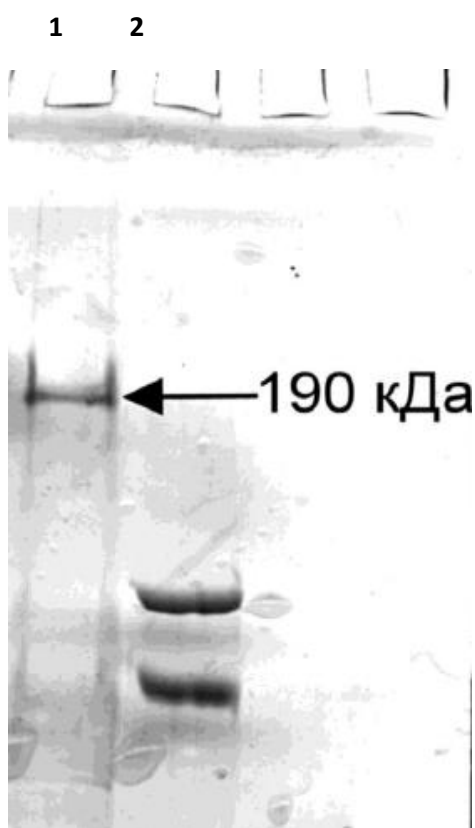


Рис. 2.7. Електрофореграма препарату макроглобуліну за присутності 2%  $\beta$ -меркаптоетанолу. 1 – макроглобулін, 2 – маркери (94 кДа та 67 кДа).

### 2.3.2. Одержання гідроксикислот

Неферментативне одержання *in vitro* гідроксикислот фосфоліпідів тварин є досить проблематичним, оскільки у них переважають насичені жирні кислоти. Відтак нами було використано для окиснення соняшникову олію з її високим вмістом ненасичених жирних кислот. Деяка розбіжність за кількістю вуглецевих атомів не була визначальною у рамках нашого експерименту. Очищення гідроксикислот проводили з використанням

тривіальних методів. Характеризували їх за модифікованим протоколом для жирних кислот через брак методів визначення гідроксикислот.

#### 2.3.2.1. Окиснення ліпідів

Гідроксикислоти одержували аерацією нерафінованої соняшникової олії. До водного розчину їх переводили ультразвуковим озвучуванням з подальшим розділенням водного розчину та нерозчинних фракцій центрифугуванням за 4 тис. об/хв при кімнатній температурі на центрифугу Joan CR-412 (Франція). Водний розчин відбирали та використовували в експерименті.

#### 2.3.2.2. Відокремлення фракції гідроксикислот.

Фракцію гідроксикислот відокремлювали від жирних кислот поділом їхніх метилових ефірів методом мікротонкошарової хроматографії (МТШХ) на силікагелі КСК-2 (Хімекспо, Росія) [232]. Метиліві ефіри гідроксикислот отримували, відбираючи в ампулу по 0.5 мл водного розчину аерованої олії. Потому до нього додавали 1.5 мл 3 М HCl у метанолі, виходячи зі співвідношення, що на 20 мкг ліпідів необхідно додати 0.2 мл 3М HCl у метанолі. Ампулу запаювали на відкритому вогні газового пальника та прогрівали на киплячій водяній бані протягом 1 години. Після цього ампули зберігали при температурі 4<sup>0</sup>С до проведення хроматографії. Безпосередньо перед початком хроматографії ампули відкривали, метиліві ефіри жирних кислот екстрагували в гексані у співвідношенні 1:2, потому екстракт упарювали до 300 мкл [233].

Силікагель подрібнювали протягом 5 годин на кульковому млині до отримання дрібного помолу. Отриманий силікагель декантували у

дистильованій воді у співвідношенні 1:10 протягом 40 хвилин. Осад відбирали, а надосадову суспензію ще раз лишали відстоятися протягом 2 годин. До одержаного осаду додавали дистильовану воду (1:1) та використовувати для приготування пластинок.

До 1 мл суспензії силікагелю додавали 15-20 мг гіпсу та перемішували на магнітній мішалці протягом 20-30 хвилин. Потому на скляну пластинку для двовимірної хроматографії, розміром 6x6 см, наносили необхідний об'єм суспензії силікагелю з гіпсом і підсушували. Пластинки активували, витримуючи їх протягом двох годин у сушильній шафі при температурі 120°C.

Хроматографію проводили з використанням бензолу як рідкої фази. За цих умов ефіри гідроксикислот залишаються на старті. Пластинку підсушували на теплом повітрі та проводили повторну хроматографію з використанням як рідкої фази суміші хлороформ:метанол:льодяна оцтова кислота (85:15:1) для підняття ефірів гідроксикислот з лінії старту. Смугу силікагелю з гідроксикислотами збирали і заповнювали цим силікагелем колонку 2/1, для екстракції ефірів гідроксикислот використовували суміш хлороформ:метанол (1:2). Екстраговані гідроксикислоти упарювали на роторному випаровувачі та зберігали при температурі 4°C.

### 2.3.2.3. Визначення вмісту гідроксикислот

Газову хроматографію гідроксикислот проводили з використанням методу визначення холестерину [234] з урахуванням аналогії властивостей цих сполук. Газову хроматографію високого тиску проводили на хроматографі HRGC-5300 (Carlo Erba, Італія) з полум'яно-іонізаційним детектором на скляній колонці (довжина 0,5 м, внутрішній діаметр 3 мм), заповненої 3% фазою OV-1 на адсорбенті «Chromosorb W/HP» (Sigma-Aldrich, США) з розміром часток 100-120 mesh (149-125 мкм) при

температурі 180<sup>0</sup> С. За газову фазу використовували аргон під тиском 130 кПа. Температура в зоні нанесення становила 250<sup>0</sup> С, в зоні детектування – 260<sup>0</sup> С. Тиск водню та повітря на детекторні пластинки становив 80 кПа та 110 кПа відповідно.

Індивідуальні гідроксикислоти ідентифікували за допомогою стандартів метилових ефірів гідроксикислот (Sigma-Aldrich, США).

### **2.3.3. Методи визначення функціональної активності білків**

2.3.3.1. Казеїнолітичний метод визначення активності (міні)плазміну [235]

Активність (міні)плазміну стосовно високомолекулярних субстратів проводили за модифікацією розробленого для трипсину методу гідролізу казеїну. Модифікація полягає у збільшенні концентрації казеїну, враховуючи нижчу гідролітичну активність плазміну, ніж трипсину та хімотрипсину, стосовно усіх високомолекулярних субстратів, окрім фібрину.

Протеолітичну активність плазміну та потенційну активність плазміногену та їхніх низькомолекулярних форм визначали за гідролізом казеїну. 55-80 мкг (міні)плазміну в 1 мл 0.067 М фосфатного буферу, рН 7.4, додавали до 1 мл розчину казеїну (у кінцевій концентрації 4 %) у тому ж буфері. В разі (міні)плазміногену до розчину проферменту додавали 250 одиниць стрептокінази з тим, щоб об'єм проби становив 2 мл. Вміст пробірок ретельно перемішували та інкубували 30 хв при 37<sup>0</sup> С.

Реакцію зупиняли додаванням 3 мл 15% розчину трихлороцтової кислоти. Осад відокремлювали центрифугуванням за 3 тис об/хв протягом 30 хв при кімнатній температурі на центрифугі ОПН-8 (ПТК Армед, Росія), після чого вимірювали оптичну густину відносно контролю за довжини хвилі

280 нм на спектрофотометрі Ultrospec 2000 (Biochrom LTD, Велика Британія). Спонтанну активність проферментів визначали за відсутності стрептокінази у пробі. Активність (міні)плазміну розраховували за формулою (2.3):

$$A_{к.о.} = \frac{\Delta E_{280}}{C \cdot V} \cdot 3,27 \quad (2.3.)$$

де  $\Delta E_{280}$  - поглинання розчинних у трихлороцтовій кислоті пептидів; V – об'єм внесеного в інкубаційну суміш розчину (про)ферменту; C – концентрація білка у вихідному розчині; 3,27 – коефіцієнт перерахунку в казеїнолітичних одиницях, що враховує час інкубації, об'єм інкубаційної суміші, оптичні властивості тирозину. За 1 казеїнолітичну одиницю прийнято вважати таку кількість ферменту, яка вивільнює 450 мкг розчинного в 10% розчині трихлороцтової кислоти тирозину за 1 год. в умовах експерименту.

#### 2.3.3.2. Казеїнолітичний метод визначення активності трипсину [236]

Для характеристики препарату  $\alpha_2$ -макроглобуліну було використано різницю здатності інгібувати гідроліз високо- та низькомолекулярних субстратів. За еталонний фермент було обрано трипсин фірми Sigma-Aldrich, США, внаслідок чого постало питання визначення його активності стосовно високомолекулярних субстратів. Серед різних методів визначення гідролітичної активності трипсину та трипсин подібних протеїназ казеїнолітичний метод є найпопулярнішим через відносну простоту й високу повторюваність проведення аналізу та дешевизну й доступність субстрату.

До 1 мл 0.067М фосфатного буфера, рН 7.4, який містив 10-20 мкг трипсину, додавали 1 мл розчину казеїну (у кінцевій концентрації 2 %). Вміст пробірок ретельно перемішували та інкубували протягом 20 хв при 35<sup>0</sup> С.

Реакцію зупиняли додаванням 3 мл 5% розчину трихлороцтової кислоти. Осад відокремлювали центрифугуванням за 3 тис об/хв протягом 30 хв при кімнатній температурі на центрифугі ОПН-8 (ПТК Армед, Росія), після чого вимірювали оптичну густину відносно контролю за довжини хвилі 280 нм на спектрофотометрі Ultrospec 2000 (Biochrom LTD, Велика Британія). Активність трипсину розраховували за формулою, наведеною у розділі 2.3.3.1.

2.3.3.3. Метод визначення активності трипсину з використанням синтетичного субстрату БАПНА [237]

Для визначення активності трипсину стосовно низькомолекулярних субстратів було обрано синтетичний субстрат БАПНА (N-бензоїл-DL-аргінін-p-нітроанілін). Перевагами цього методу є його широке використання, що полегшує трактування результатів різними дослідниками, висока специфічність та порівняно низька вартість субстрату.

До 3,2 мл розчину БАПНА додавали 1 мл розчину ферменту (1-10мкг) та інкубували протягом 30 хвилин при 30<sup>0</sup> С. Реакцію зупиняли додаванням 1.4 мл 5 % розчину фосфорновольфрамкової кислоти в 1М ацетатному буфері, рН 4.5. Осад відокремлювали центрифугуванням за 3 тис. об/хв протягом 10 хв. при кімнатній температурі на центрифугі ОПН-8 (ПТК Армед, Росія), після чого вимірювали оптичну густину за довжини хвилі 383 нм на спектрофотометрі Ultrospec 2000 (Biochrom LTD, Велика Британія).

Питому активність ферменту визначали за калібрувальною кривою як кількість мікромолів пара-нітроаніліну, відщеплених 1 мкг трипсину за 1 хвилину.

#### 2.3.3.4. Визначення інгібіторної активності препарату $\alpha_2$ -макроглобуліну

Інгібіторну активність визначали за співвідношенням пригнічення гідролітичної активності еталонного препарату трипсину відносно казеїну та БАПНА. Оскільки  $\alpha_2$ -макроглобулін не зв'язується з активним центром ферментів, а стерично обмежує до них доступ, інгібовані протеїнази втрачають здатність гідролізувати високомолекулярні субстрати (казеїн), тоді як низькомолекулярні (БАПНА) – мають майже необмежений доступ до ферменту [238]. Відповідно, визначення інгібіторної активності за співвідношенням результатів двох методів дає змогу тестувати активність  $\alpha_2$ -макроглобуліну навіть за присутності у розчині інгібіторів протеїназ іншої природи [236].

Для визначення пригнічення ступеню гідролізу казеїну та синтетичного субстрату БАПНА  $\alpha_2$ -макроглобулін попередньо додавали до розчину трипсину у різних співвідношеннях та інкубували протягом 30 хв при кімнатній температурі. Надалі проводили всі процедури, описані у розділах 2.3.2.2 та 2.3.2.3 відповідно.

#### 2.3.3.5. Визначення коагуляційної активності препарату тромбіну

З різних методів тестування тромбінової активності метод визначення часу зсідання еталонної плазми є одним із найпоширенішим у лабораторіях, які працюють з тромбіном. Перевагами методики є простота і швидкість проведення аналізу та висока повторюваність.

Слід також враховувати, що один NIH (National Institute of Health) – стандарт Національного інституту здоров'я США, прийнятий за міжнародну одиницю активності тромбіну становить таку кількість ферменту, яка зсідає 1 мл 0.1 % розчину фібриногену при температурі 29<sup>0</sup> C за 15 с [239]. З огляду

на сказане використання коагуляційних методів визначення активності тромбіну полегшує обрахунок результатів, порівняно з методами використання синтетичних субстратів.

Коагуляційну активність препарату тромбіну визначали за швидкістю зсідання нормальної плазми людини, для чого до 200 мкл розчину плазми додавали 100 мкл розчину тромбіну. Активність тромбіну обчислювали з урахуванням того, що 0,35 NIH призводить до зсідання 200 мкл плазми за 30 с при температурі 37<sup>0</sup> С [240].

#### 2.3.3.6. Визначення інгібіторної активності антитромбіну III

Інгібіторну активність препарату антитромбіну III визначали за титруванням активності еталонної кількості тромбіну відносно хромогенного тромбін-специфічного субстрату S-2238. Побудова графіка залежності активності тромбіну від кількості антитромбіну III за незмінної концентрації ферменту є нормальною практикою характеристики препаратів інгібіторів.

У комірки імунологічного планшету вносили по 10 NIH тромбіну, 1 од. гепарину, різні кількості препарату антитромбіну III, 25 мкл 3 мМ хромогенного тромбін-специфічного субстрату S-2238 та доводили 50 мМ трис-НСІ буфером, рН 7.4 з вмістом 0.15 М хлориду натрію до кінцевого об'єму 250 мкл. Надалі планшет інкубували у термостаті протягом 5 хв при температурі 37<sup>0</sup> С. Вимірювання проводили на ридері Multiscan EX (Thermo Electron Corporation, США) спектрофотометрично за двох довжин хвиль – 405 та 492 нм та визначали різницю показів між ними ( $\Delta E$ ) за допомогою програмного забезпечення Ascent Software, version 2.6 (Thermo Scientific, США). Активність препарату інгібітора вираховували за графіком залежності активності тромбіну відносно субстрату S-2238 від кількості антитромбіну III в пробі (рис. 2.8).

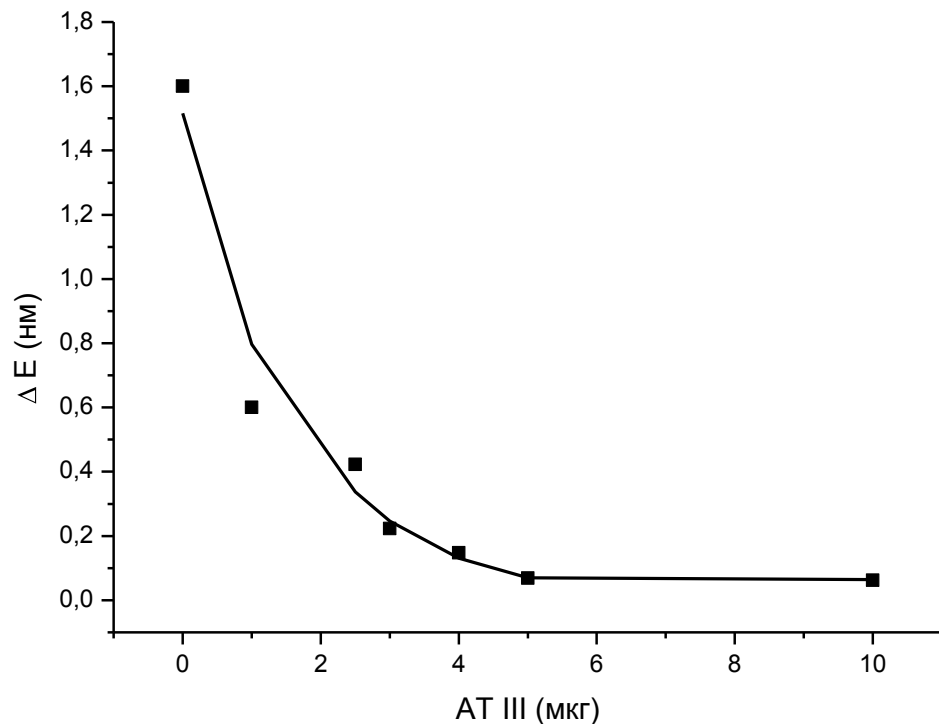


Рис. 2.8. Залежність активності тромбіну відносно субстрату S-2238 від кількості антитромбіну III в пробі.

Згідно одержаних даних 0,5 мкг препарату інгібітору містили еквімолярну одному NIH тромбіну кількість антитромбіну III.

### 2.3.4. Електрофоретичні методи

#### 2.3.4.1. Електрофорез у поліакриламідному гелі [241]

Для характеристики чистоти білкових препаратів протягом останніх 40 років прийнято використовувати метод диск-електрофорезу за модифікацією Лемлі [241]. Перевагами цього методу є високий коефіцієнт поділу білків і відсутність обмежень за молекулярною масою. З розвитком методик електронного сканування використання пластинок стало додатковою

перевагою, оскільки їх дуже легко переводити до цифрової форми та зберігати протягом необмеженого терміну. Цифрування гелів спричинило також появу комп'ютерних програм з їхнього обрахунку, які дають змогу ефективно визначати кількість забарвлених зон на треку, ступінь їхньої однорідності та, в разі однорідних зон і використання еталонних стандартів молекулярних мас, молекулярну масу білка.

Електрофорез проводили у пластинці 10% акриламід у розділяючого та 6.9% – концентруючого гелів зі співвідношенням акриламід/метилен-біс-акриламід 10:1. Для одержання горизонтальної поверхні гелю нашаровували 30% розчин ізопропілового спирту. Білки розчиняли до концентрації 1 мг/мл у 0.01М трис-фосфатному буфері для проб, рН 6.8, з вмістом 2.5% ДС-натрію, 8М сечовини, 5%  $\beta$ -меркаптоетанолу, 0.001% бромфенолового синього для відновленого електрофорезу та в тому ж буфері без  $\beta$ -меркаптоетанолу – для нативного. Потому проби прогрівали на киплячій водяній бані протягом 3-5 хв.

Електрофорез проводили на апараті Hoefer Mighty Small (Amersham Biosciences, США) за сили струму 10 мА під час концентрування проб і 30 мА – під час розділення. Гелі фіксували протягом 10 хв у розчині 7.5 % оцтової кислоти та 37.5% ізопропілового спирту, фарбували в розчині 2.5% Кумасі, 10% етилового спирту, 10% оцтової кислоти, 15% ізопропілового спирту та відмивали в 7% розчині оцтової кислоти.

За маркери було використано набір білків (Pharmacia, Швеція) з молекулярними масами 94 кДа (фосфорилаза В), 67 кДа (альбумін), 43 кДа (овальбумін), 30 кДа (ангідраза), 20,1 кДа (соєвий інгібітор трипсину), 14,4 кДа (лактальбумін).

#### 2.3.4.2. Ензим-електрофорез [242]

Метод диск-електрофорезу за Лемлі дає змогу ефективно поділити білки за молекулярною масою, але не визначити їхню функціональну активність. Для протеолітичних ферментів було розроблено модифікацію цієї методики з включенням до розділяючого гелю білка як субстрату. Така модифікація одержала назву ензим-електрофорезу.

Ензим-електрофорез є дуже ефективним, коли слід визначити контамінацію домішками ферменту білкового препарату, визначити присутність ферменту серед білків близької молекулярної маси або, як у нашому випадку, довести, що білок певної молекулярної маси має гідролітичну активність.

Акриламід і желатин розчиняли у 0.75 М трис-НСІ буфері, рН 8.8, з вмістом 0.2% ДС-натрію та 0.4% ТЕМЕД до концентрацій 12% і 1 мг/мл відповідно. Полімеризацію розділяючого гелю проводили з одержаного розчину, концентруючого – згідно розділу 2.3.4.1. Електрофорез проводили на апараті Hoefer Mighty Small (Amersham Biosciences, США) за сили струму 19 мА під час концентрування та 36 мА – розділення. По завершенні, гель обробляли 2.5% розчином тритон Х-100 протягом 60 хв. при кімнатній температурі, переносили у 0.1 М гліцин-NaOH буфер, рН 8.3 та залишали при кімнатній температурі на ніч. Фарбування гелю проводили 1% розчином амідочорного в 7% розчині оцтової кислоти протягом 1 години. Пластинки відмивали в 7% розчині оцтової кислоти.

#### 2.3.5. Електронна мікроскопія [243]

Охарактеризувати структуру згустку неможливо без використання методів візуалізації, таких як оптична й електронна мікроскопія. Враховуючи

розмір фібрил у нашому випадку використання електронної мікроскопії було доцільнішим.

Фіксацію згустків для електронно-мікроскопічного дослідження проводили 2.5% розчином глутарового альдегіду в 0.1 М какодилатному буфері, рН 7.2, протягом 20 годин при кімнатній температурі. Потому відмивали 0.1 М какодилатним буфером, рН 7.2, протягом 30 хв. Фіксували 1% розчином OsO<sub>4</sub> у тому ж буфері протягом двох годин при кімнатній температурі та відмивали протягом 30 хв. у дистильованій воді. Зневоднення препаратів проводили послідовною зміною розчинів ацетону: 30%, 50%, 70%, 90% по 15 хвилин за кожної концентрації та дві зміни по 1 годині у 100% ацетоні. Заливали в епоксидну смолу та полімеризували при 60° С протягом 48 годин. Блоки зі зразками заточували сталевими лезами (GEM, США), зрізи з них одержували за допомогою скляних ножів (LKB, Швеція) на мікротомі Knifemaker 7800 (LKB, Швеція) та переносили на предметні сітки (AGAR, Англія), вкриті формваровою плівкою (Sigma-Aldrich, США) та зміцнені вуглецем (AGAR, Англія) на HUS-5B (Hitachi, Японія). Фарбування проводили 2% розчином ураніацетату (Sigma-Aldrich, США) у воді протягом 45 хв і цитратом свинцю (AGAR, Англія) – 20 хв. Перегляд зрізів і фотографування проводили на трансмісійному електронному мікроскопі H 600 (Hitachi, Японія).

### **2.3.6. Визначення концентрації білка**

В умовах нашого експерименту точність визначення концентрацій і чутливість методу не були вирішальними. Концентрацію білка зазвичай визначали безпосередньо після очищення або перед використанням, і, враховуючи схильність препаратів ферментів та інгібіторів до інактивації, швидкість визначення мала пріоритетний характер. Окрім того використання чистих препаратів білків з відомими коефіцієнтами молекулярної екстинції

значно підвищувало точність методу. Також слід зазначити неабиякою перевагою спектрофотометричного методу, особливо для препаратів з плазми крові людини, є можливість уникнути втрат білка.

Концентрацію плазміногену та його фрагментів, фібриногену, тромбіну, антитромбіну III й  $\alpha_2$ -макроглобуліну визначали спектрофотометрично, вимірюючи поглинання за довжини хвилі 280 нм і віднімаючи значення поглинання за 320 нм. Для розрахунку концентрацій білків використовували значення коефіцієнтів екстинції для 1% розчинів за довжини оптичного шляху кювети 1 см (E), наведені в таблиці 2.2:

*Таблиця 2.2*

*Коефіцієнти екстинції для 1% розчинів білків*

<b>Білок</b>	<b>E</b>	<b>Молекулярна маса, кДа</b>
Плазміноген	17,0	92 [244]
Крингли 1-3	22,5	38 [244]
Крингл 4	25,0	14 [244]
Мініплазміноген	14,0	38 [244]
Тромбін	18,3	39 [245]
Антитромбін III	6,2	58 [246]
Фібриноген	15,1	340 [247]
$\alpha_2$ -Макроглобулін	8,0	720 [248]

### **2.3.7. Турбідиметрія**

#### **2.3.7.1. Статична система турбідиметрії**

Турбідиметричний метод засновано на фіксації світлорозсіювання фібриновим згустком [249]. За довжини хвилі 350 нм розчинний фібриноген практично не поглинає випромінювання. В разі ініціації утворення фібринового згустку, він розсіює світло тим більше, чим більшого розміру набуває згусток. Така особливість дає змогу динамічно описати у часі швидкість його утворення, а також, за подальшим зниженням світлорозсіювання, швидкість його деградації. Відтак, цей метод є зручним скринінговим тестом, який дає змогу оцінити ступінь активації чи пригнічення систем зсідання крові та фібринолізу, одночасно враховуючи баланс їхньої активності.

До кювети спектрофотометра послідовно вносили (скрізь кінцевий об'єм інкубаційної суміші був 1,5 мл):

1. фібриноген 1,5 мг/мл, 20 мМ трис-НСІ буфер, рН 7.4 з вмістом 0.15 М хлориду натрію, 1.5 мМ СаСІ<sub>2</sub>, розчин плазміногену з розрахунку 0.034 к.о. питомої активності плазміногену на 1 мг фібриногену. Реакцію ініціювали додаванням розчину стрептокінази 1.25 од. на 0.034 к.о. плазміногену та розчину тромбіну (30 NIH/мг фібриногену);

2. попередню суміш компонентів з додаванням  $\alpha_2$ -макроглобуліну в концентрації 0.25-0.75 мг/мл;

3. попередню суміш компонентів з додаванням замість  $\alpha_2$ -макроглобуліну 20-100 мкг препарату гідроксикислот

та вміщували кювету до термостатованої камери спектрофотометра Ultrospec 2000 (Biochrom LTD, Велика Британія). Світлорозсіювання реєстрували за довжини хвилі 350 нм за допомогою приєданого до спектрофотометру ноутбуку AcerNote 760i (Acer, США) з програмним забезпеченням SWIFT II (Biochrom LTD, Велика Британія). Час від ініціації утворення згустку до досягнення максимальної величини світлорозсіювання враховували як час утворення згустку, де період від ініціації до початку зростання визначали як лаг-період. Тангенс кута –  $\text{tg } \alpha$  – дотичної, проведеної

до висхідної кривої піку світлорозсіювання визначали як швидкість утворення згустку. Час зниження світлорозсіювання до початкових величин визначали як час повного лізису згустку. Час зниження світлорозсіювання до половини від максимуму визначали як час напівлізису згустку. Тангенс кута  $-\operatorname{tg} \beta$  – дотичної, проведеної до низхідної кривої піку світлорозсіювання визначали як швидкість лізису згустку [250].

### 2.3.7.2. Динамічна система турбідиметрії

Головною відмінністю динамічної системи від статичної є система формування та кріплення згустку у кюветі спектрофотометру. Якщо у статичній системі згусток формують безпосередньо у кюветі з тим, щоб він рівномірно заповнив її об'єм, у динамічній – попередньо сформований згусток закріплюють у кюветі таким чином, щоб забезпечити вільне протікання рідини між ним і стінками кювети. Для цього нами було розроблено спеціальну схему кріплення (рис. 2.9).

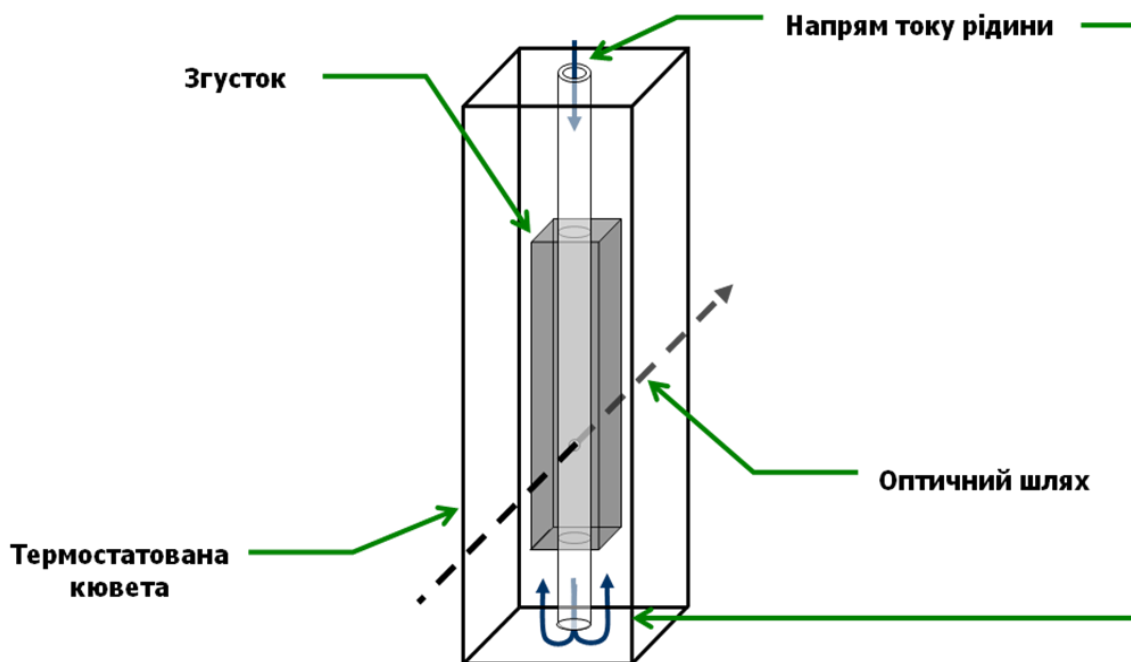


Рис. 2.9. Схема кріплення згустку у кюветі спектрофотометру в динамічній системі дослідження фібринолізу.

Згусток формували у камері, діаметром 8 мм на трубці, внутрішній діаметр якої становив 0,6 мм, зовнішній – 1 мм з плоским розширенням на кінці, діаметром 8 мм. По сформуванні згустку його переносили до кювети та закріплювали таким чином, щоб нижній отвір трубки був на відстані 1 мм від дна кювети. Потому кювету з трубкою закривали кришкою зі з'єднаннями для трубок проточної системи, складеної за схемою рис. 2.10.

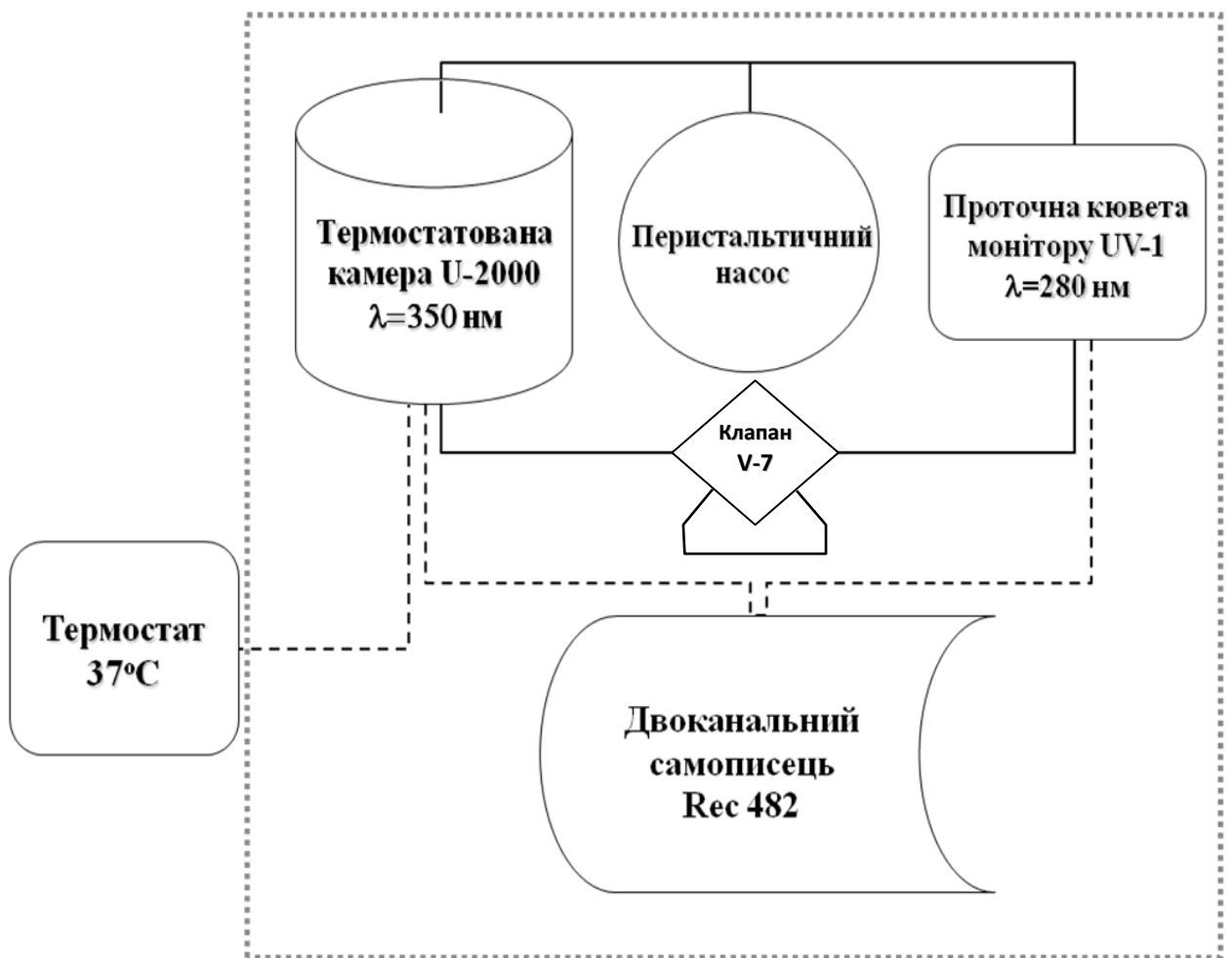


Рис. 2.10. Принципова схема з'єднання основних вузлів динамічної системи дослідження фібринолізу.

Використаний перистальтичний насос Р-1 (Amersham Biosciences, США) давав змогу підтримувати потік від 1 до 9 мл/хв або від 0,4 до 4 мм/сек у заданій геометрії кювети. Термостат зі спеціальним блоком управління

давав змогу підтримувати протягом всього часу експерименту температуру термостатованої камери з точністю до  $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ .

Спектрофотометр "Ultrospec 2000" (Biochrom LTD, Велика Британія) зі змонтованим термостатованим тримачем кювет давав змогу вимірювати світлорозсіювання згустком на довжині хвилі 350 нм. За кювету було використано стандартну кварцеву кювету з довжиною оптичного шляху 10 мм, перерізом  $10 \times 10$  мм та об'ємом 4,5 мл.

Вимірювання оптичної густини проточного буферу проводили на УФ моніторі UV-1 (Amersham Biosciences, США) з фіксованою довжиною хвилі 280 нм і довжиною оптичного шляху проточної кювети 10 мм. Дані зі спектрофотометра та УФ монітора фіксували за допомогою двоканального двокоординатного самописця Rec 482 (Amersham Biosciences, США) та комп'ютера AcerNote 760i (Acer, США) з програмним забезпеченням SWIFT II (Biochrom LTD, Велика Британія).

Триканальний клапан V-7 (Pharmacia, Швеція) з петлею 50 мкл давав змогу змінювати протягом експерименту склад проточного буферу та відбирати проби для електрофорезу продуктів гідролізу згустку, залишаючи незмінним загальний об'єм рідини в системі. Сумарний об'єм робочого розчину в установці становив близько 5 мл, довжина капілярів, якими циркулювала рідина в замкнутій системі кювета – насос – клапан – УФ монітор – кювета – близько одного метра. Максимальна швидкість рідини в кюветі була від 4 мм/с на початку експерименту до 1,3 мм/с після повного лізису згустку. В'язкість проточного буферу становила  $8.5 \times 10^{-4}$  Па·с при температурі  $37^{\circ}\text{C}$ . За таких умов величина shear rate коливалася у діапазоні від 30 до  $300 \text{ s}^{-1}$ , shear stress – близько 0,2 Па. Отже, у названому діапазоні параметрів можна було моделювати процес лізису згустку в артеріолах, капілярах і венулах. Зниження лінійної швидкості в ході експерименту внаслідок збільшення перерізу потоку в процесі лізису згустку давало змогу

змоделювати гідродинамічні умови у судинах, коли в міру лізису тромбу збільшується просвіт судини та, відповідно, падає лінійна швидкість протікання крові.

### **2.3.8. Математична обробка результатів**

Протягом останнього часу з розвитком комп'ютерних технологій для статистичної обробки одержаних даних прийнято використовувати фірмові програмні пакети. Такий підхід дає змогу стандартизувати використання статистичних методів і полегшити інтерпретацію опублікованих даних іншими дослідниками.

Електрофореграми обробляли за допомогою програмного пакету TOTAL LAB (Amersham-Pharmacia, США). Аналіз інгібіторної активності антитромбіну III проводили з використанням пакету Ascent Software version 2.6 (Thermo Scientific, США). Аналіз турбідиметричних кривих здійснювали за допомогою пакету SWIFT II (Biochrom LTD, Велика Британія).

Математичну обробку та аналіз отриманих експериментальних даних виконували за допомогою пакету ORIGIN 8.1 (Microsoft, США). До роботи включено результати експериментів, допустима похибка яких не перевищувала 5 відсотків ( $p < 0,05$ ). Представлені на рисунках дані є типовими для серій повторюваних дослідів (не менше трьох у кожній серії).

## Розділ 3

### ДИНАМІЧНА СИСТЕМА ДОСЛІДЖЕННЯ ФІБРИНОЛІЗУ

#### 3.1. Розробка установки для моделювання фібринолізу в умовах реального потоку

Історія дослідження фібринолізу налічує вже декілька сторіч, тож на сьогодні в умовах *in vitro* практично цілком охарактеризовано головні фактори плазіноген-плазінової системи та з'ясовано основні параметри їхньої взаємодії між собою та фібрином. Проте, не зважаючи на вельми значні успіхи сучасної біохімії у з'ясуванні механізмів руйнування фібринових згустків, розроблені на їхній основі методи фібринолітичної терапії не дають бажаного клінічного результату. Пояснити таке можна лише одним: стаціонарні системи дослідження фібринолізу не відтворюють повної картини взаємодії компонентів плазіноген-плазінової системи зі згустком і між собою в умовах реального тиску крові.

Слід зауважити, що стаціонарні моделі не дають змоги відтворити вплив змін концентрацій учасників процесу внаслідок надходження з крові нових компонентів або вимивання зі згустку тих чи тих білків під тиском крові. Не враховано у таких моделях внесок механічного руйнування через розмивання частково гідролізованого згустку, динамічну взаємодію згустку з ендотеліальними та імунокомпетентними клітинами, форменими елементами крові тощо. Відтак наразі перед сучасною біохімією постало завдання створення динамічних моделей дослідження фібринолізу в умовах реального потоку.

Для характеристики взаємодії динамічного потоку з перешкодами, зокрема крові з фібриновим депозитом, дуже важливими є такі величини, як *shear rate* та *shear stress* [217]. *Shear rate* українською мовою можна

перекласти як "швидкість деформації зсуву", ця фізична величина описує залежність тиску рідини на перешкоду від лінійної швидкості та радіусу судини. Як було сказано вище (формула 2.1), її розраховують як співвідношення чотирикратної лінійної швидкості до добутку числа  $\pi$  та кубу радіусу судини.

Однак, в нашому випадку було використано кювету прямокутної форми з круглим скляним тримачем всередині. Відповідно, слід ввести до формули (2.1) перерахунок перерізу судини з круглого на прямокутний і врахувати внесок в опір потоку введеної в нього круглої трубки. З урахуванням сказаного ми трансформуємо формулу (2.1) у формулу (3.1) [217, 251]:

$$\gamma_{wall} = \frac{6Q}{bh^2 f(\kappa)} \left[ \kappa - \frac{1 - \kappa^2}{2\kappa \ln\left(\frac{1}{\kappa}\right)} \right], \quad (3.1)$$

де

$$f(\kappa) = \kappa^4 - \frac{(1 - \kappa^2)^2}{\ln\left(\frac{1}{\kappa}\right)}, \quad (3.2)$$

$\kappa$  – відношення ширини кювети та діаметру скляної трубки із закріпленим згустком,  $Q$  – лінійна швидкість,  $b$  – ширина кювети,  $h$  – її висота.

*Shear stress* своєю чергою можна перекласти як «напруга зсуву». Цю фізичну величину, яка описує силу тиску рідини у будь-якій точці потоку обчислюють за формулою (2.2), як добуток в'язкості розчину та швидкості деформації зсуву. Для розрахунку напруги зсуву у прямокутній кюветі формулу (2.2) перетворюють у формулу (3.3) [251]:

$$\tau = \frac{6Q\mu}{bh^2}, \quad (3.3)$$

де  $Q$  – лінійна швидкість,  $\mu$  – в'язкість розчину,  $b$  – ширина кювети,  $h$  – її висота.

Отже, у розробленій установці слід було відтворити фізіологічні величини названих параметрів. Відомо, що величина швидкості деформації зсуву у судинах коливається від  $50 \text{ с}^{-1}$  для дрібних судин до  $500 \text{ с}^{-1}$  – для великих [218, 219]. Фізіологічний діапазон величини напруги зсуву становить від 0,3 Па до 3 Па для дрібних та великих судин відповідно [220, 221]. Також установка мала давати змогу відтворити в належному діапазоні коливання параметрів потоку, які, як відомо, у кровоносному руслі варіюють у досить широкому діапазоні залежно від розміру та призначення судин, як то аорти, артерій, капілярів, вен тощо. Згідно фізіологічних параметрів, наведених у таблиці 2.1, основними вимогами до установки є можливість варіювати швидкість потоку від 0,3 до 100 мм/сек, забезпечувати перепад тиску від 10 до 60 мм рт. ст. (1,3-6 кПа) з опором від 0 до 50%.

На виконання цих вимог було зібрано установку, описану в розділі 2.3.7.2. Використаний перистальтичний насос Р-1 (Amersham Biosciences, США) давав змогу підтримувати потік від 1 до 9 мл/хв або від 0,4 до 4 мм/сек у заданій геометрії кювети. За кювету було використано стандартну кварцеву кювету з довжиною оптичного шляху 10 мм, перерізом  $10 \times 10$  мм та об'ємом 4,5 мл. За таких умов величина shear rate коливалась у діапазоні від 30 до  $300 \text{ с}^{-1}$ , shear stress становила близько 0,2 Па. Як видно з таблиці 2.1 та згідно [218-221], у названому діапазоні параметрів можна моделювати процес лізису згустку в артеріолах, капілярах і венулах. Саме у судинах цих типів

відбувається інтенсивне фібриноутворення у зоні запалення [252]. Зниження лінійної швидкості в ході експерименту внаслідок збільшення перерізу потоку в процесі лізису згустку дає змогу змоделювати гідродинамічні умови у судинах, коли в міру лізису тромбу збільшується просвіт судини та, відповідно, падає лінійна швидкість току крові.

Особливою перевагою описаної установки є можливість поєднання одночасного фіксування світлорозсіювання за довжини хвилі 350 нм і поглинання за довжини хвилі 280 нм з відбором проб за допомогою триканального клапану V-7 (Pharmacia, Швеція). Відповідно, вона дає змогу зіставляти макропоказники розміру згустку з біохімічними показниками зростання рівнів продуктів деградації у проточному буфері та аналізувати склад ПДФ.

### **3.2. Порівняння результатів, одержаних у стаціонарній і динамічній системах моделювання фібринолізу**

Насамперед було опрацьовано оптимальні умови утворення та лізису згустку. Слід зауважити, що для формування згустку важливими є не лише достатні концентрації фібриногену та тромбіну, а й співвідношення їхніх концентрацій. В разі надміру фібриногену згустки утворюються тонковолокнисті з великою кількістю розгалужень фібрил [138]. Такі ж згустки утворюються в разі надміру тромбіну. Вирівнювання їхніх концентрацій спричинює утворення згустків з товщими фібрилами з меншою кількістю розгалужень аж до утворення гелів з невеликою кількістю дуже товстих фібрил. Ці факти слід враховувати, оскільки зміна товщини фібрил і кількості розгалужень не лише змінюють механічну стійкість згустку, а й прямо впливають на швидкість фібринолізу [253].

Відповідно було поставлено дві серії експериментів. У першій з них було вивчено зміни часу утворення згустку в разі послідовного зростання

концентрації тромбіну за сталого вмісту фібриногену. У другій – час утворення згустку в разі зростання концентрації фібриногену за лімітуючої концентрації тромбіну.

За фізіологічної концентрації фібриногену (3 мг/мл) зафіксовано стрімке зростання швидкості утворення згустку у діапазоні концентрацій тромбіну від 0 до 1 НІН/мл (Рис. 3.1). Надалі прискорення швидкості утворення згустку було не таким стрімким, якщо у діапазоні від 0 до 1 НІН/мл час утворення згустку скорочувався з 30 до 5 хвилин, то від 1 до 5 НІН/мл – з 5 до 2 хвилин.

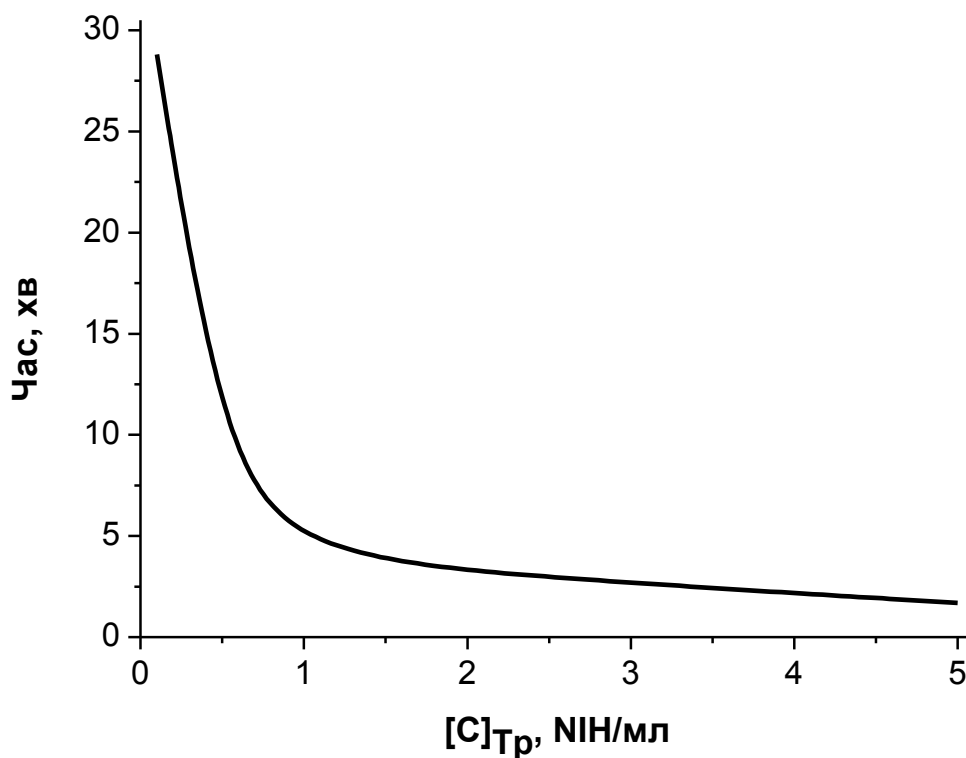


Рис. 3.1. Залежність часу утворення згустку від зміни концентрації тромбіну за сталої – фібриногену.

З рис. 3.1 можна зробити висновок, що концентрація тромбіну 0,1-0,2 НІН/мл перетворює фізіологічну концентрацію фібриногену у фібриновий

згусток протягом нефізіологічно тривалого терміну 25-27 хвилин. В умовах динамічного кровотоку подібне перетворення фібриногену, вірогідно, матиме вигляд утворення невеликих, вільно плаваючих згустків, що є абсолютно неприйнятним.

Зростання концентрації фібриногену за сталої концентрації тромбіну 1 НН/мл призводило до лінійного подовження часу утворення згустку (Рис. 3.2). Було взято концентрації фібриногену від 1 мг/мл, що є характерним для гіпофібриногенемії до 6 мг/мл – концентрації, характерної за розвитку синдрому запалення [254]. Впадає в очі, що концентрації тромбіну 1 НН/мл цілком достатньо для повного перетворення фібриногену на фібрин протягом нетривалого часу. Отже, навіть зростання концентрації фібриногену за синдрому запалення не обумовлює необхідності додаткового синтезу протромбіну та не зумовлює виснаження системи зсідання крові. Якщо взяти до уваги можливість локального концентрування тромбіну за участю тромбоцитарної системи, такий висновок стає ще очевиднішим. Проте слід враховувати, що подібне зростання локальної концентрації тромбіну у зоні запалення має призводити виключно до утворення тонковолокнистих згустків. Отже, аби максимально відтворити структуру згустку, характерну саме для запалення слід використовувати максимально високі концентрації тромбіну.

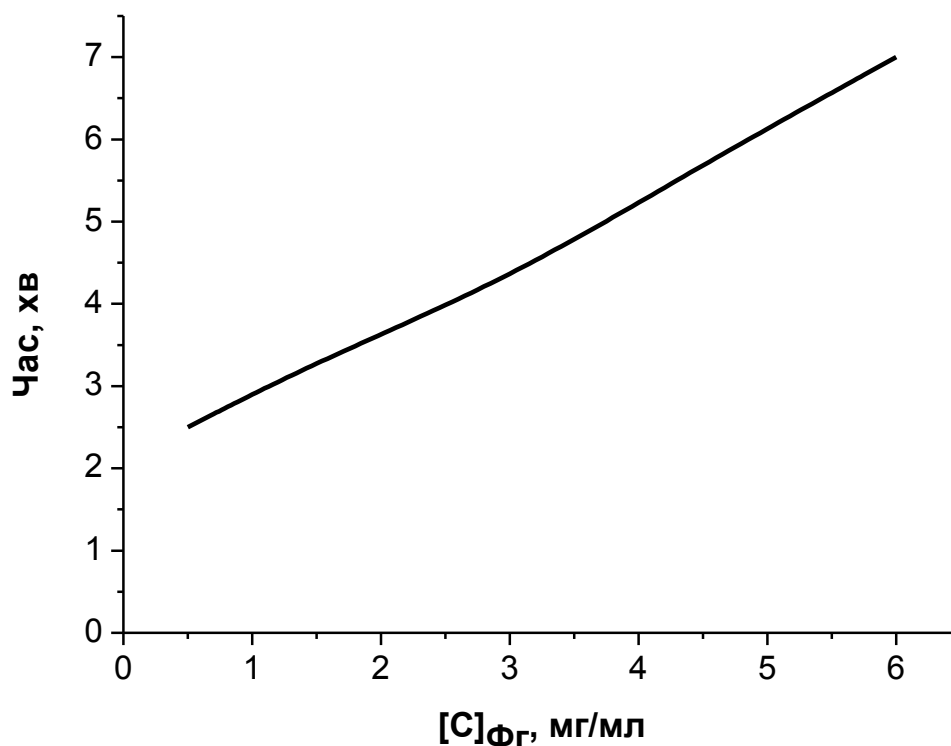


Рис. 3.2. Залежність часу утворення згустку від зростання концентрації фібриногену за фізіологічної концентрації тромбіну.

Надалі у стаціонарній системі було визначено концентрацію фібриногену, яка б забезпечувала фізичні властивості згустку, достатні для переносу до проточної системи. Було обрано концентрацію фібриногену 1,5 мг/мл, що загалом є наближеною до його фізіологічної концентрації. Для цієї концентрації було підібрано умови формування і лізису з тим щоб одержана турбідиметрична крива була максимально наближеною до модельної. Умови лізису згустку було опрацьовано як для лізису плазміном (Рис. 3.3), так і з використанням плазміногену та стрептокінази (Рис. 3.4).

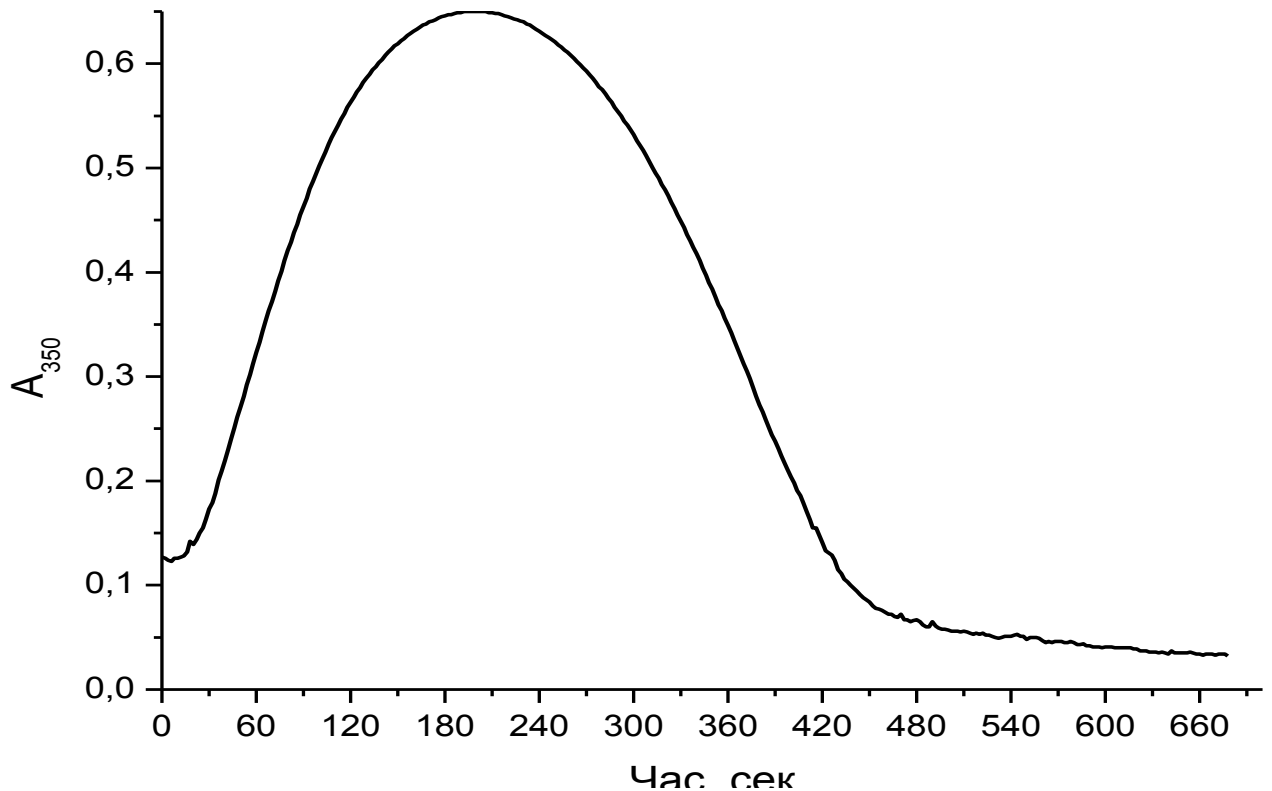


Рис. 3.3. Типова турбідиметрична крива лізису фібринового згустку плазміном.

Загалом, в разі використання для гідролізу фізіологічних концентрацій плазміну, для одержання приблизно симетричної турбідиметричної кривої у стаціонарній системі цілком було достатньо концентрації тромбіну у межах 1-2 НН. В разі використання для гідролізу плазміногену та стрептокінази як активатора така концентрація тромбіну була навіть зависокою, призводячи до асиметрії кривої (рис. 3.4). Водночас у динамічній системі такі концентрації тромбіну виявились замалими: згустки виявились механічно нестійкими та легко розмивались струменем буферу. Відповідно ефективна концентрація тромбіну, як з'ясувалося, була на порядок вищою – в діапазоні концентрацій 20-30 НН. Нами було обрано до роботи концентрацію тромбіну 30 НН/мл, оскільки вона давала змогу одержувати механічно стійкі згустки та досліджувати вплив на руйнування згустку саме плазміноген-плазмінової системи, а не механічного руйнування.

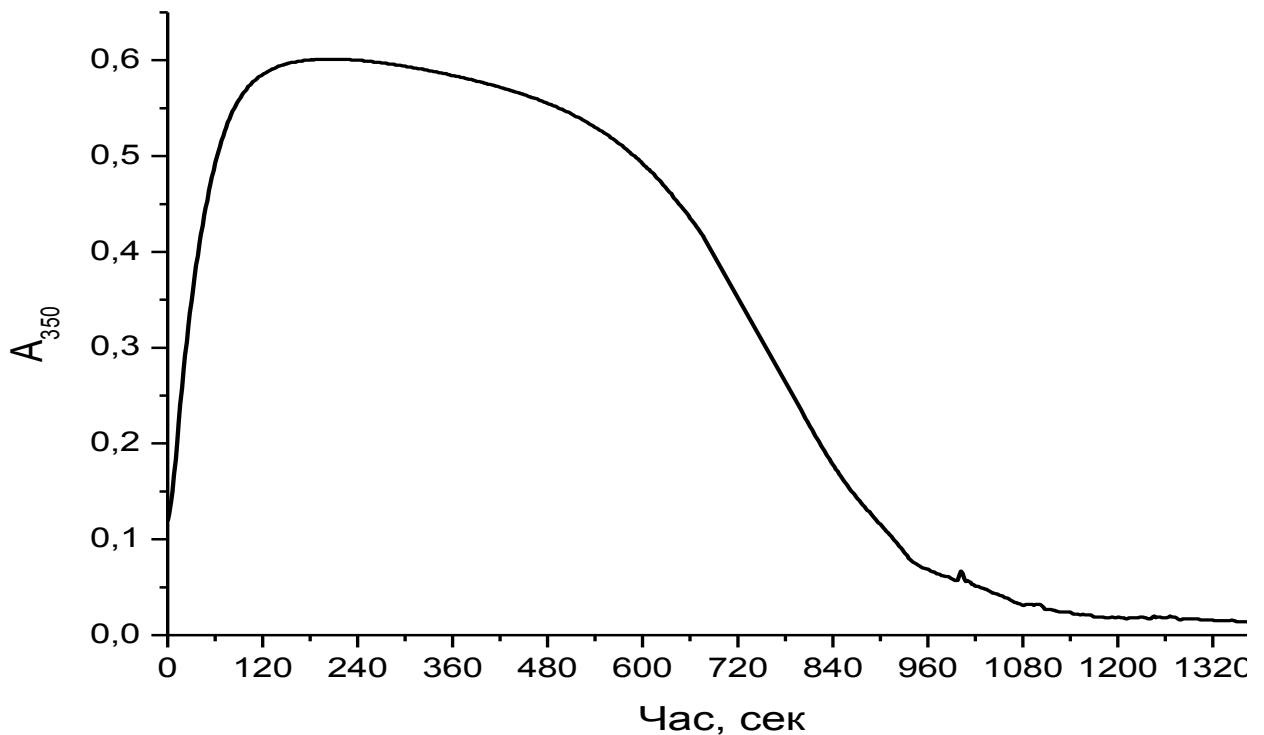


Рис. 3.4. Типова турбідиметрична крива лізису фібринового згустку плазміногеном і стрептокіназою.

На перший погляд дещо несподіваним є занадто великий проміжок часу, який у такому випадку витрачається на активацію проферменту. Як видно з наведених рисунків час напівлізису ( $T_{1/2}$ ) різнився більше ніж у двічі: 6 хвилин для використання попередньо активованого плазміну та 13,5 хвилин для активації плазміногену на згустку комплексом плазміноген-стрептокіназа. Оскільки відомо, що комплекс плазміноген-стрептокіназа не здатен до лізису фібрину, а має виключно активаторну активність стосовно вільного плазміногену, час напівлізису в такому разі є сумою часу утворення плазміну та власне лізису. На противагу, в разі використання вільного плазміну, він включається до згустку під час його формування, тож лізис фібрину починається практично одночасно з його полімеризацією.

Іншим поясненням може стати неповна активація плазміногену, внесеного до проби. На рисунку 3.5 наведено залежність швидкості напівлізису фібринового згустку від кількості плазміну в пробі.

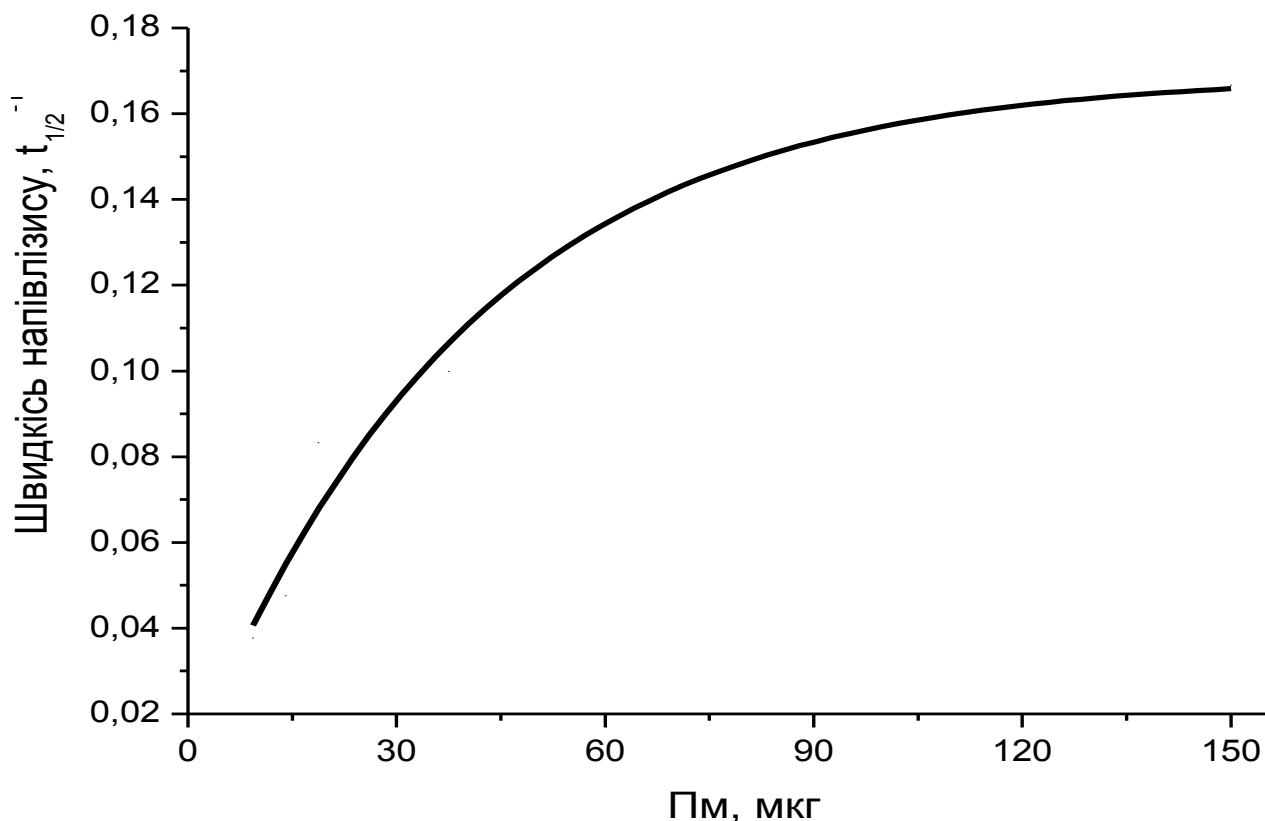


Рис. 3.5. Залежність швидкості напівлізису від кількості плазміну в інкубаційному середовищі.

З результатів, представлених на графіку, видно, що часу напівлізису, відповідного такому за внесення 150 мкг плазміногену, можна досягти знизивши кількість плазміну в пробі приблизно в вісім разів. Навіть якщо подвоїти чи потроїти цю кількість з урахуванням часу на активацію, можна зробити висновок, що до лізису залучено менше половини внесеного плазміногену. Сказаному можна знайти досить логічне пояснення, якщо врахувати обмеження взаємодії плазміногену з фібрином, описані в «активаційному каскаді» Т. В. Гриненко [215]. Наявність на молекулі фібрину вкрай обмеженої кількості сайтів зв'язування для К 5 і К 4 значною мірою лімітує швидкість включення плазміногену до згустку, його подальшу активацію та, відповідно, гідроліз. Натомість плазмін здатен взаємодіяти з фібрином К 1-3, сайтів зв'язування яких на молекулі фібрину набагато більше. Відтак описана різниця має бути ще суттєвішою в умовах реального потоку, тиском якого незв'язаний плазміноген буде відносити зі згустку.

З метою оцінки можливої різниці даних стосовно параметрів гідролізу фібринового згустку у стаціонарній і динамічній системах моделювання фібринолізу було проведено зіставлення часу напівлізису в обох системах. Додатково було використано таку перевагу динамічної системи, як можливість транспортування компонентів фібринолізу до уже сформованого згустку (Таблиця 3.1).

Таблиця 3.1

Час напівлізису ( $T_{1/2}$ ) згустку за різних умов включення до нього плазміногену

Система	Варіант	$T_{1/2}$ (хв)
Стаціонарна	Пг+СК у структурі згустку	11,5±0,57
Динамічна	Пг+СК у структурі згустку	27,0±1,33
	Пг+СК у проточному буфері	405±5,30

Насамперед у стаціонарній системі було визначено час напівлізису згустку за обраних умов і надалі зіставлено з даними, одержаними у проточній системі за двох можливих варіантів внесення плазміногену: згусток формувався без плазміногену, а плазміноген і стрептокіназу, як його активатор, було додано до проточного буферу та плазміноген і стрептокіназу було додано до розчину фібриногену перед формуванням згустку подібно до умов стаціонарної системи, тоді як у проточному буфері плазміногену не було.

За однакових умов формування згустку з одночасним внесенням плазміногену, стрептокінази та фібриногену час напівлізису у стаціонарній і динамічній системах різнився приблизно вдвічі. Одержані результати є досить несподіваними, оскільки за однакових концентрацій внесеного плазміногену та активатора у динамічній системі додано додатковий засіб

руйнування згустку – механічний тиск рідини. Отже, можемо зробити висновок, що вимивання зі згустку плазміну, сорбованого на продуктах деградації фібрину, з точки зору ефективності лізису є значно суттєвішим за механічне руйнування згустку. Відтак, під час інтерпретації даних, одержаних за допомогою стаціонарної системи, слід брати до уваги, що ефективні концентрації компонентів фібринолітичної системи за цих умов є дещо заниженими відносно фізіологічно необхідних. Сказане можна потвердити посиланням на клінічну практику, де ефективні терапевтичні дози активаторів плазміногену як стрептокінази, так і ТАП, є на декілька порядків вищими за необхідні для лізису згустку в стаціонарних системах [255, 256].

Водночас в разі відсутності плазміногену в структурі згустку час напівлізису було зтягнуто майже в 15-ть разів. Як було згадано вище, модель «активаційного каскаду» плазміногену Т. В. Гриненко передбачає суттєву проблемність початкової взаємодії Глу-плазміногену з фібрином і дещо легшу взаємодію для Ліз-плазміногену. Обмежена кількість сайтів зв'язування для К 5 в умовах реального потоку, коли взаємодію плазміногену та фібрину різко обмежено в часі, стає ще суттєвішим чинником лімітування швидкості гідролізу згустку. Можна припустити, що саме ця ланка процесу гідролізу – первинна взаємодія Глу-плазміногену плазми крові з фібрином – є однією з основних точок регуляції процесу фібринолізу *in vivo*. З огляду на ці дані можна припустити, що суттєве зтягування лізису згустку в разі запалення обумовлено або блокуванням зв'язування плазміногену чи його активатора з фібрином під час його полімеризації, або інактивацією інкорпорованого до згустку плазміну. Враховуючи на доведеність у стаціонарних системах того факту, що взаємодія з фібрином захищає плазмін від інактивації його основним фізіологічним інгібітором –  $\alpha_2$ -антиплазміном, а значні розміри  $\alpha_2$ -макроглобуліну роблять можливість його участі в регуляції фібринолізу всередині згустку просто гіпотетичною, інактивація

інкорпорованого до згустку плазміну до завершення процесу гідролізу та розриву взаємодії фібрину та плазміну видається малоімовірною [257]. Відтак саме регуляцію початкової взаємодії плазміногену та його активації на фібрині можна вважати визначальною для зміни швидкості гідролізу згустку.

Аналогічний характер мала також крива зростання концентрації продуктів деградації фібрину в проточному буфері (Рис. 3.6).

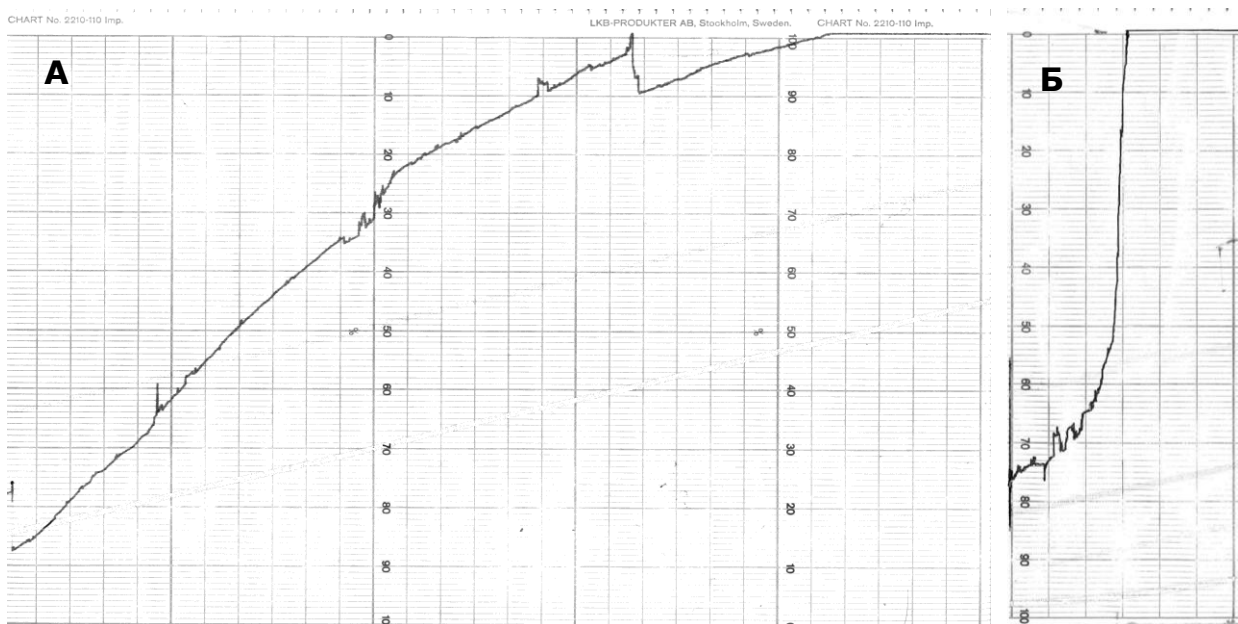


Рисунок 3.6. Типові криві зростання концентрацій ПДФ у проточному буфері. **А** – Пг+СК у проточному буфері; **Б** – Пг+СК у структурі згустку

Як видно з рис. 3.6, в разі наявності плазміногену в структурі згустку крива зростання концентрації продуктів деградації фібрину мала експоненційний характер з невеликим лаг-періодом, обумовленим, очевидно, утриманням фрагментів фібрину доки згусток ще зберігає свою структуру та стрімким зростанням надалі. Водночас, коли плазміноген представлено лише у проточному буфері, зростання концентрації продуктів деградації фібрину далеко повільніше та має чітко виражений лінійний характер. Можна припустити, що молекула плазміну відривається від згустку разом з фрагментом, до відщеплення якого вона спричинила. Відтак, швидкість

гідролізу не наростає, оскільки кількість плазміну, який зв'язується зі згустком, врівноважується кількістю плазміну, який вимивається зі згустку разом з продуктами деградації. Почасти це припущення має побічне підтвердження з аналізу електрофореграми проб ПДФ, відібраних на різних етапах гідролізу згустку (рис. 3.7). Протягом усього періоду гідролізу, аж до повної деградації згустку з переходом усіх його компонентів у розчин, вимиваються переважно високомолекулярні фрагменти з молекулярними масами понад 200 кДа. Накопичення фрагментів з молекулярними масами, близькими до Д-димеру та Е-фрагменту ближче до закінчення деградації згустку може бути пояснено двома причинами: насамперед слід згадати, що протягом усього часу лізису у проточному буфері не було  $\alpha_2$ -антиплазміну, тож деградація Х, Y фрагментів могла відбуватися під дією вивільненого зі згустку плазміну. По-друге, не можна виключити масове вивільнення Д-димерів та Е-фрагментів, які механічно утримувалися у згустку, коли його деградація сягнула певної граничної межі. На жаль, структура експерименту не дає змоги однозначно інтерпретувати одержані результати.

Водночас з літератури відомо, що у периферійній крові під час запалення ПДФ зафіксовано у формі як високомолекулярних фрагментів (Х і Y), так і Д-димерів і окремих Е-фрагментів [258-261]. Відомо, що мінімальним фрагментом фібрину, який захищає плазмін від інактивації  $\alpha_2$ -антиплазміном є (ДД)Е [262]. Отже, можна припустити, що *in vivo* деградація згустку проходить до високомолекулярних фрагментів з продовженням гідролізу плазміном фрагментів фібрину вже після вимивання цих фрагментів до кровоносного русла. З фізіологічного боку така ситуація є досить доцільною, оскільки таким чином унеможливорює різке зростання локальних концентрацій вільного плазміну в зоні гідролізу згустку. Розмивання фрагментів із сорбованим на них плазміном з поступовим вивільненням його до кровоносного русла в міру остаточного гідролізу ПДФ

полегшує інактивацію плазміну  $\alpha_2$ -антиплазміном, отже й блокує можливість появи неконтрольованого протеолізу в кровоносному руслі.

### Висновки до розділу 3

- Показано, що вирішальний внесок до деградації фібрину належить плазмін(оген)у, включеному до згустку під час його формування.
- З'ясовано, що взаємодія Глу-плазміногену з розчином з уже сформованим фібрином в умовах реального потоку є досить проблематичною та за фізіологічних концентрацій компонентів фібринолізу не здатна суттєво змінити швидкість гідролізу згустку вже інкорпорованим до нього плазмін(оген)ом.

Основні наукові результати розділу, опубліковані в роботах:

1. Дослідження гідролізу фібринового згустку в умовах динамічного потоку / К. С. Андріанова, А. В. Петік, О. Ю. Сломінський, В. Г. Вартанов, Т. В. Горошнікова // Матеріали ІХ Українського біохімічного з'їзду. – 2006. – Т. 2. – С 138.
2. Динамічна система дослідження фібринолізу / К. С. Андріанова, В. Г. Вартанов, О. Ю. Сломінський, С. І. Андріанов, А. В. Петік // Лабораторна діагностика. – 2008. – Т. 4 (46). – С. 39-43.

## Розділ 4

### ВПЛИВ ПРОДУКТІВ І ЧИННИКІВ ЗАПАЛЕННЯ НА УТВОРЕННЯ ТА ЛІЗИС ФІБРИНОВОГО ЗГУСТКУ

Синдром запалення характеризується появою у плазмі крові білків, не характерних для нормального стану, та зростанням концентрацій групи білків, насамперед фібриногену та інгібіторів протеїназ. Вся ця група білків в результаті одержала спільну назву «білки гострої фази» [116]. Наявність у цій групі інгібіторів протеїназ теоретично здатна змінити перебіг процесу гідролізу згустку. Водночас дослідження проблеми впливу білків гострої фази досі була поза увагою дослідників.

Ще однією характерною рисою синдрому запалення є поява чи наростання локальних концентрацій продуктів різного роду біохімічних реакцій. Насамперед слід згадати такий тісно пов'язаний з фібринолізом продукт як ПДФ. Висока активність тромбіну обумовлює утворення надміру фібрин-мономерів, частина яких не встигає включитися до згустку, асоціює з фібриногеном та циркулює у плазмі крові. Такі асоціати одержали назву розчинного фібрину [261]. Одночасно універсальний месенджер запалення гістамін індукує процеси пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ), що супроводжується появою біоактивних сполук, зокрема гідроксикислот [23, 24]. Який фермент ініціює утворення гідроксикислот *in vivo* досі достеменно не з'ясовано, можливими тригерами ПОЛ у зоні запалення виступають ліпооксигенази, циклооксигенази, цитохром P<sub>450</sub> монооксигенази, мієлопероксидази тощо [25-31]. Потенційно усі названі чинники здатні суттєво модулювати процеси коагуляції та фібринолізу.

#### 4.1. Характеристика препарату $\alpha_2$ -макроглобуліну

Для дослідження можливого впливу «білків гострої фази» на процеси коагуляції та фібринолізу було обрано  $\alpha_2$ -макроглобулін з двох причин.

Насамперед цей інгібітор навіть за нормальних умов є відповідальним за елімінацію до 25% тромбінової активності плазми крові [263]. Отже, його вплив на систему коагуляції є безпосереднім. Окрім того, цей інгібітор є єдиним, здатним за фізіологічних умов конкурувати з  $\alpha_2$ -антиплазміном за плазміну. Принаймні, дослідженнями вмісту в плазмі крові комплексів плазміну з різними інгібіторами було показано, що 95% плазмінової активності в організмі елімінується у вигляді комплексу з  $\alpha_2$ -антиплазміном і 5% – з  $\alpha_2$ -макроглобуліном [194]. За інгібіторною активністю препарат практично на 100 % пригнічував казеїнолітичну активність трипсину у співвідношенні фермент:інгібітор 1:1 ( $[C]_{50} \approx 0,51$ ), тоді як активність стосовно низькомолекулярних субстратів (БАПНА) пригнічувалася на ~20% за співвідношення 1:6 (рис. 4.1). Такі характеристики цілком збігаються з літературними даними щодо інгібіторних властивостей  $\alpha_2$ -макроглобуліну [236].

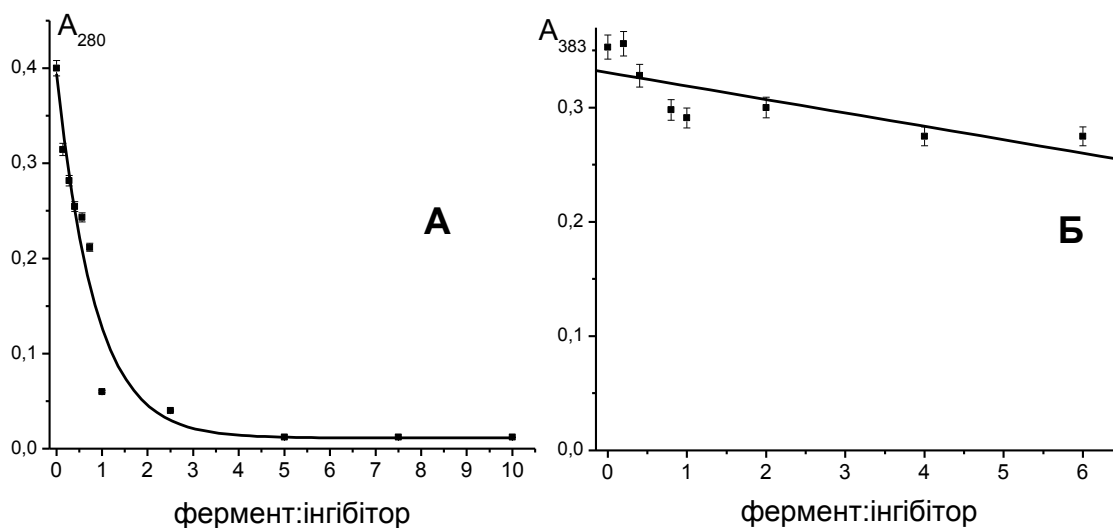


Рис. 4.1. Інгібування  $\alpha_2$ -макроглобуліном гідролізу трипсином казеїну (А) та БАПНА (Б).

#### 4.2. Швидкість утворення та лізису фібринового згустку за присутності $\alpha_2$ -макроглобуліну

Фізіологічна концентрація  $\alpha_2$ -макроглобуліну коливається в межах 1,2-1,8 г/л плазми крові, зростаючи удвічі в разі запалення [264]. Враховуючи, що експерименти проводилися за концентрації фібриногену 1 мг/мл, що є нижчим за фізіологічну норму, нами було взято відповідно знижені концентрації  $\alpha_2$ -макроглобуліну. За концентрації  $\alpha_2$ -макроглобуліну 0,25 мг/мл в інкубаційному середовищі турбідиметричні криві за своєю формою практично не відрізнялися від контрольних (Рис. 4.2).

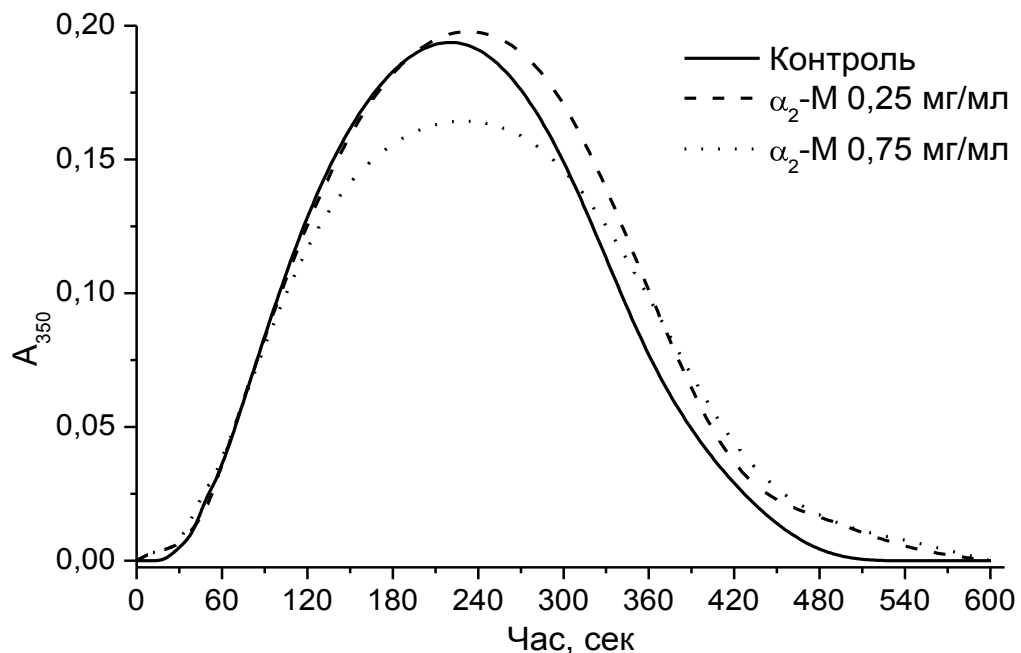


Рис. 4.2. Залежність утворення та лізису згустку від концентрації  $\alpha_2$ -макроглобуліну в інкубаційному середовищі

Можна говорити лише за деяку відмінність нижхідного плеча кривих, яке може свідчити за тенденцію до пригнічення фібринолізу.

Натомість, швидкість як утворення згустку так і його лізису мала незначну тенденцію до зростання (табл. 4.1).

Таблиця 4.1

*Швидкість утворення ( $tg \alpha$ ) та лізису ( $tg \beta$ ) згустку за різних концентрацій  $\alpha_2$ -макроглобуліну*

<b>Концентрація <math>\alpha_2</math>-макроглобуліну</b>	<b><math>tg \alpha</math></b>	<b><math>tg \beta</math></b>
0 (контроль)	4,47	3,46
0,25 мг/мл	4,61	3,82
0,75 мг/мл	3,94	2,65

Збільшення концентрації інгібітора втричі, до 0,75 мг/мл, посилювало тенденцію до зниження швидкостей утворення та лізису згустку. Також дещо знижувалось загальне світлорозсіювання згустку або внаслідок зміни структури згустку, або зміщення рівноваги між утворенням та лізисом на користь останнього. Загалом можна зробити висновок, що самостійно  $\alpha_2$ -макроглобулін навіть за підвищеної концентрації мало впливає на процес фібринолізу.

### **4.3. Характеристика препарату гідроксикислот**

Для дослідження можливого впливу гідроксикислот, які утворюються у зоні запалення внаслідок пероксидного окиснення ліпідів [23-31], було взято препарат, одержаний аерацією олії з подальшою ультразвуковою обробкою. Методом газової хроматографії у препараті виявлено 11

хроматографічних фракцій, відповідних гідроксикислотам з кількістю вуглецевих атомів від 8 до 28 (Рис. 4.3).

Домінуючими фракціями препарату були C<sub>24</sub>- (31,17%) і C<sub>18</sub>- (21,01%) гідроксикислоти. З інших можна виокремити групу фракцій так би мовити середніх концентрацій – C<sub>20</sub>- (12,2%), C<sub>16</sub>- (9,7%) та C<sub>26</sub>- (8,5%) гідроксикислот. Відсоток інших гідроксикислот коливався від 3 до 4 %, виняток становили C<sub>14</sub>- (0,49%) і C<sub>26</sub>- (1,1%) гідроксикислоти, які можна віднести до мінорних.

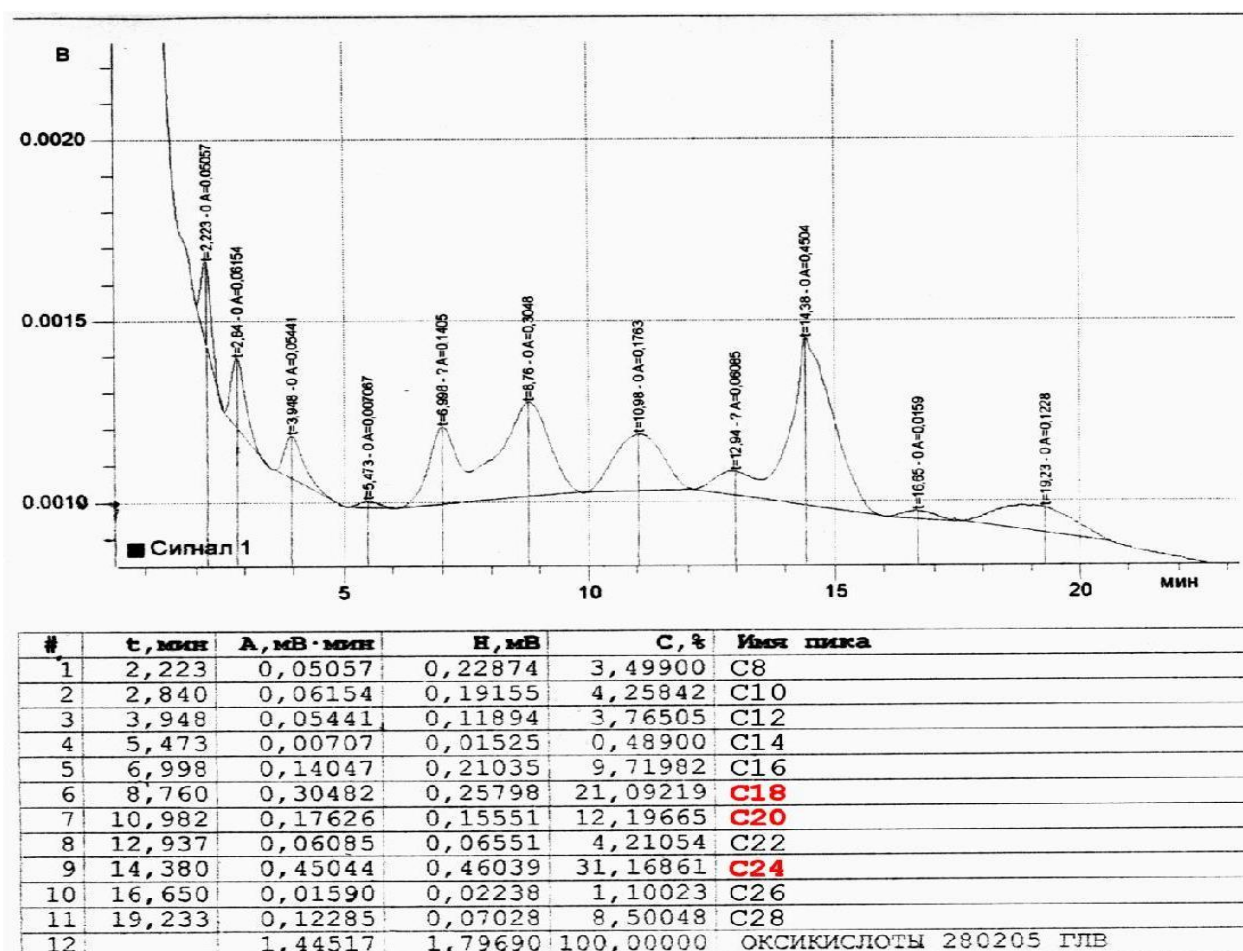


Рис. 4.3. Характеристика препарату гідроксикислот.

#### 4.4. Вплив гідроксикислот на швидкість утворення та лізису фібринового згустку.

Гідроксикислоти було взято до роботи з огляду на активацію пероксидного окиснення ліпідів у зоні запалення [23-31]. Як відомо, одним з механізмів реалізації синдрому запалення є активація циклооксигенази мембран ендотеліальних клітин [27]. Цей шлях є необхідним для синтезу медіаторів запалення – простагландинів, які є, як відомо, різного роду похідними арахідонової кислоти [28]. Надалі відбувається ескалація процесу внаслідок експонування фосфоліпідів зовнішніх мембран загиблих нейтрофілів, генерації супероксидного радикалу макрофагами тощо [25]. Потенційно гідроксикислоти є вільними радикалами, які, з огляду на значний внесок заряджених амінокислот у взаємодію плазміну та фібрину, теоретично можуть впливати на швидкість фібринолізу.

Окрім того відомо, що у процесах самозбирання фібрину важливу роль відіграють електростатичні та гідрофобні взаємодії [265]. Зокрема, для водневих зв'язків акцептором протону водню виступають незаряджені аміногрупи гістидину, а донором – протоновані аміногрупи лізину чи тирозинові гідроксили. Суттєве значення відіграють і гідрофобні взаємодії, що потверджено результатами рентгеноструктурного аналізу. Було показано, що фрагменти молекули фібрину, які виступають центрами первинної та, можливо, вторинної латеральної асоціації протофібрил, містять амінокислотні залишки, здатні забезпечувати електростатичні, водневі та гідрофобні взаємодії [266].

Наявність гідроксильної групи та гідрофобного аліфатичного ланцюга дає змогу гідроксикислотам одночасно модулювати обидва типи міжмолекулярних взаємодій у процесі самозбирання фібринового згустку. Водночас, можливість впливу похідних пероксидного окиснення ліпідів на процеси утворення, полімеризації фібрину; латеральної асоціації протофібрил; лізису фібринового згустку досі лишалася поза увагою дослідників.

Препарат гідроксикислот у різних концентраціях додавали до інкубаційної суміші безпосередньо перед формуванням згустку з тим, щоб вони входили до його структури. Концентрація гідроксикислот у периферійній крові здорової людини сягає 1,2 мкг/мл, за інфекційних захворювань – зростає до 4 мкг/мл [267]. Зрозуміло, що в зоні запалення локальна концентрація гідроксикислот є ще вищою. Нами було обрано діапазон концентрацій 20-100 мкг/мл.

Як виявилось, вплив гідроксикислот реалізувався прямо пропорційно їхній концентрації в інкубаційній суміші (Рис.3.4).

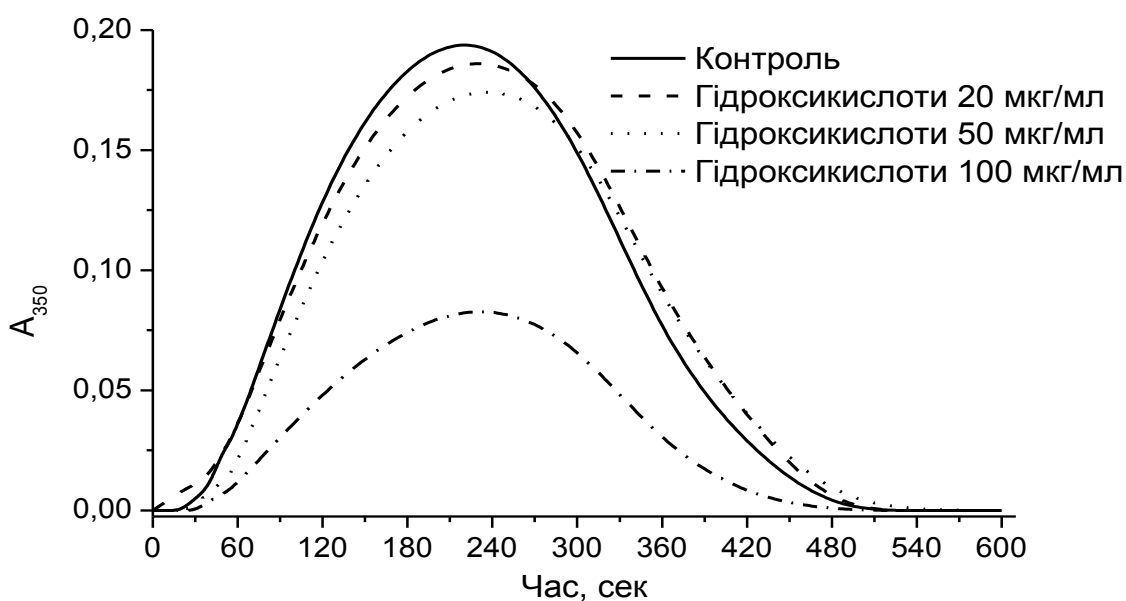


Рис. 4.4. Залежність утворення та лізису згустку від вмісту гідроксикислот у інкубаційному середовищі

Низькі концентрації гідроксикислот (20 мкг/мл) і середні (50 мкг/мл) майже не змінювали швидкості утворення та лізису згустку (табл. 4.2). Натомість, збільшення концентрації до 100 мкг/мл спричинювало фатальне зниження світлорозсіювання, падіння швидкості як утворення, так і лізису згустку. До певної міри можна говорити, що проміжок від 50 мкг/мл до 100 мкг/мл є пороговим для реалізації ефекту гідроксикислот. Суттєве

зниження світлорозсіювання в разі високого вмісту гідроксикислот в інкубаційному середовищі, ймовірно, можна пояснити двома причинами: зміною розміру згустку внаслідок утруднення включення до нього фібриногену суміші чи зміною його структури. Було проведено перевірку можливості зміни кількості фібриногену, залученого до утворення згустку, та показано, що за обраних умов весь фібриноген інкубаційної суміші включено до згустку. Відповідно, зміни світлорозсіювання, очевидно, спричинено зміною структури згустку, принаймні показано, що спадання світлорозсіювання свідчить за переважання у згустку тонких фібрил [268]. Відповідно, зміною структури згустку в такому разі можна пояснити і зниження швидкості фібринолізу, оскільки прозорі гелі, укладені з тонких фібрил, гідролізуються плазміном значно повільніше [269].

Таблиця 4.2

*Швидкість утворення ( $tg \alpha$ ) та лізису ( $tg \beta$ ) згустку за різних концентрацій гідроксикислот*

<b>Концентрація гідроксикислот</b>	<b><math>tg \alpha</math></b>	<b><math>tg \beta</math></b>
0 (контроль)	2,47	2,62
20 мкг/мл	2,8	3,12
50 мкг/мл	2,5	2,83
100 мкг/мл	1,18	1,46

**4.5. З'ясування можливості взаємодії  $\alpha_2$ -макроглобуліну та гідроксикислот у регуляції утворення та лізису згустку**

Оскільки більш-менш значимі ефекти як для  $\alpha_2$ -макроглобуліну, так і для гідроксикислот було зафіксовано лише в разі їхніх підвищених концентрацій, можливих в зоні запалення, взаємодію цих двох чинників було вивчено саме за таких значень.

Як виявилось, одночасне поєднання двох факторів впливу, гідроксикислот і  $\alpha_2$ -макроглобуліну, має характер суми обох ефектів (Рис. 4.5).

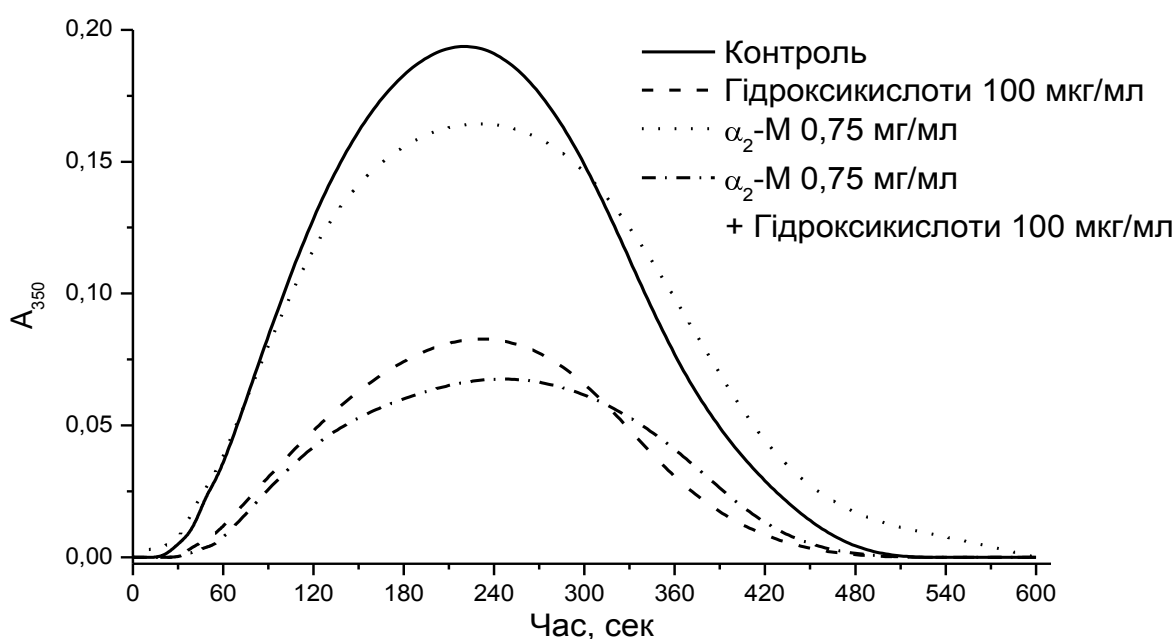


Рис. 4.5. Залежність утворення та лізису згустку від наявності  $\alpha_2$ -макроглобуліну та гідроксикислот в інкубаційному середовищі.

Додавання високої концентрації  $\alpha_2$ -макроглобуліну до суміші, яка містила 100 мкг/мл гідроксикислот призводило до такої ж тенденції до зниження світлорозсіювання та затягування часу лізису згустку, як і в разі порівняння ефекту  $\alpha_2$ -макроглобуліну з контролем. Відповідно, можна зробити висновок, що поєднання зростання концентрації гідроксикислот у зоні запалення з підвищенням рівня у плазмі крові  $\alpha_2$ -макроглобуліну як білка гострої фази здатне спричинити зміну як структури згустку, так і швидкості його гідролізу.

#### **4.6. Електронно-мікроскопічне дослідження структури згустку, утвореного за наявності гідроксикислот**

Значне зниження світлорозсіювання згустку в разі наявності в інкубаційному середовищі високої концентрації (100 мкг/мл) гідроксикислот є свідченням зміни його структури. Як було згадано вище, зниження світлорозсіювання є можливим в разі утворення тонких фібрил, також цей показник може падати внаслідок порушення компактності згустку. Які саме зміни відбуваються зі згустком під дією гідроксикислот було вивчено електронно-мікроскопічно за допомогою трансмісійного електронного мікроскопу Н 600 (Hitachi, Японія).

Як видно з рис. 4.6, за наявності у середовищі формування гідроксикислот згусток втрачає характерну сітчасту будову. Натомість його представлено міцелярними структурами, розташованими без вираженої взаємодії між собою.

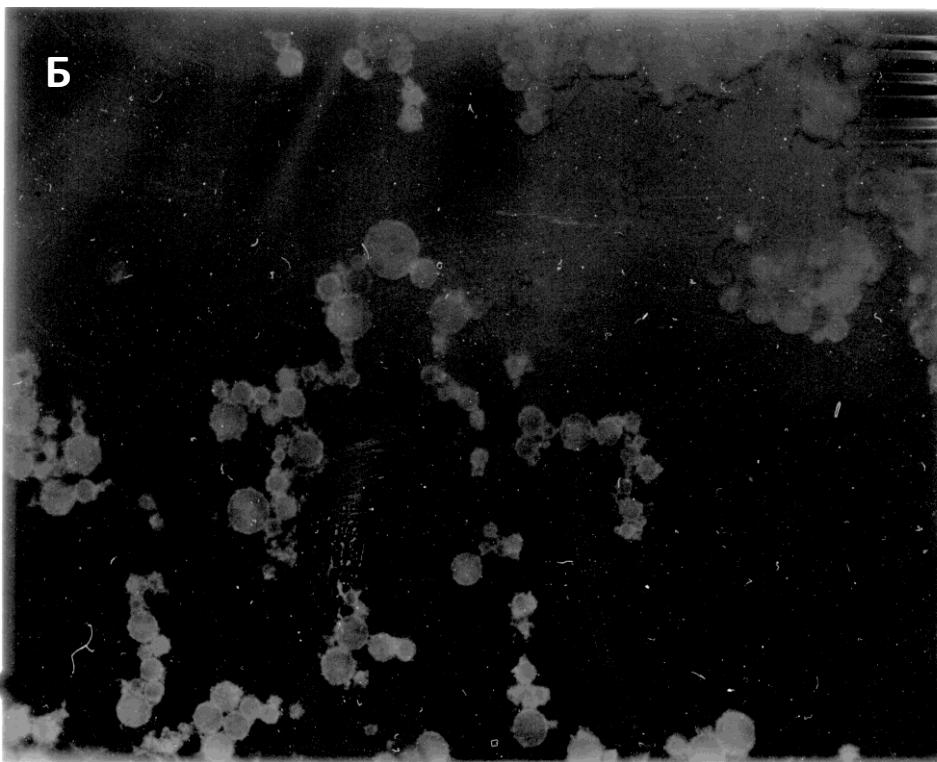


Рис. 4.6. Структура згустку, сформованого за наявності у середовищі гідроксикислот:

**А** – контроль; **Б** – 100 мкг/мл гідроксикислот

Водночас відомо, що фібринові депозити у зоні запалення мають плівковий характер з вираженою сітчастою або принаймні нитчастою структурою без наявності міцел (рис. 4.7) [270].

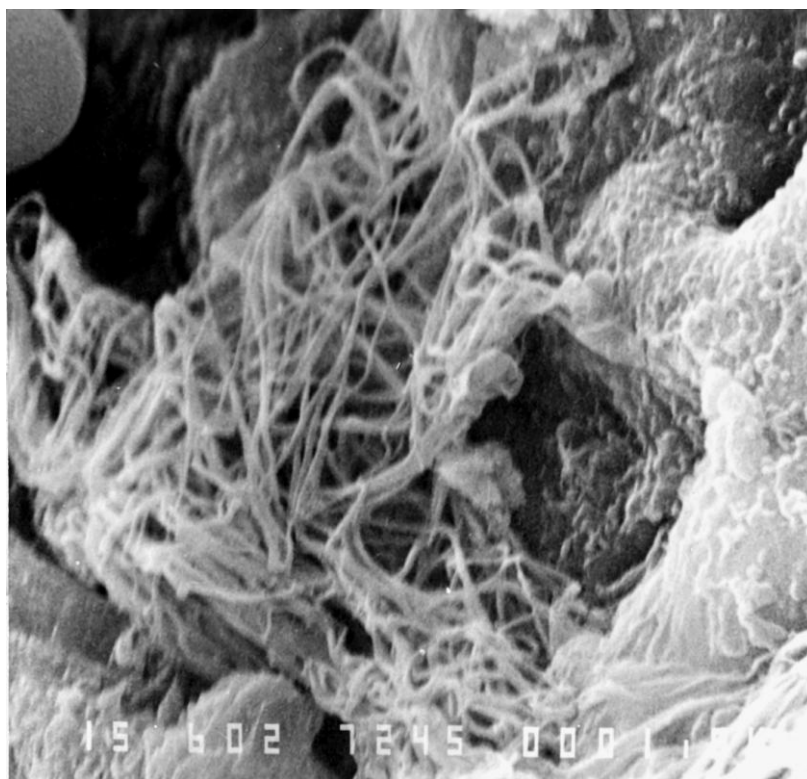


Рис. 4.7. Структура типового внутрішньосудинного депозиту.

Відповідно, очевидним є, що гідроксикислоти, утворені у зоні запалення, не реагують з фібрином та не залучені до формування депозитів. Імовірно існують механізми блокування їхньої участі в утворенні згустку. Отже, можна зробити висновок, що виявлені ефекти  $\alpha_2$ -макроглобуліну та гідроксикислот становлять лише теоретичний інтерес для з'ясування природи взаємодії молекул фібрину між собою у процесі самоскладання згустку та з плазміном у процесі фібринолізу, проте *in vivo* вони не є значимими.

#### 4.7. Вплив продуктів деградації фібрину на лізис фібринового згустку

Постійне існування внутрішньо-судинних фібринових депозитів під час синдрому запалення не є свідченням сто відсоткового пригнічення фібринолізу, а лише певного переважання процесу утворення фібрину на швидкістю його лізису. Відповідно, характерною рисою будь-якого запалення є накопичення у плазмі крові ПДФ [271-273].

Продукти деградації фібрину, як свідчать дослідження у стаціонарних системах, потенційно можуть справляти різнонаправлений вплив як на утворення згустків, так і на швидкість їхньої деградації. Щодо процесу самоскладання фібрину вплив ПДФ є однозначним: вони виступають гальмівним чинником цього процесу [274]. Потенційно різнонаправленою є дія суміші ПДФ на фібриноліз. З одного боку, фрагменти фібрину насамперед X Y та E, меншою мірою різні форми D-фрагменту містять сайти зв'язування для плазміногену, тож здатні виступати конкурентами згустку за вільний плазміноген [275]. Скажімо, X-фрагмент зв'язує плазміноген як у Глу- так і в Ліз-формах практично співмірно з фібрином, взаємодіючи переважно з лізин-зв'язувальними ділянками [215]. З тими ж ділянками взаємодіють також, хоча й дещо меншою мірою, фрагменти подальшої деградації фібрину: Y, E та D, за винятком однієї з форм D-фрагменту. Проте ця форма, як і Y-фрагмент здатні зв'язуватися з аргініл-зв'язувальними ділянками молекули плазміногену [276]. Такі властивості роблять ПДФ потенційними інгібіторами фібринолізу. Сказане особливо стосується Y і D-фрагментів, спроможних заблокувати початкову взаємодію плазміногену з фібрином. Водночас D-домен фібрин(оген)у містить послідовність, здатну прискорювати активацію плазміногену [277].

У стаціонарних системах ґрунтовно досліджені механізми та афінність зв'язування різних фрагментів фібрину з плазміногеном, вивчено імовірність блокування тими чи тими фрагментами взаємодії плазміногену з фібрином

[215]. Проте вивчення дії суміші ПДФ на фібриноліз у стаціонарній системі є досить проблематичним. Нами було взято стандартну суміш, яка утворювалася внаслідок гідролізу згустку в рамках експерименту. У її складі переважав вміст X-фрагменту (рис. 2.5).

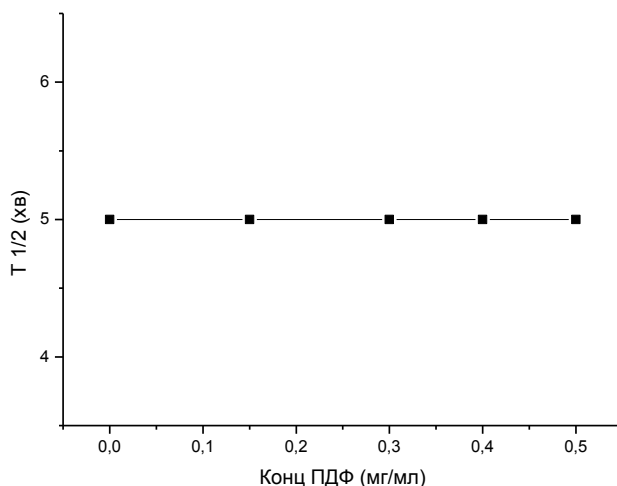


Рис. 4.7. Залежність часу напівлізису згустку від концентрації ПДФ у проточному буфері.

Одержані результати наведено на рис. 4.7. Як виявилось, наростання рівня ПДФ у проточному буфері не справляло жодного впливу на час напівлізису та швидкість гідролізу згустку. Слід зауважити, що фізіологічні значення рівня ПДФ у плазмі крові становлять 0,5 мкг/мл за нормального стану організму, зростаючи до 23 мкг/мл під час вагітності [5] та коливаючись від 0,66 до 145 мкг/мл за різних патологій [271-273]. За умов нашого експерименту навіть перевищення граничного рівня ПДФ, зафіксованого *in vivo*, у 3,5 рази не призвело до якогось видимого ефекту. Таке можна досить легко пояснити з урахуванням даних, наведених у розділі 3.2, згідно яких вирішальний внесок у швидкість гідролізу згустку належить плазміногену, включеному до згустку під час його утворення. Відтак, навіть

якщо ПДФ якимось чином і взаємодіють з плазміногеном у розчині, їхній вплив є мізерним.

#### Висновки до розділу 4

- Зростання під час запалення рівня  $\alpha_2$ -макроглобуліну в плазмі крові, як білка гострої фази, має досить незначний вплив на процес фібринолізу, тож його не можна розглядати як основну причину затягування лізису згустку та утворення фібринових депозитів.
- Гідроксикислоти у високих концентраціях здатні драматично змінювати структуру згустку та досить суттєво впливати на швидкість його гідролізу.
- Міцелярна структура згустку, утвореного за присутності високих концентрацій гідроксикислот, є абсолютно неподібною сітчастій структурі внутрішньо судинних фібринових депозитів, відповідно гідроксикислоти не залучено до регуляції як утворення, так і лізису згустку *in vivo*.
- Зростання рівня продуктів деградації фібрину в проточному буфері, співмірне з таким за різних фізіологічних станів, не впливає на час напівлізису та швидкість гідролізу згустку.

Основні наукові результати розділу опубліковані в роботах:

1. Андрианова Е. С. Влияние  $\alpha_2$ -макроглобулина и оксикислот на формирование и лизис фибринового сгустка / Е. С. Андрианова // Системная биология и биоинженерия: материалы международной школы-конференции молодых ученых, 28 ноября-2 декабря 2005 г. – Москва: МАКС Пресс, 2005. – С. 131.

2. Андріанова К. С. Вплив  $\alpha_2$ -макроглобуліну та гідроксикислот на утворення та лізис фібринового згустку / К. С. Андріанова, О. Ю. Сломінський, С. І. Андріанов, А. В. Петік // Лабораторна діагностика. – 2009. – Т. 2 (48). – С. 8-11.
3. Андріанова К. С. Механізми збереження фібринових депозитів під час запалення / К. С. Андріанова, О. Ю. Сломінський, С. І. Андріанов, А. В. Петік // Укр. біохім. журн. – 2010. – Т. 82, № 4 (додаток 2). – С. 39.

## Розділ 5

### ВПЛИВ ПРОДУКТІВ ЕЛАСТОЛІЗУ МОЛЕКУЛИ ПЛАЗМІНОГЕНУ НА ЛІЗИС ФІБРИНОВОГО ЗГУСТКУ

#### 5.1. Еластазна активність у зоні запалення та фрагментація молекули плазміногену

Молекулу плазміногену в організмі представлено переважно нативною формою з молекулярною масою 92 кДа, так званим Глу-плазміногеном. Однак він легко піддається частковому гідролізу з утворенням молекули з молекулярною масою 83 кДа – Ліз-плазміногену. Ліз-плазміноген відрізняється від Глу-плазміногену втратою неупорядкованої ділянки з N-кінця, внаслідок чого N-кінцевим амінокислотним залишком у нього стає лізин замість глютамінової кислоти. Обидві форми рівною мірою можуть утворювати плазмін в разі активації. Молекулу Глу-плазміногену складено з легкого та важкого ланцюгів, об'єднаних двома дисульфідними містками. В разі активаційного розщеплення зв'язку Arg<sub>561</sub>-Val<sub>562</sub> легкий ланцюг формує SP-домен з активним центром. Важкий ланцюг участі у формуванні активного центру не бере, його роль обмежено формуванням некаталітичних ділянок взаємодії з фібрином, тканинним активатором плазміногену та  $\alpha_2$ -антиплазміном. Ділянки некаталітичної взаємодії, здатні специфічно зв'язуватися з лізином – лізин-зв'язувальні або з аргініном – аргінін-зв'язувальні, винесено на жорстко прошиті дисульфідними зв'язками петлі, так звані кринглові структури або крингли. Така будова дає змогу чітко позиціонувати молекулу плазмін(оген)у відносно його субстрату фібрину специфічного інгібітора  $\alpha_2$ -антиплазміну та активаторів [101].

У системі *in vitro* еластазний гідроліз проводять при кімнатній температурі за присутності контрикалу, аби заблокувати плазміновий автоліз, протягом 6 годин. За таких умов молекула плазміногену

розщеплюється на три фрагменти: легкий ланцюг з п'ятьма кринглами важкого ланцюга (мініплазміноген, Вал<sub>442</sub>-плазміноген); N-кінцевий фрагмент важкого ланцюга з кринглами з першого по третій та окремо четвертий крингл важкого ланцюга (рис 5.1).

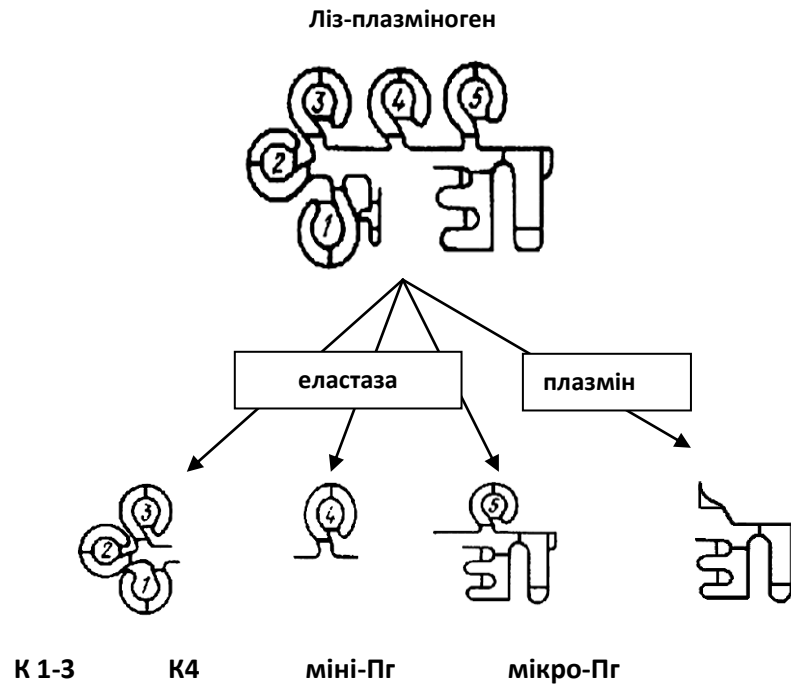


Рис. 5.1. Схема еластолізу молекули плазміногену.

У зоні запалення відбувається активація макрофагів, дегрануляція нейтрофілів, на фібриновому згустку активуються та секретують вміст гранул тромбоцити [93, 98]. Усі названі типи клітин обов'язковим елементом секреції мають еластазу. Відтак у зоні запалення мусить бути високою локальна концентрація еластазної активності. Зокрема показано зростання вшестеро еластазної активності у сироватці крові хворих на туберкульоз під час загострення хвороби [278]. Точних даних стосовно рівнів продуктів еластолізу молекули плазміногену під час запалення, на жаль, бракує. Насьогодні маємо лише оціночні дані рівня мініплазміногену у периферійній крові мишей за розвитку карциноми Льюїс, згідно яких він не перевищує 5%

від рівня плазміногену [279]. Відповідно, можна припустити, що локальна концентрація у зоні запалення може коливатися в межах 10-50% від рівня плазміногену. Також доведено наявність у плазмі крові та у тканинах різних форм кринглових структур (К 1-3, К 1-4 тощо), названих ангіостатинами [103]. Стосовно можливих концентрацій ангіостатинів, то точкою відліку може бути рівень ангіостатинів у хворих на рак – близько 20 нМ і до 67 нМ в разі проведення антитромботичної терапії за допомогою тПА [280]. Звідси можна зробити ще один досить цікавий висновок: активація фібринолізу під час хвороби призводить до посилення процесів протеолітичної фрагментації молекули плазміногену.

Згідно даних літератури, крингли 1-3 та 4 взяті окремо у такому діапазоні концентрацій практично не впливають на зв'язування плазміногену з фібрином. Натомість суміш кринглів 1-3 та 4 внаслідок адитивного ефекту здатна суттєво пригнічувати взаємодію плазміногену та фібрину [281]. Згідно даних Гриненко, мініплазміноген у стаціонарних системах прискорював фібриноліз внаслідок зростання концентрації активних центрів плазміну.

## **5.2. Вплив кринглових структур молекули плазміногену на лізис фібринового згустку**

Суміш кринглів 1-3 та 4 у концентраціях, співмірних концентрації плазміногену, практично не справляла впливу на швидкість фібринолізу. Певний вплив, виражений у зростанні приблизно у 1,5 рази часу напівлізису, суміш кринглів справляла лише за концентрацій у 7-10 разів більших за концентрацію плазміногену (Рис. 5.2).

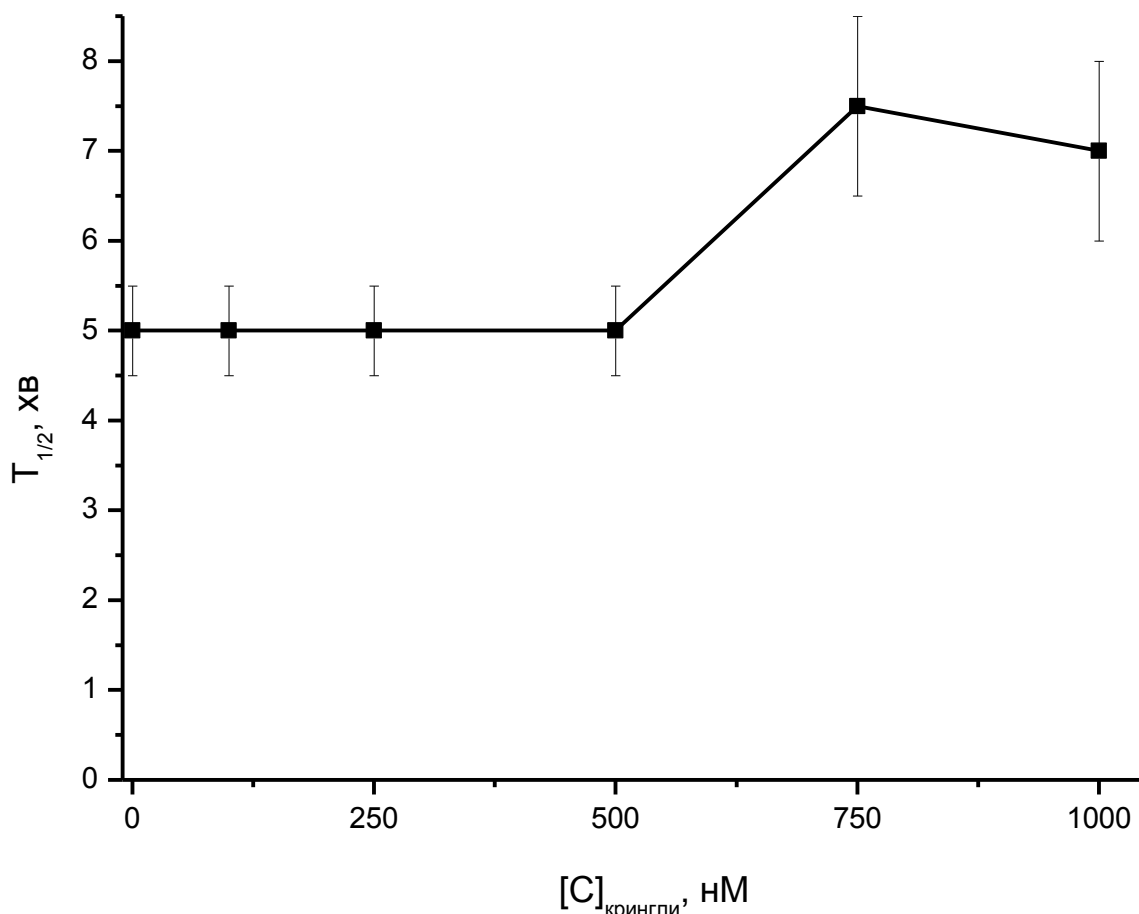


Рис. 5.2. Залежність часу напівлізису фібринового згустку від концентрації вільних кринглових структур плазміногену.

Як раніше було показано, кринглові структури молекули плазміногену, а саме їхні лізин-зв'язувальні ділянки, відіграють вирішальну роль у прискоренні гідролізу фібрину плазміном, порівняно з іншими сериновими протеїназами. Мікроплазмін, повністю позбавлений кринглових структур, гідролізує фібрин приблизно у 1,5 рази повільніше за трипсин, тоді як плазмін – у 30 разів швидше [214]. Отже, одержаний ефект можна пояснити можливістю очищених кринглових структур конкурувати з плазмін(оген)ом за місця посадки на фібрині. Відповідно, концентрації ізольованих кринглових структур мають бути далеко вищими ніж плазміногену аби їхня конкуренція за сайти зв'язування на фібрині могла справити якийсь видимий ефект. Водночас, як сказано вище, зафіксована у хворих концентрація ангіостатинів є далеко нижчою [280]. Звичайно, у місці їхнього утворення

локальна концентрація має бути вищою приблизно в 5-10 разів, тобто можна припустити можливість локальної концентрації кринглових структур у зоні запалення у 200-700 нМ. Точка перегину кривої 500 нМ ніби то потрапляє до цього діапазону, але слід врахувати, що рівень ангіостатину близько 70 нМ зафіксовано лише на тлі інтенсивної антитромботичної терапії. Звичайна концентрація ангіостатину – 20 нМ у периферійній крові та імовірно 100-200 нМ у зоні їхнього утворення є далеко нижчою, ніж необхідно для реалізації ефекту. Відтак можна зробити висновок, що біологічну роль ангіостатинів реалізовано в регуляції тканинного гомеостазу, а не фібринолізу.

### **5.3. Вплив мініплазміногену на лізис фібринового згустку**

На відміну від концентраційної залежності ефекту кринглових структур, уже еквімолярні з плазміногеном концентрації мініплазміногену призводять до досить суттєвого уповільнення гідролізу згустку та, відповідно, затягування втричі часу напівлізису (Рис. 5.3). Одержані результати є досить цікавими, оскільки у стаціонарних системах не спостерігали конкуренції плазміну та мініплазміну, навпаки додавання мініплазміногену до плазміногену в пробі, як згадано вище, призводило до прискорення гідролізу згустку внаслідок зростання кількості активних центрів ферменту.

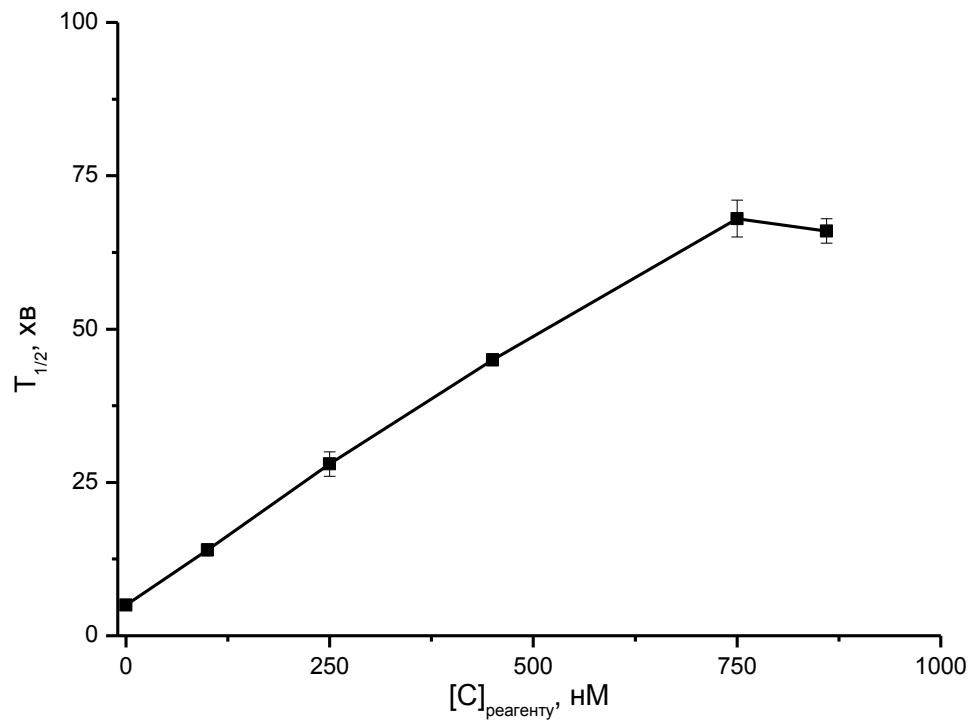


Рис. 5.3. Залежність часу напівлізису фібринового згустку від концентрації мініплазміногену.

Надалі залежність затягування часу напівлізису згустку від концентрації мініплазміногену має лінійний характер. Мініплазмін(оген), подібно до кринглових структур, теж може конкурувати з плазмін(оген)ом за сайти зв'язування на фібрині. Відомо, що мініплазмін на порядок повільніше за плазмін гідролізує згусток [214], тож в разі витіснення мініплазміном плазміну чи, принаймні, його часткової заміни, можна очікувати певного гальмування фібринолізу. Окрім того, відомо, що мініплазміноген значно повільніше активується тканинним активатором за Глу-плазміноген [282], тож уповільнення деградації згустку в разі витіснення з місць зв'язування на фібрині плазміногену мініплазміногеном є цілком очікуваним.

Іншим імовірним поясненням може бути вірогідна конкуренція п'ятого кринглу мініплазміногену з відповідною структурою Глу-плазміногену за

сайти зв'язування на фібрині. Як було показано Т. В. Гриненко [197], початкова взаємодія п'ятого кринглу Глу-плазміногену з фібрином є лімітуючим етапом швидкості активації плазміногену його тканинним активатором. Така взаємодія ініціює конформаційні переходи у молекулі Глу-плазміногену, внаслідок яких поступово експонуються лізин-зв'язувальні ділянки інших кринглових структур і відбувається остаточне формування тріадного активаційного комплексу тканинний активатор-плазміноген-фібрин. Згідно даних Гриненко, на нативному фібрині експоновано дуже обмежену кількість сайтів придатних до повноцінного зв'язування п'ятого крингла [215]. Відповідно, навіть незначні концентрації мініплазміногену можуть виявитися достатньо ефективними у блокуванні можливості активації плазміногену, а відтак і можливості гідролізу згустку.

З огляду на те, що залежність затягування часу напівлізису від концентрації мініплазміногену має лінійний характер, друге пояснення видається вірогіднішим. Навіть у разі конкуренції мініплазміну з плазміном, зростання сумарної концентрації активних центрів ферментів має пришвидшувати повну деградацію згустку, тобто крива залежності часу напівлізису від концентрації мініплазміногену мусила б мати криволінійний характер внаслідок взаємодії двох різнонаправлених сил. На ділі, навіть за десятикратного зростання концентрації мініплазміногену, не зафіксовано його внеску у швидкість гідролізу згустку плазміном. Враховуючи, що мініплазміноген значно повільніше активується тканинним активатором, можна припустити наявність свого роду феномену подвійної конкуренції. З одного боку, мініплазміноген займає потенційні місця зв'язування на фібрині, тим самим уповільнюючи його гідроліз плазміном. З другого боку, плазміноген, якому вдалося зв'язатися з фібрином попри конкуренцію з мініплазміногеном, своєю чергою виграє в останнього конкуренцію за тканинний активатор.

#### **5.4. Дослідження можливості поєднання ефектів гальмування фібринолізу мініплазміногеном і вільними крингловими структурами**

Виявлення значного гальмівного впливу мініплазміногену на фібриноліз зробило необхідним з'ясування можливості поєднання його ефекту з таким вільних кринглових структур. Безперечно, для останніх не зафіксовано значимих ефектів за можливих фізіологічних концентрацій. Проте, якщо взяти до уваги можливий спільний механізм гальмування, тобто блокування сайтів зв'язування молекули плазміногену на фібрині, могло виявитися, що їхня дія має адитивний характер. Дослідження було проведено з використанням неподіленої суміші продуктів еластолізу, яка містила мініплазміноген, К 1-3 та К 4. Саме такою має бути суміш фрагментів молекули плазміногену в зоні запалення з її надзвичайно високою еластазною активністю. Аби запобігти внесенню до згустку еластази суміш по фрагментації піддавали обробці р-NPGB. Надалі для звільнення її від контрикалу та надлишку р-NPGB проводили гель-фільтрацію.

Вплив суміші продуктів еластолізу молекули плазміногену на час гідролізу фібринового згустку можна охарактеризувати як суму ефектів мініплазміногену та кринглових структур. До концентрацій 500-600 нМ відбувається лінійне зтягування часу напівлізису фібринового згустку, абсолютно співмірне з таким в разі використання чистого мініплазміногену. За вищих концентрацій зафіксовано значне зтягування часу напівлізису (Рис. 5.4).

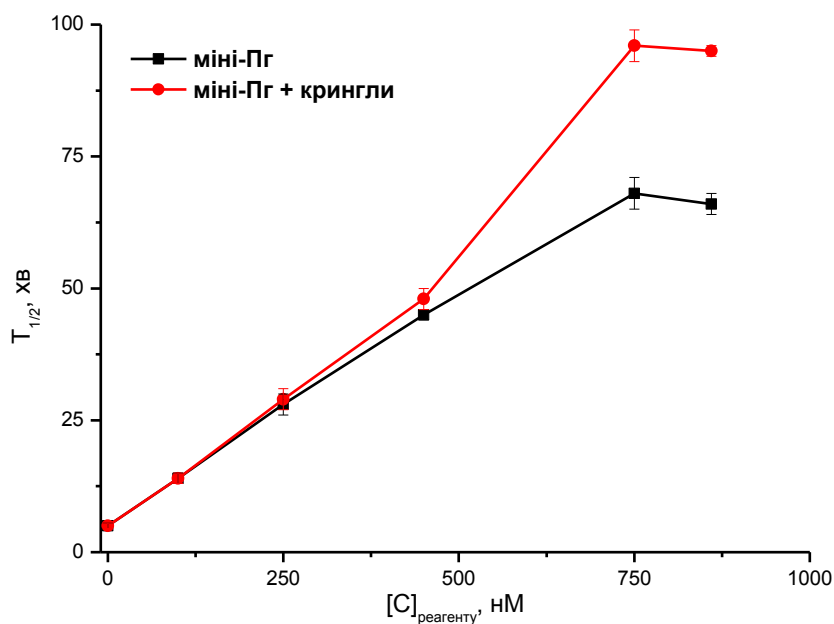


Рис. 5.4. Залежність часу напівлізису фібринового згустку від концентрації міні-Пг та суміші продуктів еластолізу молекули Пг.

Загалом, порівняно з часом напівлізису за присутності аналогічних концентрацій чистого мініплазміногену, швидкість деградації згустку уповільнюється приблизно у 1,5 рази. Так само у 1,5 рази затягується час напівлізису, порівняно з контролем, в разі присутності в інкубаційній суміші аналогічних концентрацій кринглів 1-3 та 4. Сказане стає нагляднішим, якщо побудувати діаграму порівняння гальмівних ефектів вільних кринглових структур відносно контролю та суміші продуктів еластолізу відносно чистого мініплазміногену (Рис.5.5).

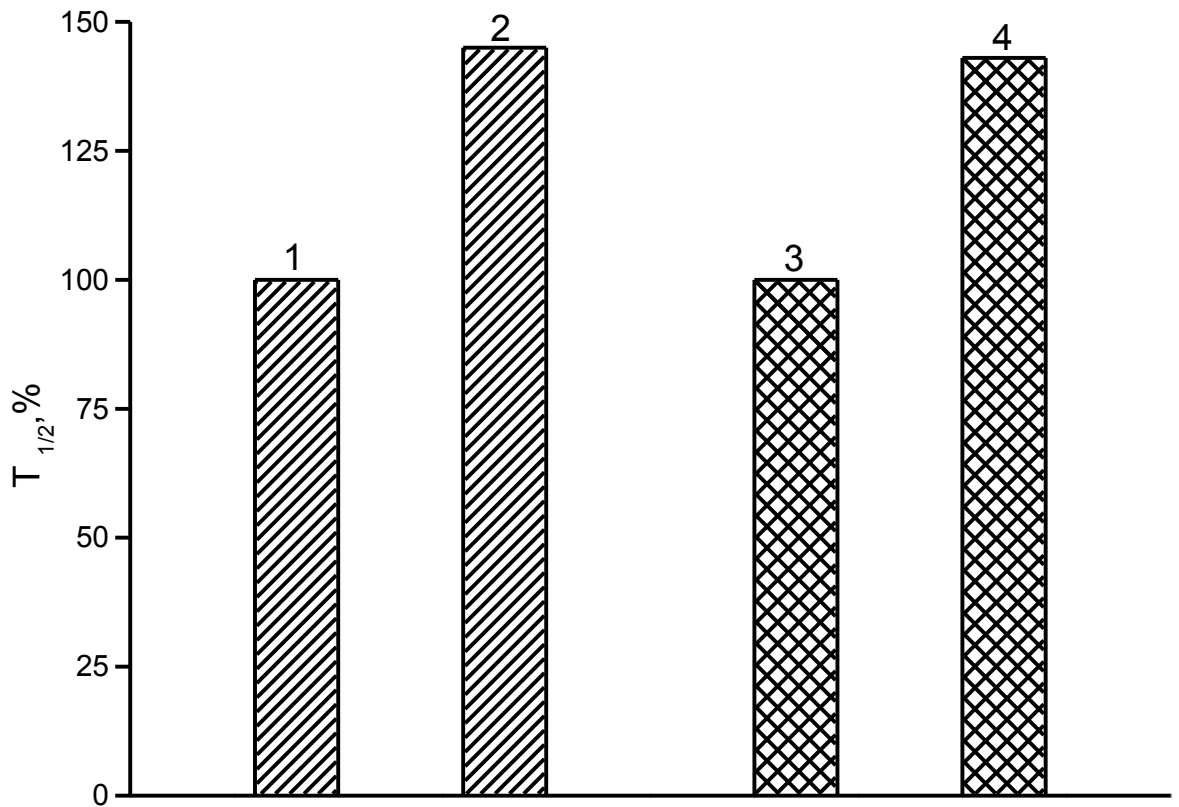


Рис. 5.5. Порівняльна діаграма гальмівного ефекту кринглових структур на фібриноліз відносно контролю (2 відносно 1) і суміші продуктів еластолізу молекули плазміногену відносно мініплазміногену (4 відносно 3)

Отже, інгібуючий вплив продуктів еластолізу молекули плазміногену має характер суми ефектів мініплазміногену та кринглових структур, причому вплив мініплазміногену є початковим, а кринглових структур – завершальним. Одержані дані добре узгоджуються зі згаданим вище фактом лімітуючої ролі п'ятого кринглу молекули плазміногену в процесі початкової взаємодії Глу-плазміногену з фібрином і його подальшої активації тканинним активатором [197]. Натомість швидкість гідролізу фібрину плазміном насамперед детерміновано лізин-зв'язувальними ділянками кринглів 1-3 та 4, тоді як сумарний внесок п'ятого кринглу у швидкість гідролізу становить лише 11-13% [215].

Відповідно, можна зробити висновок, що вирішальною для інгібуючої дії мініплазміногену є взаємодія його п'ятого кринглу з сайтами потенційного зв'язування Глу-плазміногену з фібрином або конкуренція за тканинний активатор. Враховуючи, що саме стадії початкового зв'язування Глу-плазміногену з фібрином та активації плазміногену є лімітуючими у процесі гідролізу згустку, конкуренція з боку п'ятого кринглу мініплазміногену за сайти початкового зв'язування та самого мініплазміногену за тканинний активатор виявляються достатньо суттєвими для процесу в цілому. Тут слід враховувати літературні дані, що потенційних сайтів зв'язування для п'ятого кринглу на нативному фібрині обмаль, або вони взагалі відсутні, експонуючись лише в разі його часткового гідролізу [215].

Натомість сайтів зв'язування для кринглових структур плазміну на фібриновому матриці більше ніж достатньо, що й зумовлює необхідність використання задля досягнення скількись видимого ефекту значно вищих концентрацій кринглових структур, ніж ефективна концентрація мініплазміногену. Проста сумація ефектів мініплазміногену та кринглових структур є додатковим підтвердженням їхньої дії на різних стадіях гідролізу фібрину. Внесок п'ятого кринглу мініплазміногену у сповільнення деградації згустку плазміном є незначним, порівняно з 1-4 кринглами, тож він практично не посилює їхнього ефекту. Стосовно 1-4 кринглів, очевидно, вони неспроможні блокувати взаємодію п'ятого кринглу Глу-плазміногену з молекулою фібрину, а відтак і не справляють жодного впливу на стадію активації плазміногену. Водночас пошук сайтів зв'язування для кринглів 1-4 у процесі гідролізу фібрину плазміном не є лімітуючою стадією, тож блокування таких сайтів вільними крингловими структурами лише незначною мірою обмежує швидкість деградації згустку та не має здатності адитивно посилювати гальмівний ефект мініплазміногену.

### 5.5. З'ясування механізмів гальмівного ефекту мініплазміногену

Як було зазначено вище, природа гальмівного ефекту мініплазміногену може бути обумовлена двома чинниками: наявністю в його структурі К 5, відтак можливістю екранувати сайти початкового зв'язування Глу-плазміногену з фібрином і здатністю конкурувати за тканинний активатор. Аби розмежувати внесок кожного з цих чинників було проведено експерименти з гідролізу згустку Глу-плазміногеном за присутності мініплазміногену в умовах активації активаторами різної природи та заміни мініплазміногену міні плазміном із заінгібованим активним центром.

В разі використання активаторів плазміногену різної природи: тканинного активатора та стрептокінази (табл. 5.1), яка здатна активувати плазміноген у розчині, гальмівного ефекту мініплазміногену не виявлено.

Таблиця 5.1

*Вплив суміші продуктів еластолізу на швидкість гідролізу фібринового згустку плазміном, активованим активаторами різної природи*

Група	Активатор	Концентрація суміші, нМ	Час напівлізису, хв
Контроль n=4	ТАП	0	4,0 ± 0,1
Суміш продуктів еластолізу n=5	ТАП	1090	130,0 ± 5,0
Контроль n=4	Стрептокіназа	0	4,0 ± 0,1
Суміш продуктів еластолізу n=4	Стрептокіназа	760	8,0 ± 0,3

Незначне затягування часу напівлізису в разі активації плазміногену стрептокіназою за присутності суміші продуктів еластолізу можна пояснити вмістом у цій суміші вільних кринглових структур. Принаймні ступінь гальмування є практично тотожним такому з використанням як інгібітора суміші кринглів К 1-3 та К 4. Проте цей результат не можна трактувати як однозначний доказ, що гальмування лізису згустку обумовлено конкуренцією за тканинний активатор. Справа в тім, що стрептокіназа активує плазміноген у розчині, а плазмін по активації набуває Ліз-форми, сайти зв'язування кринглів 1-4 вивільнюються, тож п'ятий крингл перестає відігравати вирішальну роль у початковій взаємодії з фібрином.

Аби уточнити результати, одержані з активаторами різної природи, їх було доповнено порівнянням ступенів гальмівного ефекту нативного мініплазміногену з мініплазміном із заінгібованим активним центром (Рис. 5.6). У складі мініплазміну теж наявний К 5, відповідно, він, подібно до мініплазміногену, здатен блокувати чи принаймні серйозно утруднювати початкову взаємодію Глу-плазміногену з фібрином. Водночас внаслідок зміни конформації після активації він не взаємодіє з тканинним активатором, отже й не конкурує за нього.

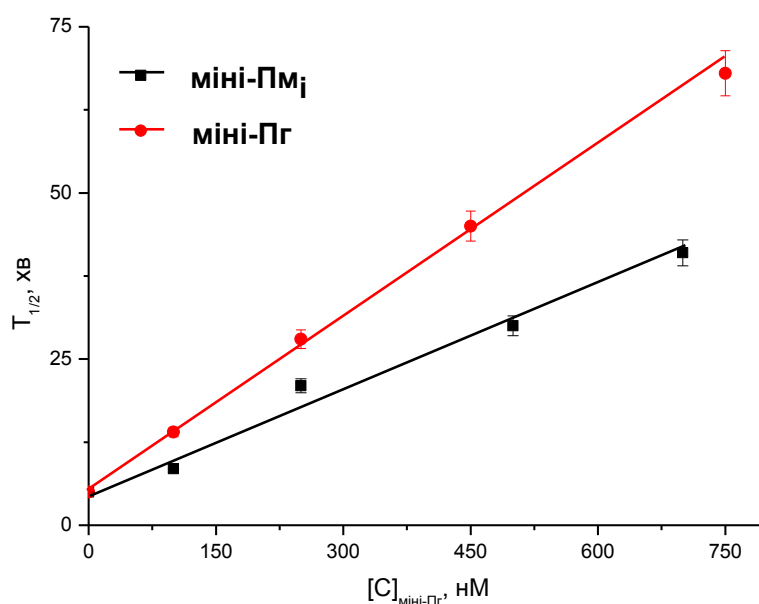


Рис. 5.6. Залежність гальмівного ефекту міні-Пг від наявності активного центру.

Залежність затягування часу напівлізису від концентрації мініплазміну із заінгібованим активним центром мала так само лінійний характер, як і в разі використання мініплазміногену. Також абсолютно подібно до мініплазміногену ефективними виявилися навіть найнижчі концентрації мініплазміну. Проте ступінь гальмівного ефекту був значно нижче, становлячи близько 60% від гальмівного ефекту мініплазміногену. Таким чином можна зробити висновок, що гальмування мініплазміногеном лізису фібринового згустку має двоїсту природу. Близько 60% ефекту мініплазміногену обумовлено наявністю в його структурі К 5 і, відповідно, здатністю екранувати сайти початкової взаємодії Глу-плазміногену з фібрином. Решта припадає на конкуренцію за тканинний активатор.

В умовах стаціонарної системи гальмівний ефект К 5 мініплазміногену не було виявлено внаслідок каскадного переходу молекул ферментів з початкового сайту зв'язування на інші сайти, відповідно, й вивільненням сайту зв'язування для К 5. В умовах реального потоку молекули ферментів не можуть «зайняти чергу» на вивільнення сайту початкового зв'язування, оскільки незв'язані молекули негайно вимиває зі згустку. За таких умов навіть короточасне блокування можливості зв'язування з фібрином стає драматичним для процесу лізису згустку в цілому.

Так само у стаціонарній системі складно чи взагалі неможливо виявити наслідки конкуренції Глу-плазміногену та мініплазміногену за тканинний активатор. Хоча мініплазміноген дещо повільніше активується тканинним активатором, отже й довше взаємодіє з ним, затягуючи процес активації, проте таке затягування є не настільки значним і легко компенсується зростанням кількості активних центрів ферменту в пробі. В умовах реального потоку лізин-зв'язувальні ділянки кринглів 1-4 дають змогу плазміну ефективно зв'язуватися з фібрином і, по деградації однієї фібрили,

відносно легко переходити на іншу. Мініплазмін такої можливості позбавлено, тож його шанси перейти на іншу фібрилу після гідролізу тієї на якій його було активовано набагато менші. Найімовірніше відсутність внеску активних центрів мініплазміну у загальну швидкість гідролізу можна пояснити вимиванням мініплазміну зі згустку одразу по його активації. До того ж, гідролізуючи фібрилу, на якій його було активовано, мініплазмін призводить до виходу в розчин тканинного активатора, змушуючи його тим самим заново зв'язуватися з фібрином. Оскільки цей процес є суто статистичним в умовах протікання рідини крізь згусток частина тканинного активатора, безперечно, також вимивається, чим ще більше пригнічується процес активації плазміногену.

### **Висновки до розділу 5**

- Вільні кринглові структури здатні екранувати місця зв'язування плазміну з фібрином, певною мірою гальмуючи фібриноліз. Проте видимого гальмівного ефекту кринглових структур можна досягти лише з використанням концентрацій, вищих за фізіологічні.
- Мініплазміноген за будь-яких концентрацій є досить ефективним гальмівним чинником у фібринолізі. Залежність ступеню гальмування від концентрації мініплазміногену має лінійний характер.
- Близько 60% гальмівного ефекту мініплазміногену обумовлено наявністю в його складі К 5 і здатності за його рахунок блокувати початкове зв'язування Глу-плазміногену з фібрином. Окрім блокування початкової взаємодії плазміногену з фібрином гальмівний ефект мініплазміногену обумовлено також його здатністю конкурувати за тканинний активатор.

- Гальмування фібринолізу вільними крингловими структурами та мініплазміногеном має різну природу, тож в разі їхнього поєднання ступінь гальмування можна визначити як арифметичну суму ефектів.

Основні наукові результати розділу опубліковані в роботах:

1. Вплив продуктів еластолізу молекули плазміногену на лізис фібринового згустку / К. С. Андріанова, С. В. Верьовка, О. Ю. Сломінський, С. І. Андріанов, А. В. Петік // Лабораторна діагностика. – 2009. – № 4 (50). – С. 3-7.
2. Андріанова К. С. Механізми гальмування фібринолізу в зоні запалення /К. С. Андріанова, О. Ю. Сломінський, С. І. Андріанов, А. В. Петік // Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2010: тези доп. Конференції-конкурсу молодих учених, 27-28 травня 2010 р. - Київ: Прінт Квік, 2010. – С. 2.
3. Андріанова К. С. Механізми збереження фібринових депозитів під час запалення / К. С. Андріанова, О. Ю. Сломінський, С. І. Андріанов, А. В. Петік // Укр. біохім. журн. – 2010. – Т. 82, № 4 (додаток 2). – С. 39.

## Розділ 6

### АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Обов'язковою рисою синдрому запалення є запуск каскаду клітинно-гуморальних реакцій регуляції систем зсідання крові та фібринолізу. Насамперед слід згадати зміну фенотипу ендотелію з тромборезистентного на тромбопластичний [12], експресію тромбопластичного фенотипу імунокомпетентними клітинами [62, 63], індукцію ними посиленого утворення тромбіну та активацію на фібрині тромбоцитів [177, 178]. Усі названі фактори в цілому призводять до інтенсивного утворення фібрину в судинах, дотичних до зони запалення. Отже, можна зробити висновок, що механізми інтенсивного утворення фібрину *in vivo* під час запалення насьогодні є досить повно охарактеризованими. Проте вони не дають відповіді на питання, з яких причин фібринові депозити утримуються в судинах протягом тривалого часу. Адже для зон хронічного запалення чи тромбофлебітів збереження фібринових депозитів обчислюється місяцями [283]. Однією лише активацією системи зсідання крові таку тривалість існування депозитів годі пояснити, тим паче, що в разі нормального функціонування плазміноген/плазмінової системи, інтенсивне утворення фібрину неминуче призводило б до виснаження потенціалу коагуляційної системи та втрати здатності плазми крові до зсідання. Власне таку картину зафіксовано під час застосування інтенсивної тромболітичної терапії [284].

Вплив зміни фенотипу ендотеліальних та імунокомпетентних клітин під впливом медіаторів запалення на плазміноген/плазмінову систему охарактеризовано далеко не так повно, як на коагуляцію. Насьогодні достеменно встановленими фактами є посилення секреції активованими медіаторами запалення ендотеліальними клітинами тПА та ПАІ [15, 72], секреція ними ж, в разі пошкодження судини механічними подразниками,

бактеріальними токсинами чи індукторами ангиогенезу, урокінази [17]. Принагідно можна також згадати показану *in vitro* можливість активації тромбіном у комплексі із тромбомодуліном карбоксипептидази В, відомої як специфічного інгібітору фібринолізу ТАФІ [49]. Названих факторів явно недостатньо для пояснення суттєвого затягування часу лізису згустку, показаного у хворих на рак [162]. Бракує даних для такого пояснення чи з'ясування його механізмів і серед масиву даних, одержаних *in vitro* у статичних системах.

Для окреслення кола можливих чинників регуляції фібринолізу під час запалення насамперед слід максимально чітко окреслити умови формування фібринового депозиту. Індукція синдрому запалення призводить до зміни білкового складу плазми крові внаслідок появи чи зростання концентрацій так званих білків гострої фази [116]. Серед інших до цієї групи належать матриксоутворюючі білки – амілоїди А та В, інгібітори протеїназ і фібриноген.

Безперечно прошивання згустків внаслідок включення до них амілоїдів, які не є специфічними субстратами для плазміну, здатне драматично змінити структуру згустку та суттєво уповільнити його лізис. Проте повідомлень про виявлення амілоїдів у структурі принаймні внутрішньо-судинних депозитів досі не було, тож імовірність регуляції ними тривалості життя депозитів поки що слід розглядати як гіпотетичну.

З іншого боку, зростання концентрації фібриногену в плазмі крові за незмінної концентрації протромбіну може, як відомо досить суттєво вплинути на структуру згустків. Показано, що за такого співвідношення фібриноген/тромбін фібрили, які утворюють згусток є тоншими, з більшою кількістю сайтів галуження [138]. З даних, одержаних у статичних системах, відомо, що такі згустки гідролізуються повільніше [199, 269]. Проте однозначно стверджувати, що зростання концентрації фібриногену вдвічі під час запалення саме таким чином регулює структуру згустків наразі не є

можливим. У зоні запалення масовану активацію протромбіну плазми доповнено внаслідок дегрануляції тромбоцитів [91]. Відповідно, стверджувати, що подвійна концентрація фібриногену є переважаючою над локальною концентрацією тромбіну зарано, принаймні до розробки методів адекватної фіксації локальної концентрації активності ферментів *in vivo*. З іншого боку, якщо локальна концентрація тромбіну є вищою за концентрацію фібриногену, рівновагу в утворенні згустку також буде зміщено у бік формування тонких розгалужених фібрил [155].

Гідролітичну здатність плазміноген/плазмінової системи обумовлено наявністю в її складі серинових протеїназ: плазміну, тПА, урокінази. Отже, зростання під час запалення концентрації в плазмі крові широкого спектру інгібіторів серинових протеїназ теоретично здатне певним чином модулювати активність фібринолізу. Проте під час подібних узагальнень слід враховувати, що зв'язування з фібрином оберігає плазмін від інактивації  $\alpha_2$ -антиплазміном, а тПА – ПАІ [21, 22]. Щодо інших інгібіторів, то для плазміну *in vivo* показано можливість утворення комплексів лише з  $\alpha_2$ -макроглобуліном [194].

Наявністю білків гострої фази у зоні запалення перелік чинників, здатних модулювати швидкість гідролізу депозиту, не обмежено. Фізико-хімічне середовище утворення фібрину під час запалення суттєвим чином змінено внаслідок індукції пероксидного окиснення ліпідів з подальшим вивільненням у плазму гідроксикислот і появою везикул теназних комплексів [32, 91]. Гідроксикислоти мають у своїй структурі дві активні групи, тож здатні атакувати заряджені групи білків, змінюючи тим самим їхні властивості. Зокрема, таку регуляторну здатність гідроксикислот показано стосовно TFPI, зв'язування з С-кінцем якого призводить до інгібування його дії [71]. Як відомо, взаємодія заряджених амінокислотних залишків відіграє визначальну роль у позиціонуванні плазміну відносно фібрину та забезпеченні швидкості гідролізу [191].

Окремою групою виступають комплекси розчинного фібрину та ПДФ. За нормальних умов вони присутні у плазмі крові лише у слідових кількостях, проте інтенсифікація утворення фібрину та паралельного процесу гідролізу спричинює різке зростання їхніх концентрацій [271-273]. Щодо ПДФ у статичних системах для деяких з них було показано прискорення швидкості активації плазміногену тПА в разі їхнього включення у згусток [285]. Щоправда вільний Е-фрагмент у плазмі крові може виступати як інгібітор фібринолізу. Справа в тім, що для нього показано здатність активувати плазміноген до плазміну в разі їхнього зв'язування, проте він не захищає плазмін від інактивації  $\alpha_2$ -антиплазміном [215, 262]. Відповідно, *in vivo* дія Е-фрагменту має призводити до елімінації плазміногену з плазми та зниження його концентрації. Щодо впливу розчинного фібрину, його у статичних системах досліджено не було, оскільки за таких умов він негайно включається до згустку і полімеризується.

Згідно даних, одержаних у статичних системах, різнонаправленим може бути вплив зростання у зоні запалення еластазної активності. Частковий гідроліз фібрину еластазою призводить до зростання кількості експонованих сайтів первинної взаємодії Глу-плазміногену з фібрином, отже має справляти на фібриноліз виражений стимулюючий ефект. З іншого боку, еластаза також гідролізує молекулу плазміногену, призводячи до утворення низки фрагментів [102]. Якщо додавання у статичних системах до згустку мініплазміногену пришвидшувало лізис, то для кринглів показано здатність конкурувати з плазмін(оген)ом за місця зв'язування на фібрині, тобто виступати інгібітором фібринолізу [281].

Підбиваючи підсумок аналізу змін умов середовища утворення згустку під час запалення, можна зробити висновок, що насамперед слід звернути увагу на зростання рівнів ПДФ, розчинного фібрину,  $\alpha_2$ -макроглобуліну;

появу гідроксикислот і фрагментів молекули плазміногену. Саме цей висновок ліг в основу нашої роботи.

Як виявилось, ані  $\alpha_2$ -макроглобулін, ані гідроксикислоти найімовірніше *in vivo* не залучено до регуляції фібринолізу. Порівняно незначний вплив зростання концентрації  $\alpha_2$ -макроглобуліну можна пояснити високою лабільністю молекули інгібітору, внаслідок якої він може втрачати активність в разі фізичного тиску фібрил під час включення до згустку [238]. Окрім того, так само як і в плазмі крові,  $\alpha_2$ -макроглобулін у згустку має витримувати жорстку конкуренцію з боку  $\alpha_2$ -антиплазміну. Більше того, ця конкуренція, можливо, є навіть жорсткішою, ніж у плазмі, оскільки  $\alpha_2$ -антиплазмін специфічно інтегрується до згустку під час прошивання фібрину фактором XIII з розрахунку приблизно 1 молекула інгібітору на 25 молекул фібрин-мономеру [91]. Безперечно, під час взаємодії з фібрилою плазмін захищено від впливу  $\alpha_2$ -антиплазміну, можливість взаємодії з інгібітором є лише під час переходу молекули плазміну з фібрили на фібрилу. Проте надзвичайно висока молекулярна маса  $\alpha_2$ -макроглобуліну робить малоімовірною його здатність до взаємодії з плазміном на фібрині внаслідок стеричних перешкод з боку фібрили у доступі до активного центру ферменту [248]. Відповідно, обидва інгібітори перебувають у рівних умовах можливості атакувати фермент, проте, на відміну від  $\alpha_2$ -макроглобуліну,  $\alpha_2$ -антиплазмін має механізми специфічної інтеграції до згустку та підвищення його локальної концентрації.

Гідроксикислоти є класом органічних сполук з дуже широким спектром біологічної дії. Зокрема, у тварин показано здатність гідроксикислот до активації тромбоцитів, доведено, що вони виступають індуктором атерогенезу, виявлено можливість інактивації певних білків, наприклад TFPI [32, 71, 72]. Оскільки вони здатні атакувати вільні аміногрупи, амідуючи їх, їхня можлива участь у регуляції мала досить привабливий вигляд, з огляду на роль, яку відіграють аміногрупи залишків лізину та аргініну фібрину у

просторовій орієнтації молекули плазміногену стосовно фібрил [101]. Дійсно, *in vitro* у статичній системі гідроксикислоти продемонстрували неабияку здатність змінювати структуру згустку та певну тенденцію модулювання швидкості його гідролізу. Однак згусток, утворений за присутності гідроксикислот, мав розсипчасту міцелярну форму, якої досі не було зафіксовано *in vivo*. Міцели настільки слабо взаємодіяли між собою, що вивчити можливість гідроксикислот впливати на взаємодію плазміногену з фібрином у динамічній системі не стало можливим. Отже, можна зробити висновок, що утворені внаслідок індукованого запалення пероксидного окиснення ліпідів гідроксикислоти якщо й атакують фібрин-мономер, то змінюють його властивості настільки, що він втрачає здатність до нормальної асоціації у протофібрилу та вимивається з області утворення згустку. Щодо можливої модифікації гідроксикислотами молекул фібрину, експонованих на поверхні згустку та блокування можливості взаємодії з ним молекул плазміногену, які надходять з плазми, можна згадати співвідношення внесків у швидкість гідролізу плазміну, активованого з інкорпорованого під час утворення згустку та вільного плазміногену проточного буферу (рис. 3.6).

Натомість продукти еластолізу молекули плазміногену, насамперед мініплазміноген, у динамічній системі виявили неабияку здатність до модулювання швидкості гідролізу згустку. Вельми показовими у цих результатах стали розбіжності між даними, одержаними у статичній та динамічній системах. Мініплазміноген, додавання якого у статичній системі прискорювало гідроліз згустку внаслідок збільшення кількості активних центрів ферменту в пробі, у динамічній системі виступив як потужний інгібітор лізису. Таку розбіжність можна легко пояснити вимиванням плазміногену, який не встиг зв'язатися з фібрином, потоком буферу зі згустку в динамічній системі, чого немає у статичній. Відтак, мініплазміноген конкуруючи за сайти початкового зв'язування з

плазміногеном призводить до вимивання останнього зі згустку. Окрім того, мініплазміноген конкурує за тПА, знижуючи тим самим швидкість активації плазміногену (рис. 5.6). Водночас мініплазмін гідролізує фібрин на порядок повільніше за плазмін [214]. Конкуренція за тПА може бути ще драматичнішою, якщо взяти до уваги можливість вимивання активатора зі згустку після гідролізу мініплазміном фібрили, на якій він був зв'язаний.

Згідно теорії активаційного каскаду Т. В. Гриненко, Глу-плазміноген початково взаємодіє з фібрином аргініл-зв'язувальними ділянками К 5 [215]. Зміна конформації, спричинена такою взаємодією, призводить до експонування лізин-зв'язувальних ділянок К 4 та переходу молекули плазміногену з сайту початкової взаємодії на сайт взаємодії четвертого кринглу з вивільненням початкового – для зв'язування наступної молекули. Внаслідок подальшого розгортання Глу-плазміноген набуває Ліз-подібної конформації з експонуванням лізин-зв'язувальних ділянок, розташованих на К 1-3. Це дає йому змогу остаточно закріпитися на фібрині та просторово позиціонуватися таким чином, щоб сформувати активаторний комплекс з тПА. Згідно даних Гриненко сайтів початкової взаємодії на нативному фібрині майже зовсім немає, вони експонуються після часткового гідролізу, тож рівень їхньої експонованості обумовлено ступенем гідролізу згустку. Натомість сайтів зв'язування для К 4 та особливо К 1-3 на кожній молекулі фібрин-мономеру достатньо, щоб забезпечити плазміну стабільне просування фібрилою. Отже, ступінь лімітування швидкості гідролізу сайтами зв'язування знижується за лінією  $K 5 > K 4 > K 1-3$ . Звідси й пояснення меншої здатності суміші К 1-3 та К 4 уповільнювати деградацію згустку, порівняно з мініплазміногеном.

Цікавим фактом є те, що, не зважаючи на доведеність Т. В. Гриненко необхідності проміжної взаємодії К 4 для остаточного набування Глу-плазміногеном Ліз-подібної конформації, ізольований К 4, на відміну від очищеного К 5, згідно її ж даних, не виявляв здатності гальмувати

фібриноліз [215]. Подібні дані одержано під час дослідження впливу на швидкість утворення плазміну та гідролізу ним фібрину антитіл до К 1 і К 4 [198]. Антитіла до К 4 виявили вельми низьку здатність інгібувати взаємодію плазмін(оген)у з фібрином, тоді як антитіла до К 1 зводили гідроліз до нуля. Нами також не зафіксовано впливу ізольованого К 4 у динамічній системі. Можливо, конформація К 4 після його ізоляції з нативної молекули змінюється таким чином, що він втрачає здатність до взаємодії з фібрином або афінність його зв'язування знижується достатньо для програшу конкуренції з нативною молекулою. Іншим можливим поясненням є необхідність для взаємодії К 4 зі своїм сайтом певної підтримки від інших кринглів.

Як було згадано вище, блокування антитілами К 1 на молекулі плазмін(оген)у призводило до повного блокування гідролізу згустку. Водночас використання для екранування сайтів зв'язування ізольованих К 1-3 у динамічній системі не дало жодного результату. Пояснити таку розбіжність можна легко, якщо взяти до уваги, що перший крингл, який екранують антитіла, у молекулі плазміногену один, тоді як сайтів зв'язування для нього на полімерному фібрині – безліч. Цікавим є те, що використання суміші К 1-3 та К 4 дало видимий ефект. Безперечно, концентрація суміші кринглів для досягнення ефекту мусить бути високою, проте далеко нижчою ніж для окремо взятих ізольованих кринглів. Подібні дані одержано у статичних системах [281]. Такий ефект дає змогу припустити, що друге пояснення відсутності ефектів ізольованого К 4 є дещо імовірнішим.

Поєднання впливу мініплазміногену та суміші кринглів К 1-3 та К 4 давало арифметичну суму ефектів. Згідно теорії активаційного каскаду Т. В. Гриненко, К 1-3, К 4, К 5 і здатність формувати активаторний комплекс з тПА відіграють провідну роль на різних стадіях активації плазміногену та лізису плазміном фібрину, що обумовлює абсолютно різні механізми впливу названих чинників і різні сайти взаємодії з молекулою фібрину. Саме цим,

очевидно, слід пояснювати відсутність взаємодії між їхніми ефектами з одержанням суми ефектів у тих випадках, коли фіксацію результату проводити за оцінкою процесу вцілому.

Отже, за фізіологічних рівнів концентрацій продуктів еластолізу молекули плазміногену окремо взяті кринглові структури не справляють якогось серйозного впливу на швидкість гідролізу згустку. Натомість мініплазміноген досить активно блокує початкову взаємодію Глу-плазміногену з фібрином і формування активаторного комплексу з тПА, гальмуючи тим самим активацію плазміногену. Хоча *in vitro* нами зафіксовано сумачію ефектів К 1-3 та К 4 з мініплазміногеном, за нормальних умов *in vivo* така ситуація є малоімовірною. Адже навіть за високої локальної активності еластолізу у зоні запалення накопичення фрагментів деградованого плазміногену обмежено рівнем проферменту в плазмі крові, що робить концентрації кринглових структур недостатніми для реалізації впливу на фібриноліз. Проте під час проведення антитромботичної терапії показано потроєння концентрації кринглових структур у периферійній крові [280], що робить можливою сумачію ефектів блокування активації плазміногену мініплазміногеном та взаємодії активованого плазміну з фібрином крингловими структурами. Відповідно, результати антитромботичної терапії на тлі гострого запального процесу є досить сумнівними, оскільки застосування тромболітиків спричинює наростання концентрації вільних кринглових структур [280] і створює передумови реалізації їхнього гальмівного ефекту та його сумачіі з таким мініплазміногеном.

## ВИСНОВКИ

1. Показано, що за умов динамічного потоку деградація фібрину в першу чергу визначається плазмін(оген)ом, включеним до згустку за його формування, а вплив плазмін(оген)у проточного буферу є несуттєвим.
2. З'ясовано, що зростання рівня  $\alpha_2$ -макроглобуліну не справляє значного впливу на процес фібринолізу, тобто він не є основною причиною затягування лізису згустку та утворення фібринових депозитів.
3. Виявлено, що гідроксикислоти в діапазоні концентрацій 50-100 мкг/мл істотно змінюють структуру згустку та впливають на швидкість його утворення та лізису.
4. Доведено, що зростання рівня продуктів деградації фібрину в проточному буфері не впливає на час напівлізису та швидкість гідролізу згустку.
5. Показано, що за умов динамічного потоку вільні кринглові структури за концентрацій, вищих за 500 нМ, здатні екранувати місця зв'язування плазміну з фібрином, гальмуючи фібриноліз, тоді як мініплазміноген ефективно гальмує фібриноліз навіть за концентрацій на порядок менших.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Blasts from the past / P. A. Insel, S. Kornfeld, P. W. Majerus [et al.] // *J Clin Invest.* – 2004. – 114 (8). – P. 1017–1033.
2. Letai A. Cancer, coagulation, and anticoagulation / A. Letai, D. J. Kuter // *Oncologist* – 1999. – 4 (6). – P. 443-449.
3. Donati M. B. Cancer and thrombosis / M. B. Donati // *Haemostasis.* – 1994. – 24. – P. 128-131.
4. Sode B. F. Venous thromboembolism and risk of idiopathic interstitial pneumonia: a nationwide study / B. F. Sode, M. Dahl, S. F. Nielsen, B. G. Nordestgaard // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2010. – 181 (10). – P. 1085-1092.
5. Голота В. Я. Рання діагностика і профілактика тромботичних ускладнень після операції кесарева розтину / В. Я. Голота, М. Ш. Гамісонія, Т. М. Платонова, Є. М. Макогоненко // *Педіатрія, акушерство та гінекологія.* – 2000. – 3. – С. 104-107.
6. Broze G. J. Tissue factor pathway inhibitor / G. J. Broze // *Thromb. Haemost.* – 1995. – Vol. 74. – P. 90-93.
7. Berger G. Coagulation and anticoagulation in pulmonary arterial hypertension / G. Berger, Z. S. Azzam, R. Hoffman, M. Yigla // *Isr. Med. Assoc. J.* – 2009. – Vol. 6. – P. 376-379.
8. Weiler H. Regulation of inflammation by the protein C system / H. Weiler // *Crit. Care Med.* – 2010. – Vol. 38, № 2. – P. 18-25.
9. Dittman W.A. Structure and function of thrombomodulin: a natural anticoagulant / W.A. Dittman, P.W. Majerus // *Blood.* – 1990. – Vol. 75, № 2. – P. 329-336.

10. Relocating the active site of activated protein C eliminates the need for its protein S cofactor. A fluorescence resonance energy transfer study / S. Yegneswaran, M.D. Smirnov, O. Safa [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1999. – Vol. 274, № 9. – P.5462-5468.
11. Amino acids 225-235\*\* of the protein C serine-protease domain are important for the interaction with the thrombin-thrombomodulin complex / Vincenot A., Gaussem P., Pittet J.L. [et al.] // *FEBS Lett.* – 1995. – Vol. 367, № 2. – P. 153-157.
12. Schouten M. Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis / M. Schouten, W. J. Wiersinga, M. Levi, T. Poll // *J. Leukoc. Biol.* – 2008. – Vol. 83. – P. 536–545.
13. Reversible regulation of tissue factor-induced coagulation by glycosyl phosphatidylinositol-anchored tissue factor pathway inhibitor / I. Ott, Y. Miyagi, K. Miyazaki [et al.] // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2000. – Vol. 20. – P. 874–882.
14. Iversen N. Elevated plasma levels of the factor Xa-TFPI complex in cancer patients / N. Iversen, A. K. Lindahl, U. Abildgaard // *Thromb. Res.* – 2002. – Vol. 105. – P. 33–36.
15. Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice / [R. W. Colman, V. J. Marder, A. W Clowes et al.]. – [fifth ed.]. – Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005. – 1822 p.
16. Sharma M. C. The role of annexin II in angiogenesis and tumor progression: a potential therapeutic target / M. C. Sharma, M. Sharma // *Curr. Pharm. Des.* – 2007. – Vol. 13, № 35. – P. 3568-75.
17. Bacharach E. In vivo patterns of expression of urokinase and its inhibitor PAI-1 suggest a concerted role in regulating physiologic angiogenesis / E. Bacharach,

- A. Itin, E. Keshet // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1992. – Vol. 89. – P. 10686-10690.
18. Tkachuk V. A. Regulation of arterial remodeling and angiogenesis by urokinase-type plasminogen activator / V. A. Tkachuk, O. S. Plekhanova, Y. V. Parfyonova // Can. J. Physiol. Pharmacol. – 2009. – Vol. 87, № 4. – P. 231-251.
19. Modulation of cellular migration and survival by c-Myc through the downregulation of urokinase (uPA) and uPA receptor / D. Alfano, G. Votta, A. Schulze [et al] // Molecular and Cellular Biology. – 2010. – Vol. 30, № 7. – P. 1838-1851.
20. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders / D. B. Cines, E. S. Pollak, C. A. Buck [et al.] // Blood. – 1998. – Vol. 91, № 10 – P. 3527-3561.
21. Interaction of single chain urokinase type plasminogen activator with human endothelial cells / E.S. Barnathan, A. Kuo, L. Rosenfeld [et al.] // J. Biol. Chem. – 1990. – Vol. 265. – P. 2865-2872.
22. Лайнен Г. Р. Матриксные металлопротеиназы и фибринолитическая активность клеток / Г.Р. Лайнен // Биохимия. – 2002. – Т. 67, № 1. – С. 107-115.
23. Podrez E. A. Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis / E. A. Podrez, H. M. Abu-Soud, S. L. Hazen // Free Radic. Biol. Med. – 2000. – Vol. 28 – P. 1717–1725.
24. Uchida K. Stimulatory effect of histamine on the peroxidation of linoleic acid / K. Uchida, K. Haraguchi, M. Mitsui, S. Kawakishi // J. Agric. Food Chem. – 1990. – Vol. 38, № 7. – P. 1491–1493.
25. Chisolm G. M. The oxidation of lipoproteins by monocytes-macrophages: biochemical and biological mechanisms / G. M. Chisolm, S. L. Hazen, P. L. Fox, M. K. Cathcart // J. Biol. Chem. – 1999. – Vol. 274. – P. 25959-25962.
26. Funk, C. D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology / C.D. Funk // Science. – 2001. – Vol. 294. – P. 1871-1875.

27. Sphingosine-1-phosphate enhances IL-1 $\beta$ -induced COX-2 expression in mouse intestinal subepithelial myofibroblasts / T. Ohama, M. Okada, T. Murata [et al.] // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2008. – Vol. 295. – P. 766-775.
28. Arachidonic acid metabolism / P. Needleman, J Turk, B. A. Jakschik [et al.] // *Annu. Rev. Biochem.* – 1986. – Vol. 55. – P. 69–102
29. Lewis R. A. Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway. Biochemistry and relation to pathobiology in human diseases / R. A. Lewis, K. F. Austen, R. J. Soberman // *N. Engl. J. Med.* – 1990. – Vol. 323, № 10. – P. 645–655
30. Cathcart M. K. Lipoxygenases and atherosclerosis: Protection versus pathogenesis / M. K. Cathcart, V. A. Folcik // *Free Radical Biology and Medicine.* – 2000. – Vol. 28, № 12. – P. 1726-1734.
31. Myeloperoxidase functions as a major enzymatic catalyst for initiation of lipid peroxidation at sites of inflammation / R. Zhang, M.-L. Brennan, Z. Shen [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277. – P. 46116-46122 .
32. Bochkov V. N. Inflammatory profile of oxidized phospholipids / V. N. Bochkov // *Thromb. Haemost.* – 2007. – Vol. 97. – P. 348–354.
33. Proton-sensing and lysolipid-sensitive G-protein-coupled receptors: a novel type of multi-functional receptors / H. Tomura, C. Mogi, K. Sato [et al.] // *Cell Signal.* – 2005. – Vol. 17. – P. 1466–1476.
34. Anliker B. Cell surface receptors in lysophospholipid signaling / B. Anliker, J. Chun // *Semin. Cell Dev. Biol.* – 2004. – Vol. 15. – P. 457–465.
35. Identification of prostaglandin E2 receptor subtype 2 as a receptor activated by OxPAPC / R. Li, K. P. Moullesseaux, D. Montoya [et al.] // *Circ. Res.* – 2006. – Vol. 98. – P. 642–650.
36. Oxidized alkyl phospholipids are specific, high affinity peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands and agonists / S. S. Davies, A. V. Pontsler, G. K. Marathe [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276. – P. 16015–16023.

37. Biomarkers of vascular disease linking inflammation to endothelial activation: Part II / P. E. Szmitko, C.-H. Wang, R. D Weisel [et al.] // *Circulation*. – 2003. – Vol. 108. – P. 2041-2048.
38. Epoxyisoprostane and epoxycyclopentenone phospholipids regulate monocyte chemotactic protein-1 and interleukin-8 synthesis. Formation of these oxidized phospholipids in response to interleukin-1beta / G. Subbanagounder, J. W. Wong, H. Lee [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277. – P. 7271–7281.
39. Oxidized phospholipids trigger atherogenic inflammation in murine arteries / A. Furnkranz, A. Schober, V. N. Bochkov [et al.] // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2005. – Vol. 25. – P. 633–638.
40. Role for peroxisome proliferator-activated receptor alpha in oxidized phospholipid-induced synthesis of monocyte chemotactic protein-1 and interleukin-8 by endothelial cells / H. Lee, W. Shi, P. Tontonoz [et al.] // *Circ. Res.* – 2000. – Vol. 87. – P. 516–521.
41. Hydroxy alkenal phospholipids regulate inflammatory functions of endothelial cells // G. Subbanagounder, Y. Deng, C. Borromeo [et al.] // *Vascul. Pharmacol.* – 2002. – Vol. 38. – P. 201–209.
42. Identification of genes induced by oxidized phospholipids in human aortic endothelial cells / S.T. Reddy, V. Grijalva, C. Ng [et al.] // *Vascul. Pharmacol.* – 2002. – Vol. 38. – P. 211–218.
43. Analysis of inflammatory gene induction by oxidized phospholipids in vivo by quantitative real-time RT-PCR in comparison with effects of LPS / A. Kadl, J. Huber, F. Gruber [et al.] // *Vascul. Pharmacol.* – 2002. – Vol. 38. – P. 219–27.
44. The unfolded protein response is an important regulator of inflammatory genes in endothelial cells / P. S. Gargalovic, N. M. Gharavi, M. J. Clark [et al.] // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2006. – Vol. 26. – P. 2490–2496.
45. The mononuclear phagocyte system and its cytokine inflammatory networks in schizophrenia and bipolar disorder / R. C. Drexhage, E. M. Knijff, R. C. Padmos [et al.] // *Expert Rev. Neurother.* – 2010. – Vol. 10, № 1. – P. 59-76.

46. Kimura S. Acute inflammatory reactions caused by histamine via monocytes/macrophages chronically participate in the initiation and progression of atherosclerosis / S. Kimura, K.-Y. Wang, A. Tanimoto // *Pathology International*. – 2004. – Vol. 54, № 7. – P. 465-474.
47. Conway E. M. Tumor necrosis factor suppresses transcription of the thrombomodulin gene in endothelial cells / E. M. Conway, R. D. Rosenberg // *Mol. Cell. Biol.* – 1988. – Vol. 8. – P. 5588–5592.
48. Takano S. Plasma thrombomodulin in health and diseases / S. Takano, S. Kimura, S. Ohdama, N. Aoki // *Blood*. – 1990. – Vol. 76. – P. 2024–2029.
49. Bajzar L. TAFI, or plasma procarboxypeptidase B, couples the coagulation and fibrinolytic cascades through the thrombin-thrombomodulin complex / L. Bajzar, J. Morser, M. Nesheim // *J. Biol. Chem.* – 1996. – Vol. 271. – P. 16603-16608.
50. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI): a molecular link between coagulation and fibrinolysis / P. Miljić, E. Heylen, J. Willemse [et al.] // *Srp. Arh. Celok. Lek.* – 2010. – Vol. 138, № 1. – P. 74-78.
51. Elimination of interleukin 6 attenuates coagulation activation in experimental endotoxemia in chimpanzees / T. Poll, M. Levi, C. E. Hack [et al.] // *J. Exp. Med.* – 1994. – Vol. 179. – P. 1253–1259.
52. Levi M. The cytokine-mediated imbalance between coagulant and anticoagulant mechanisms in sepsis and endotoxaemia / M. Levi, T. Poll, H. Cate, S. J. Deventer // *Eur. J. Clin. Invest.* – 1997. – Vol. 27. – P. 3–9.
53. Ruf W. Allosteric regulation of the cofactor-dependent serine protease coagulation factor VIIa / W. Ruf, C. D. Dickinson // *Biochemistry*. – 1999. – Vol. 38. – P. 1957–1966.
54. Baugh R. J. Exosite interactions determine the affinity of factor X for the extrinsic Xase complex / R. J. Baugh, C. D. Dickinson, W. Ruf, S. Krishnaswamy // *J. Biol. Chem.* – 2000 – Vol. 275, № 37. – P. 28826-28833.

55. Riewald M. Mechanistic coupling of protease signaling and initiation of coagulation by tissue factor / M. Riewald, W. Ruf // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* – 2001. – Vol. 98, № 14. – P. 7742–7747.
56. Rapaport S. I. The tissue factor pathway: How it has become a “Prima Ballerina” / S. I. Rapaport, V. M. Rao // *Thromb. Haemost.* – 1995. – Vol. 74. – P. 7-17.
57. Camerer E. Cell biology of tissue factor, the principal initiator of blood coagulation / E. Camerer, A. B., Kolsto, H. Prydz // *Thromb. Res.* – 1996. – Vol. 81. – P. 1–41.
58. Tissue factor-dependent coagulation is preferentially up-regulated within arterial branching areas in a baboon model of *Escherichia coli* sepsis / C. Lupu, A. D. Westmuckett, G. Peer [et al.] // *Am. J. Pathol.* – 2005. – Vol. 167. – P. 1161–1172.
59. Lipopolysaccharide induction of tissue factor expression in rabbits // J. Erlich, C. Fearn, J. Mathison [et al.] // *Infect. Immun.* – 1999. – Vol. 67. – P. 2540–2546.
60. Osterud B. Induction of tissue factor expression in whole blood – lack of evidence for the presence of tissue factor expression on granulocytes / B. Osterud, L. V. Rao, J.O. Olsen // *Thromb. Haemost.* – 2000. – Vol. 83. – P. 861–867.
61. Osterud B Sources of tissue factor / B. Osterud, E. Bjorklid // *Semin. Thromb. Hemost.* – 2006. – Vol. 32. – P. 11–23.
62. Shantsila E. The role of monocytes in thrombotic disorders. Insights from tissue factor, monocyte-platelet aggregates and novel mechanisms / E. Shantsila, G. Y. Lip // *Thromb. Haemost.* – 2009. – Vol. 102, № 5. – P. 916-924.
63. Osterud B. Tissue factor expression in blood cells / B. Osterud // *Thromb. Res.* – 2010. – Vol. 125, № 1. – P. 31-34.

64. Reinhardt C. New locations of intravascular tissue factor – Indications / C. Reinhardt // *Hämostaseologie* – 2007. – Vol. 27, № 1. – P. 55-58.
65. Shebuski R. J. Role of inflammatory mediators in thrombogenesis / R. J. Shebuski, K. S. Kilgore // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2002. – Vol. 300. – P. 729–735.
66. Conde I. Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation / I. Conde, C. N. Shrimpton, P. Thiagarajan, J. A. Lopez // *Blood.* – 2005. – Vol. 106. – P. 1604–1611.
67. Sugama Y. Thrombin-induced expression of endothelial P-selectin and intercellular-adhesion molecule-1: a mechanism for stabilizing neutrophil adhesion / Y. Sugama, C. Tirupathi, K. Janakidevi [et al.] // *J. Cell Biol.* – 1992. – Vol. 119. – P. 935–944.
68. Procoagulant soluble tissue factor is released from endothelial cells in response to inflammatory cytokines / B. Szotowski, S. Antoniak, W. Poller [et al.] // *Circ. Res.* – 2005. – Vol. 96. – P. 1233–1239.
69. Oxidized phospholipids stimulate tissue factor expression in human endothelial cells via activation of ERK/EGR-1 and Ca(++)/NFAT / V. N. Bochkov, D. Mechtcheriakova, M. Lucerna [et al.] // *Blood.* – 2002. – Vol. 99. – P. 199–206.
70. Oxidized phospholipids in oxidized low-density lipoprotein down-regulate thrombomodulin transcription in vascular endothelial cells through a decrease in the binding of RARbeta-RXRalpha heterodimers and Sp1 and Sp3 to their binding sequences in the TM promoter / H. Ishii, T. Tezuka, H. Ishikawa [et al.] // *Blood.* – 2003. – Vol. 101. – P. 4765–4774.
71. Oxidized phospholipids in oxidized low-density lipoprotein reduce the activity of tissue factor pathway inhibitor through association with its carboxy-terminal region / N. Ohkura, S. Hiraishi, H. Itabe [et al.] // *Antioxid Redox Signal.* – 2004. – Vol. 6. – P. 705–712.

72. Göpfert M. S. Structural identification of oxidized acyl-phosphatidylcholines that induce platelet activation / M. S. Göpfert, F. Siedler, W. Siess, A. Sellmayer // *J. Vasc. Res.* – 2005. – Vol. 42. – P. 120-132.
73. Antiproliferative agents alter vascular plasminogen activator inhibitor-1 expression: a potential prothrombotic mechanism of drug-eluting stents / J. A. Muldowney, J. R. Stringham, S. E. Levy [et al.] // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2007. – Vol. 27, № 2. – P. 400-406.
74. Ye P. The increase in plasminogen activator inhibitor type-1 expression by stimulation of activators for peroxisome proliferator-activated receptors in human endothelial cells / P. Ye, X. Hu, Y. Zhao // *Chin. Med. Sci. J.* – 2002. – Vol. 17, № 2. – P. 112-116.
75. Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation / R. J. Berckmans, R. Nieuwland, A. N. Boing [et al.] // *Thromb. Haemost.* – 2001. – Vol. 85. – P. 639–646.
76. Elevation of endothelial microparticles, platelets, and leukocyte activation in patients with venous thromboembolism / J. A. Chirinos, G. A. Heresi, H. Velasquez [et al.] // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2005. – Vol. 45, № 9. – P. 1467-1471.
77. Ahn Y. S. Cell-derived microparticles: A mediator of inflammation in aortic valve stenosis? / Y. S. Ahn, W. Jy, L. L. Horstman, J. J. Jimenez // *Thromb. Haemost.* – 2008. – Vol. 99. – P. 657–658.
78. Cell-derived microparticles and exosomes in neuroinflammatory disorders / L. L. Horstman, W. Jy, A. Minagar [et al.] // *Int. Rev. Neurobiol.* – 2007. – Vol. 79. – P. 227-68.
79. Microparticles during sepsis and trauma. A link between inflammation and thrombotic processes / N. Morel, O. Morel, X. [et al.] // *Ann. Fr. Anesth. Reanim.* – 2006. – Vol. 25, № 9. – P. 955-966.

80. In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant / V. Combes, A. C. Simon, G. E. Grau [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 1999. – Vol. 104. – P. 93–102.
81. Horstman L. L. Endothelial microparticles as markers of endothelial dysfunction / L. L. Horstman, W. Jy, J. J. Jimenez, Y. S. Ahn // *Front. Biosci.* – 2004. – Vol. 9. – P. 1118–1135.
82. Endothelial microparticles induce formation of platelet aggregates via a von Willebrand factor/ristocetin dependent pathway, rendering them resistant to dissociation / W. Jy, J. J. Jimenez, L. M. Mauro [et al.] // *J. Thromb. Haemost.* – 2005. – Vol. 3. – P. 1301–1308.
83. Bombeli T. Apoptotic vascular endothelial cells become procoagulant / T. Bombeli, A. Karsan, J. F. Tait, J. M. Harlan // *Blood.* – 1997. – Vol. 89. – P. 2429–2442.
84. Coughlin S. R. Thrombin signaling and protease-activated receptors / S. R. Coughlin // *Nature* – 2000. – Vol. 407. – P. 258–264.
85. Ossovskaya V. S. Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease / V. S. Ossovskaya, N. W. Bunnett, // *Physiol. Rev.* – 2004. – Vol. 84. – P. 579–621.
86. Bunnett N. W. Protease-activated receptors: how proteases signal to cells to cause inflammation and pain / N. W. Bunnett // *Semin. Thromb. Hemost.* – 2006. – Vol. 32, № 1. – P. 39–48.
87. Endothelial cell thrombin receptors and PAR-2. Two protease-activated receptors located in a single cellular environment / M. Molino, M. J. Woolkalis, J. J. Reavey-Cantwell [et al.] // *J Biol Chem.* – 1997. – Vol. 272, № 17. – P. 11133–11141.

88. Hirano K. Role of protease-activated receptors in the vascular system / K. Hirano, H Kanaide // *J. Atheroscler. Thromb.* – 2003. – Vol. 10, № 4. – P. 211-225.
89. PAR-1 activation on human late endothelial progenitor cells enhances angiogenesis in vitro with upregulation of the SDF-1/CXCR4 system / D. M. Smadja, I. Bièche, G. Uzan [et al.] // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* – 2005. – Vol. 25. – P. 2321-2327.
90. Licari L.G. Thrombin physiology and pathophysiology / L. G. Licari, J. P. Kovacic // *J. Vet. Emerg. Crit. Care (San Antonio).* – 2009. – Vol. 19, № 1. – P. 11-22.
91. Зубаиров Д. М. Молекулярные основы свертывания крови и тромбообразования / Д. М. Зубаиров – Казань: ФЭН, 2000. – 367 с.
92. Garcia P. S. The role of thrombin and protease-activated receptors in pain Mechanisms / P. S. Garcia, A. Gulati, J. H. Levy // *Thromb. Haemost.* – 2010. – Vol. 103. – P. 1145–1151.
93. Levi M. The coagulant response in sepsis and inflammation / M. Levi // *Hämostaseologie.* – 2010. – Vol. 30. – P. 10–16.
94. Flick M. J. Fibrin(ogen)-alpha M beta 2 interactions regulate leukocyte function and innate immunity in vivo / M. J. Flick, X. Du, J. L. Degen // *Exp. Biol. Med.* (Maywood). – 2004. – Vol. 229, № 11. – P. 1105-1110.
95. Leukocyte integrin Mac-1 recruits toll/interleukin-1 receptor superfamily signaling intermediates to modulate NF- $\kappa$ B activity / C. Shi, X. Zhang, Z. Chen [et al.] // *Circ. Res.* – 2001 – Vol. 89. – P. 859–865.
96. Soluble fibrinogen modulates neutrophil functionality through the activation of an extracellular signal-regulated kinase-dependent pathway / C. Rubel, G. C. Fernández, F. A. Rosa [et al.] // *J. Immunol.* – 2002 – Vol. 168 – P. 3527–3535.

97. Mayadas T. N. Neutrophil beta2 integrins: moderators of life or death decisions / T. N. Mayadas, X Cullere // Trends Immunol. – 2005. – Vol. 26, № 7. – P. 388-395.
98. Korkmaz B. Neutrophil elastase, proteinase 3 and cathepsin G: physicochemical properties, activity and physiopathological functions / B. Korkmaz, T. Moreau, F. Gauthier // Biochimie. – 2008. – Vol. 90. – P. 227-242.
99. Komorowicz E. Flow rate-modulated dissolution of fibrin with clot-embedded and circulating proteases / E. Komorowicz, K. Kolev, I. Léránt, R. Machovich // Circ. Res. – 1998. – Vol. 82, № 10. – P. 1102-1108.
100. Swaisgood C. M. In vivo regulation of plasminogen function by plasma carboxypeptidase B / C. M. Swaisgood, D. Schmitt, D. Eaton, E. F. Plow // J. Clin. Invest. – 2002. – Vol. 110, № 9. – P. 1275–1282.
101. Waisman D. M. Plasminogen: Structure, Activation and Regulation / D. M. Waisman – New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003. – 318 p.
102. Duboscq C. Impaired clot lysis by rt-PA catalyzed mini-plasminogen activation / C. Duboscq, V. Genoud, M. F. Parborell, L. C. Kordich // Thromb. Res. – 1997. – Vol. 86, № 6. – P. 505-513.
103. Soff G. A. Angiostatin and angiostatin-related proteins / G. A. Soff // Cancer Metastasis Rev. – 2000. – Vol. 19. – P. 97-107.
104. Клысь Ю. Г. Протеолитические производные плазминогена при развитии злокачественных новообразований / Ю.Г. Клысь, Н.В. Зайцева, А.И. Кизим, С.В. Вережка // Онкология. – 2010. – Т. 12, № 1. – С. 17-21.
105. Matrix metalloproteinases generate angiostatin: effects on neovascularization / L. A. Cornelius, L. C. Nehring, E. Harding [et al.] // J. Immunol. – 1998. – Vol. 161. – P. 6845 - 6852.

106. Proteolytic cleavage of urokinase-type plasminogen activator by stromelysin-1 (MMP-3) / F. Ugwu, B. Hoef, A. Bini [et al.] // *Biochemistry*. – 1998. – Vol. 37, № 20. – P. 7231-7236.
107. Human kallikrein 6 activity is regulated via an autoproteolytic mechanism of activation/inactivation / A. Bayés, T. Tsetsenis, S. Ventura [et al.] // *Biological Chemistry*. – 2004. – Vol. 385, № 6. – P. 517–524.
108. Biochemical and enzymatic characterization of human kallikrein 5 (hK5), a novel serine protease potentially involved in cancer progression / I. P. Michael, G. Sotiropoulou, G. Pampalakis [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2005. – Vol. 280, № 15. – P. 14628-14635.
109. Angiostatin anti-angiogenesis requires IL-12: the innate immune system as a key target / A. Albini, C. Brigati, A. Ventura [et al.] // *J Transl Med.* – 2009. – Vol. 7. – 5.
110. Yang D.Z. Angiostatin inhibits pancreatic cancer cell proliferation and growth in nude mice / D. Z. Yang, J. He, J. C. Zhang, Z. R. Wang // *World J. Gastroenterol.* – 2005. – Vol. 11, № 32. – P. 4992-4996.
111. Human plasminogen kringle 1-5 reduces atherosclerosis and neointima formation in mice by suppressing the inflammatory signaling pathway / P. C. Chang, H. L. Wu, H. C. Lin [et al.] // *J. Thromb. Haemost.* – 2010. – Vol. 1. – P. 194-201.
112. Plasminogen Kringle 5 blocks tumor progression by antiangiogenic and proinflammatory pathways / S. R. Perri, D. Martineau, M. François // *Mol. Cancer Ther.* – 2007. – Vol. 6, № 2. – P. 441-449.
113. Decrease in circulating anti-angiogenic factors (angiostatin and endostatin) after surgical removal of primary colorectal carcinoma coincides with increased metabolic activity of liver metastases. C. F. Peeters, L. F. Geus, Westphal J. R. [et al.] // *Surgery* – 2005. – Vol. 137. – P. 246-249.

114. Angiostatin suppresses malignant glioma growth in vivo / M. Kirsch, J. Strasser, R. Allende [et al.] // *Cancer Res.* – 1998. – Vol. 58, № 20. – P. 4654-4659.
115. Laurens N. Fibrin structure and wound healing / N. Laurens, P. Koolwijk, M. P. de Maat // *J. Thromb. Haemost.* – 2006. – Vol. 4, № 5. – P. 932-939.
116. Gabay C. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation / C. Gabay, I. Kushner // *N. Engl. J. Med.* – 1999. – Vol. 340, № 6. – P. 448-454.
117. Janmey P. A. Fibrin gels and their clinical and bioengineering applications / P. A. Janmey, J. P. Winer, J. W. Weisel // *J. R. Soc. Interface.* – 2009. – Vol. 6, № 30. – P. 1-10.
118. Mosesson M. W. The structure and biological features of fibrinogen and fibrin / M. W. Mosesson, K. R. Siebenlist, D. A. Meh // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2001. – Vol. 936. – P. 11-30.
119. Meh D. A. Sequence of release of fibrinopeptide A from fibrinogen molecules by thrombin or Atroxin / D. A. Meh, K. R. Siebenlist, G. Bergtrom, M. W. Mosesson // *J. Lab. Clin. Med.* – 1995. – Vol. 125, № 3. – P. 384-391.
120. Moskowitz K. A. The (DD)E Complex Is Maintained by a Composite Fibrin Polymerization Site / K. A. Moskowitz, A. Z. Budzynski // *Biochemistry.* – 1994. – Vol. 33, № 44. – P 12937–12944.
121. The role of fibrinogen D domain intermolecular association sites in the polymerization of fibrin and fibrinogen Tokyo II ( $\gamma$  275 Arg $\rightarrow$ Cys) / M. W. Mosesson, K. R. Siebenlist, J. P. DiOrio [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 1995. – Vol. 96, № 2. – P. 1053-1058.
122. Weisel J. W. Fibrin assembly: lateral aggregation and the role of the two pairs of fibrinopeptides / J. W. Weisel // *Biophys. J.* – 1986. – Vol. 50. – P. 1079–1093.

123. Localization of a fibrin polymerization site complimentary to Gly-His-Arg sequence / L. V. Medved, S. V. Litvinovich, T. P. Ugarova [et al.] // FEBS Lett. – 1993. – Vol. 320. – P. 239–242.
124. Yang Z. A model of fibrin formation based on crystal structures of fibrinogen and fibrin fragments complexed with synthetic peptides / Z. Yang, I. Mochalkin, R. F. Doolittle // Proc. Natl. Acad. Sci. USA – 2000. – Vol. 97. – P. 14156–14161.
125. The  $\alpha$ C domains of fibrinogen affect the structure of the fibrin clot, its physical properties, and its susceptibility to fibrinolysis / J.-P. Collet, J. L. Moen, Y. I. Veklich [et al.] // Blood. – 2005. – Vol. 106, № 12. – P. 3824–3830.
126. Mosesson M. W. The covalent structure of factor XIIIa crosslinked fibrinogen fibrils / M. W. Mosesson, K. R. Siebenlist, J. F. Hainfeld, J. S. Wall // J. Struct. Biol. – 1995. – Vol. 115. – P. 88–101.
127. Spraggon G. Crystal structures of fragment D from human fibrinogen and its crosslinked counterpart from fibrin / G. Spraggon, S. J. Everse, R. F. Doolittle // Nature. – 1997. – Vol. 389. – P. 455–462.
128. Shainoff J. R. Immuno-electrophoretic characterizations of the cross-linking of fibrinogen and fibrin by factor XIIIa and tissue transglutaminase. J. R. Shainoff, D. A. Urbanic, P. M. DiBello // J. Biol. Chem. – 1991. – Vol. 266. – P. 6429–6437.
129. Siebenlist K. R. Evidence of intramolecular cross-linked A alpha.gamma chain heterodimers in plasma fibrinogen / K. R. Siebenlist, M. W. Mosesson // Biochemistry. – 1996. – Vol. 35. – P. 5817–5821.
130. Siebenlist K. R. Plasma factor XIII binds specifically to fibrinogen molecules containing  $\gamma$  chains / K. R. Siebenlist, D. A. Meh, M. W. Mosesson // Biochemistry. – 1996. – Vol. 35. – P. 10448–10453.

131. Berezky Z. Fibrin Stabilization (Factor XIII), Fibrin Structure and Thrombosis / Z. Berezky, É. Katona, L. Muszbek // *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* – 2003/2004. – Vol. 33. – P. 430-437.
132. Lorand L. Factor XIII: structure, activation, and interactions with fibrinogen and fibrin / L. Lorand // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2001. – Vol. 936. – P. 291-311.
133. Role of factor XIII in fibrin clot formation and effects of genetic polymorphisms R. A. Ariëns, T.-S. Lai, J. W. Weisel [et al.] // *Blood.* – 2002. – Vol. 100, № 3. – P. 743-754.
134. Standeven K. F. The molecular physiology and pathology of fibrin structure/function / K. F. Standeven, R. A. Ariëns, P. J. Grant // *Blood Rev.* – 2005. – Vol. 19, № 5. – P. 275-288.
135. Gerweck L. E. Tumor pH controls the in vivo efficacy of weak acid and base chemotherapeutics / L. E. Gerweck, S. Vijayappa, S. Kozin // *Mol. Cancer Ther.* – 2006. – Vol. 5. – P. 1275-1279.
136. Albumin dialysis MARS: knowledge from 10 years of clinical investigation. S. R. Mitzner, J. Stange, S. Klammt [et al.] // *ASAIO J.* – 2009. – Vol. 55, № 5. – P. 498-502.
137. Farmand M. Blood gas analysis and the fundamentals of acid-base balance / M. Farmand // *Neonatal. Netw.* – 2009. – Vol. 28, № 2. – P. 125-128.
138. Ryan E. A. Structural origins of fibrin clot rheology / E. A. Ryan, L. F. Mockros, J. W. Weisel, L. Lorand // *Biophys. J.* – 1999. – Vol. 77, № 5. – P. 2813-2826.
139. Associations of plasma fibrinogen levels with established cardiovascular disease risk factors, inflammatory markers, and other characteristics: individual participant meta-analysis of 154,211 adults in 31 prospective studies: the

- fibrinogen studies collaboration / S. Kaptoge, I. R. White, S. G. Thompson [et al.] // *Am. J. Epidemiol.* – 2007. – Vol. 166, № 8. – P. 867-879.
140. Functional Analysis of the Fibrinogen A $\alpha$  Thr312Ala Polymorphism. Effects on Fibrin Structure and Function / K. F. Standeven, P. J. Grant, A. M. Carter [et al.] // *Circulation.* – 2003. – Vol. 107. – P. 2326-2330.
141. Influence of fibrinogen  $\beta$ -chain gene variations on risk of myocardial infarction in a Chinese Han population / X.-f. Lu, H.-j. Yu, X.-y. Zhou [et al.] // *Chinese Medical Journal.* – 2008 – Vol. 121, № 16. – P. 1549-1553.
142. Lim B. C. Bb448 Lys/Lys variant alters coronary risk by an effect on fibrin structure/ function due to conformational changes in fibrinogen [abstract]. B. C. Lim, R. A. Ariens, J. W. Weisel, P. J. Grant / *J. Thromb. Haemost.* – 2003. – Suppl. 1. – Abstract No. OCO29.
143. Maghzal G. J. Fibrinogen B beta polymorphisms do not directly contribute to an altered in vitro clot structure in humans / G. J. Maghzal, S. O. Brennan, P. M. George // *Thromb. Haemost.* – 2003. – Vol. 90. – P.1021–1028.
144. Fibrinogen Dusart: electron microscopy of molecules, fibers and clots, and viscoelastic properties of clots / J. P. Collet, J. L. Woodhead, J. Soria [et al.] // *Biophys J.* – 1996. – Vol. 70, № 1. – P. 500-510.
145. Thrombotic dysfibrinogenemia. Fibrinogen "Caracas V" relation between very tight fibrin network and defective clot degradability / R. Marchi, S. S. Mirshahi, C. Soria [et al.] // *Thromb. Res.* – 2000. – Vol. 99, № 2. – P. 187-193.
146. Genetics of fibrin clot structure: a twin study / E. J. Dunn, R. A. Ariens, M. Lange [et al.] // *Blood.* – 2004. – Vol. 103. – P. 1735-1740.
147. Cooper A. V. Fibrinogen gamma-chain splice variant  $\gamma$  alters fibrin formation and structure / A. V. Cooper, K. F. Standeven, R. A. Ariens // *Blood.* – 2003. – Vol. 102, № 2. – P. 535-540.

148. Uitte de Willige S. The pleiotropic role of the fibrinogen gamma' chain in hemostasis. S. Uitte de Willige, K. F Standeven, H. Philippou, R. A. Ariens // *Blood*. – 2009. – Vol. 114, № 19. – P. 3994-4001.
149. The ultrastructure of fibrinogen-420 and the fibrin-420 clot / M. W. Mosesson, J. P. DiOrio, I. Hernandez [ et. al.] // *Biophys. Chem.* – 2004. – Vol. 112, № 2-3. – P. 209-214.
150. Nieuwenhuizen W. Biochemistry and Measurement of Fibrinogen / W. Nieuwenhuizen // *Eur. Heart J.* – 1995. – Vol. 16 (suppl. A). – P. 6-10.
151. The alternatively spliced alpha (E)C domain of human fibrinogen-420 is a novel ligand for leukocyte integrins alpha (M)beta (2) and alpha (X)beta (2) / V. K. Lishko, V. P. Yakubenko, K. M. Hertzberg [et al.] // *Blood*. – 2001. – Vol. 98. – P. 2448–2455.
152. Effect of Val34Leu polymorphism on the activation of the coagulation factor XIII-A / U. Wartiovaara, H. Mikkola, G. Szoke [et al.] // *Thromb. Haemost.* – 2000. – Vol. 84. – P. 595–600.
153. Factor XIII val34leu and the risk of myocardial infarction / R. F. Franco, A. Pazin-Filho, M. H. Tavella [et al.] // *Haematologica*. – 2000. – Vol. 85. – P. 67–71.
154. Genetic regulation of fibrin structure and function: complex gene–environment interactions may modulate vascular risk / B. C. Lim, R. A. Ariens, A. M. Carter [et al.] // *Lancet*. – 2003. – Vol. 361. – P. 1424–1431.
155. Wolberg A. S. Thrombin generation and fibrin clot structure / A. S. Wolberg // *Blood Reviews*. – 2007. – Vol. 21. – P. 131–142.
156. Wohner N. Role of Cellular Elements in Thrombus Formation and Dissolution / N. Wohner // *Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem.* – 2008. – Vol. 6, № 3. – P. 224-228.

157. Gersh K. C. Fibrin network structure and clot mechanical properties are altered by incorporation of erythrocytes / K. C. Gersh, C. Nagaswami, J. W. Weisel // *Thromb. Haemost.* – 2009. – Vol. 102, № 6. – P. 1169-1175.
158. Petersen L. C. Effect of plasminogen and tissue-type plasminogen activator on fibrin gel structure / L. C. Petersen, E. Suenson // *Fibrinolysis.* – 1991. – Vol. 5, № 1. – P. 51-59.
159. Smith S. A. Polyphosphate enhances fibrin clot structure / S. A. Smith, J. H. Morrissey // *Blood.* – 2008. – Vol. 112, № 7. – P. 2810-2816.
160. Platelet factor 4 (CXCL4) seals blood clots by altering the structure of fibrin / A. A. Amelot, M. Tagzirt, G. Ducouret [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2007. – Vol. 282, № 1. – P. 710-720.
161. Carr M. E. Granulocyte lysosomal cationic protein alters fibrin assembly: a possible mechanism for granulocyte control of clot structure / M. E. Carr, D. A. Gabriel, J. C. Herion, H. R. Roberts // *J. Lab. Clin. Med.* – 1986. – Vol. 107, № 3. – P. 199–203.
162. Carr M. E. Abnormal fibrin structure and inhibition of fibrinolysis in patients with multiple myeloma / M. E. Carr, R. M. Dentab, S. L. Carra // *J. Lab. Clin. Med.* – 1996. – Vol. 128, № 1. – P. 83-88.
163. Jones M. Influence of the subendothelial basement membrane components on fibrin assembly. Evidence for a fibrin binding site on type IV collagen / M. Jones, D. A. Gabriel // *J. Biol. Chem.* – 1988. – Vol. 263. – P. 7043-7048.
164. Fibrinogen and beta-amyloid association alters thrombosis and fibrinolysis: a possible contributing factor to Alzheimer's disease / M. Cortes-Canteli, J. Paul, E. H. Norris // *Neuron.* – 2010. – Vol. 66, № 5. – P. 695-709.
165. Петик А. В. Роль пристеночного тромбообразования в кровеносных сосудах легких при метастазировании карциномы Льюис у мышей линии

- C57Bl/6 / А. В. Петик, О. Н. Пясковская, В. Б. Винницкий // Эксперим. Онкология. – 1999. – Т. 21, № 3-4. – С. 239-242.
166. Bennett J. S. Platelet-fibrinogen interactions / J. S. Bennett // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2001. – Vol. 936. – P. 340–354.
167. Altieri D. C. Regulation of leukocyte-endothelium interaction by fibrinogen / D. C. Altieri // Thromb. Haemost. – 1999. – Vol. 82, № 2. – P. 781-786.
168. Ruoslahti E New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins / E. Ruoslahti, M. D. Pierschbacher // Science. – 1987. – Vol. 238. – P. 491–497.
169. Yokoyama K. Specific binding of integrin alpha v beta 3 to the fibrinogen gamma and alpha E chain C-terminal domains / K. Yokoyama, X. P. Zhang, L. Medved, Y. Takada // Biochemistry. – 1999. – Vol. 38. – P. 5872–5877.
170. Suehiro K. Fibrinogen is a ligand for integrin alpha5beta1 on endothelial cells / K. Suehiro, J. Gailit, E. F. Plow // J. Biol. Chem. – 1997. – Vol. 272. – P. 5360–5366.
171. Transglutaminase-mediated oligomerization of the fibrin(ogen) aC-domains promotes integrin-dependent cell adhesion and signaling / A. M. Belkin, G. Tsurupa, E Zemskov [et al.] // Blood. – 2005. – Vol. 105. – P. 3561-3568.
172. Feng X. Fibrin and collagen differentially regulate human dermal microvascular endothelial cell integrins: stabilization of alphav/beta3 mRNA by fibrin1 / X. Feng, R. A. Clark, D. Galanakis, M. G. Tonnesen // J. Invest. Dermatol. – 1999. – Vol. 113. – P. 913–919.
173. Structural recognition of a novel fibrinogen gamma chain sequence (117–133) by intercellular adhesion molecule-1 mediates leukocyte– endothelium interaction / D. C. Altieri, A. Duperray, J. Plescia // J. Biol. Chem. – 1995. – Vol. 270. – P. 696–699.

174. Erban J. K. A 130-kDa protein on endothelial cells binds to amino acids 15-42 of the B $\alpha$  chain of fibrinogen / J. K. Erban, D. D. Wagner // *J. Biol. Chem.* – 1992. – Vol. 267. – P. 2451-2458.
175. VE-Cadherin mediates endothelial cell capillary tube formation in fibrin and collagen gels / T. L. Bach, C. Barsigian, D. G. Chalupowicz // *Exp. Cell Res.* – 1998. – Vol. 238. – P. 324–334.
176. Gorlatov S. Interaction of fibrin(ogen) with the endothelial cell receptor VE-cadherin: mapping of the receptor-binding site in the NH<sub>2</sub>-terminal portions of the fibrin beta chains / S. Gorlatov, L. Medved // *Biochemistry.* – 2002. – Vol. 41. –P. 4107–4116.
177. Identification of a novel binding site for platelet integrins  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (GPIIb/IIIa) and  $\alpha_5\beta_1$  in the  $\gamma$ C-domain of fibrinogen / N. P. Podolnikova, V. P. Yakubenko, G. L. Volkov [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278. – P. 32251-32258.
178. Sloan S. M. Glycoprotein IIb-IIIa-liposomes bind fibrinogen but do not undergo fibrinogen-mediated aggregation / S. M. Sloan, E. B. Brown, Q. Liu, M. M. Frojmovic // *Platelets.* – 2000. – Vol. 11, № 2. – P. 99-110.
179. Leukocyte engagement of fibrin(ogen) via the integrin receptor  $\alpha$ M $\beta$ 2/Mac-1 is critical for host inflammatory response in vivo / M. J. Flick, X. Du, D. P. Witte [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2004. – Vol. 113. – P. 1596–1606.
180. Identification of a novel recognition sequence for integrin  $\alpha$ M $\beta$ 2 within the c-chain of fibrinogen / T. P. Ugarova, D. A. Solovjov, L. Zhang // *J. Biol. Chem.* – 1998. – Vol. 273. – P. 22519–22527.
181. Regulated unmasking of the cryptic binding site for integrin  $\alpha$ M  $\beta$  2 in the gamma C-domain of fibrinogen / V. K. Lishko, B. Kudryk, V. P. Yakubenko // *Biochemistry.* – 2002. – Vol. 41. – P. 12942–12951.

182. Sahni A. Binding of Basic Fibroblast Growth Factor to Fibrinogen and Fibrin / A. Sahni, T. Odrliin, C. W. Francis // *J. Biol. Chem.* – 1998. – Vol. 273. – P. 7554-7559.
183. Sahni A. Potentiation of endothelial cell proliferation by fibrin(ogen)-bound fibroblast growth factor-2 / A. Sahni, L. A. Sporn, C. W. Francis // *J. Biol. Chem.* – 1999. – Vol. 274. – P. 14936–14941.
184. Sahni A. Vascular endothelial growth factor binds to fibrinogen and fibrin and stimulates endothelial cell proliferation / A. Sahni, C. W. Francis // *Blood.* – 2000. – Vol. 96. – P. 3772–3778.
185. Sahni A. FGF-2 binding to fibrin(ogen) is required for augmented angiogenesis / A. Sahni, A. A. Khorana, R. B. Baggs [ et al.] // *Blood.* – 2006. – Vol. 107, № 1. – P. 126–131.
186. Becker J. C. Biological in vitro effects of fibrin glue: fibroblast proliferation, expression and binding of growth factors / J. C. Becker, W. Domschke, T. Pohle // *Scand. J. Gastroenterol.* – 2004. – Vol. 39. – P. 927–932.
187. Kilarski W. W. An ex vivo model for functional studies of myofibroblasts / W. W. Kilarski, N. Jura, P. Gerwins // *Lab. Invest.* – 2005. – Vol. 85. – P. 643–654.
188. A 30,000 g/mol protein involved in plasminogen activation in the dextran sulphate euglobulin fraction of human plasma depleted in both t-PA and u-PA / J. J. Sidelmann, J. Jespersen, B. Teisner [et al.] // *Fibrinolysis Proteolysis.* – 1998. – Vol. 12 (Suppl. 1). – P. 19.
189. Braat E. A. Fibrinolytic properties of activated FXII / E. A. Braat, G. Dooijewaard, D. C. Rijken // *Eur. J. Biochem.* – 1999. – Vol. 263, № 3. – P. 904-911.

190. Shariat-Madar Z. Assembly and activation of the plasma kallikrein/kinin system: a new interpretation / Z. Shariat-Madar, F. Mahdi, A. H. Schmaier // *Int. Immunopharmacol.* – 2002. – Vol. 2, № 13-14. – P. 1841-1849.
191. Rijken D. C. New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system / D. C. Rijken, H. R. Lijnen // *J. Thromb. Haemost.* – 2009. – Vol. 7, № 1. – P. 4-13.
192. Castellino F. J. Structure and function of the plasminogen/plasmin system / F. J. Castellino, V. A. Ploplis // *Thromb. Haemost.* – 2005. – Vol. 93. – P. 647–654.
193. Stief T. W. Oxidative inactivation of purified human alpha-2-antiplasmin, antithrombin III, and C1-inhibitor / T. W. Stief, A. Aab, N. Heimburger // *Thromb. Res.* – 1988. – Vol. 49, № 6. – P. 581-589.
194. Harpel P. C. Alpha2-plasmin inhibitor and alpha2-macroglobulin-plasmin complexes in plasma. Quantitation by an enzyme-linked differential antibody immunosorbent assay / P. C. Harpel // *J Clin Invest.* – 1981. – Vol. 68, № 1. – P. 46-55.
195. Fibrinolytic cross-talk: a new mechanism for plasmin formation / T. Dejouvencel, L Doeuvre, R. Lacroix [et al.] // *Blood.* – 2010. – Vol. 115, № 10. – P. 2048-2056.
196. Гриненко Т. В. Інгібування  $\alpha_2$ -антиплазміном процесу активації Glu-плазміногену тканинним активатором на фібрині, DDE-комплексі та DD-димері / Т. В. Гриненко, М. Б. Задорожна, Т. М. Платонова, Г. Л. Волков // *Укр. біохім. журн.* – 2005. – Т. 77, № 5. – С. 45-51.
197. Гриненко Т. В. Міжбілкові взаємодії плазміногену/плазміну в регуляції фібринолізу / Т. В. Гриненко // *Матеріали ІХ Українського біохімічного з'їзду.* – Х.: Харківський національний університет ім. В. Н. Каразіна, 2006. – С.16.

198. Functional hierarchy of plasminogen kringles 1 and 4 in fibrinolysis and plasmin-induced cell detachment and apoptosis / B. Ho-Tin-Noé, G. Rojas, R. Vranckx [et al.] // FEBS J. – 2005. – Vol 272, № 13. – P. 3387-3400.
199. Weisel J. W. The biochemical and physical process of fibrinolysis and effects of clot structure and stability on the lysis rate / J. W. Weisel, R. I. Litvinov // Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem. – 2008. – Vol. 6, № 3. – P. 161-180.
200. Третьяченко В. Г. Связывание К 1-3 и К 4 фрагментов плазминогена, содержащих лизин-связывающие участки, с фибриногеном и его фрагментами / В. Г. Третьяченко, Т. В. Гриненко, С. А. Кудинов // Укр. биохим. журн. – 1988. – Т. 60, № 2. – С. 3-6.
201. Anglés-Cano E. Inhibition of fibrinolysis by lipoprotein(a) / E. Anglés-Cano, A. de la Peña Díaz, S. Loyau // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2001. – Vol. 936. – P. 261-275.
202. Jones A. L. Histidine-rich glycoprotein: A novel adaptor protein in plasma that modulates the immune, vascular and coagulation systems / A. L. Jones, M. D. Hulett, C. R. Parish // Immunol. Cell Biol. – 2005. – Vol. 83, №2. – P. 106-118.
203. Петік А. В. Роль внутрішньосудинного згусткоутворення у метастазуванні злоякісних пухлин / А. В. Петік, Т. М. Платонова, О. М. Пясковська, В. Б. Вінницький // Шляхи та перспективи розвитку експериментальної онкології в Україні. Під ред. В. Ф. Чехуна. – Київ: ДІА, 2001. – С. 154-161.
204. The Xylum Clot Signature Analyzer: a dynamic flow system that simulates vascular injury C. K. Li, T. J. Hoffmann, P. Y. Hsieh [et al.] // Thromb. Res. – 1998. – Vol. 92, №6 (Suppl 2). – P. 67-77.

205. The effects of heparin, protamine, and heparin/protamine reversal on platelet function under conditions of arterial shear stress / M. J. Griffin, H. M. Rinder, B. R. Smith [et al.] // *Anesth. Analg.* – 2001. – Vol. 93, №1. - 20-27.
206. Influence of anatomical location on arterial thrombosis / K. Karnicki, E. Komorowicz, D. N. Fass [et al.] // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2002. – Vol. 22, № 2. – P. 342-347.
207. Fibrin monomer increases platelet adherence to tumor cells in a flowing system: a possible role in metastasis / J. P. Biggerstaff, N. B. Seth, T. V. Meyer [et al.] // *Thromb. Res.* – 1998. – Vol. 92, №6 (Suppl 2). – P. 53-58.
208. An in vitro cell culture system to study the influence of external pneumatic compression on endothelial function / G. Dai, O. Tsukurov, R. W. Orkin [et al.] // *J. Vasc. Surg.* – 2000. – Vol. 32, № 5. – P. 977-987.
209. Jeong W. W. Whole blood clot dissolution: in vitro study on the effects of permeation pressure / W. W. Jeong, A. S. Jang, K. Rhee // *Proc. Inst. Mech. Eng. H.* – 2007. – Vol. 221, № 4. – P.357-363.
210. Bajd F. Microscopic clot fragment evidence of biochemo-mechanical degradation effects in thrombolysis / F. Bajd, J. Vidmar, A. Blinc, I. Sersa // *Thromb. Res.* – 2010. – Vol. 126, № 2. – P.137-143.
211. Flow-induced permeation of non-occlusive blood clots: an MRI study and modelling / B. Grobelnik, J. Vidmar, G Tratar [et al.] // *Eur. Biophys. J.* – 2008. – Vol. 37, №7. – P. 1229-1233.
212. The spatial dynamics of fibrin clot dissolution catalyzed by erythrocyte-bound vs. free fibrinolytics / K. C. Gersh, S. Zaitsev, V. Muzykantov [et al.] // *J. Thromb. Haemost.* – 2010. – Vol. 8, №5. – P. 1066-1074.
213. Anand S. Computer simulation of systemic circulation and clot lysis dynamics during thrombolytic therapy that accounts for inner clot transport and

- reaction / S. Anand, S. L. Diamond // *Circulation*. – 1996. – Vol. 94, № 4. – P. 763-774.
214. Андрианов С. И. Особенности гидролиза полимерного фибрина плазмином, миниплазмином, микроплазмином и трипсином / С. И. Андрианов, Е. М. Макогоненко, С. А. Кудинов // *Укр. биохим. журн.* – 1992. – Т. 64, № 3. – С. 14-20.
215. Гриненко Т.В. Регуляція фібринолізу некаталітичними ділянками молекул плазміногену/плазміну: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня д-ра біол. наук: спец. 03.00.04 «Біохімія» / Т. В. Гриненко – К., 2007. – 42 с.
216. Шмидт Р. Физиология человека в 3 т. / Р. Шмидт, Г. Тевс. – М.: Мир, 1996. – Т. 2. Кровь. Кровообращение. Дыхание. – 1996. – 313 с.
217. Slack S. M. Flow chambers and their standardization for use in studies of thrombosis / S. M. Slack, V. T. Turitto // *Thromb. Haemost.* – 1994. – Vol.72 №5. – P.777–781.
218. Davis A. Quantitative measurement of blood flow dynamics in embryonic vasculature using spectral Doppler velocimetry / A. Davis, J. Izatt, F. Rothenberg // *Anat. Rec. (Hoboken)*. – 2009. – Vol. 292, № 3. – P.311-319.
219. Wall shear rate in supra-aortic vessels: a factor for different atherosclerotic pattern? / R. W. Simon, S. Spring, R. Luechinger [et al.] // *Vasa*. – 2008. – Vol. 37, № 3. – P. 227-232.
220. Effects of shear stress on wound-healing angiogenesis in the rabbit ear chamber / S. Ichioka, M. Shibata, K. J. Kosaki [et al.] // *Surg. Res.* – 1997. – Vol. 72. – P. 29–35.
221. Cheng C. P. Quantification of wall shear stress in large blood vessels using Lagrangian interpolation functions with cine phase-contrast magnetic resonance

- imaging / C. P. Cheng, D. Parker, C. A. Taylor // *Ann. Biomed. Eng.* – 2002. – Vol. 30, № 8. – P. 1020-1032.
222. Castellino F.J. Human plasminogen / F. J. Castellino, J. R. Powell // *Methods of enzymology.* – 1981. – Vol. 80. – P. 365-378.
223. Wiman B. Primary structure of the  $\beta$ -chain of human plasmin / B. Wiman // *Eur. J. Biochem.* – 1977. – 76, № 1. – P. 129-137.
224. Heath A. B. A collaborative study to establish the second international standard for streptokinase / A. B. Heath, P. J. Gaffney // *Thromb. Haemost.* – 1990. – Vol. 64, № 2. – P. 267-269.
225. Powell J. R. Activation of human neo-plasminogen-Val<sub>442</sub> by urokinase and streptokinase and a kinetic characterization of neo-plasmin-Val<sub>442</sub> / J. R. Powell, F. J. Castellino // *J.Biol.Chem.* – 1980. – Vol.255, № 11. – P. 5329-5335.
226. Komorowicz E. Fibrinolysis with des-kringle derivatives of plasmin and its modulation by plasma protease inhibitors / E. Komorowicz, K. Kolev, R. Machovich // *Biochemistry.* – 1998. – Vol. 37, № 25. – P. 9112-9118.
227. Варецька Т. В. Мікрогетерогенність фібриногену. Кріофібриноген / Т.В. Варецька // *Укр. біохім. журн*– 1960. – Т. 32, № 1. – С. 13-23.
228. On the properties of fibrin monomer prepared from fibrin clot with acetic acid / T. M. Pozdnjakova, A. A. Musjalkovskaja, T. P. Ugarova [et al.] // *Thromb. Res.* – 1979. – Vol. 16, № 1-2. – P. 283-288.
229. Aizawa P. Large-scale preparation of thrombin from human plasma / P. Aizawa, S. Winge, G. Karlsson // *Thromb. Res.* – 2008. – Vol. 122, № 4. – P. 560-567.
230. *Affinity chromatography: principles and methods.* – Upsala: Amersham Pharmacia Biotech AB, 2001. – 160 p.

231. Kurecki T. Purification of human plasma alpha 2 macroglobulin and alpha 1 proteinase inhibitor using zinc chelate chromatography / T. Kurecki, L. F. Kress, M. Laskowski // *Anal. Biochem.* – 1979. – Vol. 99, № 2. – P. 415-420.
232. Кирхнер Ю. Тонкослойная хроматография: книга в 2 т. / Ю. Кирхнер. – М.: Мир, 1981. – Т. 1 – 616 с.
233. Кирхнер Ю. Тонкослойная хроматография: книга в 2 т. / Ю. Кирхнер. – М.: Мир, 1981. – Т. 2 – 523 с.
234. Зміни ліпідного складу мозку тварин з експериментальною морфінною залежністю / Н. М. Гула, В. М. Маргітич, Н. М. Говсеєва [та ін.] // *Укр. біохім. журн.* – 1998. – Т. 70, № 2. – С. 98-105.
235. Robbins K. Human plasminogen and plasmin / K. Robbins, L. Summaria // *Methods in Enzymology.* – New York-London Acad.Press. – 1979. – Vol. 19. – P. 184-186.
236. Веремеенко К. М. Ферменты протеолиза и их ингибиторы в медицинской практике / К. М. Веремеенко. – К.: Здоров'я, 1971. – 216 с.
237. Kassell B. A trypsin inhibitor from barley / B. Kassell // *Methods in Enzymology.* – 1970. – Vol. 19. – P. 840-844.
238. Adham N. F. Binding of zinc to alpha-2-macroglobulin and its role in enzyme binding activity / N. F. Adham, M. K. Song, H. Rinderknecht // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1977. – Vol. 495, № 2. – P. 212-219.
239. Magnusson S. Bovine prothrombin and thrombin / S. Magnusson // *Methods in Enzymology.* – 1970. – Vol. 19. – P. 157-184.
240. Платонова Т. Н. Аналіз порушення фази фібриноутворення у практично здорових осіб похилого та старечого методу за допомогою анцистронового тесту / Т. Н. Платонова, О. О. Сушко, Н. І. Лукінова, Д. І. Соловійов // *Фізіол. журн.* – 1994. – Т. 40, № 3-4. – С. 63-69.

241. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U. K. Laemmli // *Nature*. – 1970. – Vol. 227, № 5259. – P. 680-685.
242. Manchenko G. P. Handbook of Detection of Enzymes on Electrophoretic Gels / G. P. Manchenko. – Florida: CRC Press, 2002. – 592 p.
243. Bozzola J. J. Electron microscopy : principles and techniques for biologists / J. J. Bozzola, L. D. Russell. – Sudbury: Jones and Bartlett, 1999. – 670 p.
244. Miles L. A. Topography of the high-affinity lysine binding site of plasminogen as defined with a specific antibody probe / L. A. Miles, E. F. Plow // *Biochemistry*. – 1986. – Vol. 25, № 22. – P. 6926-6933.
245. Fenton J. W. Large-scale preparation and preliminary characterization of human thrombin / J. W. Fenton, W. P. Campbell, J. C. Harrington, K. D. Miller // *Biochim. Biophys. Acta*. – 1971. – Vol. 229, № 1. – P. 26-32.
246. Villaneuva G. B. Tryptophan residue at the heparin binding site in antithrombin III / G. B. Villaneuva, V. Perret, I. Danishefsky // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1980. – Vol. 203, № 1. – P. 453-457.
247. Dellenback R. J. The extinction coefficient of fibrinogen from man, dog, elephant, sheep, and goat at 280 mmu / R. J. Dellenback, S. Chien // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* – 1970. – Vol. 134, № 1. – P. 353-355.
248. Song M. K. Large scale purification of alpha2-macroglobulin from human plasma / M. K. Song, N. F. Adham, H. Rinderknecht // *Biochem. Med.* – 1975. – Vol. 14, № 2. – P. 162-169.
249. Андрианов С. И. Роль крингловых структур молекулы плазминогена в осуществлении фибринолитической функции / С. И. Андрианов, Е. М. Макогоненко, Т. И. Лежен, С. А. Кудинов // *Докл. АН УССР*. – 1988. – Т. 12. – С. 44-47.

250. Лежен Т. И. Турбидиметрический экспресс-микрометод одновременной оценки параметров свертывания и фибринолиза в плазме крови / Т. И. Лежен, Л. И. Соколовская, В. В. Прусская, С. А. Кудинов // Укр. биохим. журн. – 1993. – Т. 65, №2. – С. 23-30.
251. Effect of shear stress on microvessel network formation of endothelial cells with in vitro three-dimensional model / A. Ueda, M Koga, M Ikeda [et al] // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. – 2004. – Vol 287, № 3. – P. 994-1002.
252. Carlson J. A. The histological assessment of cutaneous vasculitis / J. A. Carlson // Histopathology. – 2010. – Vol. 56. – P. 3–23.
253. Walter P. J. The importance of the pre-activation peptide in two-stage mechanism of the human plasminogen activation / P. J. Walter, R. L. Hill, P. A. McKee // J. Biol. Chem. – 1975. – Vol. 250, № 15. – P. 5926-5933.
254. Современные представления о системе гемостаза / Г. Л. Волков, Т. Н. Платонова, А. Н. Савчук [и др.] // Киев: Наукова думка, 2005. – 296 с.
255. Accelerated infusion of streptokinase for the treatment of left-sided prosthetic valve thrombosis: a randomized controlled trial / G. Karthikeyan, R. S. Math, N. Mathew [et al.] // Circulation. – 2009. – Vol. 120, № 12. – P. 1108-1114.
256. Chan J. Usefulness of catheter-directed thrombolysis using alteplase in peripheral vascular occlusion / J. Chan. C. R. Rees, A. K. Song, S. Pham // Proc. (Bayl. Univ. Med. Cent.) – 2001. – Vol. 14, № 1, - P. 3-7.
257. Cesarman-Maus G. Molecular mechanisms of fibrinolysis / G. Cesarman-Maus, K. A. Hajjar // Br. J. Haematol. – 2005. – Vol. 129, № 3. – P. 307-321.
258. Fibrin degradation product (FnDP) assays: analysis of standardization issues and target antigens in plasma / P. J. Gaffney, T. Edgell, L. J. Creighton-Kempford [et al] // Br. J. Haematol. – 1995. – Vol. 90, № 1. – P. 187-194.

259. Fibrinogen catabolism within the procoagulant VX-2 tumor of rabbit lung in vivo: Effluxing fibrin(ogen) fragments contain antiangiogenic activity / M. W. Hatton, S. M. Southward, K. J. Legault [et al.] // *J. Lab. Clin. Med.* – 2004. – Vol. 143, № 4. – P. 241-254.
260. Clinical significance of a new fibrinogen/fibrin degradation products(FDP) test using plasma samples for the diagnosis of fibrinogenolysis and fibrinolysis / K. Imoto, Y. Yasumuro, M. Taki [et al.] // *Rinsho Byori.* – 2001. – Vol. 49, № 3. – P. 283-289.
261. Платонова Т. М. Характеристика складу фракції розчинних фібрин-мономерних комплексів / Т. М. Платонова, В. О. Чернишенко, О. М. Савчук // Перша Українська конференція: «Тромбози в клінічній практиці: профілактика, діагностика, лікування», 27-28 травня 2004 р.: тези доп., Кровообіг та гемостаз – 2004 р. – додаток. – с. 146-148.
262. Like fibrin, (DD)E, the major degradation product of crosslinked fibrin, protects plasmin from inhibition by alpha2-antiplasmin / A. Y. Lee, J. C. Fredenburgh, R. J. Stewart [et al.] // *Thromb. Haemost.* – 2001. – Vol. 85, № 3. – P. 502-508.
263. Alpha-2-macroglobulin functions as an inhibitor of fibrinolytic, clotting, and neutrophilic proteinases in sepsis: studies using a baboon model / J. P. de Boer, A. A. Creasey, A. Chang [et al.] // *Jr. Infect. Immun.* – 1993. – Vol. 61, № 12. – P. 5035-5043.
264. Plasma alpha 2 macroglobulin is increased in nephrotic patients as a result of increased synthesis alone / M. G. de Sain-van der Velden, T. J. Rabelink, D. J. Reijngoud [et al.] // *Kidney Int.* – 1998. – Vol. 54, № 2, - P. 530-535.
265. Луговской Э. В. Молекулярные механизмы образования фибрина и фибринолиза / Э. В. Луговской – Киев: Наукова думка, 2003. – 223 с.

266. Prediction of fibrinogen adsorption for biodegradable polymers: Integration of molecular dynamics and surrogate modelling / A. V. Gubskaya, V. Kholodovych, D. Knight [et al.] // *Polymer*. – 2007. – Vol. 48, № 19. – P. 5788-5801.
267. Белобородова Н. В. Гомеостаз малых молекул микробного происхождения и его роль во взаимоотношениях микроорганизмов с хозяином / Н. В. Белобородова, Г. А. Осипов // *Вестник РАМН*. – 1999. – Т. 16, №7. – С. 25-31.
268. Андрианов С. И. Изучение роли крингловых структур молекулы плазмينا в процессе протеолитического разрушения фибринового сгустка: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук: спец. 03.00.04 «Біохімія» / С. И. Андрианов – К., 1992. – 18 с.
269. Native fibrin gel networks observed by 3D microscopy , permeation and turbidity / B. Blombäck, K. Carlsson, B. Hessel [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta*. – 1989. – Vol. 997, № 1. – P. 96-110.
270. Петік А.В. Активация систем зсідання крові та фібринолізу за розвитку солідних пухлин: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук: спец. 03.00.04 «Біохімія» / А. В. Петік – К., 2004. – 17 с.
271. Fibrinogen/fibrin degradation products in the diagnosis of pulmonary embolism in critically ill patients / A. J. Jareno, J. L. de la Serna, E. E. Corral [et al.] // *Crit. Care Med*. – 1980. – Vol. 8, № 11. – P. 646-650.
272. Song K. S. The fibrinogen degradation products (FgDP) levels in liver disease / K. S. Song, H. S. Kim, K. E. Park, O. H. Kwon // *Yonsei. Med. J.* – 1993. – Vol. 34, № 3. – P. 234-238.
273. Fibrin and fibrinogen degradation products in plasma of patients with colorectal adenocarcinoma / M. Okholm, L. H. Iversen, O. Thorlacius-Ussing

- [et al.] // Diseases of the Colon & Rectum. – 1996. – Vol. 39, № 10. – P. 1102-1106.
274. Platonova T. Inhibitory Effect of D and DD Fragments on Fibrin Polimerization / T. Platonova, N. Lukinova // Укр. біохім. журн. – 1996. Т. 68, №4. – С. 17
275. Гриненко Т. В. Плазминоген-связывающие центры молекулы фибриногена, фибрина и продуктов их протеолиза / Т. В. Гриненко, В. Г. Третьяченко, С. А. Кудинов, Л. В. Медведь // Биохимия. – 1987. – Т. 52, № 10. – С. 1732–1738.
276. Кудинов С. А. Локализация плазминоген-связывающих участков на молекуле фибриногена и его фрагментах / С. А. Кудинов, Т. В. Гриненко, В. Г. Третьяченко, Л. В. Медведь // Докл. АН УССР. – 1986. – Сер. Б, № 4. – С. 68-70.
277. Medved L. Molecular mechanisms of initiation of fibrinolysis by fibrin / L. Medved, W. Nieuwenhuizen // Thromb. Haemost. – 2003. – Vol. 89, № 3. – P. 409-419.
278. Эластаза лейкоцитов в плазме крови больных туберкулезом и ее роль в нарушении регуляции процессов свертывания крови / В. Л. Доценко, А. Я. Спирина, А. И. Макинский [и др.] // Вопросы Медицинской Химии. – 2000. – № 2. – С.176-183.
279. Показатели системы гемостаза при развитии карциномы Льюис / А. В. Петик, Т. Н. Платонова, С. И. Андрианов [и др.] // Экперим. онкология. – 2001. – Т. 23, № 1. – С. 73-75.
280. In vivo generation of angiostatin isoforms by administration of a plasminogen activator and a free sulfhydryl donor: a phase I study of an angiostatic cocktail of tissue plasminogen activator and mesna / G. A. Soff, H.

- Wang, D. L. Cundiff [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2005. – Vol. 11, № 17. – P. 6218-6225.
281. Таран Л. Д. Влияние кринглов К 1-3, К 4 и К 5 на лизис фибринового сгустка, вызванный активацией Glu- и Lys-плазминогена тканевым активатором / Л. Д. Таран, Е. М. Макогоненко // *Укр. биохим. журн.* – 1989. – Т 61, №4. – С. 31-36.
282. Takada A. Activation of Val442-plasminogen (mini-plasminogen) by urokinase, streptokinase and tissue plasminogen activator / A. Takada, Y. Takada, Y. Sugawara // *Thromb. Res.* – 1988. – Vol. 49, № 2. – P. 253-263.
283. Acute venous disease: venous thrombosis and venous trauma / M. H. Meissner, T. W. Wakefield, E. Ascher [et al.] // *J. Vasc. Surg.* – 2007. – Vol. 46, Suppl. – P. 25-53.
284. Mentzer R. L. High-dose, brief-duration intravenous infusion of streptokinase in acute myocardial infarction: description of effects in the circulation / R. L. Mentzer, A. Z. Budzynski, S. Sherry // *Am. J. Cardiol.* – 1986. – Vol. 57, № 15. – P. 1220-1226.
285. Stewart R. J. Characterization of the interactions of plasminogen and tissue and vampire bat plasminogen activators with fibrinogen, fibrin, and the complex of D-dimer noncovalently linked to fragment E / R. J. Stewart, J. C. Fredenburgh, J. I. Weitz // *J. Biol. Chem.* – 1998. – Vol. 273, № 29. – P. 18292-18299.