

Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Міністерство освіти і науки України
Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Міністерство освіти і науки України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

КЛИСЬ ЮЛІЯ ГРИГОРІВНА

УДК 577.1.15:616.212:616.22-006:616.15

ДИСЕРТАЦІЯ

**СТАН СИСТЕМИ ГЕМОСТАЗУ ПРИ ЗАПАЛЬНИХ ТА ОНКОЛОГІЧНИХ
ПРОЦЕСАХ ЛОР-ОРГАНІВ**

03.00.04 – біохімія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук
Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело
_____ Клись Ю.Г.

Науковий керівник **Верьовка Сергій Вікторович** доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник.

Київ – 2018

АНОТАЦІЯ

Клисть Ю.Г. Стан системи гемостазу при запальних та онкологічних процесах ЛОР-органів. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія. – Київський національний університет імені Тараса Шевченка МОН України, Київ, 2018.

В Україні щорічно збільшується кількість хворих на злоякісні захворювання, серед яких 7,8% - це хворі із онкологічними захворюваннями ЛОР-органів. Рання діагностика злоякісних новоутворень ускладнюється безсимптомним перебігом чи схожістю початкових їх проявів із запальними та іншими патологічними процесами. Відомо, що більше, ніж у 60% хворих рак ЛОР-органів виявляють на пізніх стадіях. У багатьох випадках розвитку злоякісних пухлин ЛОР-органів передують доброякісні чи передракові захворювання. Виникнення цих захворювань та раннього раку тісно пов'язані з тривалим перебігом хронічних запальних процесів. Висока поширеність, тривалий прихований перебіг захворювання, виявлення пухлинних процесів на пізніх стадіях обумовлюють необхідність дослідження особливостей патогенезу новоутворень ЛОР-органів.

Відомо, що компоненти системи гемостазу беруть участь у розвитку запальних та онкологічних процесів. Трипсин-подібні протеїнази системи гемостазу відіграють роль медіаторів каскаду запалення. Більшість протеїназ крові та їх інгібіторів належать до гострофазних білків. Процеси запалення і зсідання крові тісно пов'язані між собою: запалення ініціює процеси зсідання, знижує антикоагулянтні механізми та пригнічує активність фібринолітичних компонентів. Порушення функціонування гемостазу при новоутвореннях обумовлені комплексною взаємодією компонентів системи гемостазу, злоякісних клітин та елементів стромы. Інвазія та метастазування пухлини опосередковані численними протеолітичними ензимами системи гемостазу. Їх активність призводить до руйнування компонентів позаклітинного матриксу чи активації інших протеїназ, що утворюють патологічний

активаційний каскад, кінцевим результатом якого є протеоліз компонентів матриксу. При лікуванні пухлин головним чином увага приділяється лікуванню основного захворювання, тоді як вплив пухлинної тканини на систему гемостазу та роль компонентів гемостазу у процесах росту та поширенні новоутворень лишається недостатньо дослідженим. Тому з'ясування особливостей функціонування системи гемостазу при запальних захворюваннях та новоутвореннях ЛОР-органів є вкрай актуальним.

Під час виконання дисертаційної роботи вперше було проведено комплексне дослідження вмісту та активності компонентів системи гемостазу у хворих із хронічним тонзилітом, доброякісними, передраковими та злоякісними новоутвореннями ЛОР-органів.

При дослідженні плазми крові хворих із хронічним тонзилітом виявлено зниження рівня α_2 -макроглобуліну, зростання плазмін-подібної активності, вмісту фібриногену, інгібітору активатору плазміногену I типу та фактору фон Віллебранда, подовження активованого парціального (часткового) тромбопластинового часу.

Результати досліджень показників системи гемостазу осіб із доброякісними захворюваннями ЛОР-органів свідчать про підвищення загальної протеолітичної, тромбін- та плазмін-подібної активностей, вмісту фібриногену, інгібітору активатору плазміногену I типу та фактору фон Віллебранда.

Згідно отриманих нами результатів, хворим із передраковими захворюваннями ЛОР-органів притаманно зростання протеолітичної, плазмін- та тромбін-подібної активностей, активності еластази, вмісту фібриногену, рівня тканинного активатору плазміногену, інгібітору активатору плазміногену I типу, фактору фон Віллебранда та пригнічення фібринолітичної активності.

У пацієнтів із злоякісними новоутвореннями ЛОР-органів II-ої стадії показано підвищення протеолітичної, плазмін-подібної активностей, вмісту фібриногену, протромбінового пулу, рівня тканинного активатору

плазміногену, інгібітору активатора плазміногену I типу та фактору фон Віллебранда. У осіб із III-ою стадією злоякісного процесу виявлено найбільші зміни всіх досліджуваних показників. Для хворих цієї групи характерно підвищення загальної протеолітичної, тромбін-, та плазмін-подібної активностей, активності еластази, вмісту фібриногену, α_2 -макроглобуліну, протромбінового пулу, рівня тканинного активатору плазміногену, інгібітору активатора плазміногену I типу та фактору фон Віллебранда, зменшення вмісту α_1 -III та уповільнення часу лізису фібринового згустку.

Отримані результати розширюють відомості про стан компонентів системи гемостазу та свідчать про зміни вмісту та активності досліджуваних показників системи гемостазу при запальних та онкологічних процесах ЛОР-органів.

Основною причиною летальності при злоякісних новоутвореннях ЛОР-органів є місцеві рецидиви і метастази в лімфатичні вузли шиї, причому відмічено високу смертність хворих вже в перший рік після встановлення діагнозу. Використання стандартних критеріїв, заснованих на клінічних і морфологічних характеристиках пухлинного процесу для оцінки прогнозу перебігу захворювання є малоінформативними. Тому пошук додаткових показників, які могли б відображати фактичний стан пухлинної прогресії та визначати прогноз розвитку злоякісних новоутворень ЛОР-органів є актуальним. Загальновідомою є недостатня інформативність окремих показників чи маркерів онкозахворювань. Більш інформативним може бути використання величини, що об'єднує декілька параметрів.

Отримані в роботі дані дозволили розробити прогностичний індекс, що враховував відміни від контролю доопераційних показників вмісту фібриногену, α_2 -макроглобуліну та рівня тромбін-подібної активності.

Для кожного з хворих індекс відображає співвідношення вмісту фібриногену ([Fg]), α_2 -макроглобуліну ($[\alpha_2M]$) та тромбін-подібної

активності ([Thr]) до середнього значення контрольної величини відповідного показника та виражено в безрозмірних величинах.

Розраховані індивідуальні показники хворих досліджуваних груп дали змогу отримати середнє значення індексу $6,35 \pm 1,67$ для групи хворих з рецидивами та метастазами та $2,65 \pm 0,53$ для групи хворих в стані ремісії, критерій вірогідності відмін індексу між групами $p < 0,05$. Запропонований індекс дає змогу прогнозувати виникнення рецидиву чи метастазів у хворих на рак ЛОР-органів III-ої стадії.

Надмірна секреція протеїназ та порушення протеїназно-інгібіторного балансу при запальних захворюваннях та новоутвореннях призводить до виникнення значної кількості протеолітично ушкоджених протеїнів. Такі похідні протеолітичних ензимів та їх проформ здатні до розщеплення інших протеїнів. Через структурну неповноцінність ушкоджені протеїнази не піддаються інактивації наявними в кровообігу інгібіторами. Загальноприйняті дослідження протеолітичних похідних плазміногену зосерджені на вивченні неферментативних фрагментів важкого ланцюга (ангіостатинів), залишаючи поза увагою існування в кровообізі легкого домену плазміногену, що містить активний центр.

Вперше експериментально методом ензим-форезу доведено утворення в кровообізі хворих із доброякісними, передраковими та злоякісними новоутвореннями ЛОР-органів фрагментів плазміногену, що містять протеолітичний SP-домен. Подібні похідні здатні до активації, однак через відсутність кринглових структур не інгібуються циркулюючими в кровообізі інгібіторами. Це призводить до утворення низькоспецифічних трипсин-подібних протеїназ. Такі фрагменти плазміногену, хоч і виявляються функціонально неповноцінними, однак через низькоспецифічну гідролітичну активність можуть відігравати істотну роль в порушенні протеїназно-інгібіторного балансу крові та становити вагомий складову патологічного процесу.

Відомо, що плазміноген може бути проактивований в розчинному стані стрептокіназою, в результаті чого в молекулі плазміногену формується гідролітичний центр внаслідок конфірмаційних перетворень без розщеплення активаційного зв'язку Arg₅₆₁-Val₅₆₂. Дослідження цих механізмів *in vitro* не враховують взаємодію інших білкових компонентів крові.

Вперше в умовах, наближених до фізіологічних, доведено участь α_2 -макроглобуліну в процесі активації плазміногену стрептокіназою в плазмі крові. Показано, що активаційна дія стрептокінази в складі білкових компонентів плазми крові опосередкована утворенням потрійного комплексу плазміноген-стрептокіназа- α_2 -макроглобулін, що виявляє як амідолітичну плазмін-подібну дію, так і активаційну дію по відношенню до плазміногену.

Це розширює відомості про механізми активаційної дії стрептокінази. Існування істотних відмін між функціонуванням білків за фізіологічних умов та в очищеному вигляді є причиною хибного тлумачення експериментальних даних та формування на їх підставі помилкових висновків. Поглиблення відомостей щодо особливостей активаційної дії стрептокінази в плазмі крові людини надасть можливість коректного планування експериментальних досліджень при вивченні функціонування фібринолітичної системи плазми крові.

Проведені нами дослідження свідчать про те, що порушення функціонування компонентів системи гемостазу викликають або супроводжують хронічні запальні процеси та розвиток новоутворень ЛОР-органів. Тому вивчення стану зсідуючої та фібринолітичної ланок системи гемостазу та їх інгібіторів при досліджуваних захворюваннях ЛОР-органів безсумнівно має теоретичне та практичне значення.

Ключові слова: запалення, онкологічний процес, ЛОР-органи, система гемостазу, зсідання, фібриноліз, протеїнази, інгібітори.

SUMMARY

Klys Yu.G. State of the hemostasis system in the inflammatory and oncological processes of ENT organs. - Manuscripts.

A dissertation submitted to acquire the degree of Candidate of Science in Biology (PhD), specialty 03.00.04 – Biochemistry. – Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2018.

In Ukraine, the number of patients with malignant diseases increases annually, among which 7.8% are patients with ENT-related cancer. It is known that more than 60% of patients with cancer of the ENT organs are detected at later stages. Early diagnosis of malignant neoplasms is complicated by the asymptomatic course or similarity of their initial manifestations with inflammatory and other pathological processes. It is known that in many cases the development of malignant tumors of ENT organs is preceded by benign or precancerous diseases. The emergence of these diseases and early cancer is closely linked to the prolonged course of chronic inflammatory processes. Detection of oncological pathology in the early stages enables to prevent the development of malignant neoplasms and allows to achieve the best results of treatment, significantly increase the duration and improve the quality of life of the patient. High prevalence, long latent course of the disease, detection of tumor processes at later stages necessitate the study of features of the pathogenesis of tumors of ENT organs.

The components of the hemostasis system are involved in the development of inflammatory and oncological processes. Trypsin-like proteinases of the hemostasis system play the role of mediators of the cascade of inflammation. Most blood proteinases and their inhibitors belong to acute phase proteins. The processes of inflammation and blood clotting are closely interconnected: inflammation initiates the processes of aggregation, reduces the activity of natural anticoagulant mechanisms and inhibits the activity of fibrinolytic components. Violations of hemostatic mechanisms in tumors are due to the complex interaction of the components of the hemostasis system, malignant cells and stroma elements.

Invasion and tumor metastasis are mediated by numerous proteolytic enzymes in the hemostasis system. Their activity leads to the destruction of the components of the extracellular matrix or activation of other proteinases, forming a pathological activation cascade, the final result of which is the proteolysis of the components of the matrix. In the treatment of tumors, the maximum attention is paid to the treatment of the underlying disease, but the effect of tumor tissue on the hemostasis system and the role of hemostasis components in growth and distribution of tumors are insufficiently investigated. Therefore, the study of the features of the system of hemostasis in inflammatory diseases and neoplasms of ENT organs is extremely relevant.

During the implementation of the dissertation a comprehensive study was carried out on the content and activity of the components of the hemostasis system in patients with chronic tonsillitis, benign, precancerous and malignant neoplasms of ENT organs.

During the study of blood plasma in patients with chronic tonsillitis, a decrease in the level of α_2 -macroglobulin, growth of plasmin-like activity, fibrinogen content, type I plasminogen activator inhibitor and von Willebrand factor, prolongation of activated partial (partial) thromboplastin time were shown.

The results of studies of hemostatic system indices in patients with benign ENT-related diseases revealed an increase in total proteolytic, thrombin and plasmin-like activity, the content of fibrinogen, type I plasminogen activator inhibitor, and von Willebrand factor.

According to our results, the growth of proteolytic, elastase, plasmin and thrombin-like activity, fibrinogen content, tissue plasminogen activator level, type I plasminogen activator inhibitor, von Willebrand factor and delayed fibrinolytic activity were observed in patients with pre-cancerous ENT.

Increased proteolytic, plasmin-like activity, fibrinogen content, prothrombin pool, plasminogen tissue plasminogen activator, type I plasminogen activator inhibitor, and von Willebrand factor were shown in patients with the second stage of malignant neoplasms of ENT organs. In people with the third stage of the

malignant process, the most expressed changes were observed in all the studied parameters. For patients in this group, an increase in the total proteolytic-, thrombin-, elastase- and plasmin-like activities, the content of fibrinogen, the prothrombin pool, the level of the tissue plasminogen activator, the inhibitor of the plasminogen activator I and the von Willebrand factor, and the decrease in the α_1 -IP content, the growth of the α_2 M level and slowing down of fibrin clot lysis time.

The obtained results broaden the understanding of the role of components of the hemostasis system and the changes in their content and activity in inflammatory and oncological processes of ENT organs.

The main cause of lethality in malignant neoplasms of ENT organs is local relapses and metastases to the lymph nodes of the neck, with high mortality rate among patients already in the first year after diagnosis. The use of standard criteria based on the clinical and morphological characteristics of the tumor process to evaluate the prognosis of the course of the disease is not informative. Therefore, the search for additional indicators that could reflect the actual state of tumor progression and determine the outlook for the development of malignant neoplasms of ENT organs is relevant. It is common knowledge that there is insufficient information about individual indicators or markers of cancer. More informative may be the use of a value that combines several parameters.

The data obtained in the work allowed to create a prognostic index that took into account the abandonment of the control of the preoperative indexes of fibrinogen content, α_2 -macroglobulin and the level of thrombin-like activity.

For each patient, the index reflects the ratio of the content of fibrinogen ([Fg]), α_2 -macroglobulin ($[\alpha_2$ M]) and thrombin-like activity ([Thr]) to the mean value of the control value of the corresponding indicator and expressed in dimensionless quantities.

The calculated individual values of the patients of the studied groups made it possible to obtain the average index value of $6,35 \pm 1,67$ for the group of patients with relapses and metastases and $2,65 \pm 0,53$ for the group of patients with

remission, the probability of the index difference between the groups $p < 0,05$. The proposed index allows to predict the occurrence of relapse or metastases in patients with stage III laryngeal cancer, which is extremely necessary for patients with such tumors due to the high frequency of their development and the main cause of mortality in patients.

Excessive proteinase secretion and proteinase-inhibitory protein breakdown in inflammatory diseases and tumors leads to a significant amount of proteolytically damaged proteins. Such derivatives of proteolytic enzymes and their proforms are capable of splitting other proteins. Due to structural inferiority, damaged proteinases are not inactivated by inhibitors present in the bloodstream. Traditional studies of proteolytic derivatives of plasminogen include the study of non-enzymatic fragments of the heavy chain (angiostatins), leaving out the attention of the existence of the lung domain in the bloodstream of plasminogen containing the active center.

For the first time, experimentally with the enzyme-forease method, the formation of blood-borne patients with benign, precancerous and malignant neoplasms of ENT organs of plasminogen fragments containing proteolytic SP-domain has been proved. Due to the absence of the kringle structures, such a degraded derivative is not inhibited by circulating inhibitors in the bloodstream and has the properties of a low-specific trypsin-like proteinase. Such plasminogen fragments, although they are functional inferior, however, due to their low specific hydrolytic activity, can play a significant role in breaking the proteinase-inhibitory balance of blood and make a significant component of the pathological process.

It is known that plasminogen can be proactivated in the soluble state of streptokinase, resulting in the formation of a hydrolytic center in the plasminogen molecule as a result of confirmatory transformations without splitting the activation link Arg₅₆₁-Val₅₆₂. Investigations of these mechanisms in vitro do not take into account the interaction of other proteinaceous components of blood.

For the first time in conditions close to the natural, α_2 -macroglobulin has been shown to be involved in the activation of plasminogen by streptokinase in blood

plasma. It has been shown that the activation effect of streptokinase in the protein components of the plasma is mediated by the formation of the plasminogen-streptokinase- α_2 -macroglobulin triple complex, which detects both the amidolytic plasmin-like effect and the activation effect relative to the plasminogen.

It broadens the view of the mechanisms of activation and therapeutic action of streptokinase and allows to explain the complex dynamics of circulation in the blood flow of acylated plasminogen-streptokinase complexes. The existence of significant differences between the functioning of proteins in vivo and in the purified form leads to a misinterpretation of the experimental data and the formation of erroneous conclusions based on them. Deepening of the data on the peculiarities of the activation action of streptokinase in human plasma will allow the correct planning of experimental studies on the study of the functioning of the fibrinolytic plasma system when using streptokinase as a plasminogen activator.

Our research suggests that the disruption of the functioning of the components of the hemostasis system causes or accompanies chronic inflammatory processes and the development of tumors of ENT organs. Improvement of diagnostics of diseases, substantiation of applied pathogenetic therapy is possible under the condition of expanding information about proteolysis processes in these diseases. In this connection, the study of the components of the concomitant and fibrinolytic units of the hemostasis system and their inhibitors in the studied diseases of ENT organs can undoubtedly have theoretical and practical significance.

Key words: inflammation, oncological process, ENT organs, hemostatic system, clotting, fibrinolysis, proteinases, inhibitors.

СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

– в наукових періодичних фахових виданнях України, в т.ч., що входять до міжнародних наукометричних баз:

1. Клись ЮГ, Верьовка СВ. Особливості активаційної дії стрептокінази в плазмі крові людини. Вісник Одеського Національного Університету. Біологія. 2010;15(6):С.9-14.

2. Клись ЮГ, Верьовка СВ. Асоційовані з мембранами компоненти ендогенної інтоксикації та їх роль в онкогенезі. Вісник КНУ імені Тараса Шевченка, Серія: Проблеми регуляції фізіологічних функцій. 2011;57:18-20.

3. Клись Ю, Верьовка С. Зміни протеолізного балансу плазми крові хворих на запальні захворювання та новоутворення верхніх дихальних шляхів. Вісник КНУ імені Тараса Шевченка, Серія: Проблеми регуляції фізіологічних функцій. 2015; 2(19): 41-43.

4. Klys' YG, Gryn' NV, Verevka SV. Combined use of haemostatic system indices for evaluation of upper respiratory tract cancer. Experimental Oncology. 2016;38(1):36-39.

5. Клись Ю, Верьовка С, Галенова Т, Вовк Т. Фактори ризику гемостатичного дисбалансу хворих на запальні захворювання та новоутворення ЛОР-органів. Вісник КНУ імені Тараса Шевченка, Серія: Проблеми регуляції фізіологічних функцій. 2016;1(20): 19-22.

6. Клись ЮГ. Протеолітично ушкоджені похідні плазміногену за новоутворень верхніх дихальних шляхів. Науковий вісник Чернівецького університету. Біологічні системи. 2016;8(2):171-175.

– в інших наукових виданнях:

1. Клись ЮГ, Зайцева НВ, Кизим АИ, Веревка СВ. Протеолитически деградированные производные плазминогена и их возможное диагностическое значение при онкологических процессах. Лабораторная диагностика. 2008;2(44):52-58.

2. Клысь ЮГ, Сторчак РМ, Вережка СВ. Протеолитически деградированные производные ферментов, их диагностическое и терапевтическое значение. В кн.: Молекулярная патология белка. Под ред. Д.И. Заболотного. К.: Логос, 2008:142-153.

3. Klys' YuG, Storchak RM, Verevka SV. Proteolytically degraded enzymes derivatives: Their diagnostic and therapeutic value. In: Molecular Pathology of Proteins (Zabolotny DI, Ed.), Nova Science Publishers, NY. 2009:139-151.

4. Клысь ЮГ, Зайцева НВ, Кизим АИ, Вережка СВ. Протеолитические производные пламиногена при развитии злокачественных новообразований. Онкология. 2010;12(1):17-21.

5. Верьовка СВ, Голобородько ОП, Кизим ОЙ, Клысь ЮГ, Зайцева НВ. Дослідження компонентів систем протеолізу та гемостазу в плазмі хворих із злоякісними новоутвореннями верхніх дихальних шляхів до і після хірургічного втручання. Журнал вушних, носових і горлових хвороб. 2010;3:2-9.

6. Голобородько ОП, Кизим ОЙ, Клысь ЮГ, Верьовка СВ, Зайцева НВ, Кікоть ЮВ, Савченко ТД. Дослідження компонентів протеолітичної, коагуляційної та фібринолітичної систем плазми крові пацієнтів з різною патологією ЛОР-органів. Журнал вушних, носових і горлових хвороб. 2010;5:34-39.

7. Голобородько ОП, Кизим АИ, Клысь ЮГ, Зайцева НВ, Вережка СВ. Оценка риска послеоперационного рецидива и метастазирования по предоперационным показателям системы гемостаза при раке верхних дыхательных путей. Лабораторная диагностика. 2011;1 (55):3-7.

8. Клысь ЮГ, Кизим ОЙ, Голобородько ОП, Зайцева НВ, Кікоть ЮВ, Савченко ТД, Верьовка СВ. Скринінг показників гемостатичної системи як можливих первинних маркерів онкогенезу. Лабораторна діагностика. 2011;2(56):20-25.

9. Патент на корисну модель № 61639 Україна, А61К 38/43 (2006.01) А61К 38/55 (2006.01) G01N 33/49 (2006.01). Спосіб прогнозування

виникнення рецидиву і метастазів у хворих на рак гортані. Кизим ОЙ, Голобородько ОП, Клись ЮГ, Зайцева НВ, Верьовка СВ. № U 201015865 заявлено 29.12.2010, опубліковано 25.07.2011. Бюл. № 14.

10. Верьовка СВ, Голобородько ОП, Кизим ОЙ, Клись ЮГ, Зайцева НВ. Показники гемостатичної системи для оцінки перебігу захворювання на рак верхніх дихальних шляхів (Методичні рекомендації) (27.11/183.11), Київ, 2012, 20 с.

Тези наукових доповідей:

1. Зайцева Н, Клись Ю. Протеолитические производные плазминогена в патогенезе онкологических заболеваний. Матеріали всеукраїнської наукової конференції з міжнародною участю “Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології”, Дніпропетровськ, 30-31 жовтня 2008; с.62.

2. Клись ЮГ, Куркина ТВ. Молекулярные трансформации плазминоген-стрептокиназного комплекса в плазме крови человека. Матеріали III Міжнародної конференції молодих науковців “Біологія: від молекули до біосфери”, м. Харків, 18-21 листопада 2008; с.116-117.

3. Клись ЮГ, Верьовка СВ. Ензиматично деградовані та функціонально неповноцінні протеїни та їх вплив на перебіг метаболічних процесів. Матеріали X Українського біохімічного з’їзду, 13-17 вересня 2010 р., м. Одеса. Укр. біохім. журн. 2010;82(4(Додаток 2)):с.18.

4. Зайцева НВ, Клись ЮГ. Протеолітично ушкоджені компоненти системи гемостазу як діагностично-прогностичні маркери онкологічного процесу. Матеріали X ювілейної наукової конференції молодих онкологів за участю міжнародних спеціалістів “Сучасні проблеми експериментальної та клінічної онкології”, м. Київ, 22-24 квітня 2010; с.48-49.

5. Верьовка СВ, Голобородько ОП, Кизим ОЙ, Клись ЮГ, Зайцева НВ. Оцінка ризику післяопераційних ускладнень та рецидиву онкозахворювань верхніх дихальних шляхів за передопераційними показниками гемостатичної системи. Матеріали щорічної традиційної весняної конференції Українського наукового медичного товариства оториноларингологів “Сучасні методи

діагностики і лікування запальних захворювань ЛОР-органів”. Журн. вушних, носових і горлових хвороб. 2012;№ 3-с:с.33.

6. Клысь Ю. Протеолітично деградовані протеїнази в формуванні протеолітично-інгібіторного дисбалансу за онкогенезу. Матеріали Другої міжнародної наукової конференції “Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології”, м. Дніпропетровськ, 24-25 вересня 2013; с.69.

7. Клысь ЮГ. Показники гемостатичної системи як критерій прогнозу рецидиву та метастазування у хворих на рак верхніх дихальних шляхів. Матеріали XI Українського біохімічного конгресу, 6-10 жовтня 2014 р., Київ. Укр. біохім. журн. 2014;86(5 (Suppl.1):с.85.

8. Гринь Н, Клысь Ю, Ворошилова Н. Аналіз складових протеолітичної ланки в плазмі крові хворих на злоякісні новоутворення при носових пазух і порожнини носа. Збірник тез третьої міжнародної наукової конференції “Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології”, м. Дніпропетровськ, 24-25 вересня 2015; с.92-93.

9. Клысь Ю. Особливості показників гемостатичної системи у хворих на запальні захворювання та новоутворення ЛОР-органів. Матеріали XX міжнародного медичного конгресу студентів та молодих вчених м. Тернопіль, 25-27 квітня 2016; с.231.

10. Клысь Ю. Гемостатичні показники за новоутворень верхніх дихальних шляхів. Матеріали четвертої міжнародної наукової конференції “Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології”, м. Дніпро, 5-6 жовтня 2017; с.154-156.

ЗМІСТ

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ СКОРОЧЕНЬ	19
ВСТУП	20
РОЗДІЛ 1. Огляд літератури	
1.1. Протеолітичні каскади в системі гемостазу.....	27
1.2. Компоненти системи гемостазу при запальних та онкологічних процесах.....	34
1.3. Шляхи та механізми утворення структурно ушкоджених білків за норми та патології.....	43
РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи	
2.1. Характеристика груп, які досліджувалися.....	49
2.2. Реагенти та матеріали.....	50
2.3. Обладнання.....	50
2.4. Отримання плазми крові.....	51
2.5. Визначення загальної протеолітичної активності (ПРА).....	51
2.6. Визначення вмісту α_1 -інгібітора протеїназ (α_1 ІІ).....	52
2.7. Визначення вмісту альфа-2-макроглобуліну (α_2 М).....	53
2.8. Визначення концентрації фібриногену у плазмі крові.....	54
2.9. Визначення вмісту антитромбіна ІІІ.....	55
2.10. Визначення активованого парціального (часткового) тромбoplastиного часу (АЧТЧ)	55
2.11. Визначення протромбінового (тромбoplastиного) часу.....	56
2.12. Визначення тромбінового часу.....	56
2.13. Визначення фібринолітичної активності плазми крові.....	57
2.14. Визначення амідолітичної тромбін-подібної активності.....	58
2.15. Визначення плазмін-подібної активності	58
2.16. Визначення активності еластази.....	59

2.17. Визначення вмісту протромбінового пулу в плазмі крові.....	59
2.18. Імуноферментний аналіз.....	60
2.19. Хроматографія, що поділяє за розмірами.....	60
2.20. Метод ензим-електрофорезу.....	61
2.21. Статистична обробка результатів досліджень.....	62
РОЗДІЛ 3. Результати досліджень та їх обговорення	
3.1. Зміни показників системи гемостазу за запальних та онкологічних захворювань ЛОР-органів.....	63
3.2. Особливості функціонування плазмін/плазміногенової системи гемостазу за новоутворень верхніх дихальних шляхів.....	103
РОЗДІЛ 4. Заключення.....	116
ВИСНОВКИ.....	124
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	126
ДОДАТОК 1.....	155

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ СКОРОЧЕНЬ

АТ-III – антитромбін III

A₂-АП – α₂-антиплазмін

АЧТЧ – Активований парціальний (частковий) тромбопластиновий час

К – крингл

ПАІ-1, ПАІ-2, ПАІ-3 – інгібітори активатору плазміногену I, II, III типу (відповідно)

Пг – плазміноген

Ск – стрептокіназа

α₁ІІІ – α₁-інгібітор протеїназ

α₂МГ – α₂-макроглобулін

ІІ-1α – інтерлейкін-1α

ІІ-1β – інтерлейкін-β

FGF – фактор росту фібробластів

ММР – матриксні металопротеїнази

МСР-1 – фактор хемотаксису моноцитів-1

PARs – protease-activated receptors

PDGF – тромбоцитарний фактор росту

proММР – попередник матриксних металопротеїназ

SP-домен – серин-протеїназний домен

TGFβ – трансформуючий фактор росту β

TNF-α – фактор некрозу пухлин α

t-PA – tissue type plasminogen activator

u-PA – urokinase-type plasminogen activator

VEGF – судинно-ендотеліальний фактор росту

vWF – von Willebrand factor

ВСТУП

Актуальність теми. Ефективна діагностика, лікування та профілактика будь-якого захворювання неможливі без з'ясування молекулярних механізмів, що становлять основу патологічного процесу. Стрімке поширення онкологічних захворювань та необхідність виявлення ризику післяопераційного рецидиву та метастазування становить гостру проблему сучасної біохімії та медицини. Зокрема, в нашій країні щорічно виявляють біля 7000 ЛОР-онкологічних хворих, що складає 7,8% від загальної онкозахворюваності [1-3]. У більшості випадків злякисні новоутворення ЛОР-органів виявляють на пізніх стадіях. Основною причиною смертності при цих захворюваннях є місцеві рецидиви і метастази в лімфатичні вузли шиї [4]. Відомо, що розвитку злякисного процесу передують ряд послідовних трансформацій епітеліальних клітин слизової оболонки. При цьому в 60 % випадків рак гортані розвивається внаслідок тривалого перебігу передракових захворювань, що тісно пов'язані з хронічними запальними процесами [5-7]. Тому вивчення загальних механізмів розвитку онкологічних захворювань, пошуки молекулярних маркерів виникнення післяопераційних рецидивів та метастазів належить до актуальних напрямків медико-біологічних досліджень.

На особливу увагу при цьому заслуговують компоненти гемостазу, оскільки протеолітичні ензими, їх неактивні попередники, активатори та інгібітори знаходяться в складних взаємозв'язках, що забезпечують контроль за багатоланковими та різноспрямованими каскадними процесами гемостазу [8]. Порушення узгодженості між ними призводить до неконтрольованого протеолізу, нефункціональної активації компонентів систем зсідання крові, фібринолізу, комплементу, кініногенезу та деструкції клітин. Компоненти протеїназно-інгібіторної системи відіграють важливу роль в механізмах, що забезпечують загальну регуляцію процесу запалення в організмі. Надмірна

активація протеолізу є найважливішою біохімічною ланкою у розвитку запалення. При онкологічних захворюваннях порушення функціонування системи гемостазу обумовлено комплексною взаємодією її компонентів, злоякісних клітин та елементів стромы. Ракові клітини стають індукторами нефункціональної активації протеолізу. Вони не лише продукують підвищену кількість специфічних протеїназ, але й активують проензими системи гемостазу [9]. Це впливає як на локальний, так і системний гемостаз, сприяє процесам інвазії та метастазування та забезпечує різні етапи багатоступеневого процесу канцерогенезу та процеси взаємовідносин між злоякісними клітинами та клітинами оточуючих тканин [10,11]. Надмірна секреція протеїназ при запальних захворюваннях та новоутвореннях призводить до порушення протеїназно-інгібіторного балансу [12]. Це відіграє істотну роль в розвитку патології, призводить до утворення нехарактерних для здорових тканин протеїнових похідних та може мати вагому інформативну цінність для розуміння механізмів розвитку захворювань та створення нових підходів для оцінки стану хворого.

Загальноновизнано, що відомі маркери онкозахворювань мають досить обмежену інформативність. Тому в останні роки дедалі більшого поширення набувають підходи, що ґрунтуються на визначенні кількох показників [13]. Саме до досліджень такого напрямку належить проведене нами вивчення групи показників системи гемостазу при новоутвореннях верхніх дихальних шляхів. Робота спрямована на комплексне вивчення показників гемостазу з метою розширення відомостей щодо особливостей функціонування системи гемостазу при запальних та онкологічних процесах ЛОР-органів. Такі уточнені наукові дані мають важливе значення для поглибленого з'ясування патофізіологічних механізмів, що призводять до розвитку досліджуваних захворювань.

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

Представлена дисертаційна робота є завершеним дослідженням, що виконане автором відповідно до програми експериментальних досліджень, спланованих, проведених та узагальнених протягом 2009-2016 років. Робота виконана на кафедрі біохімії ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка у рамках науково-дослідних тем «Визначення біохімічних, генетичних, імунологічних та цитологічних маркерів розвитку патологічних станів організму з метою розробки засобів направленої корекції і профілактики» (№ д/р 0106U005750, 2005-2010 рр.) та «Механізми реалізації адаптаційно-компенсаторних реакцій організму за умов розвитку різних патологій» (№ д/р 0111U004648, 2011-2016 рр.).

Мета та завдання дослідження. Мета роботи – дослідити стан системи гемостазу при запальних та онкологічних процесах ЛОР-органів.

Для досягнення мети були поставлені наступні завдання:

1. Провести комплексну оцінку показників системи гемостазу за хронічного тонзиліту та новоутворень ЛОР-органів.
2. Визначити інформаційну цінність досліджуваних показників щодо прогнозу перебігу злоякісних захворювань ЛОР-органів.
3. Дослідити наявність протеолітично ушкоджених похідних плазміногену за новоутворень ЛОР-органів.
4. З'ясувати особливості активації плазміногену стрептокіназою за умов, наближених до фізіологічних.

Об'єкт дослідження: система гемостазу у пацієнтів із запальними та онкологічними процесами ЛОР-органів.

Предмет дослідження: компоненти зсідаючої та фібринолітичної систем крові хворих із хронічним тонзилітом, доброякісними, передраковими та злоякісними захворюваннями ЛОР-органів у доопераційний період.

Методи дослідження: визначення вмісту досліджуваних компонентів системи гемостазу проведено з застосуванням комплексу біохімічних

методів. Ферментативні активності визначали спектрофотометрично з використанням хромогенних субстратів, специфічних до плазміну, тромбіну та еластази. Протеолітичну трипсин-подібну активність визначали за гідролізом протаміну із забарвленням продуктів реакції за Сакагуші. Вміст білкових інгібіторів – антитромбіну III, α_2 -макроглобуліну та α_1 -інгібітору протеїнази визначали за пригніченням дії відповідних ензимів. Показники тромбінового часу, протромбінового часу та АЧТЧ визначали за допомогою хронометричних тестів. Для визначення концентрації тканинного активатору плазміногену, інгібітору активатору плазміногену ПАІ-1 та фактору фон Віллебранда застосовували імуноферментний аналіз у модифікації ELISA. Вміст протеолітично деградованих похідних плазміну в плазмі крові досліджували методом ензим-електрофорезу. Фракціонування плазми крові проводили за допомогою хроматографії, що розподіляє за розмірами.

Наукова новизна одержаних результатів.

Вперше проведено комплексне дослідження параметрів системи гемостазу при хронічному тонзиліті, доброякісних, передракових та злоякісних новоутвореннях ЛОР-органів. Внаслідок проведеної роботи отримано нові наукові дані, що істотно поглиблюють уявлення про функціонування системи гемостазу при досліджуваних захворюваннях. Виявлено зміни ключових показників фібринолітичної, зсідуючої ланок системи гемостазу та компонентів інгібіторного потенціалу плазми.

Вперше у плазмі крові хворих із новоутвореннями ЛОР-органів експериментально доведено утворення протеолітично ушкоджених похідних плазміногену, що містять SP-домен на відміну від досліджень неферментативних фрагментів важкого ланцюга (ангіостатинів). Виявлені деградовані похідні плазміногену можуть відігравати істотну роль в порушенні протеїназно-інгібіторного балансу крові.

Вперше показано участь α_2 -макроглобуліну у процесі активації плазміногену стрептокіназою в плазмі крові та доведено утворення складних асоційованих похідних. Встановлено, що активаційна дія стрептокінази в

складі білкових компонентів плазми крові опосередкована утворенням потрійного комплексу плазміноген-стрептокіназа- α_2 -макроглобулін, що виявляє як амідолітичну плазмін-подібну дію, так і здатність до перетворення плазміногену у плазмін. Це поглиблює відомі уявлення щодо механізмів активаційної дії стрептокінази.

Практичне значення одержаних результатів.

Виявлені закономірності змін досліджуваних компонентів системи гемостазу при хронічному тонзиліті та новоутвореннях ЛОР-органів створюють вагоме теоретичне та практичне підґрунтя для розуміння особливостей перебігу патофізіологічних процесів, що становлять основу розвитку досліджуваних захворювань. Отримані в роботі дані дозволили розробити прогностичний індекс, що за комплексного урахування доопераційних показників вмісту фібриногену, α_2 -макроглобуліну та рівня тромбін-подібної амідолітичної активності дає можливість прогнозувати розвиток рецидиву чи метастазів у хворих із злоякісними новоутвореннями ЛОР-органів. Доцільність подібного підходу зумовлена обмеженою інформативністю відомих маркерів онкозахворювань, в останні роки дедалі більшої актуальності набувають підходи, що ґрунтуються на визначенні кількох показників.

Поглиблення відомостей щодо особливостей активаційної дії стрептокінази в плазмі крові людини може бути інформативним при плануванні експериментальних досліджень для вивчення функціонування фібринолітичної системи при використанні стрептокінази як активатора плазміногену плазми крові.

Встановлені відміни показників системи гемостазу за новоутворень ЛОР-органів можуть бути основою для подальшого пошуку та розробки додаткових інформаційних критеріїв формування груп хворих підвищеного онкологічного ризику, що може істотно розширити можливості діагностики новоутворень ЛОР-органів.

Особистий внесок здобувача.

Здобувачем особисто здійснено пошук та проаналізовано наукову літературу за темою наукового дослідження, самостійно виконано експериментальні дослідження, обробку та теоретичне обґрунтування результатів, підготовку матеріалів до публікації. Планування експериментальних робіт, аналіз та обговорення отриманих результатів проведено спільно з науковим керівником д.б.н. Верьовкою С.В.

Плазма крові хворих на хронічний тонзиліт, доброякісні, передракові та злоякісні захворювання ЛОР-органів була надана лабораторією біохімії ДУ «Інститут отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка НАМН України».

Апробація результатів дисертації. Результати дисертації були представлені на вітчизняних та міжнародних конференціях: Всеукраїнській науковій конференції з міжнародною участю “Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології” (м. Дніпропетровськ, 2008), III Міжнародній конференції молодих науковців “Біологія: від молекули до біосфери” (м. Харків, 2008), X Українському біохімічному з’їзді (м. Одеса, 2010), X Ювілейній науковій конференції молодих онкологів за участю міжнародних спеціалістів “Сучасні проблеми експериментальної та клінічної онкології” (м. Київ, 2010), Щорічній традиційній весняній конференції Українського наукового медичного товариства оториноларингологів “Сучасні методи діагностики і лікування запальних захворювань ЛОР-органів” (м. Київ, 2012), Другій міжнародній науковій конференції “Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології” (м. Дніпропетровськ, 2013), XI Українському біохімічному конгресі (м. Київ, 2014), III міжнародній науковій конференції “Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології” (м. Дніпропетровськ, 2015), XX міжнародному медичному конгресі студентів та молодих вчених (м. Тернопіль, 2016), IV міжнародній науковій конференції “Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології” (м. Дніпропетровськ, 2017).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 26 наукових праць, у тому числі 5 статей у наукових фахових виданнях України, 1 стаття у науковому фаховому виданні України, включеному до міжнародних наукометричних баз даних, 8 публікацій в інших наукових виданнях, 1 патент на корисну модель, 1 методичні рекомендації, 10 тез доповідей у матеріалах наукових конференцій та з'їздів.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів досліджень, результатів досліджень та їх обговорення, заключення, висновків та списку літературних джерел (295 найменувань). Матеріали дисертаційної роботи викладено на 159 сторінках (з яких основна частина займає 125 сторінок), проілюстровано 4 рисунками та 17 таблицями.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Протеолітичні каскади в системі гемостазу

Система гемостазу складається зі значної кількості взаємопов'язаних білків, чия сумарна дія забезпечує підтримку крові в рідкому стані. Вона виконує дві протилежні задачі: максимальне зменшення крововтрати при ушкодженні судин та щонайшвидше відновлення вільної течії крові в цих судинах.

Функціонування системи гемостазу забезпечується взаємодією стінок кровоносних судин, формених елементів крові (еритроцитів, тромбоцитів, лейкоцитів), гуморальних факторів, що містяться у плазмі крові, та клітинних факторів формених елементів. Систему гемостазу умовно поділяють на три підсистеми, що знаходяться між собою у складних взаємозв'язках – судинно-тромбоцитарну (первинну), коагуляційну (вторинну) і фібринолітичну. Кожний компонент системи гемостазу вступає в реакцію залежно від типу й концентрації специфічних активаторів та інгібіторів у зоні реалізації своєї функції [14-15].

Судинно-тромбоцитарна ланка забезпечує зупинку кровотечі з дрібних судин. Її основна роль полягає в утворенні первинного, так званого, білого тромбоцитарного тромбу і забезпечується судинами та тромбоцитами.

Плазмова (коагуляційна) ланка є багатоетапним ферментативним процесом, в якому беруть участь білки плазми крові і тканин, надмолекулярні структури та іони кальцію. Її функціонування щільно пов'язане із судинно-тромбоцитарною ланкою. Необхідним компонентом процесу зсідання крові є тромбоцити. Вони містять білки, що беруть участь у процесах зсідання крові та їх регуляції. Агреговані активовані тромбоцити забезпечують негативно заряджену фосфоліпідну поверхню, яка є

необхідною умовою для проходження реакцій. Кінцевою метою коагуляційного гемостазу є перетворення фібриногену в фібрин і наступне формування фібринового згустку, що збільшує щільність первинного тромбу і закріплює його на судинній стінці в місці пошкодження.

Основна функція третьої – фібринолітичної – ланки полягає у високо вибіркового протеолітичному розщепленні фібринових депозитів в системі кровотоку та поза ним і підтримку гемостатичного балансу крові. Лізис фібринового згустку є одним з початкових етапів відновлення після пошкодження кровоносних судин [16].

З біохімічної точки зору механізми зсідання крові та фібринолізу є класичним прикладом каскадних активаційних процесів, за яких утворена активна форма певного ферменту відіграє роль активатора проформи іншого білка. Як правило, активаційне перетворення зумовлене обмеженням і строго визначеним протеолітичним розщепленням в молекулі проформи, що зазнає конформаційних змін з формуванням активного центру. Надмірна активність утворюваних при цьому ферментів обмежується присутніми в кровообізі високо специфічними інгібіторами. Більшість реакцій каскаду зсідання крові проходять не у вільному розчині, а на поверхні фосфоліпідних мембран, активованих тромбоцитів, лейкоцитів, ендотеліальних клітин в присутності іонів кальцію та білкових кофакторів. Для подібних каскадних реакцій характерно зростання швидкості перебігу процесів на кожному наступному активаційному етапі. При цьому формується позитивний зворотній зв'язок, що також сприяє пришвидшенню процесу зсідання крові [14,17-19].

Процеси зсідання знаходяться під контролем групи антикоагулянтів. Їх поділяють на первинні та вторинні. Первинні синтезуються та постійно циркулюють в кровообізі незалежно від процесу зсідання крові. Вони не впливають на неактивні форми факторів гемостазу. До них належать антитромбін III (АТ-III), гепарин, α_1 -інгібітор протеїназ (α_1 -PI), α_2 -макроглобулін (α_2 -MG), протеїн С та інгібітор комплементу-1. Вторинні антикоагулянти утворюються в процесі зсідання крові та фібринолізу [20,21].

Функціонування коагуляційного каскаду реакцій умовно поділяють на три фази. Загальна схема зсідання крові представлена на рис. 1.1.

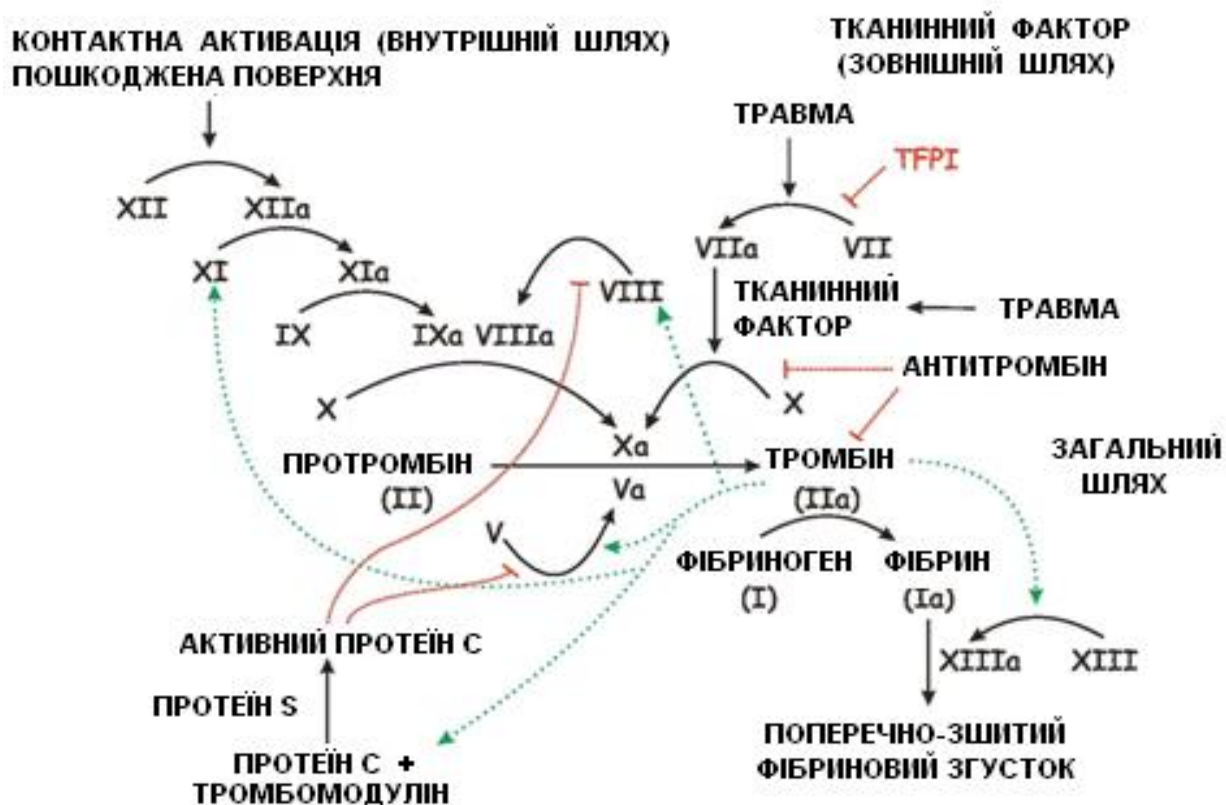


Рис. 1.1. Загальна схема зсідання крові.

1. Утворення протромбіназного комплексу. В залежності від механізму формування протромбінази умовно поділяють внутрішній і зовнішній шляхи її утворення. Обидва вони спрямовані на активацію фактору X та формування протромбіназного комплексу, що перетворює протромбін на тромбін. Внутрішній шлях протікає за наявності негативно зарядженої поверхні – колагену, початковою реакцією є перетворення неактивного фактора XII на XIIa, котрий діє на фактор XI (плазменний попередник тромбопластину), перетворюючи його на фактор XIa з наступною активацією ним IX (антигемофільний фактор Крістмаса). Після цього IXa зі своїм кофактором VIIIa формують теназний комплекс, котрий активує фактор X [22]. Проходження зовнішнього шляху відбувається при вивільненні

тканинного тромбoplastину (TF, фактор III) із ушкоджених тканин під час травмування судинної стінки. TF активує фактор VII (проконвертин) до VIIa. TF і фактор VIIa формують активний комплекс, який активує фактор X через попередню активацію фактора IX. Фактор Xa та його кофактор Va формують комплекс тканинної протромбінази, що активує протромбін. Тромбін, що формується комплексом тканинної протромбінази, надалі активує інші компоненти коагуляційного каскаду: фактор V (проакцелерин); фактор VIII (антигемофільний глобулін A); фактор XI (плазменний попередник тромбoplastину). Внутрішній та зовнішній шляхи активації системи зсідання крові об'єднуються на етапі утворення протромбіназного комплексу [23].

2. Тромбіноутворення. Протромбіназний комплекс (фактор Xa-Va-фосфоліпідна поверхня) перетворює неактивний фактор II (протромбін) на активний фактор IIa (тромбін, К.Ф. 3.4.21.5). Завдяки цьому генеруються великі кількості тромбіну.

3. Фібриноутворення. В подальшому тромбін спричиняє перетворення фібриногену на фібрин-мономер. Фібриноген – білок, молекулярна вага якого становить 340 кДа, складається з двох однакових симетричних субодиниць, а кожна субодиниця - з трьох ланцюгів: A α , B β , γ . Між ланцюжками розташовані дисульфідні зв'язки. Молекула фібриногену має три основні домени: E, два D, та α C домени, які відіграють певну структурну та функціональну роль. Тромбін відщеплює фібринопептиди від молекули фібриногену, перетворюючи його в фібрин-мономер, що супроводжується експонуванням специфічних центрів полімеризації. Завдяки цьому відбувається формування протофібрил, що латерально асоціюють в фібрили, утворюючи таким чином фібринову сітку.

Проактивованій тромбіном фактор XIIIa за присутності іонів Ca²⁺ ковалентно прошиває фібринову сітку утворенням внутрішньо- та міжмолекулярних зв'язків по залишкам глутаміну та лізину α -ланцюгів. Таким чином, волокна полімеризованого фібрину, розгалужені і стабілізовані фXIIIa, утворюють згусток, що запобігає кровотечі.

Після утворення згустку настає посткоагуляційна фаза ущільнення (ретракції) під впливом VIII фактору тромбоцитів (ретрактозима). Одночасно з ретракцією починається фібриноліз - гідролітичне розщеплення фібрину - під дією компонентів фібринолітичної системи крові [24,25].

До складу фібринолітичної системи входять протеолітичний ензим плазмін і його неактивний попередник плазіноген, його активатори (тканинний активатор, урокіназа) та інгібітори (α_2 -антиплазмін, α_2 -макроглобулін), інгібітори активаторів плазіногену, інгібітори фібринолізу (ТАFІ, антитрипсин).

Основний фермент фібринолітичної системи – плазмін (К.Ф. 3.4.21.7) циркулює в кровообізі в формі свого профермента – плазіногену. Саме плазмін забезпечує розщеплення фібринового згустку на окремі розчинні фрагменти. Нативний плазіноген складається з N-кінцевого домену, п'яти кринглових доменів і серин-протеїназного домену (SP-домен), і має закрити конформацію, що резистентна до дії активаторів та забезпечується внутрішньомолекулярними взаємодіями в структурі проензиму (Рис. 1.2).

Кринглові домени забезпечують взаємодію плазіногену з поверхнею фібринового згустку, інгібітором – α_2 -антиплазіном і клітинними рецепторами. Такі взаємодії призводять до порушення внутрішньомолекулярних міждоменних зв'язків і молекула проензиму набуває відкритої конформації, здатної до активації. Активація плазіногену в плазмін опосередкована фізіологічними активаторами, що забезпечують вибіркоче розщеплення активаційного зв'язку в SP-домени у положенні Arg₅₆₁-Val₅₆₂ профермента плазіногена з перетворенням його на активний фермент плазмін.

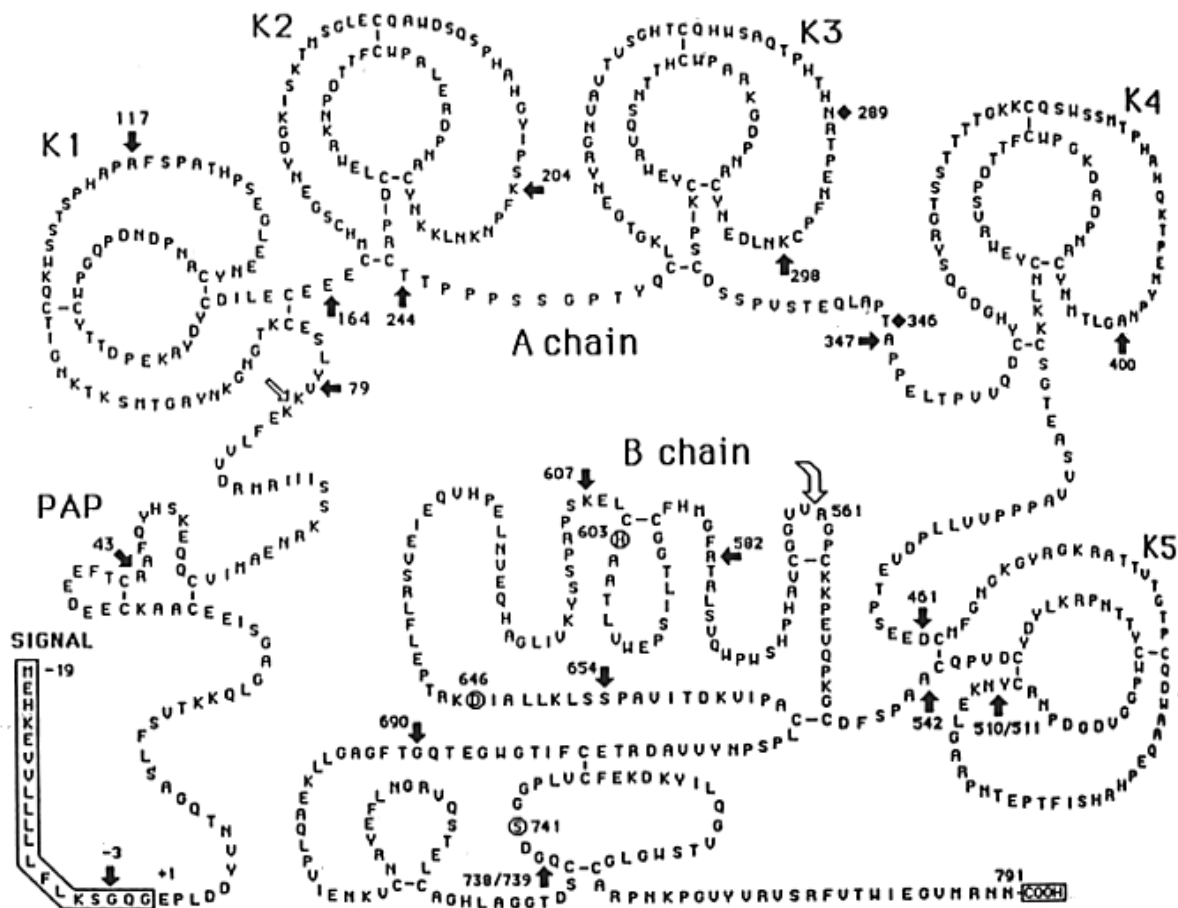


Рис.2. Схема структури молекули плазміногену людини: А – важкий, В - легкий ланцюги плазміногену; K1, K2, K3, K4, K5 – крінглові структури; біла стрілка вказує на активаційний зв'язок Арг561-Вал562; Гіс₆₀₃, Асп₆₄₆ і Сер₇₄₁ каталітична триада активного центру плазміну.

Головну роль в активації плазміногену в плазмін відіграє тканинний активатор плазміногену (t-РА, К.Ф. 3.4.21.68). Подібно до плазміногену та плазміну, t-РА виявляє високу спорідненість до фібрину, при чому внаслідок комплексоутворення з фібрином активаційна дія t-РА на плазміноген багаторазово підсилюється. Тобто процес активації плазміногену t-РА відбувається в сорбованому на фібриновій сітці стані. Урокиназа (u-РА, К.Ф. 3.4.21.73) здатна активувати плазміноген в плазмін в розчинному стані. В зв'язаному з рецепторами клітин стані урокіназа забезпечує протеоліз на поверхні клітин, активуючи плазміноген з наступною деградацією компонентів клітинного матриксу. Порівняно до цих двох активаторів

плазміногену внесок третього – фактора XIIa (К.Ф. 3.4.21.38) – до загального активаційного потенціалу крові вважають незначним. Специфічна сорбція плазміногену та t-PA на поверхні фібрину забезпечується групою зв'язуючих сайтів, що виявляють високу спорідненість до певних ділянок фібрину. Розщеплення плазміном пептидних зв'язків у фібрині веде не лише до утворення розчинних продуктів деградації фібрину, але й до експозиції на фібриновій сітці нових ділянок – лігандів зв'язуючих ділянок плазміну. Сорбція на фібрині захищає плазмін від інактивації циркулюючим в кровообізі інгібітором – α_2 -антиплазміном, що миттєво блокує вивільнений після розщеплення згустку плазмін [14].

Окрім фізіологічних активаторів плазміногену, відомі й нефізіологічні, зокрема – бактеріального походження. Найбільш відомою з них є стрептокіназа – білок, що продукується гемолітичними стрептококами та здатний утворювати комплекс з плазміногеном з формуванням активного центру без розриву активаційного зв'язку Arg₅₆₁-Val₅₆₂. Комплекс виявляє обмежену фібринолітичну активність, не блокується α_2 -антиплазміном, однак здатен ефективно активувати як вільний, так і зв'язаний з фібриновою сіткою плазміноген в плазмін. Відносна простота виділення та помірні вартість зумовили широке впровадження стрептокінази і ряду її похідних в клінічну практику в якості фібринолітичного засобу [26].

Активація плазміноген/плазмінової системи є фізіологічною відповіддю на утворення фібринового згустку. Процес активації плазміногену тканинним активатором ініціюється полімеризацією фібрину, тобто фібрин є одночасно і субстратом фібринолітичної системи, і її кофактором. Плазмін, активований на фібрині t-PA, лізує полімерний фібрин з утворенням розчинних продуктів деградації. Також ензим здатен гідролізувати фібриноген. Фрагментація фібриногену та непрошитого полімерного фібрину плазміном є однаковою і здійснюється в декілька послідовних стадій, на яких утворюються фрагменти X, Y, D і E. В

молекулі фібриногену плазмін гідролізує 42 пептидних зв'язки з існуючих 181, утворених за участі залишків лізину або аргініну.

Як і у випадку системи зсідання крові, система фібринолізу містить як каскад із ферментів, що забезпечують активацію один одного, так і групу високоселективних інгібіторів, що обмежують дію кожного з них. Більшість з цих інгібіторів належить до сімейства серпінів – білкових інгібіторів протеїназ, що блокують комплементарні ферменти за рахунок утворення ковалентного зв'язку із залишком серину активного центру. Саме до сімейства серпінів належать інгібітори активаторів плазміногену I, II, III типу (відповідно ПАІ-1, ПАІ-2, ПАІ-3), α_2 -антиплазмін, та α_1 -інгібітор протеїназ. Натомість α_2 -макроглобулін – великий (725 кДа) білок зв'язує протеїнази поза активним центром, істотно обмежуючи їх дію по відношенню до білкових субстратів, однак активність протеїназ по відношенню до низькомолекулярних синтетичних субстратів лишається практично без змін.

В плазмі крові за надмірної активації та виснаження α_2 -антиплазміну плазмін руйнує фібриноген, фактори зсідання крові V (Va) і VIII (VIIIa) та деякі інші протеїни. Протеїни фібринолітичної системи залучені не тільки до фібринолізу, але і до процесів міграції клітин і відновлення тканин, функціонування макрофагів і запалення, інвазії трофобластів в ендометрій, ангіогенез та ін.

Окрему групу модуляторів функціональної активності компонентів фібринолітичної системи складають вітронектин, тромбоспондин та деякі мінорні фактори, здатні впливати на процес фібринолізу [14,21,27].

Таким чином, нормальна функція системи гемостазу – складний багатоетапний процес, що забезпечується прямими та оберненими взаємодіями як на молекулярному, так і клітинному рівні.

1.2. Компоненти системи гемостазу при запальних та онкологічних процесах

Відомо, що протеїнази забезпечують як повне розщеплення білків, так і реакції обмеженого протеолізу, що регулюють ключові фізіологічні процеси. За фізіологічних умов для збереження гомеостазу, протеїназна активність регулюється на різних рівнях від факторів, контролюючих експресію генів, біосинтез білка, посттрансляційну модифікацію до активації проферментів та обмеження активності ферментів селективними інгібіторами [28]. Каскади послідовної активації протеїназ утворюють високоорганізовані ланцюги реакцій, за яких початковий протеолітичний процес не спрямований на розщеплення субстрату, однак ініціює послідовність реакцій, що викликають специфічні біологічні ефекти. Цей процес отримав назву протеолітичний сигналінг, що при порушенні гомеостазу та розвитку дисбалансу між протеїназами, інгібіторами та субстратом зазнає суттєвих змін [29]. Це може бути причиною чи наслідком розвитку різних запальних, нейродегенеративних, серцево-судинних захворювань, атеросклерозу та остеопорозу [30-32]. Відомо, що ферменти каскадів системи гемостазу окрім виконання основної функції – утворення чи гідролізу фібринового згустку – беруть участь в регуляції найрізноманітніших фізіологічних і патофізіологічних процесів – загоюванні ран, овуляції та ембріогенезі, ремоделюванні тканин, ангіогенезі, у запальних, інфекційних, алергійних та імунних реакціях; інвазії та метастазуванні злоякісних пухлин. [8]. У відповідь на будь-яке пошкодження в організмі розвивається цілий комплекс фізіологічних реакцій, спрямованих на локалізацію вогнища пошкодження і швидке відновлення порушених функцій. Цей складний процес, спрямований на збереження гомеостазу, відомий як запалення [33]. Відомо, що протеоліз при запаленні протікає на рівні альтеративно-дистрофічних реакцій, що супроводжуються підвищенням протеолітичної активності на фоні зниження рівня інгібіторів протеїназ, у зв'язку з чим підвищується процес розщеплення

білків та накопичення у вогнищі запалення великої кількості поліпептидів та амінокислот [34]. При розвитку запалення в інтерстиціальній тканині зростає кількість вивільнених лізосомальних протеїназ, в розвитку запальних процесів беруть участь протеїнази різних типів [34-35]. Комплекс змін, що виникають безпосередньо за ушкодженням, в сукупності становить поняття гострої фази запалення. Білки гострої фази - це специфічна група білків крові, рівень яких змінюється у відповідь на розвиток гострого запалення. Особливістю більшості білків гострої фази є неспецифічність та взаємозв'язок їх концентрацій в крові з активністю захворювання і стадією процесу [36]. Відомо, що більшість трипсин-подібних протеїназ та їх інгібіторів крові належать до гострофазних білків, що виконують різні біологічні функції, спрямовані на зменшення запальної реакції, видалення пошкоджуючих факторів та відновлення порушеної структури в місці пошкодження або на рівні всього організму. Вони відіграють роль медіаторів каскаду запалення та відображають стан хворих при різних видах лікування. Запалення ініціює процеси зсідання, знижує активність натуральних антикоагулянтних механізмів і пригнічує активність фібринолітичних компонентів [37-38].

Відомо, що пухлини різних типів часто розвиваються на тлі процесів хронічного запалення [39,40]. Всі пухлини складаються із гетерогенних клітин: генетично змінених та нетрансформованих клітин (фібробластів, ендотеліальних, нейтрофілів, макрофагів, лімфоцитів, тучних клітин та ін.). У мікросередовищі пухлини клітини імунної системи синтезують величезну різноманітних регуляційних сполук. До них належать цитокіни, хемокіни, молекули активного кисню та азоту, цитотоксичні медіатори та індуктори проліферації клітин, а також різні класи протеїназ (цистеїнові, серинові, металопротеїнази). Вивільнення цих сполук у позаклітинний простір підсилює внутрішньопухлинні процеси запалення та створює умови, що підтримують процеси проліферації, генної нестабільності, злоякісного перетворення та розвитку пухлини. Пухлинні клітини здатні експресувати різні класи протеїназ, однак основним їх джерелом є клітини імунної

системи, що інфільтрують пухлину. Інфільтрація пухлини імунними клітинами є головним чинником розвитку запалення у пухлинному мікросередовищі [41]. Незалежно від механізму дії продукти онкогенів і генів-супресорів координують «запальну транскрипційну програму», а трансформовані клітини генерують запальне мікрооточення. Тобто формується механізм взаємопідсилення запального і пухлинного процесу [42].

Інвазія та метастазування – основні прояви прогресії пухлин – забезпечуються реакціями ремодулювання позаклітинного матриксу чи тканини строми. Для утворення метастатичної пухлини неопластичній клітині необхідно відділитися від первинного новоутворення, потрапити до мікроциркуляційного русла, прикріпитися у віддаленій кровоносній або лімфатичній судині, потрапити до паренхіми органу з наступною проліферацією і утворенням метастатичного вогнища. Руйнування позаклітинного матриксу становить необхідну умову для реалізації інвазивних та метастатичних властивостей пухлинних клітин. Ці процеси опосередковані численними протеолітичними ферментами, що належать до основних класів: серинових, аспарагінових, цистеїнових та металопротеїназ. Вони можуть безпосередньо руйнувати компоненти позаклітинного матриксу або активувати інші протеїнази, задіяні в цих процесах. Ці ферменти утворюють патологічний активаційний каскад, кінцевим результатом якого є протеоліз компонентів матриксу [43-44].

Імовірний порядок реакцій цього каскаду має такий вигляд. Прокатепсин В після активації катепсином D чи іншими протеїназами активує інші протеїнази, зокрема pro-uPA, що секретується у неактивній формі та після активації перетворює плазміноген у плазмін. Крім того, катепсин В і плазмін здатні розщеплювати деякі компоненти строми пухлини та активувати проферменти металопротеїназ. Внаслідок цих реакцій відбувається деградація глікопротеїнів катепсинами та плазміном, потім – колагену металопротеїназами. Ця послідовність зумовлена тим, що

глікопротеїни оточують колагенові структури для захисту їх від протеолізу, тому руйнування колагенових волокон можливе лише після дії плазміну. Деградація цих компонентів дестабілізує структуру позаклітинного матриксу та забезпечує здатність неопластичних клітин до міграції. Відділення неопластичної клітини від первинної пухлини також забезпечується системою протеолізу для розщеплення білків адгезії та міжклітинної взаємодії. Відомо, що головним компонентом базальної мембрани є колаген IV типу. За норми базальна мембрана не має отворів, достатніх за розміром для проникнення злоякісних клітин. Пенетрація базальної мембрани є активним процесом, за якого пухлинні клітини самі секретують і виділяють в оточуюче середовище відповідні протеолітичні ферменти. Крім того, їх секретують асоційовані з пухлиною макрофаги, фібробласти та лейкоцити [12,31].

Таким чином, послідовна дія різних за субстратною специфічністю та локалізацією протеїназ забезпечує деградацію позаклітинного матриксу та базальної мембрани, що сприяє розвитку раку. Активація цього каскаду протеїназ індукується переважно кислими протеїназами – катепсинами, що містяться головним чином у лізосомах. В нормальних клітинах лише 5-10% катепсинів знаходиться у цитозолі [45]. За розвитку пухлинного процесу відбувається порушення процесів посттрансляційного глікозилювання та фосфорилування проферментів в апараті Гольджі, що перешкоджає їх транспортуванню до лізосом. Тому в неопластичних клітинах більшість цих протеїназ міститься у цитозолі. Головна функція катепсинів полягає в розщепленні білків позаклітинного матриксу, базальної мембрани, активації попередників ферментів та гормонів шляхом обмеженого протеолізу. У злоякісних клітинах відмічена надмірна експресія та синтез аспарагінової протеїнази катепсину D. Так, при раку молочної залози, матки, кишківника та інших органів показано зв'язок між високим його вмістом у цитозолі та несприятливим прогнозом перебігу захворювання. Як ендопептидаза, катепсин D розщеплює різні білки та активує прокатепсини B та L, а також

інактивує цистатини – інгібітори цистеїнових протеїназ. Показано, що катепсин D стимулює проліферацію та ангіогенні властивості злоякісних клітин, діючи як мітогенний фактор незалежно від своєї протеолітичної активності [12,31,46].

Відомо, що цистеїнові протеїнази забезпечують протеолітичне розщеплення компонентів базальної мембрани та інтерстиціальної стромы. Серед них найбільшу увагу приділяють катепсину В. Показано, що збільшення рівня його синтезу та виділення неопластичними клітинами призводить до росту, інвазії та метастазування різних пухлин. Крім того, цей фермент бере участь у процесах трансформації передракових новоутворень у злоякісні. Прокатепсин В після активації катепсином D, G, еластазою, uPA чи tPA може розщеплювати компоненти позаклітинного матриксу (ламінін, еластин, фібронектин та різні типи колагену) чи активувати інші проферменти. Катепсин В опосередковано підсилює протеоліз, активуючи uPA, чим стимулює плазмін-металопротеїназний протеолітичний шлях. Крім того, катепсин В може змінювати баланс між металопротеїназами та їх інгібіторами, безпосередньо активуючи проколагеназу (proMMPs-3), простромелізін-1 (proMMPs-2) та інактивуючи деякі інгібітори металопротеїназ [47]. Усі цистеїнові протеїнази опосередковують протеолітичні реакції, що сприяють деградації компонентів позаклітинного матриксу, сприяючи процесам метастазування. При цьому вивільнюються пов'язані з ним деякі фактори росту, що можуть зв'язуватись із рецепторами пухлинних клітин та впливати на їх ріст. Активність цих ферментів контролюється тканинними та плазмовими інгібіторами, зокрема цистатинами, стефінами та α_2 -M [48].

Надзвичайно важлива роль у розвитку патологічних процесів належить компонентам системи активації плазміногену – самому плазміногену, двом його активаторам – uPA та tPA, клітинним рецепторам та інгібіторам. uPA синтезується у вигляді проформи, що активується плазміном, слідові кількості якого міститься у позаклітинному матриксі, еластазою та

катепсином В. Ці активатори опосередковують неоваскуляризацію, активуючи позаклітинний протеоліз, що, в свою чергу, веде до руйнування базальної мембрани і матриксних білків та створює умови для міграції ендотеліальних клітин і формування нових капілярів. Крім того, вони беруть участь у стимуляції міграції і проліферації клітин, процесах інвазії та метастазування. Окрім протеолітичної дії, система uPA/рецептори uPA сприяє процесам інвазії завдяки прямій взаємодії uPAR з інтегринами та вітронектином, опосередковуючи клітинну адгезію та міграцію. uPA експресується більшістю типів злоякісних клітин, причому його підвищений рівень належить до факторів несприятливого прогнозу. Провідна функція tPA полягає в активації сорбованого на фібриновому згустку плазміногену. Водночас він взаємодіє з аннексином на мембрані пухлинних клітин, де активує плазміноген та сприяє інвазивним процесам [49].

Клінічні спостереження та експериментальні дослідження при злоякісних пухлинах різної етіології та гістологічного типу підтвердили факт зсуву рівноваги в системі зсідання-антикоагуляція в бік стимуляції гемостатичних механізмів. Тромбоемболічні ускладнення виникають в 10-20% випадків і найчастіше є першим клінічним симптомом пухлинного росту, що виявляється задовго до діагностування хвороби. Відомо, що тромботичні ускладнення є другою за частотою причиною смерті онкологічних хворих. Розвиток порушень гемостатичних механізмів обумовлено комплексною взаємодією компонентів системи гемостазу, клітин пухлини і елементів стромы новоутворення [50].

Неопластичні клітини експресують ряд прокоагулянтів - активаторів системи гемостазу та інгібіторів антигемостатичних механізмів. Найбільш вивченими є тканинний фактор (TF) і раковий прокоагулянт. TF - трансмембранний глікопротеїд, що діє як поверхневий рецептор і кофактор активації фактору VII. Взаємодія TF з фактором VII призводить до створення комплексу, який активує фактор Ха та тромбін, що запускають процес зсідання крові. Раковий прокоагулянт є Ca^{2+} -залежною цистеїною

протеїназою, яка активує фактор X згортання крові незалежно від фактору VII [51].

Крім того, пухлинні клітини активують прокоагулянтну ланку системи гемостазу за рахунок утворення рецептора фактору V на поверхні плазмової мембрани, що прискорює формування протромбіназного комплексу (Ф.V + Ф.X + Ca²⁺ + тромбоцити). У пухлинних клітинах виявлена прокоагулянтна активність, що має властивості фактора XIII та підсилює міцність сформованого згустку фібрину [52,53].

У той же час здорова тканина може проявляти прокоагулянтну активність у відповідь на пухлину. Прозапальні цитокіни, в тому числі фактор некрозу пухлин (TNF- α) та інтерлейкін-1 (IL-1 α), що секретуються пухлинними клітинами, значно підвищують експресію TF моноцитів. Показано, що прокоагулянтна активність TF моноцитів і тканинних макрофагів відіграє вирішальну роль в активації зсідання крові у хворих зі злоякісними новоутвореннями. Прозапальні цитокіни, що виділяються пухлиною і клітинами крові, порушують регуляцію тромбомодуліну ендотеліальних клітин, підвищують експресію TF та інгібіторів фібринолізу (PAI-1) ендотелію. Порушення регулюючого впливу ендотелію знижує синтез антитромбіну III і протеїну C печінкою. Зазначені зміни призводять до посилення прокоагулянтної та зниження антикоагулянтної і фібринолітичної активності судинної стінки. Крім того, пухлинні клітини або їх циркулюючі мембрани впливають на тромбоцитарну ланку системи гемостазу, підвищуючи адгезію і агрегацію тромбоцитів. Це відбувається внаслідок утворення тромбіну, посилення метаболізму арахідонової кислоти та АДФ-індукованої агрегації тромбоцитів, підвищення рівня фактору Віллебранда [54-56].

Таким чином, активація системи гемостазу внаслідок впливу пухлинних прокоагулянтів, запальних цитокінів, тканинного фактору моноцитів, макрофагів та ендотеліальних клітин, а також підвищення функціональної активності тромбоцитів призводить до появи тромбіну та відкладенню

фібрину всередині та навколо пухлинної тканини. Генерація тромбіну і формування фібрину постійно виявляється у онкологічних пацієнтів, ці процеси призводять до підвищення ризику тромбоемболічних ускладнень [53]. Більш важливо, що надмірне утворення фібрину - найважливіший елемент в процесах росту та метастазування злоякісних пухлин. Локальне відкладення фібрину утворює матрицю для пухлинного росту: полімерний фібрин пронизує тканину пухлини, утворюючи разом з іншими білками строми (ламінінами, колагенами) каркас для направлено розповсюдження пухлини в прилеглі тканини - інвазії. У структурі пухлинної тканини фібрин виконує, крім того, функцію позаклітинного матриксу. Полімерний фібрин виявляє стимулюючу дію на фібробласти, що забезпечують секрецію компонентів строми пухлинної тканини. При гематогенному метастазуванні пухлинна клітина здатна стимулювати формування мікротромбу і залучатися до його структури, що збільшує можливості прикріплення її до судинної стінки, даючи, таким чином, початок метастазу пухлинного вузла. Мікротромби судинної стінки та відкладення полімерного фібрину захищає неопластичні клітини від цитотоксичних клітин імунної системи [50,57,58].

Баланс між необхідністю постійного синтезу фібрину і активацією тромбоутворення з одного боку та інвазивним напрямком росту злоякісної пухлини з іншого, забезпечується синтезом активатора плазміногену урокіназного типу (uPA) та інгібітору активатора плазміногену 1-го типу (PAI-1). uPA, зв'язаний з високоафінними рецепторами неопластичних клітин, забезпечує утворення плазміну з плазміногену і локальний фібриноліз, деградацію інтерстиціального матриксу (разом з іншими протеолітичними компонентами, активність яких може бути індукована плазміном), створюючи передумови для міграції клітин пухлини (пухлинної інвазії). Синтез uPA відбувається в пухлинних клітинах та компонентах строми, в яких він індукується трансформованими клітинами. uPA, не зв'язаний з неопластичними клітинами, що міститься на периферії пухлинного вогнища, інактивується PAI-1 та синтезованими асоційованими з

пухлиною макрофагами PAI-2 [3]. Крім того, PAI-1 запобігає руйнуванню самих пухлинних клітин каскадом активованих протеїназ, забезпечуючи їх перифокальне інгібування [59,60].

Також відомо, що комплекс TF-VIIa на пухлинних клітинах стимулює перебудову цитоскелету, який регулюється в основному TF. Ця реорганізація цитоскелету веде до збільшення рухливості та адгезії пухлинних клітин. TF також підвищує утворення судинного ендотеліального фактора росту (VEGF) та порушує регуляцію тромбоспондину, що відіграє ключову роль в пухлинному ангіогенезі [50,59].

Таким чином, компоненти системи гемостазу беруть участь у розвитку запальних та онкологічних процесів. Активація процесів зсідання крові у онкохворих під дією пухлинних прокоагулянтів, запальних цитокінів, тканинного фактору та підвищеної функціональної активності тромбоцитів обумовлена взаємодією неопластичних клітин та системи гемостазу хворого [61,62].

1.3. Шляхи та механізми утворення структурно ушкоджених білків за норми та патології.

Серед різноманітних функцій протеїназ особливе місце належить активаційним процесам. Вибіркове розщеплення одного або декількох специфічних пептидних зв'язків у молекулах білків неактивних попередників призводить до утворення активного фермента. Зазвичай роль ферментів-активаторів належить сериновим протеїназам трипсинового ряду. Проактивовані ферменти часто самі виявляються активаторами інших білків, формуючи багатокомпонентні активаційні каскади, задіяні в регуляції численних метаболічних процесів [9]. Як вже відмічалось, обмеження надмірного протеолізу забезпечується відповідними білковими інгібіторами. Порушення активаційно-інгібіторного балансу відмічено за багатьох патологій. Нефункціональна активація протеолітичних ферментів належить

до характерних особливостей перебігу запальних та онкологічних захворювань. Так, процеси росту ракової пухлини, інвазії та метастазування опосередковані дією всіх класів позаклітинних та внутрішньоклітинних протеолітичних ферментів [63]. Подібний “протеолітичний спалах” веде до нефункціональних протеолітичних розщеплень білків з утворенням великої кількості їх структурно ушкоджених та функціонально неповноцінних похідних. Всупереч очікуваному швидкому вилученню з кровообігу, подібні білки здатні до тривалої циркуляції та накопичення. Через часткове збереження структури нативної форми окремими доменами ушкоджених молекул вони не розпізнаються кліренсовими системами організму як такі, що підлягають вилученню [64].

Утворення подібних – структурно та функціонально неповноцінних – похідних відомо для багатьох білків. Для більшості пептидгідролаз відомо кілька структурних ізоформ, відмінних між собою за ділянками розщеплення первинної послідовності та фізико-хімічними та ферментативними властивостями. Навіть найпростіша клас-утворююча протеїназа – трипсин (К.Ф. 3.4.21.4) – окрім основної одноланцюгової β -форми утворює ряд автолітично деградованих похідних з додатковими розщепленнями в поліпептидному ланцюгу: - Lys₄₉-Ser₅₀; - Arg₁₀₅-Val₁₀₆; - Lys₁₃₁-Ser₁₃₂ (т.з. α -трипсин); - Lys₁₇₆-Asp₁₇₇ и Lys₁₃₁-Ser₁₃₂ (т.з. псевдо-трипсин) [65]. Субстратна специфічність та каталітичні властивості нативної та частково деградованих форм трипсину є істотно відмінними між собою. Для хімотрипсину теж відомо кілька ступенів деградації, відмінних як за місцем та кількістю розщеплень прошиитої дисульфідними зв'язками молекули, так і за ферментативними властивостями похідних форм [66].

Подібна поліформість притаманна й іншим протеїназам серинового ряду, в тому числі й ключовим ферментам системи гемостазу – тромбіну та плазміну. Так, амідолітична активність підданих автолітичному розщепленню β - і γ -форм тромбіну по відношенню до низькомолекулярних субстратів мало відрізняється від активності α -тромбіну, однак по

відношенню до фібриногену їх активність на два порядки нижче [67]. Відомо, що в процесі розщеплення молекули протромбіну – проензиму тромбіну – утворюється низка протеолітично деградованих його похідних, зокрема проміжний продукт його активації мезотромбін та функціонально неактивна форма протромбіну – претромбін 1 [68]. Молекула мезотромбіну містить активний центр, що формується внаслідок розщеплення пептидного зв'язку в каталітичному домені протромбіну. Стосовно низькомолекулярних субстратів мезотромбін не відрізняється від α -тромбіну, тоді як їх дія на протеїнові субстрати різко відмінна. Це призводить до істотних відмін у взаємодії цих форм з компонентами системи гемостазу. Тому все більшу увагу привертає вивчення ролі протеолітично деградованих похідних протромбіну в системі гемостазу, формуванні імунної відповіді та перебізі процесів, пов'язаних з порушеннями системи коагуляції [69, 70].

Ферментативно деградовані форми плазміну за своєю дією по відношенню до низькомолекулярних субстратів навіть перевищують нативний плазмін, однак значно поступаються йому за фібринолітичною дією [71]. Утворення подібного роду деградованих похідних може бути інформативним для оцінки перебігу відповідних захворювань та створює нові методичні підходи до діагностики пов'язаних з порушенням регуляції протеолізу патологій [66].

Не менш інформативним може виявитись виявлення та характеристика похідних білків, позбавлених гідролітичної активності через протеолітичну деградацію вихідних ферментів. Серед подібного роду похідних особливе місце посідають ангіостатини, що вважаються одними з найбільш перспективних антиметастатичних агентів. Через модульну будову молекули плазміногену (Рис. 1.2.) можливе обмежене розщеплення молекули на окремі структурні домени. За характерних для онкологічних захворювань порушень активаційно-інгібіторного балансу протеолітичних систем подібна вибіркова фрагментація важкого ланцюга веде до формування кількох форм ангіостатину. Процес формування ангіостатину за умов *in vivo* залежить від

типу пухлини та співвідношення задіяних в процесі протеолітичних ферментів з утворенням форм, відмінних між собою як за молекулярною вагою, так і за антиангіогенною дією. Описано варіанти K1-3, K2-3, K1-4, K1-4.85, K1-5 та окремі крингли плазміногену [72,73]. При цьому лишається поза увагою питання про існування в кровообізі відщепленої проформи протеолітичного домена. Визнано, що функціональна активність ангіостатина безпосередньо залежить від збереження кринглових структур і ділянок міжмолекулярної взаємодії, які містяться в них. Тобто, дія ангіостатину визначається його здатністю ефективно конкурувати зі значними кількостями циркулюючих в кровообізі плазміногену та t-PA за ділянки специфічної сорбції з клітинними рецепторами та різними білками позаклітинного матриксу (в тому числі з фібрином). Таке конкурентне зв'язування ангіостатину зменшує функціонально необґрунтовану активацію плазміногену, таким чином пригнічуючи міграцію клітин, ангіогенез, ріст та метастазування пухлин [74,75].

В той же час протеолітично ушкоджені похідні білків виявляються функціонально неповноцінними, однак здатними впливати на опосередковані нативною формою процеси. Так, утворення протеолітично деградованих похідних фібриногену істотно впливає на динаміку зсідання крові та фібринолізу. При нефункціональній активації фібринолізу в крові з'являються продукти розщеплення фібриногену: X, Y, D, E-фрагменти, які поглиблюють патологічні процеси системи гемостазу. Показано, що D-фрагмент фібриногену значною мірою інгібує полімеризацію фібрину, а ранній фрагмент X після протеолітичного розщеплення тромбіном зберігає здатність до участі у побудові полімеру [76-78].

Відомо, що розчинний фібрин та D-димер є специфічними маркерами активації системи зсідання крові. Збільшення їх вмісту свідчить про підвищення рівня тромбіну у кровообізі та утворення розчинного олігомерного фібрину. В залежності від концентрації тромбіну, фактору XIII та плазміну відбуваються подальші процеси стабілізації фібрину фактором

XIII, формування фібринової сітки та руйнування фібрину плазміном з утворенням Д-димеру. Підвищення рівня розчинного фібрину є раннім прогностичним показником активації системи зсідання крові. Одночасне визначення його вмісту та рівня Д-димера може свідчити про наявність чи відсутність балансу та кореляції між накопиченням розчинного фібрину та його руйнуванням. Похідні фібриногену/фібрину також досить ефективно впливають на процес активації компонентів системи фібринолізу. Показано, що один із продуктів ферментативного розщеплення фібриногену, а саме E-фрагмент, при взаємодії з плазміногеном індукує в останньому формування активного центру [79,80].

Порушення рівноваги між системами зсідання крові та фібринолізу є характерною ознакою будь-якого патологічного процесу. Поява в кровообізі значної кількості продуктів розпаду фібриногену, особливо суміші Д- і ДД-фрагментів, може сприяти розвитку геморагічних ускладнень. Отже, розчинні фрагменти, що утворюються внаслідок ферментативного розщеплення фібринового згустку, накопичуються в кровообізі та є маркерами порушення системи гемостазу. Підвищений рівень цих продуктів показано при тромбозі глибоких вен, синдромі дисемінованого внутрішньосудинного згортання крові, травмах, хірургічних втручаннях, інфекціях, розвитку пухлин, серповидно-клітинній анемії [81].

Визначення вмісту того чи іншого білка може бути коректним лише за оцінкою його участі в нативних взаємодіях при застосуванні його нативних субстратів. Натомість виявлення як за більшістю штучних субстратів, так і різноманітними імунологічними методами може дати результат, що не відповідає дійсному стану. Зокрема, при визначення імунологічними методами $\alpha_2\text{M}$ показано його високий вміст в слині, тоді як функціонально – за комплексоутворенням з протеїназами – його там немає [82]. Подібну ж невідповідність між вмістом та специфічною активністю показано для плазміногену при хворобі Кройцфельда-Якоба [83].

Слід зазначити, що існування частково деградованих форм не є чимось незвичним та складає функціонально важливу стадію процесингу багатьох білків. При цьому варто підкреслити, що лише незначна частина будь-якого новосинтезованого білка виконує повний цикл своїх функцій, оскільки більшість молекул зазнає тієї чи іншої деградації значно раніше [84].

Порушення структурної організації ділянок міжмолекулярних зв'язувань робить неможливою ефективну взаємодію білкових компонентів, що впливає на регуляцію опосередкованих ними процесів. Крім того, формування нетипових послідовностей на поверхні білкових молекул внаслідок структурних порушень надає їм можливість брати участь у нехарактерних для них функціональних взаємодіях, порушуючи протікання протеолітичних процесів [75]. Отже, функціонально неповноцінні протеолітично ушкоджені похідні протеїнів становлять істотну складову протеїнового пулу плазми крові як в нормі, так і при патології. Вони здатні впливати на опосередковані нативною формою протеїназ процеси та можуть бути інформативним показником стану організму.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1. Характеристика груп, які досліджувалися

Для проведення дослідження було виконано клініко-лабораторне обстеження 123 пацієнтів із захворюванням ЛОР-органів. Хворі перебували на стаціонарному лікуванні у відділі запальних захворювань верхніх дихальних шляхів та онкопатології ЛОР-органів ДУ „Інститут отоларингології ім.проф.О.С. Коломійченка НАМН України”.

Хронічний тонзиліт у стадії декомпенсації діагностовано у 31 хворого. Доброякісні новоутворення порожнини носа і приносних пазух (кісти верхньощелепних пазух, поліпозний етмоїдит та гаймороетмоїдит) було виявлено у 31 пацієнта. У 26 осіб діагностовано передракові захворювання гортані (хронічний гіперпластичний ларингіт або папіломатоз). Групу із злоякісними новоутвореннями ЛОР-органів склали 35 хворих, з яких у 10 пацієнтів підтверджено плоскоклітинний рак II стадії ($T_2N_0M_0$), у 25 осіб – III стадії ($T_3N_0M_0$). У дослідження включали тільки хворих, у яких діагноз злоякісного новоутворення встановлено вперше та підтверджено гістологічно. Всі хворі були віком від 48 до 65 років. Контрольну групу склали 30 практично здорових осіб (донори).

Критеріями виключення хворих з клінічних досліджень були супутні некомпенсовані або гострі захворювання, стан і наявність яких може суттєво вплинути на результати досліджень, участь хворого у будь-якому іншому клінічному дослідженні або вживання препаратів, які можуть вплинути на систему гемостазу.

Матеріал відбирали за персональної письмової згоди хворих в рамках лікувально-діагностичних процедур.

2.2. Реагенти і матеріали

У роботі було використано такі матеріали та реактиви: натрій цитрат (Merck, Німеччина), 0,9 % розчин натрій хлориду (Юрія-Фарм, Україна), *трис*-гідроксиметил-амінометан (Alfa Aesar, Великобританія), протамінсульфат (Merck, Німеччина), оксихінолін-8 (Альтекс Сервіс, Україна), сечовина (Alfa Aesar, Великобританія), синтетичний субстрат *N*-бензоїл-*D,L*-аргінін-*p*-нітроанлід (БАПНА) (Merck, Німеччина), трипсин (“Sprofa”, Чехія), фосфорновольфрамова кислота (Альтекс Сервіс, Україна), інгібітор трипсину з бобів сої (Sigma-Aldrich, США), тромбін (Sigma-Aldrich, США); тромбопластин, АЧТЧ реагент (“Ренам”, Росія), стрептокіназа Kabikinase (“Pharmacia AG”, Швеція), трихлорацетатна кислота (Merck, Німеччина), льодяна ацетатна кислота (Chem-Lab, Бельгія), монойодацетатна кислота (Астрахім, Росія), кальцій хлорид (Юрія-Фарм, Україна), хромогенні субстрати *Tos-Gly-Pro-Arg-p*-нітроанлід, S-2251 (*H-D-Val-L-Leu-L-Lys-p*-нітроанлід) гідрохлорид), *Suc-Ala³-p*-нітроанлід (“Merck”, Німеччина), Superdex 200PG (Amersham Biosciences, США) інші органічні сполуки та неорганічні реактиви вітчизняного виробництва категорії хч.

Антитіла для імунодетекції ПАІ-1, ТАП та фактору фон Віллебранда (Invitrogen, США), акриламід, *N,N'*-метилен-біс-акриламід, персульфат амонію, ТЕМЕД (*N,N,N',N'*-тетраметилен-1,2-діамін), реактиви для забарвлення електрофоретичних гелів (GE Healthcare AB, Швеція).

2.3. Обладнання

В роботі використовували: спектрофотометр (СФ-26, «ЛОМО», Росія), апарат для препаративного вертикального диск-електорофорезу (BioRad, США), мікропланшетний спектрофотометр (BioTek Instruments, BioTek, USA).

Піпетки автоматичні, термостати, та т.і. є продукцією фірм, що працюють згідно стандарту ISO 9001. Пластиковий лабораторний посуд (пробірки, епандорфи, планшети для імуноферментного аналізу та інше)

отримано від фірми Sente-Lab. Скляний лабораторний посуд (колби, стакани, пробірки, циліндри та інше) фірми Simax.

2.4. Отримання плазми крові

Кров брали пункційно з ліктьової вени пацієнтів вранці натщесерце та вносили у поліетиленову пробірку з 3,8% розчином цитрату натрію у кінцевому співвідношенні 9:1 та обережно повільно перемішували. Бідну на тромбоцити плазму отримували шляхом центрифугування цитратної крові при частоті обертання 4000 об/хв протягом 20-ти хв в центрифугі ОПН-8. Плазму (супернатант) переносили у поліетиленову пробірку лабораторним дозатором. Отриману плазму крові використовували для аналізу або, за необхідності, заморожували при -20°C у епендорфах. Плазму розморожували прогріванням на водяній бані (37°C) протягом 20 хв, після чого розміщували обережними перевертанням пробірки та негайно переміщували на лід, при цьому способі розморожування не відбувається зниження активності факторів зсідання крові [85].

2.5. Визначення загальної протеолітичної активності

Визначення загальної протеолітичної активності (ПРА) проводили спектрофотометричним методом К.М. Веремеєнка, за допомогою якого досліджується ендогенна протеолітична активність плазми, котру виявляють трипсин-подібні протеїнази (плазмін, калікреїн) та ферменти пептидазної дії. Визначали аргінін-вмісні пептиди, що відщеплюються від білка протаміну протеолітичними ферментами плазми крові [86].

До 0,1 мл плазми крові та 0,5 мл 0,05М мєдиналового буфера (рН 7,6) додавали 0,2 мл 1% розчину протамінсульфату у мєдиналовому буфері. Проби інкубували протягом 15 хв при температурі $+35^{\circ}\text{C}$. Для зупинки реакції додавали 0,8 мл 20% розчину трихлороцтової кислоти. У контрольні проби протамінсульфат додавали після неї. Вміст пробірок після

перемішування охолоджували при +4°C протягом 15 хв. Після чого центрифугували при 3000 об/хв. протягом 45 хв. Далі проводили фарбування за допомогою реакції Сакагуші. Для цього до 1 мл центрифугату в такому ж об'ємі додавали дистильовану воду, 0,02% розчин оксихіноліну та 10% розчин гідроксиду натрію. Через 2 хв додавали 0,2 мл 1% розчину гіпоброміту натрію (NaBrO), 1 мл 40% розчину сечовини та дистильованої води. Через 10 хв проводили вимірювання оптичної густини дослідних проб у порівнянні з контрольними у спектрофотометрі СФ-26 в кюветі з товщиною оптичного шару 1 см при довжині хвилі 508 нм.

Кількість вивільненого аргініну розраховували за калібрувальним графіком, побудованим у відповідності з умовами досліду, який відображає залежність оптичної густини проби від кількості аргініну. За стандарт використовували розчин хлориду аргініну.

Кількісну оцінку ПРА виражали в нмоль аргініну, що утворюється за 1 хв під дією 1 мл плазми крові та розраховували за формулою:

$$\text{ПРА} = \frac{A \times 1,6 \times 1000}{0,1 \times 15 \times 174,2}$$

A – кількість аргініну, що утворилась в умовах досліду, мкг;

1,6 – загальний об'єм проби, мл; **0,1** – об'єм плазми в пробі, мл;

15 – час інкубації з протамінсульфатом, хв;

174,2 – м.м. аргініну;

1000 – коефіцієнт розрахунку в нмоль аргініну.

2.6. Визначення вмісту α_1 -інгібітора протеїназ

Метод заснований на здатності α_1 -інгібітора протеїназ (α_1 -ІП) плазми крові пригнічувати гідроліз трипсином синтетичного субстрата N-бензоїл-DL-аргінін-p-нітроаніліда (БАПНА) [86]. При дослідженні до плазми крові вносили надлишок трипсину по відношенню до всіх трипсин-зв'язуючих білків.

До 0,4 мл розведеної в 100 разів 0,05М фосфатним буфером (рН 7,6) плазми додавали 0,1 мл розчину трипсину (10 мкг). Реакційну суміш витримували 15 хв при +20°C. Об'єм доводили до 1 мл фосфатним буфером, додавали 3,2 мл розчину БАПНА і витримували при температурі +30°C протягом 30 хв. Реакцію зупиняли додаванням 1,4 мл 5% розчину фосфорновольфрамової кислоти в 1М ацетатному буфері (рН 4,5). У контрольні проби БАПНА додавали після фосфорновольфрамової кислоти. Після центрифугування проб при 3000 об/хв протягом 40 хв у прозорій надосадовій рідині визначали оптичну густину на спектрофотометрі СФ-26 при 383 нм, порівнюючи дослідну пробу з контрольною.

Для розрахунку вмісту α_1 -ІІ був побудований калібрувальний графік, на якому по осі абсцис відкладали кількість трипсину (1-10 мкг), а по осі ординат - оптичну густину проб, в яких відбувався гідроліз БАПНА відповідною кількістю трипсину.

Вміст α_1 -ІІ виражали в г інактивованого ферменту на 1 л плазми крові (г/л) та розраховували за формулою:

$$X = \frac{A \times 2,3 \times 0,7 \times 100 \times 1000}{0,2 \times 1000000},$$

A - кількість зв'язаного з α_1 -ІІ трипсину, мкг;

2,3 - співвідношення між м.м. α_1 -ІІ (55000 Д) та трипсину (24000 Д);

0,7 - чистота трипсину;

100 - розведення плазми;

1000 - коефіцієнт перерахунку на 1 л плазми;

0,4 - кількість плазми в пробі, мл;

1000000 - коефіцієнт перерахунку на 1 г.

2.7. Визначення вмісту α_2 -макроглобуліну

Метод ґрунтується на здатності α_2 -макроглобуліну (α_2 М) кількісно утворювати з трипсином активний комплекс, здатний розщеплювати БАПНА, який нечутливий до інгібітора з бобів сої [86]. Повне насичення α_2 М

трипсином досягалося додаванням надлишку трипсину по відношенню до всіх трипсин-зв'язуючих білків. Його надлишок інактивували соєвим інгібітором, який повністю нейтралізує вільний трипсин та не діє на фермент, зв'язаний з $\alpha_2\text{M}$.

До 0,4 мл розбавленої в 15 разів плазми крові додавали 0,3 мл робочого розчину трипсину. Після витримування протягом 15 хв при кімнатній температурі додавали 0,1 мл розчину інгібітора з бобів сої. Через 15 хв об'єм суміші доводили до 1 мл 0,05М фосфатним буфером рН 7,6. Після додавання 3,2 мл 0,001М розчину БАПНА проби інкубували 30 хв. при температурі +30°C. Реакцію припиняли додаванням 1,4 мл 5% розчину фосфорновольфрамової кислоти в 1М ацетатному буфері рН 4,5. В контрольні проби БАПНА додавали після фосфорновольфрамової кислоти. Після центрифугування при 3000 об/хв протягом 30 хв. у надосадовій рідині визначали оптичну густину проб на спектрофотометрі СФ-26 при довжині хвилі 383 нм. Кількість трипсину, зв'язаного з $\alpha_2\text{M}$, визначали за калібрувальним графіком, побудованим згідно результатів розщеплення БАПНА кристалічним трипсином (в межах 1-10 мкг).

Концентрацію $\alpha_2\text{M}$ виражали в г на 1 л плазми крові (г/л). Розрахунок проводили за формулою:

$$X = \frac{A \times 15^1 \times 15^2 \times 1000}{B \times 1000000},$$

A - кількість зв'язаного з $\alpha_2\text{M}$ трипсину, мкг;

15¹ - співвідношення між м.м. $\alpha_2\text{M}$ та трипсину (725000/48000);

15² -розведення плазми;

1000 - коефіцієнт перерахунку на 1 л сироватки;

B - кількість плазми в пробі, мл;

1000000 - коефіцієнт перерахунку в г $\alpha_2\text{M}$.

2.8. Визначення концентрації фібриногену у плазмі крові

Для визначення концентрації фібриногену використовували спектрофотометричний метод В.О. Беліцера та спавт. [87]. Метод заснований на перетворенні фібриногена у фібрин тромбіном в присутності іонів кальція та моноіодацетату, що інактивує фактор XIII, сприяючи розчиненню фібринового згустка в оцтовій кислоті та перешкоджає включенню в нього інших білків плазми.

До 0,2 мл плазми додавали 1,6 мл 0,06 М фосфатного буферу рН 7,0. Пробу інкубували при +37°C протягом 3 хв, потім вносили 0,1 мл розчину моноіодоцтової кислоти та 0,1 мл розчину тромбіну. Після додавання кожного компоненту вміст пробірки ретельно перемішували скляною паличкою з шорсткою поверхнею. Реакційну суміш інкубували при +37°C протягом 15 хв, після чого утворений згусток фібрину намотували на паличку, промивали двічі в охолодженому розчині натрія хлориду та дистильованій воді. Залишки води видаляли фільтрувальним папером та розчиняли в 5 мл 1,5 % розчину оцтової кислоти протягом 5 хв. Вміст білку в розчині визначали спектрофотометрично при 280 та 320 нм. Концентрацію фібриногену в дослідному зразку плазми виражали в г на 1 л плазми крові (г/л) та розраховували за формулою:

$$X(\text{г/л}) = \frac{(E_{280} - E_{320}) \times 255}{15,067},$$

$E_{(280-320)}$ – різниця величин екстинкції при 280 та 320 нм, чим досягається необхідна поправка на мутність;

255 – коефіцієнт для вираження кількості фібриногену в г/л при аналізі 0,2 мл плазми;

15,067 – коефіцієнт екстинкції для фібриногену в кислому середовищі при довжині хвилі 280 нм.

2.9. Визначення вмісту антитромбіна III

Метод заснований на здатності антитромбіна III (АТ-III) інактивувати тромбін. Принцип методу полягає у визначенні різниці між рівнем тромбіна, який у надлишку додають до плазми крові, та кількістю фермента, що залишається після його інактивації АТ-III за розщепленням п-нітроанідного зв'язку в хромогенному субстраті. Реакція відбувається в присутності гепарину, який є активатором АТ-III [88].

При дослідженні відомі кількості тромбіну інкубували із 0,2 мл плазми, що розведена 0,05 М трис-буфером буфером, який містить гепарин, рН 8,4 при +37°C протягом 2 хв. Після додання 0,1 мл хромогенного субстрату проби інкубували 2 хв та зупиняли реакцію додаванням 0,1 мл оцтової кислоти. Кількість п-нітроаніліну, вивільненого в результаті гідролізу тромбіном хромогенного субстрату, визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 405 нм. Активність тромбіна, яка залишається після взаємодії із АТ-III плазми, вимірюють і порівнюють з такою стандартної плазми людини.

Кількість АТ-III визначали за калібрувальним графіком у % та виражали у % по відношенню до відповідної величини, отриманої для стандартної плазми крові, яку приймають за 100 %.

2.10. Визначення активованого парціального (часткового) тромбопластинового часу

Активований частковий (парціальний) тромбопластиновий час (АЧТЧ) – тест, що імітує *in vitro* процес активації внутрішнього шляху зсідання з утворенням активного теназного комплексу [IXa + VIIIa + Ca²⁺]. АЧТЧ відображає порушення активності або вмісту в плазмі факторів вторинного гемостазу внутрішнього (XII, XI, IX, VIII) і загального (II, X, V) шляхів. Тест називають «частковим», так як в ньому бере участь «частковий тромбопластин» - кефалін, а не повний тромбопластин.

АЧТЧ визначали за часом утворення згустку рекальцифікованої бідної на тромбоцити плазми в умовах стандартної контактної активації каоліном та фосфоліпідної активації кефаліном [89].

До 0,1 мл дослідного зразка плазми додавали 0,1 мл АЧТЧ-реагенту та інкубували при +37°C протягом 3 хв. Після чого в інкубаційну суміш додавали 0,1 мл 0,025 М розчину хлористого кальцію і фіксували час зсідання при періодичному покачуванні пробірки.

Результат виражали в секундах (с), порівнюючи час згортання контрольної та досліджуваної плазм.

2.11. Визначення протромбінового (тромбопластинового) часу

Протромбіновий тест імітує *in vitro* процес активації зовнішнього шляху вторинного гемостазу, коли при пошкодженні тканин в кровообіг вивільняється тканинний фактор (ТФ) і утворює комплекс з постійно циркулюючим в кровообізі Ф.VII, який, в свою чергу, активує Ф.X. Замість ТФ, що активує каскад зовнішнього шляху зсідання, застосовували спеціальний реагент - тромбопластин, а для відновлення кальцію плазми, зв'язаного з цитратом натрію, вносили стандартний (0,025 М) розчин хлористого кальцію [89].

Визначали час утворення фібринового згустку при додаванні до плазми крові тромбопластину та кальцію хлориду.

Пробірку з 0,1 мл плазми, що досліджується, інкубували при +37°C протягом 3 хв. Після цього додавали 0,2 мл підігрітої до +37°C тромбопластин-кальцієвої суміші та визначали час зсідання плазми. Час утворення згустку виражали в секундах (с) та порівнювали з таким у контрольній плазмі.

2.12. Визначення тромбінового часу

Метод ґрунтується на здатності екзогенного тромбіну індукувати перетворення фібриногену в фібрин без участі інших факторів зсідання крові.

Тромбіновий тест характеризує протікання кінцевого етапу зсідання крові – перетворення фібриногену у фібрин з наступною його полімеризацією [90].

До 0,2 мл підігрітої на водяній бані при $+37^{\circ}\text{C}$ дослідної плазми додавали 0,1 мл розчину тромбіну в 0,05М трис-буфері рН 7,4, що відповідає 1 NIH тромбіну, включали секундомер та фіксували час зсідання плазми.

Результат виражали в секундах (с), порівнюючи час утворення згустку контрольної та досліджуваної плазм.

2.13. Визначення фібринолітичної активності плазми крові

Фібринолітичну активність плазми крові досліджували в еуглобуліновій фракції, що містить плазміноген, фібриноген і фактори зсідання та позбавлена інгібіторів фібринолізу. Тому еуглобуліновий лизис відображає активність фібринолізу в умовах виключення інгібуючої дії антиплазмінів. Загальну фібринолітичну активність плазми крові визначали відповідно до загального часу спонтанного лізису фібринового згустку плазми крові, утвореного після полімеризації фібрину внаслідок додавання розчину CaCl_2 до еуглобулінової фракції плазми крові, що осаджується в кислому середовищі при низькій температурі. При цьому головні інгібітори фібринолізу, зокрема α_2 -антиплазмін, залишаються в надосадовій фракції і видаляються [90].

До 0,25 мл плазми додавали 4 мл дистильованої води, 0,075 мл розчину 1 % оцтової кислоти, суміш витримували при температурі $+4^{\circ}\text{C}$ протягом 30 хв. Після центрифугування при 3000 об/хв протягом 5 хв видаляли надосадову рідину, осад розчиняли додаванням 0,25 мл розчину натрія борнокислого. Після внесення 0,25 мл розчину 0,277% хлориду кальція пробу інкубували за температури 37°C та реєстрували час з моменту утворення згустку до його повного розчинення, результат виражали в хвилинах (хв).

2.14. Визначення тромбін-подібної активності

Тромбін-подібну активність (ТрПА) в плазмі крові визначали за методом [88], в основу якого покладено здатність тромбіну та його похідних специфічно гідролізувати низькомолекулярний хромогенний субстрат Tos-Gly-Pro-Arg-*para*-нітроанлід. До 0,1 мл плазми додавали 1,7 мл 0,1 М трис-буферу рН 8,1 та 0,1 мл хромогенного субстрату, інкубували протягом 15 хв при +37°C. Реакцію зупиняли додаванням 0,1 мл оцтової кислоти. Після центрифугування проб при 3000 об/хв протягом 30 хв у надосадовій рідині визначали оптичну густину проб на спектрофотометрі СФ-26 при довжині хвилі 405 нм. Кількість утвореного *para*-нітроанліну (п-НА), що еквівалентна кількості розщепленого субстрату, визначали за калібрувальним графіком, побудованим за поглинанням в умовах досліду вільного *para*-нітроанліну в інтервалі вмісту 0,01 – 0,2 мкмоль в 2 мл проби. ТрПА виражали в нмоль п-НА, утвореного під дією 1 мл плазми крові за 1 хв.

2.15. Визначення плазмін-подібної активності

Метод ґрунтується на здатності плазміноген-стрептокіназного комплексу, утвореного при додаванні стрептокінази до розведених зразків плазми, розщеплювати хромогенний субстрат S-2251 (H-D-Val-L-Leu-L-Lys-*para*-нітроанліду гідрохлорид) [91]. Швидкість гідролізу нітроанлінового зв'язку залежить від концентрації у зразку плазміногену.

До 0,1 мл розведеної в 4 рази плазми вносили 0,1 мл розчину стрептокінази, що містить 500 од., 1,6 мл 0,05 М трис-буферу рН 7,5 та 0,1 мл розчину хромогенного субстрату S-2251. Реакційну суміш інкубували при +37°C протягом 3 хв, реакцію зупиняли додаванням 0,1 мл оцтової кислоти. Проби центрифугували протягом 30 хв при 3000 об/хв та визначали оптичну густину надосадової рідини проб на спектрофотометрі СФ-26 при довжині хвилі 405 нм. Кількість утвореного п-НА визначали, використовуючи графік, де на осі абсцис відкладали відомі концентрації п-НА, на осі ординат відповідні їм значення оптичної густини. Потенційну активність

плазміногену виражали в мкмоль вивільненого п-НА за 1 хв під дією 1 мл плазми.

2.16. Визначення активності еластази

Активність еластази визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 410 нм за поглинанням пара-нітроаніліну, утвореного при розщепленні хромогенного синтетичного субстрату Suc-Ala3-*para*-нітроаніліді [92].

Реакційну суміш, що містила 0,1 мл плазми, 1,7 мл 0,1 М трис-буферу рН 8,1 та 0,1 мл хромогенного субстрату, інкубували при +37°C протягом 4 год. Реакцію зупиняли додаванням 0,1 мл оцтової кислоти, після чого проби центрифугували при 3000 об/хв протягом 30 хв. У надосадовій рідині визначали оптичну густину проб на спектрофотометрі СФ-26 при довжині хвилі 410 нм. Кількість утвореного пара-нітроаніліну визначали за калібрувальним графіком, побудованим за поглинанням у відповідних умовах вільного пара-нітроаніліну в інтервалі вмісту 0,01 – 0,2 мкмоль в 2 мл проби. Активність еластази виражали в нмоль п-НА, утвореного під дією 1 мл плазми крові за 1 год.

2.17. Визначення вмісту протромбінового пулу в плазмі крові

Протромбіновий пул отримували з плазми крові методом сорбування фракції вітамін К-залежних білків на сірчаноокислому бар'ї [93]. До 1 мл плазми крові додавали 30 мг сірчаноокислого барію та обережно перемішували протягом 1 години на льоду. Суміш центрифугували при 2000 об/хв протягом 15 хв. Елюцію вітамін К-залежних білків плазми з осаду проводили 0,05 М трис-НСІ буфером, рН 7,4, що містив 0,2 М натрію хлориду та 0,02 М ЕДТА. Концентрацію протромбінового пулу в плазмі вимірювали за допомогою стандартного твердофазного імуноферментного аналізу ELISA [94].

2.18. Імуноферментний аналіз

Рівні тканинного активатору плазміногену, інгібітору активатору плазміногену 1 типу, фактора фон Віллебранда та молекул протромбінового

походження визначали у плазмі крові методом імуноферментного аналізу, який проводили за стандартною методикою для розчинних білків [94].

Імуноферментний аналіз проводили у планшетах із сорбційною здатністю для мікропланшеточного спектрофотометру. Плазму крові розводили 50 мМ трис-НСІ буфером, рН 7,4 у співвідношенні 1:100 та інкубували у комірках планшетів за 37°C протягом 60 хв. Для видалення реагентів, що не зв'язалися, використовували 50 мМ трис-НСІ буфер, рН 7,4. Блокування неспецифічних місць зв'язування проводили 5% розчином знежиреного молока протягом ночі. Первинні (Millipore, USA) та вторинні (Bio-Rad, USA) антитіла готували відповідно до рекомендацій виробника, інкубацію проводили за 37°C протягом 60 хв. Візуалізацію реакції проводили субстратом для лужної фосфатази (1 мг/мл паранітрофенілфосфату у 10 % диетаноламіні, рН 9,8) за 37°C протягом 60 хв. Оптичне поглинання вимірювали за довжин хвилі 405 нм та 492 нм на мікроридері BioTek Instruments.

2.19. Хроматографія, що розподіляє за розмірами

Метод хроматографії, що розподіляє за розмірами, заснований на розподілі суміші речовин з різними молекулярними масами шляхом фільтрації на хроматографічних колонках через пористі гелі. Елюють речовини, що розподіляються, буферними розчинами [95]. Ефективність хроматографії, що розподіляє за розмірами, визначається розмірами пор між гранулами гелю і величиною комірок кожної гранули: дрібні молекули (значно менше за розміром комірок гранул) дифундують всередину гранули і затримуються при фільтрації через ці молекулярні сита, а більш значні за розміром молекули не можуть потрапити в комірки і проходять в пори між гранулами.

Фракціонування протеїнів плазми проводили на колонці з Superdex 200. Даний гель обрано через його високі сепараційні властивості, зумовлені жорсткістю гранул та більшою швидкістю протікання порівняно

до традиційного Сефадексу G-200. Водночас застосування Superdex 200 дає змогу більш селективно відокремити α_2 -макроглобулін-вміщуючу фракцію. Фракціонування протеїнів проводили на колонці діаметром 1,8 см, довжиною 26,6 см та загальним об'ємом 67,4 мл, урівноважену робочим трис-солянокислим буфером рН 7,6. Для більш селективного розділення плазми крові за молекулярною масою застосовували розділення в буферних системах з різною йонною силою, в присутності 0,1; 0,5 та 1М NaCl.

Наносили 0,4 мл вдвічі розведеної цитратної плазми крові. Швидкість протікання становила 20-25 мл/год, збирали фракції об'ємом 1,5 мл.

Контроль за елюцією білка проводили спектрофотометрично за довжини хвилі 280 нм.

2.20. Метод ензим-електрофорезу

Для ідентифікації активних протеолітичних ензимів в плазмі застосовували метод ензим-електрофорезу, який базується на проведенні електрофорезу в поліакриламідному гелі (за присутності 0,1% додецилсульфату натрію), кополімеризованому з фібриногеном у якості субстрату в концентрації 1 мг/мл [96]. Електрофорез проводили у апараті для вертикального препаративного диск-електрофорезу (BioRad) у скляних пластинах завтовшки 1 мм за сили струму 19 мА для концентруючого та 35 мА для розділяючого гелів. Герметично зібрану камеру заповнювали 12% розділяючим гелем, по закінченні полімеризації якого поверх нашаровували 4% концентруючий гель. Після електрофорезу додецилсульфат натрію видаляли з гелю промиванням у 2,5%-му розчині тритону X-100. Потім гель залишали в 0,05М трис-HCl буфері рН 7,4 протягом 12 год. Гель забарвлювали Coomassie R-250 протягом 40 хв. та виявляли зони протеолітичної активності за безбарвними смугами на гелі. Для ідентифікації відповідних ділянок лізису застосовували маркерні білки. Одержані ензимограми переводили у електронний формат за допомогою цифрової камери.

2.21. Статистична обробка результатів досліджень

Статистичну обробку отриманих результатів досліджень проводили використовуючи комп'ютерні програми Microsoft Excel та Origin 8.0. Розраховували значення середніх арифметичних величин (M) та похибок середніх величин (m) при n - об'ємі вибірки. Для визначення вірогідних відмінностей між середніми величинами розраховували критерій Стюдента. Достовірними вважали відмінності при $p < 0,05$.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Зміни показників системи гемостазу за запальних та онкологічних захворювань ЛОР-органів

Участь протеолітичних ензимів в регуляції функцій органів і тканин пов'язана з протеолізом двох типів: повною деградацією білкових молекул і реакціями обмеженого протеолізу, тобто специфічного гідролізу певних пептидних зв'язків. За норми обмежений протеоліз відіграє провідну роль в утворенні з неактивних попередників активних форм ензимів, гормонів, структурних протеїнів, синтезі та інактивації біоактивних пептидів, що мають велике значення в регуляції різних процесів для підтримання гомеостазу. Реакції обмеженого протеолізу лежать в основі функціонування таких важливих фізіологічних систем як ренін-ангіотензинова, калікреїн-кінінова, імунна, сздаюча та фібринолітична. Таким чином, протеоліз виконує регулюючу та деструктивну функції в організмі [28, 86]. Активність протеолітичних ензимів в організмі регулюється кількома шляхами - просторовою роз'єднаністю ензиму і субстрату, синтезом більшості протеїназ в формі неактивних попередників, а також наявністю специфічних протеїнів-інгібіторів, котрі зв'язують протеїнази, позбавляючи їх повністю або частково каталітичної активності [97]. Підвищення активності протеолітичних ензимів на тлі пригнічення їх інгібіторів в свою чергу сприяє пошкодженню тканин різних органів і призводить до порушення як структури, так і їх функції. Протеїназно-інгібіторна система задіяна в механізмах, що забезпечують загальну регуляцію процесу запалення в організмі. З літературних даних відомо про взаємозв'язок процесів запалення та гемостазу. Прозапальні цитокіни і хемокіни можуть впливати на механізми коагуляції і навпаки, активні протеїнази системи зсідання та фізіологічні антикоагулянти чи компоненти плазміноген-плазмінової системи можуть модулювати процеси

запалення через активацію специфічних клітинних рецепторів, зумовлюючи цим підвищення експресії прозапальних медіаторів [98-100].

Отже, надмірна протеїназна, а також недостатня інгібіторна активність плазми крові є важливим патогенетичним чинником розвитку ряду деструктивних і запальних реакцій організму [8]. При формуванні протеолітичних каскадів провідна роль належить трипсин-подібним протеїназам, до яких належать трипсин, плазмін, активатори плазміногену, калікреїни, тромбін, більшість факторів зсідання, деякі компоненти комплементу, що не лише безпосередньо розщеплюють протеїновий субстрат, але й є активаторами найрізноманітніших проензимів [86].

Нами було досліджено загальну протеолітичну активність трипсин-подібних ензимів в плазмі крові хворих на хронічний тонзиліт, доброякісні, передракові захворювання та злоякісні новоутворення ЛОР-органів (табл. 3.1).

Таблиця 3.1.

Загальна протеолітична активність плазми крові хворих із захворюваннями ЛОР-органів

Групи обстежених	Загальна протеолітична активність, нмоль арг/(хв·мл)
Практично здорові донори (контроль)	55,5±3,2
Хворі з хронічним тонзилітом	62,6±3,4
Хворі з доброякісними захворюваннями	65,3±2,9*
Хворі з передраковими захворюваннями	67,9±2,3*
Хворі з злоякісними захворюваннями II стадії	72,5±5,1*
Хворі з злоякісними захворюваннями III стадії	78,0±4,0*

* – статистично достовірні зміни в порівнянні з показником донорів, $p \leq 0,05$.

Як впливає з наведених у табл. 3.1 даних, рівень ПРА у пацієнтів на хронічний тонзиліт підвищувався відносно контрольної величини, але не

достовірно. У хворих на передракові захворювання та доброякісні новоутвореннями цей показник вірогідно підвищувався в однаковій мірі (у 1,2 рази) порівняно з показником в групі контролю. Досліджувана активність у пацієнтів зі злякисними новоутвореннями ЛОР-органів достовірно збільшувалася: при II-й стадії онкологічного процесу в 1,3 рази, а при III-й стадії – в 1,4 рази відносно рівня практично здорових осіб, тобто загальна протеолітична активність плазми крові зростала по мірі прогресування пухлинного процесу [101].

Одержані нами дані щодо збільшення рівня ПРА у хворих з хронічним тонзилітом є відображенням перебігу хронічного запального процесу. За участю протеолітичних ензимів здійснюється регуляція рівня медіаторів запалення, утворення з попередників активних форм ензимів, які беруть участь у запальній реакції. Відомо, що надмірна активація протеолізу є найважливішим біохімічним механізмом розвитку фундаментального патологічного процесу – запалення [33,34]. Велика увага приділяється вивченню стану протеолітичних систем організму при розвитку різних патологічних змін органів і тканин. Підвищення протеолітичної активності, що притаманне процесу запалення, показано за таких патологій, як хронічні запальні захворювання бронхо-легеневої системи, пародонта, шкіри, артрити, виразки [34,102-104].

Зв'язок між запаленням та злякисною трансформацією клітин активно досліджується і ґрунтується на сучасних даних щодо молекулярно-біологічних, клітинних та біохімічних механізмів цих патофізіологічних процесів [105-109]. Епідеміологічні дані, накопичені за два останніх десятиріччя, свідчать про те, що хронічне запалення пов'язане з розвитком принаймні 15% випадків всіх форм раку. Основою взаємозв'язку процесів запалення і канцерогенезу є експресія нормальними епітеліальними клітинами, з одного боку, рецепторів до цитокінів, хемокінів, імунорегуляторних і ростових факторів, з іншого - синтез (при активації - секреція) цими ж клітинами медіаторів запалення. Регуляція цих процесів, як

уже зазначалося, опосередковується протеолітичною системою. У свою чергу медіатори і продукти запалення можуть сприяти ініціації канцерогенезу, виступати як потужний промотуючий фактор, стимулювати пухлинну прогресію [42].

Виявлене в нашому дослідженні збільшення загальної протеолітичної активності при доброякісних, передракових та злоякісних новоутвореннях ЛОР-органів може бути зумовлене участю трипсин-подібних протеїназ у розвитку цих захворювань. Вони беруть участь у формуванні трансформованого фенотипу злоякісних клітин [110]. Трипсин-подібні протеїнази забезпечують гідроліз компонентів позаклітинного матриксу (фібронектин, ламінін, протеоглікани та колаген) як безпосередньо, так і опосередковано активацією матриксних металопротеїназ. Утворені протеїназами активаційно-протеолітичні каскади руйнують позаклітинний матрикс та створюють новий простір для росту пухлини, що сприяє інвазії та метастазуванню злоякісних клітин [111]. Процеси деструкції призводять до вивільнення лізосомних протеїназ, котрі, в свою чергу, активують ряд інших протеолітичних ензимів з їх подальшим залученням до процесів деградації. Протеолітичне ушкодження антиген-розпізнаючих структур імунних клітин та видалення з поверхні пухлинних клітин антигенних детермінант призводить до зниження активності клітин-кілерів та послаблення протипухлинного захисту організму. Показано, що ці ензими секретуються як нормальними, так і трансформованими клітинами різного гістогенезу. Вони виділяють велику кількість протеїназ у позаклітинне середовище з подальшим їх надходженням у системний кровообіг або функціонують у зв'язаному з поверхнею трансформованих клітин стані [112,113].

Встановлене у нашій роботі збільшення активності трипсин-подібних протеїназ при злоякісних новоутвореннях ЛОР-органів узгоджується з даними літератури. Рівень цього показника підвищується у хворих на рак шкіри, щитоподібної залози та ін. [114-118]. Відомо, що уявлення про роль

протеїназ зводяться до простої формули: чим вища активність протеолітичних ферментів, тим більш агресивний фенотип має пухлина.

Показник загальної протеолітичної активності є інтегративним параметром, інформація про активність трипсин-подібних ензимів необхідна для оцінки не тільки інтенсивності обмеженого протеолізу, а опосередковано може свідчити про можливість трансформації, проліферації, міграції клітин, оскільки доведено їх безпосередню участь у цих процесах [119].

Серед серинових протеїназ нейтрофільна еластаза виконує ряд особливо важливих функцій. Внаслідок проведених нами досліджень було встановлено рівень активності еластази в крові хворих на хронічний тонзиліт, доброякісні, передракові захворювання та злоякісні новоутворення ЛОР-органів. Результати цих досліджень наведені в табл. 3.2.

Таблиця 3.2.

Активність еластази в плазмі крові хворих із захворюваннями ЛОР-органів

Групи обстежених	Амідолітична еластазоподібна активність, нмоль п-НА/(год·мл)
Практично здорові донори (контроль)	9,2±1,0
Хворі з хронічним тонзилітом	10,4±1,8
Хворі з доброякісними захворюваннями	12,1±2,9
Хворі з передраковими захворюваннями	13,8±1,6*
Хворі з злоякісними захворюваннями II стадії	10,3±1,5
Хворі з злоякісними захворюваннями III стадії	14,0±1,7*

* – статистично достовірні зміни в порівнянні з показником донорів, $p \leq 0,05$.

Як видно з табл. 3.2, активність еластази у хворих на хронічний тонзиліт незначно перевищувала контрольні значення, при доброякісних захворюваннях ЛОР-органів вона була вищою за контроль у 1,3 рази. У пацієнтів з передраковими та злоякісними захворюваннями ЛОР-органів

III-ої стадії активність еластази достовірно перевищувала таку умовно здорових осіб в однаковій мірі у 1,5 рази. При II-ій стадії онкологічного процесу зростання цього показника відносно контролю було незначним і статистично невірогідним.

Відомо, що гранули нейтрофілів містять понад 20 ензимів, серед яких колагенази, желатинази, еластаза, катепсин G. Еластаза забезпечує розщеплення структурних компонентів патогенних мікроорганізмів. Висока концентрація еластази у зрілих нейтрофілах призводить до деструктивних процесів, якщо вона у великій кількості вивільняється в позаклітинний простір [120,121]. Під час запалення кількість нейтрофілів різко зростає. Зростання активності еластази в позаклітинному просторі визнано основною ланкою в патогенезі деяких запальних захворювань (емфізема легень, нефрит, панкреатит). Відмічене нами зростання її активності при досліджуваних захворюваннях ЛОР-органів може бути обумовлене прозапальною дією еластази. Відомо, що еластаза виявляє індукуючу дію на секрецію IL-6, IL-8, колонієстимулюючого фактора, в результаті чого збільшується кількість запальних клітин. Окрім того, еластаза фрагментує α_1 -III на хемоатрактанти, що збільшує міграцію нейтрофілів до вогнища запалення [120,122]. Припускають, що первинний розвиток пухлини пов'язаний із запальними процесами, зокрема, активацією та інфільтрацією лейкоцитів, в тому числі, макрофагів та нейтрофілів, що викликає метаболічні та фізіологічні зміни при тривалих запальних процесах та приводить до розвитку пухлин [123,124]. Показано, що інфільтрація пухлин нейтрофілами та підвищення її концентрації в крові хворих пов'язані з пізніми стадіями хвороби та є поганим прогнозом виживаності при різних пухлинах, в тому числі – при новоутвореннях верхніх дихальних шляхів [126,127]. Підтверджено участь еластази у міграції та інвазії злоякісних клітин при раку підшлункової залози [128,129]. В гомогенатах пухлин хворих на рак гортані та молочної залози показано зростання активності

еластази та дефіцит її інгібіторів, що може бути прогностичним показником перебігу захворювання і терміну виживаності цих хворих [129].

Показане у нашій роботі підвищення активності еластази у крові хворих із передраковими та злоякісними новоутвореннями ЛОР-органів дозволяє припустити її участь у розвитку досліджуваних нами захворювань ЛОР-органів. Такий вплив еластази може бути обумовлено її здатністю гідролізувати компоненти міжклітинного матриксу (еластин, колагени, протеоглікани) та активувати металопротеїнази, синтезовані трансформованими клітинами [130]. Тому гранулоцитарна еластаза є вагомим чинником процесів інвазії та метастазування. Вона також виявляє індукуючу дію на проліферацію та міграцію трансформованих клітин, активує протеїнази в мікрооточенні пухлини, котрі розщеплюють PAI-1, що, в свою чергу, призводить до вивільнення різних факторів росту. Окрім цього, еластаза активує TGF β , секретований пухлиною в неактивному стані, сприяючи таким чином TGF β -опосередкованій імуносупресії [131-134].

Зростання активності еластази при хронічному тонзиліті та новоутвореннях ЛОР-органів може бути наслідком зростання кількості нейтрофілів при запальних процесах [126]. Відомо, що гіперпродукція прозапальних цитокінів є визнаним механізмом розвитку запальних процесів. За участі цитокінів - інтерлейкінів (IL-1, IL-6, IL-8, IL-18), фактору некрозу пухлини (TNF- α) і простагландину E₂ (PGE₂) запускається процес секреторної дегрануляції нейтрофілів з вивільненням еластази і матриксних металопротеїназ. Ці ж цитокіни контролюють рівень експресії лейкоцитарних протеїназ на поверхні нейтрофілів і регулюють їх секрецію з поверхні клітин в плазму крові і тканини організму [120].

В здоровому організмі існує баланс активності лейкоцитарних протеїназ, що регулюється природними плазмовими і тканинними інгібіторами для підтримки функціонального стану тканин. Проте пошкоджуюча дія еластази щодо протеїнів тканин і плазми крові відбувається навіть незважаючи на швидке зв'язування ензиму інгібіторами

плазми крові: α_1 -ІІІ та частково α_2 -МГ. Вважають, що дисбаланс нейтрофільної еластази та її основного інгібітору α_1 -ІІІ відіграє значну роль у розвитку пухлин печінки, легенів, прямої кишки [135-138].

Ключовим ензимом системи зсідання крові є тромбін. Відомо, що окрім виконання своєї головної функції – перетворення розчинного фібриногену на фібрин-мономер, тромбін задіяний в регуляції різноманітних фізіологічних та патофізіологічних процесів [139].

Результати дослідження амідолітичної тромбін-подібної активності у хворих на хронічний тонзиліт, доброякісні, передракові захворювання та злоякісні новоутворення ЛОР-органів узагальнено в табл. 3.3.

Таблиця 3.3.

Амідолітична тромбін-подібна активність у плазмі крові хворих із захворюваннями ЛОР-органів

Групи обстежених	Амідолітична активність тромбіну, нмоль п-НА/(хв·мл)
Практично здорові донори (контроль)	9,6±1,0
Хворі з хронічним тонзилітом	11,8±1,4
Хворі з доброякісними захворюваннями	17,5±3,8*
Хворі з передраковими захворюваннями	16,6±1,5*
Хворі з злоякісними захворюваннями II стадії	10,2±2,0
Хворі з злоякісними захворюваннями III стадії	16,0±3,0*

* – статистично достовірні зміни в порівнянні з показником донорів, $p \leq 0,05$.

Як видно з наведених в табл. 3.3 даних, тромбін-подібна активність у хворих на хронічний тонзиліт була вищою за показник контрольної групи у 1,2 рази. У хворих на доброякісні та передракові новоутворення виявлено достовірне збільшення цієї активності відносно практично здорових осіб у 1,8 та 1,7 рази відповідно. У пацієнтів зі злоякісними новоутвореннями ЛОР-органів II-ої стадії рівень тромбін-подібної активності не відрізнявся від

такого порівняно з контролем. При III-й стадії онкологічного процесу цей показник достовірно збільшувався у 1,7 рази.

З літературних даних відомо, що тромбін регулює розвиток гострих і хронічних запальних процесів шляхом активації PARs рецепторів, що призводить до стимуляції синтезу і секреції цитокінів, хемокінів та інших протеїнів різними типами клітин [140]. Впливаючи на ендотеліальні клітини, тромбін може ініціювати синтез медіаторів запалення, таких як, IL-6, IL-8, (TGF β), фактор хемотаксису моноцитів (MCP-1), тромбоцитарний фактор росту (PDGF), молекули клітинної адгезії (ICAM-1) та P-селектин. Активуючи PARs рецептори тромбоцитів, він викликає зміну форми тромбоцитів та вивільнення АДФ, серотоніну, тромбоксану та різних хемокінів і факторів росту. Крім того, на поверхні тромбоцитів тромбін вивільняє головні рецептори фібриногену - GPIIb-IIIa, P-селектин та ліганди CD40 [141-143]. Перші два підсилюють агрегацію тромбоцитів, а ліганди CD40 стимулюють секрецію ендотеліальними клітинами хемокінів і експресії адгезивних молекул, забезпечуючи хемоатрактантний сигнал для лейкоцитів. Взаємодія тромбіну з тромбоцитами та фібриногеном, котрі також беруть участь у розвитку запальних процесів, є проявом його прозапальної активності [144].

Показане підвищення тромбінової активності при хронічному тонзиліті може бути обумовлено описаними механізмами участі тромбіну у розвитку хронічних запальних процесів [145,146]. Дослідження тромбінової активності при доброякісних та передракових захворюваннях ЛОР-органів раніше не проводились. Підвищений рівень цього показника згідно отриманих нами результатів при цих захворюваннях добре узгоджуються з відомими даними щодо імовірності розвитку доброякісних та передракових захворювань ЛОР-органів внаслідок тривалих хронічних запальних процесів.

Відомо, що тромбін бере участь в розвитку передракових процесів із наступним формуванням пухлини кишківника на тлі запального процесу [147]. Показано важливе значення опосередкованого тромбіном протеолізу у

формуванні аденоми на ранніх, початкових стадіях злоякісних процесів слизової оболонки, асоційованих із запальними процесами. Доведено, що запальні процеси лежать в основі механізмів, що пов'язують тромбін та злоякісну трансформацію, так як за дії канцерогенів при відсутності стимульованих процесів запалення зменшення рівня протромбіну на процеси злоякісного новоутворення не впливало. Тобто тромбін є важливим регулятором саме початкових стадій онкологічного процесу [148]. Припускають, що тромбін сприяє процесам малігнізації через механізми, пов'язані з попереднім запаленням. Біохімічні процеси, опосередковані тромбіном, змінюють функції запалення у напрямку розвитку пухлини завдяки зміні активності лейкоцитів (утворення активних форм кисню, вивільнення протеаз, ключових цитокінів та інших ефекторних молекул), регуляцію відповіді епітеліальних клітин на запальні реакції та незначно впливають на пошкодження слизової оболонки чи інфільтрацію клітин. Локальне виділення продуктів запалення, стимульоване тромбіновою активністю, підтримує прогресію злоякісного процесу через кілька незалежних механізмів. Місцеве вивільнення цитокінів та факторів росту сприяє виживанню та проліферації передракових та трансформованих клітин. Крім того, місцеве вивільнення потенційно мутагенних молекул реактивного кисню та азоту збільшують ризик виникнення трансформацій в епітеліальних клітинах [147,149]. Активація тромбіном фактору транскрипції κB (NF- κB) при запальних процесах сприяє злоякісним змінам в епітеліальних клітинах. Отже, імовірно, тромбін завдяки не пов'язаним з фібриноутворенням механізмам може відігравати важливу роль в розвитку досліджуваних передракових захворювань ЛОР-органів.

Виявлені нами зміни тромбін-подібної активності у хворих із злоякісними новоутвореннями ЛОР-органів III-ої стадії добре узгоджуються із наведеними в літературі даними. Підвищена активність тромбіну виявлена у крові хворих із гліомою, раком яєчників, в тканинах злоякісної меланоми, бронхоальвеолярній рідині хворих на остеосаркому із легневими

метастазами [150-152]. Зростання цього показника при раку легенів асоційоване з тяжким перебігом захворювання та зменшенням ефективності хіміотерапії [153].

Відомо, що можлива участь тромбіну в процесах онкогенезу опосередковується його активністю щодо PARs-рецепторів [154]. В різних типах пухлин експресія тромбінового рецептора PAR-1 корелює із злоякісним фенотипом. Показано роль PAR-1 в розвитку епітеліальних пухлин, зокрема, молочної залози, товстого кишківника, яєчників, нирок, легенів, меланоми, карциноми печінки [155,156]. Досліджуються можливі механізми впливу тромбіну на процеси онкогенезу. На поверхні злоякісних клітин та клітинах прилеглих до пухлини тканин відбувається активація тромбіну тканинним фактором. Утворений тромбін запускає різноманітні активаційні каскади, що сприяють проліферації та міграції пухлинних клітин та ангиогенезу. Процеси активації ангиогенезу є PARs опосередкованими і незалежними від формування фібрину. Тромбін зменшує здатність ендотеліальних клітин прикріплюватися до протеїнів базальної мембрани та активує желатиназу А (MMP-2) та катепсин Д, що сприяють її деградації [157,158]. Саме тромбін індукує синтез ендотеліальними клітинами фактору росту ендотелія судин (VEGF), що збільшує рівень їх проліферації. Крім того, тромбін підвищує експресію ключових VEGF-рецепторів (KDR та Flt1) та рівень експресії інтегринів $\alpha_v\beta_3$, що ідентифіковані як маркери ангиогенного фенотипу ендотеліальних клітин. Дія тромбіну стимулює ракові клітини до секреції VEGF, зумовлюючи тим самим взаємну стимуляцію між ендотеліальними та злоякісними клітинами [159,160].

Існують експериментальні дані щодо впливу тромбіну на прогресію пухлин та метастазування [161]. Показано, що прямий вплив тромбіну на ракові клітини призводить до збільшення адгезії злоякісних клітин до тромбоцитів, ендотеліальних клітин та субендотеліального матриксу, підвищення синтезу металопротеїназ та збільшену експресію інтегринів $\alpha_v\beta_3$, задіяних в процесах метастазування. Цей вплив істотно обмежувався

антитілами до тромбінових рецепторів, виявлених на поверхні різних видів ракових клітин. При підшкірному введенні злоякісних клітин застосування інгібітору тромбіну гірудину призводило до затримки первинного росту пухлини, індукції некрозу пухлини та зменшення гематологічної дисемінації у віддалені органи. Тобто, тромбін впливає як на ангиогенез, так і на ріст пухлини та метастазів [161].

Показано індукцію тромбіном злоякісного фенотипу в різних лініях ракових клітин за рахунок стимуляції проонкогенного/ангіогенного гена GRO- α (growth-regulated oncogene- α), що призводило до різкого збільшення синтезу судинних регуляторних протеїнів та факторів росту [162,163].

В останні роки набула поширення гіпотеза епітеліально-мезенхімальної трансформації (EMT) як ключового механізму метастазування. Під час цього процесу відбувається перехід епітеліальних клітин із високо диференційованого стану до менш диференційованого. Це супроводжується перетворенням клітин на менш спеціалізовані з набуттям ними здатності до синтезу компонентів позаклітинного матриксу, скоротливості, міграції, редиференціювання у нові структури, що забезпечує процеси міграції ракових клітин, інвазії та дисемінації. Доведено індукування процесів EMT тромбіном: за його активації PAR-1 рецепторів виявлено збільшення синтезу клітинами мезенхімальних маркерів на тлі зменшення епітеліальних [164].

Можлива участь тромбіну на різних етапах канцерогенезу забезпечується його різними клітинними ефектами. Рівень тромбінової активності при захворюваннях ЛОР-органів є маловивченим.

Відомо, що процес активації тромбіну в присутності різноманітних протеїназ призводить до утворення його похідних, що істотно відрізняються від інтактного α -тромбіну за цілою низкою властивостей. Тому наступний етап роботи присвячено визначенню рівня протромбінового пулу – сукупності молекул, що мають антигенні ділянки молекули протромбіну. До таких молекул належать протромбін, мезотромбін, тромбін, аномальні форми протромбіну, різноманітні комплекси цих молекул з іншими протеїнами,

фрагменти тромбіну. Результати дослідження протромбінового пулу плазми крові хворих на хронічний тонзиліт, доброякісні, передракові захворювання та злоякісні новоутворення ЛОР-органів наведено в табл. 3.4.

Таблиця 3.4.

Рівень протромбінового пулу плазми крові хворих із захворюваннями
ЛОР-органів

Групи обстежених	Протромбіновий пул, ум. од./мл
Практично здорові донори (контроль)	0,323±0,028
Хворі з хронічним тонзилітом	0,301±0,018
Хворі з доброякісними захворюваннями	0,293±0,027
Хворі з передраковими захворюваннями	0,402±0,061
Хворі з злоякісними захворюваннями II стадії	0,479±0,058*
Хворі з злоякісними захворюваннями III стадії	0,585±0,049*

* – статистично достовірні зміни в порівнянні з показником донорів, $p \leq 0,05$.

Згідно з табл. 3.4, вміст протромбінового пулу в плазмі крові хворих на тонзиліт і доброякісні новоутворення ЛОР-органів був на рівні контрольних значень. У пацієнтів із передраковими захворюваннями гортані він зростав відносно контролю у 1,2 рази. Визначення протромбінового пулу у хворих з II-ою та III-ою стадією злоякісного захворювання дозволило встановити достовірне збільшення цього показника порівняно з контролем, а саме: у 1,5 та 1,8 рази відповідно. Такі зміни можуть бути обумовлені участю різних похідних форм тромбіну в протеолітичних процесах при розвитку новоутворень ЛОР-органів. Існують дані щодо можливостей терапевтичного обмеження підвищеної активності тромбіну шляхом блокування PARs-рецепторів [165,166]. Це може бути ефективним підходом для попередження розвитку пухлин у осіб підвищеного ризику, в тому числі у хворих із передраковими захворюваннями ЛОР-органів.

Основним інгібітором тромбіну в системі гемостазу є АТ-III. Результати дослідження вмісту АТ-III в плазмі крові хворих на хронічний тонзиліт, доброякісні, передракові та злоякісні новоутворення ЛОР-органів узагальнено в табл. 3.5. Як видно з наведених даних, вміст АТ-III при всіх патологіях виявляв тенденцію до підвищення, а у хворих на рак ЛОР-органів III-ої стадії виявлено достовірне зростання рівня цього інгібітору порівняно з контрольною групою у 1,2 рази. Тобто, незважаючи на підвищення тромбін-подібної активності, у всіх групах досліджуваних хворих зниження рівня АТ-III не спостерігалось.

Таблиця 3.5.

Рівень АТ-III у плазмі крові хворих із захворюваннями ЛОР-органів

Групи обстежених	АТ-III, %
Практично здорові донори (контроль)	100,0±2,7
Хворі з хронічним тонзилітом	109,0±3,9
Хворі з доброякісними захворюваннями	114,0±6,3
Хворі з передраковими захворюваннями	110,4±5,3
Хворі з злоякісними захворюваннями II стадії	107,0±5,0
Хворі з злоякісними захворюваннями III стадії	119,0±6,6*

* – статистично достовірні зміни в порівнянні з показником донорів, $p \leq 0,05$.

Логічно припустити, що підвищення рівня АТ-III у хворих із хронічним тонзилітом та новоутвореннями ЛОР-органів відіграє компенсаторну роль для зменшення впливу запальних процесів, опосередковану як інгібуванням тромбіну, так і механізмами, незалежними від системи коагуляції. Відомо, що АТ-III є поліфункціональним протеїном, що бере участь у двосторонньому зв'язку між процесами коагуляції та запалення. Він виявляє протизапальні властивості та широку антикоагулянтну дію: окрім тромбіну, АТ-III інгібує плазмін, фактори IXa, Xa, XIa, XIIa. АТ-III відіграє центральну роль в опосередкуванні взаємозв'язку між антикоагулянтними та

протизапальними ефектами. Деякі протизапальні властивості АТ-III забезпечуються його здатністю інгібувати тромбін, який активує тромбоцити та ендотеліальні клітини, стимулюючи секрецію цитокінів та активність лейкоцитів [167]. Крім блокування тромбін-індукованих запальних шляхів, АТ-III інгібує інші прозапальні ензими системи коагуляції: перешкоджає Ха-індукованому утворенню інтерлейкінів (IL-6, IL-8), Е-селектину та інших молекул, що беруть участь у міграції моноцитів та їх адгезії до ендотеліальних клітин. Він інгібує утворення комплексу тканинного фактору з VIIa, що має стимулюючий вплив на синтез запальних цитокінів та хемокінів. Отже, АТ-III може зменшувати запалення шляхом пригнічення різноманітних коагуляційних процесів та модулювати запальну відповідь через механізми, незалежні від системи коагуляції. Пряме зв'язування цього інгібітора з рецепторами лейкоцитів перешкоджає їх взаємодії з ендотеліальними клітинами та забезпечує протизапальний вплив. АТ-III бере участь також в регуляції ангиогенезу, впливаючи на ендотеліальні клітини та призводячи до повного блокування ангиогенних каскадів [167,168].

Відомо, що зміни вмісту АТ-III при різних захворюваннях мають різноспрямований характер. Нами виявлене підвищення його вмісту у хворих з доброякісними новоутвореннями ЛОР-органів на відміну від пацієнтів із доброякісними новоутвореннями шкіри, у яких він не відрізнявся від норми. Показане нами зростання рівня АТ-III в групах хворих із передраковими та злоякісними захворюваннями ЛОР-органів має протилежний напрямок змін порівняно до хворих з меланомою шкіри, у яких відмічено зниження його рівня [117]. Отримані нами дані щодо вмісту інгібітора у цих хворих узгоджуються з показником пацієнтів на рак підшлункової залози, у яких рівень АТ-III був значно вищим за норму. Показано, що співвідношення тромбін/АТ-III може бути потенційним діагностичним маркером для виявлення аденокарциноми підшлункової залози [169]. Підвищення вмісту комплексу тромбін/АТ-III може бути пов'язане із розвитком злоякісних

новоутворень, причому високий рівень цих маркерів визнано ознакою несприятливого прогнозу у хворих на рак легенів [170].

Необхідною умовою нормального функціонування гемостатичної системи є динамічна рівновага між протеолітичними ензимами та їх інгібіторами. Підвищення активності протеолітичних ензимів на тлі зменшення вмісту їх інгібіторів може призводити до пошкодження різноманітних протеїнів та зумовлювати порушення їх функціональної активності. Тому інгібітори протеїназ можна розглядати як компоненти універсальної системи, що захищають організм від надмірного протеолізу, перешкоджають деструкції тканин та забезпечують захист органів і тканин від дії протеїназ ендogenous та екзогенного походження [12]. До 90% загального антитрипсинового потенціалу плазми крові забезпечує α_1 -ІІІ. Цей інгібітор належить до сімейства серпінів і є досить широкоспецифічним. Крім трипсину та трипсин-подібних протеїназ, він блокує дію еластази, колагенази, реніну, α_1 -дефензини нейтрофілів, ІІ-8 та лейкотриєн В₄, які є потужними атрактантами нейтрофілів у вогнищі запалення. α_1 -ІІІ є універсальним протизапальним інгібітором широкого спектру дії, а його дефіцит значною мірою впливає на темпи прогресування та інтенсивність запальних процесів [171-173].

Узагальнені результати дослідження вмісту α_1 ІІІ в плазмі крові хворих на хронічний тонзиліт, доброякісні, передракові захворювання та злоякісні новоутворення ЛОР-органів представлено у табл. 3.6.

Як впливає з наведених у табл. 3.6. даних, рівень α_1 ІІІ у хворих на хронічний тонзиліт та доброякісні новоутворення ЛОР-органів не відрізнявся від контрольних значень. У пацієнтів з передраковими захворюваннями та онкологічним процесом ЛОР-органів ІІ-ої стадії відмічено незначне зменшення його вмісту відносно показника контрольної групи. Проте при розповсюдженості злоякісного процесу - ІІІ-ій стадії онкологічного процесу - рівень α_1 ІІІ зазнавав достовірних змін в бік зростання.

Вміст α_1 ІІІ у плазмі крові хворих із захворюваннями ЛОР-органів

Групи обстежених	Вміст α_1 ІІІ, г/л
Практично здорові донори (контроль)	2,00±0,08
Хворі з хронічним тонзилітом	2,00±0,09
Хворі з доброякісними захворюваннями	2,00±0,20
Хворі з передраковими захворюваннями	1,90±0,10
Хворі з злоякісними захворюваннями II стадії	1,80±0,20
Хворі з злоякісними захворюваннями III стадії	2,50±0,20*

* – статистично достовірні зміни в порівнянні з показником донорів, $p \leq 0,05$.

При запальних та доброякісних захворюваннях ЛОР-органів змін рівня α_1 -ІІІ не виявлено. Водночас з даних літератури відомо, що за цілого ряду захворювань цей показник має різноспрямовані зміни. Так, при бронхіальній астмі, хронічних бронхітах, панкреатиті, запально-виразкових захворюваннях кишківника, запальних процесах органів малого тазу вміст α_1 -ІІІ зменшується [174-177]. Натомість при атопічному дерматиті та виразковій хворобі дванадцятипалої кишки його рівень зростає [178,179].

Одержані нами дані щодо зниження рівня α_1 -ІІІ у пацієнтів із злоякісними новоутвореннями II-ої стадії співпадають з результатами дослідження його вмісту у хворих на карциному молочної залози, рак печінки, сечового і жовчного міхура, простати [180-183]. Зниження рівня α_1 -ІІІ при онкологічних захворюваннях ЛОР-органів II-ої стадії може бути пов'язане як із його деструкцією пухлинними протеїназами, так і з секрецією дефектного α_1 -ІІІ злоякісними клітинами [115]. Навпаки, підвищення концентрації α_1 -ІІІ в плазмі крові, показане нами у хворих із злоякісними новоутвореннями III-ої стадії, погоджується з результатами досліджень плазми хворих на колоректальну карциному, інвазивну карциному шийки матки, рак легенів, шлунка, шкіри та кістково-суглобною локалізацією [13,117,184-186]. Зростання рівня α_1 -ІІІ в крові таких хворих з

новоутвореннями розглядають як компенсаторну реакцію на надмірну активацію протеолізу.

Не менш вагомим регулятором активності трипсин-подібних протеїназ є $\alpha_2\text{M}$. Відомо, що протеїни сімейства макроглобулінів, основним представником яких є $\alpha_2\text{M}$, беруть активну участь у розвитку запальних і проліферативних процесів [187]. Результати дослідження рівня $\alpha_2\text{M}$ у плазмі крові хворих на хронічний тонзиліт, доброякісні, передракові захворювання та злоякісні новоутворення ЛОР-органів представлено у табл. 3.7.

Таблиця 3.7.

Вміст $\alpha_2\text{M}$ у плазмі крові хворих із захворюваннями ЛОР-органів

Групи обстежених	Вміст $\alpha_2\text{M}$, г/л
Практично здорові донори (контроль)	2,00±0,09
Хворі з хронічним тонзилітом	1,70±0,05*
Хворі з доброякісними захворюваннями	1,60±0,20
Хворі з передраковими захворюваннями	1,80±0,10
Хворі з злоякісними захворюваннями II стадії	1,60±0,20
Хворі з злоякісними захворюваннями III стадії	1,50±0,10*

* – статистично достовірні зміни в порівнянні з показником донорів, $p \leq 0,05$.

Дані, наведені у табл. 3.7, свідчать про достовірне зниження рівня $\alpha_2\text{M}$ у хворих на хронічний тонзиліт у порівнянні з контрольною групою. У хворих із доброякісними та передраковими захворюваннями ЛОР-органів також відмічено його зменшення відносно донорів. Слід зазначити, що при злоякісних новоутвореннях ЛОР-органів обох стадій вміст $\alpha_2\text{M}$ в плазмі крові був нижчим за контроль, при III-ій стадії показано достовірне його зменшення у 1,3 рази.

Важливою рисою $\alpha_2\text{M}$ є його здатність зв'язувати практично всі відомі гідролази без блокування їх активного центра, що відрізняє його від серпінів, котрі необоротньо інактивують ензими. Розщеплення протеїназою пептидного зв'язку так званої “приманкової ділянки” призводить до

нековалентного зв'язування ензиму поза активним центром, що істотно обмежує гідролітичну дію останнього. В подальшому відбувається ковалентне зв'язування захопленого $\alpha_2\text{M}$ ензиму. Внаслідок цих взаємодій відбувається модифікація молекули $\alpha_2\text{M}$, на якій експонуються нові сайти, що забезпечують $\alpha_2\text{M}$ здатність приєднувати нові молекули найрізноманітніших сполук. До них належать гормони пептидної природи, цитокіни, фактори росту, інтерлейкіни, інтерферони, фактори некрозу пухлин, а також імуноглобуліни, біогенні аміни та метали. $\alpha_2\text{M}$ – головний транспортер цитокінів (інтерлейкінів, інтерферонів та факторів некрозу пухлин), які контролюють запальну відповідь [188]. Більшість цитокінів реалізують свої ефекти тільки в комплексі з $\alpha_2\text{M}$, через що його слід вважати одним із важливих компонентів регуляції імунної системи. Тобто $\alpha_2\text{M}$ є універсальним регулятором, що здійснює контроль за запальною відповіддю організму [189,190].

Одержані нами дані щодо змін рівня $\alpha_2\text{M}$ при хронічному тонзиліті є подібними до змін при запальних захворюваннях кишківника та яєчників, при яких рівень $\alpha_2\text{M}$ в плазмі крові знижено. Зменшення активності цього інгібітору на тлі активації протеолізу показано при фіброзі печінки, що розвивається внаслідок хронічних запальних процесів [177,191,192]. Відомо, що зниження вмісту $\alpha_2\text{M}$ може бути критерієм розвитку хронічних запальних процесів в організмі.

Зменшення рівня $\alpha_2\text{M}$ при хронічному тонзиліті відповідає механізмам утворення протеїнів гострої фази запалення. Відомо, що його біосинтез безпосередньо регулюється цитокінами. Ген $\alpha_2\text{M}$ входить до локусу генів протеїнів гострої фази запальної реакції, що запускається прозапальними цитокінами $\text{IL-1}\beta$, IL-6 , $\text{TNF-}\alpha$. При цьому промотор гену $\alpha_2\text{M}$ запускається безпосередньо IL-6 , тоді як два інших цитокіни по каскадному механізму відіграють роль його інгібіторів. Тому концентрація $\alpha_2\text{M}$ в плазмі крові знижується, а не зростає подібно до вмісту більшості гострофазних протеїнів [191].

У хворих на доброякісні та передракові захворювання ЛОР-органів рівень $\alpha_2\text{M}$ був також нижчим порівняно до контрольних значень. Ці захворювання розвиваються внаслідок тривалих хронічних запальних процесів, чим, імовірно, й пояснюється зменшення рівня $\alpha_2\text{M}$ як протеїну гострої фази запалення і обумовлено утворенням комплексів з різними біологічними факторами, що продукуються під час запальних реакцій. Виявлені нами зміни при доброякісних новоутвореннях ЛОР-органів співпадають з результатами досліджень вмісту $\alpha_2\text{M}$ при новоутвореннях яєчників, якими показано зниження його рівня як при доброякісних новоутвореннях, так і при раку яєчників [193,194]. Припускають, що $\alpha_2\text{M}$ не бере прямої участі у розвитку добро- чи злоякісної проліферації, однак його дефіцит та накопичення регуляторно-транспортних комплексів $\alpha_2\text{M}$ -плазмін в кровообізі можуть бути пусковим механізмом проліферації. Можна припустити такий же механізм участі $\alpha_2\text{M}$ у процесах розвитку доброякісних та передракових захворювань ЛОР-органів.

Виявлене нами зменшення вмісту $\alpha_2\text{M}$ у хворих із злоякісними новоутвореннями ЛОР-органів узгоджується з літературними даними. Подібні зміни рівня $\alpha_2\text{M}$ відмічено при пухлинах кісток, легенів, колоректальному раці. Причому виявлено зв'язок між рівнем $\alpha_2\text{M}$ у сироватці крові хворих на рак простати, рак шлунка та наявністю віддалених метастазів і показано можливість прогнозу метастазування за цим показником [13,195-197]. При раку молочної залози та легенів ріст пухлин і розвиток метастазів також супроводжується зниженням рівню $\alpha_2\text{M}$ в сироватці крові у 80-90% випадків, а при ремісії рівень його стабілізується [198]. Показано, що розвиток остеолітичних метастазів раку різної локалізації супроводжується зниженням вмісту основних інгібіторів - $\alpha_2\text{M}$ та $\alpha_1\text{-III}$ [119].

Протеїни сімейства макроглобулінів задіяні в патогенезі злоякісних новоутворень на всіх його стадіях, починаючи з ранніх і закінчуючи процесом метастазування завдяки наявності рецепторів модифікованого $\alpha_2\text{M}$ на багатьох клітинах. Основним рецептором $\alpha_2\text{M}$ є макроглобуліновий

рецептор (LRP) або CD91, що виконує функцію ендоцитозу в клітині, в тому числі за злякисної трансформації. Крім того, на поверхні пухлинних клітин міститься інший вид макроглобулінових рецепторів, так званий сигнальний. Під час реакції з модифікованим $\alpha_2\text{M}$ сигнальний рецептор ініціює проліферацію клітин-мішеней. Кількісний склад рецепторів у новоутвореннях неоднорідний. В зонах інвазії та метастазування їх значно більше, ніж в інтактних клітинах та щільних пухлинних конгломератах [199]. Велика кількість рецепторів дозволяє злякисно трансформованим клітинам отримувати більшу кількість енергоресурсів у вигляді ліпопротеїдів, хіломікронів та регуляторних субстанцій, що транспортуються $\alpha_2\text{M}$. Оскільки $\alpha_2\text{M}$ не має вибіркості для речовин, що ним транспортуються, біологічно активні сполуки, котрі доставляються до пухлини $\alpha_2\text{M}$, виявляють різноспрямований вплив на її ріст. Так, фактори росту стимулюють проліферацію пухлинних клітин. Цей процес може підсилюватися за рахунок того, що фактори росту сприяють додатковій експресії LRP на поверхні злякисно трансформованих клітин [188,190].

Зменшення вмісту $\alpha_2\text{M}$ у хворих із злякисними новоутвореннями ЛОР-органів відносно контрольного значення може бути зумовлене комплексоутворенням інгібітору з різними біологічними факторами. Окрім цього, під час інвазивних процесів відбувається руйнування клітин мікрооточення пухлини, що призводить до виділення лізосомальних гідролаз, здатних як до розширення зони некрозу, так і до лізису пухлинних клітин. Тому може відбуватися інтенсивне використання $\alpha_2\text{M}$ для зв'язування протеїназ зруйнованих клітин для захисту пухлинних клітин від їх деструктивної дії [200]. Крім захисту від гідролітичних протеїназ, $\alpha_2\text{M}$, трансформований гідролазами, блокує антигени головного комплексу гістосумісності імунокомпетентних клітин. Також блокування синтезу $\alpha_2\text{M}$ прозапальними цитокінами сприяє зменшенню його загального вмісту в плазмі крові цих пацієнтів [201,202].

Виявлені особливості вмісту та активності компонентів ланки зсідання крові варто співставити з показниками її функціонування. До них належать показники активованого парціального (часткового) тромбoplastинового часу (АЧТЧ-тест), протромбінового та тромбінового часу.

АЧТЧ-тест відображає зміни активності факторів внутрішнього механізму формування протромбіназної активності: XII, VIII, IX, XI, прекалікреїну та високомолекулярного кініногену та дозволяє виявляти виключно плазмові дефекти внутрішньої системи активації X фактора у процесі зсідання крові. Протромбіновий тест відображає стан активності вітамін К-залежних факторів: фактору II (протромбіну), фактору VII (проконвертину), фактору X (Стюарта), фактору V (проакселерину). Для оцінки динаміки кінцевого етапу зсідання крові застосовують показник тромбінового часу, що відображає швидкість зсідання фібринового згустку стандартною кількістю екзогенного тромбіну. Цей метод дозволяє оцінити кінцевий етап зсідання крові – перетворення фібриногену в фібрин з наступною його полімеризацією.

Результати дослідження АЧТЧ, протромбінового та тромбінового часу в плазмі крові хворих досліджуваних груп наведено в таблиці 3.8.

Як впливає з наведених в табл. 3.8 даних, час зсідання плазми крові в АЧТЧ-тесті був подовженим відносно контролю у хворих всіх досліджуваних груп: при хронічному тонзиліті на достовірному рівні, у решті груп зміни цього показника була на рівні тенденції. Результати табл. 3.8 свідчать про істотні зміни протромбінового часу. Швидкість перетворення протромбіну в тромбін уповільнюється як при хронічному тонзиліті, так і доброякісних та передракових захворюваннях. Найбільш виражені зміни тесту при злоякісних процесах II-ої та III-ої стадій, при яких показано подовження протромбінового часу у 1,2 рази порівняно до результатів практично здорових людей. Згідно отриманих нами даних, показник тромбінового часу у всіх досліджуваних групах хворих не зазнавав істотних відмін від рівня контрольної групи.

Показники функціонування каскаду зсідання крові хворих із захворюваннями ЛОР-органів

Групи обстежених	АЧТЧ-тест, с	Протромбіновий час, с	Тромбіновий час, с
Практично здорові донори (контроль)	43,0±0,6	23,5±0,8	15,0±0,2
Хворі з хронічним тонзилітом	46,0±1,3*	25,0±0,7	15,6±0,2
Хворі з доброякісними захворюваннями	45,0±1,3	26,0±0,6*	15,6±0,6
Хворі з передраковими захворюваннями	44,5±1,1	27,0±0,8*	15,3±0,4
Хворі з злоякісними захворюваннями II стадії	46,0±1,5	28,0±1,4*	14,90±0,40
Хворі з злоякісними захворюваннями III стадії	44,5±0,9	29,0±1,0*	15,70±0,30

* – статистично достовірні зміни в порівнянні з показником донорів, $p \leq 0,05$.

Подовження АЧТЧ свідчить про дефіцит плазмових факторів (крім VІІ і XIII) та вказує на перевагу гіпокоагуляції. З літературних даних відомо, що АЧТЧ-тест за новоутворень зазнає різноспрямованих змін. В групі хворих із доброякісними новоутвореннями ЛОР-органів нами показано подовження АЧТЧ на противагу показнику хворих із доброякісними новоутвореннями шкіри, у яких він не відрізнявся від контролю [117]. Виявлені нами зміни АЧТЧ-тесту у пацієнтів із злоякісним процесом ЛОР-органів узгоджуються з результатами досліджень при меланомі шкіри та раку молочної залози, при яких показано його подовження [117,203]. При цьому при розвитку регіонарних метастазів при злоякісних новоутвореннях молочної залози АЧТЧ-тест був достовірно довшим відносно хворих без метастазів, тобто динамічна оцінка коагуляційного ланцюга гемостазу опосередковано

відображала тяжкість перебігу злякисного процесу. Подібні зміни у цих хворих автори пояснюють виснаженням факторів внутрішнього механізму формування протромбінази [203].

Виявлені відміни від норми протромбінового часу в плазмі крові хворих досліджуваних нами груп можуть вказувати на зміни зовнішнього механізму формування протромбіназної активності. Слід зазначити, що питання патогенетичного значення показників коагуляційного гемостазу за процесів метастазування малігнізованих клітин лишається відкритим. Встановлені нами зміни протромбінового часу при онкологічних процесах ЛОР-органів подібні до змін показника при вузловій формі раку молочної залози, при якому показано подовження протромбінового часу відносно контролю, причому зміни залежать від стадії захворювання та можуть бути використаними в комплексній діагностиці паранеопластичних зсувів при новоутвореннях молочної залози [203,204]. З літературних даних відомо, що при злякисних новоутвореннях кишківника рівень протромбінового часу є в межах нормальних значень на відміну від показаних нами змін при онкологічних захворюваннях ЛОР-органів [205].

Відомо, що багатьом прокоагулянтним та фібринолітичним факторам притаманно кілька функцій. Так, основна функція фібриногену - утворення внаслідок протеолітичної дії тромбіну фібрину, що становить матрикс кров'яного згустку. Окрім цього, він бере участь в різноманітних компенсаторних механізмах і є визнаним протеїном гострої фази [206]. Дані щодо вмісту фібриногену в плазмі крові хворих на хронічний тонзиліт, доброякісні, передракові та злякисні новоутворення ЛОР-органів представлені в таблиці 3.9.

Як видно з наведених у таблиці даних, нами встановлено зміни вмісту фібриногену в плазмі крові хворих всіх досліджуваних груп. При хронічному тонзиліті та доброякісних новоутвореннях зміни мали помірний характер. У пацієнтів із передраковими захворюваннями та II-ою стадією раку вміст фібриногену був збільшеним у 1,4 рази. Найбільше значення рівня

фібриногену спостерігали у хворих з III-ю стадією раку ЛОР-органів: його вміст перевищував у 1,8 рази рівень практично здорових осіб.

Таблиця 3.9.

Вміст фібриногену в плазмі крові хворих із захворюваннями ЛОР-органів

Групи обстежених	Вміст фібриногену, г/л
Практично здорові донори (контроль)	2,2±0,1
Хворі з хронічним тонзилітом	2,6±0,2
Хворі з доброякісними захворюваннями	2,5±0,1*
Хворі з передраковими захворюваннями	3,1±0,2*
Хворі з злоякісними захворюваннями II стадії	3,1±0,2*
Хворі з злоякісними захворюваннями III стадії	4,0±0,3*

* – статистично достовірні зміни в порівнянні з показником донорів, $p \leq 0,05$.

Відомо, що фібриноген належить до протеїнів гострої фази. Кожний запальний процес супроводжується розвитком системної запальної відповіді та підвищеним синтезом гострофазних протеїнів. Фібриноген відіграє важливу роль в процесах клітинної адгезії, онкогенезу та метастазування, його вміст зростає у відповідь на запалення і пошкодження тканин [207,208]. Показано участь фібриногену/фібрину у розвитку захворювань, що розвиваються на тлі запальних процесів: ревматоїдний артрит, розсіяний склероз, сепсис, інфаркт міокарду. Встановлене у нашій роботі підвищення концентрації фібриногену як при хронічному тонзиліті, так і при доброякісних та передракових процесах, що тісно пов'язані з хронічними запальними процесами, може свідчити про можливу його участь у розвитку запалення при досліджуваних нами захворюваннях. Завдяки наявності великої кількості інтегринових та неінтегринових рецепторів на поверхні молекули, фібриноген опосередковує взаємозв'язок між системою з'єднання та

процесами запалення. При запаленні фібриноген плазми виходить в екстраваскулярний простір, де активовані моноцити/макрофаги проявляють прокоагулянтну активність шляхом експресії тканинного фактора і фактора VII, що забезпечує перетворення фібриногену у фібрин, створюючи матрикс для адгезії і міграції запальних клітин. Він бере також безпосередню участь у регуляції їх функцій. В результаті зв'язування фібриногену з інтегринами (CD11b) лейкоцитів, відбувається посилення експресії рецепторів IL-1 (IL-1r) і одночасне пригнічення рецепторів інгібітору цього цитокіну (IL-1ra), що підсилює прозапальні ефекти у вогнищі запалення [209,210].

Показане нами підвищення рівня фібриногену при злоякісних новоутвореннях ЛОР-органів у порівнянні з контрольним значенням узгоджується з результатами вивчення його вмісту при раку шлунка, стравоходу, яєчників, шийки матки, легенів, молочної залози, сечового міхура. Рівень фібриногену в плазмі крові цих хворих пов'язаний з розміром, гістологічним типом пухлин, їх інвазивністю. Визначення доопераційного рівня фібриногену належить до загальноновизнаних критеріїв прогнозу розвитку лімфатичних метастазів та виживаності хворих [211-216].

З даних літератури відомо, що фібриноген бере участь у розвитку онкологічних процесів за наступними механізмами. Молекула фібриногену має різні інтегринові та не інтегринові сайти зв'язування, а ракові клітини експресують велику кількість фібринових рецепторів ($\alpha 5\beta 1$, $\alpha v\beta 3$ -інтегрини та ICAM-1), що опосередковують взаємодію злоякісних та нормальних клітин. Через взаємодію з цими рецепторами фібриноген може підвищувати проліферацію та міграцію злоякісних клітин. Він бере безпосередню участь в адгезії та агрегації тромбоцитів зі злоякісними клітинами, сприяє утворенню тромбоцитарно-пухлинних агрегатів, що призводить до гематогенного розповсюдження останніх [217,218]. Взаємодіючи із тромбоцитами, фібриноген сприяє утворенню пухлинних мікротромбів, що перешкоджає доступу моноцитів, лейкоцитів і натуральних кілерів до злоякісних клітин. Тим самим він обмежує дію захисних систем організму на злоякісні клітини

та збільшує метастатичний потенціал останніх [219,220]. Фібриноген також бере участь у процесах ангіогенезу та росту пухлин, взаємодіючи з фактором росту фібробластів-2 (FGF-2) та судинно-ендотеліальним фактором росту (VEGF) [221]. Спричинене ростом пухлини пошкодження тканин призводить до системної запальної реакції, що зумовлює зростання вмісту фібриногену та, в свою чергу, сприяє розвитку пухлини та метастазуванню. Крім того, відомо, що самі пухлинні клітини здатні синтезувати фібриноген та цитокіни, задіяні в процесах запалення (наприклад, ІЛ-6), що, в свою чергу, стимулює синтез фібриногену [209,222].

Наступний етап роботи було присвячено визначенню рівня фактору фон Віллебранда (vWF). vWF – глікопротеїн, що бере участь як судинно-тромбоцитарному, так і коагуляційному гемостазі. Його синтез відбувається переважно в ендотеліальних клітинах. vWF відіграє важливу роль на початкових етапах зсідання крові, опосередковуючи адгезію тромбоцитів до субендотеліальної поверхні в місцях пошкодження судин та діє як протеїн-носії для фактора VIII [223].

Результати визначення вмісту vWF в плазмі крові хворих на хронічний тонзиліт, доброякісні, передракові та злоякісні захворювання ЛОР-органів узагальнено в табл. 3.10.

Згідно з наведеними у ній даними, у хворих на хронічний тонзиліт рівень vWF перевищував такий практично здорових осіб у 2,5 рази. В групі хворих із доброякісними утвореннями його вміст зростав у 2,3 рази відносно контролю. Такі ж зміни характерні для осіб із передраковими захворюваннями, у яких рівень vWF у 2,3 рази перевищував показник донорів. У хворих із злоякісними новоутвореннями ЛОР-органів II-ої та III-ої стадії показано збільшення його рівня у 2,3 та 2,7 рази відносно контрольної групи [224].

Вміст vWF в плазмі крові хворих із захворюваннями ЛОР-органів

Групи обстежених	vWF, у.о./мл
Практично здорові донори (контроль)	0,028±0,002
Хворі з хронічним тонзилітом	0,069±0,004*
Хворі з доброякісними захворюваннями	0,063±0,002*
Хворі з передраковими захворюваннями	0,069±0,002*
Хворі з злоякісними захворюваннями II стадії	0,065±0,002*
Хворі з злоякісними захворюваннями III стадії	0,076±0,004*

* – статистично достовірні зміни в порівнянні з показником донорів, $p \leq 0,05$.

Подібно до фібриногену, vWF належить до білків гострої фази. Його секреція відбувається під впливом факторів гемостазу (тромбіну, фібрину, плазміну) при активації окремих його ланок та медіаторів запалення (гістамін, компоненти комплементу, IL-1 α та TNF- α). Внаслідок впливу прозапальних цитокінів та пухлинних метаболітів відбувається дисфункція ендотелію, що призводить до збільшення рівня vWF в крові через його вихід з секреторних гранул ендотеліальних клітин. Збільшення його вмісту в плазмі крові свідчить про активацію гемостатичних процесів [217,225]. Підвищення рівня vWF у хворих на хронічний тонзиліт, доброякісні та передракові захворювання ЛОР-органів може бути обумовлене зростанням загального протеолітичного потенціалу крові, що призводить до його вивільнення із ендотеліальних клітин, та наслідком тривалого запального процесу, що супроводжується збільшенням рівня медіаторів запалення у кровообізі, котрі стимулюють його секрецію.

Підвищення рівня vWF показано за різних клінічних станів, зокрема у пацієнтів із злоякісними новоутвореннями молочної залози, яєчників,

простати, колоректальною карциномою відмічено зв'язок між рівнем збільшення його рівня в плазмі крові та агресивністю злоякісного процесу [226-229]. Проте нами не знайдено даних щодо його вмісту при онкологічних процесах ЛОР-органів. Показане в нашій роботі збільшення рівня vWF при раку досліджуваної локалізації має такий же напрямок змін, як і наведені в літературі дані. Зростання вмісту vWF в плазмі крові цих хворих може бути наслідком дисфункції ендотеліальних клітин через підвищену проліферацію, пов'язану з пухлинозалежним ангиогенезом. Крім того, відомо, що вивільнення тромбіну пухлинними клітинами індукує вивільнення vWF ендотеліальними клітинами. Показано пряму взаємодію між vWF і неопластичними клітинами, що свідчить про важливу роль vWF в гематогенному метастазуванні пухлини [230]. Так, на поверхні трансформованих клітин виявлено експресію поверхневих комплексів GrPb-IIIa та GrIb, що є адгезивними лігандами для vWF. Внаслідок зв'язування ракових клітин із лігандами та наступною взаємодією з тромбоцитами vWF сприяє формуванню атипових клітинних агрегатів, що не розпізнаються імунною системою та виявляють підвищену сорбційну здатність до ендотеліальної поверхні порівняно з окремими злоякісними клітинами [231].

Не меншої уваги заслуговує й фібринолітична ланка системи гемостазу. До провідних показників цієї ланки належить час лізису згустку, що характеризує загальну фібринолітичну активність плазми. Через вилучення інгібіторів плазміну еуглобулінова фракція є зручним об'єктом дослідження і дозволяє оцінити потенціал системи фібринолізу. Дані щодо результатів дослідження загальної фібринолітичної активності в плазмі крові хворих на хронічний тонзиліт, доброякісні, передракові та злоякісні захворювання ЛОР-органів наведені в табл. 3.11.

Як випливає з наведених у ній даних, загальна фібринолітична активності у хворих на хронічний тонзиліт та доброякісні новоутворення перебувала в межах контрольних значень, тоді як у хворих з передраковими

захворюваннями відмічено достовірне уповільнення фібринолізу у 1,3 рази. Пацієнтам із раком ЛОР-органів III-ої стадії притаманне пригнічення фібринолітичної активності, на відміну від показника хворих з II-ою стадією онкологічного процесу, у яких вона не відрізнялась від такої у практично здорових осіб.

Таблиця 3.11.

Фібринолітична активність плазми крові хворих із захворюваннями
ЛОР-органів

Групи обстежених	Фібринолітична активність, хв
Практично здорові донори (контроль)	237,0±5,0
Хворі з хронічним тонзилітом	240,0±8,0
Хворі з доброякісними захворюваннями	238,0±6,0
Хворі з передраковими захворюваннями	302,0±21,0*
Хворі з злоякісними захворюваннями II стадії	238,0±6,0
Хворі з злоякісними захворюваннями III стадії	263,0±12,0*

* – статистично достовірні зміни в порівнянні з показником донорів, $p \leq 0,05$.

Відомо, що фібринолітична активність за різних новоутворень зазнає різноспрямованих змін. При доброякісних процесах ЛОР-органів змін часу лізису еуглобулінового згустку відносно контролю показано не було, на відміну від хворих із міомою - доброякісним новоутворенням матки, у яких зафіксовано процес активації фібринолізу [232].

Подовження часу лізису еуглобулінового згустку у хворих з передраковими та злоякісними захворюваннями ЛОР-органів III-ої стадії узгоджується з відомими даними щодо схильності онкохворих до тромботичних ускладнень [233]. Виявлені в нашій роботі зміни фібринолітичної активності в плазмі хворих цих хворих співпадають з даними щодо активності фібринолізу хворих на рак шлунка, у яких встановлено пригнічення фібринолітичної системи крові за одночасного підвищення функціональної активності системи зсідання. Зміни іншого

напрямку показано при дослідженні фібринолітичної активності у хворих на рак легенів, молочної залози та простати, у яких прискорення фібринолізу відображено в укороченні часу лізису згустку [198,203,204,226].

Відомо, що ефективність фібринолізу залежить не тільки від активності ензимів, але і від властивостей фібринового згустку, обумовлених повнотою поперечної зшивки під дією фактора XIIIа, щільністю і товщиною волокон, їх розгалудженістю, розміром пор тощо [234]. Уповільнення фібринолізу пов'язано з аномальною структурою та підвищеною механічною міцністю згустків [235]. Тому подовження часу лізису згустку при передракових та злоякісних новоутвореннях ЛОР-органів III-ї стадії може бути наслідком включення до нього структурно ушкоджених форм фібриногену та його фрагментів, що призводить до утворення фібринових згустків, більш резистентних до гідролізу плазміном.

Плазміноген/плазмінова система окрім фібринолітичної виконує в організмі й інші фізіологічні та патологічні функції, опосередковані взаємодіями плазміну з рецепторами клітин [236]. Процес активації плазміногену тканинним активатором чи урокіназою полягає в ензиматичному гідролізі пептидного зв'язку Arg₅₆₁-Val₅₆₂. Дія активаторів плазміногену обмежується білковими інгібіторами – PAI-1 та PAI-2 [74].

Дані щодо плазмін-подібної активності та вмісту компонентів системи активації плазміногену – t-PA та PAI-1 в плазмі крові хворих на хронічний тонзиліт, доброякісні, передракові та злоякісні захворювання ЛОР-органів наведено в таблиці 3.12.

Представлені в таблиці дані свідчать про те, що плазмін-подібна активність однаково підвищувалась відносно контрольного значення як при хронічному тонзиліті, так і при доброякісних захворюваннях ЛОР-органів. У хворих на передракові захворювання та злоякісні новоутворення II-ої та III-ої стадій виявлено збільшення цього показника у 1,3 рази у порівнянні до значення практично здорових осіб. При дослідженні рівня t-PA було встановлено підвищення його вмісту в плазмі крові хворих на хронічний

тонзиліт та доброякісні новоутворення. У пацієнтів із передраковими та злоякісними захворюваннями ЛОР-органів рівень t-РА також перевищував такий контрольної групи у 1,3 рази. Як впливає з отриманих нами даних, рівень PAI-1 у хворих на хронічний тонзиліт перевищував у 4 рази контрольні значення, при доброякісних новоутвореннях ЛОР-органів виявлено його збільшення 3,4 рази відносно показника донорів. При передракових захворюваннях показано зростання вмісту PAI-1 у 5 разів порівняно до контролю. Пацієнтам зі злоякісними новоутвореннями верхніх дихальних шляхів II-ої стадії притаманне збільшення рівня цього інгібітора у 5,5 разів, при III-ій стадії онкологічного процесу його зростання сягало у 5,9 рази у порівнянні із значенням умовно здорових людей.

Таблиця 3.12.

Плазмін-подібна активність, рівень t-РА та PAI-1 в плазмі крові хворих із захворюваннями ЛОР-органів

Групи обстежених	Плазмін-подібна активність, п-НА/(хв·мл)	t-РА, у.о./мл	PAI-1 у.о./мл
Практично здорові донори (контроль)	0,57±0,02	0,059±0,001	0,074±0,002
Хворі з хронічним тонзилітом	0,65±0,03*	0,063±0,002	0,296±0,058*
Хворі з доброякісними захворюваннями	0,63±0,02*	0,069±0,002	0,25±0,069*
Хворі з передраковими захворюваннями	0,72±0,06*	0,075±0,004*	0,368±0,078*
Хворі з злоякісними захворюваннями II стадії	0,74±0,10*	0,073±0,002*	0,410±0,027*
Хворі з злоякісними захворюваннями III стадії	0,76±0,06*	0,074±0,003*	0,434±0,121*

* – статистично достовірні зміни в порівнянні з показником донорів, $p \leq 0,05$.

Відомо, що плазмін є патофізіологічним стимулом, котрий бере участь у підтриманні запального процесу [237]. У зв'язку зі встановленою підвищеною плазмін-подібною активністю в плазмі крові хворих досліджуваних груп та відомими з літературних джерел даними щодо прозапальних ефектів плазміну можна припустити його участь у патофізіологічних механізмах розвитку хронічного тонзиліту, доброякісних та передракових захворювань ЛОР-органів. Відомо, що плазмін бере участь у розвитку запальних процесів завдяки активації клітин, що містять його рецептори, та їх стимуляції до утворення різних медіаторів запалення [238,239]. Активація моноцитів супроводжується їх міграцією до місця запалення та активацією прозапальних генів, що зумовлюють експресію ТГ та цитокінів: IL-1 α , IL-1 β , TNF- α . Сорбція плазміногену на поверхні різних за біологічними функціями клітин призводить до його активації та формування поверхонь з широким спектром протеолітичної активності. Це сприяє розвитку гострих та хронічних запальних процесів. Плазмін стимулює продукцію цитокінів, активних форм кисню та інших медіаторів клітинами-ефекторами, що беруть участь в процесах запалення [240]. Утворений на поверхні клітин плазмін індукує агрегацію нейтрофілів, дегрануляцію тромбоцитів, вивільнення арахідонової кислоти із ендотеліальних клітин та лейкотрієнів із моноцитів через активацію різних сигнальних шляхів, виконуючи таким чином роль прозапального агоніста [241,242].

Відомо, що в основі інвазивних та метастатичних властивостей пухлини лежить здатність до руйнування базальної мембрани та позаклітинного матриксу асоційованими з пухлинами протеїназами. В цих процесах беруть участь декілька класів протеїназ, в першу чергу – протеолітичний каскад активації плазміногену [243]. Плазмін, утворений із плазміногену під дією активаторів, може розщеплювати більшість протеїнів позаклітинного матриксу (ламінін, фібронектин, тромбоспондин та ін.) безпосередньо та завдяки активації певних металопротеїназ (простромелізіну-1 (proMMP-3), прожелатинази В (proMMP-9) та

проколагенази (proMMP-13), посилюючи протеолітичне ушкодження позаклітинного матриксу, забезпечуючи прогресію пухлин [244]. Відомо, що α_2 -АП – головний інгібітор плазміну не блокує активність сорбованого ензиму, що сприяє його участі у деструктивних процесах [245,246].

Система плазміноген/плазмін бере участь як в нормальному, так і патологічному ангіогенезі [247]. Так, при рості та метастазуванні пухлин, хронічних запальних захворюваннях її компоненти активують VEGF та фактор росту фібробластів (FGF), які є ключовими індукторами ангіогенезу [248,249].

Відомо, що рівень та співвідношення експресії різних компонентів системи активації плазміногену за розвитку новоутворень може бути показником метастатичної та інвазивної активності пухлини, внаслідок чого вони можуть бути використані як фактори прогнозу при різних новоутвореннях [244,246,250-252]. Експресія t-PA підвищена при багатьох пухлинах – гліобластомі, меланомі, нейробластомі, карциномі підшлункової залози та при лейкемії. При цьому тканини цих пухлин відрізняються підвищеним вмістом плазміногену [253-257]. Встановлене нами підвищення рівня t-PA у хворих із новоутвореннями ЛОР-органів узгоджується із цими роботами.

Провідна функція t-PA полягає в активації сорбованого на фібриновому згустку плазміногену. Водночас щодо його участі у розвитку онкологічних процесів єдиної думки немає. Припускають, функція t-PA при розвитку пухлини, імовірно, полягає у захисті нормальної тканини від інвазії злякисних клітин [256]. В основі протилежної думки авторів є механізм взаємодії t-PA з аннексином на мембрані пухлинних клітин, де він активує плазміноген та сприяє інвазивним процесам [243,258].

Виявлений нами рівень активатора може бути інтегрованим показником t-PA, синтезованого пухлиною, та компонентом системи гемостазу.

PAI-1 є головним інгібітором двох типів активаторів плазміногену – tPA та uPA. Біологічна функція PAI-1 не обмежується його участю у

фібринолітичних процесах шляхом запобігання активації плазміну, він відіграє важливу роль в інших фізіологічних і патологічних процесах. PAI-1 є важливим регулятором процесів клітинної адгезії. Він не тільки регулює протеолітичну активність uPA, але і впливає на рівень uPA, зв'язаного з його рецепторами, шляхом забезпечення швидкої елімінації комплексу uPA-PAI-1-uPAR [259]. Одержані нами результати щодо рівня PAI-1 при передракових та злоякісних новоутвореннях ЛОР-органів узгоджуються з відомими даними літератури щодо взаємозв'язку підвищення рівнів PAI-1 із прогресуванням злоякісного процесу. Доведено підвищення ризику виникнення метастазів та рецидивів пухлини при збільшенні рівня PAI-1 при злоякісних новоутвореннях різної локалізації (стравоходу, товстого кишківника, молочної залози, простати, шлунка) [260-264]. Визначення рівня PAI-1 та uPA в деяких країнах є обов'язковим тестом для виявлення раку молочної залози на ранній стадії у осіб підвищеного ризику [256,265,266]. Вважають, роль PAI-1 у розповсюдженості онкологічного процесу полягає у забезпеченні захисту трансформованих клітин від саморуйнування під дією асоційованих з пухлиною протеїназ [256]. З іншого боку, зв'язуючись із комплексом uPA-uPAR-вітронектин, PAI-1 перешкоджає взаємодії клітин матриксу і може сприяти процесу від'єднання клітини і таким чином опосередковувати міграційні та інвазивні процеси пухлинних клітин [259].

Експресія PAI-1 регулюється багатьма внутрішніми факторами (цитокінами, факторами росту, гормонами та ліпідами) [244,258,259,267]. Відомо, що розповсюдження злоякісного процесу в межах голови та шиї значно стимулює виділення факторів запалення, які можуть забезпечувати механізми збільшення його вмісту в плазмі крові [125,126].

Підсумовуючи наведені результати дослідження компонентів системи гемостазу, можна зазначити, що виявлено зміни як протеолітичних показників, так і компонентів інгібіторного потенціалу плазми крові при досліджуваних захворюваннях ЛОР-органів. Для хворих всіх груп показано підвищення загальної протеолітичної активності плазми крові, рівня

фібриногену, vWF, PAI-I, AT-III, плазмін-подібної активності та подовження протромбінового часу. У хворих на хронічний тонзиліт також виявлено зниження рівня $\alpha_2\text{M}$ та подовження АЧТЧ-тесту. Особам із доброякісними захворюваннями ЛОР-органів окрім зазначених змін притаманне зростання тромбін-подібної активності та зниження рівня $\alpha_2\text{M}$. Результати досліджень плазми крові хворих із передраковими захворюваннями ЛОР-органів свідчать про зростання активності еластази, тромбін-подібної активності, підвищення рівня протромбінового пулу, зниження вмісту $\alpha_2\text{M}$ та уповільнення часу еуглобулінового лізису. В плазмі крові хворих на рак ЛОР-органів II-ої стадії, окрім змін, притаманних всіх хворим, показано підвищення рівня протромбінового пулу, t-РА, зниження рівня $\alpha_2\text{M}$ та $\alpha_1\text{-ІІІ}$. У осіб із III-ою стадією злоякісного процесу виявлено найбільші зміни всіх досліджуваних показників.

Злоякісні новоутворення ЛОР-органів характеризуються безсимптомним перебігом, пізнім зверненням хворих до спеціалізованих закладів, раннім виникненням метастазів і рецидивів, високою смертністю вже в перший рік після постановки діагнозу [268]. Основною причиною летальності є місцеві рецидиви і метастази в лімфатичні вузли ший. Значною мірою невдачі в лікуванні пухлин цієї локалізації пов'язані з незадовільною оцінкою прогнозу перебігу захворювання і його результату, заснованого на використанні стандартних критеріїв, що включають клінічні і морфологічні характеристики пухлинного процесу. Розповсюдженість пухлинного процесу - важливий критерій прогнозування та визначення методів лікування, але далеко не завжди виявляється взаємозв'язок розмірів пухлини з ефективністю терапії та прогнозом хвороби. Крім того, відомо, що близько 25% пацієнтів мають приховані метастази в лімфатичні вузли, які не проявляються клінічно, тому на ранніх стадіях пухлинного процесу клініко-морфологічні критерії часто малоінформовані [1,4,5,268]. У зв'язку з цим пошук додаткових показників, які могли б відображати фактичний стан пухлинної прогресії та визначати прогноз розвитку захворювання є

актуальним [5,268-270]. Як уже було зазначено, особливої уваги компоненти системи гемостазу заслуговують через безпосередню їх участь у розвитку комплексу порушень, що призводять до розвитку онкологічних захворювань [10,11,31,40].

Аналіз даних клінічного спостереження за хворими на рак ЛОР-органів III-ої стадії, показав, що у віддаленому післяопераційному періоді (через 3-12 місяців після оперативного втручання) у 10 хворих цієї групи виявлено рецидив або метастази в регіонарні лімфатичні вузли ший, а 15 хворих перебували у стадії ремісії. Узагальнені показники активності еластази, загальної протеолітичної та тромбін-подібної активностей плазми крові онкологічних хворих III-ої стадії з метастазами чи рецидивом пухлини та осіб у стані ремісії у віддаленому післяопераційному періоді наведено в табл. 3.13 [272].

Таблиця 3.13.

Загальна протеолітична, тромбін-подібна активності та активність еластази у хворих на рак ЛОР-органів III-ої стадії з ускладненнями та у стані ремісії у віддаленому післяопераційному періоді

Групи обстежених	ПРА, нмоль арг/ (хв·мл)	Активність еластази, нмоль п-НА/ (год·мл)	Амідолітична тромбін-подібна активність, нмоль п-НА/(хв·мл)
Практично здорові донори (контроль)	55,5±3,2	9,2±1,0	9,6±1,0
Хворі з рецидивом чи метастазами пухлини	81,0±7,2*	14,8±2,3*	20,0±3,9*
Хворі в періоді ремісії	75,7±3,5*	11,5±1,5	12,1±2,7

* – статистично достовірні зміни в порівнянні з показником донорів, $p \leq 0,05$.

Згідно з представленими даними, доопераційний рівень загальної протеолітичної активності в плазмі крові онкологічних пацієнтів, у котрих виявлено рецидив або метастази у віддаленому періоді, достовірно перевищував у 1,5 рази контрольні значення. У хворих у стані ремісії він збільшувався у 1,4 рази порівняно з показником донорів. Онкологічним хворим з ускладненим віддаленим післяопераційним періодом було притаманне зростання амідолітичної активності еластази у 1,6 разів відносно контролю, у пацієнтів у стадії ремісії вона перевищувала показник умовно здорових людей у 1,3 рази. Амідолітична тромбін-подібна активність у хворих з виявленим рецидивом чи метастазами була у 2,1 рази вищою порівняно до її значення у осіб контрольної групи.

Дані щодо дослідження рівня $\alpha_2\text{M}$, $\alpha_1\text{IP}$ та вмісту фібриногену в плазмі крові цих хворих наведені в таблиці 3.14.

Таблиця 3.14.

Вміст $\alpha_2\text{M}$, $\alpha_1\text{IP}$ та фібриногену у хворих на рак ЛОР-органів III-ої стадії з ускладненнями та у стані ремісії у віддаленому післяопераційному періоді

Групи обстежених	Вміст $\alpha_2\text{M}$, г/л	Вміст $\alpha_1\text{IP}$, г/л	Вміст фібриногену, г/л
Практично здорові донори (контроль)	2,00±0,09	2,00±0,08	2,2±0,1
Хворі з рецидивом чи метастазами пухлини	1,40±0,10*	2,5±0,2*	4,6±0,4*
Хворі в періоді ремісії	1,70±0,10*	2,10±0,15	3,5±0,2*#

* – статистично достовірні зміни між відповідним показником в порівнянні з показником донорів, $p \leq 0,05$.

– статистично достовірні зміни між відповідним показником у хворих з післяопераційними ускладненнями та в стані ремісії, $p \leq 0,05$.

Як впливає з наведених у таблиці результатів, вихідний рівень $\alpha_2\text{M}$ в плазмі крові хворих із злякисними новоутвореннями, у яких віддалений

період після лікування ускладений рецидивом або метастазами, був нижчим у 1,4 рази за контрольні значення; у пацієнтів із сприятливим післяопераційним періодом інгібітор знижувався у 1,2 рази відносно його рівня у донорів. Вмісту $\alpha_1\text{PI}$ у осіб в стані ремісії майже не відрізнявся від контролю, на відміну від хворих із виявленими ускладненнями, рівень інгібітору в плазмі крові яких зменшувався у порівнянні із показником контрольної групи. Вміст фібриногену у хворих обох груп був достовірно вищим у порівнянні з контрольними значеннями: у пацієнтів із рецидивами і метастазами у віддаленому періоді виявлено зростання його вмісту у 2,1 рази, за неускладненого перебігу хвороби він збільшувався у 1,6 рази. Крім того, доопераційний рівень фібриногену у хворих з післяопераційними ускладненнями був достовірно вищим порівняно до хворих у періоді ремісії.

Слід зазначити, що проведення комплексної оцінки компонентів системи гемостазу є актуальним в зв'язку з недостатньою інформативністю окремо досліджуваних показників. Більш інформативним може бути використання величини, що об'єднує декілька параметрів. Комплексне урахування кількох показників з наведеної групи індивідуальних даних кожного хворого відносно середнього значення контрольної групи дозволило розробити прогностичний індекс щодо післяопераційного перебігу захворювання. Запропонований адитивний числовий індекс, що враховував відміни від контролю вмісту фібриногену, α_2 -макроглобуліну, рівня тромбін-подібної активності та виражається формулою:

$$H = \frac{[Fg][Thr]}{[\alpha_2M]}$$

Для кожного з хворих індекс виражено в безрозмірних величинах, котрі відображають співвідношення вмісту фібриногену ($[Fg]$), α_2 -макроглобуліну ($[\alpha_2M]$) та тромбін-подібної активності ($[Thr]$) до середнього значення контрольної величини відповідного показника. Розраховані за наведеною формулою індивідуальні показники кожного хворого досліджуваних груп та

подальший їх обрахунок методами варіаційної статистики дали змогу отримати середнє значення індексу $6,35 \pm 1,67$ для групи хворих з рецидивами чи метастазами та $2,65 \pm 0,53$ для групи хворих в стані ремісії. Критерій вірогідності відмін $p < 0,05$, що свідчить про їх достовірність [273,274]. Запропонований індекс може бути використаним для оцінки тяжкості розвитку злякисних новоутворень ЛОР-органів та прогнозу розвитку рецидиву чи метастазів у регіонарні лімфовузли, що є актуальним питанням для хворих із пухлинами досліджуваної локалізації в зв'язку з високою частотою їх утворення та основною причиною смертності цих хворих [275].

Натомість, решта показників протеїназно-інгібіторної системи плазми крові хоч і лишаються цінними показниками загального стану хворих, однак стосовно прогнозу перебігу захворювання у віддаленому періоді спостереження виявились малоінформативними.

Подібний підхід комплексного урахування показників в останні роки набуває дедалі ширшого застосування і видається виключно перспективним. З літературних даних відомо, що на основі показників загальної протеолітичної активності сироватки крові, вмісту $\alpha_2\text{M}$ та $\alpha_1\text{PI}$ створено формулу для обчислення індексу тяжкості захворювання хворих на рак шлунка, за результатами якого створюється можливість прогнозування розвитку віддалених метастазів [13]. Системний індекс імуно-запалення, названий SII ($SII = N \times P / L$), що базується на кількості кількості нейтрофілів (N), тромбоцитів (P) та лімфоцитів (L), виявився перспективним прогностичним показником у хворих на гепатоцелюлярну карциному, рак стравоходу, шлунка, легенів, колоректальний рак. Для хворих на рак носоглотки також підтверджено інформаційну цінність системного індексу імуно-запалення для прогнозу виживаності хворих [276].

Отже, створення прогностичного індексу на основі врахування кількох показників для прогнозування перебігу захворювання у хворих на злякисні новоутворення ЛОР-органів є вкрай актуальним і необхідним.

3.2. Особливості функціонування плазмін/плазміногенової системи гемостазу за новоутворень верхніх дихальних шляхів

Порушення протеолітично-інгібіторного балансу є характерною особливістю перебігу запальних та онкологічних захворювань, надмірна активація протеїназ визнана одним з провідних чинників канцерогенезу. На поверхні злоякісних клітин відбувається надмірна активація протеолітичних ензимів, котрі впливають на локальний і системний гемостаз та безпосередньо забезпечують процеси інвазії та метастазування [10,63,129,277]. При цьому, як випливає з даних, наведених в попередньому розділі, вміст білкових інгібіторів протеїназ у крові хворих із доброякісними, передраковими та злоякісними новоутвореннями ЛОР-органів хоч і зазнає певних змін, однак виснаження інгібіторного потенціалу крові не відбувається [278]. Ці дані добре узгоджуються з численними літературними даними стосовно молекулярних механізмів перебігу онкологічного процесу та вмісту основних інгібіторів крові (A_2 -АП, α_2M , α_1 ІІІ, АТ-ІІІ) за новоутворень різних типів та локалізацій [279,280]. Тобто при запальних та онкологічних процесах відбувається розвиток протеолітичних процесів, що не піддаються блокуванню природними інгібіторами протеїназ. Подібна невідповідність може бути пояснена утворенням протеолітично ушкоджених похідних відповідних протеїназ, що хоч і зберігають протеолітичну активність, відмінну від такої при нативній формі ензиму, однак нездатні до ефективного зв'язування з рухливим реактивним центром інгібіторів [281]. Особливої уваги при цьому заслуговує основний ензим фібринолітичної системи – плазмін, що циркулює в кровотоці у формі неактивного проензиму – плазміногену. Він є поліфункціональним протеїном, що задіяний в регуляції різноманітних фізіологічних та патофізіологічних процесів. Зокрема, за онкологічних захворювань надмірна активація плазміногену та гідролітична дія утвореного плазміну становлять ключову ланку патофізіологічного процесу [74]. Зумовлено це своєрідною будовою

плазміногену, що відзначається розвинутою субдоменністю структури. Спільно з протеїнажною частиною (так званим SP-доменом, або ж легким ланцюгом плазміну - 26 кДа), молекула плазміногену містить блок з п'яти високоавтономних кринглових структур, що утворюють додаткові ділянки міжмолекулярної взаємодії (60 кДа). Ці ділянки задіяні в механізмах забезпечення фібринолізу, блокування вільного плазміну його функціональним антагоністом – α_2 -АП – та у взаємодії з різноманітними угрупованнями на поверхні багатьох клітин (ендотеліоцитів, лімфоцитів та моноцитів). Ці взаємодії опосередковані комплементарністю так званих лізин-зв'язуючих ділянок плазміногену певним структурним угрупованням відповідних протеїнів. Утворення подібних угруповань на поверхні ракових клітин призводить до нефункціональної сорбції плазміногену та його активації в плазміні, що виявляється не лише захищеним від інактивації α_2 -антиплазміном, але й здатним до протеолітичного ушкодження розчинних та мембранних білків [75,241]. Зокрема, доведено здатність сорбованого за допомогою лізин-зв'язуючих ділянок плазміну до протеолітичної активації розчинних протеїнів крові, а саме протромбіну в тромбін [282]. Як уже було зазначено в розділі 3.1, при онкологічних процесах ЛОР-органів нами було показано зростання тромбін-подібної амідолітичної активності в плазмі крові цих хворих [283,284].

Через розвинуту субдоменну структуру плазміноген/плазмін є схильним до фрагментації, зокрема – автолітичної, що призводить до утворення функціонально неповноцінних похідних. Тому плазміноген не зазнає активації плазміном, оскільки процеси протеолітичного ушкодження перевершують очікувану для типової трипсин-подібної протеїнази активаційну дію. Зазнають невдачі й спроби активації плазміногену у плазміні за допомогою трипсину: замість утворення активного плазміну відбувалось розщеплення плазміногену з утворенням суміші протеїнів [285]. В наших попередніх роботах досліджено цей процес на прикладі препарату Фібринолізину, що повинен містити проактивованій трипсином плазмін.

Згідно отриманих нами електрофореграм, в досліджуваних препаратах були повністю відсутні білки з молекулярною масою плазміногену чи плазміну (92 та 84 кДа, відповідно). Натомість виявлено протеїни з молекулярною масою 15-22 кДа, що за відновлення дисульфідних зв'язків розпадались на низькомолекулярні складові. При нанесенні препарату на афінну колонку з лізин-агарозою специфічної сорбції протеїну не відбувалось, що також свідчить про відсутність в досліджуваних препаратах протеїнів з характерними для плазміногену та плазміну лізин-зв'язуючими ділянками. Отже, внаслідок впливу неспецифічних трипсин-подібних протеїназ на плазміноген можуть утворюватися протеолітично деградовані низькомолекулярні його похідні [286].

Внаслідок доменної будови молекули плазміногену/плазміну можливе утворення фрагментів, що зберегли зв'язуючі ділянки, а отже – й можливість впливати на перебіг опосередкованих плазміном процесів. Саме тому за умов характерного для онкологічних та запальних процесів нефункціонального протеолізу відбувається утворення ангіостатинів – крингл-вмісних фрагментів плазміногену, здатних блокувати сорбцію інтактного плазміну на поверхні ракових клітин, а отже – й гальмувати розвиток онкологічного процесу. Відповідно до виду патології описано варіанти K1-3, K2-3, K1-4, K1-4.85, K1-5 та окремі крингли плазміногену [287]. Однак протеолітична частина молекули плазміногену залишається поза увагою, хоча подібні фрагменти також можуть зберігати певні властивості вихідної молекули, а отже – й впливати на регуляцію відповідних процесів. Відсутність направляючої дії лізин-зв'язуючих ділянок, розміщених у кринглових структурах, перетворює ферментативну частину плазміну на низькоспецифічну трипсин-подібну протеїназу. Така протеолітично деградована похідна зберігає гідролітичну та активаторну дію при зменшенні можливостей її взаємодії з циркулюючими в кровообізі інгібіторами. Як відомо, вільний плазмін, що утворюється під час лізису фібринового згустка, необоротньо інгібується α_2 -антиплазміном. Перша стадія цієї взаємодії

опосередкована лізин-зв'язуючими ділянками, а за їх відсутності вона просто неможлива [64]. Поява в кровообізі деградованої форми плазміну, позбавленої кринглових структур, може впливати на поглиблення активаторно-інгібіторного дисбалансу [67].

Тому нами досліджено вміст протеолітичних фрагментів плазміногену в плазмі крові хворих зі злаякісними, доброякісними та передраковими новоутвореннями ЛОР-органів та донорів методом ензим-електрофорезу. Це дозволяє не лише виявити активні протеолітичні ензими, але й охарактеризувати їх за молекулярною вагою. Гідролітичну дію досліджуваних зразків визначали за гідролізом кополімеризованого в гель фібриногену без та із застосуванням активатора плазміногену – стрептокінази.

За відсутності активатору ні в зразках здорових донорів, ні у хворих з новоутвореннями зон протеолізу не виявлено. Згідно наших та літературних даних як за норми, так і при патології протеолітична активність плазми крові по відношенню до неспецифічних протеїнових субстратів практично відсутня. Натомість, по відношенню до протаміну – протеїну, що більшою мірою утворений з молекул аргініну і здатний синхронно взаємодіяти як зі зв'язуючою, так і з алостеричною ділянками активного центру – вона спостерігається.

Проте в присутності стрептокінази картина ензим-електрофорезів була якісно відмінною. На рис. 3.1 наведено типові ензимограми зразків плазми крові хворих зі злаякісними, доброякісними та передраковими новоутвореннями верхніх дихальних шляхів. Також представлено типовий зразок плазми здорових осіб, препаратів плазміну, трипсину та стрептокінази, взятих в якості маркерів молекулярної маси.

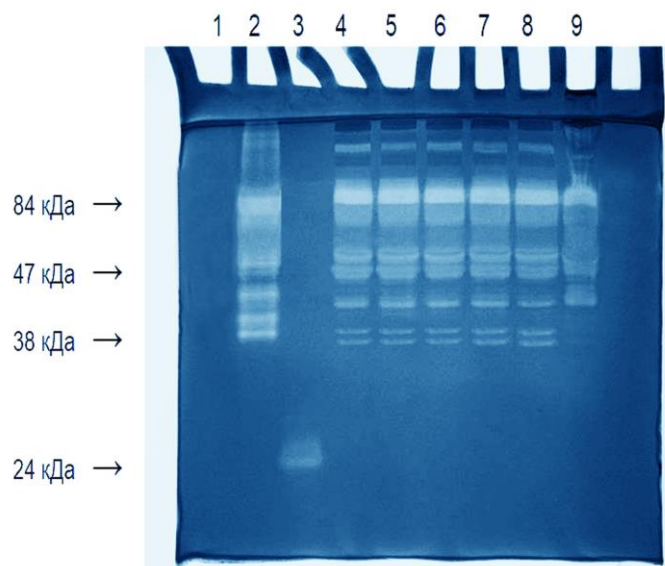


Рис. 3.1. Типова ензимограма зразків плазми хворих із новоутвореннями ЛОР-органів:

- 1 – стрептокіназа, застосована для активації плазміногена у плазмі;
- 2 – плазміні та низькомолекулярні форми, утворені внаслідок автолізу;
- 3 – трипсин;
- 4-5 – III стадія злоякісного процесу;
- 6 – II стадія злоякісного процесу;
- 7 – передракові утворення;
- 8 – доброякісні утворення;
- 9 – донори.

Сама стрептокіназа не виявила протеолітичної дії через відсутність активного центру. Вона забезпечує формування активного центру в плазміногені внаслідок конформаційних перетворень за асоціації з плазміногеном [288]. На ензимограмі препарату плазміну виявлено значну кількість низькомолекулярних протеїназ, що утворились внаслідок активації стрептокіназою схильного до протеолітичної деградації плазміногену. При порівнянні зразків плазм пацієнтів з патологіями ЛОР-органів та зразків донорів видно, що низькомолекулярні похідні плазміну зустрічаються як в плазмі донорів, так і в плазмі хворих із доброякісними, передраковими та

злякисними новоутвореннями. Тобто процеси обміну протеїнів за норми також включають утворення деградованих форм плазміногену. Утворення непротеолітичних фрагментів плазміногену (ангіостатинів) показано як для норми, так і для патології з відмінами у кількісному та якісному складі [289]. Одержані ензімограми плазми хворих також істотно відрізнялися від норми як за кількісним, так і за якісним вмістом низькомолекулярних похідних. Оскільки в нашому дослідженні за активатор обрано стрептокіназу, що здатна до активації лише плазміногену, то можна однозначно стверджувати про належність виявлених протеолітичних похідних саме до SP-вміщуючих фрагментів плазміногену.

Таким чином, нами показано, що протеолітичного ушкодження зазнають також ензими, що цей протеоліз опосередковують. Розвиток досліджуваних новоутворень пов'язано з формуванням протеолітично ушкоджених похідних плазміногену, що містять SP-домен та здатні виявляти протеолітичну активність після специфічної активації. Низькомолекулярні деградовані похідні плазміногену виявлено і в плазмі здорових осіб, що пов'язано з нормальними процесами обміну протеїнів. При цьому порівняння зразків плазми пацієнтів з патологіями та зразків донорів свідчить про кількісні та якісні відміни SP-вміщуючих фрагментів плазміногену, утворених в плазмі крові здорових донорів та хворих на доброякісні, передракові та злякисні новоутворення верхніх дихальних шляхів [290].

Як відомо, функціонування протеїнів у реальному складному оточенні протеїнів організму може істотно відрізнитись від взаємодій, досліджених в очищеному вигляді в умовах *in vitro*. Неврахування цих відмін може призводити до хибного тлумачення експериментальних даних [286]. З'ясування механізмів міжмолекулярних взаємодій та структурних перетворень функціональних протеїнів становить необхідну передумову для розуміння опосередкованих ними процесів. Особливо це стосується протеїнів, що задіяні в складних регуляційних каскадах, опосередкованих послідовною активацією функціонально пов'язаних протеїнових проформ.

Як вже відмічалось, ключовий ензим фібринолітичної системи крові плазмін циркулює в кровообізі в формі свого неактивного попередника – плазіногену. Його функціональна активація відбувається внаслідок сорбції на фібриновій сітці та активаційного розщеплення тканинним активатором плазіногену пептидного зв'язку Arg₅₆₁-Val₅₆₂. В сорбованому стані плазмін захищений від інактивації α₂-антиплазіном, вивільнений після розщеплення фібрину плазмін зазнає миттєвої інактивації. Плазіноген може бути проактивований і в розчинному стані урокіназо-подібним активатором [14,74]. Окрім протеолітичного шляху активації плазіногену відомий непрямий спосіб формування активного центру без розщеплення активаційного зв'язку внаслідок взаємодії зі стрептокіназою (Ск) – невеликим за масою (47 кДа) протеїном, що продукується β-гемолітичними стрептококами групи С. Встановлено, що формування Пг-Ск-комплексу відбувається з великою швидкістю ($5,4 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$) і призводить до утворення в молекулі плазіногену гідролітичного центру без розщеплення активаційного зв'язку Arg₅₆₁-Val₅₆₂. Сформований комплекс виявляє гідролітичну дію по відношенню до низькомолекулярних субстратів. На відміну від вільного плазіну, Пг-Ск-комплекс ефективно активує вільний плазіноген, розщеплюючи в ньому активаційний зв'язок. За умов *in vitro* Пг-Ск-комплекс трансформується у Пн-Ск-комплекс з наступною протеолітичною деградацією стрептокіназної складової комплексу [288]. Однак недостатньо дослідженими є подібні перетворення в присутності багатоконпонентної системи протеїнів крові, зокрема – цілої низки інгібіторів. В клінічній практиці в якості фібринолітичного агенту застосовують ацильовані форми Пг-Ск комплексу, в яких серин активного центру ковалентно заблоковано ацилюючим агентом. При введенні такого препарату в кровообіг відбувається поступове деацилювання активного центру, тобто забезпечується перманентне формування активного плазіну. При цьому час циркуляції ацильованого Пг-Ск комплексу в кров'яному руслі значно довший, ніж у стрептокінази ($T_{1/2}$ 70-120 хв проти 15-25 хв,

відповідно). Тобто час циркуляції Ск в кровообізі залежить від наявності вільного активного центру в утворюваних Ск комплексах. Це дозволяє за фізіологічних умов припустити участь додаткових компонентів крові в цьому процесі [291].

Відомо, що гідролітична та активаторна дія Пг-Ск-комплексу не блокується основними складовими інгібіторного антипротеїназного потенціалу крові – α_1 ІІІ, α_2 -АІІ, АТ-ІІІ та α_2 М. При цьому не враховується така особливість дії α_2 М, як зв'язування ним протеїназ поза гідролітичним центром. Таке зв'язування обмежує гідроліз великих протеїнів, однак активність по відношенню до низькомолекулярних субстратів істотних змін не зазнає [291]. Молекулярна маса α_2 М (725 кДа) дає змогу виявляти за допомогою хроматографії, що розподіляє за розмірами, як сам α_2 М, так і утворені ним комплекси з протеїназами на фоні інших протеїнів плазми крові. Показано, що за гель-фільтраційного розділення плазми крові донорів, протеолітична активність виявляється лише у фракції, що за молекулярною вагою відповідає α_2 -Мг та утвореним ним комплексам [278].

Тому метою даного фрагменту роботи було з'ясувати амідолітичну, протеолітичну дію та здатність до активації інтактного плазміногену комплексів, що утворюються при взаємодії Ск з протеїнами плазми крові. Нами було проведено розділення плазми крові умовно здорових осіб методом хроматографії, що розподіляє за розмірами. Хроматограми результатів фракціонування плазми крові наведено на рис 3.2.

Як впливає з хроматограм, фракціонування білкових складових плазми крові виявило три відмінні за молекулярною масою піки. Збільшення йонної сили призводить до певного зростання ступеню розподілу протеїнових фракцій, однак в цілому істотних змін не спостерігалось.

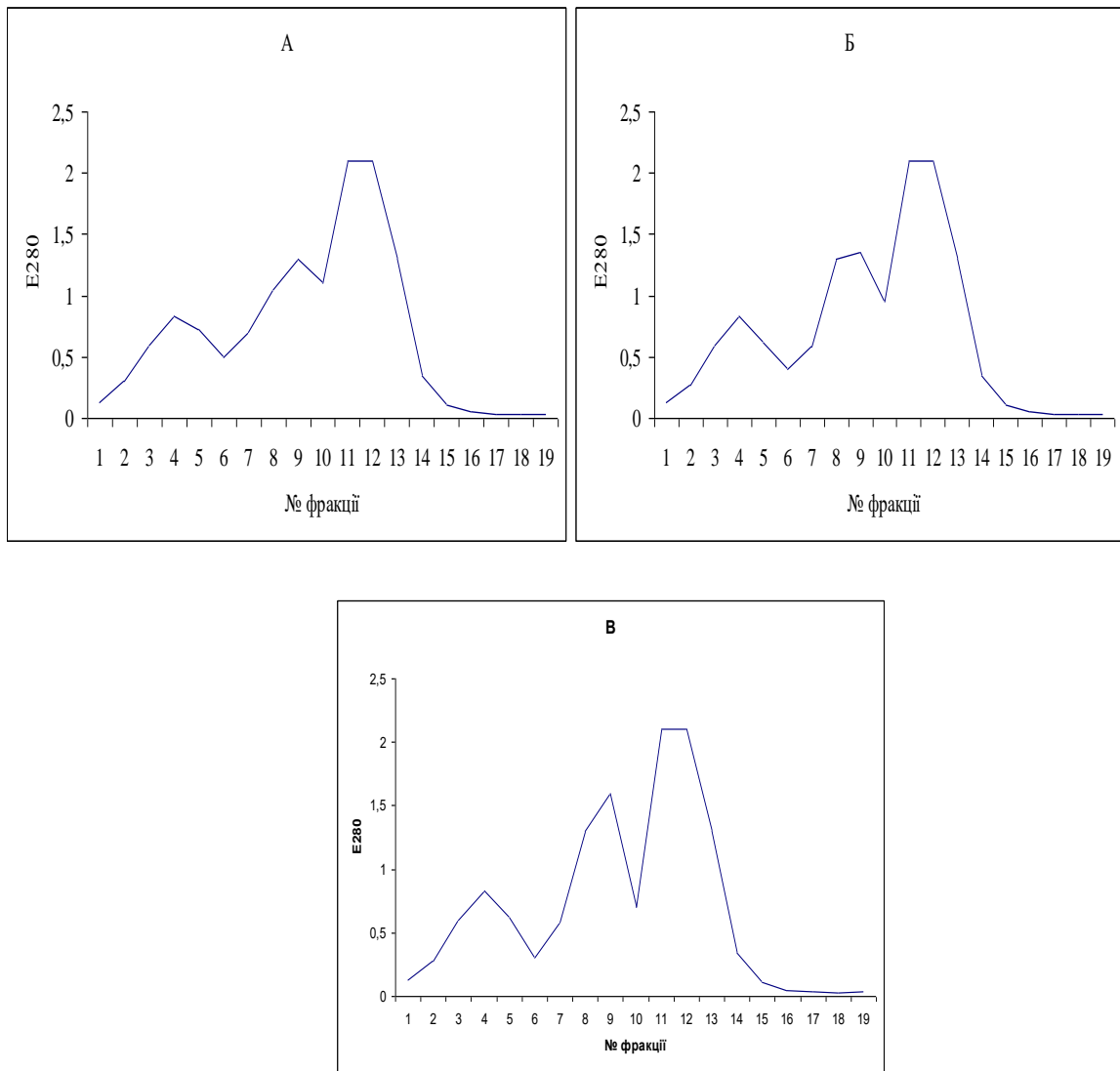


Рис. 3.2. Хроматограма результатів фракціонування плазми крові донорів на Superdex 200. Колонка 1,8×26,6 см, елюент – 0,05 М трис-НСІ буфер, рН 7,6 в присутності 0,1М (А), 0,5М (Б) та 1М (В) натрію хлориду; швидкість протікання 25 мл/год; об'єм фракцій – 1,5 мл.

Для визначення знаходження плазміногену серед трьох отриманих фракцій плазми крові застосовували екзогенний активатор – стрептокіназу, котру вносили в кількості 10 міжнародних одиниць до аліквот (0,5 мл) кожної з трьох отриманих фракцій, що забезпечує перетворення більшої частини наявного плазміногену на Пг-Ск-комплекс, що не інгібується α_2 -АП та може бути виявлений за каталітичною дією. Результати дослідження амідолітичної та протеолітичної активностей фракцій плазми крові після внесення екзогенної Ск за гідролізом хромогенного субстрату

S-2251 та протаміну, відповідно наведені в табл. 3.15. Фракціонування проводили проти 1 М натрію хлориду в 0,05 М трис-солянокислому буфері, рН 7.6.

Таблиця 3.15

Амідолітична та протеолітична активності фракцій плазми крові після внесення екзогенної Ск*.

№ досліджуваної фракції	Амідолітична активність за гідролізом хромогенного субстрату S-2251 (поглинання при 405 нм)	Протеолітична активність за гідролізом протаміну (поглинання при 508 нм)
1	-	-
2	-	-
3	0,156 ± 0,020	0,340 ± 0,040

* - в таблиці наведено усереднені дані трьох дослідів

Як випливає з даних таблиці, протеолітична та амідолітична активності спостерігаються лише в третій фракції плазми крові.

Для з'ясування характеру міжмолекулярних взаємодій екзогенної Ск з протеїнами плазми крові до аліквот плазми (0,4 мл) вносили 1600 міжнародних одиниць Ск. Подібне співвідношення забезпечує повне зв'язування внесеної стрептокінази з плазміногеном зі збереженням 20% вільного плазміногену [284]. Внаслідок швидкої активації утвореним Пг-Ск-комплексом остаточний Пг перетворюється на вільний плазмін, який миттєво інактивується α_2 -антиплазміном. Це забезпечує присутність в системі активного Пг-Ск-комплексу за відсутності вільних Пг, плазміну та Ск. Проактивовану у наведений спосіб плазму донорів піддавали фракціонуванню за допомогою хроматографії, що поділяє за розмірами, за різних значень концентрації натрію хлориду. Результат розподілу протеїнів не відрізнявся від отриманих в попередніх дослідях. Водночас спостерігались якісні відміни у розподілі гідролітичної активності піків.

Результати дослідження амідолітичної та протеолітичної активностей фракцій плазми після внесення екзогенної Ск до плазми крові донорів за гідролізом хромогенного субстрату S-2251 та протаміну, відповідно наведені в табл. 3.16.

Таблиця 3.16.

Амідолітична та протеолітична активності фракцій плазми крові, отриманих розділенням плазми хроматографією, що поділяє за розмірами, після активації стрептокіназою

Концентрація NaCl та № досліджуваної фракції	Амідолітична активність за гідролізом хромогенного субстрату S-2251 (поглинання при 405 нм)	Протеолітична активність за гідролізом протаміну (поглинання при 508 нм)
1 М - №1	0,146± 0,010	0,320 ± 0,033
1 М - №2	0,052±0,008	0,070± 0,007
1 М - №3	немає	немає
0,1 М - №1	0,148± 0,010	0,310 ± 0,028
0,1 М - №2	0,052±0,007	0,060± 0,007
0,1 М - №3	немає	немає

* - в таблиці наведено усереднені дані трьох дослідів.

Як впливає з наведених в табл. 3.16 даних, при дослідженні фракцій проактивованої стрептокіназою плазми крові практично здорових осіб, отриманих розділенням плазми хроматографією, що поділяє за розмірами, амідолітичну та протеолітичну активності виявлено лише в першому та другому піках, тоді як в третьому відповідних активностей не спостерігалось.

Подібний розподіл амідолітичної та протеолітичної активностей істотно відрізнявся від розподілу активаційної дії фракцій на інтактний препарат плазміногену, результати дослідження якої наведено в табл. 3.17.

Активаційна дія фракцій на препарат плазміногену була виявлена у всіх трьох протеїнових піках при фракціонуванні зразків плазми при високих значеннях іонної сили (1 М). Виявлений розподіл активностей може бути

пояснено розпадом частини плазміноген-стрептокіназного комплексу за високої іонної сили. Сама стрептокіназа гідролітичної дії не виявляє, а за молекулярною вагою (47 кДа) має знаходитись саме в третьому піку. При цьому за низької іонної сили (0,1 М) амідолітична, протеолітична та активаційна дія по відношенню до інтактного препарату плазміногену виявлялась лише в фракціях високомолекулярних першого та другого піків.

Таблиця 3.17

Активаційна дія на препарат плазміногену фракцій плазми крові, отриманих розділенням плазми хроматографією, що поділяє за розмірами, після активації стрептокіназою*.

Концентрація NaCl та № досліджуваної фракції	Активаційна дія на інтактний плазміноген за гідролізом хромогенного субстрату S-2251 (поглинання при 405 нм)
1 М - №1	0,485±0,038
1 М - №2	0,500±0,033
1 М - №3	0,245±0,020
0,1 М - №1	0,760±0,060
0,1 М - №2	0,930±0,070
0,1 М - №3	немає

* - в таблиці наведено усереднені дані трьох дослідів.

Наведені дані дають змогу зробити певні висновки щодо перетворень, що їх зазнає Пг-Ск-комплекс в складній багатокомпонентній системі плазми крові. Перш за все, можна припустити формування потрійного комплексу Пг-Ск- α_2 М, котрий й забезпечує подальшу активацію вільного Пг у плазмін. Виявлене в нашій роботі руйнування потрійного комплексу під впливом високої йонної сили призводить до вивільнення Ск та появи зумовленої нею активаційної активності в третьому, низькомолекулярному, піці. При цьому гідролітичної активності в третьому піці не спостерігається, оскільки власне каталітичною активністю стрептокіназа не володіє. Збереження як

активаторної, так і амідолітичної активності в першому піці може свідчити як про збереження відповідних активностей позбавленим стрептокінази комплексом Пг- α_2 М, так і про часткове збереження потрійного комплексу. Наявність як амідолітичної, так і активаторної активності в другому піці може бути наслідком утворення додаткових комплексів між Ск, Пг та відмінними від α_2 М протеїнами плазми крові.

Отримані дані свідчать, що за умов, наближених до фізіологічних, Пг-Ск-комплекс зазнає складних комплексоутворень з α_2 М шляхом формування потрійного комплексу Пг-Ск- α_2 М, котрий забезпечує подальшу активацію вільного Пг у плазмі. Такі молекулярні перетворення є відмінними від досліджуваних процесів за умов *in vitro* [291].

РОЗДІЛ 4

ЗАКЛЮЧЕННЯ

Злоякісні захворювання ЛОР-органів становлять актуальну і соціально значущу проблему сучасної медицини. За даними Національного канцер-реєстру, в Україні щорічно виявляють до 7000 нових випадків злоякісних пухлин ЛОР-органів [3]. Відомо, що у більшості хворих їх виявляють на пізніх стадіях [271]. Однією із загальних особливостей клінічного перебігу більшості злоякісних пухлин цієї локалізації є високий ризик розвитку рецидивів (до 80%) [5]. Розвитку злоякісного процесу передують ряд послідовних трансформацій епітеліальних клітин слизової оболонки: в 60% випадків розвитку раку гортані передують хронічні патології, що складають групу передракових захворювань [5,269,271]. Своєчасне їх виявлення та лікування дає змогу запобігти розвитку злоякісних новоутворень або виявити їх на ранніх стадіях. Виникнення передракових захворювань та раннього раку тісно пов'язані з тривалим перебігом хронічних запальних процесів, тому дослідження особливостей патогенезу при різних захворюваннях ЛОР-органів є вкрай необхідним [269,292,293].

Компоненти системи гемостазу широко задіяні в різних патофізіологічних процесах. Відомо, що процеси запалення і зсідання крові тісно пов'язані між собою. Вважають, що активація системи зсідання крові у відповідь на запалення служить захисним механізмом [8,9,36-38]. Порухення гемостатичних механізмів при онкологічних процесах обумовлені комплексною взаємодією компонентів системи гемостазу, злоякісних клітин та елементів стромы. Їх розвиток пов'язаний як із загальними факторами відповіді організму на розвиток пухлини (запалення, гострофазна реакція, вогнищеві некрози, гемодинамічні порушення), так і з більш специфічними факторами, залежними від пухлинних клітин (прокоагулянтна, фібринолітична активність ракових клітин, їх взаємодія з тромбоцитами, ендотелієм, пухлинний неоангіогенез) [31,111-114]. Традиційний підхід при

лікуванні новоутворень полягає в лікуванні основного захворювання, але недостатньо дослідженим є вплив злоякісної тканини на систему гемостазу та роль компонентів гемостазу у процесах росту та поширенні новоутворень [294]. Тому дослідження особливостей функціонування системи гемостазу при запальних захворюваннях та розвитку новоутворень є актуальним.

Згідно отриманих нами результатів, показано достовірне зростання загальної протеолітичної активності у хворих із доброякісними, передраковими та злоякісними захворюваннями, причому рівень зростання залежав від тяжкості захворювання. Показник загальної протеолітичної активності є інтегративним параметром. Трипсинподібні протеїнази, до яких належать плазмін, активатори плазміногену, калікреїни, тромбін, більшість факторів зсідання, а також деякі компоненти системи комплементу, беруть участь як в регуляції процесів запалення, так і опосередковують усі етапи розвитку новоутворень [9,36,110-114]. Інформація про рівні активності зазначених ферментів необхідна для оцінки не тільки інтенсивності обмеженого протеолізу, а й можливості проліферації, трансформації, міграції клітин, оскільки доведено безпосередню участь зазначених протеїназ у цих процесах [115,119].

Внаслідок проведеного дослідження встановлено підвищення активності еластази у пацієнтів з передраковими захворюваннями та раком ЛОР-органів III-ої стадії відносно контролю. За розвитку запальних процесів та новоутворень відбувається гіперпродукція прозапальних цитокінів - інтерлейкінів (IL-1, IL-6, IL-8, IL-18), фактору некрозу пухлини (TNF), що контролюють рівень експресії протеїназ на поверхні нейтрофілів і регулюють їх де грануляцію [120,125]. Зростання активності еластази при передракових та злоякісних новоутвореннях може свідчити про її участь у патогенезі цих захворювань завдяки здатності розщеплювати компоненти міжклітинного матриксу, активувати металопротеїнази, синтезовані злоякісними клітинами [130]. Еластаза виявляє індукуючу дію на проліферацію та міграцію

трансформованих клітин, опосередковуючи своєю протеолітичною активністю розвиток новоутворень [1131-134].

Показано збільшення тромбін-подібної амідолітичної активності у хворих із доброякісними захворюваннями ЛОР-органів у 1,8 разів, передраковими та злоякісними захворюваннями – у 1,7 рази. Також виявлено підвищення протромбінового пулу у 1,5 рази в плазмі хворих із злоякісними новоутвореннями II-ї стадії, при III-ї стадії онкологічного процесу він збільшувався у 1,8 рази відносно контролю. Окрім головної функції у зсіданні крові, тромбін задіяний в перебізі різних патофізіологічних процесів, причому механізми його впливу є незалежними від формування фібрину, а опосередковуються впливом на PARs-рецептори. Активуючи PARs, тромбін стимулює синтез і секрецію цитокінів, хемокінів та інших протеїнів різними типами клітин-ефекторів, індукує проліферацію та рухливість клітин, збільшує судинну проникність, викликає агрегацію тромбоцитів, адгезію, хемотаксис лейкоцитів [141-143,155,161]. Таким чином, зростання рівня тромбінової активності може свідчити про його участь у розвитку запалення, що супроводжує перебіг доброякісних та передракових захворювань ЛОР-органів. Крім того, зростання тромбін-подібної активності в плазмі крові хворих цієї групи порівняно з контролем узгоджується з даними літератури щодо молекулярних механізмів його участі в розвитку передракових та хронічних запальних процесів, що призводить до формування пухлини [147,149]. Саме дія тромбіну сприяє дисемінації ракових клітин, їх адгезії до ендотелія та позаклітинного матриксу, підвищує метастатичні властивості пухлин [161]. Визнано, що на клітинному рівні чисельні ефекти тромбіна можуть сприяти активації ангиогенезу [159,160]. Відомо, що тромбін здатний до стимуляції проонкогенного/ангіогенного гена GRO- α , в результаті чого різко збільшується синтез судинних регуляторних протеїнів та факторів росту [162,163]. Крім того, доведено індукування тромбіном епітеліально-мезенхімальної трансформації (EMT), що може бути ключовою ланкою метастазування [164]. Можлива участь тромбіну в процесах канцерогенезу є

маловивченою, що робить дослідження тромбінової активності при захворюваннях ЛОР-органів актуальним. Варто підкреслити, що рівень інгібітору АТ-ІІІ підвищувався відносно контролю у хворих всіх груп, тож зростання тромбін-подібної активності не обумовлене дефіцитом інгібітору.

В той же час зменшення вмісту $\alpha_2\text{M}$ – важливого регулятора активності трипсин-подібних протеїназ, виявлене при всіх досліджуваних захворюваннях ЛОР-органів, свідчить про виражений протеїназно-інгібіторний дисбаланс. Така зміна рівня $\alpha_2\text{M}$ може бути пояснена як механізмом регуляції його синтезу прозапальними цитокінами, що відіграють роль його інгібіторів, так і комплексоутворенням $\alpha_2\text{M}$ з різними біологічними факторами, що утворюються під час запальних реакцій та швидко виводяться з кровообігу в складі комплексу з $\alpha_2\text{M}$ [187,188,191,193]. Відмічене нами зменшення рівня $\alpha_2\text{M}$ при злоякісних процесах ЛОР-органів може також бути спричинено інтенсивним використанням інгібітора для блокування активності гідролаз, що виділяються зруйнованими клітинами під час інвазивних процесів [200].

Зростання рівня $\alpha_1\text{-III}$ – головного компоненту антитрипсинового потенціалу плазми – в крові хворих на рак ЛОР-органів ІІІ-ої стадії імовірно є компонентом компенсаторної реакції на надмірну активацію протеолізу.

В нашому дослідженні показано зростання вмісту фібриногену у всіх груп хворих. Фібриноген є відомим протеїном гострої фази, тому підвищення його вмісту при хронічному тонзиліті, доброякісних та передракових захворюваннях свідчить про перебіг запального процесу. Фібриноген опосередковує прозапальні механізми, створюючи матрикс для адгезії, міграції запальних клітин та стимулює синтез цитокінів в результаті зв'язування з рецепторами цих клітин [209,210]. Зростання вмісту фібриногену при злоякісних новоутвореннях ЛОР-органів підтверджує припущення щодо участі фібриногену в розвитку онкологічних процесів. Фібриноген може підвищувати проліферацію та міграцію злоякісних клітин, бере безпосередню участь у процесах ангиогенезу, в утворенні

тромбоцитарно-пухлинних агрегатів, що обмежує дію захисних систем організму та призводить до їх гематогенного розповсюдження [217,218]. Крім того, відомо, що самі пухлинні клітини здатні синтезувати фібриноген та цитокіни, задіяні в процесах запалення [209,222]. Подібно до фібриногену, результатами досліджень показано збільшення вмісту vWF в плазмі крові всіх хворих. vWF також належить до протеїнів гострої фази, зростання його в плазмі крові свідчить про активацію гемостатичних процесів [217,225]. У хворих на хронічний тонзиліт, доброякісні та передракові захворювання ЛОР-органів процес його вивільнення може стимулюватися медіаторами запалення та протеолітичними компонентами системи гемостазу, активність яких була підвищеною при цих захворюваннях [101,224,]. Показане у онкологічних хворих підвищення рівня vWF може бути результатом порушення функції ендотеліальних клітин через підвищену проліферацію чи індукуватися тромбіном, вивільненим пухлинними клітинами [230,231].

Згідно одержаних результатів, плазмін-подібна активність, рівень t-PA та PAI-1 були підвищеними відносно контрольних значень у хворих всіх груп. Зростання плазмін-подібної активності у хворих на хронічний тонзиліт, доброякісні та передракові захворювання ЛОР-органів узгоджується з даними щодо ролі плазміну як патофізіологічного стимула, котрий бере участь у підтриманні запального процесу. Плазмін стимулює продукцію цитокінів, активних форм кисню та інших медіаторів клітинами-ефекторами, що беруть участь в процесах запалення. Крім того, плазмін, утворений із плазміногену під дією активаторів, може розщеплювати більшість протеїнів позаклітинного матриксу та базальної мембрани та активувати металопротеїнази, сприяючи прогресії пухлини. Провідна функція t-PA полягає в активації сорбованого на фібриновому згустку плазміногену, щодо його участі у розвитку онкологічних процесів єдиної думки немає. При розвитку пухлини роль t-PA може полягати у захисті нормальної тканини від інвазії злоякісних клітин. З іншого боку, припускають взаємодію t-PA з аннексином на мембрані пухлинних клітин, де він активує плазміноген та

сприяє таким чином інвазивним процесам [256,258,243]. Встановлений нами рівень активатора у хворих із новоутвореннями ЛОР-органів може бути інтегрованим показником t-РА, синтезованого пухлиною, та компонентом системи гемостазу. Експресія PAI-1 регулюється багатьма внутрішніми факторами (цитокінами, факторами росту, гормонами та ін.), підвищення в кровообізі факторів запалення при досліджуваних нами захворюваннях ЛОР-органів може призводити до зростання його рівня в плазмі крові [259,125,126]. Вважають, роль PAI-1 у розповсюдженості онкологічного процесу полягає у забезпеченні захисту трансформованих клітин від саморуйнування під дією асоційованих з пухлиною протеїназ [256]. Проте його зв'язування із комплексом uPA-uPAR-вітронектин перешкоджає взаємодії клітин матриксу і може сприяти від'єднанню клітини, сприяючи міграційним та інвазивним процесам пухлинних клітин [244,258,259,].

Слід зазначити, що регуляція рівноваги між ангиогенезом та антиангиогенезом, опосередковується взаємодією між ангиостатином, плазміном/плазміногеном, його активаторами, еластазою та металопротеїназами. Неоваскуляризація «сплячої пухлини» ініціюється зсувом цього балансу, спричиненим різноманітними компонентами, що вивільняються і трансформованими клітинами, і клітинами строми, підвищенням експресії стимуляторів ангиогенезу (VEGF, FGF) та пригніченням синтезу інгібіторів ангиогенезу – локальних або системних (PAI-1, α_2 -АП). Відповідно, зміна активності кожного з компонентів цієї системи може мати регулюючий вплив на процеси ангиогенезу [295].

Одержані нами результати свідчать про зміни показників системи гемостазу, зокрема вмісту та гідролітичної активності ензимів та інгібіторного потенціалу у хворих із хронічним тонзилітом та новоутвореннями ЛОР-органів.

На основі комплексного урахування доопераційних показників фібриногену, α_2 -макроглобуліну та амідолітичної тромбін-подібної активності у хворих на рак ЛОР-органів III-ої стадії розроблено індекс

прогнозу післяопераційного рецидиву. Рак такої локалізації характеризується раннім виникненням метастазів і рецидивів, високою смертністю вже на першому році після постановки діагнозу, тому пошук додаткових показників, які могли б відобразити стан пухлинної прогресії та визначити прогноз розвитку захворювання є актуальним [4,5,268].

Експериментально доведено утворення в кровообізі хворих із доброякісними, передраковими та злякісними новоутвореннями ЛОР-органів фрагментів плазміногену, що містять протеолітичний SP-домен. Традиційні дослідження протеолітичних похідних плазміногену охоплюють вивчення неферментативних фрагментів важкого ланцюга (ангіостатинів), залишаючи поза увагою існування в кровообізі легкого домену плазміногену, що містить активний центр [73]. Через відсутність кринглових структур така деградована похідна не інгібується циркулюючими в кровообізі інгібіторами та має властивості низькоспецифічної трипсин-подібної протеїнази. Такі фрагменти плазміногену, хоч і виявляються функціонально неповноцінними, однак через низькоспецифічну гідролітичну активність можуть відігравати істотну роль в порушенні протеїназно-інгібіторного балансу крові [75].

Функціональна активація плазміногену відбувається внаслідок сорбції на фібриновій сітці та активаційного розщеплення, що здійснюється сорбованим тканинним активатором плазміногену [14,74]. Водночас в розчинному стані плазміноген може бути проактивований окрім урокіназного активатора стрептокіназою, в результаті чого в молекулі плазміногену формується гідролітичний центр без розщеплення активаційного зв'язку Arg₅₆₁-Val₅₆₂ [14,288]. Дослідження *in vitro* не враховують взаємодію інших білкових компонентів крові. Вперше в умовах, наближених до фізіологічних, показано участь α_2 -макроглобуліну в процесі активації плазміногену стрептокіназою в плазмі крові, внаслідок чого утворюється щонайменше потрібний комплекс плазміноген-стрептокіназа- α_2 -макроглобулін. Це розширює уявлення щодо механізмів активаційної дії стрептокінази. Існування істотних відмін між функціонуванням протеїнів за фізіологічних

умов та в очищеному вигляді є причиною хибного тлумачення експериментальних даних та формування на їх підставі помилкових висновків [286]. Поглиблення відомостей щодо особливостей активаційної дії стрептокінази в плазмі крові людини може бути інформативним для коректного планування експериментальних досліджень та трактування їх результатів при вивченні особливостей функціонування фібринолітичної системи при використанні плазми крові та стрептокінази як активатора плазміногену.

Враховуючи те, що порушення функціонування протеолітичних компонентів системи гемостазу викликають або супроводжують хронічні запальні процеси та розвиток новоутворень ЛОР-органів, вдосконалення діагностики захворювань, обґрунтування раціональних прийомів терапії можливі за умови розкриття закономірностей процесів протеолізу при цих захворюваннях. У зв'язку з цим дослідження компонентів зсідаючої та фібринолітичної ланок системи гемостазу та їх інгібіторів при різних захворюваннях ЛОР-органів безсумнівно має теоретичне та практичне значення.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі вперше проведено комплексне дослідження системи гемостазу у хворих із хронічним тонзилітом, доброякісними, передраковими та злоякісними новоутвореннями ЛОР-органів. Отримані результати розширюють відомості про функціонування компонентів системи гемостазу при досліджуваних патологіях.

1. Показано зниження вмісту α_2M , зростання плазмін-подібної активності, вмісту фібриногену, PAI-1 та vWF при хронічному тонзиліті. У хворих із доброякісними захворюваннями ЛОР-органів виявлено підвищення загальної протеолітичної, тромбін- та плазмін-подібної активностей, вмісту фібриногену, PAI-1 та vWF.

2. Виявлено зростання активності еластази, протеолітичної, плазмін- та тромбін-подібної активностей, вмісту фібриногену, t-PA, PAI-1, vWF та пригнічення фібринолітичної активності при передракових захворюваннях ЛОР-органів.

3. Відмічено підвищення протеолітичної, плазмін-подібної активностей, вмісту фібриногену, протромбінового пулу, t-PA, PAI-1, vWF у пацієнтів із злоякісними новоутвореннями ЛОР-органів II-ої стадії. У хворих із III-ою стадією злоякісного процесу окрім таких же змін, показано зростання активності еластази та тромбін-подібної активності, вмісту α_1 -III, зменшення вмісту α_2M та пригнічення фібринолітичної активності.

4. Розроблено індекс прогнозу післяопераційного рецидиву чи розвитку метастазів у хворих на рак ЛОР-органів III-ої стадії на основі комплексного урахування доопераційних показників вмісту фібриногену, α_2 -макроглобуліну та амідолітичної тромбін-подібної активності.

5. Вперше експериментально доведено утворення в кровообізі хворих із новоутвореннями ЛОР-органів фрагментів плазміногену, що містять SP-

домен та можуть відігравати істотну роль в порушенні протеїназно-інгібіторного балансу крові.

6. Вперше показано участь α_2 -макроглобуліну в процесі активації плазміногену стрептокіназою в плазмі крові внаслідок утворення потрійного комплексу плазміноген-стрептокіназа- α_2 -макроглобулін.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Пачес АИ. Опухоли головы и шеи. М.: Медицина. 2000;480.
2. Лукач ЭВ. Проблемы и перспективы современной ЛОР-онкологии в Украине. Онкология. 2000;2(1):47-50.
3. Федоренко ЗП, Гулак ЛО, Михайлович ЮЙ, Горох ЄЛ, Рижов АЮ, Сумкіна ОВ та ін. Рак в Україні, 2015–2016. Захворюваність, смертність, показники діяльності онкологічної служби. Бюл. Нац. Канцер реєстру України. 2017;18:130 с.
4. Чойнзонов ЕЛ, Спирина ЛВ, Кондакова ИВ, Чижевская СЮ, Шишкин ДА, Кульбакин ДЕ. Прогностическая значимость определения активности протеасом в тканях плоскоклеточных карцином головы и шеи. Бюллетень СО РАМН. 2014;34(4):103-108.
5. Кондакова ИВ, Какурина ГВ, Спирина ЛВ, Черемисина ОВ, Панкова ОВ, Меньшиков КЮ. Оценка внеклеточного и внутриклеточного протеолиза при предопухолевых и опухолевых заболеваниях гортани. Сибирский онкологический журнал. 2014;3:45-50.
6. Пальчун ВТ. Оториноларингология. Национальное руководство. М.: Медицина. 2008;801-811.
7. Кожанов ЛГ, Шацкая НХ, Лучихин ЛА. Принципы ранней диагностики злокачественных новообразований ЛОР-органов. Вестник отоларингологии. 2008;5:7-10.
8. Schuliga M. The Inflammatory Actions of Coagulant and Fibrinolytic Proteases in Disease. Mediators of Inflammation. 2015;15:1-9.
9. Веремеенко КН, Заболотный ДИ, Кизим АИ. Роль протеолиза в инвазии и метастазировании злокачественных опухолей. Журн. АМН України. 2002;8(2):217-237.
10. Rakashanda S, Rana F, Rafiq S. Role of proteases in cancer: A review. Biotechnology and Molecular Biology Review. 2012;7(4):90-101.
11. Mason SD and Joyce JA. Proteolytic Networks in Cancer. Trends Cell Biol. 2011; 21(4):228-237.

12. Skrzydlewska E, Sulkowska M, Koda M, Sulkowski S. Proteolytic-antiproteolytic balance and its regulation in carcinogenesis. *World J Gastroenterol.* 2005;11(9):1251-1266
13. Петросян АМ, Харченко ВЗ. Изменения протеиназингибиторной системы у больных раком желудка. *Онкология.* 2007;9(4):303-306.
14. Волков ГЛ, Платонова ТН, Савчук АН, Горницкая ОВ, Чернышенко ТМ, Краснобрижая ЕН. Современные представления о системе гемостаза. К: Наукова думка. 2005.
15. Баркаган ЗС. Введение в клиническую гемостазиология: Монография. М.: Ньюдиамед АО. 1998. 56с.
16. Зубаиров ДМ. Молекулярные основы свертывания крови и тромбообразования. Казань: Изд-во «ФЭН». 2000. 367 с.
17. Davie EW, Fujikawa K, Kisiel W. The coagulation cascade: initiation maintenance, and regulation. *Biochemistry.* 1991;30(43):10363-10366.
18. Wakefield TW, Myers DD, Henke PK. Mechanisms of venous thrombosis and resolution. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28:387-391.
19. Пантелеев МА, Атауллаханов ФИ. Свертывание крови: биохимические основы. *Клиническая онкогематология.* 2008;1(1):50-62.
20. Пантелеев МА, Атауллаханов ФИ. Свертывание крови: методы исследования и механизмы регуляции (часть 2). *Клиническая онкогематология.* 2008;1(1):174-181.
21. Кузник БИ, Баркаган ЗС. Современные представления о процессе свертывания крови, фибринолизе и естественных антикоагулянтах. *Гематология и трансфузиология.* 1991;11:18–21.
22. Gailani D, Renne T. Intrinsic pathway of coagulation and arterial thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:2507-2513.
23. Malý MA, Tomašov P, Hájek P et al. The role of tissue factor in thrombosis and hemostasis. *Physiol Res.* 2007;56:685-695.
24. Kolde H. Haemostasis: Монография. Basel: Pentapharm Ltd, 2001. 243 p.

25. Furie V. The molecular basic of blood coagulation. *Cell*. 1998;53(4):505-515.
26. Добровольский АБ, Титаева ЕВ. Система фибринолиза: регуляция активности и физиологические функции ее основных компонентов. *Биохимия*. 2002;67:116-127.
27. Воробьев АИ. Руководство по гематологии. М.: Ньюдиамед. 2005;3:416.
28. Ehrmann M and Clausen T. Proteolysis as a Regulatory Mechanism. *Annu. Rev. Genet.* 2004;38:709–724.
29. Ramachandran R and Hollenberg MD. Proteinases and signalling: pathophysiological and therapeutic implications via PARs and more. *Br J Clin Pharmacol.* 2008;153:263–282.
30. Hollenberg MD, Oikonomopoulou K, Hansen KK, Saifeddine M, Ramachandran R, Diamandis EP. Kallikreins and proteinase-mediated signaling: proteinase-activated receptors (PARs) and the pathophysiology of inflammatory diseases and cancer. *Biol Chem.* 2008;389(6):643-51.
31. Breznik B, Motaln, Turnšek TL. Proteases and cytokines as mediators of interactions between cancer and stromal cells in tumours. *Biol. Chem.* 2017; 398(7): 709–719.
32. Hansen KK, Oikonomopoulou K, Varuch A, Ramachandran R, Beck P, Diamandis EP at al. Proteinases as hormones: targets and mechanisms for proteolytic signaling. *Biol Chem.* 2008;389(8):971-82.
33. Висмонт ФИ. Воспаление (патофизиологические аспекты): уч. метод. пособие. Мн.:БГМУ. 2006;48с.
34. Памирский И, Бородин Е, Штарберг М. Регуляция протеолиза растительными и животными ингибиторами. Saarbrücken: LAP LAMBERT Academic Publishing; 2012. 105 с.
35. Дилакян ЭА, Балаевская ТО, Закамалдина-Цама Т. Исследование экспрессии катепсинов D и L в процессе онкогенной трансформации фибробластов. *Вопр. мед. химии.* 1994;40(3):2-6.

36. Janciauskiene S. Acute Phase Proteins. Croatia: InTech; 2013. 187 p.
37. Levi M, Poll T. Two-Way Interactions Between Inflammation and Coagulation. *Trends Cardiovasc Med.* 2005;15(7):254-259.
38. Esmon CT. The interactions between inflammation and coagulation. *Br J Haematol.* 2005;131:417–430.
39. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature.* 2008; 454(7203):436-44.
40. Del Prete A, Allavena P, Santoro G, Fumarulo R, Corsi MM, Mantovani A. Molecular pathways in cancer-related inflammation. *Biochem Med.* 2011;21(3):264-75.
41. Zamarron BF and Chen WJ. Dual Roles of Immune Cells and Their Factors in Cancer Development and Progression. *Int. J. Biol. Sci.* 2011; 7(5):651-658.
42. Чехун В. Воспаление и рак. *Онкология.* 2009;11(4):244-245.
43. Aznavoorian S, Murphy AN, Stetler-Stevenson WG, Liotta LA. Molecular aspects of tumor cell invasion and metastasis. *Cancer* 1993; 71: 1368–1383.
44. Flores-Reséndiz D, Castellanos-Juárez E, Benítez-Bribiesca L. Proteases in cancer progression. *Gac Med Mex.* 2009;145(2):131-42.
45. Gabrijelcic D, Svetic B, Spaic D, Skrk J, Budihna M, Dolenc I at al. Cathepsins B, H and L in human breast carcinoma. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1992; 30: 69–74.
46. Akkari L, Gocheva V, Quick ML, Kester JC, Spencer AK, Garfall AL at al. Combined deletion of cathepsin protease family members reveals compensatory mechanisms in cancer. *Genes Dev.* 2016; 30: 220–232.
47. Krepela E. Cysteine proteinases in tumor cell growth and apoptosis. *Neoplasma* 2001; 48: 332–349.
48. Turk B, Turk D, Turk V. Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1477: 98–111.
49. Mason SD. and Joyce JA. Proteolytic Networks in Cancer. *Trends Cell Biol.* 2011; 21(4): 10-28.

50. Тарабрин ОА, Мазуренко АИ. Нарушения системы гемостаза у онкологических больных. Досягнення біології та медицини. 2012;1(19):23-29.
51. Langer F, Bokemeyer C. Crosstalk between cancer and haemostasis. Implications for cancer biology and cancer-associated thrombosis with focus on tissue factor. *Haemostaseologie*. 2012; 32: 95–104.
52. Воробьев АВ, Макацария АД, Чабров АМ, Савченко АА. Синдром Труссо : современный взгляд на проблему. Журнал акушерства и женских болезней. 2015;14(4):85-94.
53. De Cicco M. The prothrombotic state in cancer: pathogenic mechanisms. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2004;(50):187–196.
54. Dammacco F., Vacca A., Procaccio P., Ria R., Marech I., Racanelli V. Cancer-related coagulopathy (Trousseau's syndrome): review of the literature and experience of a single center of internal medicine. *Clin. Exp. Med*. 2013;13(2): 85-97.
55. Воробьев АВ, Макацария АД. Противотромботическая терапия у онкологических больных. Практическая медицина. 2014;5(81):18-28.
56. Трашков АП, Васильев АГ, Цыган НВ, Хайцев НВ, Марченко СП, Наумов АБ. Антитромботическая терапия в онкологии: современное состояние проблемы и нерешенные вопросы. *Педиатр*. 2012;3(2):3-19.
57. Varki A. Trousseau's syndrome: multiple definitions and multiple mechanisms. *Blood*. 2007; 110: 1723–9.
58. Данилов ИП. Роль гемостаза в метастазировании опухолевых клеток. *Здравоохранение*. 2005;8:21–22.
59. Соменова ОВ. Нарушение системы гемостаза у онкологических больных: современное состояние проблемы. *Вестник РОНЦ*. 2006;17(1): 38-42.
60. Falanga A, Donati MB. Pathogenesis of thrombosis in patients with malignancy. *Int J Hematol* 2001;73:137–44.
61. Соменова ОВ, Маджуга АВ, Елизарова АЛ, Зубрихина ГН. Состояние системы гемостаза у больных со злокачественными новообразованиями. *Клиническая онкогематология*. 2008;1(3):266-272.

62. Шапошников С.А., Синьков В.С., Заболотских И.Б. Нарушение гемостаза при онкологическом процессе: современный взгляд на проблему. Вестник РОНЦ им.Н.Н. Блохина РАМН. 2011;22(3):12–20.
63. McIntyre JO, Matrisian LM. Molecular imaging of proteolytic activity in cancer. *J. Cell. Biochem.* 2003;90(6):1087-1097.
64. Клысь ЮГ, Сторчак РМ, Вережка СВ. Протеолитически деградированные производные ферментов, их диагностическое и терапевтическое значение. В кн.: Молекулярная патология белка. Под ред. Д.И. Заболотного. К.: Логос, 2008, С.142-153.
65. Клысь ЮГ, Зайцева НВ, Кизим АИ, Вережка СВ. Протеолитические производные плазминогена при развитии злокачественных новообразований. *Онкология.* 2010;12(1):17-21.
66. Клысь ЮГ, Зайцева НВ, Кизим АИ, Вережка СВ. Протеолитически деградированные производные плазминогена и их возможное диагностическое значение при онкологических процессах. *Лаб. диагностика.* 2008;2(44):52-58.
67. Elion J, Boissel J-Py, Le Bonniec B, et al. Proteolytic derivatives of thrombin. *Ann. NY Acad. Sci.* 1986;485:16-26.
68. Mann KG, Butenas S, Brummel K. The Dynamics of Thrombin Formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:17-25.
69. Корольова ДС, Чернишенко ВО, Горницька ОВ, Платонова ТМ. Вплив продуктів розщеплення протромбіну на активацію та агрегацію тромбоцитів. *УБЖ.* 2009;81(5):58-65.
70. Korolova D, Chernyshenko V, Platonova T, Chernyshenko T, Lugovskoy E. Detection of prethrombin 1 in human blood plasma. *Intern. Blood Res.* 2016;5(2):1-7.
71. Андрианов СИ, Макогоненко ЕМ, Кудинов СА. Особенности гидролиза полимерного фибрина плазмином, миниплазмином, микроплазмином и трипсином. *УБЖ.* 1992;64(3):14-20.

72. O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, et al. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by Lewis lung carcinoma. *Cell*. 1994;79(2):P.315-328.
73. Doll JA, Soff A. Angiostatin. *Cancer Treat. Res.* 2005;126:175-204.
74. Aisina RB, Mukhametova LI. Structure and Function of Plasminogen/Plasmin System. *Russ J Bioorgan Chem.* 2014;40(6):590–605.
75. Verevka SV, Grinenko TV. Pseudo-functional interactions of plasminogen: molecular mechanisms and pathologic appearance / in: *Advances in Medicine and Biology* (Berhardt L.V., Ed.), NY- Nova Science Publishers. 2011;34:35-62.
76. Zia A, Chitlur M. Disorders of Fibrinogen. *Adv. Med. Biol.* 2013;67:147-173.
77. Standeven K, Ariëns R, Grant P. The molecular physiology and pathology of fibrin structure/function. *Blood Reviews.* 2005;19:P.275-88
78. Яценко ТА, Рибачук ВМ, Юсова ОІ, Харченко СМ, Гриненко ТВ. Вплив продуктів деградації фібрину на фібринолітичний процес. *УБЖ.* 2016;88(2):16-24.
79. Рубленко АМ, Фіщенко ВО, Колеснікова ІМ, Литвинова ЛМ, Костюченко ОП, Чернишенко ТМ, Платонова ТМ, Луговської ЕВ. Стан системи зсідання крові при ендопротезуванні кульшового суглоба. *Лаб. діагностика.* 2012;2(60):8-12.
80. Луговской ЕВ, Колесникова ИН, Платонова ТН, Луговская НЕ, Литвинова ЛМ и др. Одновременное количественное определение растворимого фибрина и D-димера в плазме крови для оценки угрозы тромбообразования. *Клиническая медицина.* 2013;11:38-44.
81. Савчук ОМ. Дослідження появи в кровотоці білків-маркерів гемостатичного дисбалансу організму. *Фізика живого.* 2010;18:132-137.
82. Aurer A, Jorgić-Srdjak K, Plančak D. Proinflammatory factors in saliva as possible markers for periodontal disease. *Coll. Antropol.* 2005;29(2):435–439.

83. Zerr I, Bodemer M, Kaboth U, Kretzschmar H, Oellerich M, Armstrong VW. Plasminogen activities and concentrations in patients with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurosci Lett.* 2004;23(371):163-166.
84. Кордюм ВА. Что такое наш "мусор", что такое его "уборка" и какие следствия из всего этого вытекают. *Біополімери і клітина.* 2002;18(6):457-466.
85. Токар АВ, Макогоненко ЄМ, Платонова ТМ. Сучасні методи лабораторної діагностики внутрішньовенного мікрозсідання крові (методичні рекомендації). К: Макком. 1994;22.
86. Веремеенко КН, Голобородько ОП, Кизим АИ. Протеолиз в норме и при патологии. К., 1988.
87. Беліцер ВО, Варецька ТВ, Веремеєнко КМ. Кількісне визначення фібриногену в плазмі крові людини. *Лаб. діагностика.* 1997;2:53-55.
88. Abilgaard U, Lie M, Odegard OR. Antitrombin assay with new chromogenic substrates (S-2238 and chromozym TH). *Tromb. Res.* 1977;11(4):549-553.
89. Меньшиков ВВ. Лабораторные методы исследования в клинике. - М., 1987.
90. Балуда ВП, Баркаган ЗС, Гольдберг ЕД. и соавт. Лабораторные методы исследования системы гемостаза. Т., 1980.
91. Friberger P, Knös M, Gustavsson S, Aurell L, Claeson G. Methods for determination of plasmin, antiplasmin and plasminogen by means of substrate S-2251. *Haemostasis.* 1978;7:138-145.
92. Веремеенко КН, Кизим АИ, Терентьев АГ. Определение активности эластазы и ее ингибиторов в сыворотке крови с помощью хромогенных субстратов. *Клин. лаб. диагностика.* 1992;5-6:58-61.
93. Raksha N, Burlova-Vasylieva M, Torgalo E, Savchuk O. The appearance of molecules of prothrombin origin in blood upon development of atherothrombotic and cardioembolic ischemic stroke. *Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv, series Biology.* 2014;3(68): 57-60.

94. Harlow E, Lane D. Antibodies. NY, 1988;1160 p.
95. Carta G, Jungbauer A. Protein Chromatography: Process Development and Scale-Up. Wiley-VCH. 2010;346 p.
96. Савчук ОМ. Вивчення білок-білкових взаємодій у системі гемостазу з використанням методу ензим-електрофорезу. Медична хімія. 2010;12(1):60–67.
97. Hedstrom L. Serine protease mechanism and specificity. Chem. Rev. 2002.102(12): 4501–4524.
98. Levi M, van der Poll T. Inflammation and coagulation. Crit Care Med. 2010;38 (2):26-34.
99. O'Brien M. The reciprocal relationship between inflammation and coagulation. Top Companion Anim Med. 2012; 27(2):46-52.
100. Petäjä J. Inflammation and coagulation. An overview. Thromb Res. 2011;127(2):34-37.
101. Клись Ю, Верьовка С. Зміни протеолізного балансу плазми крові хворих на запальні захворювання та новоутворення верхніх дихальних шляхів. Вісник КНУ імені Тараса Шевченка, Серія: Проблеми регуляції фізіологічних функцій. 2015; 2(19): 41-43.
102. Емельянова АН, Едемская ВС, Витковский ЮА. Содержание провоспалительных цитокинов, экспрессия тканевого фактора лейкоцитами и гемостаз у больных рожистым воспалением. Дальневосточный медицинский журнал. 2008;3:28-31.
103. Кирпиченок ЛН, Гидранович ЛГ, Шиленок ВН. Активность протеолитических процессов при заболеваниях щитовидной железы. Вопр. мед. химии. 2000;46(5):518-519.
104. Никандров ВН, Жук ОН, Вашкевич ЕИ, Пыжова НС, Лаптева ИМ. Особенности протеолитической активности плазмы крови доноров и лиц с бронхо-легочной патологией. Функциональные системы организма в норме и при патологии. Минск : РИВШ; 2008. 454 с.

105. Porta C, Riboldi E, Sica A. Mechanisms linking pathogens-associated inflammation and cancer. *Cancer Lett.* 2011;305(2):250-62.
106. Borrello MG, Degl'Innocenti D, Pierotti MA. Inflammation and cancer: the oncogene-driven connection. *Cancer Lett.* 2008;267(2):262-70.
107. Lu H, Ouyang W, Huang C. Inflammation, a key event in cancer development. *Mol Cancer Res.* 2006;4(4):221-33.
108. Kraus S, Arber N. Inflammation and colorectal cancer. *Curr Opin Pharmacol.* 2009;9(4):405-10.
109. Farrow B, Evers BM. Inflammation and the development of pancreatic cancer. *Surg Oncol.* 2002;10(4):153-69.
110. Сидоренко ЮС, Мусиенко НВ, Франциянц ЕМ. Некоторые показатели активности протеолитической системы в ткани злокачественной опухоли и перифокальной зоны при различных локализациях рака. *Вестник ЮНЦ РАН.* 2008;4(2):93–98.
111. Hoon DS, Ferris R, Tanaka R, Chong KK, Alix-Panabières C, Pantel K. Molecular mechanisms of metastasis. *J Surg Oncol* 2011; 103: 508-517.
112. Sloane BF, Sameni M, Podgorski I, Cavallo-Medved D, Moin K. Functional imaging of tumor proteolysis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2006;46:301–315.
113. Herszényi L, Lakatos G, Hritz I, Varga MZ, Cierny G, Tulassay Z. The role of inflammation and proteinases in tumor progression. *Dig Dis* 2012; 30: 249-254.
114. Herszényi L, Barabás L, Hritz I, István G, Tulassay Z. Impact of proteolytic enzymes in colorectal cancer development and progression. *World J Gastroenterol.* 2014; 20(37):13246-13257.
115. Козлова ЛС, Колычева ЕВ. Трипсиноподобные протеиназы, кининовая система и основные ингибиторы плазмы крови при раке носоглотки. *Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Естественные науки.* 2011;6:105–110.

116. Козлова ЛС, Франциянц ЕМ, Маслов АА. Трипсиноподобные протеиназы и кининовая система в плазме крови при раке желудка и лимфоме селезёнки. *Международ. ж. прикл. и фундам. исслед.* 2014;10:127–132.
117. Прохоров ДВ. Комплексная оценка и корреляция показателей систем протеолиза и гемостаза в крови у пациентов с меланоцитарными новообразованиями кожи. *Таврический медико-биологический вестник.* 2013;16(1):151-154.
118. Черногубова ЕА, Браславская ИВ, Голиков АЮ. Роль сериновых протеиназ в патогенезе рака простаты. *Вестник ЮНЦ РАН.* 2009;3(3):93–98.
119. Козлова ЛС, Франциянц ЕМ, Ващенко ЛН, Барашев АА, Верескунова МИ, Розенко ЛЯ и др. Кининовая система и ингибиторы плазмы крови у пациентов с остеолитическими метастазами. *Естественные науки.* 2017;3(2): 58-66.
120. Аверьянов АВ. Роль нейтрофильной эластазы в патогенезе хронической обструктивной болезни легких. *Цитокины и воспаление.* 2007;6(4):3–8.
121. Korkmaz B, Moreau T, Gauthier F. Neutrophil elastase, proteinase 3 and cathepsin G: physicochemical properties, activity and physiopathological functions. *Biochimie.* 2008;90(2):227–242.
122. Uribe-Querol E, Rosales C. Neutrophils in Cancer: Two Sides of the Same Coin. *J Immunol Res.* 2015;15:1-21.
123. Dumitru CA, Lang S, Brandau S. Modulation of neutrophil granulocytes in the tumor microenvironment: mechanisms and consequences for tumor progression. *Seminars in Cancer Biology.* 2013;23:141-148.
124. Fridlender ZG and Albelda SM. Tumor-associated neutrophils: friend or foe? *Carcinogenesis.* 2012;33(5):949– 955.
125. Trellakis S, Bruderek K, Dumitru CA et al. Polymorphonuclear granulocytes in human head and neck cancer: enhanced inflammatory activity, modulation by cancer cells and expansion in advanced disease. *Int J Cancer.* 2011;129(9):2183–2193.

126. Magalhaes M, Glogauer JE, Glogauer M. Neutrophils and oral squamous cell carcinoma: lessons learned and future directions. *J Leukoc Biol.* 2014;96:695-702.

127. Gaida MM, Steffen TG, Gunther F, Tschaharganeh DF, Felix K, Bergmann F, Schirmacher P, Hansch GM. Polymorphonuclear neutrophils promote dyshesion of tumor cells and elastase-mediated degradation of E-cadherin in pancreatic tumors. *Eur J Immunol.* 2012;42:3369-3380.

128. Felix K and Gaida MM. Neutrophil-Derived Proteases in the Microenvironment of Pancreatic Cancer – Active Players in Tumor Progression. *Int J Biol Sci.* 2016;12(3):302-313.

129. Вовчук ИЛ. Роль сериновых протеиназ и их эндогенных ингибиторов при неопластической трансформации. *Лаб. діагностика.* 2010;4(54):52–59.

130. Парамонова Н.С. Состояние эластаза-ингибиторной системы у детей в норме и при отдельных патологических состояниях. Гродно: ГрГМУ; 2017. Глава 1, Нейтрофильная эластаза и ее ингибиторы. Физиологическая роль; с. 6-14.

131. Sato T, Takahashi S, Mizumoto T, Harao M, Akizuki M, Takasugi M, Fukutomi T, Yamashita J. Neutrophil elastase and cancer. *Surg Oncol.* 2006;15:217-222.

132. Bierie B, Moses HL. Transforming growth factor beta (TGFbeta) and inflammation in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2010;21(1):49–59.

133. Zamarron BF and Chen W. Dual Roles of Immune Cells and Their Factors in Cancer Development and Progression. *Int. J. Biol. Sci.* 2011;7(5):651-658.

134. Sionov RV, Fridlender ZG, Granot Z. The Multifaceted Roles Neutrophils Play in the Tumor Microenvironment. *Cancer Microenviron.* 2015;8(3):125-58.

135. Schmidt H, Bastholt L, Geertsens P. Elevated neutrophil and monocyte counts in peripheral blood are associated with poor survival in patients with metastatic melanoma: a prognostic model. *Br J Cancer*. 2005;93(3):273–278.
136. Jensen HK, Donskov F, Marcussen N, Nordmark M, Lundbeck F, Maase H. Presence of intratumoral neutrophils is an independent prognostic factor in localized renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* . 2009;27(28):4709–4717.
137. Sun Z, Yang P. Role of imbalance between neutrophil elastase and alpha 1-antitrypsin in cancer development and progression. *Lancet Oncology*. 2004;5:182-190.
138. Васильєва ІМ, Шевченко ОО, Вінник ЮО, Жуков ВІ, Поліщук ТВ. Особливості структурно-метаболического стану сполучної тканини у хворих на рак шлунка. *Світ медицини та біології*. 2014;3(45):22-25.
139. Licari LG, Kovacic JP. Thrombin physiology and pathophysiology. *J Vet Emerg Crit Care*. 2009.19(1):11–22.
140. Яровая ГА, Блохина ТБ, Нешкова ЕА. Рецепторы, активируемые протеиназами (PARs) – сигнальный путь, инициируемый ограниченным протеолизом. *Лабораторная медицина*. 2009;10:23-3.
141. Hu L, Lee M, Campbell W, Perez-Soler R, Karpatkin S. Role of endogenous thrombin in tumor implantation, seeding, and spontaneous metastasis. *Blood*. 2004;104(9):2746-2751.
142. Maragoudaki ME, Tsopanoglou NE. Thrombin. Physiology and disease. Springer-Verlag. New York; 2009. Chapter 9, The Role of Thrombin in Tumor Biology; p. 161-172.
143. Snyder KM, Kessler CM. The Pivotal Role of Thrombin in Cancer Biology and Tumorigenesis. *Semin Thromb Hemost*. 2008;34(8): 734-741.
144. Danckwardt S, Hentze MW, Kulozik AE. Pathologies at the nexus of blood coagulation and inflammation: thrombin in hemostasis, cancer, and beyond. *J Mol Med*. 2013;91:1257–1271.
145. Chen D, Dorling A. Critical roles for thrombin in acute and chronic inflammation. *J Thromb Haemost*. 2009;7:122-126.

146. Ma Liang, Dorling A. The roles of thrombin and protease-activated receptors in inflammation. *Semin Immunopathol.* 2012;34(1):63–72.
147. Turpin B, Miller W, Rosenfeldt L, Kombrinck K, Flick MJ, Steinbrecher KA at al. Thrombin drives tumorigenesis in colitis-associated colon cancer. *Cancer Res.* 2014;74(11):3020–3030.
148. Adams G., Rosenfeldt L., Frederick M. at al. Colon Cancer Growth and Dissemination Relies upon Thrombin, Stromal PAR-1, and Fibrinogen. *Cancer Res.* 2015;75(19):4235–4243.
149. Steinbrecher KA, Horowitz N, Blevins EA, Barney KA, Shaw MA, Harmel-Laws E at al. Colitis-associated cancer is dependent on the interplay between the hemostatic and inflammatory systems and supported by integrin α M β 2 engagement of fibrinogen. *Cancer Res.* 2010;70(7): 2634–2643.
150. Borensztajn K, Aberson H, Groot A, Peppelenbosch MP, Spek CA. A mechanism for thrombin-dependent lung metastasis in patients with osteosarcoma. *Br J Haematol.* 2009;145:533–550.
151. Hernandez-Rodriguez NA, Correa E, Sotelo R, Gómez-Ruiz C, Contreras-Paredes A, Green L. Thrombin is present in the lungs of patients with primary extremity osteosarcoma and pulmonary metastases. *Int J Biol Markers.* 2002;17(3):189–195.
152. Naldini A, Morena E, Belotti D, Carraro F, Allavena P, Giavazzi R. Identification of thrombin-like activity in ovarian cancer associated ascites and modulation of multiple cytokine networks. *Thromb Haemost.* 2011;106(4):705-711.
153. Hernández-Rodríguez NA, Correa E, Contreras-Paredes A. Evidence that thrombin present in lungs of patients with pulmonary metastasis may contribute to the development of the disease. *Lung Cancer.* 1999;26(3):157-167.
154. Han N, Jin K, He K, Cao J, Teng L. Protease-activated receptors in cancer: A systematic review. *Oncol Lett.* 2011;2(4): 599-608.
155. Wang X, Wang E, Kavanagh J and Freedman R. Ovarian cancer, the coagulation pathway, and inflammation. *J Transl Med.* 2005;3(25):1-20.

156. Zigler M, Kamiya T, Brantley E. PAR-1 and Thrombin: The Ties That Bind the Microenvironment to Melanoma Metastasis. *Cancer Res.*2011;71(3).6561-6566.
157. Hu L, Roth JM, Brooks P, Luty J, Karpatkin S. Thrombin up-regulates cathepsin D which enhances angiogenesis, growth, and metastasis. *Cancer Res.* 2008;68:4666–73.
158. Zucker S, Conner C, DiMassmo BI. Thrombin Induces the Activation of Progelatinase A in Vascular Endothelial Cells. Physiologic regulation of angiogenesis. *J Biol Chem.* 1995;270:23730-23738.
159. Maragoudakis ME, Tsopanoglou NE and Andriopoulou P. On the mechanism(s) of thrombin induced angiogenesis. *Adv Exp Med Biol.*2000;476:47-55.
160. Tsopanoglou NE, Maragoudakis ME. Role of Thrombin in Angiogenesis and Tumor Progression. *Semin Thromb Hemost.* 2004;30(1):63-69.
161. Nierodzik ML, Karpatkin S. Thrombin induces tumor growth, metastasis, and angiogenesis: Evidence for a thrombin-regulated dormant tumor phenotype. *Cancer cell.* 2006;10:355-362.
162. Caunt M, Hu L, Tang T, Brooks P, Ibrahim S and Karpatkin S. Growth-Regulated Oncogene Is Pivotal in Thrombin-Induced Angiogenesis. *Cancer Res.* 2006;66(8):4125-4132.
163. Karpatkin S. Cytokine GRO- α is pivotal in thrombin-induced angiogenesis. *Haematologica reports.* 2005;1(9):25-26.
164. Otsuki T, Fujimoto D, Hirono Y et al. Thrombin conducts epithelial-mesenchymal transition via protease-activated receptor-1 in human gastric cancer. *Int J Oncol.*2014;45:2287-2294.
165. Ahn HS, Foster C, Boykow G, Stamford A, Manna M, Graziano M. Inhibition of cellular action of thrombin by N3-cyclopropyl-7-[[4-(1-methylethyl)phenyl]methyl]-7H-pyrrolo[3,2-f]quinazoline-1,3-diamine (SCH 79797), a nonpeptide thrombin receptor antagonist. *Biochem Pharmacol.* 2000;60(10):1425-34.

166. Zhang HC, White KB, McComsey DF, Addo MF, Andrade-Gordon P, Derian CK et al. High-affinity thrombin receptor (PAR-1) ligands: a new generation of indole-based peptide mimetic antagonists with a basic amine at the C-terminus. *Bioorg Med Chem Lett*. 2003;13(13):2199-203.
167. Levy JH, Sniecinski RM, Welsby IJ, LM. Antithrombin: anti-inflammatory properties and clinical applications. *Thromb Haemost*. 2016;115(4):712-728.
168. O'Reilly MS. Antiangiogenic antithrombin. *Semin Thromb Haemost*. 2007;33:660–666.
169. Deskur A, Sałata D, Budkowska M, Dołęgowska B, Starzyńska T, Błogowski W. Selected hemostatic parameters in patients with pancreatic tumors. *Am J Transl Res*. 2014;6(6):768-776.
170. Seitz R, Rappe N, Kraus M, Immel A, Wolf M, Maasberg M et al. Activation of coagulation and fibrinolysis in patients with lung cancer: relation to tumour stage and prognosis. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1993;4(2):249-54.
171. Silverman GA, Bird PI, Carrell RW, Church FC, Coughlin PB, Gettins PG. The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *J. Biol. Chem*. 2001;276(36):33293–33296.
172. Негруца КВ. Нарушение функции нейтрофилов как один из механизмов формирования воспаления у больных бронхиальной астмой, хронической обструктивной болезнью легких и внебольничной пневмонией. Дисс. к.м.н, 2017, Санкт-Петербург, 185 с.
173. Мурыгина ГЛ, Суркова ЕА, Бойцова ЕВ, Сесь ТП, Богданова АВ, Платонова ИС. Нейтрофилы и дисбаланс протеазы-антипротеазы при хроническом бронхолите у детей. *Клиническая иммунология*. 2002;4(1):81-85.
174. Перцева ТО, Гашинова КЮ, Віклієнко ЮІ. Рівень α 1-антитрипсину (ААТ) у хворих на хронічне обструктивне захворювання легень (ХОЗЛ). *Медичні перспективи*. 2011;16(2):98-104.

175. Федосеев ГБ, Трофимов ВИ, Тимчик ВГ, Негруца КВ, Горовнёва ЕВ, Разумовская ТС и др. Особенности воспаления у больных бронхиальной астмой и ХОБЛ и маркеры воспаления. Российский аллергологический журнал. 2014;2:44–59.

176. Акбашева ОЕ, Бурковская ВА, Деханд АЕ, Белобородова ЭИ, Акимова ЛА, Наумова ЕЛ. Активность трипсиноподобных протеиназ и деградация коллагена слизистой оболочки кишечника при заболеваниях желудочно-кишечного тракта. РЖГГК. 2010;2:31-38.

177. Кондратина ТГ, Горин ВС, Потехина НГ. Белки острой фазы и макроглобулины при воспалительных процессах органов малого таза. Сибирский медицинский журнал. 2012;5:65-68.

178. Загрямова ТА, Акбашева ОЕ, Ермаков СЮ. Активность ингибиторов протеиназ плазмы крови при язвенной болезни в зависимости от морфофенотипа конституции больных. РЖГГК. 2007;17(4): 30-35.

179. Акбашева О.Е, Серебров ВЮ. Показатели протеолиза и фенотипы антипротеиназного ингибитора при язвенной болезни двенадцатиперстной кишки. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2007;2:41 - 44.

180. Perlmutter DH. Pathogenesis of chronic liver injury and hepatocellular carcinoma in alpha-1-antitrypsin deficiency. *Pediatr. Res.* 2006;60(2):233–238.

181. Wozniak A, Mila-Kierzenkowska C, Schachtschabel DO, Wozniak B, Rozwodowska M, Drewa T. Activity of cathepsin D and alpha(1)-antitrypsin in the blood serum of patients with mammary carcinoma. *Exp. Oncol.* 2005. 27(3): 233–237.

182. El-Akawia ZJ, Abu-awadb AM, Khouri NA. Alpha-1 Antitrypsin Blood Levels as Indicator for the Efficacy of Cancer Treatment. *World J Oncol.* 2013;4(2):83-86.

183. Чибичян МБ, Черногубова ЕА, Коган МИ. Новые биохимические маркеры рецидива рака предстательной железы после его лечения. Вестник урологии. 2013;3:12-19.

184. Amiguet JA, Jimenez J, Monreal JJ, Hernández MJ, López-Vivanco G, Vidán JR. Serum proteolytic activities and antiproteases in human colorectal carcinoma. *J. Physiol Biochem.* 1998;54(1): 9–13.
185. Zelvyte I, Wallmark A, Piitulainen E, Westin U, Janciauskiene S. Increased plasma levels of serine proteinase inhibitors in lung cancer patients. *Anticancer Res.* 2004;24(1):241–247.
186. Kasprzyk M, Dyszkiewicz W, Zwaruń D, Szydlik S, Leśniewska K, Krzyzanowski M. The quantitative evaluation of the serum acute phase proteins (APP) of patients undergoing a curative resection for non-small cell lung cancer (NSCLC). *Przegl. Lek.* 2006;63(10):936–940.
187. Зорин НА, Зорина ВН, Зорина РМ. Роль белков семейства макроглобулинов в регуляции воспалительных реакций. *Биомед. химия.* 2006;52(3):229-238.
188. Баженова ЛГ. Биологические свойства белков семейства макроглобулинов и их роль в неопластическом процессе в яичниках. *Российский вестник акушера-гинеколога.* 2011;11(1):17-21.
189. Зорин НА, Зорина ВН, Зорина РМ. α_2 -макроглобулин. Универсальный модулятор цитокинов. *Иммунология.* 2004;25(5):302-304.
190. Borth W, Feinman RD, Gonias SL, Quigley JP, Strickland DK. *Biology of α_2 -Macroglobulin, its receptor, and related proteins.* New York: The New York Academy of Sciences 1994;521 p.
191. Шрамко СВ, Зорина ВН, Баженова ЛГ, Зорина РМ. Особенности острофазного ответа при различных вариантах воспалительных процессов придатков матки. *Бюллетень сибирской медицины.* 2007;1:105-110.
192. Бурковская ВА, Акбашева ОЕ, Сморгон АВ. Протеолитическая деградация соединительной ткани при заболеваниях желудочно-кишечного тракта. *Сибирский медицинский журнал.* 2010;25(1):62-66

193. Зорина ВН, Шрамко СВ, Зорина РМ, Баженова ЛГ, Промзелева НВ, Зорин НА. Белки семейства макроглобулинов при аденомиозе и миоме тела матки. Медицинская иммунология. 2015;17(3):287-292.
194. Зорина ВН, Козлов ИГ, Третьякова ТВ, Промзелева НВ, Баженова ЛГ, Зорина РМ и др. Некоторые реактанты острой фазы при различных типах пролиферативных заболеваний придатков матки. Клини. Лаб. Диагностика. 2009;7:16-19.
195. Kanoh Y, Ohtani H, Egawa S, Baba S, Akahoshi T. Levels of acute inflammatory biomarkers in advanced prostate cancer patients with α_2 -macroglobulin deficiency. Int J Oncol. 2011;39(6):1553-8.
196. Gassaloglu M, Karasu I, Ozsoz A. Are Serum Alpha-1-Antitrypsin and Alpha-2-Macroglobulin Levels Related with Tumor Histology or Stage of the Lung Cancer? Int J Hematol Oncol . 2014;1:11-16.
197. Kit OI, Frantsiiants EM, Kozlova LS, Terpugov AL. Serpins in hyperplastic colon tissue. Eksp Klin Gastroenterol. 2014;(10):18-21.
198. Андреешкина ИИ. Динамика изменения коагуляционного гемостаза у больных раком молочной железы с метастазами в легкие. Вестник новых медицинских технологий. 2012;19(1):71-72.
199. Foca C, Moses E, Quinn M. Differential expression of the α_2 -macroglobulin receptor and receptor associated protein in normal human endometrium and endometrial carcinoma. Med Hum Reprod 2000;6:921-927.
200. Kotiza J. Proteases and antiproteases in health and disease: a review. IV. Alpha-2-macroglobulin. Biomarkers Environ. 2002;5:2-14.
201. Веремеенко КН, Кизим АИ, Досенко ВЕ. α_2 -макроглобулин: структура, физиологическая роль и клиническое значение. Лаб. диагностика. 2000;2:3-9.
202. Зорин НА, Зорина ВН, Зорина РМ. Роль альфа-2-макроглобулина при онкологических заболеваниях. Вопросы онкологии. 2004;50(5):515-519.

203. Барсуков ВЮ, Чеснокова НП, Плохов ВН. Состояние коагуляционного гемостаза и фибринолиза у больных узловой формой рака молочной железы в динамике опухолевой прогрессии. *Фундаментальные исследования*. 2009;4:7-11;
204. Барсуков ВЮ, Плохов ВН, Чеснокова НП. Изменение коагуляционных свойств крови в зависимости от распространенности опухолевого процесса при раке молочной железы. *Сибирский онкологический журнал*. 2007;3(23):73-76.
205. Khachaturova EA, Savushkin AV, Gubko AV, Musin II, Eroshkina TD, Kameneva AV. Coagulation abnormalities in colorectal surgery. *Malignant Tumours*. 2015; 2:54-63.
206. Standeven KF, Ariëns RA, Grant PJ. The molecular physiology and pathology of fibrin structure/function. *Blood Rev*. 2005;19(5):275-88.
207. Palumbo JS, Kombrinck KW, Drew AF, Grimes TS, Kiser JH, Degen JL, Bugge TH. Fibrinogen is an important determinant of the metastatic potential of circulating tumor cells. *Blood*. 2000;96:3302-3309.
208. Jennewein C, Tran N, Paulus P, Ellinghaus P, Eble JA, Zacharowski K. Novel aspects of fibrin(ogen) fragments during inflammation. *Mol Med*. 2011;17(5-6):568-73.
209. Simpson-Haidaris PJ and Rybarczyk B. Tumors and fibrinogen. The role of fibrinogen as an extracellular matrix protein. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;936:406- 425.
210. Davalos D, Akassoglou K. Fibrinogen as a key regulator of inflammation in disease. *Semin Immunopathol*. 2012;34:43-62.
211. Perisanidis C, Psyrris A, Cohen EE, Engelmann J, Heinze G, Perisanidis B, Stift A, Filipits M, Kornek G, Nkenke E. Prognostic role of pretreatment plasma fibrinogen in patients with solid tumors: A systematic review and metaanalysis. *Cancer treatment reviews*. 2015.

212. Державец ЛА, Прохорова ВИ, Лаппо СВ. Показатели гемостаза в оценке распространенности опухолевого процесса у больных раком мочевого пузыря. Онкологический журнал. 2007;1(1):136-145.

213. Zhang D, Zhou X, Bao W, Chen Y, Cheng L, Qiu G, Sheng L, Ji Y, Du X. Plasma fibrinogen levels are correlated with postoperative distant metastasis and prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2015; 6:38410-38420.

214. Wen J, Yang Y, Ye F, Huang X, Li S, Wang Q, Xie X. The preoperative plasma fibrinogen level is an independent prognostic factor for overall survival of breast cancer patients who underwent surgical treatment. *Breast*. 2015; 24:745-750.

215. Sun ZQ, Han XN, Wang HJ, Tang Y, Zhao ZL, Qu YL, Xu RW, Liu YY, Yu XB. Prognostic significance of preoperative fibrinogen in patients with colon cancer. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 8583-8591.

216. Zhu LR, Li J, Chen P, Jiang Q, Tang XP. Clinical significance of plasma fibrinogen and D-dimer in predicting the chemotherapy efficacy and prognosis for small cell lung cancer patients. *Clin Transl Oncol*. 2016;18(2):178–188.

217. Принькова ТЮ, Прохорова ВИ, Цырусъ ТП, Колядко НН, Таганович АД. Значение исследования показателей оценки гемостатического потенциала крови (фибриногена, фактора Виллебранда и D-димеров) как потенциальных лабораторных критериев распространенности и дифференцировки опухоли при раке тела матки. *Лаб. диагностика. Восточная Европа*. 2012;3:112-120.

218. Pedrazzani C, Mantovani G, Salvagno GL, Baldiotti E, Ruzzenente A, Iacono C et al. Elevated fibrinogen plasma level is not an independent predictor of poor prognosis in a large cohort of Western patients undergoing surgery for colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2016; 22(45): 9994-10001.

219. Zheng S, Shen J, Jiao Y. Platelets and fibrinogen facilitate each other in protecting tumor cells from natural killer cytotoxicity. *Cancer Science*. 2009;100(5):859–865.

220. Palumbo JS, Talmage KE, Massari JV, La Jeunesse CM, Flick MJ, Kombrinck KW, Jirouskova M, Degen JL. Platelets and fibrin(ogen) increase metastatic potential by impeding natural killer cell-mediated elimination of tumor cells. *Blood*. 2005; 105:178-185.

221. Sahni A. FGF-2 binding to fibrin(ogen) is required for augmented angiogenesis. *Blood*. 2006;107:126–131.

222. Tian Y, Hong M, Jing S, Liu X, Wang H, Wang X. et al. Clinical and Prognostic Effect of Plasma Fibrinogen in Renal Cell Carcinoma: A Meta-Analysis. *Biomed Res Int*. 2017:1-8.

223. Ruggeri ZM. von Willebrand factor. *J Clin Invest* 1997; 99: 559-564.

224. Клись Ю, Верьовка С, Галенова Т, Вовк Т. Фактори ризику гемостатичного дисбалансу хворих на запальні захворювання та новоутворення ЛОР-органів. *Вісник КНУ імені Тараса Шевченка, Серія: Проблеми регуляції фізіологічних функцій*. 2016;1(20):19-22.

225. Meucci G, Pareti F, Vecchi M, Saibeni S, Bressi C, Franchis R. Serum von Willebrand factor levels in patients with inflammatory bowel disease are related to systemic inflammation. *Scand J Gastroenterol* 1999;34:287-290.

226. Колядко НН, Прохорова ВИ. Опухолеспецифическая выживаемость в зависимости от уровня некоторых параметров гемостаза при колоректальном раке и раке легкого. *Здравоохранение*. 2013;4:4-7.

227. Terraube V, Marx I, Denis CV. Role of von Willebrand factor in tumor metastasis. *Thromb Res*. 2007;120(2):64-70.

228. Xu G, Tian K-L, Liu G-P, Zhong X-J, Tang S-L, Sun Y-P. Clinical significance of plasma D-dimer and von Willebrand factor levels in patients with ulcer colitis. *World J Gastroenterol*. 2002;8(3):575-576.

229. De Divitiis C, Nastiuglielmo G, Montano Ma, Fisichella R, Iaffaioli RV, Berretta M. Prognostic and predictive response factors in colorectal cancer

patients: Between hope and reality. *World J Gastroenterol.* 2014;20(41):15049–15059.

230. Röhsig LM, Damin DC, Stefani SD, Castro CG, Roisenberg I, Schwartzmann GA. von Willebrand factor antigen levels in plasma of patients with malignant breast disease. *Braz J Med Biol Res.* 2001;34:1125-1129.

231. Wang W-S, Lin J-K, Lin T-C, Chiou T-J, Liu J-H, Yen C-C. Plasma von Willebrand factor level as a prognostic indicator of patients with metastatic colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2005;11(14):2166-2170.

232. Рогожина ИЕ, Хворостухина НФ. Малоинвазивные технологии и система гемостаза при миоме матки. *Саратовский научно-медицинский журнал.* 2011;7(3):587–592.

233. Cate H, Falanga A. Overview of the postulated mechanisms linking cancer and thrombosis. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2008;36(3-4):122-30.

234. Литвинов РИ. Молекулярные механизмы и клиническое значение фибринолиза. *Казанский медицинский журнал.* 2013; 94(5):711-718.

235. Collet JP, Allali Y, Lesty C. et al. Altered fibrin architecture is associated with hypofibrinolysis and premature coronary atherothrombosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006;26:2567–2573.

236. Deryugina EI, Quigley JP. Cell Surface Remodeling by Plasmin: A New Function for an Old Enzyme. *J Biomed Biotechnol.* 2012;12:1-21.

237. Syrovets T, Lunov O, Simmet T. Plasmin as a proinflammatory cell activator. *J. Leukoc. Biol.* 2012;92:509–519.

238. Godier, Hunt BJ. Plasminogen receptors and their role in the pathogenesis of inflammatory, autoimmune and malignant disease. *J Thromb Haemost.* 2012;11:26–34.

239. Kumari S, Malla R. New Insight on the Role of Plasminogen Receptor in Cancer Progression. *Cancer Growth and Metastasis.* 2015;8:35–42.

240. Del Rosso M, Fibbi G, Pucci M, Margheri F, Serrati S. The plasminogen activation system in inflammation. *Front Biosci.* 2008;13:4667-86.

241. Жерносеков ДД, Юсова ЕИ, Гриненко ТВ. Роль плазминоген/плазмина в функционировании клеток крови. Укр. біохім. журн. 2012;84(4):5-19.
242. Syrovets T, Simmet T. Novel aspects and new roles for the serine protease plasmin. *Cell Mol Life Sci.* 2004;61(7-8):873–885.
243. Кит ОИ, Франциянц ЕМ, Моисеенко ТИ, Козлова ЛС, Назаралиева НА, Бойко КП и др. Исследование каскада активации плазминогена в ткани рака шейки матки. Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. 2017;3(2):51-57.
244. Огнерубов НА, Герштейн ЕС, Казьмин АИ, Кушлинский НЕ. Система активации плазминогена при раке желудка. Успехи современного естествознания. 2003;8:25-28.
245. Lijnen HR. Matrix Metalloproteinases and Cellular Fibrinolytic Activity. *Biochemistry.* 2002;67(1):92-98.
246. Kwaan HC, McMahon B. The role of plasminogen-plasmin system in cancer. *Cancer Treat Res.* 2009;148:43-66.
247. Pepper MS. Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2001;21:1104–1117.
248. Rakic JM, Maillard C, Jost M. Role of plasminogen activator-plasmin system in tumor angiogenesis. *Cell Mol Life Sci.* 2003;60(3):463–473.
249. Oh CW, Hoover-Plow J, Plow EF. The role of plasminogen in angiogenesis in vivo. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2003. 1;8:1683–1687.
250. Berger DH. Plasmin/plasminogen system in colorectal cancer. *World J Surg.* 2002;26(7):767-71.
251. Герштейн ЕС, Талаева ШЖ, Сандыбаев МН, Кушлинский НЕ. Клиническая роль системы активации плазминогена в опухолях человека. Молекулярная медицина. 2007;1:4-8.
252. McMahon BJ, Kwaan HC. Components of the Plasminogen-Plasmin System as Biologic Markers for Cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2015;867:145-56.

253. Sanz L, Vizoso F, Verez P, Allende MT, Corte MG, Abdel-Lah O at al. Prognostic significance of tissue-type plasminogen activator (tPA) content in gastric cancer and surrounding mucosa. *Int. J. Biol. Markers*. 2002;17:169-176.

254. Кит ОИ, Франциянц ЕМ, Никипелова ЕА, Комарова ЕФ, Козлова ЛС, Таварян ИС. и др. Изменения маркеров пролиферации, неоангиогенеза и системы активации плазминогена в ткани рака прямой кишки. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2015;2(114):40-45.

255. Франциянц ЕМ, Комарова ЕФ, Позднякова ВВ, Погорелова ЮА, Черярина НД, Козлова ЛС. и др. Тканевая система активации плазминогена при меланоме кожи. *International journal of applied and fundamental research*. 2013;5.

256. Герштейн ЕС, Кушлинский НЕ. Клинические перспективы исследования ассоциированных с опухолью протеаз и их тканевых ингибиторов у онкологических больных. *ВЕСТНИК РАМН*. 2013;5:16-27.

257. Франциянц ЕМ, Максимова НА, Козель ЮЮ, Ильченко МГ, Козлова ЛС. Мониторинг плазминогена и плазмينا в плазме крови при лечении нефробластом у детей. *Международный журнал экспериментального образования*. 2014;1:87-89.

258. Сандыбаев МН. Активаторы и ингибиторы активаторов плазминогена. *Медицина и экология*. 2008;1:12-16.

259. Lee C-C and Huang T-S. Plasminogen Activator Inhibitor-1: The Expression, Biological Functions, and Effects on Tumorigenesis and Tumor Cell Adhesion and Migration. *J. Cancer Mol*. 2005;1(1):25-36.

260. Märkl B, Renk I, Oruzio DV, Jähnig H, Schenkirsch G, Schöler C. at al. Tumour budding, uPA and PAI-1 are associated with aggressive behaviour in colon cancer. *J Surg Oncol*. 2010;102(3):235-41.

261. Andreasen PA, Egelund R, Petersen HH. The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis. *Cell Mol Life Sci* 57:25-40, 2000.

262. Harbeck N, Kates RE, Gauger K, Willems A, Kiechle M, Magdolen V, Schmitt M. Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-I: novel tumor-derived factors with a high prognostic and predictive impact in breast cancer. *Thromb Haemost* 91:450-456, 2004.

263. Ohba K, Miyata Y, Kanda S, Koga S, Hayashi T, Kanetake H. Expression of urokinase-type plasminogen activator, urokinase-type plasminogen activator receptor and plasminogen activator inhibitors in patients with renal cell carcinoma: correlation with tumor associated macrophage and prognosis. *J. Urol.* 2005;174:461–465.

264. Hundsdorfer B, Zeilhofer HF, Bock KP, Dettmar P, Schmitt M, Kolk A et al. Tumour-associated urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-1 in normal and neoplastic tissues of patients with squamous cell cancer of the oral cavity - clinical relevance and prognostic value. *J. Craniomaxillofac. Surg.* 2005;33(3):191–6.

265. Harbeck N. Use of uPA and PAI-1 to personalise therapy in patients with breast cancer. International Society of Oncology and Biomarkers, 37th Meeting Biomarkers and New Treatment Strategies in Oncology ISOBM. Amsterdam, The Netherlands. 2009;114.

266. Lisboa BW, Friedrichs K, Riethdorf L. et al. Urokinase plasminogen activator (uPA) and its type-1 inhibitor (PAI-1) are superior to the Nottingham Prognostic Index NPI in predicting relapse in node-negative breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat.* 2000;64:40.

267. Федоткина ЮА, Панченко ЕП. Тромбозы в онкологии. *Атеротромбоз.* 2017;1: 11-17.

268. Какурина ГВ, Кондакова ИВ, Чойнзонов ЕЛ. Прогнозирование метастазирования плоскоклеточных карцином головы и шеи. *Вопр. онкологии.* 2012;58(1):26–32.

269. Черемисина ОВ, Чойнзонов ЕЛ. Возможности эндоскопической диагностики предопухолевых заболеваний и рака гортани в современной онкологии. *Сибирский онкологический журнал.* 2007;3:(23)5-9.

270. Какурина ГВ, Кондакова ИВ, Чойнзонов ЕЛ. Компоненты системы деградации в прогрессии плоскоклеточных карцином головы и шеи. ВЕСТНИК РАМН. 2015;70(6):684-693.

271. Шилова ОЮ, Уразова ЛН. Молекулярно-генетические методы прогноза и течения рака гортани. Сибирский онкологический журнал. 2010;5(41):64-70.

272. Голобородько ОП, Кизим АИ, Клысь ЮГ, Зайцева НВ, Вережка СВ. Оценка риска послеоперационного рецидива и метастазирования по предоперационным показателям системы гемостаза при раке верхних дыхательных путей. Лаб. диагностика. 2011;1(55):3-7.

273. Кизим ОЙ, Голобородько ОП, Клысь ЮГ, Зайцева НВ, Вережка СВ, винахідники; ДУ «Інститут отоларингології ім.проф. О.С. Коломійченка НАМН України», патентовласник. Спосіб прогнозування виникнення рецидиву і метастазів у хворих на рак гортані. Патент України № 61639. 2011 лип. 25.

274. Вережка СВ, Голобородько ОП, Кизим ОЙ, Клысь ЮГ, Зайцева НВ. Показники гемостатичної системи для оцінки перебігу захворювання на рак верхніх дихальних шляхів (Методичні рекомендації) (27.11/183.11), Київ, 2012, 20 с.

275. Klys' YG, Gryn' NV, Verevka SV. Combined use of haemostatic system indices for evaluation of upper respiratory tract cancer. Experimental Oncology. 2016;38(1):36-39.

276. Jiang W, Chen Y, Huang J, Xi D, Chen J, Shao Y at al. Systemic immune-inflammation index predicts the clinical outcome in patients with nasopharyngeal carcinoma: a propensity score-matched analysis. Oncotarget. 2017;8(39):66075-66086.

277. Kassenbrock K, Zlaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of tumor microenvironment. Cell. 2010;141(2):52-67.

278. Клисьь ЮГ, Верьовка СВ. Асоційовані з мембранами компоненти ендогенної інтоксикації та їх роль в онкогенезі. Вісник КНУ імені Тараса Шевченка, Серія: Проблеми регуляції фізіологічних функцій. 2011;57:18-20.

279. De Clerk Y, Imren S. Protease inhibitors: role and potential therapeutic use in human cancer. Eur J Cancer. 1994;30A(14):2170-2180.

280. Клисьь ЮГ, Кизим ОЙ, Голобородько ОП, Зайцева НВ, Кікоть ЮВ, Савченко ТД, Верьовка СВ. Скринінг показників гемостатичної системи як можливих первинних маркерів онкогенезу. Лаб. діагностика. 2011;2(56):С.20-25.

281. Enghild J, Valnickova Z, Thogersen I, Pizzo S. Complex between serpins and inactive proteinases are not thermodynamically stable but are recognized by serpin receptors. J.Biol.Chem. 1994;269(31):29159-29166.

282. Верьовка СВ, Ракша НГ, Савчук ОМ. Активаційна дія сорбованого плазміну. Моделювання *in vitro*. Науковий вісник Чернівецького університету. Біологічні системи. 2014;6(1):16–19.

283. Верьовка СВ, Голобородько ОП, Кизим ОЙ, Клисьь ЮГ, Зайцева НВ. Дослідження компонентів систем протеолізу та гемостазу в плазмі хворих із злоякісними новоутвореннями верхніх дихальних шляхів до і після хірургічного втручання. Журнал вушних, носових і горлових хвороб. 2010;3:2-9.

284. Голобородько ОП, Кизим ОЙ, Клисьь ЮГ, Верьовка СВ, Зайцева НВ, Кікоть ЮВ, Савченко ТД. Дослідження компонентів протеолітичної, коагуляційної та фібринолітичної систем плазми крові пацієнтів з різною патологією ЛОР-органів. Журнал вушних, носових і горлових хвороб. 2010;5:34-39.

285. Ерецкая ЕВ, Кудинов СА. Активация плазминогена иммобилизированным трипсином. Укр.биохим.журн. 1979;51(4):335-339.

286. Klys' YuG, Storchak RM, Verevka SV. Proteolytically degraded enzymes derivatives: Their diagnostic and therapeutic value. In: Molecular Pathology of Proteins (Zabolotny D.I., Ed.), Nova Science Publishers, NY. 2009, P. 139-151

287. Doll JA, Soff GA. Angiostatin. *Cancer Treat. Res.* 2005;126:175-204.
288. Boxrud P, Block P. Streptokinase binds preferentially to the extended conformations of plasminogen through lysine binding sites and catalytic domain interactions. *Biochemistry.* 2000;39(45):13974-13981.
289. Wahl M, Kenan D, Gonzalez-Gronow M, Pizzo S. Angiostatin's molecular mechanism: aspects of specificity and regulations elucidated. *J. Cell. Biochem.* 2005;96:242-261.
290. Клись ЮГ. Протеолітично ушкоджені похідні плазміногену за новоутворень верхніх дихальних шляхів. *Науковий вісник Чернівецького університету. Біологічні системи.* 2016;8(2):171-175.
291. Клись ЮГ, Верьовка СВ. Особливості активаційної дії стрептокінази в плазмі крові людини. *Вісник Одеського Національного Університету. Біологія.* 2010;15(6):С.9-14.
292. Шляга ИД, Сатырова ТВ. Актуальные вопросы патологии гортани. *Проблемы здоровья и экологии.* 2006;2(8):29-34.
293. Стукань АИ, Мурашко РА, Бодня ВН, Чухрай ОЮ, Дулина ЕВ. Возможности терапии плоскоклеточного рака головы и шеи в зависимости от молекулярных особенностей опухоли (обзор литературы). *Опухоли головы и шеи.* 2017;7(7):66-73.
294. Макацария АД, Воробьёв АВ, Чабров АМ, Савченко АА, Мищенко АЛ. Значение иммунной системы в патогенезе тромботических осложнений у онкологических больных. *Акушерство, гинекология и репродукция.* 2016; 1: 84-98.
295. Францияц ЕМ, Козлова ЛС, Комарова ЕФ, Верескунова МИ, Кучкина ЛП. Фактор роста эндотелия сосудов и система фибринолиза в ткани молочной железы при гиперпластических процессах различного генеза. *Международ. ж. прикл. и фундам. исслед.* 2014;4:97-100.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

За темою дисертації опубліковано 26 наукових праць, у тому числі 5 статей у наукових фахових виданнях України, 1 стаття у науковому фаховому виданні України, включеному до міжнародних наукометричних баз даних, 8 публікацій в інших наукових виданнях, 1 патент на корисну модель, 1 методичні рекомендації, 10 тез доповідей у матеріалах наукових конференцій та з'їздів.

1. Клись ЮГ, Верьовка СВ. Особливості активаційної дії стрептокінази в плазмі крові людини. Вісник Одеського Національного Університету. Біологія. 2010;15(6):С.9-14.

2. Клись ЮГ, Верьовка СВ. Асоційовані з мембранами компоненти ендогенної інтоксикації та їх роль в онкогенезі. Вісник КНУ імені Тараса Шевченка, Серія: Проблеми регуляції фізіологічних функцій. 2011;57:18-20.

3. Клись Ю, Верьовка С. Зміни протеолізного балансу плазми крові хворих на запальні захворювання та новоутворення верхніх дихальних шляхів. Вісник КНУ імені Тараса Шевченка, Серія: Проблеми регуляції фізіологічних функцій. 2015; 2(19): 41-43.

4. Klys' YG, Gryn' NV, Verevka SV. Combined use of haemostatic system indices for evaluation of upper respiratory tract cancer. *Experimental Oncology*. 2016;38(1):36-39.

5. Клись Ю, Верьовка С, Галенова Т, Вовк Т. Фактори ризику гемостатичного дисбалансу хворих на запальні захворювання та новоутворення ЛОР-органів. Вісник КНУ імені Тараса Шевченка, Серія: Проблеми регуляції фізіологічних функцій. 2016;1(20):19-22.

6. Клись ЮГ. Протеолітично ушкоджені похідні плазміногену за новоутворень верхніх дихальних шляхів. Науковий вісник Чернівецького університету. Біологічні системи. 2016;8(2):171-175.

7. Клысь ЮГ, Зайцева НВ, Кизим АИ, Вережка СВ. Протеолитически деградированные производные плазминогена и их возможное диагностическое значение при онкологических процессах. Лабораторная диагностика. 2008;2 (44):52-58.

8. Клысь ЮГ, Сторчак РМ, Вережка СВ. Протеолитически деградированные производные ферментов, их диагностическое и терапевтическое значение. В кн.: Молекулярная патология белка. Под ред. Д.И. Заболотного. К.: Логос, 2008; С.142-153.

9. Klys' YuG, Storchak RM, Verevka SV. Proteolytically degraded enzymes derivatives: Their diagnostic and therapeutic value. In: Molecular Pathology of Proteins (Zabolotny D.I., Ed.), Nova Science Publishers, NY. 2009, P. 139-151.

10. Клысь ЮГ, Зайцева НВ, Кизим АИ, Вережка СВ. Протеолитические производные плазминогена при развитии злокачественных новообразований. Онкология. 2010;12(1):17-21.

11. Вережка СВ, Голобородько ОП, Кизим ОЙ, Клысь ЮГ, Зайцева НВ. Дослідження компонентів систем протеолізу та гемостазу в плазмі хворих із злоякісними новоутвореннями верхніх дихальних шляхів до і після хірургічного втручання. Журнал вушних, носових і горлових хвороб. 2010;3:2-9.

12. Голобородько ОП, Кизим ОЙ, Клысь ЮГ, Вережка СВ, Зайцева НВ, Кікоть ЮВ, Савченко ТД. Дослідження компонентів протеолітичної, коагуляційної та фібринолітичної систем плазми крові пацієнтів з різною патологією ЛОР-органів. Журнал вушних, носових і горлових хвороб. 2010;5:34-39.

13. Голобородько ОП, Кизим АИ, Клысь ЮГ, Зайцева НВ, Вережка СВ. Оценка риска послеоперационного рецидива и метастазирования по предоперационным показателям системы гемостаза при раке верхних дыхательных путей. Лабораторная диагностика. 2011;1 (55):3-7.

14. Клысь ЮГ, Кизим ОЙ, Голобородько ОП, Зайцева НВ, Кікоть ЮВ, Савченко ТД, Вережка СВ. Скринінг показників гемостатичної системи як

можливих первинних маркерів онкогенезу. Лабораторна діагностика. 2011;2(56):С.20-25.

15. Патент на корисну модель № 61639 Україна, А61К 38/43 (2006.01) А61К 38/55 (2006.01) G01N 33/49 (2006.01). Спосіб прогнозування виникнення рецидиву і метастазів у хворих на рак гортані / Кизим ОЙ, Голобородько ОП, Клись ЮГ, Зайцева НВ, Верьовка СВ. // № U 201015865 заявлено 29.12.2010, опубліковано 25.07.2011. Бюл. № 14.

16. Верьовка СВ, Голобородько ОП, Кизим ОЙ, Клись ЮГ, Зайцева НВ. Показники гемостатичної системи для оцінки перебігу захворювання на рак верхніх дихальних шляхів (Методичні рекомендації) (27.11/183.11), Київ, 2012, 20 с.

17. Зайцева Н, Клись Ю. Протеолитические производные плазминогена в патогенезе онкологических заболеваний. Матеріали всеукраїнської наукової конференції з міжнародною участю “Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології”, м. Дніпропетровськ, 30-31 жовтня 2008. С.62.

18. Клись ЮГ, Куркина ТВ. Молекулярные трансформации плазминоген-стрептокиназного комплекса в плазме крови человека. Матеріали III Міжнародної конференції молодих науковців “Біологія: від молекули до біосфери”, м. Харків, 18-21 листопада 2008. С.116-117.

19. Клись ЮГ, Верьовка СВ. Ензиматично деградовані та функціонально неповноцінні протеїни та їх вплив на перебіг метаболічних процесів. Матеріали X Українського біохімічного з'їзду, 13-17 вересня 2010 р., м. Одеса. Укр. біохім. журн. – 2010. – 82, № 4 (Додаток 2). – С.18.

20. Зайцева НВ, Клись ЮГ. Протеолітично ушкоджені компоненти системи гемостазу як діагностично-прогностичні маркери онкологічного процесу. Матеріали X Ювілейної наукової конференції молодих онкологів за участю міжнародних спеціалістів “Сучасні проблеми експериментальної та клінічної онкології”, м. Київ, 22-24 квітня 2010. С.48-49.

21. Верьовка СВ, Голобородько ОП, Кизим ОЙ, Клись ЮГ, Зайцева НВ. Оцінка ризику післяопераційних ускладнень та рецидиву онкозахворювань

верхніх дихальних шляхів за передопераційними показниками гемостатичної системи. Матеріали щорічної традиційної весняної конференції Українського наукового медичного товариства оториноларингологів “Сучасні методи діагностики і лікування запальних захворювань ЛОР-органів”. Журн. вушних, носових і горлових хвороб. – 2012. - № 3-с. – С.33.

22. Клысь Ю. Протеолітично деградовані протеїнази в формуванні протеолітично-інгібіторного дисбалансу за онкогенезу. Матеріали Другої міжнародної наукової конференції “Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології”, м. Дніпропетровськ, 24-25 вересня 2013. С.69.

23. Клысь ЮГ. Показники гемостатичної системи як критерій прогнозу рецидиву та метастазування у хворих на рак верхніх дихальних шляхів. Матеріали XI Українського біохімічного конгресу, 6-10 жовтня 2014 р., Київ. Укр. біохім. журн. 2014;86(5(Suppl.1)):85.

24. Гринь Н, Клысь Ю, Ворошилова Н. Аналіз складових протеолітичної ланки в плазмі крові хворих на злоякісні новоутворення при носових пазух і порожнини носа. Збірник тез третьої міжнародної наукової конференції “Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології”, м.Дніпропетровськ, 24-25 вересня 2015. С.92-93.

25. Клысь Ю. Особливості показників гемостатичної системи у хворих на запальні захворювання та новоутворення ЛОР-органів. Матеріали XX міжнародного медичного конгресу студентів та молодих вчених м. Тернопіль, 25-27 квітня 2016. С.231.

26. Клысь Ю. Гемостатичні показники за новоутворень верхніх дихальних шляхів. Матеріали четвертої міжнародної наукової конференції “Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології”, м.Дніпро, 5-6 жовтня 2017. С.154-156.

Апробація результатів дисертації. Результати дисертації були представлені на вітчизняних та міжнародних конференціях: Всеукраїнська наукова конференція з міжнародною участю “Актуальні проблеми сучасної

біохімії та клітинної біології”, (Дніпропетровськ. 2008), III Міжнародна конференція молодих науковців “Біологія: від молекули до біосфери” (Харків, 2008), X Український біохімічний з’їзд (Одеса, 2010), X Ювілейна наукова конференція молодих онкологів за участю міжнародних спеціалістів “Сучасні проблеми експериментальної та клінічної онкології” (Київ, 2010), Щорічна традиційна весняна конференція Українського наукового медичного товариства оториноларингологів “Сучасні методи діагностики і лікування запальних захворювань ЛОР-органів” (Київ, 2012), Друга міжнародна наукова конференція “Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології” (Дніпропетровськ, 2013), XI Український біохімічний конгрес (Київ, 2014), Конференція-конкурс молодих учених “Актуальні проблеми біохімії та біотехнології (Київ, 2015), III міжнародна наукова конференція “Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології” (Дніпропетровськ, 2015), XX міжнародний медичний конгрес студентів та молодих вчених (Тернопіль, 2016), IV міжнародна наукова конференція “Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології” (Дніпропетровськ, 2017).