

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

**КАТРИЙ ТЕТЯНА БОГДАНІВНА**

УДК 577.112.7:612.115

**ДИСЕРТАЦІЯ**

**ФУНКЦІОНУВАННЯ СИСТЕМИ ГЕМОСТАЗУ У ПАЦІЄНТІВ З  
ІШЕМІЧНИМ ІНСУЛЬТОМ НА РІЗНИХ СТАДІЯХ ХВОРОБИ**

03.00.04-біохімія

біологічні

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

\_\_\_\_\_ Катрій Т.Б.

Науковий керівник **Савчук Олексій Миколайович** доктор біологічних наук,  
старший науковий співробітник.

Київ – 2017

## АНОТАЦІЯ

Катрій Т.Б. Функціонування системи гемостазу у пацієнтів з ішемічним інсультом на різних стадіях хвороби. - Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04-біохімія. – ННЦ «Інститут біології та медицини», Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, 2017.

Відомо, що сьогодні саме ішемічний інсульт є однією з найбільш поширених патологій. Кількість його випадків становить близько 70 – 80 % від усіх типів інсультів. Серед 6-ти пацієнтів які перенесли інсульт у 2-ох спостерігається повторне загострення хвороби протягом наступних 5 років. Більшість летальних рецидивів трапляється протягом першого року після повторного загострення. Частота рецидивів даного захворювання сягає 30 %, а смертність після них - 60 %.

Оскільки ключовим чинником розвитку даної патології є порушення у системі гемостазу, які часто зберігаються протягом тривалого часу після перенесеного захворювання, то пошук нових та ефективних біомаркерів, які можуть бути застосовані у діагностиці порушень системи гемостазу є головним флагманом для виявлення пацієнтів з високим рівнем ризику судинних захворювань. Вкрай необхідним є не лише вивчення причин і механізмів розвитку ішемічного інсульту, а також поглиблення системи контролю лікування у віддалені терміни після загострення хвороби.

Слід підкреслити, що для судинних захворювань головного мозку, крім стадійності, характерна фазність клінічного перебігу, а саме прогресування симптомів та поступовий їх регрес. Тому важливе значення має вивчення особливостей клінічного перебігу інсульту на різних стадіях хвороби.

Під час виконання дисертаційної роботи вперше було проведено комплексне дослідження функціонування судинно-тромбоцитарної, коагуляційної та фібринолітичної ланок системи гемостазу за різних підтипів

ішемічного інсульту у віддалені терміни після перенесеної гострої фази захворювання, що дозволило поглибити уже існуючі погляди на функціонування системи гемостазу за даної патології і встановити нові додаткові критерії ризику розвитку та діагностики цього патологічного стану. Отримані результати роботи, щодо дії неспецифічних чинників білкової природи на параметри системи гемостазу, висвітлюють потенційні ефекторні властивості протеїнів циркулюючих у кровотоці після загострення ішемічного інсульту, а також відкриває перспективний напрямок майбутніх досліджень, а саме, ідентифікацію в кровотоці білкових молекул, здатних ініціювати біохімічні реакції та процеси, що не характерні для нормального фізіологічного стану організму.

В результаті дослідження було показано збереження підвищеної концентрації ключового маркера гіперкоагуляційного стану – розчинних фібрин мономерних комплексів у плазмі крові пацієнтів, навіть через 1 рік після перенесеного атеротромботичного ішемічного інсульту більш ніж у 8 разів, та більш ніж у 14 разів через 1 рік після кардіоемболічного інсульту. По проходженні 1 року після обох підтипів ішемічного інсульту, було виявлено подовження часу лізису еуглобулінів та Хагеман-залежного фібринолізу. Відповідно до рівня маркеру епітеліальної дисфункції можемо стверджувати, що через 1 рік після ішемічної атаки, лише у 38 % пацієнтів з атеротромботичним інсультом рівень фактору фон Вілебранда перевищував норму на 50 %. Та для 40 % пацієнтів з кардіоемболічним інсультом рівень фактору фон Вілебранда був підвищений у середньому на 75 %. У хворих через 1 рік після гострої фази обох підтипів ішемічного інсульту спостерігався підвищений рівень ТАП і ПАІ-1 в середньому на 30 %. Оскільки, відхилення від норми інших численних показників є доказом збереження тромботичної загрози в організмі, в тому числі по проходженню 1 року після ішемічної атаки, дані показники не є підставою для анулювання підозри рецидиву. А отже, у клінічній практиці, повинні бути доповненими іншими, більш інформативними тестами.

Проведені нами дослідження дозволяють ідентифікувати протеїни, їх фрагменти та комплекси, які були наявні лише у патологічних фракціях досліджуваних маркерів гіперкоагуляції, та які, потенційно, можуть відігравати ключову роль у загостренні ішемічного процесу. А саме білки з молекулярними масами 215 та 118 кДа у фракції РФМК були ідентифіковані лише за наявності досліджуваної патології в організмі, а отже, потенційно, можуть бути причиною рецидиву. Присутність білка з молекулярною масою 75 кДа, з антигенною детермінантою тробіна, у фракції пептидного тулу у плазмі крові пацієнтів які рік назад перенесли КІ, може мати важливе етіологічне значення, яке, на сьогодні, потребує подальшого дослідження.

Дисфункціонування системи гемостазу спричинене внаслідок розвитку ішемічного інсульту може призводити до утворення у кровотоці білкових молекул чи їх фрагментів, які не є нормою для фізіологічного стану організму. Подальша циркуляція таких неспецифічних молекул білкової природи у кровотоці може представляти собою потенційну загрозу запуску неспецифічних механізмів регуляції окремих реакцій в організмі.

У ході досліджень було показано значне підвищення рівня імуноглобулінів класу G плазми крові у гострий період обох досліджуваних підтипів ішемічного інсульту, проте через 1 рік після перенесеного захворювання їх рівень повертається в норму. Доведено, що IgG плазми крові пацієнтів у гострій фазі атеротромботичного або кардіоемболічного ішемічного інсульту здатні пригнічувати гідроліз специфічного хромогенного субстрату головним антикоагулянтним фактором гемостазу - протеїном С, при цьому вони ж мають здатність активувати цю ж властивість пусковим фактором зсідання крові - тромбіном. Показано, що фракція IgG плазми крові пацієнтів в гостру фазу ішемічного інсульту здатна активувати АДФ-залежну агрегацію тромбоцитів здорових донорів в середньому на 15 % для обох досліджуваних підтипів ішемічного інсульту.

Показано, що в гостру фазу ішемічного інсульту концентрація пептидного пулу а організмі була значно підвищеною порівняно з

показником здорових донорів, проте через рік після перенесеного захворювання цей показник повертався у норму. Вперше було показано, що пептидний пул плазми крові як здорових донорів так і пацієнтів з ішемічним інсультом, здатний спричинювати інгібуючу дію на АДФ-залежну агрегацію тромбоцитів здорових донорів в середньому на 25 %. Фракція пептидного пулу пацієнтів з ішемічним інсультом, як в гостру фазу захворювання так і через рік після неї, проявляли максимальні ефекторні властивості по відношенню до фактору X, а саме, активувала процес гідролізу специфічного хромогенного субстрату ферментом на 80 %.

Згідно отриманих результатів, у пацієнтів по проходженні року після загострення ішемічного інсульту спостерігалася чітко виражена тенденція зменшення рівня гіперкоагуляційного стану системи гемостазу порівняно з показниками у гострій фазі, проте загроза тромбозу в організмі залишалася присутньою.

Отримані результати можуть бути використані при розробці алгоритму лабораторної діагностики стану системи гемостазу та перевірки ефективності проведення відповідної терапії хворих з кардіоеMBOLічним або атеротромботичним підтипом ішемічного інсульту.

Ключові слова: атеротромботичний ішемічний інсульт, кардіоеMBOLічний ішемічний інсульт, система гемостазу, гіперкоагуляція, фібриноліз, судинно-тромбоцитарна ланка системи гемостазу, імуноглобуліни класу G, пептидний пул.

## SUMMARY

Katrii T.B. Hemostasis system of the patients with ischemic stroke at the different stages of the disease. - Manuscript.

Dissertation for a candidate of biological sciences degree in specialty 03.00.04-biochemistry. - ESC "Institute of Biology and Medicine", Kyiv National Taras Shevchenko University, Kyiv, 2017.

Ischemic stroke is one of the most preashure pathologie at the current moment. Lethal repetition occur during the first year after acute phase of ischemic stroke. The incidence of repetition of this disease is 30 %, and post stroke mortality is equal to 60 %. The comprehensive study of the hemostasis system of the patients with the different subtypes of ischemic stroke during the acute phase as well as 1 year past acute phase was carried out. The influence of nonspecific protein factors on the key parameters of the hemostasis system was investigated.

The concentration of the SFMC in the plasma of patients past 1 year of acute atherothrombotic ischemic stroke was 8 times higher and for cardioembolic ischemic stroke was 14 times higher than in healthy condition. Past 1 year of both subtypes of ischemic stroke, the extension of the eugrobulins lysis time and the Hageman-dependent fibrinolysis were showed. Elevated levels of tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 as well as von Willebrand factor were observed for the patients who 1 year past suffers stroke. Significantly increased Ig G concentration as well as peptide pool (proteins from blood plasma with MW up to 5 kDa) during the acute phase of stroke was shown. It was shown that IgG as well as protein with MW up to 5 kDa obtained from blood plasma of patients with stroke are able to provide an impact to the hydrolysis of a specific chromogenic substrate by thrombin, protein C and factor Xa. Both are adle to make an impact on the platelets aggregation.

Results obtained could be useful for the development of the for laboratory diagnosis algorithm of state of the hemostasis system to check the effectiveness of the therapy in patients with cardiomyolic or atherothrombotic subtype of ischemic stroke.

Key words: atherothrombotic ischemic stroke, cardioembolic ischemic stroke, hypercoagulation, fibrinolysis, immunoglobulins of class G, peptide pool.

Список публікацій здобувача за темою дисертації:

1. Катрій ТБ, Вовк ТБ, Кравченко НК, Савчук ОМ. Рівень IgG та АДФ-залежна агрегація тромбоцитів за системного червоного вовчака та різних підтипів ішемічного інсульту. Вісник КНУ імені Тараса Шевченка, Серія: Проблеми регуляції фізіологічних функцій. 2015;18:43-45.
2. Katrii TB, Vovk TB, Kravchenko NK, Savchuk OM, Ostapchenko LI. Influence of IgG separated from blood plasma of patients with ischemic stroke on the process platelet's proteins secretion. International Journal of Chemical and Biomolecular Science. 2015;4:278-283.
3. Katrii TB, Kravchenko NK, Vovk TB, Savchuk OM, Ostapchenko LI. The influence of immunoglobulin class G from blood plasma of patients with stroke on the activity of some parameters of haemostasis system. Journal of Blood Coagulation and Fibrinolysis. 2016;27(8):876-881.
4. Katrii TB, Shandyuk VYu, Halenova TI, Shershnov OV, Melnyk VS, Savchuk OM, Ostapchenko LI. The imbalance of the haemostasis cascade in people suffered ischemic stroke. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 2016;7(6):2193-2199.
5. Katrii TB, Savchuk OM. Platelets aggregation under influence of IgG separated from the blood plasma of the patients with ischemic stroke. Вісник КНУ імені Тараса Шевченка, Серія: Проблеми регуляції фізіологічних функцій. 2016;1(20):22-25.
6. Катрій ТБ, Савчук ОМ, Шандюк ВЮ, Мельник ВС. Характеристика фракції протромбінового пулу у пацієнтів які перенесли атеротромботичного та кардіоемболічного ішемічного інсульту. Вісник

КНУ імені Тараса Шевченка, Серія: Проблеми регуляції фізіологічних функцій. 2016;2(21):53-57.

7. Katrii TB, Shandyuk VYu, Raksha NG, Halenova TI, Shershnov OV, Melnyk VS, Savchuk OM. Fibrinolysis parameters in the acute and post ischemic stroke patients. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2017;7(04):96-102.
8. Katrii TB, Shabanova NV, Ostapchuk S, Savchuk OM. The characterization of the Soluble fibrin monomer complexes in patients with acute and one year post acute ischemic stroke. *Bulletin of Kyiv National Taras Shevchenko Series: Problems of regulation of physiological functions*. 2017;1(22):58-61.

## ЗМІСТ

|   |    |
|---|----|
| <b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ СКОРОЧЕНЬ</b> .....  | 12 |
| <b>ВСТУП</b> .....  | 13 |
| <b>РОЗДІЛ 1. Огляд літератури</b> .....   | 21 |
| 1.1. Біохімічні основи функціонування системи гемостазу .....   | 21 |
| 1.2. Молекулярно-біохімічні основи розвитку різних підтипів ішемічного інсульту.....  | 30 |
| 1.3. Роль неспецифічних чинників білкової природи у розвитку гіперкоагуляційного стану організму за патологій серцево-судинної системи..... | 34 |
| <b>РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи</b> .....  | 39 |
| 2.1. Характеристика досліджуваних груп .....  | 39 |
| 2.2. Реагенти та матеріали.....   | 40 |
| 2.3. Обладнання.....  | 40 |
| 2.4. Отримання плазми крові.....  | 41 |
| 2.5. Отримання плазми крові, збагаченої тромбоцитами.....   | 41 |
| 2.6. Отримання чистих тромбоцитів.....  | 42 |
| 2.7. Отримання фракції імуноглобулінів класу G.....   | 42 |
| 2.8. Отримання пептидного пулу плазми крові.....  | 43 |
| 2.9. Визначення часу лізису еуглобулінів плазми крові.....  | 44 |
| 2.10. Визначення часу Хагеман-залежного фібринолізу плазми крові..  | 44 |
| 2.11. Визначення активності плазіногену в плазмі крові.....   | 44 |
| 2.12. Визначення активності $\alpha_2$ -антиплазіну в плазмі крові.....   | 45 |
| 2.13. Визначення вмісту розчинних фібрин-мономерних комплексів в плазмі.....  | 45 |
| 2.14. Визначення вмісту протромбінового пулу в плазмі крові.....  | 46 |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.15. Електрофорез у поліакриламідному гелі за присутності ДСН.....  | 46        |
| 2.16. Вестерн-блотинг.....   | 47        |
| 2.17. Імуноферментний аналіз.....  | 48        |
| 2.18. Визначення концентрації білка за поглинанням в УФ-області спектру.....   | 48        |
| 2.19. Хроматографія, що поділяє за розмірами.....  | 49        |
| 2.20. Дослідження функціонування тромбоцитів.....  | 49        |
| 2.20.1 Агрегація тромбоцитів.....  | 49        |
| 2.20.2 Активація тромбоцитів.....  | 50        |
| 2.21. Дослідження гідролізу хромогенного субстрату ключовими факторами системи гемостазу.....  | 50        |
| 2.21.1 Визначення гідролізу хромогенного субстрату факторами системи гемостазу.....  | 50        |
| 2.21.2 Визначення гідролізу хромогенного субстрату факторами системи гемостазу після активації проферментів у плазмі крові.....                      | 51        |
| 2.22. Статистична обробка результатів досліджень.....  | 51        |
| <b>РОЗДІЛ 3. Результати досліджень та їх обговорення .....</b>   | <b>52</b> |
| 3.1. Характеристика стану системи гемостазу у пацієнтів, через 1 рік після атеротромботичного або кардіоеMBOLічного підтипу ішемічного інсульту..... | 52        |
| 3.2. Якісна оцінка маркерів коагуляційної ланки систем гемостазу пацієнтів через 1 рік після ішемічного інсульту .....                               | 66        |
| 3.3. Вплив неспецифічних чинників на функціонування системи гемостазу за розвитку ішемічного інсульту на різних стадіях хвороби.....                 | 85        |
| 3.3.1. Дослідження ефекторних властивостей IgG акумульованих в організмі за атеротромботичного та  | 85        |

|  |     |
|--|-----|
| кардіємболічного підтипів ішемічного інсульту .....  |     |
| 3.3.2. Визначення ефекторних властивостей пептидного пулу<br>акумульованого в організмі за атеротромботичного та<br>кардіємболічного підтипів ішемічного інсульту..... | 100 |
| <b>РОЗДІЛ 4. ЗАКЛЮЧЕННЯ</b> .....  | 117 |
| <b>ВИСНОВКИ</b> .....  | 123 |
| <b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ</b> .....  | 125 |
| <b>Додаток 1</b> .....   | 150 |

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ СКОРОЧЕНЬ

АП – атеротромботичний ішемічний інсульт

КП – кардіоемболічний ішемічний інсульт

ДВЗ-синдром – синдром дисемінованого внутрішньосудинного згортання  
ПААГ – поліакриламідний гель

ПП – пептидний пул

Пг – плазміноген

РФМК – розчинні фібрин-мономерні комплекси

ТАП – тканинний активатор плазміногену ТІА

– транзиторна ішемічна атака ТЛТ –

тромболітична терапія Ск – стрептокіназа ІХС

– ішемічна хвороба серця

A<sub>2</sub>-АП – α<sub>2</sub>-антиплазмін

ПАІ-1 – інгібітор активатору плазміногену типу -1

ELISA – enzyme linked immunosorbent assay

APC – activated protein C

ТАП – тканинний активатор плазміногену

ТАФІ – thrombin activated fibrinolysis inhibitor

vWF – von Willebrand factor

## ВСТУП

**Актуальність теми.** У світовому масштабі понад 5 мільйонів людей помирають від інсульту щороку [1]. В Україні даний діагноз щорічно ставиться більш ніж 100 тис. пацієнтам [2]. За даними статистики, серед 6-ти пацієнтів, які перенесли інсульт, у 2-ох спостерігається повторне загострення хвороби протягом наступних 5 років. В більшості випадків, летальний рецидив має місце уже через 1 рік після перенесеної гострої фази інсульту [3]. Частота рецидивів даного захворювання сягає 30 %, а смертність після них рівня 60 % [4, 5]. На сьогодні, ішемічний інсульт є найбільш поширеним, оскільки він становить близько 70 – 80 % від всіх інсультів.

Відомо, що оптимальна превентивна стратегія варіює для кожного окремого підтипу даної хвороби, тому визначення конкретної причини загострення ішемічного інсульту має вирішальне значення. Проте, навіть після повного обстеження організму, причина виникнення інсульту у 30 % випадків залишаються невизначеною, що різко збільшує відсоток летальних випадків [6]. Слід підкреслити, що для судинних захворювань головного мозку, крім стадійності, характерна фазність клінічного перебігу, а саме прогресування симптомів та поступовий їх регрес. Тому важливе значення має вивчення особливостей клінічного перебігу мозкового інсульту в різні періоди після його виникнення. Більш того, чимало уваги приділяється специфічним білковим маркерам та предикторам гіперкоагуляції в організмі. При цьому питання ролі неспецифічних чинників, які прямо або опосередковано, можуть відігравати певну роль у дисбалансі тих чи інших ланок системи гемостазу, залишається майже не висвітленим сьогодні.

Оскільки ключовим чинником розвитку даної патології є порушення у системі гемостазу, які часто зберігаються протягом тривалого часу після перенесеного захворювання, то пошук нових та ефективних біомаркерів, які

можуть бути застосовані у діагностиці порушень на рівні коагуляційної, фібринолітичної та судинно-тромбоцитарної ланки системи гемостазу є головним флагманом для виявлення пацієнтів з високим рівнем ризику серцево-судинних захворювань [7, 8]. Крім цього, дисфункціонування ланок системи гемостазу може призводити до утворення у кровотоці великої кількості білкових молекул чи їх фрагментів, які не є нормою для фізіологічного стану організму. Подальша циркуляція таких неспецифічних молекул білкової природи у руслі кровотоку, в тому числі у віддалений час після загострення хвороби, може представляти собою потенційну загрозу запуску неспецифічних механізмів регуляції окремих реакцій, що протікають організмі [9, 10].

На сьогоднішній день, вкрай необхідним є не лише вивчення причин і механізмів розвитку ішемічного інсульту, а також поглиблення та деталізація системи контролю проведеного лікування у віддалені терміни після загострення хвороби. Дослідження потенційної ефекторної здатності неспецифічних білкових молекул, утворених у кровотоці в результаті дисфункції системи гемостазу, є запорукою для зменшення кількості рецидивів та висвітлинні причини повторної атаки інсульту. Деталізація механізмів, які лежать в основі розвитку, як гострого, так і хронічного, ішемічного інсульту, має ключове значення для розробки нових фармакологічних препаратів спрямованої дії, а також відкриває значні перспективи в області клінічної діагностики патологічних проявів порушень системи гемостазу на будь-якій стадії захворювання.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота виконана на кафедрі біохімії ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка у рамках науково-дослідної теми «Механізми реалізації адаптаційно-компенсаторних реакцій організму за умов розвитку різних патологій» (№ д/р 0111U004648, 2011-2015 рр.) та «Механізми регуляції метаболічних

процесів в організмі за умов розвитку патологічних станів» (№ д/р 0116U002527, 2016-2018 рр.)

**Мета і задачі дослідження.** Дослідити потенційний вплив неспецифічних факторів білкової природи, які утворюються в кровотоці за розвитку ішемічного інсульту, на функціонування системи гемостазу.

Для досягнення мети були поставлені наступні завдання:

1. Проаналізувати загальний стан системи гемостазу у пацієнтів, які 1 рік тому перенесли атеротромботичний або кардіоемболічний підтип ішемічного інсульту.
2. Дослідити якісний склад маркерів гіперкоагуляції у пацієнтів з атеротромботичним або кардіоемболічним підтипом ішемічного інсульту.
3. Проаналізувати стан тромбоцитарної функції під впливом неспецифічних чинників білкової природи, утворених в організмі в результаті прогресування ішемічного інсульту.
4. Виявити особливості функціонування ключових факторів системи гемостазу під впливом неспецифічних чинників білкової природи, утворених в результаті прогресування ішемічного інсульту.

*Об'єкт дослідження:* система гемостазу у пацієнтів з атеротромботичним та кардіоемболічним підтипами ішемічного інсульту.

*Предмет дослідження:* неспецифічні фактори білкової природи утворені в кровотоці в результаті патологічної активації системи гемостазу за різних підтипів ішемічного інсульту.

*Методи дослідження:* у роботі були використані методи препаративної хроматографії для очищення білкових препаратів з плазми та сироватки крові людини. Активність окремих компонентів гемостатичного каскаду визначали з використанням специфічних хромогенних субстратів. Аналіз функціонування окремих параметрів системи гемостазу проводили за допомогою хронометричних тестів. Концентрацію окремих білків системи гемостазу визначали методом імуноферментного аналізу на планшетах (ELISA). Якісний склад білкових фракцій плазми крові досліджували

методами електрофорезу у поліакриламідному гелі та вестерн-блотингу з використанням специфічних антитіл. Активацію та агрегацію тромбоцитів аналізували за допомогою агрегометра.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Вперше проведено комплексне дослідження функціонування судинно-тромбоцитарної, коагуляційної та фібринолітичної ланок системи гемостазу за різних підтипів ішемічного інсульту, у віддалені терміни після перенесеної гострої фази захворювання, що дозволило встановити нові додаткові критерії ризику розвитку та моніторингу ефективності терапії цих патологічних станів. Згідно отриманих результатів, у пацієнтів по проходженні року після загострення ішемічного інсульту спостерігалось зменшення рівня гіперкоагуляційного стану системи гемостазу порівняно з показниками у гострій фазі, проте залишалася загроза тромбозу в організмі.

Було показано збереження підвищеної концентрації РФМК, що є ключовим маркером гіперкоагуляційного стану, у плазмі крові пацієнтів, навіть через рік після перенесеного атеротромботичного ішемічного інсульту більш ніж у 8 разів, та більш ніж у 14 разів для пацієнтів через 1 рік після кардіоемболічного інсульту. Концентрація протромбінового пулу у тієї ж групи пацієнтів через 1 рік після гострої фази інсульту повертається до рівня здорових донорів. Стосовно маркера епітеліальної дисфункції vWF встановлено, що лише у 38 % пацієнтів з атеротромботичним інсультом через 1 рік після ішемічної атаки його рівень перевищував норму на 50 %, а у 40 % пацієнтів з кардіоемболічним інсультом цей показник був підвищений у середньому на 75 %.

Аналіз показників фібринолітичної ланки системи гемостазу показав значне пригнічення фібринолітичного потенціалу крові при ішемічному інсульті через рік після гострої фази. Наші результати також показали, що у хворих через 1 рік після гострої фази обох підтипів ішемічного інсульту спостерігався аномальний рівень ТАП і ПАІ-1. Визначено, що обидва хронічні підтипи ішемічного інсульту супроводжуються значним

подовженням часу лізису еуглобулінів та Хагеман-залежного фібринолізу. Зокрема, останній був подовжений в 1,9 рази за атеротромботичного та в 2,3 рази за кардіоеMBOLічного інсульту, у порівнянні з аналогічним показником здорових донорів.

Показано, що IgG за гострої фази обох підтипів інсульту індукували тромботичний ефект, який проявлявся у пришвидшенні процесу гідролізу хромогенного субстрату тромбіном в середньому на 25 %. При цьому, спостерігалось 30 % інгібування гідролізу хромогенного субстрату головним антикоагулянтним фактором системи гемостазу - протеїном С, активованим з його проферменту у плазмі крові, за дії фракції IgG плазми крові пацієнтів з гострим інсультом обох підтипів. Показано, що фракція IgG плазми крові, як в гостру фазу, так і через 1 рік після ішемічного інсульту, здатна активувати агрегацію тромбоцитів здорових донорів.

Вперше було показано, що пептидний пул, утворений в організмі в результаті деградації протеїнів, здатний спричинювати значний інгібуючий вплив на АДФ-залежну агрегацію тромбоцитів здорових донорів. Під час дослідження процесу гідролізу хромогенного субстрату ключовими факторами системи гемостазу було показано, що фракція пептидного пулу пацієнтів з ішемічним інсультом, як в гостру фазу захворювання, так і через 1 рік після неї, проявляли максимальні ефекторні властивості по відношенню до фактору X, та активували процес гідролізу специфічного хромогенного субстрату ферментом на 80 %. Показана активація досліджуваного процесу протеїном С активованим у плазмі крові з проферменту, за дії пулу пептидів, як здорових донорів так і людей з патологією, в середньому на 20 %.

Доведена ефекторна здатність фракцій, як імуноглобулінів класу G так і пептидного пулу, на рівні активації тромбоцитів здорових донорів, а саме, була показана секреція з  $\alpha$ -гранул тромбоцитів фактору фон Віллебранда та інгібітору активатора плазміногену типу-1 за дії усіх досліджуваних фракцій.

**Практичне значення одержаних результатів.** Отримані результати можуть бути використані при розробці алгоритму лабораторної діагностики

стану системи гемостазу та оцінці ефективності проведення відповідної терапії хворих з кардіоемболічним або атеротромботичним підтипом ішемічного інсульту. Численні відмінності між кількісними та якісними характеристиками досліджуваних параметрів для здорових донорів та пацієнтів які 1 рік назад перенесли ішемічну атаку є доведенням відсутності повного оздоровлення організму, а отже і загрози рецидиву через рік після лікування гострої фази ішемічного інсульту, незважаючи на проведене лікування.

Результати проведених досліджень дозволяють стверджувати що такі показники як: концентрація розчинних фібрин мономерних комплексів, кількість тромбоцитів та Хегеман-залежний фібриноліз є найбільш інформативними для діагностики стану гемостазу у пацієнтів з хронічним ішемічним інсультом. Відповідно до рівня ТАП, ПАІ-1 та vWF чітко прослідковується закономірність, за якою, по проходженні року після гострої фази інсульту, для певної групи пацієнтів, досліджувані параметри повертаються у норму, проте, для переважної більшості пацієнтів, їх рівень коливається поза межами норми. Оскільки, відхилення від норми інших численних показників є доказом збереження тромботичної загрози в організмі, в тому числі по проходженню 1 року після ішемічної атаки, даний тест не є підставою для анулювання підозри рецидиву. У клінічній практиці, повинен бути доповнений іншими, більш інформативними тестами.

Різниця у якісному складі компонентів білкового профілю плазми пацієнтів з патологіями є підставою для виявлення нових цільових білків, які є маркерами призначення терапії та профілактики серцево-судинних захворювань у майбутньому.

Доведені ефекторні властивості імуноглобулінів класу G, які здатні провокувати порушення системи гемостазу в напрямку посиленого тромбоутворення, що в свою чергу, слугує доказом накопичення антитіл до власних антигенів організму за ішемічного інсульту. Це відкриває новий

напрямок дослідження складових імунної системи за патологічної активації ланок системи гемостазу, а також рецидиву ішемічного інсульту.

Антитромботичний вплив пептидів з молекулярною масою до 5 кДа може бути використаний для диференційованого підходу корекції досліджуваних патологічних станів організму в залежності від причин їх виникнення та стадії захворювання.

Отримані у дисертаційній роботі дані впроваджено у навчальний процес курсів лекцій «Біохімічні основи гемостазу та діагностика», «Методи практичної біохімії».

**Особистий внесок здобувача.** Здобувачем особисто проаналізовано наукову літературу за темою роботи, самостійно виконано експериментальні дослідження та підготовку матеріалів до публікації. За участі співавторів публікацій проведено інтерпретацію отриманих результатів.

Планування експериментальних робіт, аналіз та обговорення отриманих результатів проведено спільно з науковим керівником д.б.н. Савчуком О.М.

**Апробація результатів дисертації.** Результати дисертації були представлені на вітчизняних та міжнародних конференціях: VII Міжнародна конференція молодих учених «Біологія: від молекули до біосфери» (Харків, 2013), X Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь і поступ в біології» (Львів, 2014), III Міжнародна наукова конференція студентів, аспірантів та молодих учених «Фундаментальні та прикладні дослідження в біології» (Донецьк, 2014), 21th International Student Congress of (bio)Medical Sciences (ISCOMS) (Groningen, Netherlands, 2014), 60th Annual meeting of the Scientific and Standardization Committee (SSC) of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH) (Milwaukee, United States, 2014), XI Український біохімічний конгрес (Київ, 2014), 40th FEBS Congress (Berlin, Germany, 2015), 22th International Student Congress of (bio)Medical Sciences (ISCOMS) (Groningen, Netherlands, 2015), 61th Annual meeting of the Scientific and Standardization Committee (SSC) of the International Society on

Thrombosis and Haemostasis (ISTH) (Toronto, Canada, 2015), XI Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь і поступ в біології» (Львів, 2015), European Hematology Association (EHA) Scientific Conference on Bleeding Disorders (Barcelona, Spain, 2016), 4th International Conference on Radiation and Applications in Various Fields of Research (RAD) (Nis, Serbia, 2016), XII Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів “Молодь і поступ біології”(Львів, 2016), XIV International Scientific Conference of Students, PhD Students & Young Scientists Shevchenkivska vesna (Kyiv, 2016), Міжнародна наукова конференція “Актуальні проблеми сучасної біохімії” присвячена 100-річчю від дня народження професора Бориса Федоровича Сухомлинова (Львів, 2016), International conference Thombosis and Embolism (Stockholm, Sweden, 2016), 2nd Prague European Days of Internal Medicine (Praque, Czech Republic, 2016), XXXth International Symposium on Technical Innovations in Laboratory Hematology (Honolulu, Hawaii, 2017), Annual meeting of the Scientific and Standardization Committee (SSC) of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH) (Berlin, Germany, 2017), 22nd Congress of the European Hematology Association (Madrid, Spain, 2017), 42th FEBS Congress (Jerusalem, Israel, 2017), 7th International Symposium on Women’s Health Issues in Thrombosis and Haemostasis (Barcelona, Spain, 2017).

**Публікації.** За темою дисертації опубліковано 26 наукових праць, у тому числі 8 статей у фахових вітчизняних та міжнародних періодичних виданнях, з яких 3 публікації у виданнях, включених до міжнародних наукометричних баз та 18 тез доповідей у матеріалах наукових конференцій та з’їздів.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертаційна робота складається з вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів власних досліджень та їх обговорення, заключення, висновків та списку літературних джерел (245 найменування). Робота викладена на 150 сторінках, проілюстрована 29 рисунками та 19 таблицями.

# РОЗДІЛ 1

## ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1. Біохімічні основи функціонування системи гемостазу

Гемостаз – це фізіологічний процес організму, функція якого виражається у зупинці кровотечі при пошкодженні стінки судини, а також збереженні рідкого стану крові [11]. Також, термін «гемостаз» застосовують у патології для позначення припинення руху крові по кровоносній судині – тромбозу [12]. Система гемостазу не обмежується наступним, проте, складається із двох антинаправлених систем:

- системи зсідання крові (коагуляційної системи);
- антикоагуляційної системи.

Функціонування даних систем здійснюються завдяки взаємодії стінок кровоносних судин, формених елементів крові (еритроцитів, тромбоцитів, лейкоцитів), факторів, які містяться у плазмі крові (гуморальні фактори) та факторів, що містяться у формених елементах (клітинні фактори).

Система зсідання крові являє собою каскад біохімічних реакцій, спрямованих на утворення фібринового згустку з його неактивного попередника фібриногену під дією ферменту тромбіну [13].

Розрізняють два основних механізми зупинки кровотечі при пошкодженні судин, які можуть функціонувати одночасно, з переважанням одного з механізмів, які і активуються в залежності від розмірів пошкодженої судини і ролі окремих факторів: судинно-тромбоцитарний та коагуляційний. У судинно-тромбоцитарному механізмі головна роль належить судинній стінці та тромбоцитам, в коагуляційному - системі зсідання крові [14, 15].

Так, при зупинці кровотеч із мілких судин, таких як венули, артеріоли, капіляри, задіяний мікроциркулярний механізм, що починається короточасним спазмом судин внаслідок впливу ЦНС, а також рефлекторного викиду в кровоток адреналіну та інших вазоконстрикторів, що викликає часткову зупинку кровотечі. Наступним етапом є адгезія тромбоцитів до раневої поверхні. При цьому основні структури, з якими взаємодіють тромбоцити – це колагенові волокна, мікрофібрили та базальна мембрана. Прилипання тромбоцитів до раневої поверхні вважається початком формування гемостатичного тромбоцитарного тромбу. Після цього слідує акумуляція, активація та агрегація тромбоцитів у місці ушкодження [16].

Із ушкоджених епітеліальних клітин, а також із еритроцитів та тромбоцитів виділяється АТФ, яка під впливом клітинної АТФази розщеплюється до АДФ. АДФ сприяє оберненій агрегації тромбоцитів. Для цього процесу також необхідна достатня кількість факторів IV, плазменного кофактору - фактор фон Віллебранда [17], факторів XIII та I [18]. В'язкий метаморфоз тромбоцитів під впливом тромбіну супроводжується звільненням з тромбоцитів факторів зсідання крові, серотоніну, гістаміну, адреналіну, кінінів, нуклеотидів, ензимів і агрегація тромбоцитів стає необерненою. Вплив виділених речовин супроводжується у вторинному звуженні ушкодженої судини. Паралельно з цим відбувається реакція фібриноутворення. Фібринові волокна і наступна ретракція кров'яного згустку ущільнюють гемостатичний тромбоцитарний тромб, що веде до кінцевої зупинки кровотечі.

На відміну від судинно-тромбоцитарного, коагуляційний механізм має місце при травмах великих артерій та вен і запускається після обмеження крововтрати завдяки спазму м'язів судин. Здійснюється він у три фази:

- формування ферментного комплексу протромбінази,
- активація протромбіну з утворенням тромбіну;
- перетворення фібриногену на фібрин та формування тромбу [19].

Коагуляційний механізм зсідання крові – це комплекс реакцій, у яких зимоген протеази активується, залучаючи глікопротеїновий кофактор, стає спроможним каталізувати наступну реакцію каскаду.

У процесі утворення тромбіну із протромбіну безпосередньо бере участь фактор X (фактор Прауера-Стюарта) – серинова протеаза, що може бути активована двома шляхами: зовнішнім та внутрішнім [20]. Внутрішній шлях залучає виключно компоненти із крові і призводить до формування кров'яної протромбінази. Даний механізм потребує наявності негативно зарядженої поверхні (колаген), здійснюється повільно (1 - 10 хв) і потребує факторів VIII, IX, XI (фактор Розенталя, або плазменний попередник тромбопластину), XII, прекалікреїну, високомолекулярного кініногену).

Зовнішній шлях має як мінімум один компонент тканинного походження і спричиняє формування тканинної протромбінази [21]. Його особливістю є те, що він потребує залучення тканинного тромбопластину – компоненту ушкоджених тканин, необхідного для активації фактору VII [22].

Внутрішній шлях залучає судинний колаген. Початковою реакцією є перетворення неактивного фактора XII на активний XIIa, де стимулятором виступають оголені колагенові волокна. Далі фактор XIIa перетворює фактор XI (плазменний попередник тромбопластину) на фактор XIa. XIa активує IX (антигемофільний фактор Крістмаса), а IXa зі своїм кофактором VIIIa (антигемофільний глобулін A) формують теназний комплекс. Теназний комплекс активує фактор X (фактор Стюарта-Прауера) з утворенням FXa [23]. Фактор Xa з його кофактором Va активують фактор II (протромбін) до FIIa (тромбін). Таким чином продукується основна частина пулу тромбіну. Було виявлено, що пацієнти зі спадковим дефектом фактору XII мають незначні відхилення у зсіданні крові, що вказує на мінорну роль внутрішнього шляху у системі гемостазу [24].

Основна роль зовнішнього шляху полягає у швидкій, майже миттєвій генерації активного тромбіну [25]. Проходження шляху потребує контакту із тканинними факторами, що потрапляють у кровообіг при травмуванні

судинної стінки. Відбувається вивільненням тканинного тромбoplastину (TF, фактор III) із ушкоджених тканин, що активує фактор VII (проконвертин) до VIIa [26]. Тканинний тромбoplastин і фактор VIIa формують активний комплекс (TF-FVIIa), який активує фактор X через попередню активацію FIX (фактор Крістмаса). Ця активація фактору X може швидко пригнічуватися інгібітором зовнішнього шляху (TFPI - tissue factor pathway inhibitor).

Фактор Xa та його кофактор Va (акцелерин) формують комплекс тканинної протромбінази. Комплекс тканинної протромбінази надалі активує фактор II (протромбін) до FIIa (тромбін). Таким чином формуються невеликі кількості IXa, Xa і тромбіну. Утворений тромбін використовується для активації інших коагуляційних факторів, що результується у потужній наростаючій генерації тромбіну [27].

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).

При цьому фактор XIa активує фактор IX (антигемофільний глобулін B, фактор Крістмаса), а той в свою чергу з кофактором FVIIIa формують теназний комплекс, що активує фактор X. Фактор Xa із фактором Va (протромбіназний комплекс) активують FII (протромбін) до FIIa (тромбін). Завдяки цьому генеруються великі кількості тромбіну. В подальшому тромбін спричиняє перетворення фібриногену на фібрин-мономер.

Основна біологічна функція фібриногену є його властивість під дією тромбіну переходити в активну форму - мономерний фібрин. Подальша полімеризація та утворення трьохмірної сітки, яка є основою згустку, зумовлена особливостями структури цього білка [28]. Ферментативне розщеплення фібринового згустку призводить до накопичення в плазмі розчинних фрагментів, які виступають маркерами порушення системи гемостазу. Підвищений рівень цих продуктів супроводжує тромбоз глибоких

вен, синдром дисемінованого внутрішньосудинного згортання крові, травми, хірургічні втручання, інфекції, розвиток пухлин, серповидно-клітинну анемію [29].

Фібриноген – білок, молекулярна вага якого становить 340 кДа, складається з двох однакових симетричних субодиниць, а кожна субодиниця - з трьох ланцюгів:  $A\alpha$ ,  $B\beta$ ,  $\gamma$ . Між ланцюжками розташовані дисульфідні зв'язки. Молекула фібриногену має три основні домени: E з вагою 60000 Да, два D - 95000 Да кожен, та  $\square C$  домени, які відіграють певну структурну та функціональну роль.

Процес полімеризації фібрину можна розділити на три етапи. На першому етапі відбувається активація фібриногену. На другому етапі молекули фібрин-мономеру з'єднуються у протофібрили. На третьому етапі протофібрили сполучаються. Запускається процес внаслідок відщеплення фібринопептидів тромбіном. Після утворення структура згустку фіксується фактором XIIIa [30].

Стабілізація фібрину це специфічний процес, який залежить від створеного структурою білка розташування, центрів полімеризації, а також від надмолекулярних структур. Крім того, цей процес є  $Ca^{2+}$ -залежним.

Активація системи зсідання крові, що відбувається при багатьох патологіях, призводить до появи в кровообігу фібрин-мономеру. Такий циркулюючий фібрин отримав назву розчинного фібрину. Утворення розчинного фібрину розглядається як проміжний етап в коагуляції, тобто його можна визначати і як маркер судинного зсідання крові [31].

Після утворення фібринового згустка починається післяфаза зсідання крові, яка включає ретракцію та фібриноліз.

Ретракція відбувається протягом 2-3 годин і забезпечує ущільнення і закріплення тромбу в пошкодженій судині. Вона здійснюється лише при достатній кількості тромбоцитів за рахунок їх скорочувального білка тромбостеніну за участю енергії АТФ.

Фібриноліз же являє собою гідролітичне розщеплення фібрину під дією плазміну, який утворюється із неактивного попередника плазми крові плазміногену (Пг) [32]. Даний процес відбувається у 3 фази:

1) повільне вивільнення тканинного активатора Пг із ушкодженого ендотелію кровоносних судин. Тканинних активаторів особливо багато у легнях і матці. Тому при операціях на цих органах через потрапляння значних кількостей активатора з тканин у кров може виникнути гострий фібриноліз.

Іншими активаторами фібринолізу є кров'яні активатори плазміногену – урокіназа та бактеріальний фермент стрептокіназа. Тканевий активатор плазміногену і урокіназа можуть бути заінгібовані інгібіторами активаторів плазміногену.

2) перетворення Пг на плазмін під впливом кров'яного або тканинного активатора плазміногену;

3) плазмін розщеплює фібрин до пептидів і амінокислот.

$\alpha$ -антиплазмін і  $\alpha$ -2-макроглобулін інактивують плазмін. Також активність плазміну знижується за дії інгібітору тромбін-активованого фібринолізу (ТАФІ - thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor), який модифікує фібрин і робить його резистентним до дії плазміну.

Гідроліз фібрину/фібриногену (нестабілізованого фактором XIIIa) призводить до відщеплення С-домена з утворенням фрагменту X (240 кДа). Внаслідок подальшої деградації X-фрагменту утворюється фрагмент Д (95 кДа) та У-фрагмент (150 кДа), який в свою чергу розщеплюється на Д-фрагмент та Е-фрагмент (50 кДа).

При певних умовах у крові фібриноген розщеплюється на фрагменти під дією плазміну. При відщепленні довгих С-кінцевих ділянок ланцюжків утворюється Х-фрагмент. Потім від Х-фрагмента відщеплюється один Д-фрагмент, таким чином утворюється У-фрагмент, який розщеплюється на Д- та Е-фрагменти [3333, 34].

Рівень продуктів деградації фібриногену/фібрину під час терапії тромболітиками може свідчити про стан патологічного процесу та ефективність лікування. Тому розробка нових підходів до виявлення продуктів розщеплення фібриногену/фібрину у плазмі крові людини має велике значення для лабораторної клінічної діагностики. При патологічній надмірній активації фібринолізу у крові з'являються продукти розщеплення фібриногену: X, Y, D, E-фрагменти, які самі по собі можуть ускладнити патологічний процес.

Наприклад, суттєвою особливістю фрагменту D є сильна інгібуюча дія на полімеризацію фібрину, яка виражається в затримці його згортання, а ранній тромбін і бере участь у побудові полімеру [35, 36]. Особливо важливим при порушенні гемостатичного балансу є виявлення фрагментів D та DD, які вважаються молекулярними маркерами патологій системи гемостазу. За показником рівня продуктів розщеплення фібриногену/фібрину захворювання можна поділити на кілька груп. До перших ми відносимо захворювання, де домінує первинний фібриноліз, за якого в плазмі виявляється підвищений рівень D-фрагменту (захворювання печінки, цироз). Існують захворювання, в яких переважає вторинний фібриноліз, тоді у плазмі переважно знаходиться DD-фрагмент. Відомі патології, за яких вторинний та первинний фібриноліз збалансовані, тобто у кровотоці присутні, як D фрагмент, так і D-димер. До цієї групи відноситься, зокрема, ускладнення вагітності. У цьому разі D та DD-фрагменти набувають важливого діагностичного значення.

На противагу системі зсідання крові функціонує антикоагуляційна система. Антикоагуляційні процеси спрямовані на підтримання крові у рідкому стані та сприяють формуванню тромбу тільки у ділянці ушкодження судин. За класифікацією виділяють два типи антикоагулянтів:

I – первинні (антитромбін III, гепарин, протейн C)

II – вторинні (утворюються у процесі зсідання крові і фібринолізу).

Це так звані «відпрацьовані» фактори зсідання. До факторів даного типу відносять антитромбін I – фібрин, який, утворившись, абсорбує та інактивує до 90% тромбіну. Продукти фібринолізу, взаємодіючи з фібриногеном та фібрин-мономером, гальмують кінцевий етап зсідання, порушують агрегацію тромбоцитів.

При недостатності антикоагуляційної системи застосовують і штучні антикоагулянти, наприклад, антагоністи вітаміна К (наприклад, дикумарин, неодикумарин) [37].

Як було зазначено вище, протеїн С належить до первинних антикоагулянтів і є вітамін К-залежною сериною протеазою, що синтезується печінкою. Він активується тромбіном, перетворюючись на активований протеїн С (APC - activated protein C). APC у комплексі із протеїном S і фосфоліпідами як кофакторами сприяє деградації FVa і FVIIIa. Вважається, що дефіцит протеїну С і протеїну S може спричинити формування тромбів.

Іншим, широко відомим, первинним антикоагулянтом є гепарин. Це потужний антикоагулянт, який гальмує усі фази зсідання крові, знижує активність багатьох плазмених факторів і активує неферментативний фібриноліз. Його концентрація в крові є звичайно невисокою; сам по собі є малоактивним; але у комбінації з антитромбіном III активність зростає у 100 - 1000 разів. Гепарин продукується й секретується базофілами і тучними клітинами сполучної тканини, а розщеплюється гепариназою печінки. Його фізіологічна концентрація у нормі складає 40-138 мг/л.

Підвищення зсідання крові має назву гіперкоагуляція і проявляється тромбозами. Зниження його – гіпокоагуляція, проявляється геморрагіями. Так, наприклад, явище гіперкоагуляції спостерігається при стресових ситуаціях внаслідок вивільнення катехоламінів, які сприяють звільненню із стінок судин факторів активації протромбінази.

При надходженні у кровоток тромбопластичних речовин внаслідок ушкодження цілісності тканин (при відшаруванні плаценти, емболії

амніотичної рідини, викиднях, гемотрансфузіях) розвивається дисеміноване внутрішньосудинне зсідання (ДВЗ-синдром) надмірне посилення внутрішньосудинного зсідання крові, що відноситься до набутих коагулопатій [38]. В кров'яне русло потрапляють активатори зсідання крові й агрегації тромбоцитів. Вони сприяють утворенню тромбіну і внутрішньосудинній коагуляції (утворюються згустки фібрину, що закупорюють дрібні судини).

Серед наслідків даного синдрому – розвиток ацидозу, дистрофії та дисфункції органів, інтоксикація продуктами розщеплення білків та ін сполук. Коагуляція за ДВЗ-синдрому відбувається за зовнішнім механізмом внаслідок дії тканевого тромбoplastину. Недуга розвивається при інфекційних процесах (під впливом ендотоксинів грампозитивних бактерій, вірусів), шоку, тяжких травмах, акушерській патології, деструкції тканин.

Гіпокоагуляція найчастіше пов'язана із генетичним порушенням синтезу факторів зсідання крові (гемофілії).

При нестачі вітаміну К в організмі утворюються дефектні молекули факторів II, VII, IX, X, що сповільнює зсідання крові, виникають кровотечі [39].

Також причиною дисбалансу гемостазу може слугувати ураження паренхіми печінки – місця синтезу багатьох факторів, при гепатитах, цирозі, гострій дистрофії, що порушує синтез відповідних факторів.

Тому спостереження за станом системи гемостазу та білковим профілем кровотоку є запорукою вчасного попередження захворювання чи його рецидиву.

## 1.2. Молекулярно-біохімічні основи розвитку різних підтипів ішемічного інсульту

Ішемічний інсульт - це порушення мозкового кровообігу гострого типу, яке виникає при недостатньому або повному припиненні кровопостачання певної ділянки мозку. При цьому в більшості випадків спостерігається пошкодження як функцій так і тканини мозку. Часто причиною може слугувати транзиторна ішемічна атака (ТІА) Один з найбільш важливих механізмів патогенезу полягає в звуженні просвіту інтракраніальних судин або магістральних артерій в результаті атеросклерозу, внаслідок відкладення в судинах ліпідних комплексів та ураження ендотелію, що призводить до формування атеросклерозної бляшки. Поступово утворена бляшка збільшується у розмірах за рахунок осідання на ній формених елементів крові. При цьому утворена емболічна оклюзія може бути як артеріального так і кардіологічного походження [34].

Більш ніж 5 мільйонів людей помирають від інсульту щороку [30]. Проте більша кількість людей переносять інсультну атаку та виживають. Серед 6-ти пацієнтів які перенесли інсульт у 2-ох спостерігається повторне загострення хвороби протягом наступних 5 років. В більшості випадків летальний рецидив має місце уже через рік після перенесеної гострої фази інсульту [31]. Таким чином частота рецидивів даного захворювання сягає 30 %, а смертність після них - 60 % серед усіх випадків [32, 33]. На сьогодні ішемічний інсульт є найбільш поширеним, оскільки він становить близько 70 – 80 % від всіх інсультів.

Відомо, що оптимальна превентивна стратегія варіює для кожного окремого підтипу хвороби. Тому визначення конкретної причини загострення ішемічного інсульту має вирішальне значення Проте навіть після повної діагностики організму причина виникнення інсульту у 30 % випадків залишаються невизначеною, що різко збільшує відсоток летальних випадків серед рецидивів [35].

Клінічний перебіг ішемічного інсульту здебільшого визначається трьома чинниками: калібром ураженої артерії, локалізацією та розмірами осередку інфаркту, також патогенетичним механізмом розвитку захворювання. Гострий розвиток захворювання характерний як для кардіоемболічного інсульту так і для атеротромботичного, зумовленого судинною мозковою недостатністю. Для обох підтипів інсульту характерне поступове посилення симптомів або їх миготіння протягом кількох годин або діб. Осередкова симптоматика у таких випадках переважає над загальноомозковою.

Питання стадійності розвитку судинних захворювань головного мозку завжди було в центрі уваги клініцистів. У 1969 р. експерти ВООЗ на Міжнародній нараді за участю у Монако, визначили поняття «гострий» та «хронічний» періоди інсульту (Marguardsen, 1969). У прийнятих документах була схвалена пропозиція, згідно з якою гострий період охоплює 21-шу добу з початку розвитку інсульту. А після 3-го тижня починається хронічна стадія захворювання тривалістю до року. Пізніше, в 1970 р., експерти ВООЗ рекомендували вважати гострою стадією перші 48 год після початку виникнення інсульту. Насправді, як показує клінічна практика, у більшості хворих особливо важкий стан спостерігається в перші 2—3 доби, потім процес стабілізується. Деякі автори виділяють так званий найгостріший період, а саме перші години розвитку інсульту. Інші автори стверджують існування також підгострої стадії. Це період, відсутності безпосередньої загрози для життя пацієнта, який переніс інсульт. Передусім слід зазначити, що й дотепер у наукових публікаціях гострим періодом інсульту вважають 21-шу добу після його розвитку.

Разом з тим зазначаємо, що виділення стадій захворювання є умовним, оскільки час, протягом якого спостерігається прогресування симптомів з їх наступним поступовий регресом є надзвичайно мінливим.

Згідно з Міжнародною класифікацією хвороб, також виділяють період віддалених наслідків після перенесеного інсульту, період так званих

залишкових явищ. Він починається через рік після розвитку інсульту; при цьому, через 2 роки визначають період стійких залишкових явищ.

Відомо, що для судинних захворювань головного мозку крім стабільності характерна фазність клінічного перебігу, а саме прогресування симптомів та поступовий їх регрес. Тому важливе значення має вивчення особливостей клінічного перебігу мозкового інсульту в різні періоди після його виникнення.

Тим не менш, за останні кілька десятиріччя, ряд антиагрегантних агентів, їх комбінацій та інших тромболітичних терапій (ТЛТ) були розроблені та досліджені з метою поліпшення ефективності та безпеки лікування, а також вторинної профілактики інсульту. Деякі з них і досі залишається надійними препаратами, які найчастіше призначається при виявленні симптомів даного захворювання [41].

Ймовірність розвитку інсульту зменшується на 11 % у пацієнтів з гострим інсультом та на 22 % у пацієнтів з попереднім інсультом за умови застосування антитромбоцитарної, антикоагулянтної, а також ТЛТ [40].

Аспірин є одним із добре відомих та надійних засобів боротьби з інсультом. Застосування препарату у дозі до 300 мг на день протягом перших двох діб після проявів загострення хвороби зменшує ймовірність рецидиву інсульту на 25 %, незалежно від віку чи статі пацієнтів [42-45]. Але при цьому було показано, що використання аспірину супроводжувалося зростанням крововиливів у черепну порожнину на 50 % у середньому [42].

Клінічні випробування парентеральних антикоагулянтів, а саме нефракціонованого гепарину або низькомолекулярного гепарину в порівнянні з ефектом аспірину показали незначну різницю у рецидиві інсульту [43, 45 - 48].

Таким чином ряд авторів вважають, що саме аспірин повинен бути введений пацієнтам з підозрою на гострий ішемічний інсульту, у дозі до 300 мг на добу. При цьому, після 10-14 днів лікування дозу аспірину необхідно зменшувати до 50-150 мг на добу. Як правило, пацієнтам, які проходили

ТЛТ, не рекомендується додавати аспірин протягом 24-48 годин до загальної схеми лікування [49, 50].

Ацетилсаліцилова кислота також є відомим ефектором гемостазу, яка входить до складу великої кількості медикаментів, дія якої полягає у ацетилюванні циклооксигенази-1 тромбоцитів, що, в свою чергу, інгібує синтез тромбоксану А2, який виступає агоністом тромбоцитарної функції [51, 52]. Важливо підкреслити, що ацетилювання циклооксигенази-1 за участі ацетилсаліцилової кислоти є незворотним процесом, який пострійно протікає у клітині протягом усього часу її існування [53 - 57]. Блокування активності тромбоцитів ацетилсаліциловою кислотою є успішним лише за умови інгібування синтезу тромбоксану А2 щонайменше на 95% [58, 59]. При цьому навіть дуже мала залишкова кількість циклооксигенази-1 здатна генерувати достатню кількість тромбоксану, а отже і підтримувати тромбоксан-індуковану функцію тромбоцитів [60 - 65].

Дослідження взаємозв'язку між лікувальною терапією та кожним окремим підтипом ішемічного інсульту показав відсутність ефективності застосування ацетилсаліцилової кислоти у вторинній антитромбоцитарній профілактиці за кардіоемболічного ішемічного інсульту [66]. Застосування ацетилсаліцилової кислоти у поєднанні з клопідогрелем, порівняно з варфарином, у пацієнтів з кардіоемболічним підтипом ішемічного інсульту також показує низьку ефективність і не сприяє зниженню ризику кровотеч [67]. Тому застосування варфарину у якості ефектора антикоагулянтної терапії рекомендується у випадку всіх емболій серцевого походження. Важливо підкреслити, що пацієнтам з миготливою аритмією старше 65 років, не рекомендується проведення антитромбоцитарної терапії, оскільки в цьому випадку користь від антикоагулянтної терапії перевищує ризик кровотечі [68].

Для атеротромботичного підтипу ішемічного інсульту, для більшості випадків, антиагрегантна терапія показана в якості вторинної профілактики. Ацетилсаліцилову кислоту застосовують в комбінації з дипіридамолом або

клопідогрелем, а також монотерапія аспірином може бути пріоритетною. Ефективність ацетилсаліцилової кислоти, у цьому випадку, навіть у високих дозах, доведена не була [69], але встановлено, що довгострокове застосування ацетилсаліцилової кислоти сумісно із клопідогрелем викликає незначне зниження ризику ішемічного інсульту, при цьому значно збільшується частоти кровотеч та смертність [70].

Наведений вище аналіз літературних даних свідчить про невирішеність проблем, пов'язаних з особливостями функціонування усіх ланок системи гемостазу у пацієнтів з різними підтипами ішемічного інсульту. Пошук специфічних маркерів розвитку порушення протікання нормального гемостатичного каскаду та розшифрування механізмів, що ведуть до цих змін є досить нагальною проблемою сучасної біохімії гемостазу.

### **1.3 . Роль неспецифічних факторів білкової природи у розвитку гіперкоагуляційного стану організму за патологій серцево-судинної системи**

З огляду на різницю етіології кожного окремого з підтипів інсульту, існує ймовірність того, що розвиток або рецидив конкретної патології може бути пов'язаний з білковим профілем плазми крові пацієнтів. На сьогодні ще не ідентифіковано біохімічні маркери, які можуть охарактеризувати етіологію ішемічного інсульту, хоча існує чимало досліджень спрямованих на ідентифікацію білкових маркерів стану системи гемостазу за різних підтипів даної патології [71-73]. Нещодавно для декількох біомаркерів організму було встановлено кореляцію з серцево-судинними порушеннями [74].

Одним із маркерів розвитку запального процесу та серцево-судинних захворювань вважають фібриноген, підвищення рівня якого сприяє прогресуванню гіпертонічної хвороби [75]. Показано, що для людей з

підвищеним його рівнем ризик розвитку серцево-судинних захворювань збільшений більш ніж у 2 рази [76]. Також підвищення концентрації фібриногену є фактором активації ендотеліальних клітин [77, 78]. Останні роботи показали, що підвищений рівень фібриногену сприяє вазорелаксації, що може бути наслідком синтезу вазоактивних медіаторів в результаті зв'язування фібриногену інтегринами судинної стінки [79]. Встановлено, що продукти розпаду фібриногену є модуляторами запалення та ранніми маркерами гіперкоагулянтного стану. Ряд досліджень свідчить про виявлення прозапального ефекту фібринопептидів А, В, а також D-димерів, утворених під дією плазміну [80, 81]. Відомо, що ранній продукт деградації фібриногену – X-фрагмент здатен утворювати нестійкий зв'язок з тромбоцитами та незначною мірою стимулювати агрегацію тромбоцитів. Є дані про те, що D-фрагмент та E-фрагмент впливають на ефективність фібриноген-залежної агрегації тромбоцитів [82]. Крім того висока концентрація D-димеру є незалежним предиктором кардіоеMBOLічного підтипу ішемічного інсульту [83]. До інших маркерів гіперкоагуляції, виявлених у пацієнтів з миготливою аритмією, можна віднести підвищений вміст F1+2 фрагментів протромбіну [84, 85], фібриногену, фактору фон Віллебранда, розчинного P-селектину, PAI-1 [86, 87].

Бачимо, що існує чимала кількість протеїнів, які відіграють роль маркерів розвитку гіперкоагуляційного стану організму за патологій серцево-судинної системи. Проте не є вірним виключення потенційного впливу неспецифічних чинників білкової природи і не лише у гострий період захворювання.

Сьогодні широко поширений та доведений факт, що розвиток ішемічного інсульту спричинює або є результатом суттєвих змін у функціонування гемостатичного каскаду. Таке дисфункціонування ланок системи гемостазу може призводити до утворення у кровотоці великої кількості молекул, білків чи їх фрагментів, які не є нормою для фізіологічного стану організму. Подальша циркуляція таких утворень у руслі

кровотоку може спровокувати їх репрезентацію у якості антигенних детермінант на поверхні макрофагів, в результаті чого, може мати місце генерація антитіл до білків чи їх фрагментів, фактично, власного організму. Акумуляовані аутоантитіла, потенційно, можуть проявляти ефекторні властивості по відношенню до окремих компонентів системи гемостазу, тромбоцитарним чи ендотеліальним рецепторам, інше. Постійна присутність таких молекул у кровотоці, навіть через певний час після перенесеної хвороби може представляти собою потенційну загрозу запуску неспецифічних механізмів регуляції окремих гемостатичних реакцій.

Сьогодні у багатьох дослідженнях саме антитіла розглядаються як фактори ризику серцево-судинних захворювань [88]. Часто у літературі можна зустріти докази теорії про підвищений ризик тромбозів та інсультів за присутності у периферичній крові антифосфоліпідних антитіл класу G [89]. Більш того, дослідники вважають, що для таких антитіл мішенню є саме фосфоліпідзв'язуючі білки, а не самі фосфоліпіди. У хворих із циркулюючими у кровотоці антитілами до кардіоліпіну та бета-2-глікопротеїну-1 частіше діагностували інсульти, інфаркти, а також тромбози артерій кінцівок. Взаємодія антитіл із бета-2-глікопротеїном-1 відбувається на мембранах клітин судинної стінки та викликає ураження ендотелію, що спричиняє дисфункцію останнього, а також серцево-судинні порушення [90]. Також показано, що дана група антитіл може взаємодіяти з попередником тромбіну. Відтак, антитіла до протромбіну здатні впливати на результати хронометричних тестів *in vitro*, виступаючи компонентом системи патологічних інгібіторів процесу зсідання. Крім цього, численні дослідники розглядають антифосфоліпідні антитіла як незалежний фактор ризику серцево-судинних ускладнень [91-93].

Велика кількість захворювань супроводжуються патологічною активацією імунної системи [94]. За системного склерозу, ревматоїдного артрити, діабету, системного червоного вовчаку, тиреоїдиту та інші хвороб спостерігається акумулювання ауто антитіл в організмі [95, 96]. Такі

аутоантитіла можуть відігравати роль як предикторів хвороби, швидкості її прогресування, а, можливо, і маркеру ризику рецидиву. Отже можна стверджувати, що присутність та рівень ауто антитіл у кровоторці несуть важливу діагностичну та прогностичну цінність. Проте їх патогенетична роль залишається дискусійним питанням [97]. Накопичення таких антитіл до антигенів власного організму, потенційно, може провокувати порушення системи гемостазу, а саме гіперкоагуляційний стан організму за патологій серцево-судинної системи.

Іншим потенційним чинником підвищеного тромбоутворення в організмі можуть бути пептиди з молекулярною масою до 5 кДа, які є продуктами розпаду білків організму, та які здатні діяти як вторинні ендотоксини, викликаючи порушення нормальних фізіологічних процесів. Підвищення рівня таких пептидів у плазмі крові обумовлено порушенням їх виведення з організму, або посиленням утворення в тканинах. При цьому, концентрація таких пептидів корелює з тяжкістю стану пацієнтів і може використовуватися як простий та швидкий показник ступеня токсикозу. Рівень пептидного пулу підвищується за широкого спектру патологічних станів, таких як цукровий діабет обох типів, опіки, гострий панкреатит та інші [97 - 99]. Проте, сьогодні не існує чіткої відповіді на питання стосовно складу, властивостей та функції пептидного пулу в організмі. Чимало досліджень було проведено у цій сфері і єдине загальне заключення є свідченням того факту, що пептидний пул організму це не просто набір напівдегратованих білків які ще не елімінувалися [100, 101] або результат процесингу функціональних протеїнів організму [107 - 109], а пул об'єднаний спільними біологічними характеристиками який здатний впливати на гомеостаз організму, регуляцію проліферації клітин, їх диференціація і навіть смерть [102, 103]. Пептидний пул відіграє не другорядну роль у великій кількості біологічних процесів організму на рівні нервової, ендокринної, імунної, та інших систем [104 - 107]. Зокрема, певний час назад, було показано регуляторне значення близько 600 ендогенних пептидів [104, 110,

111]. Наприклад, в результаті дослідження впливу пептидного пулу на клітину в цілому, було доведено його здатність викликати деконденсацію гетерохроматину в еухроматин, що, як наслідок, підсилює транскрипцію генів [112]. Наявність кореляції між накопиченням пептидів та наявністю того чи іншого патологічного стану в організмі, викликаного порушенням нормального функціонування тканин, дозволяє розглядати пептидиний пулу в якості маркера функціонального співвідношення клітин в тканинах [113]. Висока стабільність пулу пептидів у фізіологічних умовах дозволяє виділити його фракцію з плазми крові. Оскільки кількісна характеристика пептидного пулу організму є маркером порушення на клітинному, тканинному чи органному рівні в результаті патологічного процесу, то можемо припустити і якісні відмінності залежно від типу патології.

Подальше детальне дослідження таких неспецифічних бікових чинників білкової природи, що утворюються в організмі при патології, як імуноглобуліни та пептидний пул, можуть пролити світло на ті процеси які є причиною рецидиву та хронічного протікання хвороби.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

#### 2.1. Характеристика груп, які досліджувалися

Для проведення дослідження було виконано клініко-лабораторне обстеження групи пацієнтів з ішемічним інсультом як в гостру фазу так і через 1 рік після перенесеної гострої фази хвороби. Група складалася з 122 хворих. Дослідження включало два підтипи гострого ішемічного інсульту: атеротромботичний ішемічний інсульт (n=66) та кардіоемболічний ішемічний інсульт (n=56). Ці ж групи пацієнтів через рік після перенесеної гострої фази ішемічного інсульту також були включені у дослідження. Вік пацієнтів складав в середньому  $73 \pm 8$  років. Хворі перебували на стаціонарному лікуванні у I та II неврологічних відділеннях Київської міської клінічної лікарні № 4. Діагноз ішемічного інсульту був підтверджений нейровізуально, за допомогою комп'ютерної та магнітно-резонансної томографії головного мозку (КТ- або МРТ). Всі хворі або їх родичі добровільно погодилися на участь у клінічному дослідженні та дали письмову згоду на участь у ньому.

Хворі у стані коми, з вираженою дихальною недостатністю або з підозрою на онкологічне захворювання були виключені з дослідження.

При надходженні до стаціонару, кожному пацієнту вводили аспірин 325 мг з наступним щоденним прийомом 100 мг аспірину внутрішньо. Починаючи з другої доби перебування у стаціонарі, пацієнти отримували низькомолекулярний гепарини у профілактичній дозі.

В дослідженні також взяли участь практично здорові донори (n=35) без тромботичних захворювань в анамнезі, які за статтю та віком відповідали досліджуваним групам пацієнтів.

## 2.2. Реагенти і матеріали

У роботі було використано наступні реактиви та матеріали: акриламід, N,N'-метилен-біс-акриламід, персульфат амонію, TEMED (N,N,N',N'-тетраметилен-1,2-діамін) (GE Healthcare AB, Швеція), DAB (diaminobenzidine) та pNPP (p-Nitrophenyl Phosphate) (Sigma, Німеччина),  $\beta$ -меркаптоетанол,  $\alpha$ -амінокапронова кислота, хромогенні субстрати, реагенти для проведення хронометричних тестів та плазми-калібратори ("Ренам", Росія), маркери молекулярної маси білків для електрофорезу та вестерн-блотингу (Prestained Protein Ladder) (Fermentas, Литва), протеїн А сефароза (Amersham Biosciences, AB, Швеція).

Антитіла для імунодетекції інгібітору активатору плазміногену типу-1 (ПАІ-1), тканинного активатора плазміногена (ТАП) та фактору фон Віллебранда (Invitrogen, США). Антитіла, кон'юговані з лужною фосфатазою (Bio-Rad Laboratories, США). Нітроцелюлозна мембрана Amersham Hybond ECL для проведення вестерн-блотингу та реактиви для забарвлення електрофоретичних гелів (GE Healthcare AB, Швеція).

Фракції імуноглобулінів класу G та пептидного пулу були отримані за безпосередньої участі дисертанта. Хімічні реактиви вітчизняного виробництва, такі як солі, кислоти та луки були кваліфікації «чда» та «хч».

## 2.3. Обладнання

В роботі використовували: апарат для препаративного вертикального диск-електорофорезу (BioRad, США), препаративний хроматограф низького тиску (BioLogic LP, BioRad, США), спектрофотометр (SmartSpec Plus, BioRad, США), аналізатор агрегації тромбоцитів AT-02 («Медицина-Техніка», Білорусь), мікропланшетний спектрофотометр (BioTek Instruments, BioTek, USA), коагулологічний аналізатор (Rayto Life and Analytical Sciences, China).

Магнітні мішалки, піпетки автоматичні, термостати, шейкери та т.і. є продукцією фірм, що працюють згідно стандарту ISO 9001. Пластиковий лабораторний посуд (планшети для імуноферментного аналізу, планшети з несорбуючою поверхнею, епендорфи, пробірки та інше) отримано від фірми Sente-Lab. Скляний лабораторний посуд (колби, стакани, пробірки, циліндри та інше) фірми Simax.

#### **2.4. Отримання плазми крові**

Кров відбирали пункційно з ліктьової вени пацієнтів з 8 до 9 годин ранку перед сніданком та вносили у пластикову пробірку, яка вміщувала лимоннокислий натрій (38 г/л) у кінцевому співвідношенні 9:1, та обережно повільно перемішували. Вміст пробірки центрифугували протягом 40 хв. за 2500 об/хв., надосад переносили лабораторним дозатором у пластикову пробірку.

Отриману плазму крові використовували для аналізу або, за необхідності, заморожували при  $-20^{\circ}\text{C}$  у епендорфах. Плазму розморожували прогріванням на водяній бані ( $37^{\circ}\text{C}$ ) протягом 20 хв., після чого розмішували обережними перевертанням пробірки та негайно переміщували на лід. Даний спосіб розморожування не супроводжується зниженням активності факторів зсідання крові [232].

#### **2.5. Отримання плазми крові, збагаченої тромбоцитами**

Кров відбирали пункційно з ліктьової вени пацієнтів з 8 до 9 годин ранку перед прийомом їжі та вносили у пластикову пробірку, як вміщувала лимоннокислий натрій (38 г/л) у кінцевому співвідношенні 9:1, та обережно повільно перемішували. Вміст пробірки центрифугували протягом 15 хв. за 150 g і температурі  $20^{\circ}\text{C}$ .

Супернатант відбирали та перевіряли отриману фракцію тромбоцитів на їх агрегаційну здатність. Для цього використовували аналізатор агрегації тромбоцитів АТ-02 та стандартний протокол визначення агрегаційної здатності плазми, збагаченої на тромбоцити [232].

## **2.6. Отримання фракції чистих тромбоцитів**

Чисті тромбоцити отримували за допомогою хроматографії, що поділяє за розмірами. Для цього колонку з носієм сефароза 4В урівноважували буфером 0,05 М Тріс-НСІ, рН 7.4, який вміщував 0.13 М NaCl та наносили на неї плазму, збагачену тромбоцитами. Після чого елюат збирали з пластикові епандорфи, візуально контролюючи присутність клітин. Стабільна швидкість нанесення та елюції складала 1 мл/хв.

Далі проводили центрифугування елюату протягом 10 хв при 300 g. Супернатант наносили на поліактиламідний гель для проведення диск-електрофорезу за присутності 0.1 % ДСН- Na [208].

## **2.7. Отримання фракції імуноглобулінів класу G**

Фракцію, яка містила IgG отримували з плазми крові хворих та здорових донорів методом афінної хроматографії. Для цього використовували колонку з носієм протейн А сефароза [233].

На колонку з носієм у об'ємі 5 мл (сорбційна здатність – 35 мг IgG/мл носія) наносили плазму крові. Неспецифічно зв'язані білки відмивали 0,05 М Тріс-НСІ буфером, рН 7.4, зі швидкістю 1 мл/хв. Елюцію проводили 100 мМ гліцин-НСІ буфером, рН 2,2 зі швидкістю 1 мл/хв. Вміст білка контролювали за допомогою зміни поглинання при 280 нм, що реєструвалось УФ-датчиком хроматографа. Проби, які містили білок, об'єднували та висолювали насиченим розчином сульфату амонію до кінцевої концентрації 50 % і

залишали на 12 годин при температурі 4 ° С. Висол центрифугували за 3000 об/хв, 30 хв. та розчиняли осад у 50 мМ Na-фосфатного буфера, рН 7,4.

Додаткове доочищення фракції проводили для видалення окремих важких та легких ланцюгів імуноглобулінів використовуючи носій Sephadex G 75. Хроматографічне розділення проводили у 20 мМ Na-фосфатному буфері рН 7,4 зі швидкістю 1 мл/хв. Вміст білка контролювали за допомогою зміни поглинання при 280 нм, що реєструвалось УФ-датчиком хроматографа. Фракції, що містили білок об'єднували та ліофільно висушували для подальшої роботи.

Чистоту отриманої фракції IgG контролювали методом диск-електрофорезу в ПААГ за Лемлі в денатуруючих умовах [234].

## **2.8. Отримання фракції пептидного пулу плазми крові**

Виділення пептидного пулу проводилося за методом В. В. Ніколайчук [235]. Всі операції проводилися на льоду. Після кожної маніпуляції проби витримували протягом 15 хв.

Попередньо стабілізовану цитратом натрію плазму осаджували у співвідношенні 1:1 1,2 М HClO<sub>4</sub> і центрифугували 15 хв за 10 тис. об/хв. На наступному етапі надоосадову рідину нейтралізували 5 Н КОН до рН 7,0. Суміш перемішували і центрифугували протягом 15 хв за 10 тис. об/хв. Надоосадову рідину переносили в мікропробірки і додавали у співвідношенні 1:5 96 % етилового спирту і центрифугували протягом 15 хв за 10 тис. об/хв.

У супернатанті визначали концентрацію пептидного пулу відповідно до калібрувального графіку. Концентрація вимірювалася спектрофотометрично при 254 нм проти холостої проби, яка вміщувала фізіологічний розчин в об'ємі рівному досліджуваному об'єму плазми, та з якою були проведені аналогічні маніпуляції.

Для побудови калібрувального графіку використовували дипептид з відомою молекулярною масою, N-карбокси-гліцил-гліцин 0,26 кДа.

## **2.9. Визначення загального часу лізису еуглобулінів плазми крові**

Загальну фібринолітичну активність плазми крові визначали відповідно до загального часу лізису фібринового згустку плазми крові, який утворився після полімеризації фібрину еуглобулінової фракції, внаслідок додавання розчину  $\text{CaCl}_2$ . Отриману еуглобулінову фракцію розчиняли у 250 мкл 0,05 М Трис-НСІ буфері, рН 7,4 та додавали 0,1 мл 25 мМ  $\text{CaCl}_2$  у конічній скляній пробірці. Пробу інкубували за температури  $37^\circ\text{C}$  та визначали час (в годинах) який був необхідний для повного лізису згустку [236].

## **2.10. Визначення часу Хагеман-залежного фібринолізу плазми крові**

У пластиковий посуд для аналізу вносили 8 мл дистильованої води, 0,2 мл 1 % розчину оцтової кислоти, 0,5 мл плазми крові та 0,5 мл 0,5 % суспензії каоліну. Суміш обережно перемішували та інкубували протягом 30 хв при  $37^\circ\text{C}$ . Далі проводили центрифугування протягом 6 хв за 1500 об/хв та відбирали надосадову рідину. Осад розчиняли у 0,5 мл 0,05 М Трис-НСІ буфері, рН 7,4 та індукували утворення згустку внесенням рівного об'єму 0,025 М розчину хлориду кальцію. Після утворення згустку визначали час (у хвилинах) який необхідний для його повного лізису [237].

## **2.11. Визначення активності плазміногену в плазмі крові**

Активність плазміногену вимірювали з використанням хромогенного субстрату  $\text{S}_{2251}$ . В інкубаційне середовище послідовно вносили 0,05 М Трис-НСІ буфер, рН 7,4; 25 мкл плазми; та 3 мМ  $\text{S}_{2251}$ ; 5-10 МО/мл стрептокінази. Загальний об'єм інкубаційного середовища становив 250 мкл. Інкубацію проводили при  $37^\circ\text{C}$ . Реєстрацію поглинання вивільненого п-нітроаніліну проводили в двохвильовому режимі за довжини хвилі 405 нм та 492 нм на

спектрофотометрі для мікропланшетів SmartSpec Plus, через визначені проміжки часу. В плазмі практично здорових донорів активність плазміногену становила  $100 \pm 5 \%$ . [237].

### **2.12. Визначення активності $\alpha_2$ -антиплазміну в плазмі крові**

Активність  $\alpha_2$ -антиплазміну вимірювали з використанням хромогенного субстрату  $S_{2251}$ . В інкубаційне середовище послідовно вносили 0,05 М Трис-НСІ буфер, рН 7,4; 25 мкл плазми; 0,5 к.о./мл плазміну; та 3 мМ  $S_{2251}$ . Інкубацію проводили протягом 2-5 хвилин при  $37^\circ \text{C}$ . Об'єм інкубаційного середовища становив 250 мкл. Реєстрацію поглинання вивільненого п-нітроаніліну проводили в двохвильовому режимі за довжини хвилі 405 нм та 492 нм на спектрофотометрі для мікропланшетів SmartSpec Plus через визначені проміжки часу. В плазмі практично здорових донорів активність  $\alpha_2$ -антиплазміну становила 80 -110%. [237].

### **2.13. Визначення вмісту розчинних фібрин-мономерних комплексів в плазмі крові**

Для дослідження вмісту розчинних фібрин-мономерних комплексів використовували о-фенантроліновий тест [238]. Дана методика основана на оцінці часу появи у досліджуваній плазмі фібринових часток після додавання в неї 0,78 % розчину о-фенантроліну (у співвідношенні 1:1). Результати оцінювали напівкількісно за часом від моменту додавання о-фенантроліну до початку появи перших пластинок та за формою осаду, що з'являвся: дрібні частинки - 0,035 мг/мл (1 у.о.), пластівчаста муть - 0,07 мг/мл (2 у.о.), пластівці, нитки - 0,105 мг/мл (3 у.о.), гелеподібний осад - 0,14 мг/мл (4 у.о.).

Після оцінки концентрації РФМК проводили подальше доочищення отриманих комплексів за рахунок промивання фізіологічним розчином. Для цього спочатку осаджували РФМК центрифугуванням при 10 тис об/хв. 10

хв. Супернатант вилучали, а до осаду додавали фізіологічний розчин у об'ємі, що відповідав початковому внесеному об'єму плазми крові, ретельно перемішували та центрифугували 5 хв при 10 тис об/хв. Промивання повторювали тричі.

#### **2.14. Визначення вмісту протромбінового пулу в плазмі крові**

Протромбіновий пул отримували з плазми крові людини методом сорбування вітамін К-залежних білків на сірчаноокислому барії (з розрахунку 120 г BaSO<sub>4</sub> на 1 л плазми) та безперервно мало-помалу перемішували протягом 1 години на льоду. Суміш центрифугували при 2,000 g протягом 15 хв при кімнатній температурі. Елюцію проводили 50 mM трис-HCl буфером, рН 7.4, що містить 200 mM NaCl, 10 mM бензамідин і 20 mM ЕДТА [239].

Для контролю якості отриманого препарату проводили електрофорез у поліакриламідному гелі в присутності додецилсульфату натрію за методом Лемлі [234].

Концентрація протромбінового пулу в плазмі вимірювали за допомогою стандартного твердофазного імуноферментного аналізу ELISA [240]

#### **2.15. Електрофорез у поліакриламідному гелі за присутності додецилсульфату натрію**

Електрофоретичний аналіз білків проводили використовуючи метод диск-електрофорезу у 7,5-12% поліакриламідному гелі за присутності додецилсульфату натрію в системі Лемлі в денатуруючі умовах [234]. За необхідності, для відновлення дисульфідних зв'язків застосовували 5 % β-меркаптоетанол.

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. Гелі фарбували 0,125 % розчином кумасі G-250 у 25 % ізопропанолі та 10 % оцтовій кислоті. Відмивку від надлишкової фарби проводили використовуючи розчин 0,8 % оцтової кислоти.

Використовували маркерну суміш білків з наступними молекулярними масами: 94 кДа (фосфорилаза В), 67 кДа (альбумін), 43 кДа (овальбумін), 30 кДа (ангідраза), 20,1 кДа (соевий інгібітор трипсину), 14,4 (лактальбумін) (GE Healthcare).

## **2.16. Вестерн-блотинг**

Метод вестерн-блотингу проводили за стандартним протоколом [241]. Зразки плазми крові/сироватки/фракції цільових білків готували для проведення диск-електрофорезу стандартним способом. Електрофоретичне розділення білків проводили за методом Лемлі, використовуючи 10 % ПААГ.

Надалі проводили перенесення білків з поліакриламідного гелю на нітроцелюлозну мембрану протягом 45 хвилин за 25 ° С та силі струму 150 мА у 15 мМ трис-НСІ буфері, рН 8,4, що містив 120 мМ гліцину та 20 % етанолу.

Результативність переносу перевірялася забарвленням нітроцелюлозної мембрани розчином 0,1 % Ронсеау у 5 % оцтовій кислоті. Після забарвлення нітроцелюлозну мембрану відмивали і для блокування неспецифічних ділянок зв'язування інкубували з 5 % знежиреним молоком протягом ночі за 4 ° С.

Після кожного етапу інкубації проводили відмивку 50 мМ трис-НСІ буфером з вмістом 0,1 % твін-20, тричі по 5 хв. Наступну інкубацію проводили з первинними антитілами до цільового білку за 37 ° С протягом 60 хв. На наступному етапі використовували вторинні антитіла, кон'юговані з пероксидазою хрому, інкубацію з якими також проводили за 37 ° С протягом

60 хв. Для детекції поліпептидних зон в якості субстрату використовували 3,3'-діамінобензидин.

### **2.17. Імуноферментний аналіз**

Імуноферментний аналіз проводили у планшетах із сорбційною здатністю для мікропланшеточного спектрофотометру [240, 242]. Плазму крові розводили 0,05 М трис-НСІ буфером, рН 7,4 у співвідношенні 1:100 та інкубували за 4 ° С протягом ночі. Для видалення неспецифічно зв'язаних молекул використовували 50 мМ трис-НСІ буфер, рН 7,4 з вмістом 0,1% твін 20. Для блокування ймовірних вільних місць зв'язування на планшеті, після інкубації з досліджуваними антигенами, у лунки планшета вносили 5 % розчин знежиреного молока та проводили наступне інкубування при 37 ° С протягом 60 хв. Розчини первинних та вторинних антитіл готували у відповідності до рекомендацій виробника, інкубацію проводили за 37 ° С протягом 60 хв.

Візуалізацію реакції проводили субстратом для лужної фосфатази (1 мг/мл паранітрофенілфосфату у 10 % диетаноламіні, рН 9,8) за 37 ° С протягом 60 хв, та вимірювали зміни оптичного поглинання за довжини хвиль 405 та 492 нм на мікропланшеточному спектрофотометрі  $\mu$ Quant (BioTek Instruments).

### **2.18. Визначення концентрації білка за поглинанням в УФ-області спектру**

Визначення концентрації білків проводили на спектрофотометрі SmartSpec Plus (BioRad) у кюветах з довжиною пробігу променя 1 см за довжини хвилі 280 нм проти холостої проби чи робочого буферу відповідно. Індивідуальні коефіцієнти молярної екстинції використовували для розрахунку концентрації цільового білка [208].

## **2.19. Аналіз фракції пептидного пулу методом хроматографії що поділяє за розмірами**

Для розділення фракції пептидного пулу використовували хроматографію, що розподіляє за розміром. Аліквоти об'ємом в 1 мл наносили на колонку з відповідним носієм в 0,05 М Тріс-НСІ буфері, рН 7,4, з додаванням 130 мМ NaCl. Стабільна швидкість нанесення складала 1 мл/хв. Для калібрування колонки застосовували стандартні маркерні речовини з відомою молекулярною масою.

## **2.20. Дослідження функціонування тромбоцитів**

### **2.20.1. Агрегація тромбоцитів**

Процес агрегації тромбоцитів досліджували на фотооптичному агрегометрі AP2110 «Солар» (Білорусь) [243].

Кров відбирали пункційно з ліктьової вени пацієнтів з 8 до 9 годин ранку перед прийомом їжі та вносили у пластикову пробірку, як вміщувала лимоннокислий натрій (38 мг/мл) у кінцевому співвідношенні 9:1. Як збагачену так і збіднену на тромбоцити плазму крові для дослідження агрегації тромбоцитів отримували центрифугуванням за 160 та 250 g відповідно. Агрегацію тромбоцитів досліджували впродовж перших 2 годин після забору крові.

Як індуктор агрегації використовували АДФ у кінцевій концентрації 2,5 мкМ. Ступінь агрегації визначали як максимальний рівень світлопропускання плазми крові після внесення індуктора агрегації у кювету аналізатора.

Вміст тромбоцитів у зразках стандартизували за показниками агрегометра до  $2 \times 10^5 \pm 5$  % на 1 мкл проби шляхом розведення бідною тромбоцитами плазмою.

## **2.20.2. Активація тромбоцитів**

Ступінь активації тромбоцитів досліджували детектуючи присутність у середовищі інкубації тромбоцитів білків  $\alpha$ -гранул останніх.

Для проведення дослідження отримані чисті тромбоцити інкубували у пластикових планшетах за 37 ° С протягом визначеного часу з відповідним індуктором. Після інкубування вміст лунок переносили у пластикові пробірки та концентрували відповідно до стандартного протоколу, за допомогою додавання рівного об'єму 50 % трихлороцтової кислоти. Осад наносили на ПААГ для подальшого перенесення на нітроцелюлозну мембрану та проведення Вестерн блотингу, для визначення присутності у осаді цільових білків [244].

## **2.21. Дослідження гідролізу хромогенного субстрату ключовими факторами системи гемостазу**

### **2.21.1. Визначення гідролізу хромогенного субстрату факторами системи гемостазу безпосередньо**

Гідроліз специфічного хромогенного субстрату тромбіном та фактором Ха визначали спектрофотометрично. У лунку планшету додавали: 25 мкл ферменту, змішували з 50 мМ Тріс-НСІ, що містить 130 мМ NaCl, рН 7,4, а також досліджувану ефекторну фракцію. Після 5 хв інкубації при 37 ° С, додавали до суміші специфічний хромогенний субстрат (S<sub>2238</sub> для тромбіну або S<sub>2765</sub> для фактору Ха) з кінцевою концентрацією 0,3 мМ.

Швидкість вивільненого під дією ферменту рNA визначали в двупроменевому режимі при 405 - 492 нм на мікропланшеточному спектрофотометрі  $\mu$ Quant (BioTek Instruments), через визначені проміжки

часу протягом 60 хвилин [245]. Використовували ліофільно висушені комерційні препарати «Ренам» (Росія) [237]. Загальний об'єм суміші у лунці дорівнював 250 мкл.

#### **2.21.2. Визначення гідролізу хромогенного субстрату факторами системи гемостазу після активації проферментів у плазмі крові**

Для дослідження гідролізу хромогенного субстрату факторами системи гемостазу активованими у плазмі крові з проферментів використовували екзогенні активатори отримані з отрути змій (*Echis multisquamatus* (екамулін) для активації протромбіну; та *Agkistrodon blomhoffi Ussuriensis* для активації протеїну С). Експерименти проводилися з використанням плазми крові здорових донорів для моделювання нормального процесу гемостазу.

У лунки мікропланшету додавали: 25 мкл плазми, 50 мМ Тріс-НСІ, що містив 130 мМ NaCl, рН 7,4, 25 мкл активатору, а також досліджувану ефекторну фракцію. Після 5 хв інкубації при 37 ° С додавали до суміші специфічний хромогенний субстрат (S<sub>2238</sub> для тромбіну та S<sub>2366</sub> для протеїну С) з кінцевою концентрацією 0,3 мМ.

#### **2.22. Статистична обробка результатів досліджень**

Статистичну обробку отриманих результатів досліджень проводили використовуючи комп'ютерні програми Origin 7.0 та TotalLab 2.01. Достовірними вважали відмінності при  $p < 0,05$ .

## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

#### **3.1. Характеристика стану системи гемостазу у пацієнтів, які 1 рік назад перенесли гостру фазу атеротромботичного або кардіоемболічного підтипів ішемічного інсульту**

Ішемічний інсульт - це порушення мозкового кровообігу гострого типу, яке виникає при недостатньому надходженні крові до певної ділянки мозку або повного припинення кровопостачання. При цьому, в більшості випадків, спостерігається пошкодження тканини мозку та, відповідно, його функцій. Один з найбільш важливих механізмів патогенезу полягає в звуженні просвіту інтракраніальних судин або магістральних артерій в результаті атеросклерозу, внаслідок відкладання у руслі судин ліпідних комплексів та ураження ендотелію, що призводить до появи атеросклерозної бляшки. Поступово утворена бляшка збільшується у розмірах за рахунок осідання на ній формених елементів крові, що в свою чергу, супроводжується звуженням просвіту судини, стенозом та оклюзією. Найчастіше атеросклеротичні бляшки формуються в областях біфуркації великих судин. При цьому утворена емболічна оклюзія може бути як артеріального так і кардіологічного походження [114].

Саме визначення конкретної причини загострення ішемічного інсульту має вирішальне значення для вибору найбільш оптимальної превентивної стратегії, оскільки вона варіює для кожного окремого підтипу хвороби. Проте, навіть після повної діагностики, причина виникнення 30 % випадків інсульту залишаються невизначеною, що різко збільшує відсоток летальних випадків серед рецидивів [6].

Загалом, сучасне медичне лікування хворих з гострим ішемічним інсультом фокусується на обмеженні ступеня пошкодження головного мозку, уникненні ускладнень, встановленні належної вторинної профілактики, а також полегшенні та прискоренні відновлення організму після перенесеного інсульту [115]. З огляду на прямо-пропорційну залежність між летальністю та часом від загострення ішемічних подій до надання першої терапії, організована система медичної допомоги при ішемічному інсульті має вирішальне значення [116].

Отже, велика поширеність ішемічного інсульту, висока смертність та інвалідизація населення, а також великий відсоток рецидивів є свідченнями актуальності проблеми інсульту, як в медичному, так і в соціальному плані [117]. При цьому, патогенез ішемічного інсульту складається з низки механізмів, серед яких порушення в тромбоцитарній, коагуляційній, антикоагулянтній та фібринолітичній ланках системи гемостазу [118]. Саме тому, на сьогоднішній день, вкрай необхідним є вивчення причин та механізмів розвитку усіх підтипів ішемічного інсульту на рівні системи гемостазу. Не менш важливим є пошук нових біомаркерів, які можуть бути застосовані в діагностиці для виявлення осіб з високим ризиком розвитку інсульту, а також контролю та оптимізації лікування хворих, які уже перенесли дане захворювання.

Таким чином, діагностика стану системи зсідання крові, визначення фібринолітичного потенціалу та встановлення характеру і напрямку порушення балансу між системою фібринолізу та системою зсідання крові є найважливішими критеріями стану системи організму та його здатності запобігати тромботичним ускладненням. Одним з провідних патогенетичних чинників ішемічної хвороби є порушення на певних ланках системи гемостазу, що призводить до внутрішньосудинного тромбоутворення, зміни реологічних властивостей крові та мікроциркуляції тканин організму [119]. Деталізація механізмів, які лежать в основі розвитку даного захворювання має принципове значення не лише з точки зору розробки нових

фармакологічних препаратів направленої дії, а й відкриває значні перспективи в області клінічної діагностики патологічних проявів системи гемостазу.

Вчасно та вірно детектовані дефекти зсідання крові є запорукою надання негайної терапії, а отже, і виведення організму з критичного стану. Саме розчинні фібрин мономерні комплекси є раннім маркером тромбофілії. Вони являють собою комплекси мономерного фібрину й фібриногену або продуктів їх деградації. Виявлення РФМК, що утворюються за рахунок активації згортання крові тромбіном, при трансформації фібриногену у фібрин, дозволяє детектувати патологічний процес на ранніх доклінічних стадіях хвороби [120]. Окрім продуктів розпаду фібриногену, до складу фракції РФМК може входити також і нативний фібриноген. Підвищена концентрація даного маркера у плазми крові вказує на ризик розвитку тромбофілії. Водночас, визначення даного параметру є доступним та швидким у виконанні [121].

Відомо, що в нормі концентрація РФМК у практично здорових донорів рівна або наближена до нуля. Раніше було показано, що розвиток обох підтипів ішемічного інсульту у його гострій фазі супроводжується значним зростанням рівня РФМК [8]. Нами було визначено, що підвищена концентрація даного маркера гіперкоагуляційного стану зберігається у плазмі крові пацієнтів навіть через 1 рік після перенесеного атеротромботичного ішемічного інсульту та була рівною  $8,1 \pm 2,6$  мкг/мл, а для пацієнтів з кардіоеMBOLІЧНИМ ішемічним інсультом цей показник відповідав  $14,8 \pm 3,4$  мкг/мл (табл. 3.1). Згідно отриманих даних, у пацієнтів по проходженні 1 року після ішемії концентрація РФМК була більш наближеною до фізіологічної норми, що є свідченням зменшення рівня гіперкоагуляційного стану системи гемостазу. Проте, загроза тромбозу в організмі залишалася присутньою.

Вміст розчинних фібрин мономерних комплексів плазми крові  
хворих на ішемічний інсульт

| Група, що досліджувалася  | Концентрація РФМК,<br>мкг/мл |
|---|------------------------------|
| Здорові донори, n = 35  | 2,0 ± 0,1                    |
| Пацієнти через 1 рік після атеротромботичного ішемічного інсульту, n = 66 | 8,1 ± 2,6*                   |
| Пацієнти через 1 рік після кардіоемболічного ішемічного інсульту, n = 56  | 14,8 ± 3,4*                  |

\* - достовірні зміни відносно контролю,  $p \leq 0,05$ .

Отже, утворення РФМК у плазмі крові є результатом перетворення фібриногену у фібрин-мономери, які в подальшому полімеризуються у фібрин-полімер та формують основу для утворення тромбу. В усі ці процеси безпосередньо залучений тромбін, який утворюється з попередника протромбіну шляхом обмеженого протеолізу та карбоксилювання в його молекулі. Протромбін являє собою глікопротеїн плазми крові, що синтезується в печінці та проходить пост трансляційну модифікацію під дією вітаміну К, білкова частина молекули складається з одного поліпептидного ланцюга, із 582 амінокислотних залишків, на N-кінці якого знаходиться 10 залишків глютамінової кислоти. Концентрація протромбінового пулу може бути прямо-пропорційною тромботичній загрозі організму.

У попередніх дослідженнях, для хворих у гострій фазі ішемічного інсульту нами було показано підвищення концентрації протромбінового пулу в середньому у два рази порівняно з показником здорових донорів [122]. Через 1 рік після ішемічної атаки для хворих, які перенесли атеротромботичний ішемічний інсульт вміст протромбінового пулу в середньому становив  $0,47 \pm 0,08$  у.о./мл, та для хворих після кардіоемболічного ішемічного інсульту був рівним  $0,43 \pm 0,08$  у.о./мл (табл.

3.2), тобто був в межах норми і відповідав показнику здорових донорів, для яких досліджуваний показник був рівним  $0,47 \pm 0,02$  у.о./мл.

Таблиця 3.2

Вміст протромбінового пулу у плазмі крові хворих на ішемічний інсульт

| Група, що досліджувалася  | Вміст протромбінового пулу (умовні одиниці/мл) |
|---|--|
| Здорові донори, n = 35  | $0,47 \pm 0,02$                                |
| Пацієнти через 1 рік після атеротромботичного ішемічного інсульту, n = 66 | $0,47 \pm 0,08$                                |
| Пацієнти через 1 рік після кардіоемболічного ішемічного інсульту, n = 56  | $0,43 \pm 0,08$                                |

Таким чином, нами було показано, що через 1 рік після атеротромботичного та кардіоемболічного ішемічного інсульту концентрація протромбінового пулу у плазмі крові повертається до рівня здорових донорів. Тобто можемо стверджувати, що рівень протромбінового пулу у плазмі крові може розглядатись додатковим, але не головним прогностичним чинником для моніторингу стану системи гемостазу при атеротромботичному та кардіоемболічному ішемічному інсульті.

Відповідно до численних літературних даних, саме епітеліальна дисфункція, у великій кількості випадків, є передумовою як тромбозу так і атеросклерозу, які, в свою чергу, спричинюють ішемічний інсульт [123]. Відповідно до цього, має сенс дослідження основного маркеру ендотеліальної функції, а саме плазматичного рівня циркулюючого фактору фон Віллебранда (vWF) [124, 125]. Відомо, що vWF — це глікопротеїн плазми крові, що синтезується, депонується та секретується клітинами ендотелію судин, а також тромбоцитами [126]. Існує чимало результатів, які підтверджують залежність між рівнем плазматичного vWF та ішемічним інсультом у гострій фазі захворювання. Попередні наші дослідження показали значне зростання рівня фактору фон Віллебранда, який

перевищував показник здорових донорів, особливо у пацієнтів з гострим кардіоемболічним ішемічним інсультом [127]. Проте, на сьогодні, дані про рівень даного фактора, в тому числі через певний час після перенесеного захворювання, у літературі відсутні.

vWF виступає посередником агрегації та адгезії тромбоцитів у місці пошкодження судини, а отже безпосередньо стимулює процес тромбоутворення за допомогою рецептора GPIIb-IX-V до субендотеліального колагену та фібронектину пошкодженої судини. Крім цього, vWF є носієм фактора згортання крові VIII, захищаючи його від протеолізу [128]. Підвищення рівня vWF у плазмі крові було виявлено за наступних патологій: легенева гіпертензія [129], хронічна серцева недостатність [130], ішемічна хвороба серця (ІХС) [131], мігрень [132], хронічний ішемічний інсульт на фоні миготливої аритмії [133] та ішемічний інсульт [134], що вказує на те, що vWF є важливим маркером у прогнозуванні тромбозу. Цікавим є той факт що рівень цього фактору, а отже і тромбогенність судин, збільшується під впливом гормону вазопресину, який виробляється організмом у відповідь на стресовий стан [135].

У зв'язку з цим, нами було проаналізовано рівень vWF через 1 рік після перенесеної гострої фази атеротромботичного та кардіоемболічного ішемічного інсульту (табл.3.3).

Було показано, що для пацієнтів з АП через 1 рік після ішемічної атаки рівень vWF складав  $0,09 \pm 0,005$  у.о./мг в середньому, а для пацієнтів з КП  $0,107 \pm 0,008$  у.о./мг, в той час як у практично здорових донорів досліджуваний показник був рівний  $0,074 \pm 0,008$  у.о./мг. Проте, важливо зазначити, що у досліджуваній групі пацієнтів було помічена чітка дивергенція на дві групи. Тобто, серед усіх пацієнтів які рік назад перенесли гостру фазу АП у 62 % досліджуваних рівень vWF був рівний показнику здорових донорів. Беручи рівень vWF у практично здорових донорів за 100 % можемо стверджувати, що лише у 38 % пацієнтів з АП рівень vWF перевищував показник практично здорових донорів в середньому на 50 %. Аналогічна ситуація була показана

для пацієнтів які 1 рік назад перенесли КІІ. Тобто 60 % від усіх пацієнтів з КІІ був характерний рівень vWF який відповідав показнику практично здорових донорів. Проте для 40 % хворих КІІ, навіть через 1 рік після ішемічної атаки, рівень vWF був в середньому на 75 % більший ніж у здорових донорів.

Таблиця 3.3

Рівень фактору фон Віллебранда у плазмі крові хворих на ішемічний інсульт

| Група, що досліджувалася  | Фактор фон Віллебранда , %                               |
|---|--|
| Здорові донори, n = 35  | 100 ± 5,0  |
| Пацієнти через 1 рік після атеротромботичного ішемічного інсульту, n = 66 | 145 % (75 % досліджуваних)<br>100 % (25 % досліджуваних) |
| Пацієнти через 1 рік після кардіоемболічного ішемічного інсульту, n = 56  | 160 % (70 % досліджуваних)<br>100 % (30 % досліджуваних) |

Таким чином, можемо стверджувати, що відповідно до рівня основного маркера епітеліальної дисфункції фактору фон Віллебранда, тромботична загроза в організмі пацієнтів, як з атеротромботичним так і з кардіоемболічним підтипами ішемічного інсульту, зберігається. При цьому, кардіоемболічний ішемічний інсульт супроводжується вищим рівнем фактору фон Віллебранда у плазмі крові пацієнтів ніж атеротромботичний ішемічний інсульт. Проте важливо підкреслити, що для певної групи пацієнтів даний показник був у межах норми, що свідчить про стабілізацію досліджуваної ланки системи гемостазу через 1 рік після ішемічної атаки.

Важливе місце у патогенезі серцево-судинних захворювань посідає взаємодія тромбоцитів між собою та з ендотелієм судинної стінки [136]. Саме

тромбоцити, а також протеїни, які містяться у їх гранулах, виконують велику кількість найрізноманітніших функцій в організмі, по більшій мірі за рахунок вмісту гранул та наявності на поверхні численних рецепторів, проте, одна з найважливіших їх функцій заключається у тромбоутворенні [137]. Дослідження АДФ-залежної агрегації тромбоцитів застосовується для оцінки ефективності антикоагулянтних препаратів та є базовим методом у клінічній практиці. Важливо, що за літературними даними агрегаційна здатність тромбоцитів хворих на гострий ішемічний інсульт сильно зростає, особливо значне підвищенням тромбоцитарної реакції на АДФ було зафіксоване у пацієнтів з гострим АІ. Проте загальна кількість тромбоцитів у пацієнтів з гострим ішемічним інсультом була значно меншою ніж у здорових донорів [138]. На фоні цих суперечливих результатів доцільно дослідити процеси тромбоутворення у пацієнтів з ішемічним інсультом через 1 рік після загострення хвороби.

Отримані нами результати були двоякими (табл. 3.4). Тобто, серед усіх пацієнтів, які 1 рік назад перенесли гостру фазу АІ для 65 % пацієнтів кількість тромбоцитів становила  $110 \pm 35 \times 1000/\text{мкл}$ , що було значно меншим ніж показник практично здорових донорів, який становив  $205,6 \pm 47,6 \times 1000/\text{мкл}$ . При цьому, у цій же групі для 35 % пацієнтів кількість тромбоцитів відповідала нормі. Серед пацієнтів, які 1 рік назад перенесли гостру фазу КІІ вирізнялося 45 % зі значно зменшеною кількістю тромбоцитів, а саме  $115 \pm 20 \times 1000/\text{мкл}$ . Для інших 55 % пацієнтів кількість тромбоцитів також відповідала нормі. Статистично достовірних змін у ступені агрегації тромбоцитів у пацієнтів з ішемічним інсультом через 1 рік після гострої фази, порівняно зі ступенем контрольної агрегації, виявлено не було.

Таким чином, в ході проведених досліджень нами було показано, що обидва досліджувані підтипи ішемічного інсульту, через 1 рік після перенесеної гострої фази, не супроводжуються значним підвищенням

тромбоцитарної реакції на АДФ, проте, загальна кількість тромбоцитів для переважної більшості пацієнтів залишалася нижчою норми.

Таблиця 3.4

Показники тромбоцитарної ланки ситеми гемостазу пацієнтів через 1 рік після атеротромботичного або кардіоемболічного ішемічного інсульту

| Група, що досліджувалася  | Кількість тромбоцитів,<br>×1000/мкл               | Ступінь<br>агрегації<br>тромбоцитів,% |
|---|---|---------------------------------------|
| Здорові донори, n = 35  | 205,6 ± 47,6                                      | 66,2 ± 6,5                            |
| Пацієнти через 1 рік після атеротромботичного ішемічного інсульту, n = 45 | 65% пацієнтів 110 ± 35*<br>35% пацієнтів 214 ± 24 | 55,8 ± 9,6                            |
| Пацієнти через 1 рік після кардіоемболічного ішемічного інсульту, n = 41  | 55% пацієнтів 240 ± 30<br>45% пацієнтів 115 ± 20* | 60,6 ± 21,4                           |

\* - достовірні зміни відносно контролю,  $p \leq 0,05$ .

Окрім маркерів порушень системи зсідання крові та тромбоцитарної ланки гемостатичного каскаду, прогностично важливе значення має також аналіз головних показників системи фібринолізу. Фібринолітичний потенціал плазми крові характеризує спроможність системи фібринолізу протистояти можливим тромботичним загрозам у разі утворення гіперкоагуляційного стану [139]. Лише при вірній та своєчасній відповіді фібринолізу зберігається рівновага системи гемостазу, підтримання рідкого стану крові та попереджується тромбоутворення [140-142]. Особливо важливе значення має оцінка фібринолітичного потенціалу системи гемостазу через певний час після перенесеного захворювання, як запорука оцінки ризику повторного порушення.

Ключовим проферментом системи фібринолізу є плазміноген, який після активації ендо- та екзогенними активаторами перетворюється на

плазмін [143, 144]. Потенціал системи фібринолізу забезпечується сукупністю всіх ферментів - активаторів, здатних перетворювати неактивний плазміноген у його активну форму – плазмін [145-148]. В першу чергу, фібринолітичний потенціал обумовлений активністю тканинного активатора плазміногену (ТАП), незначний вплив належить також FXIIa [145-147, 149]. Значну роль відіграють інгібітор активатора плазміногену I, II і III типу (ПАІ-1, ПАІ-2 та ПАІ-3) або  $\alpha$ 2-антиплазмін [150, 151]. Саме ТАП і ПАІ належить визначальна роль у процесах регуляції ферментативного лізису фібринових згустків [152, 153].

Узагальнюючи літературні дані, слід підкреслити, що загальний потенціал фібринолітичної ланки системи гемостазу залежить від регулювання процесу перетворення плазміногену в плазмін. Отже, активність плазміну жорстко регулюється трьома основними компонентами системи активації плазміногену, у яку входять: плазміноген, активатор плазміногену тканинного типу; активатор плазміногену типу урокінази; активатор інгібітора плазміногену типу 1. Для повної характеристики системи гемостазу варто визначити рівень кожного з складових системи регуляції плазміногену. Отримані нами дані наведені у табл. 3.5.

Таблиця 3.5

Активність параметрів системи фібринолізу

| Досліджуваний параметер | Здорові донори, n = 35 | Пацієнти через 1 рік після КІІ, n = 56 | Пацієнти через 1 рік після АІІ, n = 66 |
|-------------------------|------------------------|--|--|
| Плазміноген             | 100 ± 5,0 %            | 93,4 ± 8,4                             | 91,3 ± 3,5                             |
| $\alpha$ 2-антиплазмін  |                        | 91,1 ± 6,5                             | 90,8 ± 3,9                             |

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

Аналіз показників фібринолітичної ланки системи гемостазу показав значне пригнічення фібринолітичного потенціалу організму при ішемічному інсульті через 1 рік після перенесеної гострої фази захворювання. Результати вказують на незначне пониження активності плазміногену, а також його

інгібітору в плазмі крові пацієнтів, які 1 рік назад перенесли гостру фазу ішемічного інсульту. Отримані результати співпадають з літературними даними про відхилення від норми активності ключових регуляторів фібринолізу в гостру фазу ішемічної хвороби [127]. Для групи хворих на кардіоеMBOLічний ішемічний інсульт не було зафіксовано статистично достовірних змін активності як плазміногену так і  $\alpha 2$ -антиплазміну, що може бути пояснене значними відмінностями індивідуальних показників хворих.

Єдиним регулятором плазміногену, який постійно секретується ендотеліальними клітинами в активній формі є тканинний активатор плазміногену (ТАП) [154]. За фізіологічних умов та присутності фібрину, ТАП активує плазміноген у його активну форму – плазмін [155, 156]. ПАІ-1 є основним фізіологічним інгібітором ТАП у кровотоці. Існують відомості, що порушення балансу активаторно-інгібіторної системи синтезу плазміну, такі як підвищення рівня ПАІ-1 та зниження рівня ТАП асоційовані з високим ризиком ішемічної хвороби серця та інфаркту міокарда [157]. ПАІ-1 синтезується ендотеліальними клітинами судин та мегакаріюцитами. Цей інгібітор накопичується в  $\alpha$ -гранулах тромбоцитів у вигляді комплексу з вітронектином [154].

Наші результати показують, що у хворих через 1 рік після гострої фази обох підтипів ішемічного інсульту спостерігався аномальний рівень таких інгібіторів плазміногену як ТАП і ПАІ-1 (табл. 3.6). Зміни наведені у відсотках від контрольної групи, за умови, що рівень інгібіторів у крові здорових донорів був прийнятий за 100 %. Певна кількість пацієнтів з рівнем інгібітору, близьким до норми була наявна у кожній досліджуваній групі пацієнтів. 25 % пацієнтів, через 1 рік після КІ мали вищий рівень ПАІ-1 на 30 - 35 %. Для 20 % пацієнтів через 1 рік після АІ рівень ПАІ-1 був на 30 - 35 % вищий в порівнянні з показником практично здорових донорів.

Таблиця 3.6

## Рівень параметрів системи гемостазу у плазмі крові хворих на ішемічний інсульт

| Група, що досліджувалася  | Інгібітор активаторів плазміногену 1 типу, %                     | Тканинний активатор плазміногена, %   |
|---|--|---|
| Здорові донори, n = 35  | 100 ± 5,0  | 100 ± 5,0   |
| Пацієнти через 1 рік після атеротромботичного ішемічного інсульту, n = 45 | 140 % (для 20 % досліджуваних)<br>100 % (для 80 % досліджуваних) | 130 % (для 55 % досліджуваних)<br>65 % (для 20 % досліджуваних)<br>100 % (для 25 % досліджуваних) |
| Пацієнти через 1 рік після кардіоеMBOLІчного ішемічного інсульту, n = 41  | 135 % (для 25 % досліджуваних)<br>100 % (для 75 % досліджуваних) | 120 % (для 35 % досліджуваних)<br>70 % (для 15 % досліджуваних)<br>100 % (для 50 % досліджуваних) |

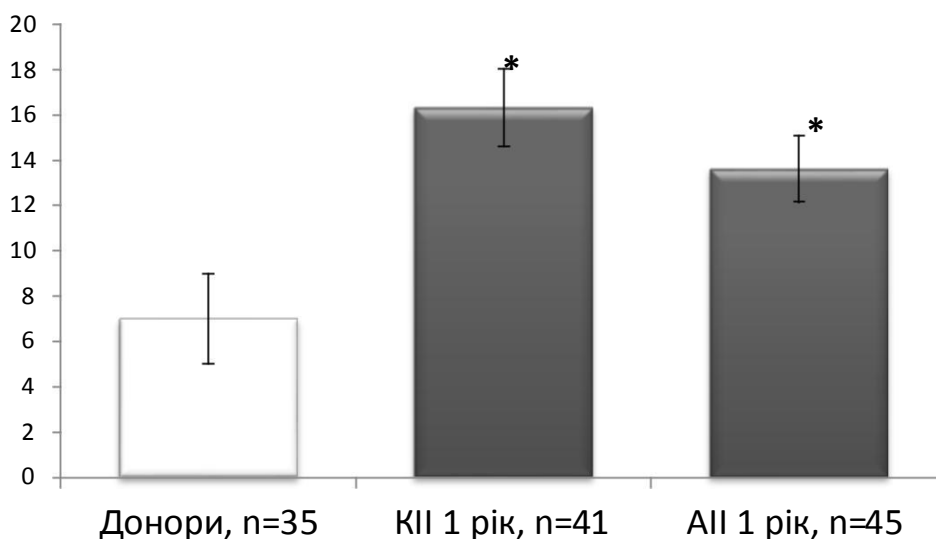
Щодо рівня ТАП у обох досліджуваних групах пацієнтів. Через 1 рік після перенесеного ішемічного інсульту обох підтипів спостерігалася наявність певної кількості людей з рівнем ТАП нижчим від норми. Таким чином, для 35 % пацієнтів з КІІ був характерний на 20 % вищий рівень інгібітору, але 15 % пацієнтів мали на 25 – 30 % нижчий рівень тканинного активатора плазміногену. 55 % пацієнтів з АІІ показали на 20 – 40 % вищий рівень, і 20 % пацієнтів, на 25 – 30 % нижчий рівень ТАП порівняно з нормою.

Аналіз рівня ПАІ-1 показали тісний зв'язок з концентрацією ТАП в плазмі крові в умовах ішемічного інсульту в тому числі через 1 рік після перенесеного захворювання.

На наступному етапі дослідження, для загальної характеристики стану системи фібринолізу хворих, було показано значне подовження часу



Хагеман-залежного фібринолізу для обох патологій (рис. 3.1). Як відомо основне призначення Хагеман-залежного фібринолізу полягає в «очищенні» циркуляторного русла від фібринових загустків, що утворюються в патологічних умовах [158]. Через 1 рік після перенесеної гострої фази АІІ, досліджуваний показник був в 1,9 рази подовжений, а для КІІ в 2,3 рази подовжений в порівнянні з аналогічним показником здорових донорів.

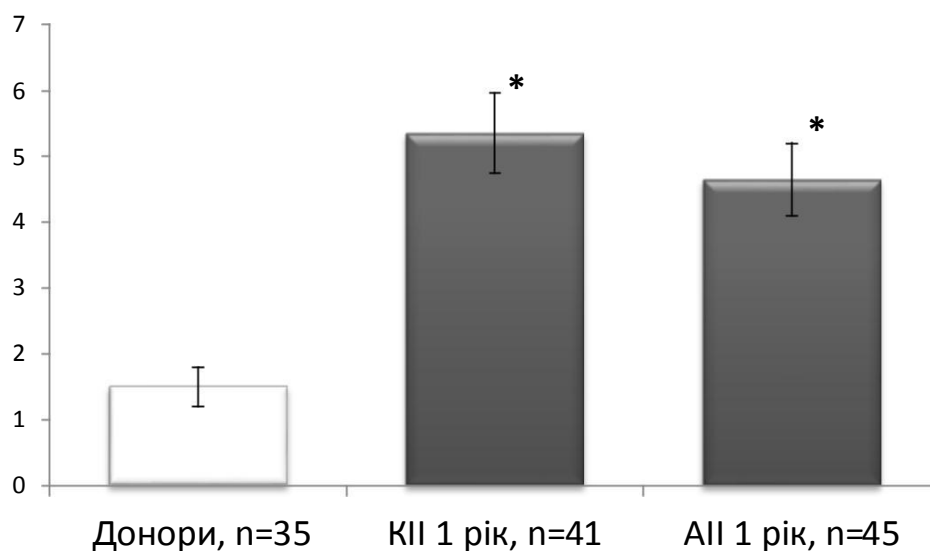


\* статистично достовірні зміни в порівнянні з показником донорів,  $p \leq 0,05$ .

Рис. 3.1 Рівень Хагеман-залежного фібринолізу у хворих з ішемічним інсультом

Ще один показник стану системи гемостазу є час лізису еуглобулінової фракції крові. Як відомо, основними факторами, які визначають поточний індекс є ПАІ-1, плазміноген, протромбін та  $\alpha 2$ -антиплазмін. Було показано, що час лізису еуглобулінів у хворих які 1 рік назад перенесли ішемічний інсульт був значним продовжений (рис. 3.2). В середньому досліджуваний час, який був необхідний для повного лізису згустку був у 3 рази довший для обох підтипів ішемічного інсульту. Таким чином, виявлені зміни є свідченням низької фібринолітичної здатності плазми крові у пацієнтів, які перенесли ішемічний інсульт, навіть через 1 рік після гострої фази захворювання.

Розвиток атеротромботичного і кардіоемболічного підтипів ішемічного інсульту характеризується подовженням часу лізису еуглобулінів та Хагеман-залежного фібринолізу. При цьому кардіоемболічний ішемічний інсульт супроводжувався більш загрозливими порушеннями.



\* статистично достовірні зміни в порівнянні з показником донорів,  $p \leq$

0,05. Рис. 3.2 Час лізису еуглобулінів у хворих з ішемічним інсультом

Отримані в ході дослідження результати свідчать про зменшену активність плазміногену, а також інгібітору  $\alpha_2$ -антиплазміну в плазмі крові у пацієнтів з атеротромботичним ішемічним інсультом. Обидва досліджувані патологічні стани супроводжувалися аномальним рівнем ТАП і ПАІ-1 у крові пацієнтів. Показано, що навіть через 1 рік після перенесеного ішемічного інсульту низький фібринолітичний потенціал плазми крові зберігається, що може стати причиною повторного загострення хвороби, та є свідченням необхідності більш довшого часу для повернення стану системи гемостазу в норму, або максимального наближення до неї.

Підсумовуючи вище перераховані результати, можна підкреслити, що в ході проведених досліджень нами було доведено, що через 1 рік після перенесеної гострої фази ішемічного інсульту, відповідно до більшості

досліджених нами параметрів системи гемостазу, тромботична загроза в організмі пацієнтів зберігається. Підвищена концентрація розчинних фібрин мономерних комплексів та фактору фон Віллебранда, понижена кількість тромбоцитів у плазмі крові, а також аномальний рівень інгібіторів плазміногену ТАП і ПАІ-1 є свідченнями збереження гіперкоагуляційного стану системи гемостазу у пацієнтів як з атеротромботичним, так і з кардіоемболічним ішемічним інсультом. На додаток до підвищеної реактивності коагуляційної ланки гемостазу у пацієнтів, по проходженні 1 року після ішемічної атаки, було зафіксовано значне подовження Хагеман-залежного фібринолізу та часу лізису еуглобулів, що є свідченням недостатньої активності параметрів фібринолітичної ланки системи гемостазу.

Отже, наші результати показують, що досить високим є ризик повторного загострення ішемічного інсульту навіть по проходженні 1 року після ішемічної атаки. Важливо зазначити, що загальний дисбаланс системи гемостазу зберігався, незважаючи на те, що протягом усього року проводилася терапія, спрямовані на оздоровлення та попередження повторних ішемічних атак. Отже, загроза рецидиву являється нагальною проблемою, яка потребує поглибленого та детального вивчення.

### **3.2. Якісна оцінка основних маркерів коагуляційної ланки систем гемостазу пацієнтів через 1 рік після атеротромботичного або кардіоемболічного підтипу ішемічного інсульту**

Природа ішемічного інсульту вирізняється етіологічною гетерогенністю. Зокрема, за численними літературними даними відомо, що близько 30 – 40 % випадків інсульту пов'язані з атеросклеротичним ураженням магістральних артерій голови; причиною 20 - 25 % інсультів є кардіогенні емболії; 25 - 30 % випадків ішемічних інсультів припадають на лакунарні інфаркти мозку, що є наслідком гіпертонічних змін судин;

приблизно 15 % ішемічних інсультів зумовлені гемодинамічними порушеннями; 10 % - гемореологічними порушеннями та коагулопатіями [159 - 161]. Виходячи з того, що етіологія підтипів інсульту різниться, можна зробити припущення, що існує ймовірність того, що розвиток тієї чи іншої патології може бути пов'язаний з білковим профілем плазми крові.

Сьогодні існує велика кількість відомостей щодо патогенезу та особливостей перебігу кожного з підтипів ішемічного інсульту, проте, жодних специфічних біохімічних маркерів, які можуть надати точну інформацію про етіологію інсульту не ідентифіковано [164 - 166]. Високі показники смертності від інсультів в Україні та за її межами, в багатьох випадках, обумовлені саме недостатністю знань про специфічні механізми, які лежать в основі кожного окремого підтипу ішемічного інсульту, а також недосконалістю системи надання допомоги хворим з цією патологією [162, 163].

Одним із шляхів вирішення цієї проблеми є детальне дослідження особливостей кожної окремої ланки системи гемостазу за розвитку різних підтипів інсульту, безсумнівно, буде корисним та необхідним кроком на шляху до виявлення конкретної причини хвороби кожного окремого пацієнта із серцево-судинними та судинно-мозковими порушеннями, оскільки довгострокові стратегії лікування для запобігання рецидивам можуть значно варіювати для різних підтипів ішемічного інсульту [167, 168].

На початку 50-х років минулого століття було встановлено, що перетворення фібриногену в фібрин, за дії тромбіну, пов'язано з ферментативним відщепленням від фібриногену коротких фібринопептидів [169]. 1980 році з'явилася робота Сміга, який досліджував продукти початкових етапів реакції фібриноген+тромбін [170]. Автор припустив існування розчинного димерного комплексу, що складається з двох молекул фібриногену, в кожній з яких відщеплений один фібринопептид А.

Стабільність розчинних олігомерів фібрину пов'язана з тим, що на їх кінцях, які складаються з мономерів desAA-фібрину, розташовуються мономерні

одиниці, що зберігають по одному фібринопептиду А. Його відщеплення забезпечує наступний етап полімеризації. Альтернативним поясненням отриманих даних може слугувати існування димеру, що складається з однієї молекули фібриногену та однієї desAA-фібрину.

Тромбін, що утворюється при активації системи зсідання крові, спершу відщеплює від фібриногену один фібринопептид А. При цьому утворюється фібрин desA, від якого в подальшому відщеплюється наступний фібринопептид А, утворюється фібрин desAA. Фібрин desA та фібрин desAA за рахунок специфічних нековалентних взаємодій можуть утворювати розчинні димерні або тримерні комплекси з фібриногеном та між собою. При подальшій полімеризації фібрин desAA утворює розчинні олігомери різної довжини, на кінцях яких можуть бути присутніми як молекули фібрину desAA, так і фібриногену. Такі надмолекулярні структури фібриногену і фібрину є компонентами розчинного фібрину, котрий у невеликих кількостях циркулює в плазмі крові навіть у нормі. За подальшого утворення тромбіну олігомери фібрину desAA ростуть у довжину з формуванням двониткових протофібрил, у яких молекули однієї нитки зміщені по відношенню до молекул другої нитки на половину довжини молекули. Довжина кожної нитки протофібрили складає в середньому 7 - 8 мономерних одиниць фібрину. На стадії утворення протофібрил різко збільшується швидкість відщеплення фібринопептидів В тромбіном, а фібрин desAA перетворюється на фібрин desAABВ. Протофібрили асоціюються між собою, формуючи фібрили, а ці в свою чергу, в результаті галуження та латеральної асоціації утворюють трьохмірну сітку фібрину, яка слугує каркасом тромбу [171].

Згодом окрім доведення існування розчинних олігомерних утворень фібрину та початкового продукту його плазмінової деградації X-фрагменту, були зроблені спроби з'ясувати природу цих полімерів та їх значення для діагностики передтромботичних станів, а також досліджено їх взаємодію з кінцевими продуктами плазмінового гідролізу фібрину (Д-, ДД-, Е-фрагменти). У випадку ДВЗ-синдрому, надмолекулярні утворення

включають комплекси «прошитих» форм фібрину, що містять X-фрагменти, фібрин desAA, фібрин desA і фібриноген. Стало очевидним, що в залежності від концентрації тромбіну, фактору XIII і плазміну формується широкий спектр олігомерних утворень, що містять різноманітні форми фібрину і продукти його розщеплення плазміном [172, 173]. Отже, підсумовуючи вищесказане, розчинний фібрин являє собою комплекси desA та desAA фібрину з фібриногеном і між собою. Вони організовані в олігомери різної довжини, на кінцях яких розташовані молекули фібриногену. У їх склад входять також продукти початкового розщеплення desAA фібрину плазміном, у молекулах яких відсутні  $\alpha$ C-домени (X-фрагменти) [174].

Незважаючи на велику кількість накопичених даних, проблема розчинного фібрину й досі лишається далекою від остаточного вирішення. Це пояснюється тим, що реальна ситуація *in vivo* набагато складніша, ніж умови експерименту *in vitro*. Очевидно, що структура розчинного фібрину може сильно варіювати при різних патологіях. А отже, потенційно, його якісні характеристики можуть відігравати роль специфічного маркера при тій чи іншій патології.

Тому для характеристики фракції РФМК, як складової частини білкового профілю плазми крові, за різних підтипів ішемічного інсульту ми отримали і детально охарактеризували дану фракцію у плазмі крові пацієнтів з атеротромботичним, а також кардіоеMBOLІЧНИМ ішемічним інсультом, як в гострий період хвороби, так і через 1 рік після перенесеної гострої фази.

Літературні джерела підтверджують свідчать про значне підвищення рівня РФМК у плазмі крові пацієнтів в гострий період ішемічного інсульту. Збереження підвищеної концентрації РФМК через 1 рік після гострої фази ішемічного інсульту було підтверджене нами раніше. Проте якісний склад фракції РФМК у пацієнтів з різними підтипами ішемічного інсульту ніколи не була досліджена.

Першим етапом дослідження їх якісного складу було електрофоретичне розділення фракції РФМК у поліакриламідному гелі (рис. 3.3).

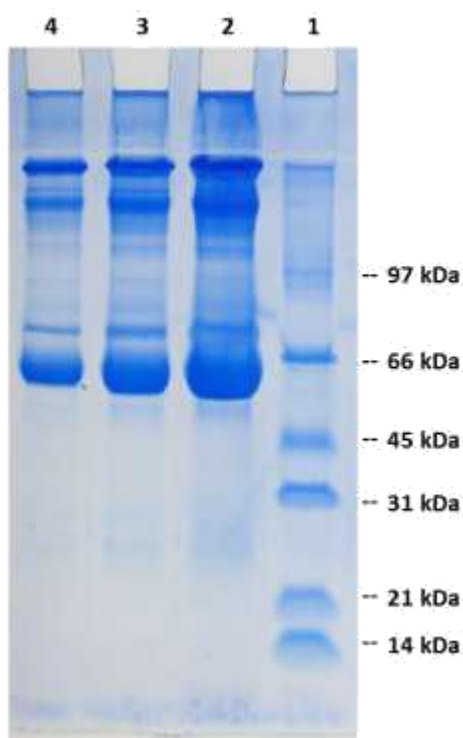


Рис. 3.3 Типова електрофореграма фракції РФМК, отриманих з плазми крові:

- 1 – маркери молекулярної маси;
- 2 – пацієнти з атеротромботичним ішемічним інсультом;
- 3 – пацієнти з кардіоеMBOLІчним ішемічним інсультом;
- 4 – здорові донори.

Електрофоретично було підтверджено наявність в усіх фракціях смуг з молекулярною масою в районі від 20 та понад 330 кДа. Однаковий білковий профіль був характерний для фракції отриманої з плазми крові як хворих пацієнтів так і здорових донорів.

Для оцінки концентраційного співвідношення між групами, фракція РФМК була виділена з однакового об'єму плазми кожної з досліджуваних груп пацієнтів. Даний результат відповідає проведеному нами раніше визначенню концентрації РФМК о-фенантроліновим методом для досліджуваних груп пацієнтів. Відтак, найбільш інтенсивні смуги відповідали треку № 2, тобто найбільша концентрація РФМК була детектована у фракції отриманої з плазми крові пацієнтів з АІ. Найменша концентрація РФМК спостерігалася у фракції практично здорових донорів.

Білки з молекулярною масою понад 330 кДа відповідали розчинним фібрин мономерним комплексам. Інші протеїни на електрофореграмі є результатом гідролізу фібрину та фібриногену плазміном в плазмі крові.

Після електрофоретичного розділення досліджувані фракції були перенесені на нітроцелюлозну мембрану для проведення Вестерн Блоттингу з використанням поліклональних антитіл проти фрагментів деградації фібриногену людини (рис. 3.4).

Відповідно до результатів якісного визначення складу фракції розчинних фібрин мономерних комплексів можемо стверджувати, що у плазмі крові практично здорових донорів циркулюють протеїни їх фрагменти та комплекси з молекулярними масами від 60 до 330 кДа та вище, антигенні детермінанти яких відповідають фрагментам деградації фібриногену та фібрину (табл. 3.7).

Фракції плазми хворих з ішемічним інсультом, характеризувалися значно більшою кількістю білків, їх фрагментів та комплексів з відомими антигенними детермінантами.

Таким чином, протеїни від 35 і до більш ніж 330 кДа були детектовані у фракції отриманої з плазми крові пацієнтів з ішемічним інсультом у гострій фазі хвороби. Фракції хворих через 1 рік після загострення обох підтипів інсульту мали ще більш різноманітний вміст, а саме вміщували білки, їх фрагменти та комплекси з молекулярними масами від 10 до 330 кДа та вище. При цьому використання методу Вестерн Блоттингу не показало суттєвої різниці між вмістом фракції РФМК в гостру фазу хвороби та через 1 рік після неї.

Отже, відповідно до отриманих результатів, можемо стверджувати, що кожна досліджувана фракція, як здорових донорів так і пацієнтів на різних стадіях хвороби, вміщувала фактор 1 системи зсідання крові – фібриноген – розчинний мультидоменний глікопротеїн з молекулярною масою 330 – 340 кДа, який складається з двох субодиниць, а кожна субодиниця з трьох поліпептидних ланцюгів: А $\alpha$  (~65 кДа), В $\beta$  (~50 кДа),  $\gamma$  (~45 кДа) [175-177].

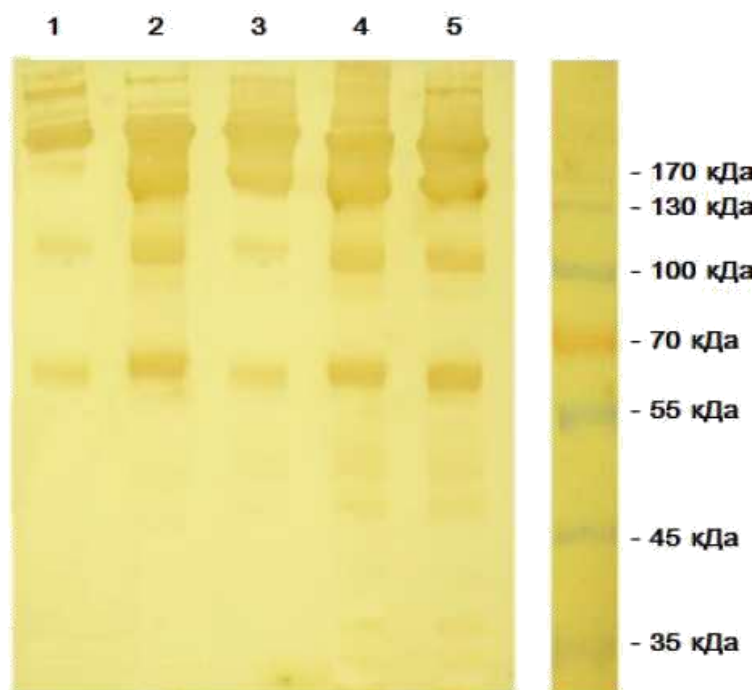


Рис. 3.4 Блоттограма фракції РФМК, отриманою з плазми крові:

- 1- здорові донори;
- 2 – пацієнти з АП;
- 3 – пацієнти з КП;
- 4 – пацієнти через 1 рік після АП;
- 5 – пацієнти через 1 рік після КП.

Таблиця 3.7

Результат вестерн блоттингу фракції РФМК

| Мол. маса,<br>кДа | Здорові<br>донори | Пацієнти з АП |       | Пацієнти з КП |       |
|-------------------|-------------------|---------------|-------|---------------|-------|
|                   |                   | Гостра фаза   | 1 Рік | Гостра фаза   | 1 Рік |
| >330              | +                 | +             | +     | +             | +     |
| 260-280           | +                 | +             | +     | +             | +     |
| 250               | +                 | +             | +     | +             | +     |
| 215-220           | +                 | +             | +     | +             | +     |
| 180-195           | +                 | +             | +     | +             | +     |
| 160               | +                 | +             | +     | +             | +     |

|     |   |   |   |   |   |
|-----|---|---|---|---|---|
| 130 | + | + | + | + | + |
| 100 | + | + | + | + | + |
| 80  | + | + | + | + | + |
| 60  | + | + | + | + | + |
| 45  | - | + | + | + | + |
| 35  | - | + | + | + | + |
| 25  | - | - | + | - | + |
| 10  | - | - | + | - | + |

Результатом фрагментації фібриногену є поява у плазмі X - фрагменту, молекулярна маса якого рівна 250 кДа. Подальша фрагментація X - фрагменту у місці утворення дисульфідного зв'язку призводить до утворення Y- та D - фрагменту з молекулярною масою 160 кДа та 100 кДа відповідно [178]. Як X- так і Y- та D- фрагменти були детектовані у кожній з досліджуваних фракцій. Наступний гідроліз Y- фрагменту призводить до утворення нового D та E- фрагменту. Молекулярна маса останнього рівна 60 кДа. Важливо підкреслити, що саме E-фрагмент фібриногену сьогодні викликає великий інтерес у зв'язку з його здатністю впливати на гемостаз, зокрема на формування атеросклеротичних бляшок, індукувати каталітичну активність молекули плазміногену, а також на функціональний стан тромбоцитів [179 - 181]. Численні дослідження підтвердили також здатність E-фрагмент фібриногену неферментативно активувати протромбін і індукувати каталітичну активність молекули плазміногену [182 - 184].

Завершальним етапом якісної характеристики фракції РФМК пацієнтів з різними підтипами ішемічного інсульту на різних стадіях хвороби був їх аналіз з використанням хроматографії, що поділяє за розмірами (рис. 3.5). Результати якого доповнюють результат Вестерн Блоттингу, та засвідчують присутність у досліджуваних фракціях білків, їх фрагментів та комплексів з молекулярними масами від 45 до більш ніж 330 кДа (табл. 3.8).

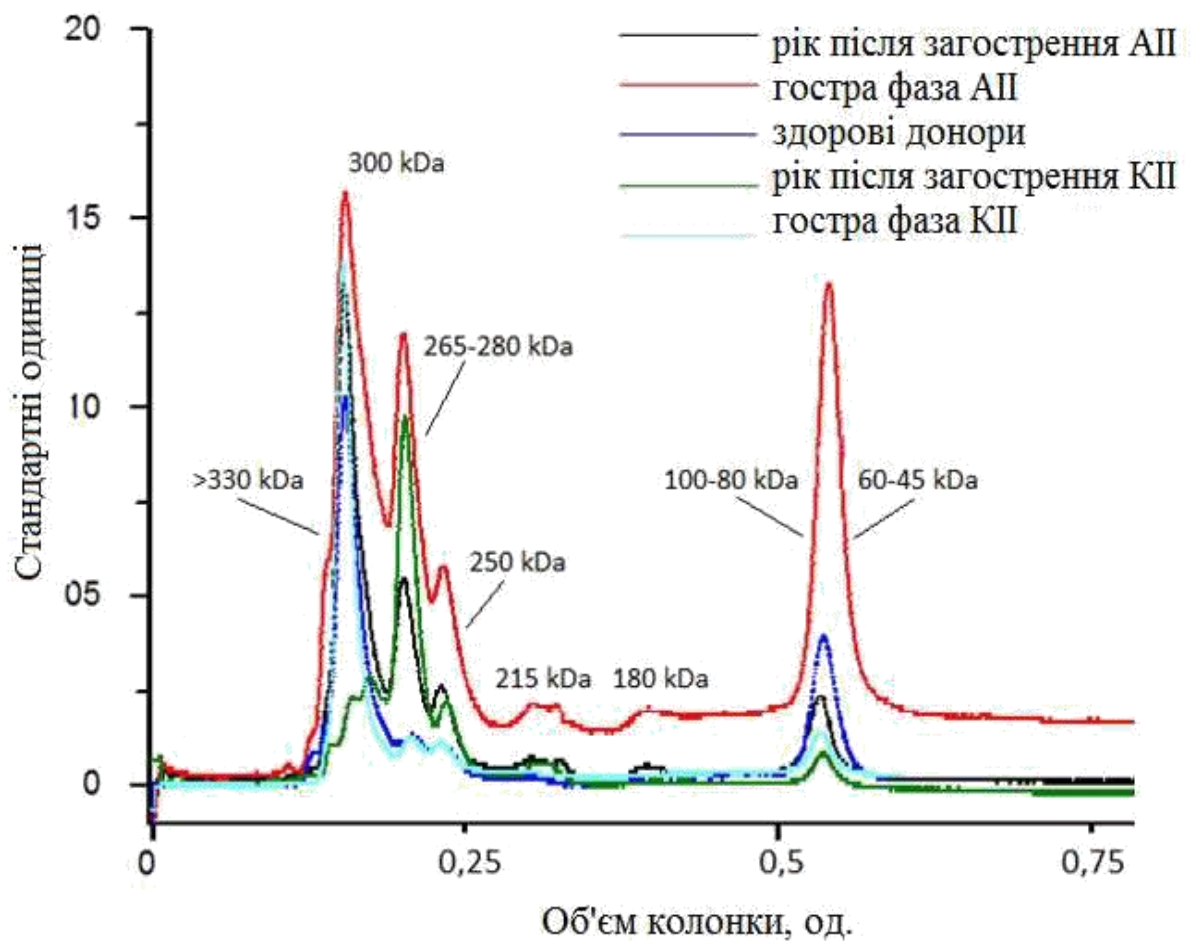


Рис. 3.5 Хроматограма фракції РФМК плазми крові пацієнтів з ішемічним інсультом.

Таблиця 3.8

Результати хроматографічного розділення фракції РФМК плазми крові пацієнтів з ішемічним інсультом на різних стадіях захворювання

| Досліджувана фракція | Площа під піками (ум.од.) | Кількість піків (шт.) | Об'єм буфер у елюції (од.) | ~Мг вмісту піків (кДа) | Висота піку (с.о.) |
|----------------------|---------------------------|-----------------------|----------------------------|------------------------|--------------------|
| Здорові донори       | 0,18918                   | 1                     | 0,15                       | >300                   | 10,10              |
|                      | 0,02729                   | 2                     | 0,23                       | 280                    | 0,90               |
|                      | 0,06337                   | 3                     | 0,24                       | 260                    | 0,80               |
|                      | 0,17065                   | 4                     | 0,51                       | 100-45                 | 4,05               |

|                                  |         |   |      |         |       |
|----------------------------------|---------|---|------|---------|-------|
| Пацієнти з АП                    | 0,29305 | 1 | 0,17 | 330-300 | 15,50 |
|                                  | 0,13172 | 2 | 0,23 | 265-280 | 12,53 |
|                                  | 0,09558 | 3 | 0,24 | 250     | 5,70  |
|                                  | 0,07276 | 4 | 0,35 | 215     | 1,75  |
|                                  | 0,0718  | 5 | 0,45 | 180     | 1,73  |
|                                  | 0,51635 | 6 | 0,51 | 100-45  | 13,00 |
| Пацієнти з КП                    | 0,14977 | 1 | 0,17 | 300     | 13,05 |
|                                  | 0,01753 | 2 | 0,23 | 280     | 0,90  |
|                                  | 0,05426 | 3 | 0,24 | 260     | 0,80  |
|                                  | 0,09486 | 4 | 0,51 | 100-45  | 1,01  |
| Пацієнти через<br>1 рік після АП | 0,1618  | 1 | 0,17 | 300     | 13,05 |
|                                  | 0,05549 | 2 | 0,23 | 265-280 | 5,40  |
|                                  | 0,03587 | 3 | 0,24 | 250     | 2,50  |
|                                  | 0,02209 | 4 | 0,35 | 215     | 0,70  |
|                                  | 0,02293 | 5 | 0,45 | 180     | 0,70  |
|                                  | 0,0767  | 6 | 0,51 | 100-45  | 2,42  |
| Пацієнти через<br>1 рік після КП | 0,06036 | 1 | 0,17 | 300     | 2,80  |
|                                  | 0,08166 | 2 | 0,23 | 265-280 | 9,50  |
|                                  | 0,0286  | 3 | 0,24 | 260     | 2,10  |
|                                  | 0,01414 | 4 | 0,35 | 215     | 0,60  |
|                                  | 0,03892 | 5 | 0,51 | 100-45  | 0,70  |

Відповідно до хроматографічного профілю загальний профіль елюції фракції РФМК був аналогічним для усіх досліджуваних патологій, з певними відхиленнями. Тобто кількість піків та об'єм буферу їх для елюції був подібним для усіх фракцій. Найбільша відмінність полягала у висоті піків, що є свідченням кількісної різниці вмісту фракції РФМК за різних патологій, а також на різних їх стадіях.

Відповідно до показника загальної площі під піками, яка відображає кількісний вміст фракції, найбільшу кількість білків вміщувала фракція РФМК плазми крові пацієнтів з АП в гострий період хвороби і була рівною 1.18 ум.од. Для фракції пацієнтів з гострим КП загальна площа під піками

була рівною 0.31 ум.од. Фракції пацієнтів які 1 рік назад перенесли ішемічну атаку вміщували значно меншу кількість білку, а саме їх площа складала 0.37 та 0.22 ум.од. для АП та КП, відповідно. Отже даний показник був значно більшим для атеротромблотичної ішемічної патології ніж для кардіоеMBOLІчної і в гострий період перевищував показник КП більш ніж в три рази. При цьому, навіть через 1 рік після гострої фази АП площа під піками залишалася значно більшою ніж така у гострий період КП. При цьому, фракції практично здорових донорів, площа під піками була рівною 0.45 ум.од. Дещо більша кількість РФМК у фракціях здорових донорів ніж у патологічних фракціях через 1 рік після хвороби може бути пояснена перебігом компенсаторних процесів в організми після хвороби.

Для повноцінного опису хроматографічного профілю варто розглянути окремо кожен пік. Отже пік який вміщував білки та їх комплекси з молекулярною масою понад 300 кДа був присутній у фракції РФМК за кожної патології, а також у практично здорових донорів, проте у фракції здорових донорів його висота була найменшою і складала 2.8 с.о. у фракції отриманої з плазми пацієнтів через 1 рік після перенесеного КП. Піки яким відповідали білки 265 – 280 кДа, а також 250 кДа спостерігалися в усіх досліджуваних фракціях. Проте, висота піків для різних патологій значно варіювала. Цікаво, що піки з протейнами 215 та 180 кДа були присутні лише у патологічних фракціях: АП як в гострий період так і через 1 рік, а також через 1 рік після КП. Можливо, саме ці протейни відіграють ключову роль за патології ішемічного інсульту, або є результатом фібринолізу тромбу. Пік, який вміщував протейни, їх фрагменти або комплекси з молекулярними масами від 45 до 100 кДа був ідентифікований в усіх фракціях, проте різнився за висотою. Найменша висота цього піку була характерна фракції за КП як в гострий період так і через 1 рік. Можливо саме зменшена кількість білків даного піку відіграють важливу роль в розвитку кардіоеMBOLІчного ішемічного інсульту, його рецидивів та його негативних наслідків.

Підсумовуючи отримані нами результати якісного аналізу раннього маркера гіперкоагуляційного стану системи гемостазу у пацієнтів з різними підтипами ішемічного інсульту в гострий період хвороби та через 1 рік після нього, можемо виділити присутність у фракціях окремих протеїнів, їх фрагментів, або комплексів, які були характерні тільки для певної патології, на тому чи іншому її етапі. Таким чином, можемо припустити ключову роль саме таких протеїнів у розвитку досліджуваних підтипів патології ішемічного інсульту.

Відповідно до отриманих нами результатів, досліджувана фракція РФМК, отримана з використанням 0,78 % 0-фенантроліну, окрім безпосередньо розчинних фрагментів фібриногену та фібрину – ранніх маркерів гіперкоагуляційного стану, вміщувала також численні продукти деградації фібриногену – маркери активації фібринолітичної ланки гемостазу. Відомо, що утворення у кровотоці останніх є результатом дії тромбіну, тому його подальше дослідження викликає особливий інтерес. На сьогодні проведена велика кількість функціональних досліджень саме цього ключового фактору системи гемостазу за різних патологічних станів, але повна та вичерпна відповідь щодо його залучення у ті чи інші порушення відсутня, або вона є вдякою та недостатньою [185]. Дослідження попередника тромбіну – протромбіну може покращити розуміння та більш глибоко пояснити отримані результати, тому наші наступні дослідження були зосереджені саме на цьому вітамін-К-залежному глікопротеїні плазми крові.

Асиметрична молекула протромбіну є одноланцюговою та має масу 72 кДа. Йому, як і фактору XII, плазміногену, та ряду інших, характерна наявність кринглових структур, функція яких полягає в регуляції взаємодії з субстратом, кофакторами чи рецепторами [9, 186]. Як один з ключових етапів коагуляції, протромбін разом з фактором Va та фактором Xa на фосфоліпідних мембранах тромбоцитів, за присутності іонів  $Ca^{2+}$ , формує

протромбіназний комплекс, головна функція якого полягає в каталітичній перетворенні протромбіна у тромбін [187, 188, 191, 192].

За літературними джерелами, концентрація протромбіну у плазмі крові пацієнтів з гострим ішемічним інсультом значно перевищує норму [193]. Наші попередні результати підтвердили повернення до норми рівня протромбіну у плазмі крові через 1 рік після перенесеної гострої фази. При цьому, було показано ряд порушень системи гемостазу, як на рівні коагуляційних, так і фібринолітичних процесів, пусковими білками яких був саме тромбін та його попередник. Тому наші наступні дослідження спрямовані на детальну характеристику якісного складу фракції протромбінового пулу в організмі пацієнтів з ішемічним інсультом на різних стадіях захворювання.

Виділення протромбінового пулу з плазми крові було проведене методом сорбування вітамін К-залежних білків на сірчаноокислому бар'ї. Наступним етапом роботи загальний пул вітамін К-залежних білків був охарактеризований електрофоретично. Результати підтвердили наявність як у фракції практично здорових донорів так і пацієнтів з патологіями ідентичних смуг які відповідали молекулярним масам від 20 до 250 кДа (рис. 3.6).

Відомо, що зовнішній шлях процесу згортання ініціюється тканинним фактором, який утворює комплекс з активованим білком плазми крові який належить до вітамін К-залежних - фактором VII, молекулярна маса якого рівна 55 кДа [189]. Далі відбувається активація іншого К-залежного фактора X (46 кДа), який в свою чергу, бере участь в активації тромбіну з протромбіну. Регулятивними антикоагулянтними білками даної фракції є одноланцюговий глікопротеїн протеїн S (84 кД), який є кофактором протеїну C (62 кДа) [190].

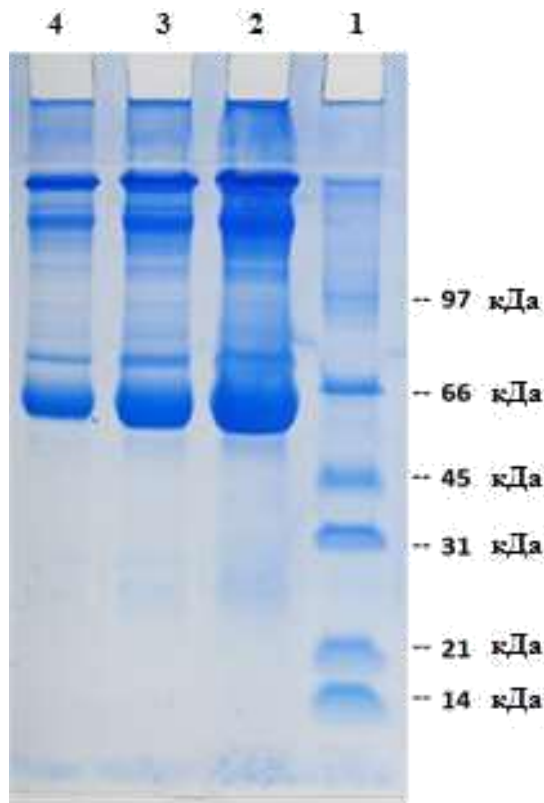


Рис. 3.6 Типова електрофореграма фракції протромбінового пулу, отриманих з плазми крові:

- 1 – маркери молекулярної маси;
- 2 – пацієнтів з атеротромботичним ішемічним інсультом;
- 3 – пацієнтів з кардіоемболічним ішемічним інсультом;
- 4 – здорових донорів.

Після електрофоретичного розділення досліджувані фракції вітамін К-залежних білків плазми крові були перенесені на нітроцелюлозну мембрану для проведення Вестерн Блоттингу з використанням поліклональних антитіл проти протромбіну людини, які дозволили оцінити вміст фракції на присутність білків з антигенними детермінантами тромбіну/протромбіну. (рис. 3.7).

Отримані результати підтвердили присутність білків, їх фрагментів та комплексів з молекулярними масами від 30 до 250 кДа (табл. 3.9). Різниця у вмісті фракцій здорових донорів і пацієнтів з патологіями підтверджено не було. Усі з досліджуваних фракцій вміщували білок з молекулярною масою 70-75 кДа та 37 кДа, які відповідають протромбіну та тромбіну.

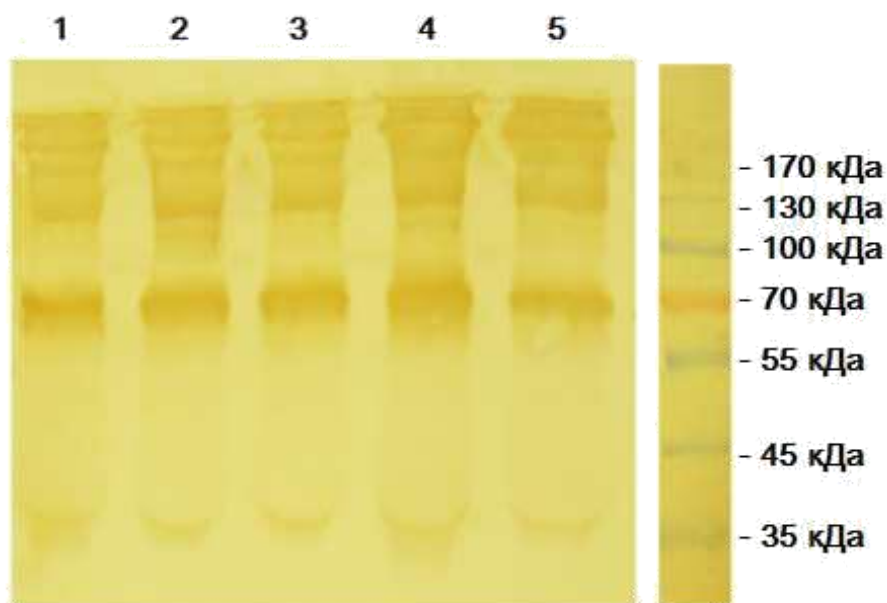


Рис. 3.7 Блоттограма фракції вітамін К-залежних білків, отриманих з плазми крові:

- 1 – здорових донорів;
- 2 – пацієнтів з атеротромботичним ішемічним інсультом;
- 3 – пацієнтів з кардіоемболічним ішемічним інсультом;
- 4 – пацієнтів через 1 рік після атеротромботичного ішемічного інсульту;
- 5 - пацієнтів через 1 рік після кардіоемболічного ішемічного інсульту.

Таблиця 3.9

Результати вестернблот аналізу фракції протромбінового пулу

| Мол. маса, кДа | Здорові донори | Пацієнти з АІІ |       | Пацієнти з КІІ |       |
|----------------|----------------|----------------|-------|----------------|-------|
|                |                | Гостра фаза    | 1 Рік | Гостра фаза    | 1 Рік |
| 240            | +              | +              | +     | +              | +     |
| 220            | +              | +              | +     | +              | +     |
| 200            | +              | +              | +     | +              | +     |
| 160            | +              | +              | +     | +              | +     |
| 130            | +              | +              | +     | +              | +     |
| 118            | +              | +              | +     | +              | +     |

|       |   |   |   |   |   |
|-------|---|---|---|---|---|
| 84    | + | + | + | + | + |
| 70-75 | + | + | + | + | + |
| 50    | + | + | + | + | + |
| 40    | + | + | + | + | + |
| 35    | + | + | + | + | + |

Результати хроматографічного розділення фракції вітамін К-залежних білків плазми крові підтверджують наявність білків з молекулярними масами від 70 до більш ніж 200 кДа. Кожна фракція вміщувала однакову кількість піків, з окремими виключеннями, проте їх висота різнилася (рис. 3.8, табл. 3.10).

Цікаво, що найбільша загальна площа під піками була характерна фракції отриманої з плазми крові пацієнтів з АП і вона була однаковою і в гострий період хвороби так і через 1 рік після перенесеного захворювання і була рівною 0.29 ум.од. Для фракції пацієнтів з КП площа становила 0.21 ум.од. в гострий період та 0.15 ум.од. через 1 рік після загострення. При цьому, для фракції практично здорових донорів цей показник був рівний 0.2 ум.од.

Піки яким відповідали білки та їх комплекси з молекулярними масами від більш ніж 200 та до 150 кДа був найвищим для фракції за АП. При цьому і для гострої фази і через рік після неї його висота була рівною 7.8 с.од. в середньому. Для усіх інших досліджуваних фракцій висота цього піку була значно меншою і відмінність між висотою піку здорових донорів та пацієнтів з КП була незначною.

Загальна тенденція була аналогічною й для піку, який вміщував білки з молекулярною масою 120 кДа, проте його висота була значно меншою ніж для піку 150 кДа. Важливо підкреслити, що лише для фракції здорових донорів висота піку з білками 120 кДа була вищою ніж для піку 150 кДа на 0.3 с.од. Ймовірно, саме пропорційне співвідношення білків з молекулярними

масами 150 і 120 кДа і є причиною, або результатом прогресування ішемічного інсульту в організмі.

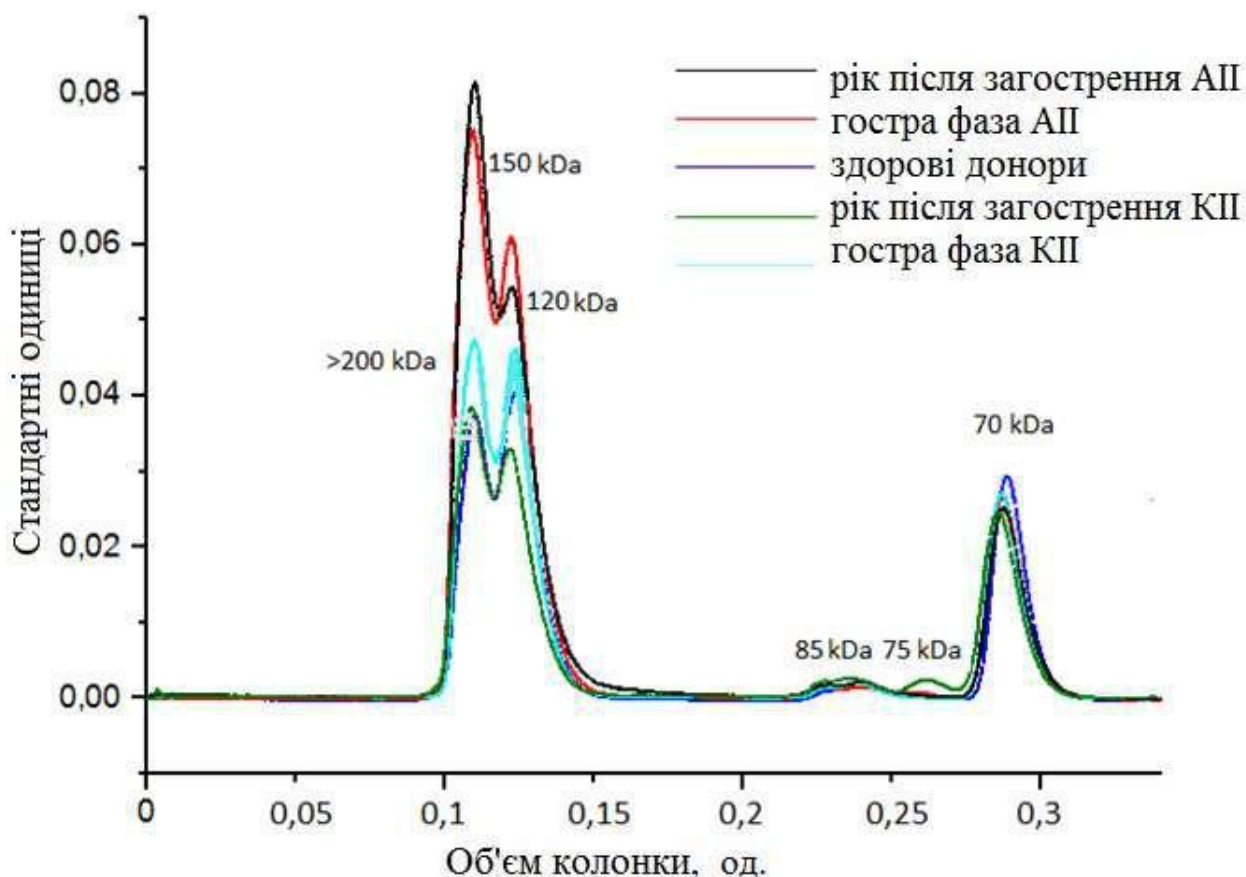


Рис. 3.8 Хроматограма фракції вітамін К-залежних білків плазми крові пацієнтів з ішемічним інсультом.

Пік якому відповідали білки з молекулярною масою в районі 75 кДа був ідентифікований лише у фракції плазми крові пацієнтів з КІІ які 1 рік назад перенесли гостру фазу хвороби, при цьому його висота становила 0.1 с.од. Можна припустити, що саме цей протеїн є результатом активації фібринолітичної ланки гемостазу через 1 рік після перенесеного КІІ.

Білки з молекулярною масою 70 кДа були ідентифіковані в кожній з досліджуваних фракцій. При цьому, даний пік був найвищим у фракції здорових донорів. Відповідно до цього, можемо припустити, що саме зменшення кількості протромбіну є передумовою або додатковою причиною ішемічного інсульту.

Результат хроматографічного розділення фракції вітамін К-залежних білків  
плазми крові пацієнтів з ішемічним інсультом на різних стадіях  
захворювання

| Досліджувана фракція              | Площа<br>під<br>піками<br>(ум.од.) | К-сть<br>піків<br>(шт.) | Об'єм<br>буферу<br>елюції<br>(од.) | ~Mr<br>вмісту<br>піків<br>(кДа) | Висот<br>а піку<br>(с.о.) |
|-----------------------------------|------------------------------------|-------------------------|------------------------------------|---------------------------------|---------------------------|
| Здорові донори                    | 0,23163                            | 1                       | 0,11                               | >200                            | 3,7                       |
|                                   | 0,31798                            | 2                       | 0,13                               | 120                             | 4,0                       |
|                                   | 0,03592                            | 3                       | 0,24                               | 85                              | 0,09                      |
|                                   | 0,21266                            | 4                       | 0,29                               | 70                              | 3,0                       |
| Пацієнти з АІІ                    | 0,47355                            | 1                       | 0,11                               | >200                            | 7,4                       |
|                                   | 0,44534                            | 2                       | 0,13                               | 120                             | 6,0                       |
|                                   | 0,0357                             | 3                       | 0,24                               | 85                              | 0,08                      |
|                                   | 0,19243                            | 4                       | 0,29                               | 70                              | 2,3                       |
| Пацієнти з КІІ                    | 0,29942                            | 1                       | 0,11                               | >200                            | 3,5                       |
|                                   | 0,32758                            | 2                       | 0,13                               | 120                             | 4,9                       |
|                                   | 0,02934                            | 3                       | 0,24                               | 85                              | 0,09                      |
|                                   | 0,18702                            | 4                       | 0,29                               | 70                              | 2,3                       |
| Пацієнти через 1 рік<br>після АІІ | 0,54775                            | 1                       | 0,11                               | >200                            | 8,1                       |
|                                   | 0,4079                             | 2                       | 0,13                               | 120                             | 5,2                       |
|                                   | 0,03625                            | 3                       | 0,24                               | 85                              | 0,09                      |
|                                   | 0,18709                            | 4                       | 0,26                               | 70                              | 2,2                       |
| Пацієнти через 1 рік<br>після КІІ | 0,24781                            | 1                       | 0,11                               | >200                            | 3,8                       |
|                                   | 0,25453                            | 2                       | 0,13                               | 120                             | 3,1                       |
|                                   | 0,03837                            | 3                       | 0,24                               | 85                              | 0,1                       |
|                                   | 0,01969                            | 4                       | 0,26                               | 75                              | 0,1                       |
|                                   | 0,18856                            | 5                       | 0,29                               | 70                              | 2,1                       |

Виділення фракцій як протромбінового пулу так і розчинних фібрин мономерних комплексів з подальшим приготуванням зразків для диск-електрофорезу, проведенням аналізу та кількісною обробкою даних є складним та довготривалим процесом, який не може бути застосований у медичній лабораторній практиці, проте, даний вид кількісного аналізу маркерів є значно більш інформативним за техніку візуальної інспекції, яка широко використовується у сучасній лабораторній практиці.

При цьому, використання хроматографії що поділяє за розмірами дає більш точну та деталізовану характеристику якісного білкового складу ніж Вестерн Блоттинг.

Окрім кількісних змін протеїнового профілю, були доведені його якісні відмінності у складі фракцій розчинних фібрин мономерних комплексів та протромбінового пулу для пацієнтів з ішемічним інсультом на різних етапах досліджуваного захворювання.

Проведене хроматографічне розділення дозволило ідентифікувати протеїни, їх фрагменти та комплекси, які були наявні лише у патологічних фракціях, та які могли відігравати роль причини або наслідку ішемічного процесу в організмі. А саме, білки з молекулярними масами 215 та 118 кДа у фракції РФМК були ідентифіковані лише за наявності досліджуваної патології в організмі. У цій же фракції було показане зменшення кількості білків з молекулярною масою від 40 до 100 кДа при кардіоеMBOLічному ішемічному інсульті. Можливо, понижена кількість того чи іншого протеїну в плазмі крові також може бути причиною рецидиву та тривалого збереження ризику повторного загострення хвороби. Присутність білка з молекулярною масою 75 кДа, з антигенною детермінантою тромбіна, лише у плазмі крові пацієнтів які 1 рік назад перенесли КІ, може мати важливе етіологічне значення, яке, на сьогодні, потребує подальшого та детального дослідження. Крім цього, можемо припустити, що зменшення кількості протромбіну є передумовою або результатом протікання патологічного процесу ішемічного інсульту в організмі.

Численні відмінності між кількісними та якісними характеристиками фракцій практично здорових донорів та пацієнтів які 1 рік назад перенесли ішемічну атаку є доказом відсутності повного відновлення нормального функціонування системи гемостазу через 1 рік після ішемічного інсульту. Отже загроза рецидиву має місце навіть по проходженню 1 року лікування після ішемічної атаки.

### **3.3. Вплив неспецифічних чинників на функціонування системи гемостазу за ішемічного інсульту на різних стадіях хвороби**

#### **3.3.1. Дослідження ефекторних властивостей IgG акумульованих в організмі за атеротромботичного та кардіоеMBOLІЧНОГО підтипів ішемічного інсульту**

Сьогодні існує чимало досліджень присвячених взаємоз'язку між розвитком серцево-судинних хвороб та акумулюванням антитіл у плазмі крові [10]. Доведена закономірність між розвитком патологій серцево-судинної системи, особливо тромботичних уражень, та підвищенням рівня антитіл класу G в організмі [194]. Вважається, що первинною мішенню для антифосфоліпідних антитіл, в тому числі антитіл класу G, є саме фосфоліпідзв'язуючі білки, а не окремі молекули фосфоліпідів, як вважалося раніше. У пацієнтів, яким був характерний підвищений вміст антитіл до кардіоліпіну та бета-2-глікопротеїну-1 частіше діагностували інсульти, інфаркти, артеріальні тромбози судин нижніх кінцівок, судинний головний біль та ураження клапанного апарату серця. Відомо, що взаємодія антитіл із мішенями проходить на мембранах клітин судинної стінки, при цьому, може мати місце ураження ендотелію, що, в свою чергу, спричиняє ендотеліальну дисфункцію, яка є основною причиною тромбозів та атеросклерозу [195]. Літературні дані підтверджують, що дана група антитіл може взаємодіяти з

попередником тромбіну - протромбіном. Антитіла до протромбіну, відтак, здатні бути ефекторами хронометричних тестів, зокрема, можуть виступати компонентом системи патологічних інгібіторів зсідання. Ряд дослідників розглядають антифосфоліпідні антитіла як окремий незалежний фактор ризику захворювань серцево-судинної системи [195 - 197].

Патологічна активація складових імунної системи має місце за великої кількості хвороб [198]. Системний склероз, ревматоїдний артрит, діабет, системний червоний вовчак, тиреоїдит та інші аутоімунні захворювання супроводжувалися появою у кровотоці аутоантитіл. [199, 200]. Такі аутоантитіла можуть виступати предикторами як самої хвороби, так і швидкості її прогресування [201, 202]. Незважаючи на важливу діагностичну та прогностичну цінність аутоантитіл, їх роль в патогенезі аутоімунних розладів до цих пір залишається дискусійним питанням [203]. Накопичення антитіл до власних антигенів організму може відігравати роль ефектора порушень системи гемостазу в напрямку посиленого тромбоутворення [204 - 206]. Виходячи з вищесказаного ми зробили припущення про можливе залучення акумульованих після ішемічного інсульту імуноглобулінів класу G у рецидив ішемічної атаки. У зв'язку з цим, нами було досліджено потенціальний вплив імуноглобулінів класу G, накопичених в організмі в результаті різних підтипів ішемічного інсульту, на процес гідролізу специфічного хромогенного субстрату ключовими параметрами системи гемостазу.

Першим етапом було визначення концентрації IgG у плазмі крові досліджуваних груп пацієнтів (табл.3.11). Відтак, для практично здорових донорів цей показник становив  $7,0 \pm 0,5$  мг/мл. Попередні дослідження, а також літературні дані підтверджують значне підвищення рівня IgG у гостру фазу атеротромботичного ішемічного інсульту [206]. Проте, через 1 рік після перенесеного захворювання їх рівень повертається в норму. Оскільки патологічні процеси мають місце навіть через 1 рік після хвороби, при цьому рівень IgG відповідає показнику практично здорових

донорів, можемо припустити, що причиною є не кількісні, а саме якісні зміни в структурі після акумульованих в результаті ішемічного інсульту та циркулюючих кровотоці IgG.

Таблиця 3.11

| Досліджувана група |             | Концентрація, мг/мл |
|--------------------|-------------|---------------------|
| Здорові донори     |             | 7,0 ± 0,5           |
| Пацієнти з АІІ     | Гостра фаза | 9,3±0,3*            |
|                    | 1 Рік       | 6,5±0,5             |
| Пацієнти з КІІ     | Гостра фаза | 7,7±0,4             |
|                    | 1 Рік       | 6,0±0,3             |

\* - достовірні зміни відносно здорових донорів,  $p \leq 0,05$ .

IgG були отримані методом афінної хроматографії плазми крові на протеїн А сефарозі (рис. 3.9). Для підтвердження чистоти отриманої хроматографічно фракції IgG був проведений диск-електрофорез, в тому числі з додаванням  $\beta$ -меркаптоетанола для руйнування дисульфідних зв'язків у молекулі IgG (рис. 3.10).

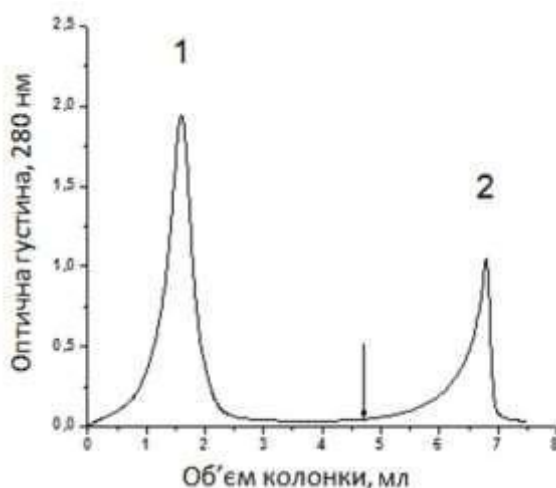


Рис. 3.9 Типова хроматографія отримання IgG з плазми крові

1. Незв'язана фракція;
2. Імуноглобуліни класу G.

Стрілкою позначене місце зміни рН буфера для елюції IgG

Відповідно до літературних джерел та попередніх досліджень для подальшої роботи IgG використовувалися у фінальній концентрації 1,2 мг/мл.

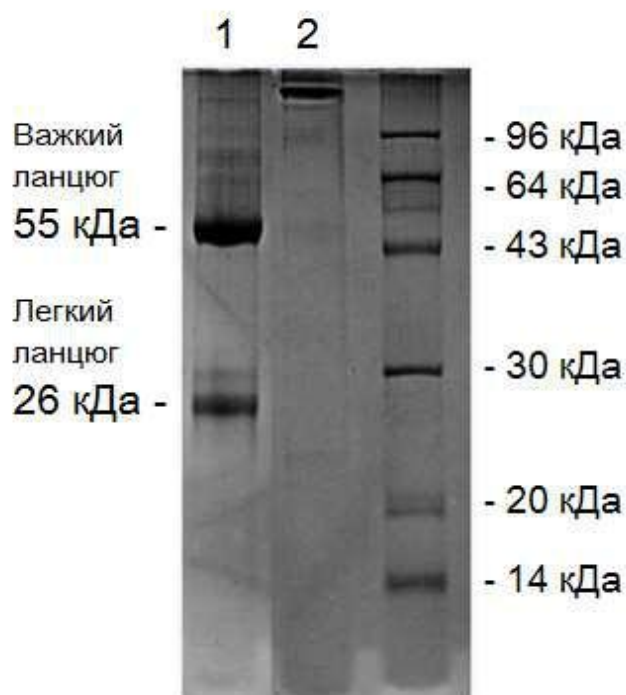


Рис. 3.10 Типова електрофореграма отриманих хроматографічно імуноглобулінів класу G з плазми крові пацієнтів з ішемічним інсультом

- 1 – Імуноглобуліни класу G в присутності  $\beta$ -меркаптоетанолу (важкий та легкий ланцюги IgG);
- 2 – Нативні імуноглобуліни класу G.

Наступним етапом була проведена серія експериментів для перевірки потенційного впливу IgG отриманих з плазми крові пацієнтів з АІІ та КІІ, як в гострий період хвороби так і через 1 рік після гострої фази, на процес гідролізу специфічного хромогенного субстрату факторами системи гемостазу (тромбін та фактор Ха), а також факторами після їх активації з відповідних проферментів екзогенними активаторами (протромбін та протеїн С) у плазмі крові здорових донорів.

Тромбін, фактор X і протеїн С є ключовими факторами системи гемостазу, які беруть участь або є регуляторами головних етапів коагуляції та

антикоагуляції. Тромбін проявляє специфічну протеолітичну та гормональну функцію. Порушення регуляторної функції тромбін грає важливу роль в розвитку захворювань серцево-судинної системи. Таким чином, активація тромбіном з попередника протромбіну є одним із важливіших регуляторних процесів [207]. Фактор Ха бере участь в активації протромбіну і є одним з ключових факторів на якому сходяться зовнішні і внутрішні шляхи зсідання крові [208]. Протеїн С виконує функцію головного антикоагулянта, а також модулює фібриноліз, запальні процеси та індукцію сигнальних шляхів [209].

У якості контролю, усі маніпуляції проводили з пробою яка не вміщувала IgG. Важливо підкреслити що вплив IgG здорових донорів відповідав показнику контрольної проби, яка не вміщувала IgG.

Таким чином спектрофотометрично вимірювали рівень вивільненого р-нітроаніліну в результаті гідролізу специфічного хромогенного субстрату відповідним ферментом за присутності у середовищі інкубації фракції IgG отриманої з плазми крові пацієнтів на різних стадіях АІІ та КІІ. Перш за все, було доведено відсутність впливу фракції IgG на кожен з компонентів інкубаційного середовища, в тому числі на хромогенний субстрат (рис. 3.11).

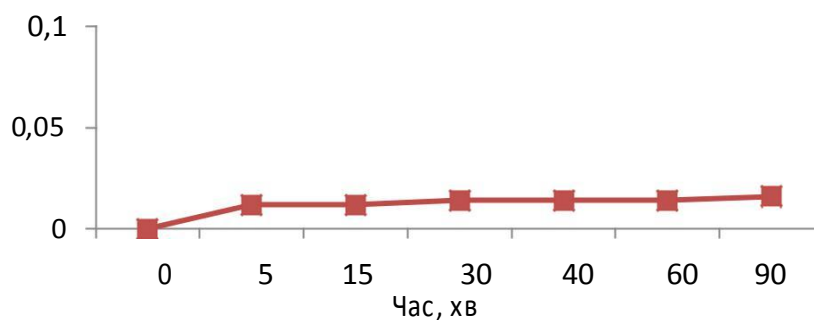
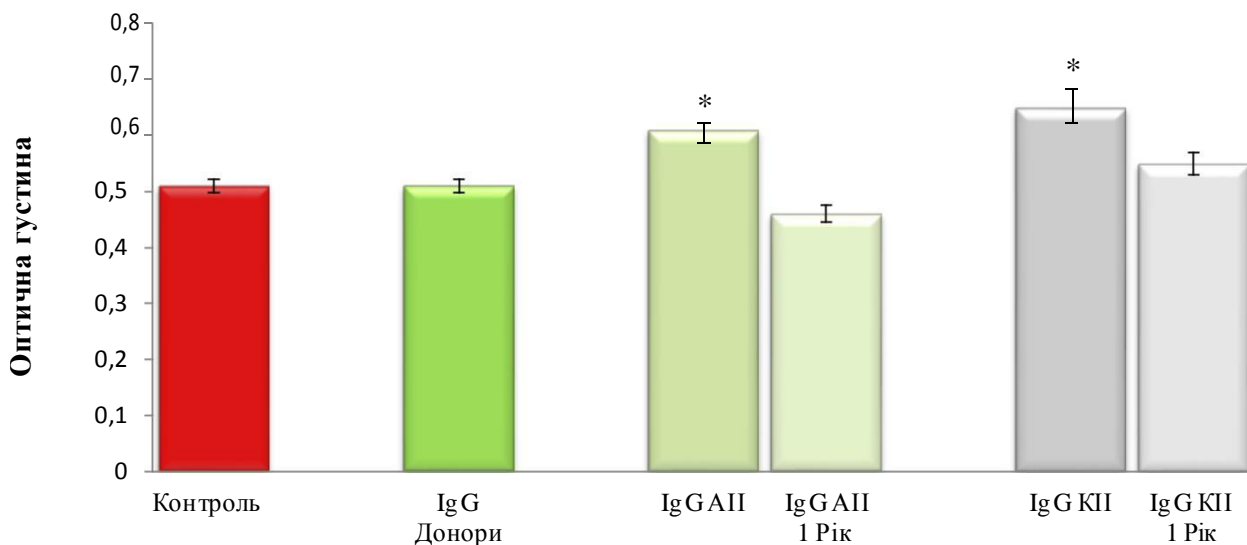


Рис. 3.11 Типовий вплив фракції IgG на хромогенні субстрати досліджуваних ферментів гемостазу S<sub>2366</sub> (протеїн С), S<sub>2765</sub> (фактор Ха), S<sub>2238</sub> (тромбін)

Підвищення рівня гідролізу субстрату тромбіном, під впливом IgG плазми крові пацієнтів в гостру фазу як АІІ так і КІІ, порівняно з контрольною пробою, показано на рисунку 3.12. А саме, IgG гострої фази КІІ підвищували активність процесу гідролізу субстрату тромбіном на 28 % та АІІ на 20 %. Вплив IgG отриманих з плазми крові пацієнтів через 1 рік після

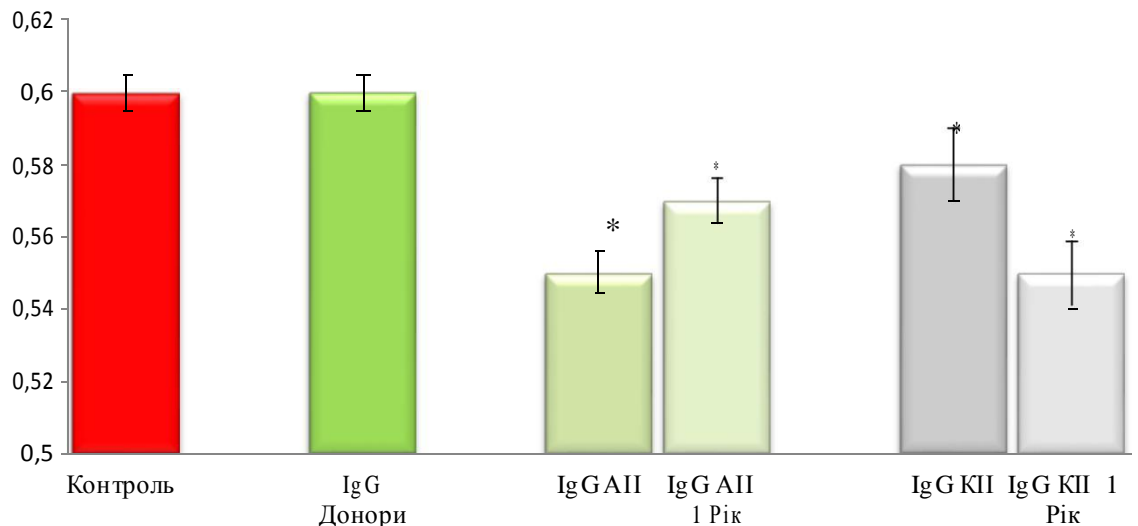
перенесеної гострої фази не спричинював достовірного ефекту на досліджуваний процес.



\* достовірні зміни в порівнянні з здоровими донорами,  $p \leq 0,05$ .

Рис. 3.12 Гідроліз хромогенного субстрату тромбіном за дії IgG у концентрації 1,2 мг/мл.

Отримані результати засвідчують інгубуючий ефект фракції IgG за усіх досліджуваних патологій на процес гідролізу специфічного хромогенного субстрату фактором Ха (рис. 3.13). Цікаво, що фракція IgG отримана з плазми крові пацієнтів з КІІ проявила підсилення інгубуючого ефекта імуноглобулінів з часом. Відтак, IgG гострої фази КІІ пригнічували активність фактору Ха на 5 % та через 1 рік після перенесеної гострої фази КІІ рівень інгібування був рівний 8 %. Для IgG плазми крові пацієнтів з АП спостерігався протилежний ефект зменшення інгібуючого впливу з часом перебігу хвороби. Таким чином, IgG гострої фази АП інгібували процес гідролізу субстрату фактором Ха на 8 %, а через рік після загострення АП ефект становив 5 %.



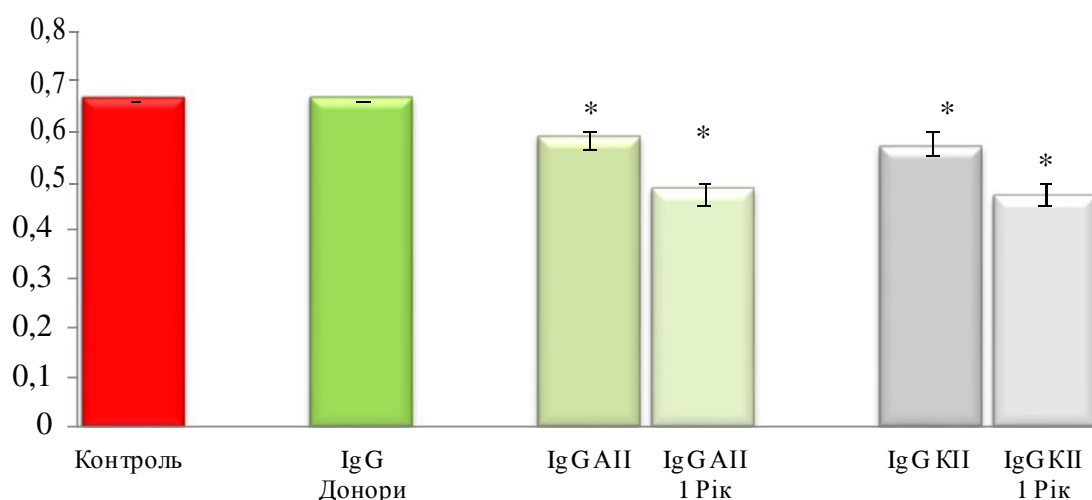
\* достовірні зміни в порівнянні з здоровими донорами,  $p \leq 0,05$ .

Рис. 3.13 Гідроліз хромогенного субстрату фактором Ха за дії IgG у концентрації 1,2 мг/мл.

Гідроліз специфічного хромогенного субстрату тромбіном, активованим з його проферменту протромбіну специфічним екзогенним активатором екамуліном, у плазмі крові, був значно заінгібованим під впливом фракції IgG за кожної з досліджуваних патологій в гостру фазу, при цьому, через 1 рік після ішемічної атаки інгібуючий ефект IgG підсилювався (рис. 3.14).

Зокрема, IgG плазми крові пацієнтів в гострій фазі АІІ пригнічували гідроліз субстрату тромбіном, активованим з протромбіну у плазмі крові на 12 %. IgG з плазми крові пацієнтів через 1 рік після АІІ інгібували досліджуваний процес на 27 %.

Аналогічний ефект спостерігався для фракції IgG за КІІ, а саме інгібування на 15 % під впливом IgG гострої фази КІІ, та на 30 % для IgG через 1 рік після гострої фази КІІ.



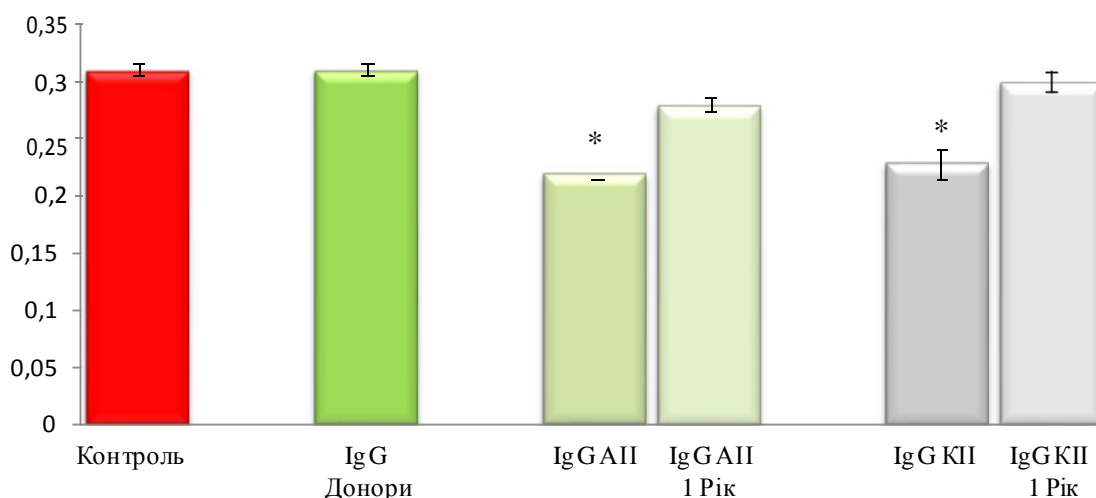
\* достовірні зміни в порівнянні з здоровими донорами,  $p \leq 0,05$ .

Рис. 3.14 Гідроліз хромогенного субстрату тромбіном після активації в плазмі крові за дії IgG у концентрації 1,2 мг/мл

Інгібування процесу гідролізу специфічного хромогенного субстрату протеїном С, активованим з його проферменту у плазмі крові, на 29 %, було спричинене фракцією IgG отриманою з плазми крові пацієнтів з АІІ у гострій фазі захворювання (рис. 3.15).

Через 1 рік після АІІ статистично достовірних змін досліджуваного параметра знайдено не було. IgG гострої фази КІІ інгібували процес гідролізу специфічного хромогенного субстрату протеїном С на 26 %, в той час як через 1 рік після КІІ фракція IgG не спричинювала статистично достовірного впливу.

Відповідно до отриманих нами результатів, можемо стверджувати, що IgG утворені в організмі в результаті ішемічного інсульту проявляють ефекторні властивості по відношенню до факторів системи гемостазу.



\* достовірні зміни в порівнянні з здоровими донорами,  $p \leq 0,05$ .

Рис. 3.15 Гідроліз хромогенного субстрату протеїном С після активації в плазмі крові за дії IgG у концентрації 1,2 мг/мл

Тромботичний ефект IgG гострої фази як АІІ так і КІІ, проявлявся у пригніченні процесу гідролізу специфічного хромогенного субстрату головним антикоагулянтним фактором гемостазу - протеїном С, а також у активації досліджуваного процесу пусковим фактором зсідання крові – тромбіном. Проте, спостерігалось інгібування гідролізу субстрату тромбіном активованим з протромбіну у плазмі крові, що є свідченням непрямой дії IgG на фермент. При цьому, для останнього, інгібуючий вплив IgG пацієнтів через 1 рік після ішемічного інсульту був значно більшим в порівнянні з впливом IgG пацієнтів у гострій фазі.

Аналогічним був вплив IgG щодо фактору Ха, який є неодмінним компонентом протромбіназноко комплексу, та залучений у процес активації протромбіна у тромбін.

Наступним етапом нашого дослідження була перевірка впливу фракції IgG за ішемічного інсульту на різних етапах хвороби на АДФ-залежну агрегацію тромбоцитів (табл. 3.12). Контрольна агрегація тромбоцитів

здорових донорів проводилася без додавання фракції IgG. Вплив IgG здорових донорів на досліджуваний процес відповідав контрольній пробі.

Таблиця 3.12

Вплив IgG плазми крові пацієнтів з ішемічним інсультом на АДФ-залежну агрегацію тромбоцитів здорових донорів

| Досліджувана група             |             | Ступінь агрегації тромбоцитів, % |
|--------------------------------|-------------|----------------------------------|
| Контрольна агрегація (Без IgG) |             | 42,5 ± 5,2                       |
| Здорові донори                 |             | 42,3 ± 8,1                       |
| Пацієнти з АІІ                 | Гостра фаза | 63,6 ± 5,6*                      |
|                                | 1 Рік       | 51,8 ± 10,4*                     |
| Пацієнти з КІІ                 | Гостра фаза | 61,1 ± 5,2*                      |
|                                | 1 Рік       | 48,4 ± 11,5*                     |

\* достовірні зміни в порівнянні з контрольною агрегацією,  $p \leq 0,05$ .

Ступінь агрегації тромбоцитів за дії IgG плазми крові пацієнтів в гострій фазі як АІІ так і КІІ була в середньому на 15 % більшою в порівнянні з контрольною пробою. Дія фракції IgG плазми крові хворих через 1 рік після інсульту полягала у підвищення ступеня агрегації тромбоцитів здорових донорів на 26 % для АІІ та на 20 % для КІІ в порівнянні з контрольною пробою.

Таким чином, можемо стверджувати, що фракція IgG, як в гостру фазу так і через 1 рік після перенесеного ішемічного інсульту, здатна активувати агрегацію тромбоцитів здорових донорів. Проте, цей ефект зменшується з часом перебігу хвороби.

Наступним етапом дослідження ефекторних властивостей IgG, утворених в організмі за патології, була перевірка їх здатності активувати тромбоцити дорových донорів. А саме, після інкубації досліджуваних фракцій IgG з фракцією чистих тромбоцитів здорових донорів, у середовищі інкубації методом Вестерн Блотингу була перевірена наявність білків, які у нормі

містяться у гранулах тромбоцитів, та вивільняються з них лише у разі активації останніх.

В результаті хроматографії, що поділяє за розмірами, була отримана фракція чистих тромбоцитів здорових донорів та електрофоретично було підтверджено відсутність будь яких білків у фракції тромбоцитів (рис. 3.16). Фракція, яка вміщувала лише цілі клітинні була взята для подальшої роботи.

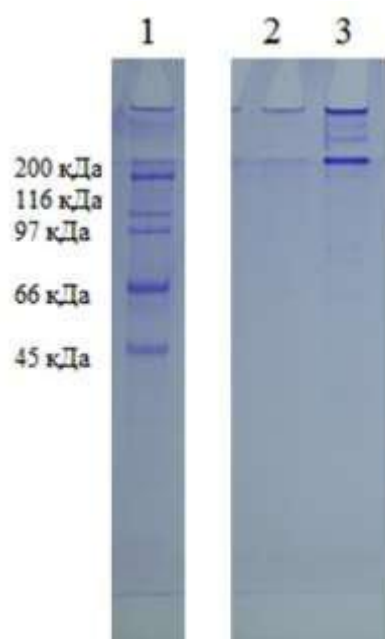


Рис. 3.16 Електрофореграма елюата хроматографічного отримання тромбоцитів

1. Маркери молекулярної маси (120 кДа, 116 кДа, 97 кДа, 66 кДа, 45 кДа);
2. Тромбоцити;
3. Білкові домішки.

Активация тромбоцитів в результаті їх інкубації протягом 30 хвилин з досліджуваними фракціями антитіл у концентрації 0,7 мг/мл була доведена електрофоретично. Ряд білків було детекровано у середовищі інкубації після внесення фракції IgG (рис. 3.17). У якості контролю використовувався колаген, природній компонент судинної стінки, який зв'язується з глікопротеїном Іа-ІІа на мембрані тромбоцитів, відіграє роль індуктору їх

активації та агрегації. Відповідно до отриманих результатів, активуючий ефект на тромбоцити проявляли IgG отримані з плазми крові як пацієнтів з ішемічним інсультом, так і здорових донорів. Активуючий ефект полягав у вивільненні з гранул тромбоцитів білків з молекулярними масами від 30 до 230 кДа.

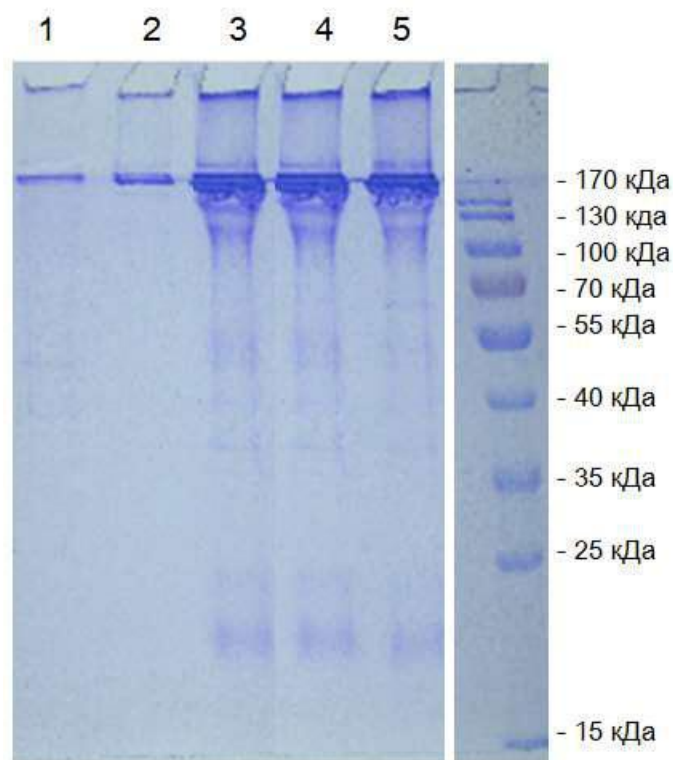


Рис. 3.17 Типова електрофореграма середовища інкубації тромбоцитів з:

1. Контроль (Колагеном);
2. Контроль (Тромбоцити);
3. IgG плазми крові здорових донорів;
4. IgG плазми крові пацієнтів з атеротромботичним ішемічним інсультом;
5. IgG плазми крові пацієнтів з кардіоеMBOLІЧНИМ ішемічним інсультом.

Використання поліклональних антитіл проти фактору фон Віллебранда, який задіяний безпосередньо у агрегації тромбоцитів, дозволило оцінити вплив IgG на акумуцію фактору фон Віллебранда у середовищі інкубування, в результаті вивільнення з  $\alpha$ -гранул тромбоцитів (рис. 3.18, табл. 3.13).

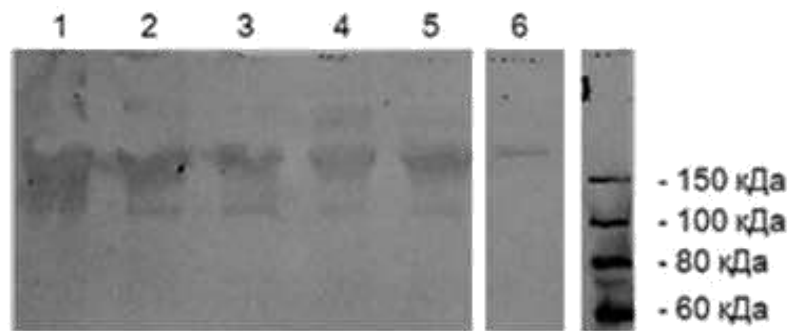


Рис. 3.18 Вестерн блотинграма фактору фон Віллебранда у середовищі інкубації тромбоцитів з IgG плазми крові:

1. Здорових донорів;
2. Пацієнтів з АІІ;
3. Пацієнтів з КІІ;
4. Пацієнтів через 1 рік після АІІ;
5. Пацієнтів через 1 рік після КІІ;
6. Контроль (Колаген).

Таблиця 3.13

Результати вестерн блот аналізу інкубаційного середовища тромбоцитів з використанням антитіл проти фактору фон Віллебранда

| Мол. маса, кДа | Колаген | Здорові донори | Пацієнти з АІІ |       | Пацієнти з КІІ |       |
|----------------|---------|----------------|----------------|-------|----------------|-------|
|                |         |                | Гостра фаза    | 1 Рік | Гостра фаза    | 1 Рік |
| 330            | -       | +              | +              | +     | +              | +     |
| 300            | -       | +              | +              | +     | +              | +     |
| 270            | -       | +              | +              | +     | +              | +     |
| 246            | +       | -              | -              | -     | -              | -     |
| 240            | -       | +              | +              | +     | +              | +     |
| 167            | -       | +              | +              | +     | +              | +     |
| 97             | -       | +              | +              | +     | +              | +     |

Відповідно до отриманих результатів, можемо стверджувати, що IgG плазми крові, як пацієнтів з ішемічним інсультом, так і практично здорових донорів, при контакті з тромбоцитами, спричинюють секрецію фактору фон

Віллебранда, який побудований з двох субодиниць, з'єднаних дисульфідним зв'язком, з сумарною молекулярною масою рівною 270 кДа [229]. Крім цього були ідентифіковані комплекси фактору фон Віллебранда з іншими білками загальними молекулярними масами 300 кДа та 333 кДа. Також середовище інкубації вміщувало фрагменти досліджуваного протеїну з молекулярними масами 240 кДа, 167 кДа, 97 кДа та 54 кДа. Деякі з них були ідентифіковані у літературних джерелах. Наприклад, відомо, що фактор фон Віллебранда синтезується у вигляді неактивного попередника, в результаті процесингу якого відщеплюється продукти по 240 кДа та 97 кДа. Процес відбувається на ЕПР та за участі апарату Гольджі ендотеліальних клітин [227, 228]. На противагу, колаген спричинює секрецію з тромбоцитів фрагмента фактору фон Віллебранда з молекулярною масою в районі 245 кДа.

На наступному етапі, використання поліклональних антитіл проти інгібітора активаторів плазміногену 1-го типу – головного месенджера дисфункції тромбоцитів, дозволило оцінити вплив IgG на його акумуляцію у середовищі інкубування в результаті вивільнення з  $\alpha$ -гранул тромбоцитів (рис. 3.19, табл. 3.14).

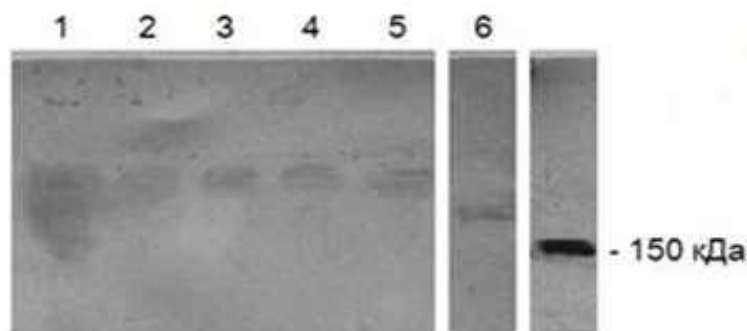


Рис. 3.19 Вестерн блотограма інгібітора активаторів плазміногену 1-го типу у середовищі інкубації тромбоцитів з IgG плазми крові:

1. Здорових донорів;
2. Пацієнтів з АП;
3. Пацієнтів з КП;
4. Пацієнтів через 1 рік після АП;

5. Пацієнтів через 1 рік після КІІ;
6. Контроль (Колаген).

Таблиця 3.14

Результати вестерн блот аналізу інкубаційного середовища тромбоцитів з використанням антитіл проти інгібітора активаторів плазміногену 1-го типу

| Мол. маса, кДа | Колаген | Здорові донори | Пацієнти з АІІ |       | Пацієнти з КІІ |       |
|----------------|---------|----------------|----------------|-------|----------------|-------|
|                |         |                | Гостра фаза    | 1 Рік | Гостра фаза    | 1 Рік |
| 280            | -       | +              | +              | +     | +              | +     |
| 210            | -       | +              | +              | +     | +              | +     |
| 170            | +       | +              | -              | -     | -              | -     |

Нами було детектовано присутність у середовищі інкубації тромбоцитів з досліджуваними фракціями IgG фрагментів ПАІ-1 з молекулярними масами 280 кДа та 210 кДа. Крім того, фракція IgG отримана з плазми крові практично здорових донорів спричинювала секрецію фрагменту з молекулярною масою в районі 170 кДа. Така ж молекулярна маса фрагменту ПАІ-1 була характерна для середовища інкубації тромбоцитів з колагеном.

Інгібітор активаторів плазміногену 1-го типу, а також його комплексні форми та фрагменти добре охарактеризовані у літературі. Зокрема, відомо, що молекулярна маса ПАІ-1 у комплексі з ТАІІ та вітронектином складає більш ніж 700 кДа; комплекс ПАІ-1 лише з вітронектином 450 кДа; а функціонально неактивна вільна форма ПАІ-1 відповідає 52 кДа [229 - 231]. Детектовані нами фрагменти ПАІ-1 не зустрічаються у літературі, а отже потребують наступних детальних досліджень.

### **3.3.2. Визначення ефекторних властивостей пептидного пулу, акумульованого в організмі за атеротромботичного та кардіоеMBOLічного підтипів ішемічного інсульту**

Протягом тривалого часу, пептидний пул організму розглядався як набір продуктів деградації білків, які не мали будь-якої біологічної функції. Проте, нещодавні спостереження пояснили значення протеїнів, молекулярна маса яких не перевищує 5 кДа, та підтвердили їх роль у підтримці гомеостазу організму, зокрема, в регуляції проліферації, диференціюванні і загибелі клітин [213 - 216]. Висока стабільність пептидного пулу за фізіологічних умов дозволяє нам зробити припущення про їх участь в регулюванні довгострокових процесів, наприклад у імунному статусі тощо [217 - 220]. Було встановлено, що формування пептидного пулу у кровотоці може бути результатом фолдингу функціональних білків організму (ферментів, структурних, транспортних або захисних білків) [217, 218, 221, 222]. При цьому, основній масі пептидів характерна присутність біологічної активності. Зокрема, 600 ендогенних пептидів з регуляторною активністю, були ідентифіковані нещодавно [218, 223, 224]. Інші дослідження, довели здатність пептидів викликати деконденсацію гетерохроматину до активного еухроматину, підсилюючи транскрипцію генів [225]. Наявність кореляції між зростанням концентрації пептидного пулу та порушенням нормального функціонування тканин, дозволили розглядати пептидний пул як маркер функціонального співвідношення клітин в тканинах [221, 226]. Будь-які порушення клітин, тканини або органів, в результаті патологічних умов, викликають суттєві зміни в якісних і кількісних характеристиках пептидного пулу організму. Таким чином, пептидний пул розглядається як показник біохімічного статусу і фізіологічного стану організму. Показано, що концентрація пептидного пулу підвищується за широкого спектру патологічних станів, таких як цукровий діабет обох типів, опіки, гострий панкреатит та інші [210-212]. Ми досліджували пептидний пул та його

ефекторні властивості за різних підтипів ішемічного інсульту та на різних етапах захворювання.

Електрофоретично було доведено виділення нами фракції загального пулу протеїнів з молекулярною масою до 5 кДа без високомолекулярних білкових домішок з плазми крові досліджуваних груп пацієнтів (рис. 3.20).

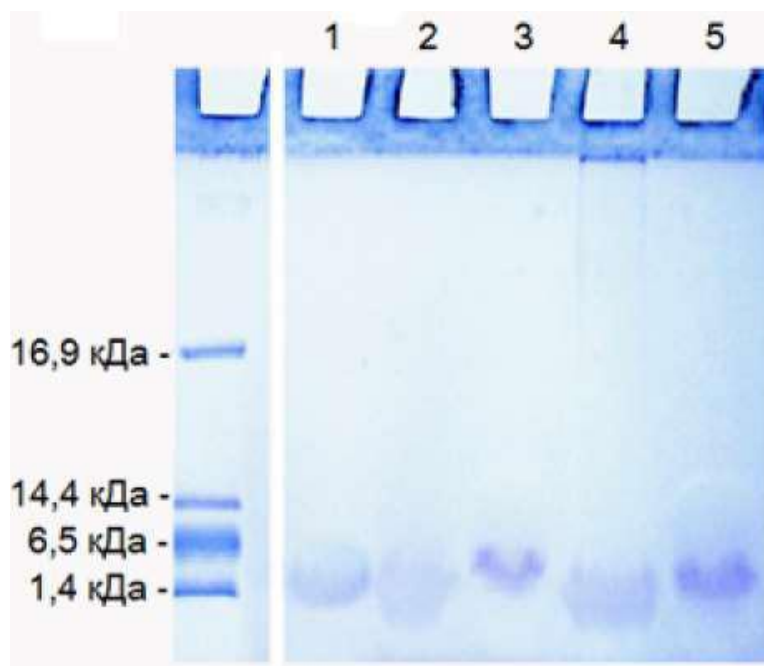


Рис. 3.20 Електрофореграма пептидного пулу отриманого з плазми крові:

1. Здорових донорів;
2. Пацієнтів з АІ;
3. Пацієнтів з КІ;
4. Пацієнтів через 1 рік після АІ;
5. Пацієнтів через 1 рік після КІ.

В гостру фазу як атеротромботичного так і кардіоемболічного ішемічного інсульту концентрація пептидного пулу в організмі була значно підвищеною, порівняно з показником здорових донорів, проте через 1 рік після перенесеного захворювання цей показник повертався до норми (табл. 3.15). Концентрація пептидного пулу у плазмі крові пацієнтів з досліджуваною патологією перевищувала концентрацію пептидного пулу здорових донорів в

3 рази для пацієнтів з гострим АІІ, та в 2,5 рази для пацієнтів з гострим КІІ. У плазмі крові здорових донорів цей показник становив  $0,68 \pm 0,018$  мг/мл.

Таблиця 3.15

Концентрація пептидного пулу пацієнтів з різними підтипами ішемічного інсульту на різних стадіях хвороби

| Досліджувана група |             | Концентрація пептидного пулу, мг/мл |
|--------------------|-------------|-------------------------------------|
| Здорові донори     |             | $0,068 \pm 0,018$                   |
| Пацієнти з АІІ     | Гостра фаза | $0,214 \pm 0,054^*$                 |
|                    | 1 Рік       | $0,099 \pm 0,023$                   |
| Пацієнти з КІІ     | Гостра фаза | $0,174 \pm 0,047^*$                 |
|                    | 1 Рік       | $0,069 \pm 0,021$                   |

\* достовірні зміни в порівнянні з донорами,  $p \leq 0,05$ .

Наступним етапом нашої роботи була перевірка впливу пептидного пулу пацієнтів з ішемічним інсультом на АДФ-залежну агрегацію тромбоцитів здорових донорів. Контрольна агрегація тромбоцитів здорових донорів проводилася без додавання фракції пептидного пулу.

Зокрема, порівняно з контрольною пробою, фракція пептидного пулу здорових донорів інгібувала досліджуваний процес на 10 %. Відтак, пептидний пул за гострої фази АІІ пригнічував агрегацію тромбоцитів донорів на 12 % та за гострої фази КІІ на 23 %. Через 1 рік після перенесеного захворювання інгібуючий ефект фракцій пептидного пулу за патології значно збільшувався, та за АІІ інгібував реакцію на 23 %, за КІІ на 30 % відповідно (табл.3.16).

Таким чином, отримані результати підтвердили, що ефекторні властивості пептидного пулу характерні не лише патологічним фракціям, але і у фракції здорових донорів. Проте, фракції пептидного пулу за досліджуваних патологій проявили значно більш інтенсивне інгібування агрегації тромбоцитів. При чому, з часом перебігу хвороби рівень

інгібування збільшувався. Крім того, пептидний пул за КІІ проявив інтенсивніші ефекторні властивості порівняно з АІІ.

Таблиця 3.16

Вплив пептидного пулу за різних підтипів ішемічного інсульту на АДФ-залежну агрегацію тромбоцитів здорових донорів

| Досліджувана фракція           |             | Спутінь агрегації тромбоцитів, % |
|--------------------------------|-------------|----------------------------------|
| Контрольна агрегація (Без ПІІ) |             | 61 ± 1,2                         |
| Здорові донори                 |             | 55 ± 1,5*                        |
| Пацієнти з АІІ                 | Гостра фаза | 53 ± 2,1*                        |
|                                | 1 Рік       | 47 ± 2,3*                        |
| Пацієнти з КІІ                 | Гостра фаза | 48 ± 2,4*                        |
|                                | 1 Рік       | 44 ± 1,6*                        |

\* достовірні зміни в порівнянні з контрольною агрегацією,  $p \leq 0,05$ .

Оскільки, незважаючи на повернення до норми концентрації пептидного пулу у плазмі крові через 1 рік після ішемічного інсульту, його ефекторна здатність щодо агрегації тромбоцитів, була значно інтенсивнішою через 1 рік після перенесеного захворювання, цей факт може слугувати передумовою для припущення різниці у якісному складі пептидного пулу у досліджуваних фракціях. Тому, для оцінки їх якісних характеристик було проведене хроматографічне розділення (рис. 3.21., табл. 3.17).

Загальна площа під піками для фракції акумульованих в організмі за ішемічного інсульту у гостру фазу хвороби узгоджуються з отриманим нами раніше концентраціями пептидного пулу в плазмі за відповідної патології. А саме, загальна площа під піками для фракції здорових донорів була рівна 263 ум.од. В той час, в гостру фазу хвороби, як для АІІ так і для КІІ, цей показник становив 1648 ум.од. Через 1 рік після ішемічної атаки для КІІ загальна площа під піками була рівною 3417 ум.од., та для АІІ - 2631 ум.од.

Пептидному пулу здорових донорів був характерний лише один пік, якому відповідали протеїни з молекулярною масою 1,32 кДа. Об'єм буферу елюції для цього піку був рівний  $0,7 \pm 0,1$  штук об'ємів колонки. Ідентичний пік був знайдений у кожній патологічній фракції. Проте, його висота була значно більшою для останніх.

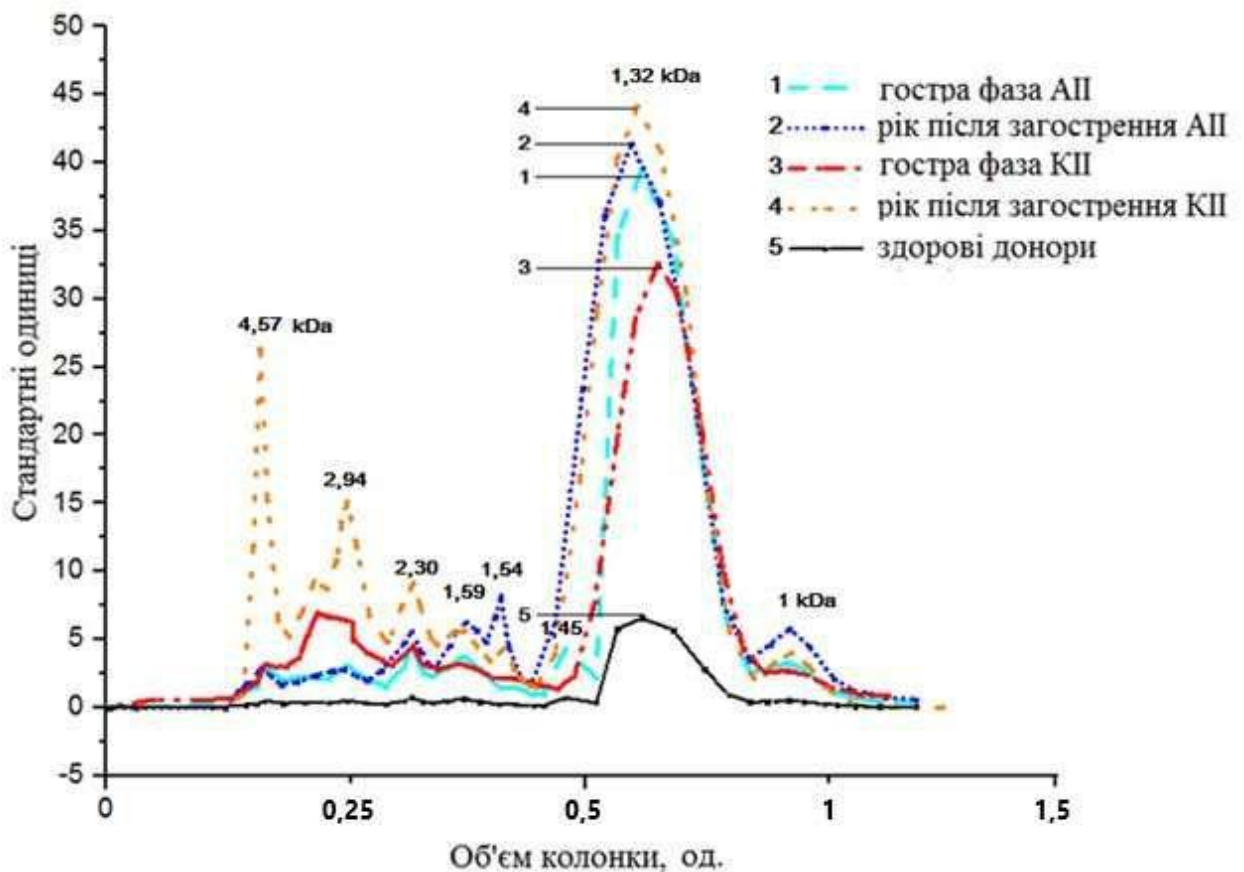


Рис. 3.21 Хроматографічне розділення пептидного пулу отриманого з плазми крові:

1. Пацієнти з АП;
2. Пацієнти через 1 рік після АП;
3. Пацієнти з КП;
4. Пацієнти через 1 рік після КП;
5. Здорові донори.

Таблиця 3.17

## Результати хроматографічного розділення фракції пептидного пулу

| Досліджувана фракція           | Площа під піками (ум.од.) | К-сть піків (шт.) | Об'єм буферу елюції (од.) | ~Mr вмісту піків (кДа) | Висота піку (с.о.) |
|--------------------------------|---------------------------|-------------------|---------------------------|------------------------|--------------------|
| Здорові донори                 | 263                       | 1                 | 0,6                       | 1,32                   | 7,0                |
|                                | 1656                      | 1                 | 0,2                       | 4,56                   | 2,0                |
|                                |                           | 2                 | -                         | -                      | -                  |
|                                |                           | 3                 | 0,25                      | 2,30                   | 4,2                |
|                                |                           | 4                 | 0,3                       | 1,59                   | 2,4                |
| Пацієнти з АІІ                 | 1640                      | 5                 | -                         | -                      | -                  |
|                                |                           | 6                 | 0,4                       | 1,45                   | 2,5                |
|                                |                           | 7                 | 0,7                       | 1,32                   | 39,5               |
|                                |                           | 8                 | 0,9                       | 1,00                   | 2,1                |
|                                |                           | 1                 | 0,2                       | 4,56                   | 2,2                |
|                                |                           | 2                 | 0,25                      | 2,95                   | 6,9                |
|                                |                           | 3                 | 0,4                       | 2,30                   | 4,2                |
|                                |                           | 4                 | 0,5                       | 1,59                   | 2,3                |
| Пацієнти з КІІ                 | 2631                      | 5                 | -                         | -                      | -                  |
|                                |                           | 6                 | -                         | -                      | -                  |
|                                |                           | 7                 | 0,7                       | 1,29                   | 32,6               |
|                                |                           | 8                 | 0,9                       | 1,00                   | 2,0                |
|                                |                           | 1                 | 0,2                       | 4,57                   | 2,5                |
|                                |                           | 2                 | -                         | -                      | -                  |
|                                |                           | 3                 | 0,3                       | 2,30                   | 5,1                |
|                                |                           | 4                 | 0,35                      | 1,59                   | 6,0                |
| Пацієнти через 1 рік після АІІ | 3417                      | 5                 | 0,4                       | 1,55                   | 6,2                |
|                                |                           | 6                 | -                         | -                      | -                  |
|                                |                           | 7                 | 0,7                       | 1,34                   | 41,4               |
|                                |                           | 8                 | 0,9                       | 1,00                   | 6,0                |
| Пацієнти через 1               | 3417                      | 1                 | 0,2                       | 4,57                   | 26,1               |

|               |   |      |      |      |
|---------------|---|------|------|------|
| рік після КІІ | 2 | 0,25 | 2,94 | 15,1 |
|               | 3 | 0,3  | 2,30 | 9,1  |
|               | 4 | 0,4  | 1,59 | 6,3  |
|               | 5 | 0,6  | 1,54 | 3,0  |
|               | 6 | -    | -    | -    |
|               | 7 | 0,7  | 1,32 | 44,1 |
|               | 8 | 0,9  | 1,00 | 2,7  |

Таким чином висота піку з пептидами 1,32 кДа для фракції здорових донорів була рівна 7,0 с.о., в той час для фракції через 1 рік після АІІ висота становила 41,4 с.о. та для АІІ - 44,1 с.о. Для фракцій через 1 рік після КІІ – 39,5 с.о., та для КІІ – 32,6 с.о. Окрім піку з протеїнами в 1,32 кДа, патологічні фракції пептидного пулу вміщували пептиди з молекулярними масами 4,56 кДа; 2,30 кДа; 1,59 кДа та 1 кДа. Проте, висота піків для різних підтипів ішемічного інсульту та різних стадій хвороби варіювала.

Цікаво, що пік, якому відповідали пептиди з молекулярною масою 2,95 кДа був характерний лише для фракцій за КІІ, як в гострий період так і через 1 рік після нього. Об'єм буферу елюції для даного піку був рівний  $0,25 \pm 0,05$  од. об'ємів колонки. При цьому, фракція пептидного пулу через 1 рік після КІІ вміщувала більшу кількість пептидів 2,95 кДа, оскільки висота піку була рівна 15,1 с.о. та більш ніж в два рази перевищувала висоту цього ж піка для фракції за гострого КІІ, яка була рівна 6,9 с.о. Відповідно до отриманих нами раніше результатів, щодо впливу пептидного пулу на агрегацію тромбоцитів, можемо зробити припущення про причетність ефektorних властивостей на рівні інгібування тромбоцитів саме пептидам з молекулярною масою 2,95 кДа у фракції ПІІ за протікання КІІ в організмі. Пік, якому відповідали пептиди з молекулярною масою 1,45 кДа був присутній лише у фракції за гострого АІІ. Його висота становила 2,5 с.о., та об'єм елюції був рівним 0,4 од. об'ємів колонки. Для фракцій через 1 рік після як АІІ так і КІІ була характерна наявність піку з молекулярною масою пептидів  $1,54 \pm 0,01$  кДа. У

гострий період хвороби пептиди 1,59 кДа були відсутні. Припускаємо, що підвищення інгібування агрегації тромбоцитів фракціями пептидного пулу через рік після перенесеної гострої фази може бути індуковане пептидами з молекулярною масою 1,59 кДа. Об'єм елюції цих пептидів був рівним 0,35 од. об'ємів колонки.

Таким чином, можемо стверджувати, що фракції пептидного пулу різняться за своїм якісним та кількісним складом не тільки в межах різних підтипів ішемічного інсульту, але і на різних етапах захворювання. Хроматографічне розділення фракції дозволяє зробити припущення про причетність того чи іншого пептиду до ефекторних властивостей пулу, проте точне підтвердження теорії потребує подальших детальних досліджень.

Наступним етапом досліджували вплив пептидного пулу на процес гідролізу специфічного хромогенного субстрату ключовими факторами системи гемостазу. У якості контролю усі маніпуляції проводили з пробою яка не вміщувала пептидний пул. Таким чином, спектрофотометрично вимірювали рівень вивільненого р-нітроаніліну в результаті гідролізу специфічного хромогенного субстрату відповідним ферментом за присутності у середовищі інкубації фракції пептидного пулу плазми крові пацієнтів на різних стадіях АІ та КІІ.

Пептидний пул доводили до кінцевої концентрації, яка відповідала концентрації пептидного пулу в плазмі крові пацієнтів у відповідних фізіологічних умовах (з відповідним підтипом ішемічного інсульту на відповідній стадії захворювання). Окрім цього, перевіряли вплив пептидного пулу у концентраціях втричі більшій, вдвічі меншій, та в чверть меншій за таку.

Перш за все, було доведено відсутність впливу пептидного пулу на кожен з компонентів інкубаційного середовища, зокрема безпосередньо на хромогенний субстрат (рис. 3.22).

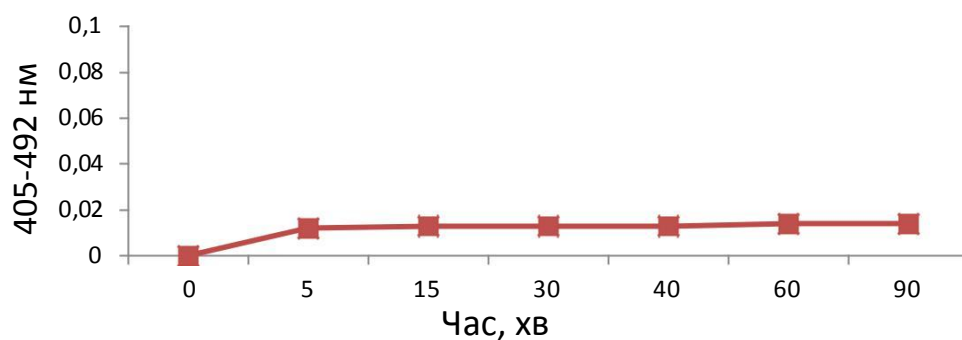
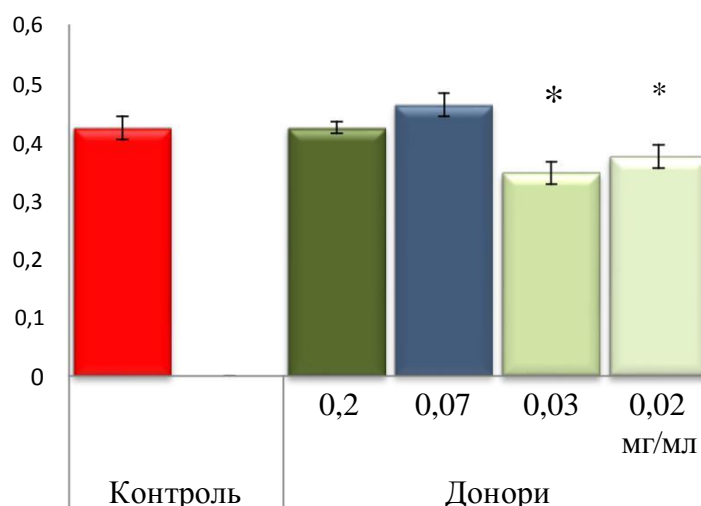


Рис. 3.22 Типовий вплив фракції пептидного пулу на хромогенні субстрати досліджуваних ферментів гемостазу S<sub>2366</sub> (протеїн С), S<sub>2765</sub> (фактор Ха), S<sub>2238</sub> (тромбін)

Важливо підкреслити, що фракція пептидного пулу плазми крові здорових донорів також проявляла ефекторні властивості щодо досліджуваного процесу. Окрім цього, пептидний пул у концентраціях, які були менші за концентрацію в організмі пацієнтів за відповідних фізіологічних умов, проявляв більший ефект порівняно з іншими обраними для дослідження концентраціями.

Відтак, спостерігалось інгібування гідролізу субстрату активності тромбіну на 20 % за дії ПП плазми крові здорових донорів у концентраціях менших за фізіологічну (рис. 3.23). Дія ПП плазми людей з патологіями не мала чітко направлено впливу. Спостерігалось інгібування досліджуваного процесу фракцією ПП за КІІ лише у концентрації втричі більшій за фізіологічну в середньому на 25 %. ПП за АІІ здійснював різнонаправлений вплив лише у концентраціях менших за фізіологічну.



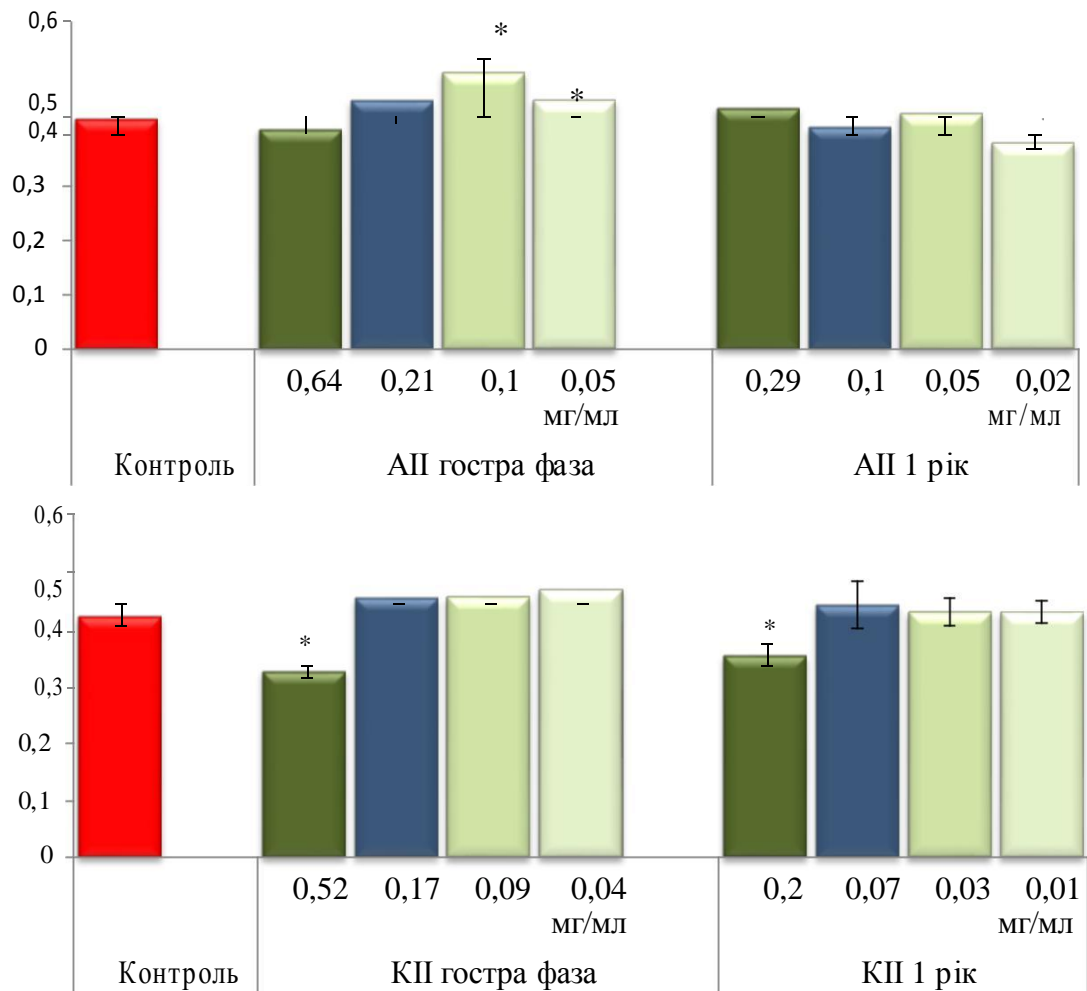


Рис. 3.23 Гідроліз хромогенного субстрату тромбіном за дії пептидного пулу плазми крові

\*достовірні зміни в порівнянні з контролем,  $p \leq 0,05$ .

Гідроліз специфічного хромогенного субстрату фактором Ха, значно активувався за дії усіх фракцій ПП (рис. 3.24). При чому, максимально ефективною була концентрація вдвічі менша за фізіологічну. Отже, в середньому, усі досліджувані фракції ПП, як здорових донорів так і людей з патологіями, активували досліджуваний процес в середньому від 40 до 80 % залежно від концентрації. При чьому, максимально ефективною була концентрація вдвічі менша за фізіологічну, як для фракції донорів так і пацієнтів з патологіями.

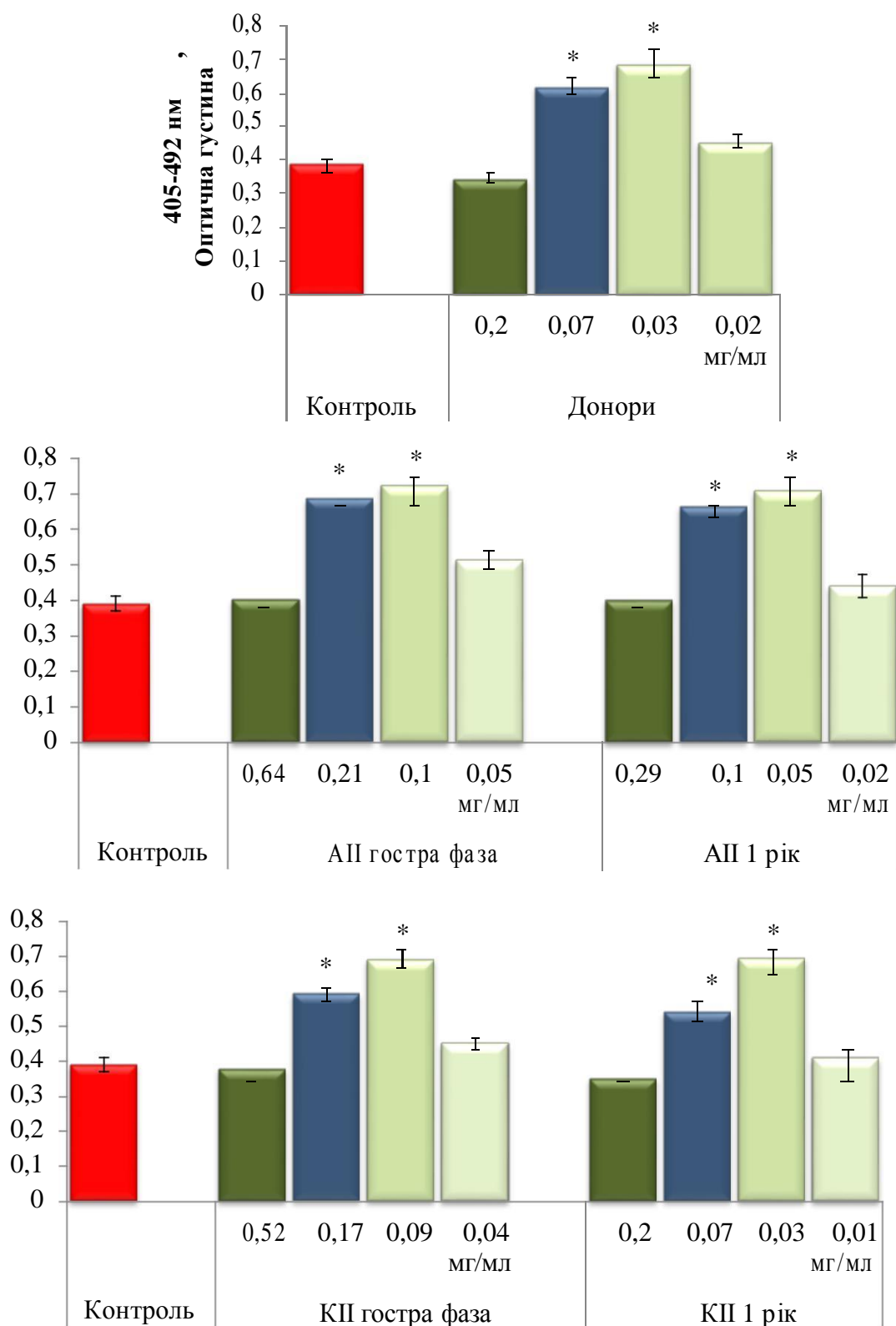


Рис. 3.24 Гідроліз хромогенного субстрату фактором Ха за дії пептидного пулу плазми крові

\*достовірні зміни в порівнянні з контролем,  $p \leq 0,05$ .

Гідроліз хромогенного субстрату тромбіном, після його активації у плазмі крові активувався в середньому на 10 - 15 % за дії ПП плазми крові, як

здорових донорів, так і людей з патологіями, в переважній більшості, у концентраціях рівній фізіологічній та меншій за таку (рис. 3.25).

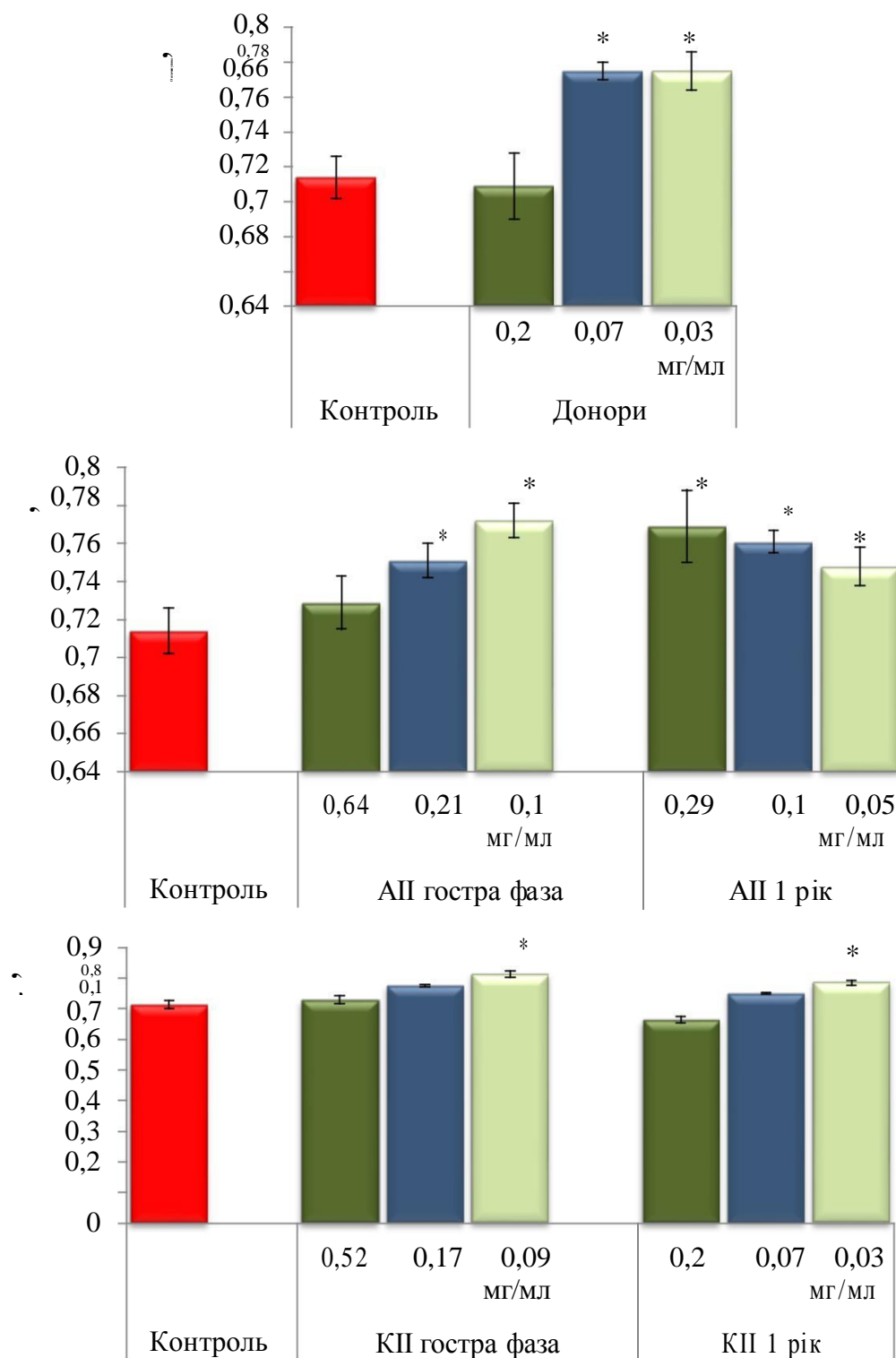


Рис. 3.25 Гідроліз хромогенного субстрату тромбіном після його активації у плазмі крові за дії досліджуваного пептидного пулу

\*достовірні зміни в порівнянні з контролем,  $p \leq 0,05$ .

Загальна активація процесу гідролізу субстрату протеїном С, активованим у плазмі крові, спостерігалася за дії ПП, як здорових донорів, так і людей з ішемічним інсультом (рис.3.26).

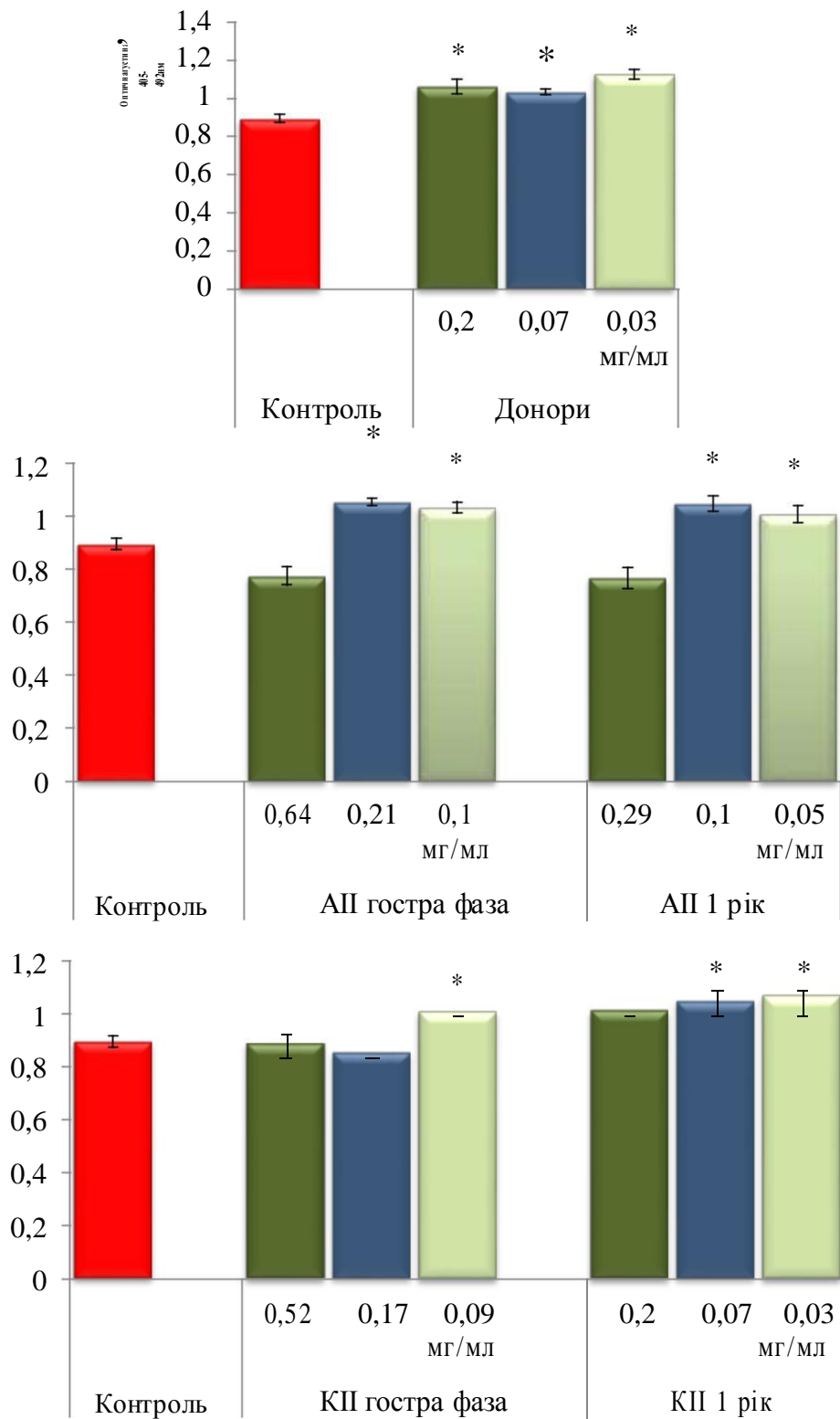


Рис. 3.26 Гідроліз хромогенного субстрату протеїном С після його активації у плазмі крові за дії досліджуваного пептидного пулу

\*достовірні зміни в порівнянні з контролем,  $p \leq 0,05$ .

Рівень активації за дії фракції здорових донорів складав в середньому 20 % за усіх концентрацій. Патологічні фракції активували досліджуваний процес в середньому на 25 – 30 %.

Підсумовуючи отримані результати, можемо зробити висновок, що загальний пептидний пул організму, як при патології, так і у нормі, здатен здійснювати вплив на процес гідролізу специфічного хромогенного субстрату ключовими факторами системи гемостазу. Важливо підкреслити, що ПП здорових донорів також проявляв ефекторну дію. При чому, для факторів коагуляції ефекторна дія патологічних фракцій ПП значно перевищувала дію ПП здорових донорів. Проте, ефекторні властивості ПП варіюють не лише в залежності від патології організму та стадії захворювання, а й залежно від його концентрації в організмі. При чому, максимально ефективною є концентрація менша або рівна концентрації ПП в плазмі крові за відповідних фізіологічних умов. Для переважної більшості випадків вплив ПП у концентрації більшій за концентрацію за відповідних умов був не достовірним.

Наступним етапом дослідження ефекторних властивостей пептидного пулу організму була перевірка їх здатності активувати тромбоцити здорових донорів. А саме, після інкубації досліджуваних фракцій ПП з фракцією тромбоцитів, у середовищі інкубації методом Вестерн Блоттингу була перевірена наявність білків секретованих з тромбоцитів в результаті активації останніх.

Гель-хроматографічно була отримана фракція тромбоцитів здорових донорів. Та електорофоретично було підтверджено відсутність будь яких білків у фракції отриманих тромбоцитів (рис. 3.27). Фракція, яка вміщувала лише цілі клітина без інших білків була взята для подальшої роботи.

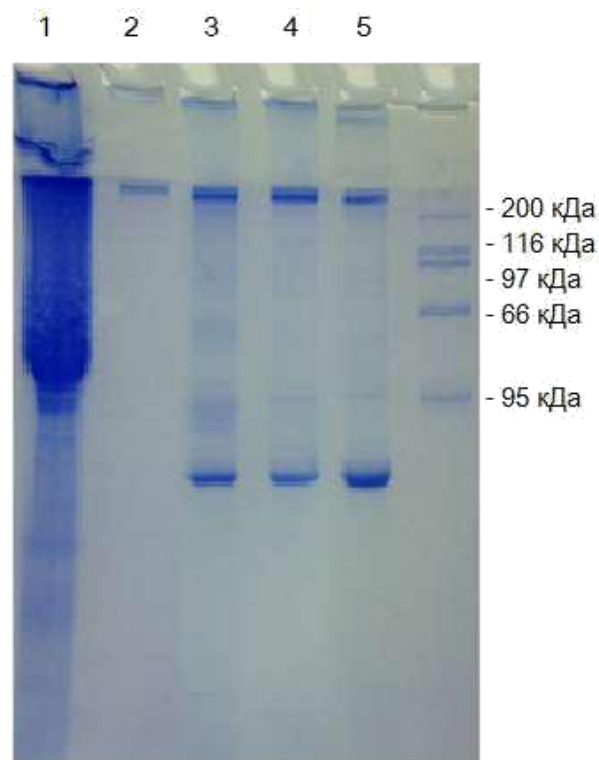


Рис. 3.27 Типова електрофореграма середовища інкубації тромбоцитів з:

1. Контроль (Загальний пул білків плазми крові здорових донорів);
2. Контроль (Тромбоцити);
3. ПП плазми крові здорових донорів;
4. ПП плазми крові пацієнтів з АІ;
5. ПП плазми крові пацієнтів з КІ.

Активація тромбоцитів в результаті їх інкубації протягом 30 хвилин з досліджуваними фракціями ПП була доведена електрофоретично, оскільки ряд білків було детекровано у середовищі інкубації (рис. 3.27). У якості контролю використовувався загальний пул протеїнів плазми крові, отриманий в результаті осадження трихлороцтовою кислотою з плазми крові здорових донорів. Відповідно до отриманих результатів, активаційний ефект на тромбоцити проявив ПП, як пацієнтів з ішемічним інсультом, так і практично здорових донорів. Активаційний ефект проявлявся у вивільненні з тромбоцитів білків з молекулярними масами від 25 до понад 250 кДа.

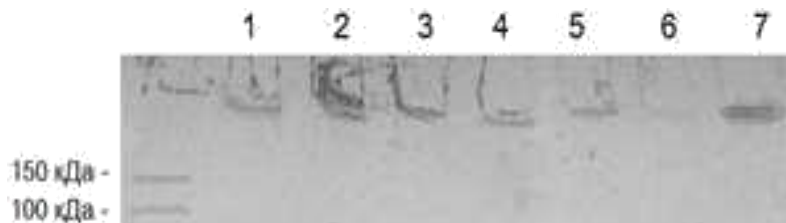


Рис. 3.28 Вестерн блоттограма середовища інкубації тромбоцитів з пептидним пулом плазми крові (з використанням антитіл проти фактору фон Віллебранда):

1. Здорові донори;
2. Пацієнти з АІІ;
3. Пацієнти з КІІ;
4. Пацієнти через 1 рік після АІІ;
5. Пацієнти через 1 рік після КІІ;
6. Контроль (Тромбоцити);
7. Контроль (Загальний пул білків плазми крові здорових донорів).

Таблиця 3.18

Результати вестерн блот аналізу інкубаційного середовища тромбоцитів з використанням антитіл проти фактору фон Віллебранда

| Мол. маса,<br>кДа | Пул<br>білків<br>плазми | Здорові<br>донори | Пацієнти з АІІ |       | Пацієнти з КІІ |       |
|-------------------|-------------------------|-------------------|----------------|-------|----------------|-------|
|                   |                         |                   | Гостра фаза    | 1 Рік | Гостра фаза    | 1 Рік |
| 270               | +                       | +                 | +              | +     | +              | +     |

Відповідно до отриманих результатів, після інкубації чистих тромбоцитів з досліджуваними фракціями пептидного пулу, у середовищі інкубації було детектовано фактор фон Віллебранда молекулярна маса якого рівна 270 кДа [229]. Такий самий вміст був характерний фракції тотального пулу білків плазми крові здорових донорів, який не вміщував фракції ППІ. Отже, можемо стверджувати, що ППІ спричинює секрецію фактору фон Віллебранда з тромбоцитів у плазму крові (рис. 3.28, табл.3.18).

Нами було детектовано присутність у середовищі інкубації тромбоцитів з досліджуваними фракціями пептидного пулу одного фрагменту ПАІ-1 з

молекулярною масою 170 кДа (рис.3.29, табл.3.19). Отже, можемо зробити висновок про індукування вивільнення інгібітора активаторів плазміногену 1-го типу з тромбоцитів, під впливом досліджуваних фракцій пептидного пулу плазми крові.

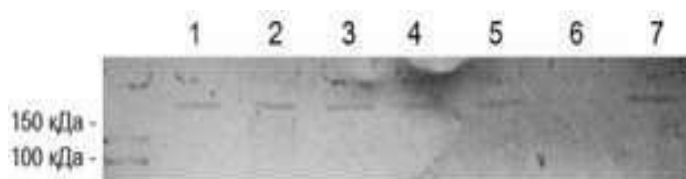


Рис. 3.29 Вестерн блоттограма середовища інкубації тромбоцитів з пептидним пулом плазми крові (з використання антитіл проти ПАІ-1):

1. Здорові донори;
2. Пацієнти з АП;
3. Пацієнти з КП;
4. Пацієнти через 1 рік після АП;
5. Пацієнти через 1 рік після КП;
6. Контроль (Тромбоцити);
7. Контроль (Загальний пул білків плазми крові здорових донорів).

Таблиця 3.19

Результати вестерн блот аналізу інкубаційного середовища тромбоцитів з використанням антитіл проти ПАІ-1

| Мол. маса, кДа | Пул білків плазми | Здорові донори | Пацієнти з АП |       | Пацієнти з КП |       |
|----------------|-------------------|----------------|---------------|-------|---------------|-------|
|                |                   |                | Гостра фаза   | 1 Рік | Гостра фаза   | 1 Рік |
| 170            | +                 | +              | +             | +     | +             | +     |

Підсумовуючи вплив ПП на активаційну здатність тромбоцитів здорових донорів, а саме на секретійну здатність з їх  $\alpha$ -гранул фактору фон Віллебранда та ПАІ-1, можемо засвідчити ефекторні властивості пептидного пулу на цьому рівні системи гемостазу.

## РОЗДІЛ 4

### ЗАКЛЮЧЕННЯ

Мозковий інсульт належить до найбільш тяжких форм цереброваскулярних захворювань. Від 100 до 120 тис. населення України щороку переносять інсульт вперше, тобто частота даної захворюваності становить 280-290 випадків на 100 тис. населення, що значно перевищує середній показник частоти мозкового інсульту в економічно розвинених країнах Європи [1, 2]. Протягом останніх 10 років захворюваність на мозковий інсульт в Україні зросла на 5 %, переважно за рахунок людей працездатного віку (35,5 % всіх мозкових інсультів сталися у людей працездатного віку). На сьогодні інсульт залишається провідною причиною інвалідизації населення країни.

Більш того, тільки 10 - 20 % хворих після перенесеного інсульту повертаються до повноцінного життя [4, 5]. А отже один із трьох пацієнтів які перенесли інсульт переживає повторне загострення хвороби протягом наступних 5 років після ішемічної атаки. В більшості випадків, летальний рецидив має місце вже через рік після перенесеного першого загострення мозкового інсульту [3].

Отже, надзвичайно гостро сьогодні стоїть питання не лише причини виникнення ішемічного інсульту, а й причини його рецидиву. Визначення конкретного ініціатора загострення ішемічного процесу має вирішальне значення для проведення вірної та своєчасної діагностики, лікування та попередження повторної ішемічної атаки мозкового інсульту.

На сьогоднішній день, вкрай необхідним є не лише вивчення причин і механізмів, які лежать в основі розвитку як гострого так і хронічного ішемічного інсульту, а також пошук нових та ефективних біомаркерів для діагностики порушень системи гемостазу, порушення функціонування якої є ключовим чинником розвитку даної патології; поглиблення та деталізація

системи контролю проведеного лікування у віддалені терміни після загострення хвороби. Дослідження потенційної ефекторної здатності неспецифічних білкових чинників, утворених у кровотоці в результаті патологічної активації системи гемостазу, є запорукою зменшення кількості рецидивів та виявленні причини повторної атаки інсульту. Дослідження особливостей патології, з погляду фазності протікання хвороби, відкриває значні перспективи в області клінічної діагностики патологічних проявів порушень системи гемостазу на будь якій стадії мозкового ішемічного інсульту.

Згідно отриманих нами результатів, було доведено, що у пацієнтів по проходженні року після загострення ішемічного інсульту спостерігалось зменшення рівня гіперкоагуляційного стану системи гемостазу порівняно з показниками у гострій фазі, проте загроза тромбозу в організмі залишалася присутньою. Отримані результати якісної характеристики складових білкового профілю плазми крові пацієнтів на різних стадіях ішемічного інсульту, а саме маркерів гіперкоагуляційного стану організму, є основою для виявлення білків, пептидів чи білкових комплексів, які є ключовими у перебігу захворювання на різних його етапах, що можуть слугувати цільовими маркерами для терапії та профілактики серцево-судинних захворювань, а також, у перспективі, відігравати роль білків-мішеней на шляху до анулювання можливості виникнення рецидиву захворювання.

Проведені нами дослідження виявили та довели ефекторну здатність по відношенню до різних ланок системи гемостазу, окремих протеїнів, а саме імуноглобулінів класу G та пулу пептидів з молекулярною масою до 5 кДа, утворених в результаті патологічної активації системи гемостазу в наслідок ішемічного процесу і циркулюючих у кровотоці у підвищених концентраціях. Ефекторні властивості означених вище пептидів були доведені, не лише у період гострої фази, але і у віддалені терміни після загострення інсульту.

Було показано збереження підвищеної концентрації ключового маркера гіперкоагуляційного стану – розчинних фібринмономерних комплексів, у плазмі крові пацієнтів, навіть через рік після перенесеного атеротромботичного

ішемічного інсульту більш ніж у 8 разів, та більш ніж у 14 разів для пацієнтів через рік після кардіоемболічного інсульту. Відповідно до рівня фактора фон Віллебранда, який є маркером ендотеліальної дисфункції, показано, що через рік після ішемічної атаки, лише у 38 % пацієнтів з атеротромботичним інсультом рівень фактору перевищував норму на 50 %. Та для 40 % пацієнтів з кардіоемболічним інсультом рівень даного фактора був підвищений у середньому на 75 %.

У ході дослідження тромбоцитарної ланки системи гемостазу було показано, що обидва підтипи ішемічного інсульту через рік після перенесеної гострої фази не супроводжувалися значним підвищенням тромбоцитарної реакції на АДФ, проте загальна кількість тромбоцитів для переважної більшості пацієнтів залишалася нижчою норми.

Аналіз показників фібринолітичної ланки системи гемостазу показав значне пригнічення фібринолітичного потенціалу організму при ішемічному інсульті через рік після перенесеної гострої фази. У хворих через рік після гострої фази обох підтипів ішемічного інсульту спостерігався аномальний рівень інгібіторів. Відтак, 25 % пацієнтів з кардіоемболічним інсультом мали вищий рівень ПАІ-1 на 30 - 35%. Для 20 % пацієнтів з атеротромботичним інсультом рівень ПАІ-1 був на 30 - 35% вищий в порівнянні з нормою.

Було показано, що обидва підтипи ішемічного інсульту, через рік після перенесеної гострої фази, супроводжуються значним подовженням часу лізису еуглобулінів та Хагеман-залежного фібринолізу. Зокрема, останній був подовжений у 1,9 рази для пацієнтів з атеротромботичним ішемічним інсультом та у 2,3 рази для пацієнтів з кардіоемболічним ішемічним інсультом порівнянно з аналогічним показником здорових донорів.

Результати проведених досліджень дозволяють стверджувати що такі показники як: концентрація розчинних фібрин мономерних комплексів, кількість тромбоцитів та Хегеман-залежний фібриноліз є найбільш інформативними для діагностики пацієнтів з хронічним ішемічним інсультом. Відповідно до рівня ТАП, ПАІ-1 та фактору фон Віллебранда чітко

прослідковується закономірність, за якою, по проходженні року після загострення інсульту, для певної кількості пацієнтів досліджувані параметри повертаються у норму, проте, для переважної більшості пацієнтів рівень коливається поза межами норми. Оскільки, відхилення від норми інших численних показників є доказом збереження тромботичної загрози в організмі, в тому числі по проходженню року після ішемічної атаки, даний тест не є підставою для анулювання підозри рецидиву. А отже, у клінічній практиці, повинен бути доповненим іншими, більш інформативними тестами.

Проведені дослідження встановили, що IgG плазми крові, за обох підтипів інсульту, здійснювали тромботичний ефект, який проявлявся у пригніченні здатності антикоагулянтного фактору гемостазу протеїну С гідролізувати специфічний хромогенний субстрат, а також у активації тієї ж здатності пускового фактору зсідання крові тромбіну, при цьому інгібуючий вплив IgG плазми крові пацієнтів які рік назад перенесли гостру фазу інсульту був значно більшим за такий для фракції IgG за гострої фази ішемічного інсульту.

Також досліджувана фракція IgG проявляла здатність активувати агрегацію тромбоцитів здорових донорів. Доведено, що IgG, які циркулюють в кровотоці здатні активувати тромбоцити, а саме спричинювати вивільнення з  $\alpha$ -гранул останніх цілого ряду білків та їх комплексів. Зокрема фактору фон Віллебранда, який задіяний у агрегації тромбоцитів та інгібітора активатора плазміногену 1-го типу - головного месенджера дисфункції тромбоцитів. Відмінності між ефекторними властивостями IgG плазми крові пацієнтів з ішемічним інсультом та IgG практично здорових донорів потребують подальшого детального дослідження, оскільки можуть слугувати цільовими білками для призначення терапії та профілактики серцево-судинних захворювань.

Також, отримані результати підтвердили, ефекторні властивості пептидів з молекулярною масою до 5кДа, при чому фракції пептидного пулу плазми крові пацієнтів з ішемічним інсультом, проявили значно інтенсивніші

ефекторні властивості. Для усіх досліджених параметрів був показаний антитромботичний ефект пептидного пулу, як у нормі так і за патології.

А саме, доведено, що пептидний пул здатний спричинювати інгібуючий вплив на АДФ-залежну агрегацію тромбоцитів здорових донорів. Через 1 рік після перенесеного захворювання інгібуючий ефект патологічних фракцій збільшувався. Показано, що під час дослідження процесу гідролізу хромогенного субстрату ключовими факторвами системи гемостазу, що фракції пептидного пулу пацієнтів з ішемічним інсультом, як в гостру фазу захворювання так і через рік після неї, проявляли максимальні ефекторні властивості по відношенню до фактора Ха, та активував його здатність гідролізувати специфічний хромогенний субстрат на 80 %. Доведено, та ж здатність тромбіну інгібувалася пептидним пулом здорових донорів, проте активувалася під впливом пептидного пулу пацієнтів з гострим ішемічним інсультом; при чому по проходженні року після ішемічної атаки, пептидний пул втрачав свою здатність активувати гідроліз специфічного хромогенного субстрату тромбіном. Показано, що вплив пептидного пулу здорових донорів перевищував вплив патологічного лише для антикоагулянтного протеїну С. Доведена відсутність ефекторної здатності пептидного пулу на рівні активації тромбоцитів здорових донорів, а саме на секрецію з  $\alpha$ -гранул фактору фон Віллебранда та ПАІ-1.

Антитромботичний вплив пептидів з молекулярною масою до 5 кДа може бути використаний для диференційованого підходу корекції досліджуваних патологічних станів організму в залежності від причин їх виникнення та стадії захворювання.

Підсумовуючи отримані результати варто підкреслити, що численні відмінності між кількісними та якісними характеристиками фракцій практично здорових донорів та пацієнтів які 1 рік назад перенесли ішемічну атаку є доведенням відсутності повного відновлення організму, а отже загроза рецидиву має місце по проходженню року лікування після перенесеного ішемічного інсульту. Отримані нами результати можуть бути використані при

розробці алгоритму лабораторної діагностики стану системи гемостазу та ефективності проведення відповідної терапії хворих з хронічним кардіоеMBOLІчним або атеротромботичним підтипами ішемічного інсульту.

## ВИСНОВКИ

Результати, представлені у дисертаційній роботі, поглиблюють існуючі погляди на функціонування ланок системи гемостазу за ішемічного інсульту, доводять ефекторні властивості протеїнів, циркулюючих у кровотоці після загострення захворювання, та висвітлюють перспективний напрямок майбутніх досліджень, а саме, ідентифікацію у кровотоці білкових молекул, в тому числі, у віддалені терміни після перенесеної гострої фази захворювання, здатних ініціювати біохімічні реакції та процеси, що не характерні для нормального фізіологічного стану організму.

1. Показано підвищення концентрації РФМК у плазмі крові пацієнтів через 1 рік після атеротромботичного ішемічного інсульту більш ніж у 8 разів, та більш ніж у 14 разів для пацієнтів через 1 рік після кардіоемболічного інсульту. Доведено, що рівень фактору фон Віллебранда через рік після ішемічної атаки перевищував норму на 50 % лише у 38 % пацієнтів з атеротромботичним інсультом, та на 75 % у 40 % пацієнтів з кардіоемболічним інсультом.

2. Встановлено значне пригнічення фібринолітичного потенціалу через 1 рік після хвороби. Виявлено підвищений рівня ТАП і ПАІ-1 та подовження часу лізису еуглобулінів та Хагеман-залежного фібринолізу у пацієнтів як з АІ так і з КІ, зокрема, останній перевищував норму в 1,9 рази за АІ та в 2,3 рази за КІ через 1 рік після ішемічної атаки.

3. Доведено наявність у кровотоці пацієнтів з АІ та КІ, у підвищених концентраціях, протеїнів - імуноглобулінів класу G та пулу пептидів з молекулярною масою до 5 кДа, що утворені в результаті ішемічної атаки.

4. Встановлено, що IgG гострої фази обох підтипів інсульту здійснювали тромботичний ефект, який проявлявся у пригніченні процесу гідролізу специфічного хромогенного субстрату головним антикоагулянтним фактором

гемостазу - протеїном С, а також у активації аналогічного процесу пусковим фактором зсідання крові – тромбіном.

5. Показано, що фракції пептидного пулу пацієнтів з ішемічним інсультом, проявляла максимальні ефекторні властивості по відношенню до фактора Х, пришвидшуючи гідроліз хромогенного субстрату фактором Ха на 80 %. Доведено, що аналогічна здатність тромбіну пригнічувалася пептидним пулом здорових донорів, проте активувалася під впливом пептидного пулу пацієнтів з гострим ішемічним інсультом, через 1 рік після ішемічної атаки пептидний пул втрачав свою здатність активувати гідроліз хромогенного субстрату тромбіном.

6. Показано, що фракція IgG як в гостру фазу так і через рік після ішемічного інсульту здатна активувати агрегацію тромбоцитів здорових донорів. Доведено, що пептидний пул здійснює інгібуючий вплив на АДФ-залежну агрегацію тромбоцитів здорових донорів, через рік після перенесеного захворювання інгібуючий ефект патологічних фракцій збільшується. Доведено, що, як IgG так і пептидний пул, здатні активувати тромбоцити, шляхом вивільнення з  $\alpha$ -гранул останніх фактору фон Віллебранда та інгібітора активаторів плазміногену 1-го типу, в тому числі у їх комплексних чи фланментних формах.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Sacco R, Adams R, Albers G, Alberts M, Benavente O, Furie K et al. American Heart Association/American Stroke Association Council on Stroke; Council on Cardiovascular Radiology and Intervention; American Academy of Neurology. Guidelines for prevention of stroke in patients with ischemic stroke or transient ischemic attack: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association Council on Stroke: co-sponsored by the Council on Cardiovascular Radiology and Intervention: the American Academy of Neurology affirms the value of this guideline. *American Journal of Ophthalmology*. 2006;142(4):716.
2. Чепелевська ЛА, Любінець ОВ. Динаміка і структура смертності населення України від зовнішніх причин смерті. *Вісник соціальної гігієни та організації охорони здоров'я*. 2008; 2:4–9.
3. Thom T. Heart Disease and Stroke Statistics--2006 Update: A Report From the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*. 2006;113(6):e85-e151.
4. Prencipe M, Culasso F, Rasura M, Anzini A, Beccia M, Cao M et al. Long-term Prognosis After a Minor Stroke : 10-Year Mortality and Major Stroke Recurrence Rates in a Hospital-Based Cohort. *Stroke*. 1998;29(1):126-132.
5. Burn J, Dennis M, Bamford J, Sandercock P, Wade D, Warlow C. Long-term risk of recurrent stroke after a first-ever stroke. The Oxfordshire Community Stroke Project [published erratum appears in *Stroke* 1994 Sep;25(9):1887]. *Stroke*. 1994;25(2):333-337.
6. Ustrell X, Pellise A. Cardiac Workup of Ischemic Stroke. *Current Cardiology Reviews*. 2010;6(3):175-183.
7. Бурлова-Васильєва МК, Кравченко НК, Мельник ВС. Стан системи фібринолізу хворих на атеротромботичний ішемічний інсульт та

- кардіоемболічний ішемічний інсульт на фоні миготливої аритмії. Медична хімія. 2014;16.1(58):5-8.
8. Katrii TB, Shabanova NV, Ostapchuk S, Savchuk OM. The characterization of the Soluble fibrin monomer complexes in patients with acute and one year post acute ischemic stroke. Bulletin of Kyiv National Taras Shevchenko Series: Problems of regulation of physiological functions. 2017; 1(22): 58-61.
  9. Williams R, Esnouf P, Lawrence M, Cederholm-Williams S. The similarities and differences in structures between kringle 1 of prothrombin and kringle 4 of plasminogen. FEBS Letters. 1986;209(1):111-116.
  10. de Groot P. Platelets as pivot in the antiphospholipid syndrome. Blood. 2014;124(4):475-476.
  11. Francis J. Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. Blood Coagulation & Fibrinolysis. 1994;5(5):855.
  12. Пантелеев МА, Васильев СА, Синауридзе ЕИ, Воробьев АИ, Атауллаханов ФИ. Практическая коагулология. М.: Практическая медицина. 2011;192.
  13. Савчук ОМ. Дослідження появи в кровотоці білків-маркерів гемостатичного дисбалансу організму. Фізика живого. 2010;18:132-137.
  14. Кузник БИ. Система гемостаза. Физиология человека. М.: Медицина. 2000;1:313-325.
  15. Атауллаханов ФИ. Сложные режимы распространения возбуждения и самоорганизация в модели свертывания крови. УФН: журнал. 2007;177(1):87-104.
  16. Балуда ВП. Лабораторные методы исследования системы гемостаза. Томск. 1980;4:24-37.
  17. Heidari M, Mehrbod M, Ejtehadi M, Mofrad M. Cooperation within von Willebrand factors enhances adsorption mechanism. Journal of The Royal Society Interface. 2015;12(109):20150334.

18. Lee A, Sinclair G, Valentine K, James P, Poon M. Acquired von Willebrand syndrome: von Willebrand factor propeptide to von Willebrand factor antigen ratio predicts remission status. *Blood*. 2014;124(5):e1-e3.
19. Вайс Х. Функции крови. Остановка кровотечения и свёртывание крови. Физиология человека. М.: Мир. 1996;2:431-439.
20. Гусина АА, Гусина НБ. Генетические дефекты про- и антикоагулянтных белков как факторы риска венозных тромбозов. *Медицинские новости*. – 2006.9.
21. Howard N, Abell C, Blakemore W, Chessari G, Congreve M, Howard S et al. Application of Fragment Screening and Fragment Linking to the Discovery of Novel Thrombin Inhibitors†. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2006;49(4):1346-1355.
22. Inoue K, Morita T. Identification of O-linked oligosaccharide chains in the activation peptides of blood coagulation factor X. The role of the carbohydrate moieties in the activation of factor X. *European Journal of Biochemistry*. 1993;218(1):153-163.
23. Renné T, Gailani D. Role of Factor XII in hemostasis and thrombosis: clinical implications. *Expert Review of Cardiovascular Therapy*. 2007;5(4):733-741.
24. Воробьёв АИ. Руководство по гематологии. М.: Ньюдиамед. 2005;3:416.
25. Папаян ЛП. Современная модель гемостаза и механизм действия препарата Ново-Севен. *Проблемы гематологии и переливания крови*. 2004;1:11-17.
26. Биохимия животных и человека. К.: Наукова думка, 1982:38-58.
27. Варецька ТВ. Мікрогетерогенність фібриногену. Кріофібриноген. *Укр. біохім. Журн*. 1960;32:13-24.
28. Wood P. New oral anticoagulants: An emergency department overview. *Emergency Medicine Australasia*. 2013;25(6):503-514.
29. Платонова Т.Н., Чернышенко ТМ, Горницкая ОВ. Комплексная лабораторная диагностика нарушений системы гемостаза при

- диссеминированном внутрисосудистом свертывании. Биохимия. 2000;3:3-10.
30. Gilliam B, Reed M, Chauhan A, Dehlendorf A, Moore T. Evidence of fibrinogen as a target of citrullination in IgM rheumatoid factor-positive polyarticular juvenile idiopathic arthritis. *Pediatric Rheumatology*. 2011;9(1):8.
31. Белицер ВА. Домены – крупные, функционально важные блоки молекул фибриногена и фибрина. *Биохимия животных и человека*. 1982;6:38 –56.
32. Голота ВЯ., Гамісонія МШ., Платонова ТМ., Макогоненко ЄМ. Рання діагностика і профілактика тромботичних ускладнень після операції кесаревого розтину. *Медична хімія*. 2000;3:104-107.
33. Дранник ГН, Ена ЯМ, Варецкая ТВ. Продукты расщепления фибрина-фибриногена при патологических процессах. К: Здоров'я. 1987;181.
34. Досон Р. Справочник биохимика. М: Мир. 1991.
35. Lorand L. Fibrino-Peptide. *New Aspects of the Fibrinogen–Fibrin Transformation*. *Nature*. 1951;167(4259):992-993.
36. Физиология человека. Под ред. Покровского ВМ., Коротько ГФ. М: Медицина. 1997;1:448.
37. Lichtman M, Beutler E, Williams W. *Williams hematology*. New York: McGraw-Hill, Medical Pub. Division; 2006.
38. Irwin R, Rippe J. *Manual of intensive care medicine*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
39. Ushiroyama T, Ikeda A, Ueki M. Effect of continuous combined therapy with vitamin K2 and vitamin D3 on bone mineral density and coagulofibrinolysis function in postmenopausal women. *Maturitas*. 2002;41(3):211-221.
40. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ*. 2002;324(7330):141-141.
41. Benesch C. Antithrombotic and thrombolytic therapy for ischemic stroke. *Current Atherosclerosis Reports*. 2003;5(4):267-275.

42. The International Stroke Trial (IST): a randomised trial of aspirin, subcutaneous heparin, both, or neither among 19 435 patients with acute ischaemic stroke. *The Lancet*. 1997;349(9065):1569-1581.
43. Chen Z. CAST: randomised placebo-controlled trial of early aspirin use in 20 000 patients with acute ischaemic stroke. *The Lancet*. 1997;349(9066):1641-1649.
44. Randomised controlled trial of streptokinase, aspirin, and combination of both in treatment of acute ischaemic stroke. *The Lancet*. 1995;346(8989):1509-1514.
45. Berge E, Abdelnoor M, Nakstad P, Sandset P. Low molecular-weight heparin versus aspirin in patients with acute ischaemic stroke and atrial fibrillation: a double-blind randomised study. *The Lancet*. 2000;355(9211):1205-1210.
46. Bath P, Lindenstrom E, Boysen G, De Deyn P, Friis P, Leys D et al. Tinzaparin in acute ischaemic stroke (TAIST): a randomised aspirin-controlled trial. *The Lancet*. 2001;358(9283):702-710.
47. Wong K, Chen C, Ng P, Tsoi T, Li H, Fong W et al. Low-molecular-weight heparin compared with aspirin for the treatment of acute ischaemic stroke in Asian patients with large artery occlusive disease: a randomised study. *The Lancet Neurology*. 2007;6(5):407-413.
48. Hankey G, Berge E, Sandercock P. Anticoagulants Versus Antiplatelet Agents for Acute Ischemic Stroke. *Stroke*. 2003;34(6):1571-1572.
49. Treatment for an acute ischaemic stroke. *The Pharmaceutical Journal*. 2013;.
50. Landry A, Foran M, Koyfman A. In Patients With Acute Ischemic Stroke, Do Different Thrombolytic Doses, Agents, or Routes of Administration Lead to Different Outcomes?. *Annals of Emergency Medicine*. 2014;63(4):435-436.
51. Patrono C, García Rodríguez L, Landolfi R, Baigent C. Low-Dose Aspirin for the Prevention of Atherothrombosis. *New England Journal of Medicine*. 2005;353(22):2373-2383.

52. Undas A, Brummel-Ziedins K, Mann K. Antithrombotic properties of aspirin and resistance to aspirin: beyond strictly antiplatelet actions. *Blood*. 2007;109(6):2285-2292.
53. Liu W, Poole E, Ulrich C, Kulmacz R. Decreased cyclooxygenase inhibition by aspirin in polymorphic variants of human prostaglandin H synthase-1. *Pharmacogenetics and Genomics*. 2012;22(7):525-537.
54. Savi, A. Bernat, A. Lale, C. Roque, P. Effect of aspirin on platelet disaggregation induced by SR121566, a potent GP-IIb/IIIa antagonist. *Platelets*. 2000;11(1):43-48.
55. Platelet Inhibition I: Aspirin and Thienopyridine (oral 80-83). *The American Journal of Cardiology*. 2007;100(8):S39-S40.
56. Capone M. Clinical Pharmacology of Platelet, Monocyte, and Vascular Cyclooxygenase Inhibition by Naproxen and Low-Dose Aspirin in Healthy Subjects. *Circulation*. 2004;109(12):1468-1471.
57. Evangelista V. De Novo Synthesis of Cyclooxygenase-1 Counteracts the Suppression of Platelet Thromboxane Biosynthesis by Aspirin. *Circulation Research*. 2006;98(5):593-595.
58. Armstrong P, Dhanji A, Tucker A, Mitchell J, Warner T. Reduction of platelet thromboxane A<sub>2</sub> production ex vivo and in vivo by clopidogrel therapy. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2009;8(3):613-615.
59. Maree A, Curtin R, Dooley M, Conroy R, Crean P, Cox D et al. Platelet Response to Low-Dose Enteric-Coated Aspirin in Patients With Stable Cardiovascular Disease. *Journal of the American College of Cardiology*. 2005;46(7):1258-1263.
60. Hohlfeld T. Aspirin-Resistenz / Aspirin resistance. *LaboratoriumsMedizin*. 2006;30(5):302-309.
61. Maree A, Fitzgerald D. Variable Platelet Response to Aspirin and Clopidogrel in Atherothrombotic Disease. *Circulation*. 2007;115(16):2196-2207.
62. Chatterjee K. Secondary prevention of stroke: more than just aspirin or warfarin. *Age and Ageing*. 2004;33(3):218-220.

63. Gijón M, Zarini S, Murphy R. Biosynthesis of eicosanoids and transcellular metabolism of leukotrienes in murine bone marrow cells. *Journal of Lipid Research*. 2006;48(3):716-725.
64. Faraday N, Yanek L, Mathias R. Heritability of Platelet Responsiveness to Aspirin in Activation Pathways Directly and Indirectly Related to Cyclooxygenase-1. *Journal of Vascular Surgery*. 2007;46(6):1307.
65. Eikelboom J. Aspirin-Resistant Thromboxane Biosynthesis and the Risk of Myocardial Infarction, Stroke, or Cardiovascular Death in Patients at High Risk for Cardiovascular Events. *Circulation*. 2002;105(14):1650-1655.
66. Friberg L, Rosenqvist M, Lip G. Evaluation of risk stratification schemes for ischaemic stroke and bleeding in 182 678 patients with atrial fibrillation: the Swedish Atrial Fibrillation cohort study. *European Heart Journal*. 2012;33(12):1500-1510.
67. Waldo A. Clopidogrel plus aspirin versus oral anticoagulation for atrial fibrillation in the Atrial fibrillation Clopidogrel Trial with Irbesartan for prevention of Vascular Events (ACTIVE W): a randomised controlled trial. *Yearbook of Cardiology*. 2007;2007:423-424.
68. Olesen J, Lip G, Lindhardsen J, Lane D, Ahlehoff O, Hansen M et al. Risks of thromboembolism and bleeding with thromboprophylaxis in patients with atrial fibrillation: A net clinical benefit analysis using a 'real world' nationwide cohort study. *Thrombosis and Haemostasis*. 2011;106(4):739-749.
69. McQuaid K, Laine L. Systematic review and meta-analysis of adverse events of low-dose aspirin and clopidogrel in randomized controlled trials. *American Journal of Ophthalmology*. 2007;143(1):194.
70. Diener H, Weber R. Clopidogrel Added to Aspirin Adds No Benefit but Bleeding Risk in Patients With Recent Lacunar Stroke. *Stroke*. 2013;44(3):861-863.
71. Zi W, Shuai J. Plasma D-Dimer Levels Are Associated with Stroke Subtypes and Infarction Volume in Patients with Acute Ischemic Stroke. *PLoS ONE*. 2014;9(1):e86465.

72. Furie K, Rosenberg R, Thompson J, Bauer K, Mohr J, Rosner B et al. Thrombin generation in non-cardioembolic stroke subtypes: The Hemostatic System Activation Study. *Neurology*. 2004;63(5):777-784.
73. Tombul T, Atbas C, Anlar O. Hemostatic markers and platelet aggregation factors as predictive markers for type of stroke and neurological disability following cerebral infarction. *Journal of Clinical Neuroscience*. 2005;12(4):429-434.
74. Rao Y, Pasupathi P, Farook J, Bakthavathsalam G. Biochemical Cardiac Markers in Clinical Cardiology. *Journal of Medicine*. 2009;10(2).
75. Lominadze D, Dean W, Tyagi S, Roberts A. Mechanisms of fibrinogen-induced microvascular dysfunction during cardiovascular disease. *Acta Physiologica*. 2010;198(1):1-13.
76. Plasma Fibrinogen Level and the Risk of Major Cardiovascular Diseases and Nonvascular Mortality. *JAMA*. 2005;294(14).
77. Shyy J. Role of Integrins in Endothelial Mechanosensing of Shear Stress. *Circulation Research*. 2002;91(9):769-775.
78. Givens C, Tzima E. Endothelial Mechanosignaling: Does One Sensor Fit All?. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2016;25(7):373-388.
79. Bas M, Kirchhartz N, Hochfeld J, Tüllmann C, Kumpf S, Suvorava T et al. Potential role of vasomotor effects of fibrinogen in bradykinin-induced angioedema. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2008;121(4):969-975.e2.
80. Litvinov R, Weisel J. Not fibrin(ogen), but fibrinogen or fibrin. *Blood*. 2015;126(17):1977-1978.
81. Iba T, Gando S, Murata A, Kushimoto S, Saitoh D, Eguchi Y et al. Predicting the Severity of Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS)-Associated Coagulopathy With Hemostatic Molecular Markers and Vascular Endothelial Injury Markers. *The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care*. 2007;63(5):1093-1098.

82. Schubert A, Zakikhany K, Schreiner M, Frank R, Spellerberg B, Eikmanns B et al. A fibrinogen receptor from group BStreptococcus interacts with fibrinogen by repetitive units with novel ligand binding sites. *Molecular Microbiology*. 2002;46(2):557-569.
83. Klai S, Fekih-Mrissa N, Mrissa R, Rachdi R, Gritli N. Maternal cerebral venous thrombosis, uncommon but serious disorder, pathologic predictors and contribution of prothrombotic abnormalities. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*. 2013;24(3):269-272.
84. Roldan V. Interleukin-6, endothelial activation and thrombogenesis in chronic atrial fibrillation. *European Heart Journal*. 2003;24(14):1373-1380.
85. Sadanaga T, Kohsaka S, Ogawa S. D-Dimer Levels in Combination with Clinical Risk Factors Can Effectively Predict Subsequent Thromboembolic Events in Patients with Atrial Fibrillation during Oral Anticoagulant Therapy. *Cardiology*. 2010;117(1):31-36.
86. Hatzinikolaou-Kotsakou E, Kartasis Z, Tziakas D, Hotidis A, Stakos D, Tsatalas K et al. Atrial Fibrillation and Hypercoagulability: Dependent on Clinical Factors or/and on Genetic Alterations?. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*. 2003;16(3):155-161.
87. Hua Q, Li M, Liu R. Study on hypercoagulation and hypofibrinolysis state in patients with atrial fibrillation and essential hypertension. *American Journal of Hypertension*. 2005;18(5):A171-A171.
88. Gatenby P. Neurological and obstetric manifestations of the antiphospholipid syndrome. *Lupus*. 1996;5(2):170-172.
89. Carecchio M, Cantello R, Comi C. Revisiting the Molecular Mechanism of Neurological Manifestations in Antiphospholipid Syndrome: Beyond Vascular Damage. *Journal of Immunology Research*. 2014;14:1-9.
90. What's new in the antiphospholipid syndrome?. *Rheumatology*. 2016.
91. Шевчук СВ, Горницкая ОВ, Чернышенко ТМ. Влияние антифосфолипидных антител на хронометрические коагуляционные

- тесты при системной красной волчанке. Известия Национальной академии Наук Беларуси. Серия медицинских наук. 2009;2:32–37.
92. Cozzani E, Drosera M, Gasparini G, Parodi A. Serology of Lupus Erythematosus: Correlation between Immunopathological Features and Clinical Aspects. *Autoimmune Diseases*. 2014;2014:1-13.
93. Bizzaro N. Autoantibodies as predictors of disease. *Pathology*. 2009;41:41.
94. Sharma S, Ghosh S, Singh L, Sarkar A, Malhotra R, Garg O et al. Identification of Autoantibodies against Transthyretin for the Screening and Diagnosis of Rheumatoid Arthritis. *PLoS ONE*. 2014;9(4):e93905.
95. Cozzani E, Drosera M, Gasparini G, Parodi A. Serology of Lupus Erythematosus: Correlation between Immunopathological Features and Clinical Aspects. *Autoimmune Diseases*. 2014;2014:1-13.
96. Aydin S, Kuloglu T, Aydin S. Copeptin, adropin and irisin concentrations in breast milk and plasma of healthy women and those with gestational diabetes mellitus. *Peptides*. 2013;47:66-70.
97. Aydin S, Kuloglu T, Aydin S. Copeptin, adropin and irisin concentrations in breast milk and plasma of healthy women and those with gestational diabetes mellitus. *Peptides*. 2013;47:66-70.
98. Sheremet'ev Y, Popovicheva A, Egorihina M, Levin G. Study of the relationship between shape and aggregation change in human erythrocytes. *Biophysics*. 2013;58(2):193-196.
99. Thomson A. Call for Subcategory of Severe Acute Pancreatitis. *Critical Care Medicine*. 2017;45(2):e241-e242.
100. Zhao S, Zhao W, Ma L. Novel peptide ligands that bind specifically to mouse embryonic stem cells. *Peptides*. 2010;31(11):2027-2034.
101. Drummer C. Involvement of the renal natriuretic peptide urodilatin in body fluid regulation. *Seminars in Nephrology*. 2001;21(3):239-243.
102. Anisimov V, Khavinson V, Mikhalski A, Yashin A. Effect of synthetic thymic and pineal peptides on biomarkers of ageing, survival and spontaneous

- tumour incidence in female CBA mice. *Mechanisms of Ageing and Development*. 2001;122(1):41-68.
103. Martelli C, Iavarone F, Vincenzoni F, Cabras T, Manconi B, Desiderio C et al. Top-down peptidomics of bodily fluids. *Peptidomics*. 2014;1(1).
104. Karelin A, Philippova M, Ivanov V. Proteolytic degradation of hemoglobin in erythrocytes leads to biologically active peptides. *Peptides*. 1995;16(4):693-697.
105. Horwell D, Nichols P, Roberts E. Methionine replacements in biologically active peptides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 1994;4(19):2263-2266.
106. Ivanov V, Yatskin O, Kalinina O, Philippova M, Karelin A, Shemyakin-Ovchinnikov E. Tissue-specific peptide pools. Generation and function. *Pure and Applied Chemistry*. 2000;72(3).
107. Schulte I, Tammen H, Selle H, Schulz-Knappe P. Peptides in body fluids and tissues as markers of disease. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 2005;5(2):145-157.
108. Gettler A, Niederl J, Benedetti-Pichler A. The isolation, identification and quantitative determination of ethyl alcohol normally present in human and animal tissues. *Mikrochemie*. 1932;11(1):167-199.
109. Ivanov V, Yatskin O, Sazonova O, Tolmazova A, Leontiev K, Philippova M et al. Peptidomics: A modern approach to biodiversity of peptides. *Pure and Applied Chemistry*. 2006;78(5).
110. Relaxin: New Functions for an Old Peptide. *Current Protein & Peptide Science*. 2004;5(1):9-18.
111. Karelin A, Blishchenko E, Ivanov V. A novel system of peptidergic regulation. *FEBS Letters*. 1998;428(1-2):7-12.
112. Lim S, Hurst P. High-molecular-mass alkaline phosphatase in amniotic fluid: Properties and relationship with lamellar body phospholipid. *Biochemical Medicine and Metabolic Biology*. 1987;37(3):323-328.

113. Klenov R, Klenova N. Effect of cAMP on Peptide Formation in Human Erythrocytes Depending on Cell Age. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2010;149(6):706-708.
114. Kolominsky-Rabas P, Weber M, Gefeller O, Neundoerfer B, Heuschmann P. Epidemiology of Ischemic Stroke Subtypes According to TOAST Criteria: Incidence, Recurrence, and Long-Term Survival in Ischemic Stroke Subtypes: A Population-Based Study. *Stroke*. 2001;32(12):2735-2740.
115. Goldstein L. Modern Medical Management of Acute Ischemic Stroke. *Methodist DeBakey Cardiovascular Journal*. 2014;10(2):99-104.
116. Avasarala J. Letter by Avasarala Regarding Article, “2015 AHA/ASA Focused Update of the 2013 Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke Regarding Endovascular Treatment: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association”. *Stroke*. 2015;46(11):e234-e234.
117. Al-Hashmi A. Stroke is the second leading cause of mortality worldwide and is the most common cause of long term disability. *Journal of Neurology & Neurophysiology*. 2016;07(04).
118. Sturm J, Dewey H, Donnan G, Macdonell R, McNeil J, Thrift A. Handicap After Stroke: How Does It Relate to Disability, Perception of Recovery, and Stroke Subtype?: The North East Melbourne Stroke Incidence Study (NEMESIS). *Stroke*. 2002;33(3):762-768.
119. Litvitskii P. Pathology of the hemostatic system. *Current pediatrics*. 2014;13(2):65.
120. Hosaka A, Miyata T, Aramoto H, Shigematsu H, Nakazawa T, Okamoto H et al. Clinical implication of plasma level of soluble fibrin monomer-fibrinogen complex in patients with abdominal aortic aneurysm. *Journal of Vascular Surgery*. 2005;42(2):200-205.
121. Takahashi D, Takahashi Y, Matsui M, Araki S, Kubo K, Sato H et al. Evaluation of hypercoagulability using soluble fibrin monomer complex in sick newborns. *Pediatrics International*. 2013;55(2):151-156.

122. Kinnby B. The Plasminogen Activating System in Periodontal Health and Disease. *Biological Chemistry*. 2002;383(1).
123. Roquer J, Segura T, Serena J, Castillo J. Endothelial Dysfunction, Vascular Disease and Stroke: The ARTICO Study. *Cerebrovascular Diseases*. 2009;27(1):25-37.
124. Lutfi AL-Maktri M. Von Willebrand Factor: A Novel Marker of Endothelial Dysfunction in Clinical Hyperthyroidism Patients. *Journal of Hematology & Thromboembolic Diseases*. 2013;01(04).
125. Kanali S, Fahs S, Shi Q, Haberichter S, Montgomery R. Contribution of platelet vs. endothelial VWF to platelet adhesion and hemostasis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2012;10(8):1646-1652.
126. De Meyer S, Stoll G, Wagner D, Kleinschnitz C. von Willebrand Factor: An Emerging Target in Stroke Therapy. *Stroke*. 2011;43(2):599-606.
127. Shabanova N, Katrii T, Savchuk O. P-006: Composition of soluble fibrin monomer complex in plasma of patients with ischemic stroke. *Thrombosis Research*. 2017;151:S111.
128. Simon D, Bandinelli E, Roisenberg I. Polymorphism in the promoter region of von Willebrand factor gene and von Willebrand disease type 1. *Genetics and Molecular Biology*. 2003;26(4):397-401.
129. Kyle W. Pulmonary Hypertension Associated with Congenital Heart Disease: A Practical Review for the Pediatric Cardiologist. *Congenital Heart Disease*. 2012;7(6):575-583.
130. Penny W, Weinstein M, Salzman E, Ware J. Correlation of circulating von Willebrand factor levels with cardiovascular hemodynamics. *Circulation*. 1991;83(5):1630-1636.
131. Spiel A, Gilbert J, Jilma B. Von Willebrand Factor in Cardiovascular Disease: Focus on Acute Coronary Syndromes. *Circulation*. 2008;117(11):1449-1459.
132. Rangarajan S. Von Willebrand factor - two sides and the edge of a coin. *Haemophilia*. 2010;17(1):61-64.

133. Sato M, Suzuki A, Nagata K, Uchiyama S. Increased von Willebrand Factor in Acute Stroke Patients With Atrial Fibrillation. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*. 2006;15(1):1-7.
134. De Meyer S, Stoll G, Kleinschnitz C. Letter by De Meyer et al Regarding Article "High von Willebrand Factor Levels Increase the Risk of Stroke: The Rotterdam Study". *Stroke*. 2011;42(3):e41-e41.
135. Ciesla B. *Hematology in practice*. Philadelphia: F.A. Davis; 2012.
136. Rodrigo G, Gruvegård M, Van Alstine J. Antibody Fragments and Their Purification by Protein L Affinity Chromatography. *Antibodies*. 2015;4(3):259-277.
137. Qureshi A, Chaoji V, Maiguel D, Faridi M, Barth C, Salem S et al. Proteomic and Phospho-Proteomic Profile of Human Platelets in Basal, Resting State: Insights into Integrin Signaling. *PLoS ONE*. 2009;4(10):e7627.
138. Бурлова-Васильева МК, Кравченко НК, Савчук ОМ, Катрий ТБ, Мельник ВС. Влияние низкомолекулярных гепаринов и стрептокиназы на АДФ-зависимую агрегацию тромбоцитов при атеротромботическом инсульте и инсульте на фоне мерцательной аритмии. *Биофармацевтический журнал*. 2014;6(2):29-32.
139. Lo E, Fisher M. Stroke: Impact Beyond the Impact Factor?. *Stroke*. 2011;42(7):1803-1804.
140. Lowe G, Rumley A, Whincup P, Danesh J. Hemostatic and Rheological Variables and Risk of Cardiovascular Disease. *Seminars in Vascular Medicine*. 2002;02(4):429-440.
141. Mehta S, Yusuf S. Short- and long-term oral antiplatelet therapy in acute coronary syndromes and percutaneous coronary intervention. *Journal of the American College of Cardiology*. 2003;41(4):S79-S88.
142. Nielsen V, Hafner D, Steinbrenner E. Can divergent plasmin–antiplasmin–carbon monoxide interactions in young, healthy tobacco smokers explain the ‘smoker’s paradox’?. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*. 2013;24(4):381-385.

143. Nielsen V, Hafner D, Steinbrenner E. Can divergent plasmin–antiplasmin–carbon monoxide interactions in young, healthy tobacco smokers explain the ‘smoker’s paradox’?. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*. 2013;24(4):381-385.
144. Surya Prakash Dwivedi, Nuzhat Husain, G. V. Reddy. Computational Characterization of Surface-Associated Binding Interaction of Alpha-Enolase of *Trichomonas vaginalis* with Human Plasminogen. *Human Parasitic Diseases*. 2011;:1.
145. Добровольский АБ, Титаева ЕВ. Система фибринолиза: регуляция активности и физиологические функции её основных компонентов. *Биохимия*. 2002;67:116–127.
146. Веремеєнко КН, Голобородько ОП, Кізім ОІ. Протеоліз в нормі і при патології. *Здоров’я*. 1988;5:200.
147. Зубаиров ДМ. Молекулярные основы свёртывания крови и тромбообразования. *ФЭН*. 2000;3:364.
148. Suelves M. The plasminogen activation system in skeletal muscle regeneration: antagonistic roles of urokinase-type plasminogen activator (upa) and its inhibitor (PAI-1). *Frontiers in Bioscience*. 2005;10(1-3):2978.
149. Nakajima K. Pharmacological observations of plasminogen activator release caused by vasoactive agents in isolated perfused pig ears. *Thrombosis Research*. 1983;29(2):163-174.
150. Rajacki M, Pajunen P, Jousilahti P, Rasi V, Vahtera E, Salomaa V. Hemostatic factors as predictors of stroke and cardiovascular diseases: the FINRISK ’92 Hemostasis Study. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*. 2005;16(2):119-124.
151. Inoue K, Sugawara Y, Kubota K, Takayama T, Makuuchi M. Induction of type 1 plasminogen activator inhibitor in human liver ischemia and reperfusion. *Journal of Hepatology*. 2000;33(3):407-414.
152. Katrii TB, Shandyuk VYu, Halenova TI, Shershnov OV, Melnyk VS, Savchuk OM, Ostapchenko LI. The imbalance of the haemostasis cascade in

- people suffered ischemic stroke. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 2016;7(6):2193–2199.
153. Regulation of gelatinase activity in mice with targeted inactivation of components of the plasminogen/plasmin system. *Fibrinolysis and Proteolysis*. 1998;12:31.
154. Добровольский АБ, Титаева ЕВ. Система фибринолиза: регуляция активности и физиологические функции её основных компонентов. *Биохимия*. 2002;67:116–127.
155. Gebbink M. Tissue-type plasminogen activator-mediated plasminogen activation and contact activation, implications in and beyond haemostasis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2011;9:174-181.
156. de Bart A, Quax P, Löwik C, Verheijen J. Regulation of plasminogen activation, matrix metalloproteinases and urokinase-type plasminogen activator-mediated extracellular matrix degradation in human osteosarcoma cell line MG63 by interleukin-1 alpha. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2009;10(9):1374-1384.
157. Oral H. Risk of Thromboembolic Events After Percutaneous Left Atrial Radiofrequency Ablation of Atrial Fibrillation. *Circulation*. 2006;114(8):759-765.
158. Хухліна ОС, Дродз ВЮ. Оптимізація лікування неалкогольного стеатогепатиту у хворих на ожиріння та ішемічну хворобу серця. *Ліки України*. 2016;9(205):69–75.
159. Верещагин НВ. Гетерогенность инсульта: взгляд с позиции клинициста. *Инсульт*. 2003;9:108–110.
160. Верещагин НВ, Суслина ЗА. Современное представление о патогенетической гетерогенности ишемического инсульта. *Очерки ангионеврологии*. М.:Атмосфера. 2005;368.
161. Дубенко ОЕ, Ковтунов ОВ, Подушка ИИ. Суточный профиль артериального давления при разных патогенетических подтипах острого

- ишемического инсульта. Пробл. безперервної мед. освіти та науки. 2012;1:20–24.
162. Кузнецова СМ. Этиопатогенез инсульта. Клинические варианты.
163. Kwon Y, Yoon S, Chang H. Categorized hospital charges of acute ischemic stroke according to trial of org 10172 in acute stroke treatment classification. *Neurology India*. 2013;61(6):633.
164. Toyoda K, Fujimoto S, Kamouchi M, Iida M, Okada Y. Acute Blood Pressure Levels and Neurological Deterioration in Different Subtypes of Ischemic Stroke. *Stroke*. 2009;40(7):2585-2588.
165. Furie K, Rosenberg R, Thompson J, Bauer K, Mohr J, Rosner B et al. Thrombin generation in non-cardioembolic stroke subtypes: The Hemostatic System Activation Study. *Neurology*. 2004;63(5):777-784.
166. Tombul T, Atbas C, Anlar O. Hemostatic markers and platelet aggregation factors as predictive markers for type of stroke and neurological disability following cerebral infarction. *Journal of Clinical Neuroscience*. 2005;12(4):429-434.
167. Flossmann E. Systematic Review of Methods and Results of Studies of the Genetic Epidemiology of Ischemic Stroke. *Stroke*. 2003;35(1):212-227.
168. Montaner J, Perea-Gainza M, Delgado P, Ribo M, Chacon P, Rosell A et al. Etiologic Diagnosis of Ischemic Stroke Subtypes With Plasma Biomarkers. *Stroke*. 2008;39(8):2280-2287.
169. Hosaka A, Miyata T, Aramoto H, Shigematsu H, Nakazawa T, Okamoto H et al. Clinical implication of plasma level of soluble fibrin monomer-fibrinogen complex in patients with abdominal aortic aneurysm. *Journal of Vascular Surgery*. 2005;42(2):200-205.
170. Takahashi D, Takahashi Y, Matsui M, Araki S, Kubo K, Sato H et al. Evaluation of hypercoagulability using soluble fibrin monomer complex in sick newborns. *Pediatrics International*. 2013;55(2):151-156.

171. Булавкин ЮВ, Курашвили ЛВ, Ситников СА. Динамика показателей гемокоагуляции и фибринолиза у больных раком молочной железы в процессе лечения. Казанский медицинский журнал. 2003;84(6):433–436.
172. Kim S, Kim J, Kim H, Kim I, Yoon S, Park S. Higher prognostic value of soluble fibrin complexes than D-dimer and fibrin degradation product for disseminated intravascular coagulation in patients with liver cirrhosis. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*. 2013;:1.
173. Singh N, Pati H, Tyagi S, Upadhyay A, Saxena R. Evaluation of the Diagnostic Performance of Fibrin Monomer in Comparison to d-Dimer in Patients With Overt and Nonovert Disseminated Intravascular Coagulation. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*. 2015;23(5):460-465.
174. Park K, Kwon E, Kim H, Kim S. Evaluation of the Diagnostic Performance of Fibrin Monomer in Disseminated Intravascular Coagulation. *The Korean Journal of Laboratory Medicine*. 2011;31(3):143.
175. Medved L. Structural aspects of fibrinogen to fibrin transition. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2003;1:SY50-SY50.
176. Watt K, Cottrell B, Strong D, Doolittle R. Amino acid sequence studies on the .alpha. chain of human fibrinogen. Overlapping sequences providing the complete sequence. *Biochemistry*. 1979;18(24):5410-5416.
177. Henschen A, Lottspeich F. Sequence homology between  $\gamma$ -chain and  $\beta$ -chain in human fibrin. *Thrombosis Research*. 1977;11(6):869-880.
178. Walker J, Nesheim M. The Molecular Weights, Mass Distribution, Chain Composition, and Structure of Soluble Fibrin Degradation Products Released from a Fibrin Clot Perfused with Plasmin. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274(8):5201-5212.
179. Barchitta M, Maueri A. Association between Vascular Endothelial Growth Factor Polymorphisms and Age-Related Macular Degeneration: An Updated Meta-Analysis. *Disease Markers*. 2016;2016:1-9.

180. Thompson W, Smith E, Stirk C, Wang J. Fibrin degradation products in growth stimulatory extracts of pathological lesions. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*. 1993;4(1):113-115.
181. Stirk C, Kochhar A, Smith E, Thompson W. Presence of growth-stimulating fibrin degradation products containing fragment E in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis*. 1993;103(2):159-169.
182. Singh S, Bhando T, Dikshit K. Fibrin-targeted plasminogen activation by plasminogen activator, PadA, from *Streptococcus dysgalactiae*. *Protein Science*. 2014;23(6):714-722.
183. Varadi A, Patthy L. .beta.(Leu121-Lys122) segment of fibrinogen is in a region essential for plasminogen binding by fibrin fragment E. *Biochemistry*. 1984;23(9):2108-2112.
184. Lezhen T, Kudinov S, Medved' L. Plasminogen-binding site of the thermostable region of fibrinogen fragment D. *FEBS Letters*. 1986;197(1-2):59-62.
185. Hess J, Boyle M. Fibrinogen fragment D is necessary and sufficient to anchor a surface plasminogen-activating complex in *Streptococcus pyogenes*. *PROTEOMICS*. 2006;6(1):375-378.
186. Dominguez M, Rojas G, Loyau S, Bazurco M, Sorell L, Anglés-Cano E. Kringles of the plasminogen–prothrombin gene family share conformational epitopes with recombinant apolipoprotein (a): specificity of the fibrin-binding site. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*. 2001;1548(1):72-80.
187. Breukels V, Touw W, Vuister G. NMR structure note: solution structure of Ca<sup>2+</sup> binding domain 2B of the third isoform of the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger. *Journal of Biomolecular NMR*. 2012;54(1):115-121.
188. Chen Q, Lentz B. Fluorescence Resonance Energy Transfer Study of Shape Changes in Membrane-Bound Bovine Prothrombin and Meizothrombin†. *Biochemistry*. 1997;36(15):4701-4711.

189. Hess J, Boyle M. Fibrinogen fragment D is necessary and sufficient to anchor a surface plasminogen-activating complex in *Streptococcus pyogenes*. *PROTEOMICS*. 2006;6(1):375-378.
190. Wypasek E, Corral J, Alhenc-Gelas M, Sydor W, Iwaniec T. Genetic characterization of antithrombin, protein C, and protein S deficiencies in Polish patients. *Pol Arch Intern Med*. 2017;127(7-8):512-523.
191. Тимербаев ВН, Зубаиров ДМ, Киселев СВ., Киришин СВ, Соболева ИВ. Взаимодействие фрагмента 1 протромбина, претромбина 1 и  $\alpha$ -тромбина человека с тканевым тромбопластином. *Биохимия*. 1992;57(1):77-90.
192. Wu J, Zhou C, Majumder R, Powers D, Weinreb G, Lentz B. Role of Procoagulant Lipids in Human Prothrombin Activation. 1. Prothrombin Activation by Factor X in the Absence of Factor Va and in the Absence and
193. Qureshi S, Yang L, Manithody C, Rezaie A. Membrane-Dependent Interaction of Factor Xa and Prothrombin with Factor Va in the Prothrombinase Complex. *Biochemistry*. 2009;48(22):5034-5041.
194. 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;68(3):57-60.
195. Guedes L, Ferro J. A Systematic Review of Immediate Anticoagulation for Ischemic Stroke of Presumed Cardioembolic Origin. *Stroke*. 2008;39(5):e81-e82.
196. Forastiero R. Antiphospholipid syndrome: new light comes from in vivo studies. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2007;5(9):1825-1827.
197. Systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome. *Rheumatology*. 2016;.
198. Rovenský J. Asherson's syndrome — Catastrophic antiphospholipid syndrome. *Autoimmunity Reviews*. 2006;6(2):61-63.

199. Sharma S, Ghosh S, Singh L, Sarkar A, Malhotra R, Garg O et al. Identification of Autoantibodies against Transthyretin for the Screening and Diagnosis of Rheumatoid Arthritis. PLoS ONE. 2014;9(4):e93905.
200. Cozzani E, Drosera M, Gasparini G, Parodi A. Serology of Lupus Erythematosus: Correlation between Immunopathological Features and Clinical Aspects. Autoimmune Diseases. 2014;2014:1-13.
201. Wenzlau J, Hutton J. Novel Diabetes Autoantibodies and Prediction of Type 1 Diabetes. Current Diabetes Reports. 2013;13(5):608-615.
202. Wang Y, Lin H, Chen H, Kuo Y, Lang M, Sun A. Hemoglobin, iron, and vitamin B12 deficiencies and high blood homocysteine levels in patients with anti-thyroid autoantibodies. Journal of the Formosan Medical Association. 2014;113(3):155-160.
203. Racanelli V, Prete M, Musaraj G, Dammacco F, Perosa F. Autoantibodies to intracellular antigens: Generation and pathogenetic role. Autoimmunity Reviews. 2011;10(8):503-508.
204. Acute Myeloid Leukemia with Preceding Systemic Lupus Erythematosus and Autoimmune Hemolytic Anemia. Japanese Journal of Clinical Oncology. 1984;.
205. Katrii TB, Vovk TB, Kravchenko NK, Savchuk OM, Ostapchenko LI. Influence of IgG separated from blood plasma of patients with ischemic stroke on the process platelet's proteins secretion. International Journal of Chemical and Biomolecular Science. 2015;:278-283
206. Katrii TB, Kravchenko NK, Vovk TB, Savchuk OM, Ostapchenko LI. The influence of immunoglobulin class G from blood plasma of patients with stroke on the activity of some parameters of hemostasis system. Blood Coagulation & Fibrinolysis. 2016;27(8):876-881.
207. Вовк ТБ, Савчук ОМ, Остапченко ЛІ. Аутоімунні антитіла до ключових компонентів системи зсідання крові, які утворюються в кровотоці при системному червоному вовчаку. Фізика живого. 2010; 18(3):10.

208. Волков ГЛ, Платонова ТН, Савчук АН, Горницкая ОВ, Чернышенко ТМ, Краснобрижая ЕН. Современные представления о системе гемостаза. К: Наукова думка. 2005.
209. Жерносеков ДД., Куркина ТВ. Протеїн С: механізми функціонування та методи одержання. Біотехнологія. 2008.
210. Baranowska-Łączkowska A, Fernández B, Rizzo A, Pawłowski F. Applicability of medium-size basis sets in calculations of molecular dynamic polarisabilities. *Molecular Physics*. 2015;113(13-14):1786-1793.
211. Bajwa M, Khan S. Platelet Aggregation: Prognostic Marker in Burn Survival. *Annals of King Edward Medical University*. 2016;22(2).
212. Alexandrovna Y. Endogenic Intoxication and Kidney. *International Journal of Pediatric Research*. 2016;2(2).
213. Zhao S, Zhao W, Ma L. Novel peptide ligands that bind specifically to mouse embryonic stem cells. *Peptides*. 2010;31(11):2027-2034.
214. Mar'yanovich A. Blood–brain barrier and evolution of peptide regulation of physiological functions. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2016;52(4):326-334.
215. Popovich I, Voitenkov B, Anisimov V, Ivanov V, Mikhaleva I, Zabezhinski M et al. Effect of delta-sleep inducing peptide-containing preparation Deltaran on biomarkers of aging, life span and spontaneous tumor incidence in female SHR mice. *Mechanisms of Ageing and Development*. 2003;124(6):721-731.
216. Martelli C, Iavarone F, Vincenzoni F, Cabras T, Manconi B, Desiderio C et al. Top-down peptidomics of bodily fluids. *Peptidomics*. 2014;1(1).
217. Karelin A, Philippova M, Ivanov V. Proteolytic degradation of hemoglobin in erythrocytes leads to biologically active peptides. *Peptides*. 1995;16(4):693-697.
218. Yonezawa M. DNA Display of Biologically Active Proteins for In Vitro Protein Selection. *Journal of Biochemistry*. 2004;135(3):285-288.

219. Hildebrandt P. Natriuretic Peptides~: Prediction of Cardiovascular Disease in the General Population and High Risk Populations. *Disease Markers*. 2009;26(5-6):227-233.
220. Praaning-Van Dalen D, Knook D. Quantitative determination of in Vivo endocytosis by rat liver kupffer and endothelial cells facilitated by an improved cell isolation method. *FEBS Letters*. 1982;141(2):229-232.
221. Ivanov V, Yatskin O, Sazonova O, Tolmazova A, Leontiev K, Philippova M et al. Peptidomics: A modern approach to biodiversity of peptides. *Pure and Applied Chemistry*. 2006;78(5).
222. Zou Z, Fu X. Abiotic Regulation: A Common Way for Proteins to Modulate their Functions. *Current Protein & Peptide Science*. 2015;16(3):188-195.
223. Washburn C, Bean J, Silverman M, Pellegrino M, Yates P, Allen R. Regulation of Peptidergic Vesicle Mobility by Secretagogues. *Traffic*. 2002;3(11):801-809.
224. Fleminger G, Ragonis H, Merin U, Silanikove N, Leitner G. Low molecular mass peptides generated by hydrolysis of casein impair rennet coagulation of milk. *International Dairy Journal*. 2013;30(2):74-78.
225. Cellular mechanisms of peptide binding to HLA. *Human Immunology*. 1990;29:17.
226. Felmeden D, Spencer C, Belgore F, Blann A, Beevers D, Lip G. Do Cardiovascular and Cerebrovascular Risk Scores Based on the Framingham Equation Correlate with von Willebrand Factor, a Marker for Endothelial Damage and Vascular Endothelial Growth Factor, a Marker for Angiogenesis?. *Clinical Science*. 2001;101(s45):5P.1-5P.
227. Turner N, Nolasco L, Moake J. Generation and Breakdown of Soluble Ultralarge von Willebrand Factor Multimers. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. 2012;38(01):38-46.

228. Erdbruegger U, Haubitz M, Woywodt A. Circulating endothelial cells: A novel marker of endothelial damage. *Clinica Chimica Acta*. 2006;373(1-2):17-26.
229. Factor VIII/von Willebrand factor. *Reactions Weekly*. 2012;&NA;(1426):23.
230. Juhan-Vague I, Alessi M, Vague P. Increased plasma plasminogen activator inhibitor 1 levels. A possible link between insulin resistance and atherothrombosis. *Diabetologia*. 1991;34(7):457-462.
231. Juhan-Vague I, Alessi M, Vague P. Increased plasma plasminogen activator inhibitor 1 levels. A possible link between insulin resistance and atherothrombosis. *Diabetologia*. 1991;34(7):457-462.
232. Токар АВ, Макогоненко ЄМ, Платонова ТМ. Сучасні методи лабораторної діагностики внутрішньовенного мікрозсідання крові (методичні рекомендації). К: Макком. 1994;:22.
233. Kenney A, Chase H. Automated production scale affinity purification of monoclonal antibodies. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 1987;39(3):173-182.
234. Paterson M, Kennedy J. *Nucleic Acid and Monoclonal Antibody Probes. Applications in diagnostic microbiology. Carbohydrate Polymers*. 1992;18(1):73-74.
235. Николайчик ВВ, Моин ВМ, Кирковский ВВ. Способ определения средних молекул. *Лабораторное дело*. 1991;10:13–18.
236. Грицюк ОЙ, Амосова КМ, Грицюк Ю. Практична гемостазіологія. К: Здоров'я. 1994;256.
237. Козлов АА, Берковский АЛ, Качалова НД. Пособие для врачей-лаборантов. Работа с отечественными коагулометрами и реагентами НПО «Ренам». М: Принт. 2013;44.
238. Renam [Internet]. 2017 [cited 4 July 2017]. Available from: <http://www.renam.ru/dokumentaciya/instrukcii/rfmk/Instrukciya%20k%20nabok%20KABL%20EUYIEyuzva>

239. 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;68(3):57-60.
240. Crowther J. *The ELISA guidebook*. Totowa, NJ: Humana Press; 2000.
241. Zanetti M, Capra J. *The antibodies*. New York: Taylor & Francis; 2003.
242. Fritz Kelly M. *Antibody Validation. Materials and Methods*. 2016;6.
243. Голдобин ВВ, Ключева ЕГ, Асадуллаева ПМ. Атеротромботический инсульт: клинические показатели и параметры тромбоцитарного гемостаза у пациентов в остром периоде. *Саратовский научно-медицинский журнал*. 2012;8(4):954 – 957.
244. Walz D. Platelet-Released Proteins as Molecular Markers for the Activation Process. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. 1984;10(04):270-279.
245. Волков ГЛ, Платонова ТН, Савчук АН. *Современные представления о системе гемостаза*. Київ: Наукова думка. 2005;296.

**СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ**

За темою дисертації опубліковано 23 наукових праць, у тому числі 8 статей у фахових вітчизняних та міжнародних періодичних виданнях, з яких 3 публікації у виданнях, включених до міжнародних наукометричних баз та 15 тез доповідей у матеріалах наукових конференцій та з'їздів.

1. Катрій ТБ., Вовк ТБ., Кравченко НК., Савчук ОМ. Рівень IgG та АДФ-залежна агрегація тромбоцитів за системного червоного вовчачка та різних підтипів ішемічного інсульту. Вісник КНУ імені Тараса Шевченка, Серія: Проблеми регуляції фізіологічних функцій. 2015; 18: 43-45.
2. Katrii TB., Vovk TB., Kravchenko NK., Savchuk OM., Ostapchenko LI. Influence of IgG separated from blood plasma of patients with ischemic stroke on the process platelet's proteins secretion. International Journal of Chemical and Biomolecular Science. 2015; 4:278-283.
3. Katrii TB., Kravchenko NK., Vovk TB., Savchuk OM., Ostapchenko LI. The influence of IgG from blood plasma of patients with stroke on the activity of some parameters of haemostasis system. Journal of Blood Coagulation and Fibrinolysis. 2016; 27(8): 876-881.
4. Katrii TB., Shandyuk VYu., Halenova TI., Shershnov OV., Melnyk VS., Savchuk OM., Ostapchenko L.I. The imbalance of the haemostasis cascade in people suffered ischemic stroke. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 2016; 7(6): 2193- 2199.
5. Katrii TB., Savchuk OM. Platelets aggregation under influence of IgG separated from the blood plasma of the patients with ischemic stroke. Вісник КНУ імені Тараса Шевченка, Серія: Проблеми регуляції фізіологічних функцій. 2016; №1(20): 22-25.
6. Катрій ТБ., Савчук ОМ., Шандюк ВЮ., Мельник ВС. Характеристика фракції протромбінового пулу у пацієнтів які перенесли атеротромботичного та

кардіоемболічного ішемічного інсульту. Вісник КНУ імені Тараса Шевченка, Серія: Проблеми регуляції фізіологічних функцій. 2016; 2(21): 53-57.

7. Katrii TB., Shandyuk VYu., Raksha NG., Halenova TI., Shershnov OV., Melnyk VS., Savchuk OM. Fibrinolysis parameters in the acute and post ischemic stroke patients. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2017; 7(04): 96-102.

8. Katrii TB., Shabanova NV., Ostapchuk S., Savchuk OM. The characterization of the Soluble fibrin monomer complexes in patients with acute and one year post acute ischemic stroke. *Bulletin of Kyiv National Taras Shevchenko Series: Problems of regulation of physiological functions*. 2017; 1(22): 58-61.

9. Katrii TB. Coagulant and fibrinolytic status in atherothrombotic and cardioembolic ischemic stroke. 21th ISCOMS. Groningen, Netherlands. 3-6 June 2014, P.485.

10. Katrii TB, Ostapchenko LI, Vovk TB, Kravchenko NK. The functioning of parameters haemostasis system under influence IgG from patients with ischemic stroke. 40th FEBS Congress. Berlin, Germany. June 4-9, 2015, P. 646.

11. Katrii TB, Savchuk OM. Effectors properties of IgG from ischemic stroke patients. 22th ISCOMS. Groningen, Netherlands. June 2-5 2015, P.485.

12. Катрій ТБ, Шабанова НВ, Вовк ТБ, Кравченко НК. IgG плазми крові хворих ішемічним інсультом потенційні ефектори системи гемостазу. XI Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь і поступ в біології». Львів, Україна. 20 - 25 квітня 2015 року, С. 128-129.

13. Katrii TB, Savchuk OM, Ostapchenko LI. The effect of IgG of ischemic stroke patients on the platelet proteins secretion. ISTH. Toronto, Canada. June 20-2, 2015, P.345.

14. Katrii TB, Savchuk OM. Qualitative composition of the acute stroke and post stroke peptide pool fraction. EHA Scientific Conference on Bleeding Disorders. Barcelona, Spain. Vol.101, S2, Sep.14-17, 2016, P.16.

15. Katrii TB, Halenova TB, Savchuk OM. Peptides from Bloodstream of the Ischemic Stroke Patients as Effectors of Platelets Aggregation. 2nd International

Conference on Biosciences Research (ICBR). Owerri, Nigeria. November 24-27, 2016, P 31.

16. Катрій ТБ, Шабанова НВ, Терещенко ІС, Даховник АГ. IgG з плазми крові хворих ішемічним інсультом в гостру фазу та через рік після перенесеної хвороби як потенційні ефектори системи гемостазу. Міжнародна наукова конференція “Актуальні проблеми сучасної біохімії” присвячена 100-річчю від дня народження професора Бориса Федоровича Сухомлинова. Львів, Україна. 16-18 листопада, 2016, С. 368.

17. Katrii TB, Savchuk OM, Vovk TB. Post-Stroke as well as Acute Stroke IgG as a Potential Effector of Haemostasis System. International conference Thombosis and Embolism. Stockholm Sweden. 17-18 November, 2016, P.32.

18. Katrii TB, Savchuk OM. Amidolytic thrombin activity under the ischemic stroke peptide pool influence. 61st Annual Meeting of the Society of Thrombosis and Hemostasis Research (GTH). Basel, Switzerland. 15-18 February, 2017, P. 34.

19. Katrii TB, Savchuk OM. Amidolytic activity of haemostasis factors activated from zymogens in plasma under influence of stroke peptide pool. 2nd Prague European Days of Internal Medicine. Praque, Czech Republic. 1-2 Dec., 2016, P.32.

20. Катрій ТБ, Шабанова НВ, Савчук ОМ. Концентрація РФМК у плазмі крові хворих на ішемічний інсульт. XIV International Scientific Conference of Students, PhD Students & Young Scientists Shevchenkivska vesna: Biology, April 6-8, 2016, Kyiv, Ukraine. P.211-212.

21. Katrii TB, Vovk TB, Savchuk OM. The proteins with prothrombine origine in blood plasma of ischemic stroke patients as a markers of hipercoagulation. XXVI Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis and 63rd Annual Scientific and Standardization Committee (SSC) Berlin, Germany. 8 - 13 July, 2017. P.580.

22. Katrii TB, Vovk TB, Savchuk OM. The quality composition of soluble fibrin monomer complex for acute and post acute ischemic stroke patients. 22nd Congress of the European Hematology Association to be held in Madrid, Spain from June 22 - 25, 2017. P. 648-649.

23. Katrii TB, Shabanova NV, Savchuk OM. Composition of soluble fibrin monomer complex in plasma of patients with ischemic stroke Papers and Abstracts of the 7th International Symposium on Women's Health Issues in Thrombosis and Haemostasis. March 3–5, 2017, Barcelona, Spain Thrombosis Research Vol. 151, Supplement 1, P. S111.

**Апробація результатів дисертації.** Результати дисертації були представлені на вітчизняних та міжнародних конференціях: VII Міжнародна конференція молодих учених «Біологія: від молекули до біосфери» (Харків, 2013), X Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь і поступ в біології» (Львів, 2014), III Міжнародна наукова конференція студентів, аспірантів та молодих учених «Фундаментальні та прикладні дослідження в біології» (Донецьк, 2014), 21th International Student Congress of (bio)Medical Sciences (ISCOMS) (Groningen, Netherlands, 2014), 60th Annual meeting of the Scientific and Standardization Committee (SSC) of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH) (Milwaukee, United States, 2014), XI Український біохімічний конгрес (Київ, 2014), 40th FEBS Congress (Berlin, Germany, 2015), 22th International Student Congress of (bio)Medical Sciences (ISCOMS) (Groningen, Netherlands, 2015), 61th Annual meeting of the Scientific and Standardization Committee (SSC) of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH) (Toronto, Canada, 2015), XI Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь і поступ в біології» (Львів, 2015), European Hematology Association (EHA) Scientific Conference on Bleeding Disorders (Barcelona, Spain, 2016), 4th International Conference on Radiation and Applications in Various Fields of Research (RAD) (Nis, Serbia, 2016), XII Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів “Молодь і поступ біології”(Львів, 2016), XIV International Scientific Conference of Students, PhD Students & Young Scientists Shevchenkivska vesna (Kyiv, 2016), Міжнародна наукова конференція “Актуальні проблеми сучасної біохімії” присвячена 100-річчю від дня народження професора Бориса Федоровича Сухомлинова (Львів,

2016), International conference Thombosis and Embolism (Stockholm, Sweden, 2016), 2nd Prague European Days of Internal Medicine (Praque, Chech Republic, 2016), XXXth International Symposium on Technical Innovations in Laboratory Hematology (Honolulu, Hawaii, 2017), Annual meeting of the Scientific and Standardization Committee (SSC) of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH) (Berlin, Germany, 2017), 22nd Congress of the European Hematology Association (Madrid, Spain, 2017), 42th FEBS Congress (Jerusalem, Israel, 2017), 7th International Symposium on Women's Health Issues in Thrombosis and Haemostasis (Barcelona, Spain, 2017).