

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ННЦ «Інститут біології та медицини»

Кафедра біохімії

Завідувач кафедри проф. Олексій САВЧУК

Протокол № \_\_\_\_ засідання кафедри

від “ \_\_\_\_ ” \_\_\_\_\_ 20 \_\_\_\_ р.

**АНТИКОАГУЛЯНТНА ДІЯ ФІБРИНОГЕН-СПЕЦИФІЧНОГО  
АНТИТІЛА 2d-2a ТА ЙОГО Fab-ФРАГМЕНТІВ**

Випускна кваліфікаційна робота  
студентки денної форми навчання  
за спеціальністю  
Біотехнології та біоінженерія  
Байдакової Катерини Віталіївни

Науковий керівник від кафедри  
д-р біол. наук, проф. Савчук О. М.

Роботу виконано у відділі структури і функції білка Інституту біохімії  
ім. О.В. Палладіна НАН України під керівництвом завідувача відділу, старшого  
дослідника, д-ра біол. наук Чернишенка Володимира Олександровича

Оцінка захисту роботи

---

**Київ – 2026 р.**

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ**

АДФ	– аденозиндифосфат;
ДСН	– додецилсульфат натрію;
ЕДТА	– етилендіамінтетраацетат;
ЗТПК	– збагачена тромбоцитами плазма крові;
ПААГ	– поліакриламідний гель;
ТЕМЕД	– тетраметилетилендіамін;
Трис	– трис[гідроксиметил]-амінометан;
FpA	– fibrinopeptide A (фібринопептид А);
FpB	– fibrinopeptide B (фібринопептид В);
GPVI	– platelet glycoprotein VI (тромбоцитарний глікопротеїн VI);
scFv	– single-chain variable fragmen (одноланцюгові варіабельні фрагменти);
vWF	– Von Willebrand factor (фактор фон Віллебранда).

## ЗМІСТ

<b>ВСТУП</b> .....	5
<b>РОЗДІЛ 1.</b> Система гемостазу та моноклональні антитіла як інструмент антикоагулянтної дії .....	7
1.1. Система гемостазу .....	7
1.2. Будова моноклональних антитіл .....	16
1.3. Терапевтичні препарати на основі антитіл.....	19
<b>РОЗДІЛ 2.</b> Матеріали та методи досліджень .....	26
2.1. Матеріали .....	26
2.2. Методи дослідження .....	27
2.2.1. Культивування гібридом.....	27
2.2.2. Афінна хроматографія.....	27
2.2.3. Імуноензимний аналіз .....	28
2.2.4. Отримання збагаченої тромбоцитами плазми крові .....	29
2.2.5. Агрегатометрія.....	30
2.2.6. Турбідиметричні вимірювання.....	30
2.2.7. Електронна мікроскопія.....	31
2.2.8. Визначення загального гемостатичного потенціалу плазми крові	31
2.2.9. Отримання Fab-фрагментів з повнорозмірного моноклонального антитіла.....	32
2.2.10. Метод іонообмінної хроматографії.....	33
2.2.11. Електрофорез протеїнів у ПААГ .....	33
2.2.12. Статистична обробка результатів дослідження.....	34
<b>РОЗДІЛ 3.</b> Результати досліджень та обговорення.....	35
3.1. Отримання та характеристика фібриноген-специфічного антитіла 2d2a .....	35
3.2. Антикоагулянтна дія фібриноген-специфічного антитіла 2d-2a <i>in vitro</i> ..	38
3.3. Антикоагулянтна дія фібриноген-специфічного антитіла 2d-2a <i>in vivo</i> ...	45

3.4. Отримання та характеристика Fab-фрагментів моноклонального антитіла 2d-2a .....	48
3.5. Обговорення результатів .....	52
<b>ВИСНОВКИ</b> .....	56
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ</b> .....	57

## ВСТУП

Порушення процесів зсідання крові та розвиток внутрішньосудинного тромбоутворення є ключовими факторами виникнення багатьох серцево-судинних ускладнень. Утворення тромбів у кровотоці може призводити до часткової або повної закупорки судин, таким чином порушуючи нормальне кровопостачання тканин та органів. Тому для профілактики та лікування тромбозів активно застосовують антикоагулянтну терапію.

На сьогоднішній день існує низка антикоагулянтних препаратів, які впливають на різні ланки системи гемостазу. Зокрема, варфарин порушує синтез вітамін К-залежних факторів зсідання крові, гепарин та його похідні здатні пригнічувати активність тромбіну або фактора Ха, в той час як прямі пероральні антикоагулянти селективно блокують ці фактори, наприклад, дабігатран та ривораксабан. Окрім цього існує група препаратів, які інгібують агрегацію тромбоцитів, але ці засоби нерідко супроводжуються ризиком виникнення патологічних кровотеч. У клінічній практиці також зустрічалися випадки, коли пацієнти мали індивідуальну нечутливість до антикоагулянтних засобів [1-3]. Враховуючи серйозність побічних ефектів, антикоагулянтна терапія потребує регулярного лікарського нагляду. З огляду на це пошук нових підходів до створення більш селективних та безпечних антикоагулянтних препаратів залишається актуальним завданням сучасної біомедицини та біотехнології.

Одним з перспективних напрямків є застосування препаратів на основі селективних біомолекул, наприклад, імуноглобулінів, або антитіл. Антитіла здатні специфічно зв'язуватись з окремими компонентами системи гемостазу і при цьому пригнічувати активність зсідання крові. Особливий інтерес становлять моноклональні антитіла, специфічні до фібриногену – ключового білка системи зсідання крові, який, перетворюючись під дією тромбіну на фібрин, бере участь у формуванні фібринового згустку. Блокування окремих

ділянок цієї молекули може перешкоджати полімеризації фібрину і, відповідно, утворенню тромбу.

Поряд із повнорозмірними імуноглобулінами все більшої уваги набувають їхні фрагменти, у тому числі й Fab-фрагменти. Такі молекули зберігають здатність специфічно зв'язувати антиген, але мають меншу молекулярну масу, кращу проникність у тканини і знижений ризик розвитку небажаних імунних реакцій. Завдяки цим властивостям фрагменти антитіл розглядають як перспективну основу для створення нових терапевтичних агентів [4].

У відділах молекулярної імунології та структури і функції білка Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України було створено бібліотеку моноклональних антитіл, специфічних до окремих ділянок молекули фібриногену та його похідних, що відкриває можливості для дослідження їхнього впливу на процеси зсідання крові.

Метою цієї роботи було дослідити антикоагулянтні властивості моноклонального антитіла 2d-2a шляхом вивчення їхнього впливу на процеси полімеризації фібрину і формування фібрино-тромбоцитарного згустку в плазмі крові, а також отримання Fab-фрагментів цього антитіла зі збереженням його специфічності. Для досягнення мети було поставлено такі завдання:

1. Отримати та очистити моноклональне антитіло 2d-2a, специфічне до В $\beta$ -ланцюга фібриногену.
2. Оцінити вплив моноклонального антитіла 2d-2a на агрегацію тромбоцитів при використанні різних індукторів.
3. Дослідити дію моноклонального антитіла 2d-2a на процеси полімеризації фібрину та утворення згустку *in vitro* та *in vivo*.
4. Одержати та очистити Fab-фрагменти з повнорозмірного моноклонального антитіла 2d-2a.
5. Дослідити вплив Fab-фрагментів на полімеризацію фібрину та утворення згустку турбідиметричним методом.

# РОЗДІЛ 1

## СИСТЕМА ГЕМОСТАЗУ ТА МОНОКЛОНАЛЬНІ АНТИТІЛА ЯК ІНСТРУМЕНТ АНТИКОАГУЛЯНТНОЇ ДІЇ

### 1.1. Система гемостазу

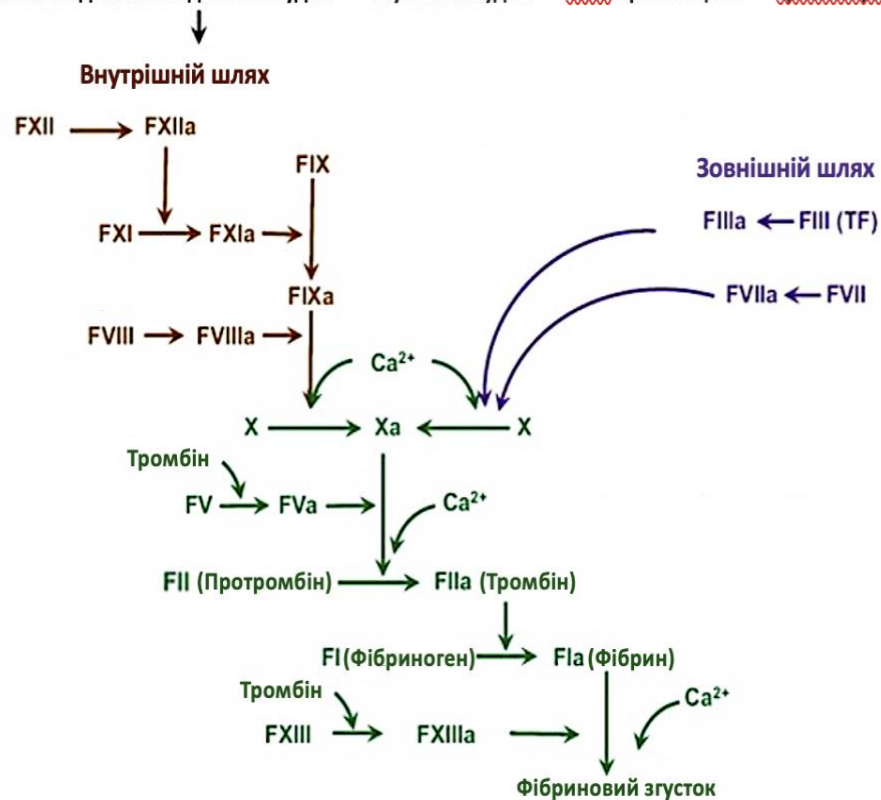
Гемостаз є складною багаторівневою фізіологічною системою, основною функцією якої є запобігання надмірній крововтраті при ушкодженні судинної стінки. У відповідь на порушення її цілісності активується каскад ферментативних реакцій. У загальному вигляді цей процес включає такі етапи: тимчасовий спазм судин, формування тромбоцитарної пробки та подальшу активацію коагуляції [5-8]. Ініціація вазоконстрикції, спрямованої на зменшення об'єму крововтрати шляхом звуження просвіту ураженої судини, є безпосередньою реакцією судинної системи на травматичне пошкодження. Наступна фаза гемостатичної відповіді класифікується як первинний гемостаз, який є результатом складних взаємодій між тромбоцитами, судинною стінкою і адгезивними протеїнами, що призводить до утворення початкової тромбоцитарної пробки, або тромбоцитарного тромбу. У межах цього етапу попереднє пошкодження цілісності ендотеліального шару зумовлює експозицію субендотеліального колагену та активне вивільнення фактора фон Віллебранда (vWF), який бере участь у адгезії тромбоцитів до травмованої поверхні.

Процес розпізнавання зазначених протеїнів тромбоцитами реалізується через специфічну взаємодію з мембранними рецепторами, зокрема GPVI (для колагену) та GPIb $\alpha$  (для vWF) [9]. Така рецепторна взаємодія стає тригером для подальшої агрегації тромбоцитів, що завершується формуванням тимчасової тромбоцитарної пробки. Паралельно з цим відбувається процес дегрануляції клітин, що супроводжується секрецією тромбоксану A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), аденозиндифосфату (АДФ) і серотоніну [10]. Вивільнення цих речовин

забезпечує залучення більшої кількості тромбоцитів та їх злипання у вогнищі ураження, що критично важливо для зменшення кровотечі. Кінцева структура тромбу стабілізується завдяки активації коагуляційного каскаду – вторинного гемостазу. На цій стадії відбувається генерація тромбіну з подальшим ферментативним перетворенням фібриногену на нерозчинний фібрин і формуванням фібринового згустку. Волокна фібрину утворюють міцний полімерний каркас, який утворюючи разом з агрегованими тромбоцитами є основою міцного фібринового повноцінного гемостатичного тромбу [11].

Зважаючи на особливості ініціації коагуляційного каскаду, прийнято розмежовувати внутрішній та зовнішній шляхи зсідання крові (рис. 1.1) [12].

Первинний гемостаз: Пошкодження ендотелію судин → Звуження судин → vWF+тромбоцити → Тромбоцитарна пробка



**Рис. 1.1.** Схематичне зображення первинного та вторинного гемостазу, а також зовнішнього та внутрішнього шляхів зсідання крові, які призводять до утворення стабільного фібринового згустку [13]

Зовнішній шлях ініціюється тканинним фактором, який за присутності іонів кальцію утворює активує циркулюючий в кровотоці коагуляційний фактор VII, з яким утворює комплекс TF/FVIIa [11].

Цей комплекс забезпечує активацію факторів X та IX. Фактор X є центральною ланкою коагуляційного каскаду, оскільки на ньому відбувається об'єднання зовнішнього і внутрішнього шляхів зсідання крові. Це призводить до ферментативного перетворення протромбіну в активний тромбін, результатом чого є формування фібрину та подальшого стабільного фібринового згустку [14].

Ініціація внутрішнього шляху відбувається як реакція на контакт крові з будь-якою чужорідною поверхнею. Процес розпочинається з контактної активації фактора XII (фактора Хагемана), зумовленої його взаємодією з негативно зарядженими матриксними структурами, зокрема субендотеліальним колагеном. Надалі активований фактор XIIa забезпечує перетворення фактора XI у фактор XIa, що потребує присутності високомолекулярного кініногену як необхідного компонента реакції. Фактор XIa протеолітично активує фактор IX у фактор IXa. Останній разом з фосфоліпідами та іонами кальцію утворює внутрішню теназу – комплекс фVIIIa/фIXa, основною функцією якого є перетворення фактора X у його активну форму. Стабільність та активність комплексу безпосередньо залежать від концентрації іонів  $Ca^{2+}$  [15, 16].

Фактор Xa в асоціації з фактором Va формує протромбіназний комплекс, який каталізує розщеплення протромбіну до тромбіну. Останній перетворює фібриноген на фібрин з його подальшою полімеризацією і стабілізацією утвореного тромбу фактором XIIIa [17].

Протромбін (фактор II) являє собою глікопротеїн, біосинтез якого детерміновано наявністю вітаміну K та локалізовано у паренхімі печінки. Процес дозрівання цього протеїну передбачає обов'язкову посттрансляційну модифікацію, що полягає у карбоксилюванні початкових десяти залишків глутамінової кислоти (Glu). Результатом такої ферментативної реакції є

формування залишків у-карбоксихлутамату (Gla), що мають високу афінність до іонів кальцію. Така молекулярна властивість є фундаментальним фактором, що забезпечує адсорбцію протромбіну на негативно заряджених поверхнях фосфоліпідів, що є критичною умовою для інтеграції білка в коагуляційний каскад. Безпосередня активація протромбіну здійснюється активованим фактором Ха шляхом обмеженого протеолізу. Розщеплення поліпептидного ланцюга відбувається у специфічних сайтах Arg271-272 і Arg320-321, що зрештою призводить до утворення активної форми ферменту – тромбіну [18].

Тромбін за своєю біохімічною природою є сериною протеїназою, що виконує центральну функцію в системі гемостазу. Його головна роль полягає у забезпеченні ферментативного перетворення фібриногену на фібрин, волокна якого становлять структурну основу стабільного згустку [19]. Окрім прямого впливу на фібриноген, тромбін виступає потужним модулятором каскаду, активуючи фактори коагуляції V, VIII та XI, що посилює активацію системи зсідання крові. Завдяки механізму позитивного зворотного зв'язку це стимулює автокаталітичну генерацію значної кількості тромбіну. Водночас фермент здійснює регуляторний вплив на тромбоцитарну ланку: сприяє адгезії тромбоцитів до місця пошкодження судини, індукує агрегацію тромбоцитів через взаємодію зі специфічними рецепторами [16].

Додатковий ефект тромбіну полягає в активації фактора XIII (фібринстабілізуючого фактора), який забезпечує утворення ковалентних зв'язків між фібриновими мономерами, що суттєво підвищує механічну резистентність тромбу. Водночас тромбін бере участь у механізмах саморегуляції: шляхом взаємодії з мембранним рецептором тромбомодуліном він ініціює активацію системи протеїну C, що обмежує гіперкоагуляцію та запобігає патологічному тромбоутворенню [16, 20].

Фібриноген (фактор I) являє собою високомолекулярний розчинний глікопротеїн, який виступає попередником фібрину. Процеси біосинтезу молекул фібриногену перебувають під строгим регуляторним контролем з боку специфічних цитокінів. Зокрема, ініціація синтезу цього білка в гепатоцитах

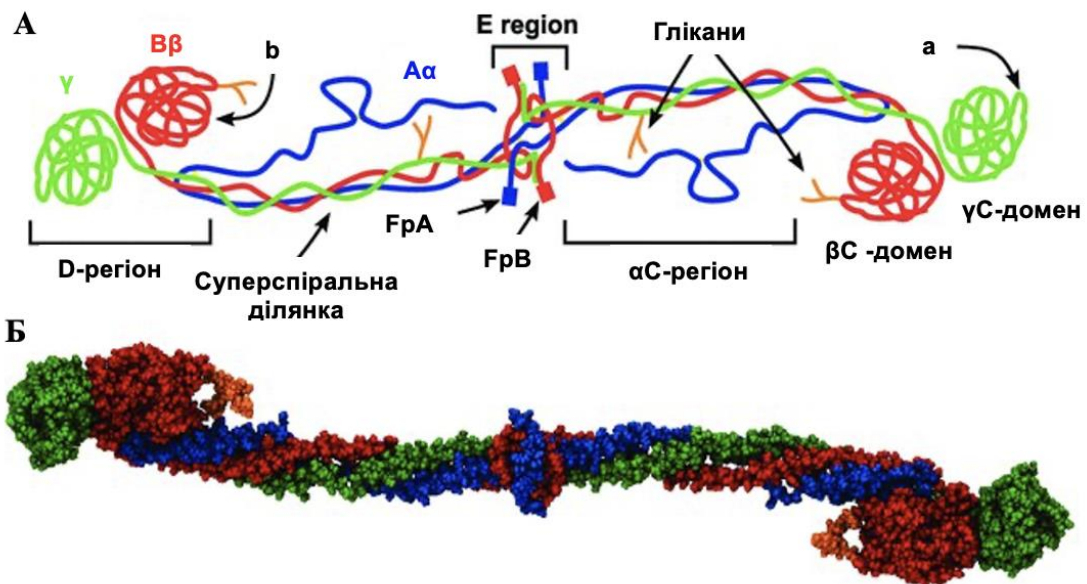
печінки індукується дією інтерлейкіну-6, тоді як такі прозапальні медіатори, як інтерлекін-1-бета та фактор некрозу пухлини-альфа, навпаки, чинять супресивний вплив на цей процес. Завдяки здатності значно підвищувати свій вміст у плазмі крові у відповідь на запальні реакції, фібриноген класифікується як білок гострої фази, що робить його ключовим маркером системної відповіді організму на пошкодження чи інфекцію [21, 22].

Молекула фібриногену має молекулярну масу на рівні 340 кДа, а її лінійні розміри в середньому становлять близько 45 нм. Молекула протеїну представлена двома симетричними структурними субодинацями, стабілізованими за допомогою дисульфідних містків. До складу кожної такої субодинаци входять три гетерогенні поліпептидні ланцюги, а саме  $A\alpha$ ;  $B\beta$  і  $\gamma$  [23]. Ці ланцюги інтегровані в єдину систему за рахунок наявності двадцяти дев'яти дисульфідних зв'язків [24]. Генетичний контроль синтезу фібриногену забезпечується кластером із трьох філогенетично споріднених генів – FGA, FGB та FGG, які детермінують первинну структуру відповідних поліпептидів [25].

Молекулярна маса  $A\alpha$ -ланцюга становить 66,5 кДа, а його структура сформована із шестисот десяти амінокислотних залишків, тоді як  $B\beta$ -ланцюг має молекулярну масу 52 кДа та складається із чотирьохсот шістдесяти одного залишку. Своєю чергою,  $\gamma$ -ланцюг має молекулярну масу 46,5 кДа, а його поліпептидний ланцюг утворено чотирьохстами одинадцятьма амінокислотними залишками [26]. Характерною особливістю первинної будови є повторювана послідовність Cys-Pro-X-X-Cys, що формує так звані «дисульфідні кільця», які розташовані на кожному з країв суперспіральних фрагментів та забезпечують поєднання всіх трьох типів ланцюгів у єдину молекулярну структуру [25].

У структурній організації молекули фібриногену виділяють центральний E-регіон, де зосереджені N-термінальні амінокислотні послідовності всіх трьох пар поліпептидних ланцюгів. Водночас C-кінцеві фрагменти  $B\beta$ - та  $\gamma$ -ланцюгів формують специфічні  $\beta$ C- та  $\gamma$ C-домени, які за своїми структурно-

функціональними характеристиками об'єднані у два периферичні дистальні D-регіони. На відміну від них,  $A\alpha$ -ланцюг характеризується наявністю просторово невпорядкованих та конформаційно лабільних С-кінцевих ділянок, що охоплюють амінокислотні залишки з 221 по 610. Ці сегменти утворюють так звані  $\alpha$ C-регіони, здатні до активної взаємодії з центральним E-регіоном за рахунок формування системи електростатичних зв'язків (рис. 1.2) [27].



**Рис. 1.2.** Схематичне зображення (А) та просторова структура (Б) молекули фібриногену.  $A\alpha$ -,  $B\beta$ - та  $\gamma$ -ланцюги позначені синім, червоним та зеленим кольорами відповідно. FrA – фібринопептид А; FrB – фібринопептид В; а – центр полімеризації «а»; b – центр полімеризації «b» [28]

Трансформація фібриногену в полімерний фібрин виступає фундаментальним етапом і ключовим результатом функціонування ензиматичного каскаду системи коагуляції [25]. Початкова фаза генерації фібрин-мономерів ініціюється шляхом тромбін-залежного відщеплення двох молекул фібринопептиду А (FrA), кожен з яких складається із шістнадцяти амінокислотних залишків. Цей процес реалізується через обмежений протеоліз пептидного зв'язку  $A\alpha$ Arg16-Gly17, локалізованого на

N-термінальних ділянках  $A\alpha$ -ланцюгів, що призводить до формування проміжної молекулярної форми – desA фібрину.

Паралельно, хоча і з суттєво меншою інтенсивністю, відбувається вивільнення двох фібринопептидів В (FpB). Дані пептиди, що містять чотирнадцять амінокислотних залишків, відщеплюються від N-кінцевих сегментів  $B\beta$ -ланцюгів у місці розриву зв'язку  $B\beta\text{Arg14-Gly15}$ . Низька швидкість відщеплення FpB порівняно з FpA зумовлена насамперед просторовою архітектонікою молекули, оскільки N-кінці  $A\alpha$ -ланцюгів є значно доступнішими для взаємодії з активним центром тромбіну. Таким чином, кінетичні розбіжності у вивільненні фібринопептидів базуються на специфічних стереохімічних обмеженнях, що виникають під час формування комплексу між ферментом та субстратом [25, 29].

Відщеплення фібринопептидів А супроводжується появою новоутвореного трипептидного мотиву гліцин-пролін-аргінін (Gly-Pro-Arg) на N-кінцевій ділянці  $\alpha$ -ланцюга, що позначається як центр полімеризації «А». Даний функціональний домен виявляє високу комплементарність до сайту зв'язування «а», локалізованого в межах  $\gamma$ -ланцюга дистального D-регіону сусідньої молекули фібрин-мономеру. Міжмолекулярні взаємодії типу «А-а» характеризуються як надзвичайно міцні, високоспецифічні та стабільні асоціації, що забезпечують первинну агрегацію білкових одиниць. Важливою особливістю молекули фібриногену є те, що центри полімеризації «а» перебувають у конститутивно відкритому стані, будучи постійно доступними для контактної взаємодії з активованими центрами «А» [25, 26].

Старт неензиматичної фази полімеризації фібрину характеризується самозбиранням двох високореактивних мономерів desA-фібрину, що супроводжується їхнім поздовжнім зміщенням на половину довжини молекули відносно один одного. У ході цього процесу пара центрів полімеризації «А», локалізованих у межах центрального E-регіону, вступає у взаємодію з двома комплементарними сайтами «а», розташованими в D-регіонах сусідньої молекули. Стабільність первинного димеру

забезпечується саме за рахунок міцності «А-а» зв'язків, які фіксують мономери в єдиний комплекс.

При подальшому приєднанні третьої молекули фібрин-мономеру ініціюється формування так званого наскрізного сполучення: при цьому дистальні D-регіони двох лінійно орієнтованих мономерів просторово зближуються, утворюючи специфічну D:D-структуру, яка через активований центр «А» асоціюється з E-регіоном третьої молекулярної одиниці [25, 26, 30]. Як наслідок, виникає складний молекулярний вузол DED, цілісність якого детермінована сукупністю «А-а» взаємодій, а також додатковими контактами між D:D- та D:E-доменами [31]. У результаті безперервного приєднання молекул desA-фібрину відбувається нарощування двониткових протофібрил, які виступають фундаментальним проміжним субстратом у загальному процесі полімеризації [25, 26].

Утворення товстих фібринових волокон відбувається шляхом латеральної асоціації протофібрил, що ініціюється після досягнення ними порогової довжини у 15-17 мономерів. Цей кінетичний бар'єр зумовлений низькою енергією поодиноких взаємодій, що потребує формування множинних міжмолекулярних контактів для стабілізації системи. Ключову роль у цьому процесі відіграють дистальні D-регіони, зокрема локуси в ділянках  $\gamma$ 350-360 та  $\gamma$ 370-380, які забезпечують просторову координацію молекул однієї протофібрили з двома сусідніми. Такий багатоточковий характер зв'язування дозволяє компенсувати слабкість окремих контактів та сприяє ефективному розгалуженню фібринового каркаса [32].

Важливо підкреслити, що окрім базових «А-а» контактів та D:D-асоціацій, у процес полімеризації фібрину залучаються додаткові міжмолекулярні взаємодії, які, хоч і не є критично необхідними для самого факту полімеризації, однак суттєво модулюють просторові та фізико-хімічні властивості фібринового каркаса. Вивільнення фібринопептидів В детермінує появу специфічного тетрапептидного мотиву Gly-His-Arg-Pro на N-кінцевому фрагменті В $\beta$ -ланцюга, що визначається як центр полімеризації «В». Цей

активний локус виявляє комплементарність до сайту зв'язування «b», інтегрованого у структуру  $\beta$ -ланцюга в межах дистального D-регіону. Функціонування системи «B-b» зв'язків значно підсилює процеси латеральної агрегації. Наукові дослідження вказують на те, що центри полімеризації «B» здатні асоціюватися з відповідними центрами «b» як у внутрішньому просторі окремої протофібрили, так і між сусідніми протофібрилами. При цьому внутрішньопротофібрилярні контакти розцінюються як менш імовірні порівняно з міжпросторовими через наявність суттєвих стеричних перешкод у щільно упакованій структурі. Дана обставина пояснює, чому взаємодії типу «B-b» не відіграють визначальної ролі на стадії ініціації складання фібрину, проте виступають потужним фактором, що сприяє потовщенню фібринових волокон шляхом бічної асоціації протофібрил [26].

Подібно до описаних раніше механізмів,  $\alpha$ C-регіони виступають важливими модуляторами, які сприяють посиленню латеральної асоціації, хоча й не є безпосередніми індукторами цього процесу. Завдяки високій гнучкості та просторовій лабільності, ці сегменти здатні до формування самостійних  $\alpha$ C- $\alpha$ C зв'язків як у межах однієї протофібрили, так і між сусідніми структурами. Результатом таких взаємодій є утворення  $\alpha$ C-полімерів, що реалізується через два взаємопов'язані механізми: самоагрегацію  $\alpha$ C-доменів, яка детермінована обміном  $\beta$ -шпильками в N-кінцевих субдоменах та контактну взаємодію C-кінцевого субдомену безпосередньо з  $\alpha$ C-конектором [26, 33].

Варто зауважити, що морфологія фібринової сітки суттєво залежить від цілісності цих структур. Так, при полімеризації фібрину з укороченими  $\alpha$ C-регіонами або des- $\alpha$ C-фібриногену формуються тонші волокна з підвищеним ступенем розгалуження порівняно з фібрином, утвореним із повнорозмірних молекул. Дане явище свідчить про критичне порушення механізмів бічної асоціації протофібрил за умови недостатньої довжини  $\alpha$ C-регіонів. Самі по собі асоціації типу  $\alpha$ C- $\alpha$ C характеризуються високим ступенем нестабільності та низькою енергією зв'язку, що робить їх

неспроможними виконувати функцію структурування полімеру автономно, без підтримки фундаментальних «А-а» взаємодій [25, 26]. Структуру полімерного фібрину прийнято описувати через сукупність таких показників, як діаметр волокон, щільність вузлів розгалуження, а також рівень пористості та ступінь проникності сформованої [34]. Масивніші (товстіші) волокна фібрину демонструють вищу швидкість ферментативного гідролізу під дією плазміну.

Структура фібрину підлягає багатофакторній регуляції, де кінетика формування згустку та швидкість полімеризації залежать від концентрації тромбіну, іонної сили розчину, а також рівня й активності фактора XIIIa. Іони хлору виступають специфічними модуляторами, які обмежують ріст товстих і жорстких волокон. Водночас рівень тромбіну критично впливає на швидкість елімінації фібринопептидів А: підвищення його концентрації стимулює утворення тонкосітчастої структури. Застосування низькомолекулярних гепаринів (НМГ) додатково модифікує будову згустку, підвищуючи його резистентність до плазмінового лізису, що безпосередньо корелює з інтенсивністю міграції ендотеліальних клітин.

Зазначені структурні трансформації фібринової сітки суттєво позначаються на регенеративних процесах, що стає особливо критичним при метаболічних порушеннях, таких як цукровий діабет або ожиріння [35].

## **1.2. Будова моноклональних антитіл**

Антитіла є специфічними глікопротеїновими молекулами з молекулярною масою близько 180 кДа [36, 37]. Біосинтез цих протеїнів здійснюється В-лімфоцитами – плазматичними клітинами [38]. Основна локалізація імуноглобулінів – плазма крові, тканини кісткового мозку та селезінки, а також екзокринні секрети та інтерстиціальна рідина. Ключова біологічна роль антитіл полягає у селективній ідентифікації та нейтралізації патогенних

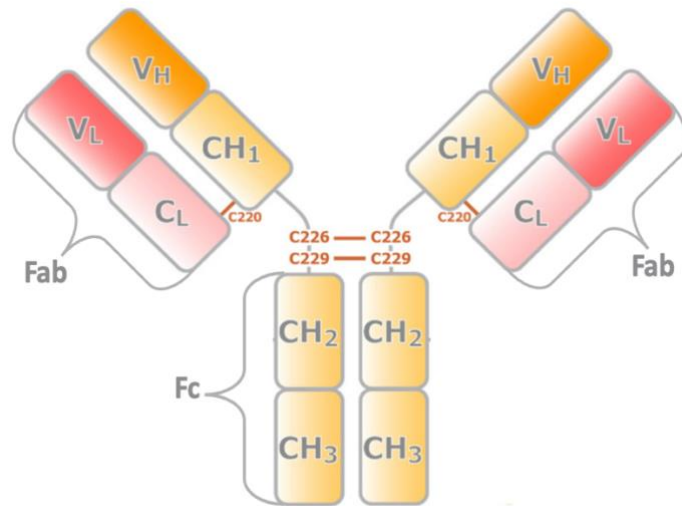
агентів, таких як бактерії, вірусні частки, паразитарні організми та токсичні продукти їхньої життєдіяльності [39].

У представників класу ссавців прийнято виділяти п'ять основних ізотипів імуноглобулінів, до яких належать IgM, IgD, IgG, IgE та IgA. Попри існуючі структурні відмінності між цими класами, що зумовлюють їхню функціональну спеціалізацію, усі вони побудовані на основі уніфікованої для даної групи протеїнів базової субодиниці, яка визначає їхню фундаментальну конформацію [40].

Зазначені гетеродимерні протеїнові структури сформовано парою ідентичних важких ланцюгів із молекулярною масою близько 55 кДа кожен, а також двома ідентичними легкими ланцюгами з молекулярною масою близько 24 кДа, що інтегровані в єдину систему за допомогою дисульфідних містків та нековалентних взаємодій [38, 39]. Кожен легкий ланцюг імуноглобуліну містить два структурні сегменти: константний ( $C_L$ ) та варіабельний ( $V_L$ ). Своєю чергою, важкий ланцюг має складнішу організацію, включаючи один варіабельний домен ( $V_H$ ) та послідовність із трьох константних ділянок, що позначаються як  $CH_1$ ,  $CH_2$  та  $CH_3$  [38].

Термінальні N-кінці обох типів ланцюгів формують два антигензв'язувальні Fab-фрагменти. У межах кожної варіабельної ділянки цих доменів локалізовано три гіперваріабельні області, відомі як ділянки, що визначають комплементарність (CDR). Сукупність цих зон утворює активний антигензв'язувальний сайт, який визначає здатність молекули до специфічної та високоафінної взаємодії з відповідними антигенами [40]. Паралельно з цим, C-кінцеві фрагменти двох важких ланцюгів формують Fc-регіон, який відповідає за реалізацію ефекторних функцій імуноглобуліну. Поєднання Fab-та Fc-доменів забезпечується через гнучку шарнірну ділянку, довжина якої становить двадцять три амінокислотні залишки. Наявність цього лабільного сегмента дозволяє антигензв'язувальним сайтам здійснювати латеральні та ротаційні рухи, що оптимізує процес контакту з епітопами [41]. Стабільність шарнірної зони підтримується двома дисульфідними містками в позиціях

Cys226 та Cys229, які з'єднують між собою важкі ланцюги, тоді як ковалентна фіксація легкого ланцюга до важкого реалізується через дисульфідний зв'язок у положенні Cys220 (рис. 1.3) [42].



**Рис. 1.3.** Схематичне зображення будови IgG. Жовтим позначено важкі ланцюги; червоним позначено легкі ланцюги; Cys220 – дисульфідний місток між важким та легким ланцюгами; Cys226 і Cys229 – дисульфідні містки між важкими ланцюгами [42]

Потрапляння антигену в організм ініціює гуморальну відповідь, що супроводжується синтезом цілого спектру імуноглобулінів, кожен з яких володіє специфічністю до певних епітопів на поверхні чужорідної молекули. Сукупність таких антитіл, які здатні розпізнавати множинні антигенні детермінанти одного і того самого об'єкту, класифікують як «поліклональні антитіла» [43]. На противагу, у сучасній біотехнології для потреб точної діагностики та спрямованої терапії застосовують моноклональні антитіла. Дана категорія імуноглобулінів продукується виключно гомогенною популяцією клітин, що походять від єдиного клітинного попередника. Завдяки такій однорідності моноклональні антитіла характеризуються унікальною здатністю селективно взаємодіяти лише з одним конкретним епітопом

антигену, що забезпечує їхню високу аналітичну точність та терапевтичну ефективність [44].

### 1.3. Терапевтичні препарати на основі антитіл

Фундаментальне відкриття гібридомної технології, представлене Köhler та Milstein [45] у середині 70-х років минулого століття, зумовило стрімкий прогрес у розробці моноклональних імуноглобулінів, що мають здатність до специфічної ідентифікації таргетних антигенів у діагностичній та терапевтичній практиці [46].

Новий етап розвитку настав у 1990-х роках, коли завдяки інтенсивному розвитку молекулярної біології було реалізовано можливість клонування генів, що кодують антитіла. Цей методологічний прорив відкрив шлях до цілеспрямованої модифікації молекул імуноглобулінів за допомогою стратегій випадкового або сайт-спрямованого мутагенезу, що фактично сформувало теоретичну та практичну базу для сучасної інженерії антитіл.

Одним із першочергових досягнень у цьому напрямі стала розробка конструкцій химерних антитіл. Структура таких молекул базується на поєднанні варіабельних доменів мишачого походження, які забезпечують специфічну антигензв'язувальну активність, із константними доменами імуноглобулінів людини. У результаті такого молекулярного злиття формуються антитіла, які приблизно на 70% ідентичні протеїнам людини та містять повністю гомологічну людині Fc-область. Такий підхід дозволив суттєво мінімізувати ризики імуногенності при клінічному застосуванні та значно покращити функціональну взаємодію введених препаратів з ефекторними ланками імунної системи пацієнта [46].

Подальший прогрес у сфері біоінженерії імуноглобулінів уможливив ще радикальніше скорочення частки мишачих фрагментів у структурі терапевтичних препаратів. Провідною стратегією у цьому напрямі стала

методика трансплантації ділянок, що визначають комплементарність (CDR-grafting), яка передбачає заміну гіперваріабельних петель реципієнтного антитіла людини на аналогічні сегменти цільового мишачого імуноглобуліну. Сформовані таким чином «гуманізовані» антитіла на 85-90% складаються з амінокислотних послідовностей людини, що зумовлює їхню мінімальну імуногенність порівняно з химерними аналогами [46].

Проте технологія отримання гуманізованих форм є значно складнішою та трудомісткою порівняно з простим конструюванням химерних протеїнів. Основна проблема полягає в тому, що в процесі ізольованого перенесення гіперваріабельних петель часто спостерігається суттєве зниження афінності антитіла до своєї мішені через зміну конформаційної підтримки з боку каркасних ділянок. Для нівелювання цих негативних ефектів застосовують стратегії сайто-спрямованого мутагенезу, вносячи точкові генетичні корекції в структуру молекули, що дозволяє повністю відновити вихідну енергію зв'язування з антигеном. На сучасному етапі розвитку медицини більшість терапевтичних препаратів на основі антитіл, що застосовуються в клінічній практиці, представлені саме химерними або гуманізованими модифікаціями імуноглобулінів [46].

Наступним еволюційним кроком у біоінженерії стала розробка систем для генерації імуноглобулінів людини. Завдяки заміні нативного мишачого набору генів, відповідальних за синтез антитіл, на відповідні локуси людини, було сконструйовано лінії трансгенних «гуманізованих» мишей. У відповідь на імунізацію імунокомпетентні клітини таких тварин продукують повноцінні IgG людини, що дозволяє інтегрувати ці моделі у класичну гібридомну технологію для отримання високоспецифічних терапевтичних антитіл. Даний методологічний підхід має низку фундаментальних переваг, насамперед через те, що процес афінного дозрівання імуноглобулінів відбувається в умовах природного імуногенезу *in vivo*. Це нівелює потребу у подальших молекулярних маніпуляціях для підвищення ефективності зв'язування, а

отримання антитіл одразу у формі повнорозмірних IgG є оптимальним для клінічного застосування [46].

Попри високу ефективність, використання трансгенних тварин має певні обмеження, зумовлені біологічними чинниками. Зокрема, у випадках високого ступеня гомології між цільовим антигеном та ендогенними протеїнами миші імунна система тварини може ігнорувати об'єкт через механізми імунологічної толерантності, що унеможлиблює синтез необхідних антитіл. Окрім того, методика виявляється недієздатною, якщо досліджуваний антиген є токсичним для організму гризуна, оскільки в такому разі замість активації гуморальної відповіді спостерігатиметься летальний ефект для біологічної моделі [46].

Протягом останніх десятиліть галузь біоінженерії імуноглобулінів продемонструвала суттєвий прогрес, результатом якого стала поява високоефективних препаратів, що посіли домінуючі позиції у терапії онкологічних патологій, аутоімунних порушень, а також інфекційних та інших системних захворювань [40]. Попри очевидні клінічні досягнення, застосування повнорозмірних моноклональних антитіл пов'язане з певними недоліками, зумовленими їхньою значною молекулярною масою та складною структурою. Зокрема, великий розмір молекул суттєво обмежує їхню здатність до глибокої дифузії в тканини, що є особливо критичним для проникнення всередину солідних пухлин. Крім того, тривалий період напіввиведення та постійна циркуляція в судинному руслі не завжди відповідають терапевтичним завданням, а Fc-опосередкована активація ефекторних ланок імунітету може провокувати розвиток небажаних побічних реакцій.

З метою нівелювання зазначених проблем дослідниками було розроблено низку компактних похідних – фрагментів антитіл, серед яких ключове місце посідають Fab-фрагменти, Fv-фрагменти та одноланцюгові варіабельні фрагменти (scFv). Такі протеїнові конструкції повністю зберігають специфічну антигензв'язувальну здатність вихідних імуноглобулінів, проте завдяки зменшеним розмірам мають суттєві переваги. Вони характеризуються покращеною фармакокінетикою, більш високою швидкістю проникнення крізь

тканинні бар'єри та можливістю ефективнішої доставки до важкодоступних молекулярних мішеней [4].

Fab-фрагменти (антигензв'язувальні домени), структура яких охоплює варіабельний і константний домени легкого ланцюга, а також варіабельний та початковий константний домени важкого ланцюга, можуть бути генеровані за допомогою обмеженого протеолізу нативних імуноглобулінів або шляхом застосування методів рекомбінантної ДНК. Використання рекомбінантної експресії відкриває широкі можливості для проектування дизайну Fab-фрагментів, що дозволяє суттєво оптимізувати їхню термодинамічну стабільність і афінність, а також організувати масове виробництво у різноманітних гетерологічних експресійних системах [47, 48].

Водночас Fv-фрагменти, які містять лише варіабельні ділянки важкого ( $V_H$ ) та легкого ( $V_L$ ) ланцюгів, з'єднані між собою виключно нековалентними взаємодіями, класифікуються як мінімально можливі одиниці антитіла, що зберігають специфічну здатність до розпізнавання антигену. Проте через відсутність стабілізуючого пептидного містка ці структури виявляють схильність до спонтанної дисоціації на окремі субодиниці. Попри те, що Fv-фрагменти рідко застосовуються в клінічній практиці як автономні терапевтичні агенти, вони виступають фундаментальною базою для конструювання складніших форматів, зокрема scFv-фрагментів, що мають вищу конформаційну стійкість [48].

Одноланцюгові варіабельні фрагменти являють собою найбільш лаконічні форми функціонально активних антитіл, сконструйовані шляхом ковалентного з'єднання варіабельних доменів важкого ( $V_H$ ) та легкого ( $V_L$ ) ланцюгів IgG за допомогою гнучкого пептидного лінкера. Таке молекулярне злиття дозволяє отримати єдину поліпептидну молекулу, яка повністю зберігає здатність до специфічного зв'язування з антигеном. Молекулярна маса таких конструкцій зазвичай коливається в межах 28 кДа [49, 50]. У порівнянні з форматами Fab та Fv, фрагменти типу scFv вирізняються підвищеною стабільністю, інтенсивнішою швидкістю дифузії в тканини та значно

ширшими можливостями для структурного дизайну. Завдяки мінімальним розмірам ці фрагменти забезпечують високу ефективність таргетування новоутворень, а їхня модульна природа дозволяє легко трансформувати їх у біспецифічні або мультиспецифічні агенти, що суттєво розширює діапазон їхнього терапевтичного застосування. На сьогоднішній день scFv-фрагменти посідають ключове місце в арсеналі засобів сучасної імунотерапії та систем цільової доставки лікарських препаратів до молекулярних мішеней [49].

У сучасних стратегіях боротьби з неопластичними процесами фрагментовані форми антитіл застосовуються як для верифікації злоякісних новоутворень, так і для реалізації протоколів спрямованої терапії. Завдяки оптимізованому розміру вони демонструють вищу дифузійну здатність щодо пухлинних утворень порівняно з нативними імуноглобулінами, що дозволяє суттєво вдосконалити векторизовану доставку радіоізотопних міток або високотоксичних цитостатичних агентів безпосередньо до пухлинних клітин.

У сфері клінічної діагностики особливе значення мають радіоактивно мічені Fab- та scFv-конструкції, використання яких дозволяє значно підвищити роздільну здатність та діагностичну точність методів позитронно-емісійної томографії (ПЕТ) та однофотонної емісійної комп'ютерної томографії (ОФЕКТ). Окрім того, значний потенціал мають біспецифічні scFv-агенти, здатні до одночасного зв'язування з пухлинними антигенами або рецепторами ініціації апоптозу та рецепторними структурами імунних ефektorів. Така подвійна специфічність дозволяє штучно зближувати імунокомпетентні клітини з мішенню, стимулюючи потужну та селективну цитотоксичну відповідь організму проти пухлин [51].

Фрагментовані імуноглобуліни забезпечують селективну блокаду цитокінів або рецепторів, маючи перевагу над повнорозмірними антитілами завдяки відсутності Fc-домену. Це нівелює ризики антитілозалежної цитотоксичності (ADCC) та активації комплементу, що критично для лікування ревматоїдного артриту чи запалення кишечника, де потрібно обмежити системну імунну відповідь [52]. В інфекційній терапії компактні

розміри фрагментів гарантують кращий біорозподіл у тканинах для нейтралізації патогенів. Рекомбінантні scFv-конструкції проти ВІЛ, грипу та COVID-19 блокують адгезію вірусів до клітин хазяїна, уражаючи їхні ключові поверхневі протеїни [53, 54].

Використання фрагментованих імуноглобулінів становить вагому частку в сучасних стратегіях антикоагулянтного лікування. Найбільш репрезентативним прикладом у цій галузі є Абциксимаб – химерний Fab-фрагмент, розроблений на основі мишачого моноклонального антитіла лінії 7E3 [55]. Фармакологічна дія Абциксимабу базується на його здатності селективно зв'язуватися з  $\beta_3$ -субодиницею тромбоцитарного глікопротеїнового рецептора IIb/IIIa. Локалізуючись у безпосередній близькості до сайту взаємодії з лігандом, цей фрагмент ефективно інгібує процеси агрегації тромбоцитів [55].

Даний лікарський засіб отримав офіційне схвалення у 1994 році як компонент ад'ювантної терапії, спрямованої на запобігання гострому тромбоутворенню під час проведення катетеризації коронарних артерій у пацієнтів із гострим інфарктом міокарда з елевацією сегмента ST (STEMI). Шляхом блокади фінальних етапів активації тромбоцитів Абциксимаб дозволяє суттєво мінімізувати ризик виникнення оклюзійних ускладнень, що критично важливо для покращення клінічного прогнозу та результатів лікування осіб із гострими формами серцево-судинних патологій [56].

Очікується, що завдяки безперервній еволюції методів рекомбінантної інженерії, створення нових терапевтичних агентів на основі фрагментованих імуноглобулінів зберігатиме високу динаміку розвитку. Сучасні інноваційні платформи дозволяють корегувати складні патологічні стани, раніше резистентні до традиційного лікування. Завдяки точності та універсальності фрагментів створюються препарати з винятковою афінністю до молекулярних мішеней, що прямо підвищує клінічну ефективність. Можливість дизайну стабільних малогабаритних молекул не лише спрощує біотехнологічне

виробництво, а й формує нові підходи до терапії з мінімальною імуногенністю та зниженим профілем побічної токсичності.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 2.1. Матеріали

У роботі було використано такі реактиви та матеріали: трис, ДСН (Bio-Rad Laboratories, США), акриламід («Sigma», США), біс-акриламід («Sigma», США), ТЕМЕД («Ренал», Угорщина), Кумасці R-250 («Sigma», США), маркерні протеїни для електрофорезу («Thermo Fisher Scientific», США), RPMI 1640 («Sigma», США), Protein G Sepharose («Sigma», США), гіпоксантин («Thermo Fisher Scientific», США), трансферин («Sigma», США), FCS («Sigma», США), розчин Хенкса 10× («Sigma», США), кролячі антитіла проти мишачих IgG – пероксидаза («Sigma», США), тромбін («Merck», Німеччина), АДФ («Merck», Німеччина), уранілацетат («Merck», Німеччина), формвар (Formvar 15/95 Resin, «PELCO», США). НЕРЕС («Merck», Німеччина), S2238 (H-D-Phe-Pip-Arg-pNa), S2251 (D-Val-Leu-Lys-pNa) («Chromogenix», Швеція), папаїн («Thermo Fisher Scientific», США), DEAE-Sepharose (Cuvita, США) Решта використаних реактивів – вітчизняного виробництва ступеня чистоти «хч» та вище.

Фібриноген отримували з плазми крові людини шляхом висолювання 16% сульфатом натрію. Зберігали фібриноген (~30 мг/мл) при температурі -20°C. Чистоту препарату перевіряли електрофоретично.

Культури гібридом було одержано в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України.

## 2.2. Методи дослідження

### 2.2.1. Культивування гібридом

Для отримання моноклональних антитіл, специфічних до фібриногену, з бібліотеки моноклональних антитіл до фібриногену та його фрагментів було взято відповідну гібридому 2d-2a.

Заморожені в азоті клітини гібридами 2d-2a поступово розморожували при 37° С на водяній бані. Промивка від DMSO відбувалась середовищем Хенкса та центрифугуванням протягом 10 хвилин при 1000 об/хв. Цей етап повторювали двічі для якісного очищення культури клітин. Осад клітин було ресуспендувано в поживному кондиційному середовищі, що складалося зі 100 мл RPMI 1640, 40 мл FCS, 60 мл культурального середовища мієломи х-63, 800 мкл амфотерицину, 100 мкл трансферину, 4 мл НТ (0,19 г/л тимідину та 0,68 г/л гіпоксантину на 200 мл розчину). У цьому середовищі культуру гібридами 2d-2a культивували допоки вона не почала швидко наростати. Після заміни кондиційного середовища культивування гібридами проводили в 10 % RPMI 1640 – середовищі для гібридом (450 мл RPMI 1640, 50 мл FCS, 10 мл НТ на 500 мл) при 37 °С [57].

### 2.2.2. Афінна хроматографія

Моноклональне антитіло 2d-2a було очищено методом афінної хроматографії. Відфільтровану надосадову рідину з моноклональними антитілами наносили на Protein G Sepharose, попередньо врівноважену 0,1 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  буфером, рН якого доводили до 7,0 додаванням NaOH. Перед нанесенням до надосадової рідини додавали інгібітор протеїназ – контривен 10 000 од/мл (20 мкл на 100 мл надосадової рідини). Швидкість нанесення

становила 0,5 мл/хв. Фракцію, що не зв'язалась з Protein G Sepharose, збирали з метою пересвідчитись у відсутності в ній моноклонального антитіла 2d-2a. Після нанесення носій промивали тим самим буферним розчином (0,1 М  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  буфером, рН 7,0). Якість відмивки колонки перевіряли спектрофотометрично, при довжині хвилі 280 нм. Елюцію антитіла проводили 0,1 М Гліцин-НСІ буфером, рН 3,0, а швидкість елюції складала 0,5 мл/хв. Для миттєвої нейтралізації усіх зібраних фракції використали 1 М розчин гідроортофосфату калію (125 мкл на 2 мл фракції). Пікову фракцію визначали спектрофотометрично за оптичною густиною при довжині хвилі 280 нм.

З використанням пристрою для ультрафільтрації з мембраною РМ-10 («Amicon», США) проводили діаліз та концентрування розчину з моноклональним антитілом в основі якого був 0,01 М  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , рН 7,2-7,4, що містив 0,14 М  $\text{NaCl}$  [57].

### 2.2.3. Імуноензимний аналіз

Непрямий твердофазний імуноензимний аналіз використовували для дослідження специфічності та активності моноклональних антитіл до фібриногену та фібрину. Для цього по 110 мкл антигенів (фібриноген розводили в 0,2 М ацетатно-аміачний буфер (рН 8,5); фібрин desAB розчиняли в 0,2 М ацетатно-аміачний буфері (рН 8,5) з додаванням 3 М сечовини) вносили в лунки 96-лункових мікропланшетів (greiner Microlon, США). Необхідна концентрація антигену має бути 10 мкг/мл. Після внесення антигенів проводили інкубацію протягом 18 годин при 4 °С.

Після етапу сорбції антигенів лунки промивали 3 рази по 150 мкл 0,01 М  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , рН 7,2-7,4 з додаванням 0,14 М  $\text{NaCl}$  та 0,05 % твін-20 (ТФБ). Після останнього додавання в лунки ТФБ мікропланшет залишали в темряві протягом 30 хвилин при кімнатній температурі. Через 30 хвилин рідину струшували з планшету, ретельно видаляючи залишки вологи. Далі в перший

ряд вносили по 200 мкл очищеного моноклонального антитіла 2d-2a попередньо розведеного в ТФБ до кінцевої концентрації 10 мкг/мл, або надосадової рідини, в якій росли клітини гібридами 2d-2a, або надосадової рідини відповідної гібридами, зібраного після хроматографічного розділення. Усі інші ряди заповнювали ТФБ по 100 мкл. Титрування зразків з антитілами проводили за наступним принципом: з лунок першого ряду відбирали по 100 мкл рідини і додавали в лунки другого ряду та ресуспендували. Ці ж операції проводили з лунками другого ряду, третього і наступних. З останнього ряду відбирали по 100 мкл рідини і видаляли їх з планшету. У залишені контрольні лунки зразки з антитілами не вносили. Виконавши титрування, планшет інкубували протягом години в термостаті при 37 °С. Після інкубації вміст лунок видаляли, і лунки промивали тричі по 150 мкл ТФБ. Далі в кожну лунку вносили по 100 мкл кон'югату пероксидази хрому із кролячими антимишачими антитілами з розведенням 1:5000 та інкубували протягом 1 годину в термостаті при 37 °С. Знову повторювали процедуру видалення вмісту з лунок та їх промивання. Далі в усі лунки мікропланшета вносили по 100 мкл 0,05 М М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , рН 6,0, з 0,03 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  та 0,04 % OPD та інкубували у темряві протягом 30 хв при кімнатній температурі. Для зупинки реакції в усі лунки додавали по 50 мкл 4 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

На автоматичному мікроспектрофотометрі (RT 2100 C) визначали оптичну густина при довжині хвилі 492 нм [58].

#### **2.2.4. Отримання збагаченої тромбоцитами плазми крові**

Зібрану цільну кров стабілізували 3,8% цитратом натрію у співвідношенні 9:1. Шляхом центрифугування при 160 g протягом 20 хвилин при 20 °С отримували збагачену тромбоцитами плазму крові (ЗТПК) отримували. Щоб не обмежувати тромбоцитам доступ кисню, пробірки не закривали під час центрифугування [59].

### 2.2.5. Агрегатометрія

Перед експериментом проводили скринінгову оцінку агрегації тромбоцитів, і виявлені зразки з гіпоагрегацією було вилучено при нормі 200-300 тис. тромбоцитів/мкл. Для агрегатометрії використовували збагачену тромбоцитами плазму крові людини. Агрегацію тромбоцитів було проведено протягом трьох годин після забору крові за допомогою фотооптичного агрегометра SOLAR AP2110, згідно методики [60]. В якості індукторів агрегації тромбоцитів використовували АДФ (12,5 мкМ) або колаген (2 мкг/мл). У контрольну кювету агрегометра додавали 250 мкл ЗТПК, 25 мкл індуктора та 25 мкл 0,025 М CaCl<sub>2</sub>. У тестову кювету до ЗТПК додавали моноклональне антитіло 2d-2a до його кінцевої концентрації 60 мкг/мл, що відповідає співвідношенню антитіла до фібриногену як 1:20.

Процес агрегації реєстрували протягом 10 хвилин без нормалізації результатів до початкового рівня світлопропускання.

### 2.2.6. Турбідиметричні вимірювання

Турбідиметричне вимірювання відбувалось за рахунок реєстрації світлорозсіювання при довжини хвилі 350 нм. Дослідна проба містила 0,05 М Трис-HCl буфер, який містив 0,13 М NaCl (pH 7,4), 0,025 М CaCl<sub>2</sub>, нативний фібриноген, кінцева концентрація якого становила 0,1 мг/мл, або плазму крові донорів та монколональне антитіло 2d-2a або його Fab-фрагмент. Антитіло та Fab-фрагмент брали у молярних співвідношеннях 1:2, 1:1 та 2:1 до фібриногену. Полімеризацію фібрину ініціювали додаванням тромбіну (0,25 NIH/мл) [61].

### 2.2.7. Електронна мікроскопія

Методу трансмісійної електронної мікроскопії негативно контрастованих зразків з деякими модифікаціями використовували для дослідження утвореної фібринової сітки [62]. Водний розчин уранілацетату (1%) використовували як негативний контрастер. Сітки для електронного мікроскопа (1GC100, «PELCO», США) покривали шаром 0,3% розчину формвару в дихлоретані. Розпиленим вуглецем закріплювали сітки, використовуючи вакуумний випарювач HUS-5GB («Hitachi», Японія). Дослідні зразки готували за методикою для турбідиметричного дослідження, використовуючи нативний фібриноген. Від проби було відібрано аліквоти через 30 та 300 с. Після цього аліквоти розводили 0,05 М амоній-форміатним буфером, кінцева концентрація протеїну яких становила 7 мкг/мл. Розведені аліквоти переносили по 10 мкл на вкриті вуглецем сітки. Через 2 хв такі сітки обробляли 1% водним розчином уранілацетату та інкубували. Після цього сітки промивали попередньо 0,1 М амоній-ацетатним буфером, рН 7,9, а потім 0,01 М амоній-ацетатним буфером, рН 8,5 протягом 3-5 хв. Використовуючи фільтрувальний папір, видаляли залишки розчину з сіток. Наступним кроком було накладання сітки на краплину контрастера, яку попередньо нанесли на поверхню тефлонового блоку. Через 1 хв контрастер було видалено за рахунок водноструменевого насосу.

У дослідженні використовували електронний мікроскоп Н-600. Одержані електронно-мікроскопічні зображення мали збільшення 1:25000 та 1:50000.

### 2.2.8. Визначення загального гемостатичного потенціалу плазми крові

Для визначення загального гемостатичного потенціалу плазми крові всі досліді проводили в 0,02 М HEPES-буфері (рН 7,4) з додаванням 0,15 М NaCl та 6,2 мМ CaCl<sub>2</sub>. Зразки плазми крові (40 мкл) інкубували з або без тканинного

активатора плазміногену (t-PA), кінцева концентрація якого була 75 МО/мл. Загальний об'єм суміші становив 400 мкл. Коагуляцію було ініційовано додаванням  $\text{CaCl}_2$  до кінцевої концентрації 25 мМ. За процесом формування згустку спостерігали спектрофотометрично, реєструючи зміни оптичної густини за допомогою спектрофотометра SF-2000.

Визначення активності тромбіну та плазміну, що утворюються під час формування і лізису фібринового згустку в плазмі крові, відбувалось в присутності t-PA та хромогенного субстрату S2251 (H-D-Val-Leu-Lys-pNA). Активність ферментів оцінювали за допомогою турбідиметричного аналізу та вимірювання амідазної активності плазміну в момент повного розчинення згустку (V).

Амідазну активність тромбіну оцінювали окремо за допомогою хромогенного субстрату S2238 (H-D-Phe-Pip-Arg-pNa) у кінцевій концентрації 0,3 мМ. Коагуляцію було ініційовано шляхом додавання  $\text{CaCl}_2$  до кінцевої концентрації 25 мМ. Загальний об'єм реакційної суміші становив 400 мкл.

### **2.2.9. Отримання Fab-фрагментів з повнорозмірного моноклонального антитіла**

Fab-фрагменти отримували шляхом папаїнового гідролізу повнорозмірного моноклонального антитіла. Реакцію проводили у кінцевому об'ємі 2 мл у 0,05 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,4, 0,15 М NaCl, 0,06 М цистеїн, 0,016 М ЕДТА буфері. Кінцева концентрація антитіла в реакційній суміші становила 0,55 мг/мл, а папаїну 50 мкг/мл. Інкубацію проводили протягом 4 год при 37 °C.

Після завершення гідролізу реакційну суміш центрифугували при 2000 об/хв протягом 15 хвилин. Після чого надосад використовували для подальшого очищення.

### 2.2.10 Метод іонообмінної хроматографії

Fab-фрагменти очищували шляхом іонообмінної хроматографії. В якості сорбенту було використано DEAE-Sepharose, зрівноважену 0,01 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , рН 8,0. Елюцію проводили ступінчастим градієнтом NaCl: 0,1; 0,2; 0,5 і 1 М NaCl у 0,01 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , рН 8,0. Швидкість елюції становила 5 мл/хв. Об'єм колонки – 12 мл.

### 2.2.11. Електрофорез протеїнів у ПААГ

Для якісного визначення протеїнів та їх молекулярної маси використовували електрофорез у поліакриламідному гелі (ПААГ) в трис-гліциновій системі для вертикального гель-електрофорезу [58] у пластинках 10% ПААГ. Розподільчий гель з кінцевою концентрацією акриламідну 10% готували на основі гелевого буфера, до складу якого входили 22,71 г трису, 0,5 г ДСН, 1 мл ТЕМЕД, на 250 мл розчину, рН 8,8. Концентруючий гель з кінцевою концентрацією акриламідну 10% готували на основі гелевого буфера до складу якого входили 3,029 г трису, 0,2 г ДСН, 0,4 мл ТЕМЕД, на 100 мл розчину, рН 6,8. Електродний буфер для проведення гель-електрофорезу містив 6 г/л трису, 28,8 г/л глютаміну та 1 г/л ДСН, рН 8,5.

Сила струму під час розділення протеїнів у концентруючому гелі становила 19 мА, а для розподільчого – 36 мА.

Зразки для електрофорезу готували додаванням буферу для зразків, який містив 5% сахарози, 2% ДСН та бромфенолу (для проявлення забарвлення зразків), до розчину протеїну, концентрація якого була 1 мг/мл, та електродного буферу. Зразки нагрівали до кипіння перед нанесенням на гель. Гель забарвлювали розчином Кумасі (0,01% Кумасі, G-250 у 25% ізопропанолі та 10% оцтової кислоти) для фарбування протеїнів. Щоб видалити залишки барвника, використовували 2-8% розчин оцтової кислоти.

Молекулярні маси протеїнів встановлювали за допомогою маркерних протеїнів («Thermo Fisher Scientific», США (245, 180, 130, 100, 75, 63, 48, 35, 25, 20, 17, 11 кДа). Аналіз електрофореграм проводили у програмі TotalLab TL100 (Phoretix).

### **2.2.12. Статистична обробка результатів дослідження**

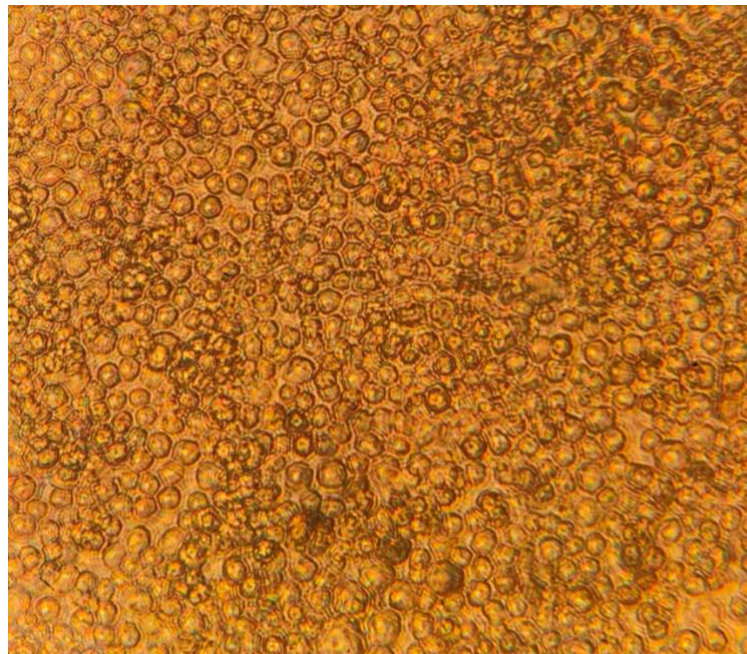
Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням стандартних статистичних програм «Microsoft Excel». Результати представлено як  $M \pm m$ . Аналіз електрофореграм було проведено у програмі TotalLab TL100 (Phoretix). Статистичну значущість відмінностей оцінювали за допомогою U-критерія Манна-Вітні. Відмінності вважались статистично значущими при  $p \leq 0,05$ .

## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

#### 3.1. Отримання та характеристика фібриноген-специфічного антитіла 2d-2a

Моноклональні антитіла є зручними інструментами у вивченні протеїнових взаємодій. Антитіло 2d-2a, специфічне до В $\beta$ -ланцюга молекули фібриногену, є особливо важливим, зважаючи на його потенціал, як прототип антикоагулянтного препарату [63]. Щоб його отримати, спершу було культивовано відповідну гібридому в 10 % середовищі для гібридоми при 37°C протягом трьох тижнів (рис. 3.1).



**Рис. 3.1.** Мікрофотографія клітин гібридоми 2d-2a на 7 день культивування в 10 % середовищі RPMI 1640 при збільшенні в 400 разів

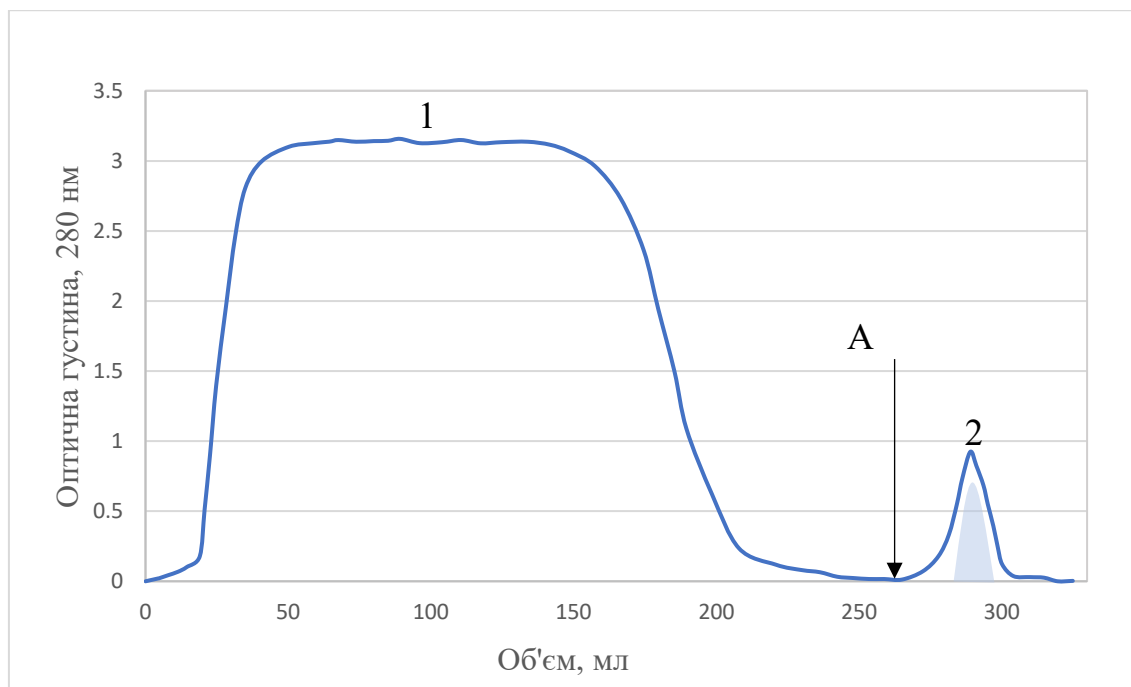
Для оцінки наявності специфічних антитіл у культуральному середовищі було проведено непрямий твердофазний імуоензимний аналіз. В якості антигенів було використано фібриноген та фібрин (рис. 3.2).



**Рис. 3.2.** Зв'язування моноклонального антитіла 2d-2a з культурального середовища з іммобілізованими на мікропланшеті фібриногеном (ФГ) та фібрином (ФН) в твердофазному імуоензимному аналізі. монАТ – моноклональне антитіло

У результаті було підтверджено, що моноклональне антитіло 2d-2a специфічно зв'язується з фібриногеном і при цьому ніяк не взаємодіє з фібрином.

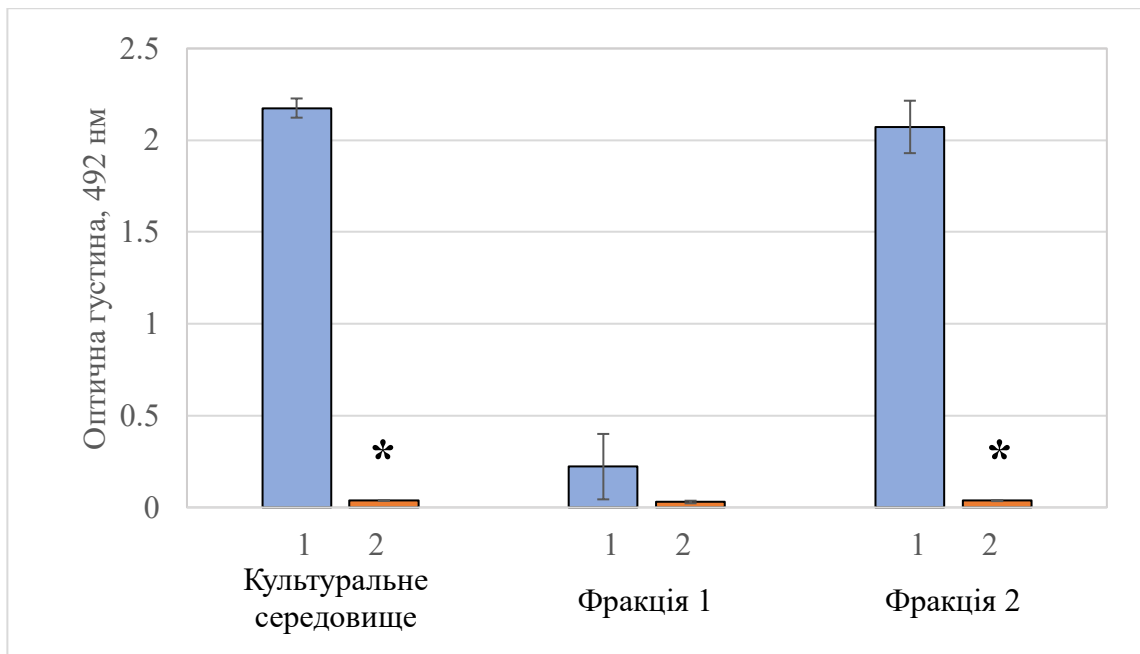
Наступним кроком було очищення моноклонального антитіла із культурального середовища, в якому росли гібридами, з використанням афінної хроматографії на Protein G Sepharose. Попередньо 140 мл культурального середовища профільтрували та додавали 28 мкл інгібітор протеїназ Контривену. Колонку врівноважили 0,1 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  рН 7,0. Швидкість елюції складала 0,5 мл/хв. Елюцію проводили 0,1 М Гліцин-НСІ буфером, рН 3,0 зі швидкістю 0,5 мл/хв (рис. 3.3).



**Рис. 3.3.** Хроматограма очищення моноклонального антитіла 2d-2a з культурального середовища за допомогою афінної хроматографії на Protein G Sepharose: 1 – фракція, що не зв’язалася з носієм за даних умов; А – зміна 0,1 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  буфера, рН 7,0 на 0,1 М гліцин- $\text{HCl}$  буфер, рН 3,0; 2 – фракція, що містить антитіла

Аби підготувати одержаний розчин моноклонального антитіла для подальшого застосування, його концентрували та одночасно переводили у 0,01 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , рН 7,2-7,4, що містив 0,14 М  $\text{NaCl}$  за допомогою ультрафільтраційного пристрою “Amicon” з мембраною PM-10.

Після цього з використанням непрямого твердофазного імуноензимного аналізу було оцінено активність виділеного моноклонального антитіла у порівнянні з культуральним середовищем. Для оцінки специфічності та ефективності зв’язування антитіла використовували фібриноген та фібрин як антигени (рис. 3.4).



**Рис. 3.4.** Зв'язування фібриногену (1) та фібрину (2) з культуральним середовищем, фракцією 1 (що не зв'язалась з носієм за даних умов) та фракцією 2 (очищеним моноклональним антитілом 2d-2a)

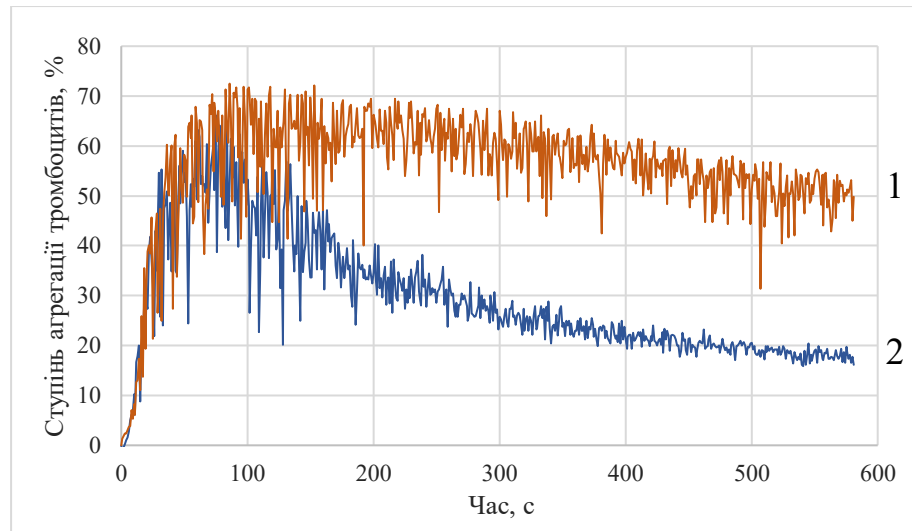
\* – різниця статистично значуща за  $p \leq 0,05$ , порівняно з фібриногеном в якості антигену

За результатами проведеного непрямого твердофазного імуоензимного аналізу було підтверджено його абсолютну специфічність зв'язування моноклонального антитіла 2d-2a з фібриногеном, що дозволило перейти до дослідження його антитромботичного впливу.

### 3.2. Антикоагулянтна дія фібриноген-специфічного антитіла 2d-2a *in vitro*

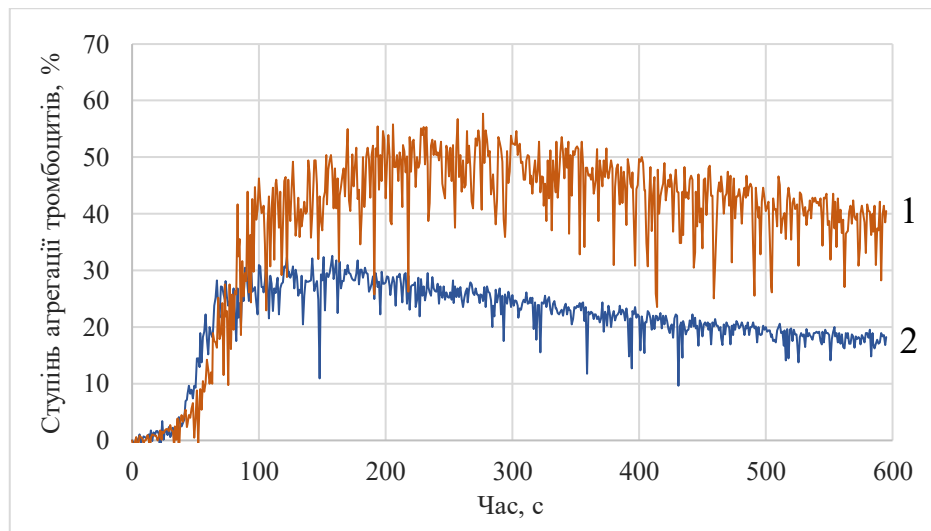
Агрегація тромбоцитів відбувається насамперед завдяки взаємодії фібриногену з активованими тромбоцитами через зв'язування з GРІІb/ІІІа-рецепторами. Водночас існують різні агенти, здатні інгібувати цей процес, зокрема пептиди, фрагменти протеїнів або антитіла, що порушують взаємодію фібриногену з рецепторами тромбоцитів.

Для дослідження впливу специфічного до В $\beta$ -ланцюга фібриногену моноклонального антитіла 2d-2a на агрегацію тромбоцитів було проведено агрегатометричний аналіз збагаченої тромбоцитами плазми крові з використанням індукторів – АДФ (рис. 3.5) та колагену (рис. 3.6). У ЗТПК вносили антитіло в кінцевій концентрації 60 мкг/мл, що відповідає співвідношенню антитіла до фібриногену 1:20.



**Рис. 3.5.** АДФ-індукована агрегація тромбоцитів людини у збагаченій тромбоцитами плазмі крові: 1 – типова агрегатограма ЗТПК; 2 – агрегатограма ЗТПК в присутності моноклонального антитіла 2d-2a в кінцевій концентрації 60 мкг/мл

Додавання антитіла 2d-2a призводило до зниження рівня агрегації тромбоцитів, що свідчить про його здатність порушувати взаємодію фібриногену з рецепторами GPIIb/IIIa. Зокрема, при АДФ-індукованій агрегації спостерігали зниження ступеня агрегації на 30%.

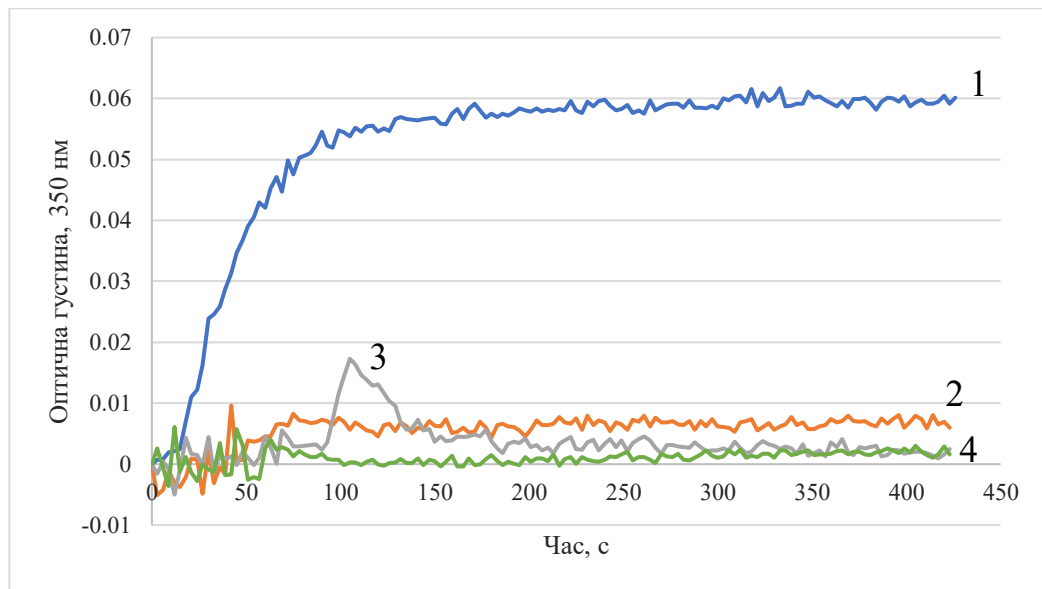


**Рис. 3.6.** Колаген-індукована агрегація тромбоцитів людини у збагаченій тромбоцитами плазмі крові: 1 – типова агрегатограма ЗТПК; 2 – агрегатограма ЗТПК в присутності моноклонального антитіла 2d-2a в кінцевій концентрації 60 мкг/мл

У результаті проведення колаген-індукованої агрегації з додаванням моноклонального антитіла 2d-2a зниження ступеня агрегації становило 20%.

Для оцінки впливу антитіла 2d-2a на полімеризацію фібрину було застосовано турбідиметричний аналіз, що дозволяє реєструвати зміни оптичної густини при формуванні фібринової сітки. Експеримент проводили у двох системах: у модельній системі фібриноген-тромбін та в плазмі крові.

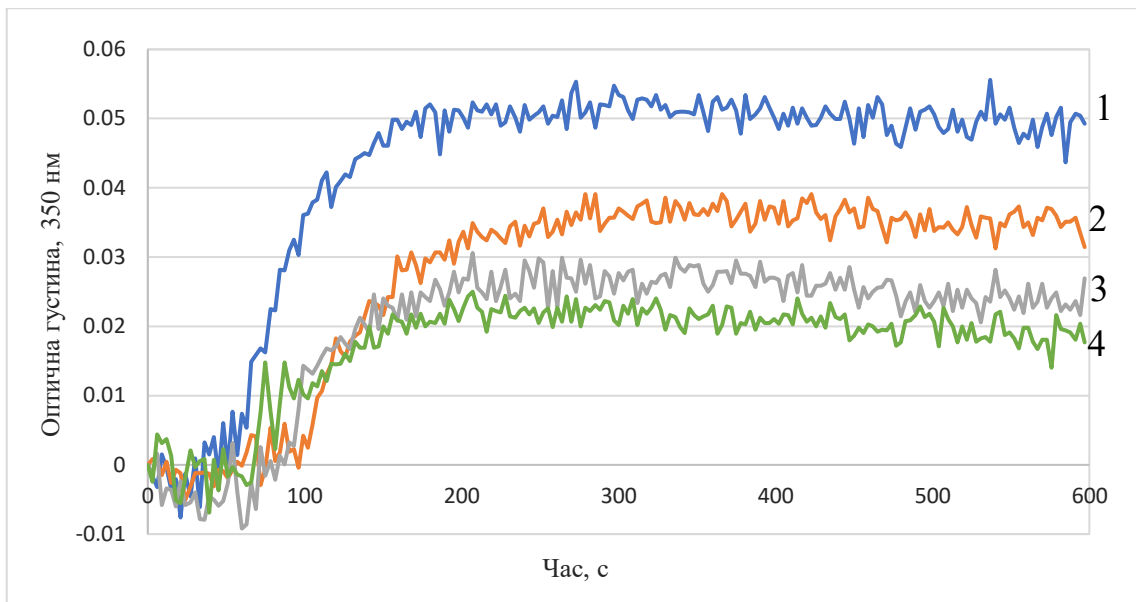
Аби дослідити полімеризацію фібрину, до розчину фібриногену з кінцевою концентрацією 0,1 мг/мл у 0,05 М трис-НСl буфері рН 7,4 з 0,013 М NaCl додавали тромбін (кінцева концентрація 0,25 NIH/мл) та CaCl<sub>2</sub> (кінцева концентрація 0,001 М). Моноклональне антитіло 2d-2a брали у різних молярних співвідношеннях до фібриногену (рис. 3.7).



**Рис. 3.7.** Зміна мутності під час тромбін-індукованої полімеризації фібрину: 1 – контроль; 2 – моноклональне антитіло 2d-2a в молярному співвідношенні 1:2 до фібриногену; 3 – моноклональне антитіло 2d-2a в молярному співвідношенні 1:1 до фібриногену; 4 – моноклональне антитіло 2d-2a в молярному співвідношенні 2:1 до фібриногену

За таких умов спостерігали значне інгібування полімеризації фібрину в присутності антитіла 2d-2a, яке становило близько 90% за різного молярного співвідношення антитіла з фібриногеном. Такий результат вказує на його здатність блокувати процес формування фібринової сітки. Отриманий ефект у чистій протеїновій системі був обнадійливим.

Аби перевірити, чи буде зберігатись такий ефект в умовах, що більше відповідають фізіологічним, дослідження повторили на плазмі крові людини (рис. 3.8).

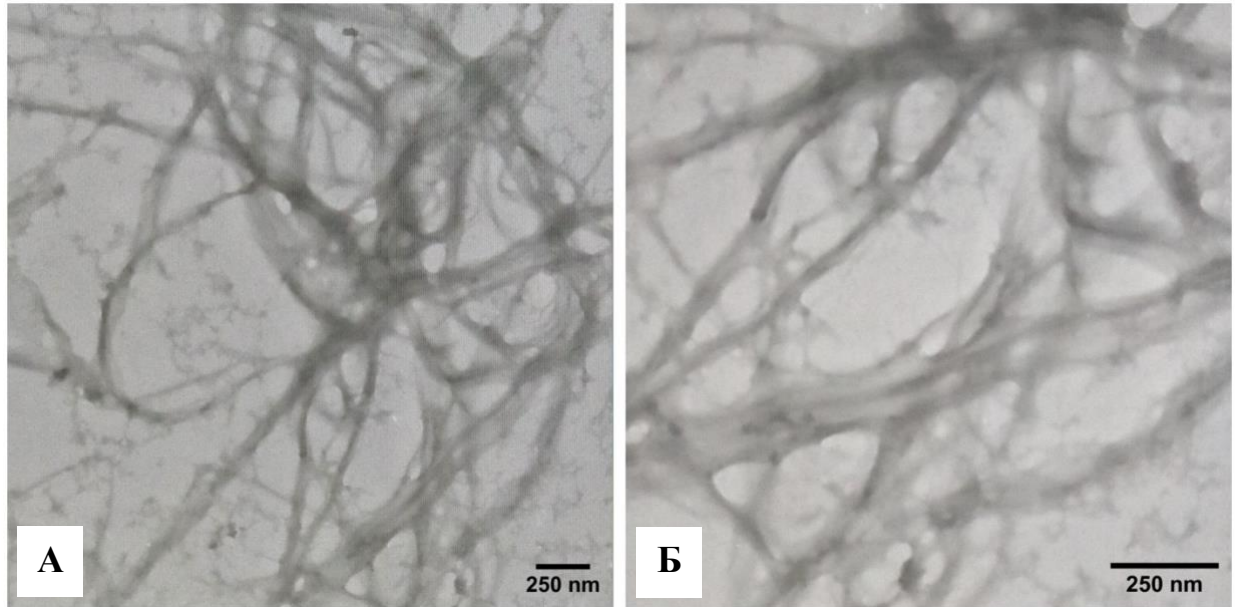


**Рис. 3.8.** Зміна мутності під час тромбін-індукованої полімеризації фібрину в плазмі крові: 1 – контроль; 2 – моноклональне антитіло 2d-2a в молярному співвідношенні 1:2 до фібриногену; 3 – моноклональне антитіло 2d-2a в молярному співвідношенні 1:1 до фібриногену; 4 – моноклональне антитіло 2d-2a в молярному співвідношенні 2:1 до фібриногену

У результаті було виявлено, що антитіло 2d-2a здатне інгібувати полімеризацію фібрину в плазмі крові людини. За таких умов інгібіторний ефект був менш вираженим, проте можна простежити концентраційну залежність, що зростала від 25% до 60% зі збільшенням концентрації досліджуваного антитіла. Слід відзначити, що дія більшості антитромботичних препаратів не може призводити до повного інгібування процесу тромбоутворення, адже це викликало б надто великий ризик кровотечі. Інгібування полімеризації фібрину вдвічі є цілком достатнім для стійкого антикоагулянтного ефекту, а тренд концентраційної залежності дії моноклонального антитіла на полімеризацію фібрину дозволяє сподіватися, що подальше титрування допоможе обрати мінімальну діючу концентрацію антитіла.

Для подальшого підтвердження інгібуючої дії моноклонального антитіла 2d-2a на полімеризацію фібрину було проаналізовано структуру фібринового

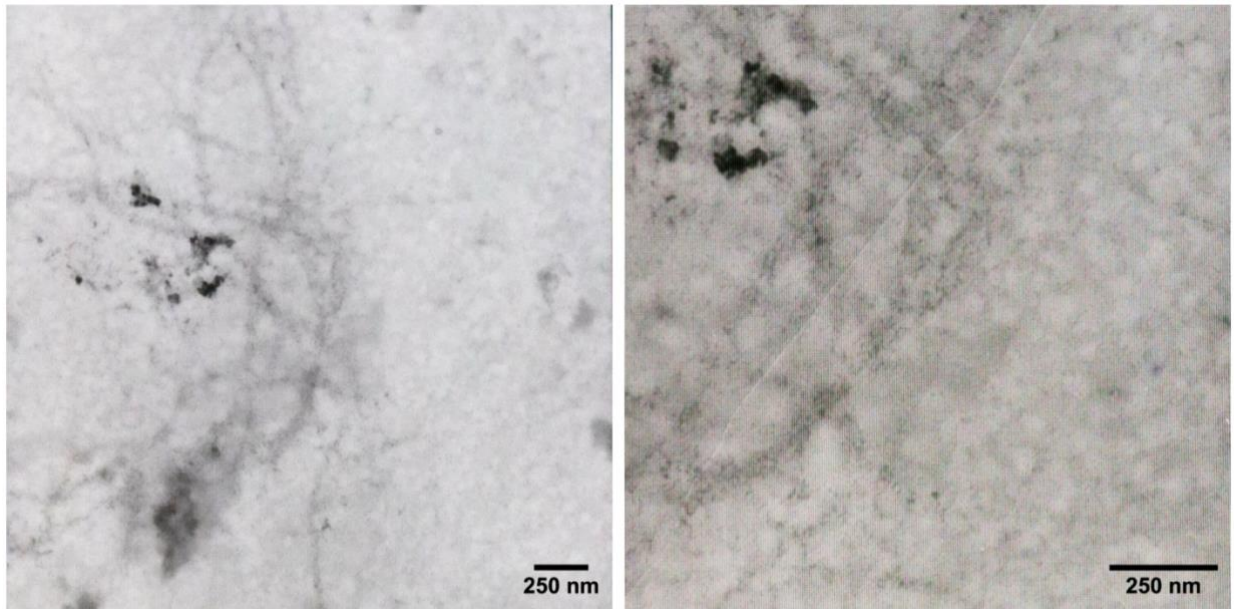
згустку, утвореного за його присутності, за допомогою електронної мікроскопії. Цей метод дозволив візуалізувати структуру фібринових сіток, сформованих за різних умов. Спочатку було досліджено морфологію стандартного фібринового згустку в нормі (рис. 3.9).



**Рис. 3.9.** Електронна мікроскопія фібринового згустку в нормі: А – фібриновий згусток при збільшенні в 25 000 разів; Б – фібриновий згусток при збільшенні в 50 000 разів

Репрезентативні зображення архітектури фібринового згустку, утвореного за присутності антитіла 2d-2a, отримані за допомогою електронної мікроскопії при збільшенні  $\times 25\,000$  і  $\times 50\,000$  (рис. 3.9) показують щільну, дуже взаємопов'язану сітку фібрину. Фібринові волокна утворюють міцну тривимірну структуру, з товстими і добре організованими нитками, щільно зшитими одна з одною. Така структура характерна для фізіологічно стабільного фібринового згустку, який забезпечує механічну підтримку та цілісність згустку.

Далі досліджували як змінюється структура фібринового згустку при полімеризації в присутності моноклонального антитіла 2d-2a (рис. 3.10).



**Рис. 3.10.** Електронна мікроскопія фібринового згустку за присутності моноклонального антитіла 2d-2a у співвідношенні 1:10: А – фібриновий згусток при збільшенні в 25 000 разів; Б – фібриновий згусток при збільшенні в 50 000 разів

Отримані електронно-мікроскопічні зображення при збільшенні  $\times 25\,000$  та  $\times 50\,000$  показують значне порушення фібринової сітки. Утворені за цих умов фібринові згустки мають дуже неупорядковану структуру, що характеризується більш тонкими та вільно розташованими фібриновими волокнами. Кількість зв'язків між фібриновими нитками помітно зменшується, що призводить до ослабленої, нещільної архітектури згустку. Це свідчить про те, що моноклональне антитіло 2d-2a перешкоджає латеральній асоціації мономерів фібрину, запобігаючи утворенню механічно стабільного фібринового каркасу.

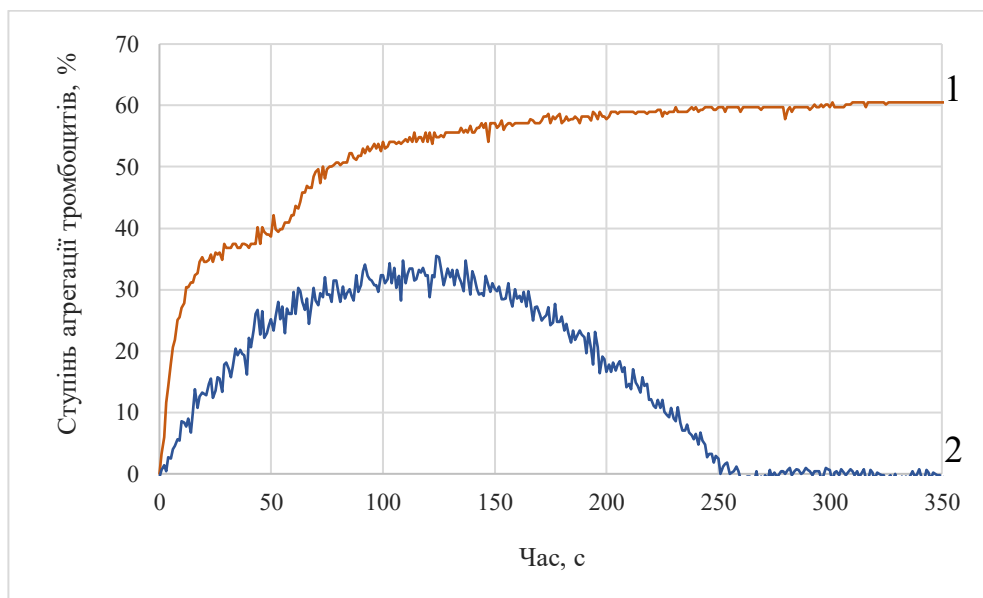
Значний контраст між нормальним фібриновим згустком і порушеною його структурою в присутності моноклонального антитіла 2d-2a додатково підтверджує інгібуючу роль цього антитіла в процесі полімеризації фібрину. Отримані результати узгоджуються з попередніми результатами турбідиметричного аналізу, які демонструють, що блокування N-кінцевої

ділянки В $\beta$ -ланцюга фібриногену перешкоджає утворенню згустку, що може мати наслідки для формування стабільної фібринової сітки.

### 3.3. Антикоагулянтна дія фібриноген-специфічного антитіла 2d-2a *in vivo*

Після встановлення антикоагулянтних властивостей моноклонального антитіла 2d-2a в умовах *in vitro* було проведено *in vivo* дослідження на щурах. Для цього тваринам внутрішньовенно вводили моноклональне антитіло 2d-2a у концентрації 20 мкг/мл. Через 30 хвилин після введення у щурів було відібрано венозну кров для отримання ЗТПК.

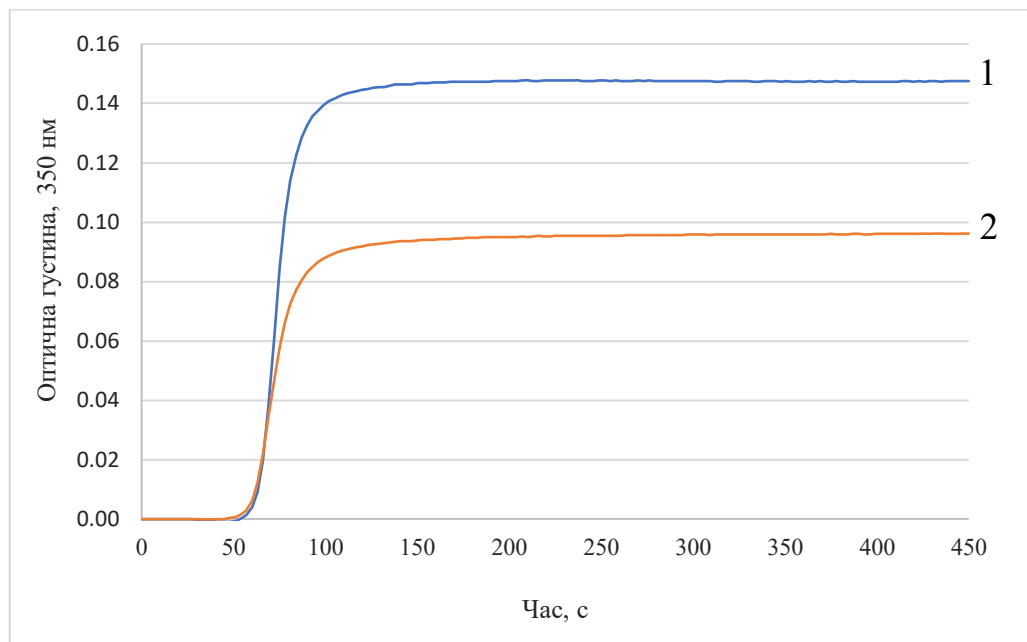
Подібно до експериментів *in vitro*, для дослідження оцінки здатності моноклонального антитіла 2d-2a пригнічувати агрегацію тромбоцитів було використано агрегатометричний аналіз. В якості індуктора використовували АДФ (рис. 3.11).



**Рис. 3.11.** АДФ-індукована агрегація тромбоцитів щурів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові: 1 – типова агрегатограма ЗТПК щурів; 2 – агрегатограма ЗТПК щурів в присутності моноклонального антитіла 2d-2a в кінцевій концентрації 20 мкг/мл

У результаті моноклональне антитіло 2d-2a продемонструвало виражений інгібуючий вплив на агрегацію тромбоцитів, що свідчить про те, що антитіло ефективно перешкоджає взаємодії фібриногену з рецепторами GPIIb/IIIa за фізіологічних умов.

Також було повторно проведено турбідиметричний аналіз на плазмі крові щурів для оцінки збереження інгібуючого впливу на полімеризацію фібрину (рис. 3.12).

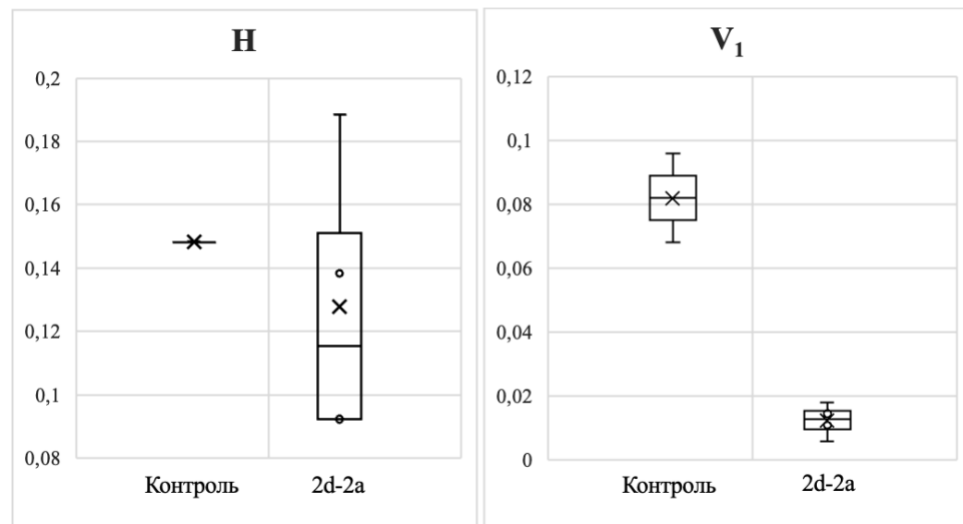


**Рис. 3.12.** Зміна мутності під час тромбін-індукованої полімеризації фібрину в плазмі крові щурів: 1 – контроль; 2 – плазма крові щура після введення 20 мкг/мл моноклонального антитіла 2d-2a

Проведений турбідиметричний аналіз показав, що введення моноклонального антитіла 2d-2a у кровотік щура призводило до порушення формування фібринової сітки та зменшення щільності утвореного згустку на приблизно 35%.

Для подальшої характеристики впливу антитіла на специфічні параметри формування фібринового згустку було оцінено загальний гемостатичний потенціал (ЗГП) (рис. 3.13). Зокрема, оцінювали максимальну мутність згустку (H), яка відображає його щільність, а також швидкість зростання

поглинання ( $V_1$ ), що відповідає інтенсивності латеральної асоціації протофібрил у процесі формування фібрил.



**Рис. 3.13.** Параметри загального гемостатичного потенціалу крові щурів. H – максимальна мутність фібринового згустку;  $V_1$  – швидкість зростання оптичної густини, що характеризує латеральну асоціацію протофібрил

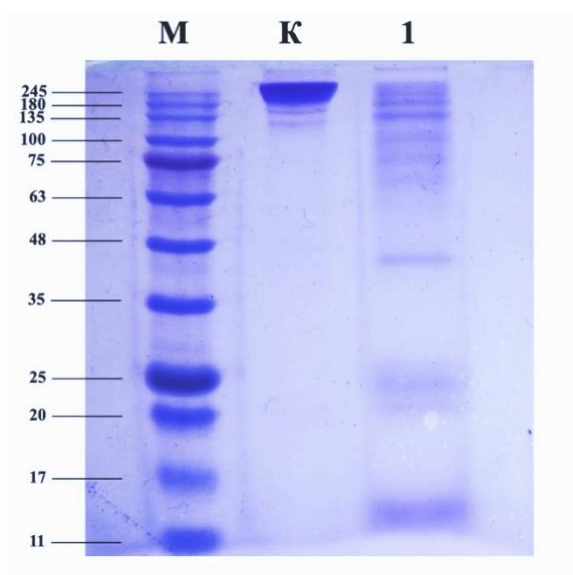
Отримані результати показали, що введення тваринам моноклонального антитіла 2d-2a призводить до уповільненого та менш щільного формування фібринової сітки, що свідчить про порушення послідовних етапів полімеризації фібрину та формування його впорядкованої тривимірної структури.

Підтвердження впливу на формування фібринової сітки в умовах експериментальної тваринної моделі дозволяє розглядати моноклональне антитіло 2d-2a як перспективний антитромботичний агент. Проте великий розмір імуноглобулінів становить суттєве обмеження для їх терапевтичного застосування. У зв'язку з цим було вирішено отримати Fab-фрагменти даного антитіла з метою покращення його терапевтичних властивостей.

### 3.4. Отримання та характеристика Fab-фрагментів моноклонального антитіла 2d-2a

Велика молекулярна маса повнорозмірного антитіла може перешкоджати його проникненню в тканини, подовжувати час циркуляції та збільшувати ризик розвитку імунних реакцій, таким чином зменшуючи його використання у медицині. Одним з найпоширеніших способів отримання менших за розміром і молекулярною масою фрагментів антитіла – Fab-фрагментів – є гідроліз повнорозмірного антитіла папаїном.

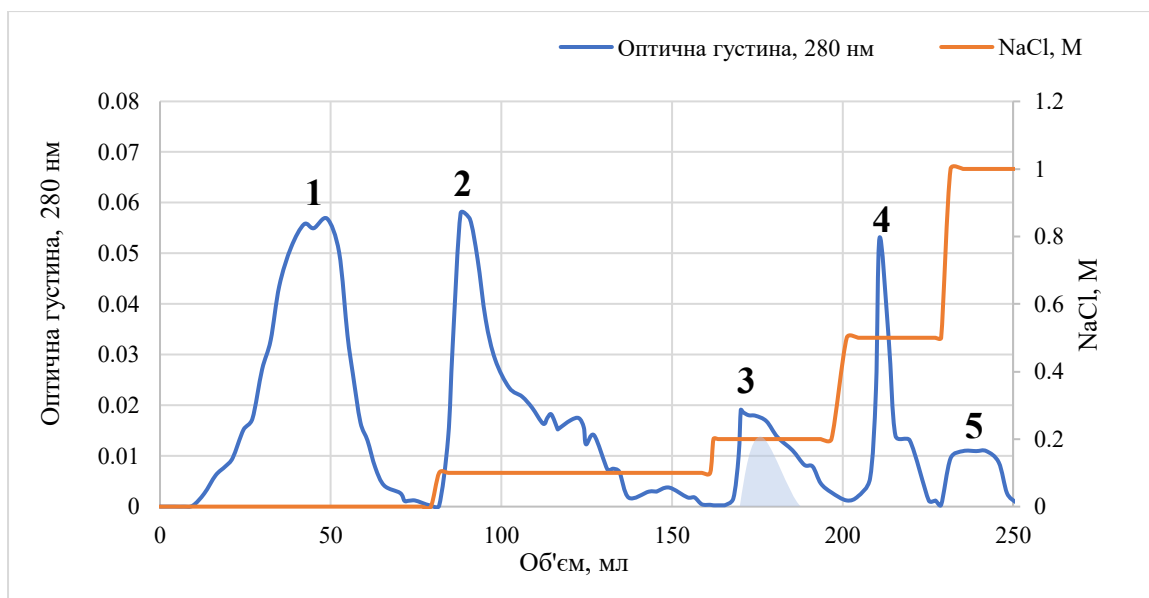
Гідроліз моноклонального антитіла 2d-2a папаїном проводили у 0,05 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , рН 7,4 буфері з 0,15 М  $\text{NaCl}$ , 0,06 М цистеїном та 0,016 М ЕДТА. Після 4 год інкубації при температурі 37°C було відібрано фракцію для електрофоретичного аналізу, а інкубаційну суміш заморожено для зупинки реакції. Продукти гідролізу візуалізували електрофоретично в 10 % поліакриламідному гелі (рис. 3.14).



**Рис. 3.14.** Електрофореграма продуктів гідролізу моноклонального антитіла 2d-2a папаїном. М – маркери молекулярної маси; К – моноклональне антитіло 2d-2a; 1 – продукти гідролізу моноклонального антитіла 2d-2a папаїном

За результатами електрофоретичного аналізу виявлено розщеплення повнорозмірного антитіла на менші фрагменти, зокрема спостерігали появу фрагмента з молекулярною масою близько 45 кДа, що відповідає масі Fab-фрагмента.

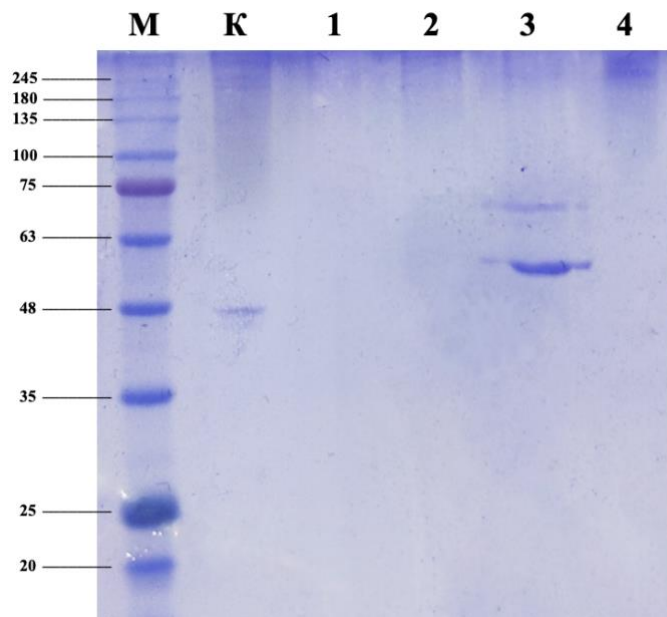
Наступним кроком було очищення Fab-фрагментів методом іонообмінної хроматографії на DEAE-Sepharose, врівноваженій 0,01 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , рН 8,0. Перед нанесенням зразок центрифугували при 2000 об/хв протягом 15 хвилин, а надосад розвели буфером для врівноваження для зменшення іонної сили. Об'єм зразку для нанесення становив 35 мл, а швидкість нанесення – 2 мл/хв. Елюцію проводили ступінчастим градієнтом NaCl: 0,1; 0,2; 0,5 і 1 М NaCl у 0,01 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , рН 8,0 (рис. 3.15).



**Рис. 3.15.** Хроматограма розділення папаїнового гідролізату моноклонального антитіла 2d-2a на DEAE-Sepharose. Елюцію проводили ступінчастим градієнтом NaCl 0,1; 0,2; 0,5 і 1 М NaCl у 0,01 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  буфері, рН 8,0; 1 – пік незв'язаної фракції; 2-5 – піки зв'язаної фракції

У результаті хроматографічного очищення було отримано 1 пік незв'язаної з носієм фракції та 4 піки зв'язаної. Знесолення та концентрування цих фракцій проводили за допомогою ультрафільтраційного пристрою

“Amicon” з мембраною PM-10. Сконцентровані фракції далі аналізували електрофоретично в 10 % поліакриламідному гелі (рис. 3.16).

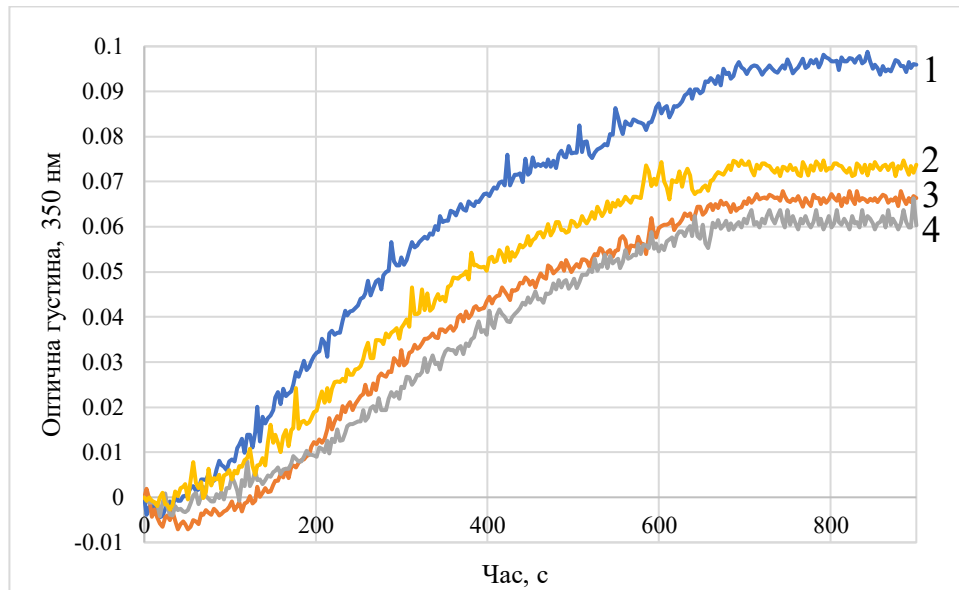


**Рис. 3.16.** Електрофореграма пікових фракцій, отриманих хроматографічним розділенням на DEAE-Sepharose. М – маркери молекулярної маси; К – відцентрифугований зразок перед нанесенням; 1 – зразок незв’язаної фракції; 2-4 – відповідні зразки зв’язаної фракції

Проведений електрофоретичний аналіз показав, що фракція, елюйована 0,2 М NaCl, містить фрагмент масою близько 55 кДа, який відповідає молекулярній масі Fab-фрагменту. Також у цій фракції виявлено фрагмент з молекулярною масою 70 кДа, що може відповідати частково розщепленому імуноглобуліну.

Наступним кроком необхідно було визначити, чи зберегли фрагменти антикоагулянтну дію. Для оцінки впливу Fab-фрагментів після етапу хроматографічного очищення на процес полімеризації фібрину було застосовано турбідиметричний аналіз. Експеримент проводили за описаних вище умов. До розчину фібриногену (0,1 мг/мл) додавали тромбін та CaCl<sub>2</sub> до кінцевих концентрацій 0,25 NIH/мл та 0,001 М, відповідно, а Fab-фрагменти

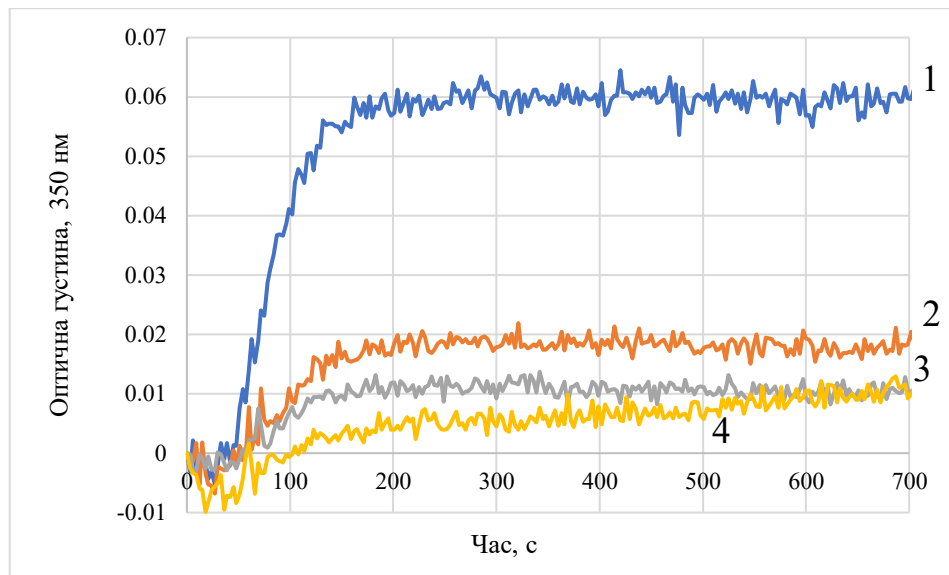
брали у таких молярних співвідношеннях до фібриногену: 1:2, 1:1 та 2:1 (рис. 3.17).



**Рис. 3.17.** Зміна мутності під час тромбін-індукованої полімеризації фібрину: 1 – контроль; 2 – Fab-фрагмент моноклонального антитіла 2d-2a в молярному співвідношенні 1:2 до фібриногену; 3 – Fab-фрагмент моноклонального антитіла 2d-2a в молярному співвідношенні 1:1 до фібриногену; 4 – Fab-фрагмент моноклонального антитіла 2d-2a в молярному співвідношенні 2:1 до фібриногену

У результаті експерименту спостерігали збереження антикоагулянтного впливу. Fab-фрагменти моноклоанального антитіла 2d-2a інгібували полімеризацію фібрину на приблизно 25%, 30% та 45% порівняно з контролем за різних молярних співвідношень до фібриногену.

Щоб оцінити, чи змінився вплив Fab-фрагментів в умовах, наближених до фізіологічних, було проведено турбідиметричне дослідження в плазмі крові людини (рис. 3.18).



**Рис. 3.18.** Зміна мутності під час тромбін-індукованої полімеризації фібрину в плазмі крові: 1 – контроль; 2 – Fab-фрагмент моноклонального антитіла 2d-2a в молярному співвідношенні 1:2 до фібриногену; 3 – Fab-фрагмент моноклонального антитіла 2d-2a в молярному співвідношенні 1:1 до фібриногену; 4 – Fab-фрагмент моноклонального антитіла 2d-2a в молярному співвідношенні 2:1 до фібриногену

При додаванні Fab-фрагментів моноклонального антитіла 2d-2a до плазми крові спостерігали значне пригнічення формування фібринової сітки (~75%) навіть за співвідношення до фібриногену 1:2. Зокрема спостерігали зменшення кінцевої мутності згустку та швидкості латеральної асоціації протофібрил. При цьому подальше збільшення концентрації Fab-фрагментів не призводило до суттєвого посилення ефекту, рівень інгібування полімеризації фібрину залишався стабільно високим (до 85%).

### 3.5. Обговорення результатів

У ході проведеного дослідження було встановлено, що моноклональне антитіло 2d-2a, яке специфічно націлене на ділянку В $\beta$ 14-15 фібриногену, проявляє антикоагулянтні властивості, перешкоджаючи як агрегації

тромбоцитів, так і полімеризації фібрину. Інгібування агрегації тромбоцитів свідчить про те, що антитіло 2d-2a порушує здатність фібриногену підтримувати агрегацію тромбоцитів.

Турбідиметричний аналіз підтвердив, що досліджуване антитіло ефективно інгібує процес полімеризації фібрину, зменшуючи утворення стабільної фібринової сітки. У фібриновій системі ступінь інгібування досягав майже 90 % при різних співвідношеннях антитіла до фібриногену, що свідчить про його високу здатність блокувати взаємодію фібринових мономерів. У плазмі крові інгібіторний ефект був менш вираженим і становив приблизно 25 %, 55 % та 60 %. Хоча інгібіторний ефект 2d-2a був менш вираженим порівняно з фібриною системою, водночас у цьому випадку простежується чітка концентраційна залежність ефекту, оскільки зі збільшенням кількості антитіла ступінь інгібування зростав. З практичної точки зору це може мати важливе значення, оскільки повне пригнічення процесу утворення фібрину є небажаним, бо може призводити до підвищеного ризику кровотеч. У цьому контексті часткове інгібування процесу полімеризації фібрину можна розглядати як більш збалансований механізм впливу на систему гемостазу.

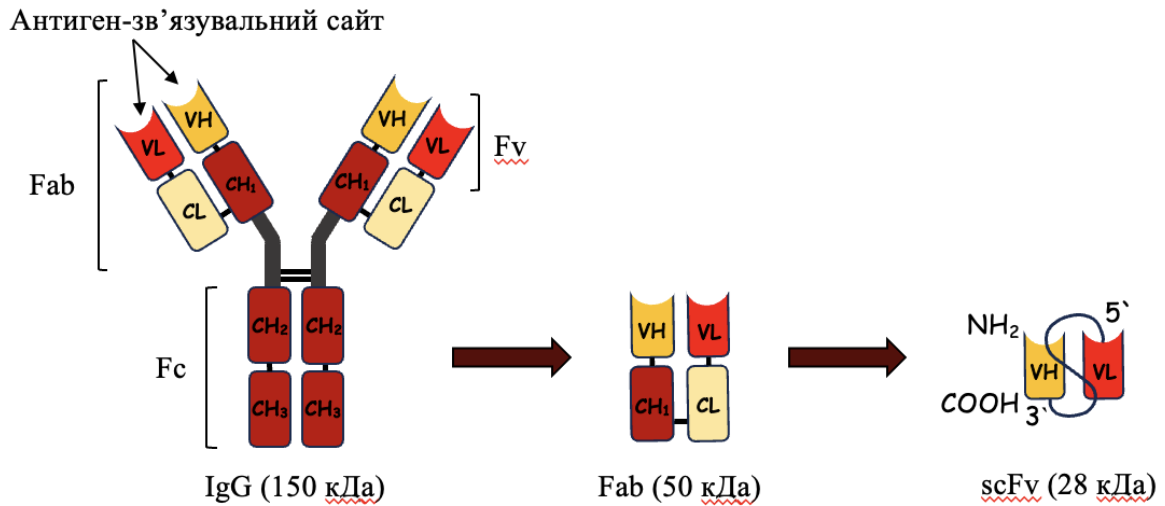
Подальший аналіз за допомогою електронної мікроскопії дозволив отримати більш детальне уявлення про вплив моноклонального антитіла 2d-2a на структуру фібринового згустку. У присутності антитіла 2d-2a процес полімеризації фібрину було порушено, а фібринова сітка була ледве утворена тонкими і неорганізованими фібриновими волокнами. Це свідчить про те, що антитіло перешкоджає латеральній асоціації мономерів фібрину, запобігаючи утворенню стабільного і добре структурованого фібринового згустку.

Важливо відзначити, що антикоагулянтний ефект антитіла 2d-2a зберігався і в умовах *in vivo*. Після введення антитіла лабораторним тваринам було показано, що його дія на систему гемостазу не зникає в організмі. Проведені турбідиметричні та агрегатометричні дослідження підтвердили інгібування процесу полімеризації фібрину та пригнічення агрегації тромбоцитів. Додатково було визначено параметри загального гемостатичного

потенціалу, що також підтвердило вплив антитіла на процес формування фібринової сітки в умовах *in vivo* тваринної моделі. Таким чином, отримані дані свідчать про збереження антитілом 2d-2a своєї функціональної активності після введення в організм, що, у свою чергу, підкреслює перспективність подальших досліджень цієї молекули.

З огляду на те, що великі розміри імуноглобулінів можуть обмежувати їх використання у терапевтичних цілях, одним із підходів до оптимізації антитіл є отримання їх фрагментів. У даній роботі було досліджено Fab-фрагменти антитіла 2d-2a, які зберігають антигензв'язувальні ділянки, але не містять Fc-області. Отримані результати показали, що Fab-фрагменти також здатні впливати на процес полімеризації фібрину. У фібриновій системі інгібування становило приблизно 25 %, 30 % та 45 %, що є значно нижчим порівняно з повнорозмірним антитілом. Натомість у плазмі крові ефект Fab-фрагментів виявився більш вираженим і досягав 75-85 %. Таким чином, порівняння результатів свідчить про те, що зменшення розміру молекули антитіла може змінювати характер її взаємодії з компонентами системи зсідання крові. Можна припустити, що менші розміри Fab-фрагментів можуть полегшувати доступ до відповідної ділянки фібриногену у плазмі крові, що може пояснювати вищий рівень інгібування у цій системі.

Ще більш перспективним підходом до оптимізації антитіл є створення одноланцюгових варіабельних фрагментів (scFv). Такі молекули складаються лише з варіабельних доменів важкого та легкого ланцюгів, з'єднаних коротким пептидним лінкером, що дозволяє суттєво зменшити їхній розмір порівняно з повнорозмірним антитілом та Fab-фрагментом (рис. 3.19). Менша молекулярна маса сприяє кращому проникненню в тканини та розширює можливості використання таких фрагментів у біомедичних дослідженнях і терапевтичних підходах.



**Рис. 3.19.** Схематичне зображення повнорозмірного антитіла разом з його терапевтичними фрагментами Fab (50 кДа) та scFv (28 кДа)

Завдяки меншому розміру та покращеним дифузним властивостям scFv можуть швидше досягати мішені та ефективніше перешкоджати формуванню стабільного фібринового згустку. Це особливо важливо для швидкої корекції тромботичних станів, оскільки дозволяє регулювати ступінь інгібування процесу полімеризації фібрину, зберігаючи при цьому необхідний рівень гемостатичної функції.

Наступним перспективним етапом досліджень може бути створення та характеристика scFv фрагментів на основі фібриноген-специфічного антитіла 2d-2a, що дозволить оцінити можливості їх використання у розробці нових підходів до антикоагулянтної терапії, спрямованої на профілактику та лікування тромбоемболічних захворювань.

## ВИСНОВКИ

У ході виконання роботи було досліджено антикоагулянтну дію моноклонального антитіла 2d-2a шляхом вивчення його впливу на процеси полімеризації фібрину та формування фібрино-тромбоцитарного згустку в плазмі крові. Отримано Fab-фрагменти моноклонального антитіла 2d-2a та підтверджено збереження їх антикоагулянтних властивостей.

1. Показано, що моноклональне фібриноген-специфічне антитіло 2d-2a повністю інгібувало полімеризацію фібрину в системі фібриноген-тромбін за співвідношення до фібриногену 1:2 та вдвічі знижувало швидкість формування згустку навіть за мінімальних концентрацій за умов активації коагуляції АЧТЧ-реагентом.
2. Визначено, що, інгібуючи фібриноутворення, антитіло 2d-2a також помірно інгібувало агрегацію тромбоцитів, запобігаючи формуванню фібриново-тромбоцитарного згустку.
3. Результати електронної мікроскопії показали, що в присутності антитіла 2d-2a фібринові згустки були утворені тонкими та погано організованими фібриновими волокнами.
4. Встановлено у дослідженнях *in vivo*, що введення антитіла 2d-2a у кровотік щура призводило до уповільненого та менш щільного формування фібринової мережі, і також майже вдвічі інгібувало агрегацію тромбоцитів.
5. Отримано шляхом папаїнового гідролізу моноклонального антитіла 2d-2a Fab-фрагменти та хроматографічно очищено за допомогою іонообмінної хроматографії на DEAE-Sepharose.
6. Встановлено, що Fab-фрагменти антитіла 2d-2a зберігають здатність інгібувати полімеризацію фібрину, що підтверджено результатами турбідиметричних досліджень у різних експериментальних системах.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Ten Cate, H., Olie, R. H., Ten Cate-Hoek, A. J. and Henskens, Y. M. C. (2018). Direct oral anticoagulants: When to consider laboratory testing?. *International journal of laboratory hematology*, 40(1), pp. 30–33.
2. Lin, S., Wang, Y., Zhang, L. and Guan, W. (2019). Dabigatran must be used carefully: literature review and recommendations for management of adverse events. *Drug design, development and therapy*, 13(1), pp. 1527–1533.
3. Spinar, J. and Spinarova, L. (2017). Rivaroxaban in high-risk patients. *Vnitřní lékařství*, 63(6), pp. 424–430.
4. Pirkalkhoran, S., Grabowska, W. R., Kashkoli, H. H., Mirhassani, R., Guiliano, D., Dolphin, C. and Khalili, H. (2023). Bioengineering of Antibody Fragments: Challenges and Opportunities. *Bioengineering (Basel, Switzerland)*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.3390/bioengineering10020122> [Accessed 17 Jan. 2023].
5. Vilahur, G. and Fuster, V. (2025). Interplay between platelets and coagulation: from protective haemostasis to pathological arterial thrombosis. *European heart journal*, 46(5), pp. 413–423.
6. Sakurai, Y., Hardy, E. T. and Lam, W. A. (2023). Hemostasis-on-a-chip / incorporating the endothelium in microfluidic models of bleeding. *Platelets*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1080/09537104.2023.2185453> [Accessed 6 Mar. 2023].
7. Mohammed, B. M., Monroe, D. M. and Gailani, D. (2020). Mouse models of hemostasis. *Platelets*, 31(4), pp. 417–422.
8. Sierra, C., Moreno, M. and García-Ruiz, J. C. (2022). The physiology of hemostasis. *Blood coagulation & fibrinolysis: an international journal in haemostasis and thrombosis*, 33(1), S1–S2.
9. Kaiser, R., Escaig, R. and Nicolai, L. (2023). Hemostasis without clot formation: how platelets guard the vasculature in inflammation, infection, and malignancy. *Blood*, 142(17), pp. 1413–1425.

10. Krishnamurthy, A., Belur, P.D. and Subramanya, S.B. (2018). Methods available to assess therapeutic potential of fibrinolytic enzymes of microbial origin: a review. *Journal of Analytical Science an*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1186/s40543-018-0143-3> [Accessed 9 Apr. 2018].
11. Jin, N. Z. and Gopinath, S. C. B. (2016). Potential blood clotting factors and anticoagulants. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 84, pp. 356–365.
12. Geddings, J. E. and Mackman, N. (2014). New players in haemostasis and thrombosis. *Thrombosis and haemostasis*, 111(4), pp. 570–574.
13. Bhatti, M. Q., Gonzalez-Fernandez, E., Bhatia, K., Divani, A. A., Di Napoli, M., Hinduja, A. and Datta, Y. H. (2023). Neurological Complications Associated with Hereditary Bleeding Disorders. *Current neurology and neuroscience reports*, 23(11), pp. 751–767.
14. Olgasi, C., Assanelli, S., Cucci, A. and Follenzi, A. (2024). Hemostasis and endothelial functionality: the double face of coagulation factors. *Haematologica*, 109(7), pp. 2041–2048.
15. Wheeler, A. and Gailani, D. (2016). The Intrinsic Pathway of Coagulation as a Target for Antithrombotic Therapy. *Hematology/oncology clinics of North America*, 30(5), pp. 1099–1114.
16. Park, S. and Park, J. K. (2024). Back to basics: the coagulation pathway. *Blood research*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1007/s44313-024-00040-8> [Accessed 28 Oct. 2024].
17. Schreuder, M., Reitsma, P. H. and Bos, M. H. A. (2019). Blood coagulation factor Va's key interactive residues and regions for prothrombinase assembly and prothrombin binding. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*, 17(8), pp. 1229–1239.
18. Chinnaraj, M., Planer, W. and Pozzi, N. (2018). Structure of Coagulation Factor II: Molecular Mechanism of Thrombin Generation and Development of Next-Generation Anticoagulants. *Frontiers in medicine*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1186/s40543-018-0143-3> [Accessed 2 Oct. 2018].

19. Simpson, A., Shukla, A. and Brown, A. C. (2022). Biomaterials for Hemostasis. *Annual review of biomedical engineering*, 24, pp. 111–135.
20. Sidonio, R. F., Jr, Hoffman, M., Kenet, G. and Dargaud, Y. (2022). Thrombin generation and implications for hemophilia therapies: A narrative review. *Research and practice in thrombosis and haemostasis*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.rpth.2022.100018> [Accessed 20 Dec. 2022].
21. Surma, S. and Banach, M. (2021). Fibrinogen and atherosclerotic cardiovascular diseases – review of the literature and clinical studies. *International Journal of Molecular Sciences*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms23010193> [Accessed 24 Dec. 2021].
22. Luyendyk, J. Schoenecker, J. and Flick, M. (2019). The multifaceted role of fibrinogen in tissue injury and inflammation. *Blood*, 133(6), pp. 511–520.
23. Doolittle, F. (2003). Structural basis of the fibrinogen–fibrin transformation: contributions from X-ray crystallography. *Blood Reviews*, 17(1), pp. 33–41.
24. Henschen, A. and McDonagh, J. (1986). Fibrinogen, fibrin and factor XIII. *New Comprehensive Biochemistry*, 13, pp. 171–241.
25. Weisel, J. and Litvinov, R. (2017). Fibrin Formation, Structure and Properties. *Sub-cellular biochemistry*, 82, pp. 405–456.
26. Litvinov, R., Pieters, M., de Lange-Loots, Z. and Weisel, J. (2021). Fibrinogen and Fibrin. *Sub-cellular biochemistry*, 96, pp. 471–501.
27. Чернишенко, В. (2019). Механізми екстрасудинного та внутрішньосудинного тромбоутворення: фундаментальні дослідження для потреб клінічної практики. *Вісник НАН України*, 2019(4), сс. 55–56.
28. Köhler, S., Schmid, F., and Settanni, G. (2015). The Internal Dynamics of Fibrinogen and Its Implications for Coagulation and Adsorption. *PLoS computational biology*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004346> [Accessed 14 Sep. 2015].
29. Pechik, I., Yakovlev, S., Mosesson, M., Gilliland, G. and Medved, L. (2006). Structural basis for sequential cleavage of fibrinopeptides upon fibrin assembly. *Biochemistry*, 45(11), pp. 3588–3597.

30. Everse, S., Spraggon, G. and Doolittle, R. (1998). A three-dimensional consideration of variant human fibrinogens. *Thrombosis and haemostasis*, 80(1), pp. 1–9.
31. Kononova, O., Litvinov, R., Zhmurov, A., Alekseenko, A., Cheng, C., Agarwal, S., Marx, K., Weisel, J. and Barsegov, V. (2013). Molecular mechanisms, thermodynamics, and dissociation kinetics of knob-hole interactions in fibrin. *The Journal of biological chemistry*, 288(31), pp. 22681–22692.
32. Lugovskoi, E., Makogonenko, E. and Komisarenko, S. (2013). *Molecular mechanisms of formation and degradation of fibrin*. Kyiv: Naukova Dumka.
33. Yakovlev, S., Mikhailenko, I., Tsurupa, G., Belkin, A. and Medved, L. (2014). Polymerisation of fibrin  $\alpha$ C-domains promotes endothelial cell migration and proliferation. *Thrombosis and haemostasis*, 112(6), pp. 1244-1251.
34. Feller, T., Connell, S. and Ariëns, R. (2022). Why fibrin biomechanical properties matter for hemostasis and thrombosis. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*, 20(1), pp. 6–16.
35. Laurens, N., Koolwijk, P. and de Maat, M. (2006). Fibrin structure and wound healing. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*, 4(5), pp. 932-939.
36. Buss, N., Henderson, S., McFarlane, M., Shenton, J. and de Haan, L. (2012). Monoclonal antibody therapeutics: history and future. *Current opinion in pharmacology*, 12(5), pp. 615–622.
37. Ma, H. and O'Kennedy, R. (2015). The Structure of Natural and Recombinant Antibodies. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1348, pp. 7–11.
38. Lipman, N., Jackson, L., Trudel, L. and Weis-Garcia, F. (2005). Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. *ILAR journal*, 46(3), pp. 258–268.
39. Castelli, M., McGonigle, P. and Hornby, P. (2019). The pharmacology and therapeutic applications of monoclonal antibodies. *Pharmacology research & perspectives*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1002/prp2.535> [Accessed 20 Dec. 2019].

40. Stanfield, R. and Wilson, I. (2014). Antibody Structure. *Microbiology spectrum*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.AID-0012-2013> [Accessed 21 Mar. 2014].
41. Chiu, M., Goulet, D., Teplyakov, A. and Gilliland, G. (2019). Antibody Structure and Function: The Basis for Engineering Therapeutics. *Antibodies (Basel, Switzerland)*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.3390/antib8040055> [Accessed 3 Dec. 2019].
42. Tokunaga, Y. and Takeuchi, K. (2020). Role of NMR in High Ordered Structure Characterization of Monoclonal Antibodies. *International journal of molecular sciences*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms22010046> [Accessed 22 Dec. 2020].
43. Nelson, P., Reynolds, G., Waldron, E., Ward, E., Giannopoulos, K. and Murray, P. (2000). Monoclonal antibodies. *Molecular pathology: MP*, 53(3), pp. 111–117.
44. Fishman, J. and Berg, E. (2019). Antibody Purification and Storage. *Cold Spring Harbor protocols*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1101/pdb.top099101> [Accessed 4 Apr. 2019].
45. Köhler, G. and Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256(5517), pp. 495–497.
46. Chames, P., Van Regenmortel, M., Weiss, E. and Baty, D. (2009). Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. *British journal of pharmacology*, 157(2), pp. 220–233.
47. Ahmad, Z. A., Yeap, S. K., Ali, A. M., Ho, W. Y., Alitheen, N. B. and Hamid, M. (2012). scFv antibody: principles and clinical application. *Clinical & developmental immunology*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1155/2012/980250> [Accessed 15 Mar. 2012].
48. Jorgensen, M. L., Friis, N. A., Just, J., Madsen, P., Petersen, S. V. and Kristensen, P. (2014). Expression of single-chain variable fragments fused with the Fc-region of rabbit IgG in *Leishmania tarentolae*. *Microbial cell factories*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-9> [Accessed 15 Jan. 2014].

49. Wang, Q., Chen, Y., Park, J., Liu, X., Hu, Y., Wang, T., McFarland, K. and Betenbaugh, M. J. (2019). Design and Production of Bispecific Antibodies. *Antibodies (Basel, Switzerland)*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.3390/antib8030043> [Accessed 2 Aug. 2019].
50. Crivianu-Gaita, V. and Thompson, M. (2016). Aptamers, antibody scFv, and antibody Fab' fragments: An overview and comparison of three of the most versatile biosensor biorecognition elements. *Biosensors & bioelectronics*, 85, pp. 32–45.
51. Delgado, M. and Garcia-Sanz, J. A. (2023). Therapeutic Monoclonal Antibodies against Cancer: Present and Future. *Cells*, 12(24), [online]. Available at: <https://doi.org/10.3390/cells12242837> [Accessed 14 Dec. 2023].
52. Lu, R. M., Hwang, Y. C., Liu, I. J., Lee, C. C., Tsai, H. Z., Li, H. J. and Wu, H. C. (2020). Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *Journal of biomedical science*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0592-z> [Accessed 2 Jan. 2020].
53. Jin, B. K., Odongo, S., Radwanska, M. and Magez, S. (2023). NANOBODIES: A Review of Diagnostic and Therapeutic Applications. *International journal of molecular sciences*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms24065994> [Accessed 22 Mar. 2023].
54. Castelli, M. S., McGonigle, P. and Hornby, P. J. (2019). The pharmacology and therapeutic applications of monoclonal antibodies. *Pharmacology research & perspectives*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1002/prp2.535> [Accessed 20 Dec. 2019].
55. Rikken, S. A. O. F., van 't Hof, A. W. J., Ten Berg, J. M., Kereiakes, D. J., and Collier, B. S. (2023). Critical Analysis of Thrombocytopenia Associated With Glycoprotein IIb/IIIa Inhibitors and Potential Role of Zalunfiban, a Novel Small Molecule Glycoprotein Inhibitor, in Understanding the Mechanism(s). *Journal of the American Heart Association*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1161/JAHA.123.031855> [Accessed 8 Dec. 2023].

56. Collier, B. S. (2015).  $\alpha$ IIb $\beta$ 3: structure and function. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*, 13(1), S17–S25.
57. Lugovska, N., Kolesnikova, I., Stohnii, Y., Chernyshenko, V., Rebriev, A., Kostiuchenko, O., Gogolinska, G., Dziubliuk, N., Varbanets, L., Platonova, T. and Komisarenko, S. (2020). Novel monoclonal antibody to fibrin(ogen)  $\alpha$ C-region for detection of the earliest forms of soluble fibrin. *The Ukrainian Biochemical Journal*, 92(3), pp. 58–70.
58. Stohnii, Ye., Rebriev, A., Hornytska, O., Slominskiy, O., Kostiuchenko, O., Klymenko, K. and Chernyshenko, V. (2021) Limited proteolysis of fibrinogen by protease of *Gloydius halys halys* venom. *Biotechnologia Acta*, 14(6), pp. 37–43.
59. Чернищенко, В. (2021). *Метод концентрування тромбоцитів аутологічної плазми крові для клітинної терапії та його клінічне випробування*. Автореф. дис. док. біол. наук. Київ. Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН.
60. Born, G. V. and Cross, M. J. (1963). The aggregation of blood platelets. *The Journal of physiology*, 168(1), pp. 178–195.
61. Weisel, J.W. and Nagaswami, C. (1992). Computer modeling of fibrin polymerization kinetics correlated with electron microscope and turbidity observations: clot structure and assembly are kinetically controlled. *Biophys J*. 63, pp. 111–128.
62. Müller, M. F., Ris, H. and Ferry, J. D. (1984). Electron microscopy of fine fibrin clots and fine and coarse fibrin films. Observations of fibers in cross-section and in deformed states. *Journal of molecular biology*, 174(2), pp. 369–384.
63. Korolova, D., Deev, V., Kypovska, S., Chernyshenko, T., Platonova, T. and Lugovskoj, E. (2009). Determination of functionally inactive forms of prothrombin to control the effectiveness of treatment with indirect anticoagulants. *Lab. diagnostika*, 2(48), pp. 3–12.