

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ННЦ «Інститут біології та медицини»
Кафедра біохімії

Завідувач кафедри професор Олексій САВЧУК

Протокол № _____ засідання кафедри

від “ _____ ” _____ 2026 р.

**ДОСЛІДЖЕННЯ РАННІХ ФОРМ РОЗЧИННОГО ФІБРИНУ В ПЛАЗМІ
КРОВІ ПАЦІЄНТІВ З ПОСТТРАВМАТИЧНИМ СТРЕСОВИМ
РОЗЛАДОМ**

Випускна кваліфікаційна робота
студентки денної форми навчання
за спеціальністю Біологія та біохімія
Демчинської Роксолани Олегівни

Науковий керівник від кафедри
канд. біол. наук, ст. дослідник
Галенова Т. І.

Робота виконана у відділі структури та функції білка Інституту біохімії
ім. О.В. Палладіна НАН України під керівництвом д-р. біол. наук, с.н.с.
Корольової Дар’ї Сергіївни

Оцінка захисту роботи

Київ – 2026 р.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ВТЕ	–	венозна тромбоемболія;
ПІ	–	протромбіновий індекс;
ПТСР	–	посттравматичний стресовий розлад;
ПЧ	–	протромбіновий час;
РГ	–	референтна група;
РФМК	–	розчинні фібрин-мономерні комплекси;
FrA	–	fibrinopeptide A (фібринопептид А);
FrB	–	fibrinopeptide B (фібринопептид В).

ЗМІСТ

ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1. РОЛЬ ФІБРИНУ, ФІБРИНОГЕНУ ТА ПРОДУКТІВ ЇХ МЕТАБОЛІЗМУ У ДІАГНОСТИЦІ ТРОМБОТИЧНИХ УСКЛАДНЕНЬ	7
1.1. Фібриноген та фібрин як елементи гемостазу	7
1.2. Похідні фібрин(оген)у як діагностичного маркеру загрози тромбоутворення	13
1.2.1. Прогностична роль розчинного фібрину	13
1.2.2. Розчинні фібрин-мономерні комплекси як ранній маркер тромбозу ..	15
1.2.3. Прогностична роль D-димеру	17
1.3. Посттравматичний стресовий розлад як фактор ризику тромботичних ускладнень.....	19
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	22
2.1. Матеріали та обладнання.....	22
2.2. Умови культивування гібридоми	23
2.3. Очистка моноклонального антитіла I-5A з культуральної рідини	23
2.4. Одержання фібриногену	24
2.5. Одержання фібрину desAB.....	25
2.6. Визначення чистоти очищених антитіл, фібрину та фібриногену	26
2.7. Перевірка специфічності антитіла I-5A	26
2.8. Оцінка імунореактивності та специфічності моноклонального антитіла I-5A.....	27
2.9. Підготовка антитіл для використання у тест-системі.....	27
2.10. Характеристика зразків плазми крові	28
2.11. Визначення концентрації розчинного фібрину, ранніх форм розчинного фібрину та D-димеру.....	29
2.12. Визначення концентрації протеїнів	30
2.13. Визначення активності протеїну С.....	30
2.14. Визначення протромбінового часу	31

	4
2.15. Визначення концентрації фібриногену в плазмі крові	31
2.16. Обрахунок та аналіз отриманих результатів	32
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ.....	33
3.1. Отримання антитіл I-5A та їх характеристика	33
3.2. Створення системи для кількісного визначення ранніх форм розчинного фібрину	38
3.3. Апробація розробленого методу кількісного визначення ранніх форм розчинного фібрину	41
3.4. Характеристика стану системи гемостазу пацієнтів з посттравматичним стресовим розладом	46
ВИСНОВКИ	51
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	52

ВСТУП

Система гемостазу є ключовим компонентом підтримання гомеостазу організму. Її функціонування базується на динамічному балансі між коагулянтною, антикоагулянтною ланками та системою фібринолізу. Порушення цієї рівноваги може призводити до розвитку патологічних станів: надмірна активація коагуляції спричиняє тромбоутворення та порушення кровообігу, тоді як недостатність коагуляційних механізмів може викликати небезпечні кровотечі. У зв'язку з цим дослідження функціонального стану системи гемостазу та розробка методів ранньої діагностики її порушень є важливим напрямком сучасної біомедицини.

Особливої актуальності проблема порушення гемостазу набула в умовах повномасштабної війни в Україні, оскільки значна частина поранень супроводжується ушкодженням тканин, запальними процесами, інтенсивною трансфузією, тощо, а це в свою чергу може спричинити порушення в системі гемостазу. Такі порушення ускладнюють перебіг лікування, підвищують ризик розвитку тромботичних ускладнень або масивних крововтрат, що може призводити до летальних наслідків (Quinn, 2024).

Окрім безпосередніх наслідків травм, значну роль відіграють віддалені ефекти стресового впливу. Посттравматичний стресовий розлад (ПТСР) супроводжується активацією нейроендокринної системи, дисфункцією судинного ендотелію та розвитком системного запалення, що може порушувати регуляцію коагуляційного гомеостазу. Біохімічні дослідження плазми крові пацієнтів із ПТСР свідчать про підвищений ризик тромбоутворення (Комісаренко, 2025).

Одним із маркерів протромботичного стану є поява розчинного фібрину в плазмі крові пацієнтів. Циркуюючи в кровотоці молекули фібрину піддаються обмеженому протеолізу зі сторони плазміну – втрачають α C-домен. Тож, на нашу думку, виявлення короткоживучих форм розчинного фібрину, які утворюються на ранніх етапах активації системи зсідання крові відкриває

можливості для ранньої діагностики тромботичних ускладнень, своєчасного виявлення порушень гемостазу, визначення тривалості протромботичного стану та оптимізації лікування пацієнтів (Lim, 2022).

Метою даної роботи була кількісна оцінка ранніх форм розчинного фібрину в плазмі крові пацієнтів з посттравматичним стресовим розладом залежно від ступеня тяжкості захворювання.

Відповідно до поставленої мети були сформульовані такі завдання:

1. Отримати та охарактеризувати моноклональне антитіло I-5A до ранніх форм розчинного фібрину.
2. Оптимізувати умови імуноензимного аналізу для кількісного визначення ранніх форм розчинного фібрину у плазмі крові з використанням моноклонального антитіла I-5A.
3. Провести апробацію розробленого методу визначення ранніх форм розчинного фібрину у плазмі крові пацієнтів з фізичними травмами.
4. Визначити рівень ранніх форм розчинного фібрину у плазмі крові пацієнтів з ПТСР різного ступеня тяжкості.

РОЗДІЛ 1

РОЛЬ ФІБРИНУ, ФІБРИНОГЕНУ ТА ПРОДУКТІВ ЇХ МЕТАБОЛІЗМУ У ДІАГНОСТИЦІ ТРОМБОТИЧНИХ УСКЛАДНЕНЬ

1.1. Фібриноген та фібрин як елементи гемостазу

Кровоносна система відіграє ключову роль у забезпеченні гомеостазу організму людини і тварин, виконуючи функцію інтеграції різних органів та забезпечення обміну речовин між ними. Порушення кровопостачання може призводити до розвитку тяжких патологічних станів, наслідком яких часто стає смерть. До таких захворювань можна віднести ішемічний інсульт, тромбоз коронарної артерії, тромбоемболію легеневої артерії, атеросклероз, атеротромбоз судин, тощо (Чернишенко, 2019).

Для нормального кровопостачання критично необхідне збереження крові в рідкому стані та запобігання крововтраті. Саме ці функції забезпечує система гемостазу.

Кінцевою ланкою каскаду зсідання крові, є формування фібринового згустку за рахунок відщеплення фібринопептидів від фібриногену (фактор зсідання I) з подальшою само збіркою фібрину. Фібриноген - це розчинний глікопротеїн молекулярною масою 340 кДа (Surma, 2021), який синтезується здебільшого у печінці з постійною швидкістю 1,7-5 г на добу (Weisel, 2017). Також описано синтез фібриногену трофобластами *in vivo* (Galanakis, 1996), хоча біологічне значення цього явища залишається нез'ясованим. Додатковим джерелом фібриногену є α -гранули тромбоцитів – при активації вони випускають фібриноген у зоні пошкодження судини (Swieringa, 2018).

За норми концентрація фібриногену у плазмі крові людини становить 1,5- 3,5 г/л (Litvinov, 2021). У практично здорових осіб частка втрати фібриногену шляхом коагуляції та фібринолізу складає лише 2-3% (Nossel,

1976). Решта фібриногену розщеплюється через 3–5 днів, однак механізми цього процесу залишаються недостатньо вивченими (Weisel, 2017).

Гени, що відповідають за синтез фібриногену, знаходяться на хромосомі 4 (4q31.3–4q32.1) – *FGA*, *FGB* та *FGG* (Vilar, 2020). Продуктами цих генів є поліпептидні ланцюги pre-pro-A α (644 амінокислотних залишків), pre-pro-B β (491 амінокислотні залишки) та pre-pro- γ (467 амінокислотні залишки) (Weisel, 2017). У ендоплазматичному ретикулумі утворені поліпептиди піддаються подальшому процесингу, у результаті якого утворюються A α -, B β - і γ -ланцюги, молекулярною масою 66,5; 52,0 і 46,5 кДа, відповідно. Потім відбувається об'єднання ланцюга B β з димером A α - γ або ланцюга A α з димером B β - γ . Процесинг закінчується асоціацією двох тримерів у N-кінцевій зоні за допомогою дисульфідних містків.

Перед секрецією фібриногену у плазму крові, він може проходити низку посттрансляційних модифікацій: глікозилювання, глікування, окиснення, цитрулінування (Surma, 2021), які впливають на структуру тромбів, полімеризацію фібрину та процес фібринолізу. Зокрема, у результаті N-ацетилювання до кожної молекули фібриногену приєднується по чотири N-глікани. Їх наявність впливає на якість подальшої латеральної асоціації фібрину (Litvinov, 2021).

Синтез фібриногену у печінці відбувається конститутивно, але його рівень може значно зростати під дією білків гострої фази запалення (наприклад ІЛ-6). Підвищення рівня ІЛ-1 β та фактору некрозу пухлин-альфа призводить до пригнічення синтезу фібриногену (Vilar, 2020). Фібриноген є одним із білків гострої фази запалення (Evans, 1987). Регуляторна дія в основному опосередковується ІЛ-6 та, можливо, іншими прозапальними медіаторами, які слугують тригерами внутрішньоклітинного сигналіngu в гепатоцитах і модулюють експресію генів (Hogan, 2000; Fish, 2012).

Молекула фібриногену за даними кристалографічного аналізу має довгасту форму: 45 нм довжиною та 2-5 нм діаметром (Hall, 1959). У її структурі розрізняють два дистальних глобулярних D регіона, які складаються

з 7 доменів кожен, та центральний E регіон, що має 4 домени (Medved, 2009). Кожен регіон містить глобулярну частину та α -спіралі, які об'єднують глобули між собою (рис. 1.1).

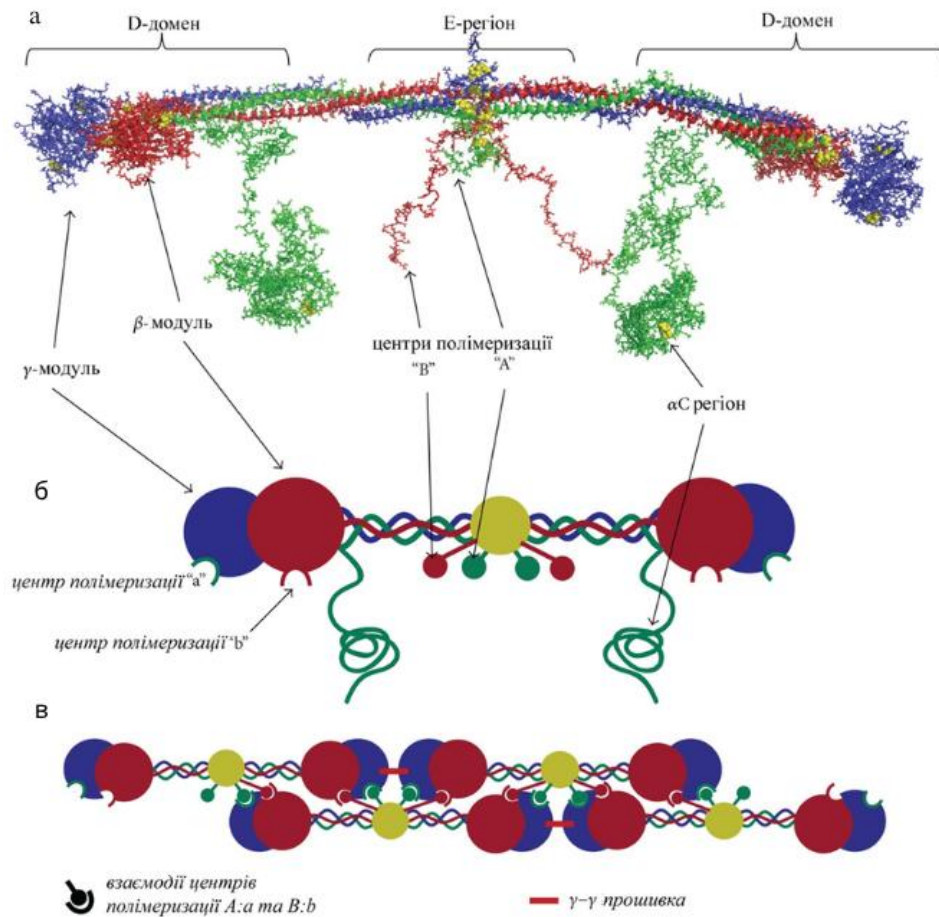


Рис. 1.1. Схематичне зображення фібрину та його полімеризації у фібрили. (а) Молекула фібрину побудована на основі кристалографії: ланцюг α показаний зеленим, β – червоним, а γ – синім; дисульфідні зв'язки виділені жовтим. (б) Схема молекули фібрину: при відщепленні FpA та FpB тромбіном. (в) Модель полімеризації протофібрили (Hudson, 2017)

E регіон складається з двох симетричних частин, в яких C-кінці ланцюгів A α , B β і γ утворюють потрійну α -спіральну структуру – суперспіральний E- регіон. N-кінцеві частини двох γ -ланцюгів утворюють асиметричний γ N- домен у центрі E регіону. На протилежному боці E регіону частини двох A α - і двох B β -ланцюгів утворюють ще один структурний домен, названий

воронкоподібним (Medved, 2009). Глобулярна частина E регіону без спіральних E-доменів часто називається центральним вузлом фібриногену (Weisel, 2017).

У D-регіоні N-кінцеві частини всіх $A\alpha$ -, $B\beta$ - і γ -ланцюгів утворюють суперспіральний D-домен, що складається з потрійної α -спіральної структури. C-кінцеві ділянки β - і γ -ланцюгів утворюють β -вузол (β -модуль) і γ -вузол (γ -модуль) відповідно. Згідно кристалічної структури γ -вузла, він складається з трьох структурних доменів: N-кінцевий A-домен, центральний B-домен і C-кінцевий P-домен (Medved, 2009).

Хоча будову фібриногену і вдалося охарактеризувати завдяки кристалографічним методам, 30% неупорядкованих та гнучких компонентів молекули досі не вдалося визначити. Найбільшими такими неупорядкованими ділянками є α C-регіони. C-кінцева частина цих регіонів утворює впорядковану компактну структуру (домен), тоді як N-кінцева частина утворює гнучку область, що сполучає глобулярну частину з основною частиною молекули. Впорядковану структуру називають α C-доменом, а гнучку частину – α C-конектором (Raynal, 2013).

Концентрацію фібриногену у крові використовують як діагностичний показник. Гіпер- та гіпофібриногенемія можуть спостерігатися при ряді патологічних станів. Зокрема, гіперфібриногенемія супроводжує запальний процес і може бути викликана діабетом, артеріальною гіпертензією, ожирінням, метаболічним синдромом, менопаузою (Surma, 2021). Підвищений вміст фібриногену є фактором ризику як артеріального, так і венозного тромбозу.

Перетворення фібриногену на фібрин відбувається у два етапи: ензиматичний та неензиматичний. На першому етапі під дією тромбіну відбувається ензиматичне відщеплення фібринопептиду А (FpA, 16 амінокислотних залишків) та фібринопептиду В (FpB, 14 амінокислотних залишків) від N-кінців $A\alpha$ та $B\beta$ ланцюгів фібриногену відповідно. Відщеплення останнього відбувається повільніше, що можна пояснити

меншою конформаційною доступністю для тромбіну, також цей процес не є обов'язковим для полімеризації фібрину (Weisel, 2017).

На другому етапі відбувається спонтанне самозбирання молекул мономерного фібрину з утворенням фібринових олігомерів, які подовжуються, утворюючи дволанцюгові протофібрили. Протофібрили агрегують, як у поперечному, так і в поздовжньому напрямках, утворюючи волокна, які у свою чергу розгалужуються, формуючи тривимірну сітку фібрину – основу тромбу.

У результаті відщеплення FpA відкривається сайт полімеризації «А», представлений N-кінцевими Gly-Pro-Arg ділянками A α -ланцюгів (Litvinov, 2021). У процесі полімеризації ця новоутворена ділянка взаємодіє з сайтом «а» сусідньої молекули фібрину (Weisel, 2017). Бічні D-ділянки двох молекул, які розташовані лінійно одна за одною, взаємодіють між собою і утворюють так званий інтерфейс D:D (рис. 1.1) (Everse, 1998).

За схожим механізмом відбувається взаємодія новоутвореного мотиву - Gly-His-Arg-Pro на N-кінці β -ланцюга після відщеплення FpB («В»-сайт), комплементарного до специфічного сайту зв'язування в D регіоні фібрину («b»-сайт) (Blombäck, 1978). Вважається, що відщеплення фібринопептиду В призводить до вивільнення α C-регіону, який зв'язаний з регіоном E у фібриногені, але є доступним для міжмолекулярних взаємодій у фібрині, тим самим сприяючи латеральній асоціації протофібрил.

Коли протофібрили досягають певного розміру, починається їх латеральна асоціація. Можливим поясненням цього явища є те, що асоціація починається лише після досягнення протофібрилами певного розміру, оскільки сайти латеральної взаємодії є слабкими і процес починається лише з появою їх у достатній кількості. Чинниками, які сприяють латеральній асоціації протофібрил, є взаємодія α C-регіонів фібрину (Brennan, 2007), взаємодія «В»:«b» (Blombäck, 1978), присутність іонів Ca²⁺ (Brennan, 2007). Полімеризація фібрину призводить до утворення тривимірної сітки – фібринового згустку. Момент утворення фібринового згустку, що визначається як час зсідання крові, зазвичай використовується в клінічних аналізах.

Стабілізація утвореного згустку відбувається завдяки фактору зсідання крові XIII, що активується тромбіном у присутності фібрину та іонів Ca^{2+} в результаті обмеженого протеолізу. Фактор XIII є трансклутаміназою, яка утворює ізопептидні зв'язки між залишками γ -карбоксіглутамілу та аміногрупою лізину, забезпечуючи міжмолекулярну прошивку мономерів фібрину, яка стабілізує та зміцнює фібриновий згусток. Крім того, прошивка фібринового згустку фактором XIII асоційована з включенням $\alpha 2$ - антиплазміну в полімерний фібрин, що важливо для регуляції системи фібринолізу (Weisel, 2017). Ковалентне включення в згусток 2- антиплазміну захищає згусток від фібринолізу: тромби, утворені за присутності фактора XIII, дуже повільно піддаються лізису. Таким чином, включення 2- антиплазміну у фібринову сітку, очевидно, виконує домінуючу роль в запобіганні швидкого гідролізу утвореного згустку плазміном (Mutch, 2010).

Важливу роль у стабільності згустку також відіграє взаємодія фібрину з тромбоцитами. Цей процес опосередковується активованим інтегрином $\alpha \text{IIb} \beta 3$, який зв'язується з нитками фібрину. Після зв'язування тромбоцити виконують роль механічних містків між волокнами фібрину. Це підвищує механічну стійкість тромбу до току крові (Vuitrago, 2021).

Отже, перетворення фібриногену на фібрин є ключовою ланкою системи гемостазу, що забезпечує формування фібринової сітки та тромбоутворення. Каскад реакцій протеолітичного розщеплення фібриногену під дією тромбіну, полімеризація фібрину та стабілізація згустку фактором XIII впливають на швидкість і характеристики утворення тромбу. Порушення будь-якої ланки цього процесу або зміни концентрації фібриногену або інших компонентів коагуляційного каскаду може призвести до патологічного тромбоутворення, що підкреслює важливість дослідження регуляції коагуляційних механізмів при різних патологічних станах.

1.2. Похідні фібрин(оген)у як діагностичного маркеру загрози тромбоутворення

До похідних фібрин(оген)у належать продукти протеолізу фібрину та фібриногену. Зокрема, до них відносять розчинний фібрин та високомолекулярні продукти деградації фібрину (D-димер та E-фрагмент). У цьому підрозділі розглянемо детальніше похідні фібрин(оген)у, які є діагностичними маркерами загрози тромбоутворення.

1.2.1. Прогностична роль розчинного фібрину

Поява розчинного фібрину є прямим наслідком активації системи коагуляції, тому розглядається як один із ранніх лабораторних маркерів її дії (Cilia, 2011). Це зумовлює необхідність розробки тест-систем для визначення розчинного фібрину для ранньої діагностики порушень гемостазу.

Розчинний фібрин є комплексом з олігомерів desA фібрину, які можуть бути частково зшиті фактором XIIIa, та молекул фібриногену, які блокують «липкі» кінці олігомерів фібрину (Udovenko, 2023; Cilia, 2011). Кожен олігомер desA фібрину містить до 16 мономерів, об'єднаних через сайти полімеризації фібрину «А»:«а» та «С»:«с» (Lugovskoy, 2007). Часткове зшивання олігомерів фібрину фактором XIIIa відбувається на С-кінцях γ -ланцюгів (Udovenko, 2023). Наявність таких зшивань забезпечує більшу стабільність цих комплексів, ніж мономерів desA фібрину (Dempfle, 1999). Молекули фібриногену на липких кінцях олігомерів приєднані завдяки взаємодії сайтів полімеризації «А»:«а» та «С»:«с» та блокують елонгацію утвореної структури, а отже і утворення протофібрил та згустків (Udovenko, 2023).

Структура розчинного фібрину значно відрізняється від структури протофібрил фібрину: високою концентрацією зв'язаного фібриногену, яка перевищує концентрацію desA фібрину; відсутністю в молекулі desA фібрину

сайтів полімеризації В та наявністю α С-регіону в комплексі з В β N-доменом (Udovenko, 2023). Встановлено, що розчинний фібрин у клінічних зразках плазми крові є гетерогенним і демонструє значну варіабельність (Dempfle, 1999).

Олігомери desA фібрину у складі розчинного фібрину здатні зв'язувати Glu-плазміноген і тканинний активатор плазміногену, але вони не здатні стимулювати активацію першого і, відповідно, спричинити лізис тромбу. Тому розчинний фібрин не є попередником D-димеру в крові. Лише згустки фібрину здатні активувати перетворення Glu-плазміногену у Glu-плазмін, а відтак лізис тромбів та формування D-димеру (Udovenko, 2023).

Утворення мікрозгустків можливе лише у мікроциркулярних умовах, де швидкість току крові набагато нижча, ніж у магістральних кровоносних судинах. У результаті збільшується ймовірність взаємодії олігомерів фібрину один з одним і з поверхнею стінок капілярів. Завдяки наявності В β N-домену desA фібрин здатний зв'язуватися з глікокаліксом ендотелію (Udovenko, 2023).

До складу розчинного фібрину також можуть входити продукти деградації фібрину. Такі комплекси отримали назву розчинних фібрин-мономерних комплексів (РФМК).

На сьогодні існують різноманітні тести для виявлення в плазмі крові таких похідних фібриногену, як фібринопептид А, розчинний фібрин та РФМК. Недоліком визначення фібринопептиду А є його короткий період циркуляції у крові, тоді як розчинний фібрин та РФМК можуть бути виявленими протягом декількох годин після їх утворення (Dempfle, 1999).

Наявними методичними підходами є: паракоагуляційні та преципітаційні тести (наприклад, протаміновий паракоагуляційний тест, преципітація з ристоцетином, нетропсином або гістонами), адсорбційні методи з використанням іммобілізованого фібриногену або його аналогів, аналізи на основі активації плазміногену з використанням хромогенного субстрату, а також імуноензимний аналіз (ELISA) із застосуванням антитіл до desA- і desAB-фібрину чи полімерних комплексів фібрину (Dempfle, 1999). Оскільки

ці методи спрямовані на виявлення різних структурних та функціональних особливостей розчинного фібрину, вони не є прямими аналогами і мають різну чутливість та можуть давати різні результати.

Хоча розчинний фібрин є раннім маркером, який вказує на активацію коагуляційного процесу, його виявлення є складним процесом через відсутність стандартизації методів. Через ці методичні обмеження розчинний фібрин як маркер активації системи гемостазу поки не набув широкого застосування у клініці, незважаючи на свої переваги для діагностики деяких захворювань. Застосування специфічних антитіл дає змогу визначити вміст розчинного фібрину з метою своєчасного попередження розвитку тромботичних ускладнень.

1.2.2. Розчинні фібрин-мономерні комплекси як ранній маркер тромбозу

Розчинні фібрин-мономерні комплекси (РФМК) можуть виникати на ранніх стадіях тромбозу (Singh, 2017). За своєю будовою вони є високомолекулярними комплексами фібрину, фібриногену та фібринопептидів (Refaai, 2018; Заїчко, 2006). Їх утворення передують формуванню згустків та полімерів розчинного фібрину, тому інколи їх сприймають як перехідну форму між фібриногеном та фібрином (рис. 1.2).

Розчинні мономери фібрину з'являються у крові після відщеплення фібринопептидів А та В фібриногену (Refaai, 2018). Наступним етапом стає приєднання до цих комплексів фібриногену та продуктів розщеплення фібрин(оген)у (D-фрагмент, E-фрагмент, D-димер) – утворюються РФМК. З часом кількість таких комплексів зростає, поки не досягає граничної концентрації, яка сприяє утворенню згустків (Singh, 2017).

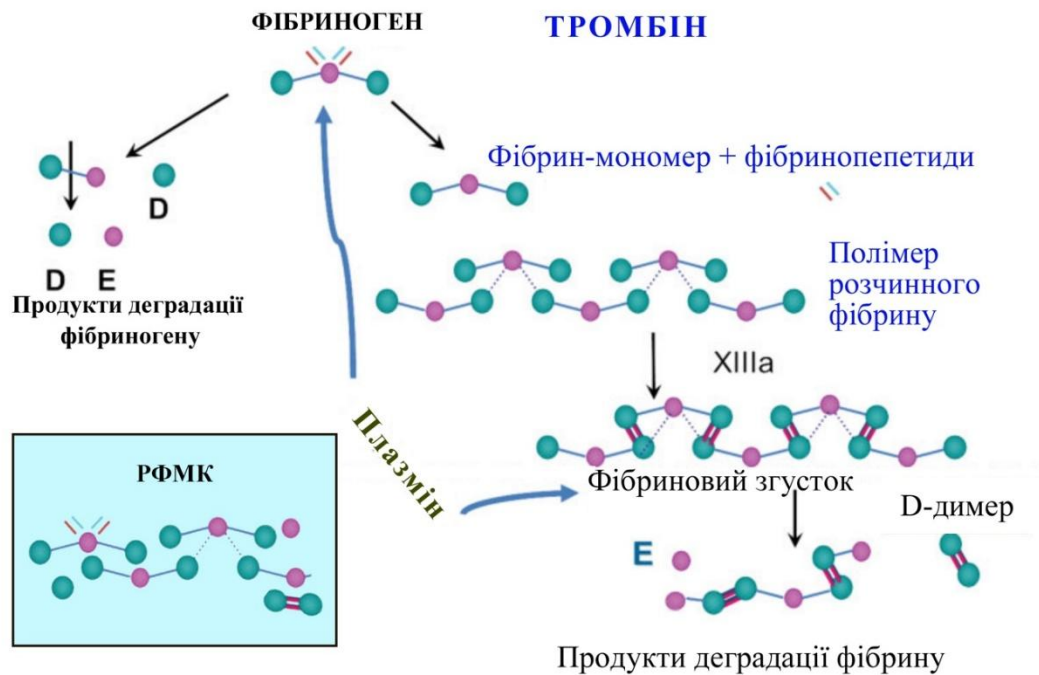


Рис. 1.2. Схема утворення РФМК. D – D-фрагмент, E – E-фрагмент, РФМК – розчинні фібрин мономерні комплекси, XIIIa – активований фактор зсідання крові XIII (Refaai, 2018)

Накопичення РФМК у крові свідчить про активацію системи коагуляції та вказує на розвиток тромботичних ускладнень (Заїчко, 2006).

Для виявлення РФМК у лабораторній діагностиці традиційно використовували паракоагуляційні тести – етаноловий та протамінсульфатний. Однак ці тести напівкількісні та погано відтворюються. Зокрема, протамінсульфат зв'язується з гепарином, тому при гепаринотерапії протамінсульфатний тест дає хибнонегативний результат.

Найбільш вдалим на теперішній час функціональним методом визначення вмісту РФМК є фосфатний тест, перевага якого полягає у простоті виконання, чутливості (виявляють навіть слідову кількість РФМК) та достовірності результатів. Результати оцінюють напівкількісно за кількістю та формою осаду. Цей метод дозволяє виявляти РФМК в межах концентрації від 17,5 до 140 мкг/мл (Чернищенко, 2010).

1.2.3. Прогностична роль D-димеру

Під час фібринолізу полімерний фібрин розщеплюється на фрагменти різного розміру від 190 до 530 кДа (Francis, 1987). Одним із продуктів деградації є D-димер (Innocenti, 2021; Riley., 2016).

D-димер є стабільною молекулою, що утворюється у результаті послідовної дії кількох ензимів гемостазу: тромбіну, фактора XIIIa та плазміну (Innocenti, 2021; Tasić, 2020).

Утворений D-димер циркулює у кров'яному руслі впродовж декількох днів. Вперше у клінічній практиці його використали для діагностики дисемінованого внутрішньосудинного зсідання крові у 1970 році, але тест був обмежений низькою специфічністю (Innocenti, 2021). Проте через велику значущість цього параметру у визначенні різних гемостатичних порушень збільшилась кількість досліджень, які спрямовано на розробку та оптимізацію методів його кількісного визначення (Tasić, 2020).

Поява D-димеру у плазмі крові пацієнтів вказує на активацію коагуляційної та фібринолітичної систем (Innocenti, 2021; Johnson, 2019). Для клінічної детекції D-димеру в крові здебільшого використовують моноклональні антитіла до епітопів які присутні лише у ковалентно стабілізованому фібрині (Innocenti, 2021; Weitz, 2017).

Патологічні стани, пов'язані з порушенням системи зсідання крові, можуть бути діагностовані за аномальним рівнем D-димеру у плазмі крові пацієнтів – венозна тромбоемболія, тромбоз магістральних вен, тромбоемболія легеневої артерії, сепсис, дисеміноване внутрішньосудинне зсідання крові, гостра кровотеча шлунково-кишкового тракту (Tasić, 2020), інфаркт міокарда та ішемічний інсульт (I), ускладнення при COVID-19 (Al-Samkari, 2020).

Діагностика венозної тромбоемболії (VTE) за допомогою D-димеру почала застосовуватися через неспецифічність симптомів цього захворювання. VTE діагностується лише у 10% пацієнтів, у яких є підозра на неї (Weitz, 2017). З одного боку ігнорування ранніх неспецифічних симптомів може вести за

собою інвалідність та смерть. З іншого – фінансові затрати на комп'ютерну томографію та перевантаження пацієнтів додатковими тестами також викликають занепокоєння (Price, 2021). Саме тому найпопулярніша стратегія діагностики ВТЕ базується на використанні клінічного правила прийняття рішення для визначення дотестової ймовірності захворювання (Wells, 2018). Використовуючи кількісні лабораторні тести для визначення вмісту D-димеру, було виявлено, що правило прийняття рішень може не тільки безпечно виключити діагноз ВТЕ, але й зменшити кількість непотрібних скерувань пацієнтів на подальші обстеження (Weitz, 2017).

Така сама картина спостерігається при діагностуванні тромбоемболії легеневої артерії: захворювання теж демонструє неспецифічні симптоми та вимагає застосування дорогих процедур для діагностування. Зараз уже існують дані про застосування тестів для визначення вмісту D-димеру для зменшення надмірного тестування пацієнтів (Innocenti, 2021).

У 2020 році ще одним захворюванням із широким спектром симптомів та високим рівнем летальних випадків стала інфекція SARS-CoV-2 (Wiersinga, 2020). Порушення коагуляції, які виникали у пацієнтів мали ті самі особливості, що і у хворих на дисеміноване внутрішньосудинне зсідання крові, у тому числі й підвищений рівень D-димеру (Vidali, 2020; Iba, 2020). Підвищення рівня D-димеру у пацієнтів з COVID-19 демонструє прогностичне значення цього параметру (Innocenti, 2021).

Незважаючи на успішне використання кількісних тестів для визначення вмісту D-димеру у клініці, вони залишаються недостатньо точними, що спричиняє високу частоту хибно позитивних результатів (Innocenti, 2021).

Важливим діагностичним аспектом при визначенні D-димеру є його зміна з віком пацієнта (Price, 2021) та у пацієнтів з порушенням роботи нирок (Innocenti, 2021). У першому випадку збільшення рівня D-димеру у здорових пацієнтів старше 80 років може бути обґрунтоване наявністю прозапальних особливостей старіння (Price, 2021). У пацієнтів з нирковою недостатністю

рівень D-димеру підвищений, оскільки елімінація частково відбувається через нирки (Innocenti, 2021).

Таким чином, D-димер – це продукт розпаду стабілізованого фібрину та широко використовується як маркер для діагностики різноманітних захворювань, які пов'язані із порушенням коагуляції.

Отже, похідні фібрин(оген)у відображають різні етапи активації системи гемостазу та формування тромбу. Розчинний фібрин є раннім маркером дії тромбоутворення, розчинні фібрин-мономерні комплекси характеризують подальші етапи полімеризації фібрину, тоді як D-димер є продуктом фібринолізу і свідчить про наявність сформованого тромбу, що піддається фібринолізу. Комплексне визначення цих показників дозволяє отримати більш повну інформацію про стан коагуляційної та фібринолітичної систем і підвищити ефективність лабораторної діагностики тромботичних ускладнень.

1.3. Посттравматичний стресовий розлад як фактор ризику тромботичних ускладнень

В умовах війни та політичної нестабільності частота випадків ПТСР серед цивільного населення та військовослужбовців зростає. Для України ця проблема стала особливо актуальною після подій 2014 року та повномасштабного вторгнення 2022 року. Проведені у 2019 році дослідження показали, що люди, які проживали на території Донецької та Луганської областей поряд із зоною АТО демонстрували ознаки ПТСР у 37,3% випадків (Fel, 2022). Після 2022 року кількість пацієнтів з ПТСР на території України зросла більш ніж удвічі (Eshel, 2022).

Аналіз новітніх літературних джерел показав, що ПТСР є не лише психологічною травмою, а й клінічним ризиком розвитку хронічних соматичних захворювань, зокрема серцево-судинних патологій (Nakhebi, 2025). Дослідження демонструють білатеральний зв'язок між ПТСР та

серцево-судинними захворюваннями. Аналіз клінічних випадків показав, що люди з ПТСР мають 75% ризик розвитку судинно-серцевих патологій порівняно з контрольною групою. Зокрема, наявність ПТСР асоціюється з підвищенням ризику інфаркту міокарда на 42% та зростанням ризику інсульту на понад 100% (Padhi, 2024; Nakhebi, 2025).

Сучасні системи діагностики цього стану базуються на клінічному анкетуванні та висновку психотерапевта. Використання таких методів діагностики збільшує суб'єктивність отриманих результатів та ускладнює встановлення точного діагнозу. Діагностика також ускладнюється перекриванням симптомів ПТСР іншими медичними станами (наприклад, порушення сну або концентрації через фізичний біль після поранення) (Navermans, 2025). З цих міркувань низка українських інститутів та університетів почала аналіз біохімічних показників пацієнтів з ПТСР для визначення можливих маркерів діагностики та аналізу фізіологічних наслідків.

Дослідження крові пацієнтів з діагностованим ПТСР показали накопичення системних фізіологічних порушень: дисрегуляція нейроендокринної та імунної систем, що може впливати на функціонування серцево-судинної системи та системи гемостазу. У людей з ПТСР було виявлено системне порушення регуляції гіпоталамо-гіпофізарно-наднирникової осі (HPA-осі), яка відіграє важливу роль у формуванні адаптаційної відповіді організму на стрес (Горбаченко, 2024). Саме тривала дія цих медіаторів стресу спричиняє дисфункцію судинного ендотелію, посилення продукції прозапальних цитокінів та активацію тромбоцитів. У свою чергу, ендотеліальна дисфункція та системне запалення можуть стимулювати експресію тканинного фактора, що призводить до активації коагуляційного каскаду та формування протромбічного стану.

Іншими біохімічними показниками, які вказують на дисбаланс у пацієнтів з ПТСР, є рівні кортизолу та катехоламінів у крові, що може призводити до патології у функціонуванні судинного ендотелію та активації тромбоцитів (Чернишенко, 2019). Такі зміни у поєднанні з гіпертензією, тахікардією та

підвищеним навантаженням на міокард, характерними для хронічної дисрегуляції автономної нервової системи при ПТСП, створюють умови для патології судинного ендотелію та посиленого тромбоутворення (Seligowski, 2022; Coughlin, 2011).

Важливим аспектом є також ПТСП, що виникає безпосередньо внаслідок серцево-судинних подій. Раптовість хвороби та відчуття безпорадності сприймаються пацієнтом як загроза життю, що відповідає критеріям травми. Згідно з моделлю «тривалої соматичної загрози», такий стан відрізняється від традиційного ПТСП тим, що джерело загрози знаходиться всередині організму. Соматичні симптоми, такі як прискорене серцебиття або задишка, стають постійним нагадуванням про травму, замикаючи пацієнта у безперервному циклі тривоги та серцево-судинної реактивності (Fait, 2018).

Спостереження таких наслідків біохімічних змін при ПТСП змушують звернути увагу на стан системи гемостазу пацієнтів з даним діагнозом. Адже система гемостазу є високочутливою до змін біохімічного гомеостазу організму. Такі відхилення спричиняють зміну концентрації компонентів тромбоутворення у крові.

Отже, ПТСП супроводжується нейроендокринними, імунними та гемостатичними змінами, які можуть сприяти протромбічному стану кровоносної системи пацієнта. У зв'язку з цим вивчення маркерів ранньої коагуляції з міркувань виявлення ознак тромботичних ускладнень у пацієнтів з ПТСП є перспективним напрямком для дослідження.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Матеріали та обладнання

При виконанні роботи використовували суміш протеїнів – маркерів молекулярної маси для електрофорезу (protein molecular weight marker) («Fermentas», Європейський союз), полівініліденфторидна (PVDF) мембрана, диметилсульфоксид (DMSO) («Bio-Rad Laboratories», США), трис (гідроксиметил) амінометан (Трис), етилендіамінтетраоцтова кислота (ЕДТА) («Serva», США), активатор протеїну С, біс-акриламід («Sigma», США), N, N, N', N'-тетраметілендіамін (ТЕМЕД) («Ренал», Угорщина), мембрани РМ-30 («Amicon», США), Q-sepharose («Pharmacia», Швеція), маркерні протеїни для електрофорезу («Thermo Fisher Scientific», США), RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) 1640 («Sigma», США), Protein G Sepharose («Sigma», США), фетальна теляча сироватка (FCS) («Sigma», США), розчин Хенкса 10x («Sigma», США), кролячі антитіла проти мишачих IgG – пероксидаза («Sigma», США), контривен, трифтороцтова кислота («Sigma», США), кон'югат стрептавідин-пероксидази, 3,3',5,5'-тетраметилбензидин, N-гідроксисукцинімідне похідне біотину, тромбін, 96-лункові планшети для імуноензимного аналізу («Nunc», Thermo fisher, Данія), 4-(2-гідроксиетил)-1-піперазинетансульфонова кислота (HEPES) («USB», США), флакон для суспензійних клітин («Sarstedt», США), 2н H₂SO₄, амфотерицин, трансферин, гіпоксантин-тимідину («Thermo Fisher Scientific», США), тромбопластин (Siemens, Erlangen, Germany), поживне кондиційне середовище, 10% поживне середовище для гібридом, буферний розчин Лемлі, гліцерол, бромфеноловий синій, кумасі G-250, ізопропанол, оцтова кислота, цитрат натрію, водяна баня (37°C), центрифуга, сухе молоко («Sigma», США), CO₂-інкубатор, термостат, автоматичний мікроспектрофотометр RT 2100 С, спектрофотометр Thermo

Multiskan EX, спектрофотометр POP Optizen (Корея), коагулометр СТ2410 (STS, Харків, Україна), електрофоретична система для ПААГ (polyacrylamide gel electrophoresis), джерело живлення для електрофорезу, система для мокрого перенесення (wet blotting system), фосфатно-сольовий буфер (ТФБ, 137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 10 мМ Na₂HPO₄, 1,8 мМ KH₂PO₄, 0,05% Tween-20, pH 7,4), хроматографічна колонка (5 мл), система ультрафільтрації («Amicon», США).

Моноклональні антитіла I-3С, специфічне до фібрину, III-3В – до D- димеру, та II-4d – до розчинного фібрину та D-димеру, були відібрані з бібліотеки антитіл відділу структури і функції білка Інституту біохімії імені О. В. Палладіна НАН України.

2.2. Умови культивування гібридоми

Вилучену з рідкого азоту культуру гібридоми I-5А поміщали у водяну баню при 37°C. Після розморожування до культури додавали 40 мл середовища Хенкса для відмивання від DMSO та центрифугували 10 хв при 1000 об./хв. Процедуру промивання повторювали двічі. Відмиту культуру гібридоми ресуспендували у поживному кондиційному середовищі та культивували протягом 24 год. Подальше культивування та напрацювання антитіл проводили у 10% поживному середовищі для гібридом при 37°C у CO₂-інкубаторі (Lugovska, 2020).

2.3. Очистка моноклонального антитіла I-5А з культуральної рідини

Для очистки моноклонального антитіла використовували афінну хроматографію. Для цього було обрано колонку об'ємом 5 мл з носієм Protein G Sepharose. Колонку врівноважували розчином 0,1 М K₂HPO₄, pH 7,4. Нанесення культурального середовища, яке містило моноклональне антитіло

I-5A, проводили зі швидкістю 0,5 мл/хв. Попередньо до культурального середовища було додано препарат контривен – інгібітор протеїназ.

Елюцію проводили 0,1 М гліцин-HCl буфером (pH 3,0), зі швидкістю 0,5 мл/хв. pH отриманої фракції відразу нейтралізували розчином 1 М K_2HPO_4 (Lugovska, 2020). Фракції, в яких спектрофотометричним методом за довжини хвилі 280 нм проти 320 нм, було виявлено протеїн, були сконцентровані за допомогою методу ультрафільтрації з переведенням антитіл у 0,1 М K_2HPO_4 буфер, pH 7,4 із застосуванням мембрани PM-30 («Amicon», США).

Незв'язану з носієм фракцію та елюат перевіряли на наявність цільового антитіла методом непрямого імуноензимного аналізу.

2.4. Одержання фібриногену

Фібриноген людини отримували з плазми крові фракційним осадженням сульфатом натрію (Na_2SO_4). До безпротромбінової плазми крові додавали 1 М гліциновий буфер (pH 9,5) з 0,1 М NaCl (у співвідношенні 1:9) і перемішували при 20–22 °C на водяній бані. При постійному перемішуванні до плазми крові по краплях додавали 16% розчин Na_2SO_4 (520–680 мл 16% Na_2SO_4 на 1 л плазми крові) до появи дрібного осаду. Останній видаляли центрифугуванням при 1400 g протягом 15 хв з подальшим осадженням фібриногену з супернатанту шляхом додавання по краплях 16% Na_2SO_4 до його кінцевої концентрації 8,5% і центрифугуванням при 1200 g протягом 15 хв. Потім осад розчиняли в 0,2 М NaCl (осад з 1 л вихідної плазми крові в 200 мл 0,2 М NaCl) і знову по краплях додавали рівний об'єм 16% Na_2SO_4 і центрифугували при 1200 g протягом 20 хв. Осад розчиняли в 0,2 М NaCl (осад з 1 л плазми крові в 200 мл 0,2 М NaCl). До отриманого розчину додавали 1/5 об'єму 0,5 М калій-фосфатного буфера (pH 6,5). Фібриноген знову

висолювали, додаючи рівний об'єм 16% Na_2SO_4 і центрифугували при 1200 g протягом 20 хв.

Осад розчиняли в 0,15 М NaCl. Концентрацію фібриногену доводили до 1% 0,15 М NaCl і залишали на 16 год при +4 °С. Потім розчин центрифугували при 1400 g протягом 15 хв, при цьому в осаді залишався кріофібриноген. До супернатанту додавали рівний об'єм 16% Na_2SO_4 і центрифугували при 1200 g протягом 15 хв. Осад розчиняли в 0,15 М NaCl до кінцевої концентрації фібриногену 25–30 мг/мл. Розчин фібриногену зберігали при -20 °С.

2.5. Одержання фібрину desAB

desAB фібрин отримували шляхом гідролізу фібриногену тромбіном. До 0,25 % розчину фібриногену в 0,15 М NaCl додавали тромбін (0,15–0,3 NIH на 1 мг фібриногену) та інкубували 1–1,5 год при 37°С. Після інкубації згусток видаляли і двічі промивали 0,15 М NaCl. Отриманий фібриновий згусток розчиняли в 0,125% розчині оцтової кислоти. До розчину фібрину додавали 14 об'ємів 0,063 М калій-фосфатного буфера з 0,25 М NaCl (рН 6,0) і залишали на 2 год для полімеризації фібрину. Отриманий згусток двічі промивали 0,15М NaCl, третій раз 0,075М NaCl і розчиняли в 0,0125% розчині оцтової кислоти при 4 °С. Розчин фібрину центрифугували 10–15 хв. при 900 г при 5 °С. Цей цикл полімеризації та розчинення повторювали двічі. Отриманий 1,2–1,5 % розчин desAB фібрину в 0,0125 % розчині оцтової кислоти зберігали при 4 °С.

2.6. Визначення чистоти очищених антитіл, фібрину та фібриногену

Електрофорез у ПААГ за денатуруючих умов проводили за методикою Лемлі. Для приготування зразків для нанесення використовували п'ятикратний буферний розчин Лемлі та нагрівали 5 хв при 95° С.

Зразки наносили у попередньо полімеризовані пластинки 12% ПААГ. Розподілення білків проводилося за сталої сили струму для концентруючого та розподільчого гелів, 19 мА та 36 мА відповідно. Після електрофорезу білки фарбували Coomassie G протягом 10 хв. Для видалення залишків барвника використовували 2-8% розчин оцтової кислоти.

2.7. Перевірка специфічності антитіла I-5A

Після електрофорезу формували “сендвіч” із гелю, PVDF мембрани та фільтрувального паперу та ставили вологе перенесення при напрузі 100 В протягом 2 год. Далі мембрану інкубували у буфері для блокування протягом 1 год за кімнатної температури та відмивали 0,1 М K_2HPO_4 буфером, рН 7,4. Потім проводили інкубацію з очищеним I-5A антитілом протягом 1 год за кімнатної температури. Після відмивання 0,1 М K_2HPO_4 буфером, рН 7,4 мембрану інкубували з вторинним кон'югованим з пероксидазою хрому козячим антикролячим антитілом.

Смуги візуалізували за допомогою 0,001 М розчину 4-хлор-1-нафтолу в 0,5 М Трис рН 7,5 і 0,03% H_2O_2 .

2.8. Оцінка імунореактивності та специфічності моноклонального антитіла I-5A

Для перевірки активності та специфічності моноклонального антитіла I-5A застосовували непрямий твердофазний імуноензимний аналіз. На поверхні лунок імунологічного планшету адсорбували по 110 мкл антигену (фібрин, фібриноген) у концентрації 10 мкг/мл протягом ночі при 4°C. Лунки відмивали 6 разів, використовуючи по 150 мкл ТФБ, після останньої промивки планшет залишали на 30 хв при кімнатній температурі з буфером для блокування (5% обезжирене молоко у ТФБ).

Після видалення буферу з мікропланшету повторно промивали лунки ТФБ та готували серію розведень, у результаті якої було отримано ряд з різною концентрацією антитіла або культурального середовища. Мікропланшет інкубували 1 годину у термостаті при 37°C.

Далі лунки мікропланшету знову промивали 150 мкл ТФБ 6 разів. На наступному етапі додавали по 100 мкл антитіла проти імуноглобулінів миші, кон'югованого з пероксидазою хрому, в ТФБ у розведенні 1:3000 та інкубували 1 годину при 37°C.

Після повторного промивання до лунок вносили по 100 мкл субстрат пероксидази хрому – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин для детекції та інкубували 30 хв при кімнатній температурі. Стоп-реагент (2N H₂SO₄) додавали по 100 мкл у лунку для зупинки реакції у тому самому порядку, що і субстрат. Оптичну густину визначали при довжині хвилі 450 нм відносно 630 нм за допомогою автоматичного мікроспектрофотометра (RT 2100 C).

2.9. Підготовка антитіл для використання у тест-системі

Для використання моноклонального антитіла I-5A в якості tag-антитіла у тест-системі для визначення розчинного фібрину, його спершу біотинілювали.

Для цього проводили переведення розчину антитіла у 0,1 М NaHCO_3 буфер, рН 9,0 за допомогою ультрафільтрації на приладі фірми «Amicon» з мембраною РМ-30. Отриманий розчин моноклонального антитіла з концентрацією 1 мг/мл змішували з активованим біотином (N-гідроксисукцинімідне похідне біотину, диметилсульфоксид) у співвідношенні 8:1. Після цього, його інкубували 4 год при кімнатній температурі, періодично помішуючи розчин. Потім проводили заміну буферу на 0,1 М K_2HPO_4 буфер, рН 7,4 шляхом ультрафільтрації (Мао, 2010).

2.10. Характеристика зразків плазми крові

У експериментах було задіяно чотири групи зразків: референтна група (n=11), пацієнти з акубаротравмою (n=22), пацієнти з опіковою травмою (n=14) та пацієнтів з ПТСР (n=36). Плазми крові пацієнтів з акубаротравмою були люб'язно надані ДУ "Інститут отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка НАМН України", з опіковою травмою – КНП "Київської міської клінічної лікарні №2", та ПТСР – Тернопільського національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського.

До групи пацієнтів з опіковою травмою входили хворі з опіками II–III ступеню, площею ураження 2–20%, віком 25–66 років, які перебували на лікуванні в КНП "Київська міська клінічна лікарня №2". Групу пацієнтів з акубаротравмою становили особи віком 30–60 років, які звернулися до медичного закладу протягом 2 місяців після травми; за результатами суб'єктивної аудіометрії у всіх пацієнтів виявлено перцептивні порушення слухової функції зі спадною тональною кривою; лікування проводилося в ДУ "Інститут отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка НАМН України". До групи пацієнтів з ПТСР входили особи віком 20–61 років з різним ступенем тяжкості розладу, які перебували на лікуванні в КНП «Тернопільська обласна психоневрологічна лікарня» м. Тернопіль; дослідження проводили спільно з

Тернопільським національним медичним університетом імені І.Я. Горбачевського.

2.11. Визначення концентрації розчинного фібрину, ранніх форм розчинного фібрину та D-димеру

Для визначення концентрації розчинного фібрину, ранніх форм розчинного фібрину та D-димеру застосовували бісайтовий імуноензимний аналіз.

На 96-лунковий планшет (NUNC MaxiSorp) адсорбували «catch»-антитіло по 110 мкл на лунку. В якості «catch»-антитіла для детекції розчинного фібрину та ранніх форм розчинного фібрину використовували моноклональне антитіло І-3С, а для детекції D-димеру використовували моноклональне антитіло ІІІ-3В.

Вміст мікропланшету інкубували протягом ночі при 4°C, а потім відмивали 6 разів за допомогою 150 мкл ТФБ, після останньої промивки мікропланшет залишали на 30 хв при кімнатній температурі з буфером для блокування (5% обезжирене молоко у ТФБ).

Після відмивання ТФБ до лунок додавали калібратор: desAB фібрин у концентрації 6,4 мкг/мл для визначення концентрації розчинного фібрину та ранніх форм розчинного фібрину, або D-димер у концентрації 400 нг/мл для визначення концентрації D-димеру. Розчин калібратора розтитровували 2-х кратно, утворюючи калібрувальний ряд. Останні лунки залишали заповненими буфером для розведення зразків (нульова точка калібрування).

В лунки (крім двох калібрувальних рядів), заповнені 90 мкл 5% розчину молока в ТФБ, вносили по 10 мкл досліджуваних зразків плазми крові. Кожен досліджуваний зразок вносили в двох повторах.

Після чого вміст мікропланшету інкубували 1 год при 37°C, промивали планшет за допомогою ТФБ та вносили по 100 мкл біотинільованого tag- антитіла: П-4d для визначення концентрації розчинного фібрину та

D- димеру, або I-5A – для визначення концентрації ранніх форм розчинного фібрину.

Після 1 год інкубації при температурі 37°C мікропланшет знову промивали та додавали кон'югат стрептавідин-пероксидази (у розведенні 1:15000). Інкубували 1 год при 37°C та знову промивали по 150 мкл ТФБ. Подальша детекція відбувалася так, як описано у підрозділі 2.2.

Для розрахунку концентрації відповідного антигену було побудовано калібрувальну криву згідно з отриманими значеннями оптичного поглинання розчину в луноках з розтитрованими калібраторами. Потім було розраховано вихідну концентрацію розчинного фібрину, ранніх форм розчинного фібрину, а також D-димеру у зразках плазми крові, з урахуванням розведення зразків (1:9).

2.12. Визначення концентрації протеїнів

Для визначення концентрації протеїнів у розчинах застосовували спектрофотометрію, вимірюючи оптичне поглинання при довжині хвилі 280 нм проти 320 нм. Для обрахунку концентрації використовували коефіцієнт поглинання фібриногену – 1,5 мл/мг•см (рН 7,5) (Medved, 2001) та моноклональних антитіл I-5A – 1,4 мл/мг•см (Maity, 2015).

2.13. Визначення активності протеїну С

Для визначення активності протеїну С у плазмі крові пацієнтів використовували активатор з отрути щитомородника звичайного (*Agkistrodon halys halys*). До 30 мкл плазми крові додавали 100 мкл активатора, 35 мкл 2 мМ хромогенного субстрату S2236 та 85 мкл 0,05 М трис-НСІ буферу, рН 7,4, з 0,13 М NaCl. Отриману суміш інкубували впродовж 15 хв при

температурі 37 °С. Активність визначали за кількістю розщепленого хромогенного субстрату за допомогою спектрофотометра Thermo Multiskan EX, при довжині хвилі 405 нм.

2.14. Визначення протромбінового часу

Для визначення протромбінового часу (ПЧ) у скляну конічну пробірку вносили 0,1 мл плазми крові, що досліджується. Після цього додавали 0,2 мл тромбoplastину і визначали час зсідання плазми крові при температурі 37°С на коагулометрі СТ2410 (STS, Харків, Україна). Час зсідання плазми крові е відносно здорових донорів в тесті ПЧ становив 18 ± 1 с.

Результати представляли як протромбіновий індекс (формула 2.1)

$$\text{ПІ} = \frac{\text{ПЧ}_n}{\text{ПЧ}_p}, \quad (2.1)$$

де ПІ – протромбіновий індекс;

ПЧ_n – час зсідання плазми крові здорового донора в тесті ПЧ;

ПЧ_p – час зсідання плазми крові пацієнта в тесті ПЧ.

2.15. Визначення концентрації фібриногену в плазмі крові

Концентрацію фібриногену визначали модифікованим спектрофотометричним методом. Для цього плазму крові (0,2 мл) та фосфатний буфер (1,7 мл) змішували в скляній пробірці. Зсідання ініціювали додаванням 0,1 мл тромбін-подібного ензиму з отрути *Agkistrodon halys halys* (1 NIH/мл), що дозволяло уникнути прошивки фібрину фактором XIIIa. Суміш інкубували впродовж 30 хв при 37 °С. Фібриновий згусток видаляли та

розчиняли в 5 мл 1,5 % оцтової кислоти. Концентрацію протеїну визначали спектрофотометрично на спектрофотометрі POP Optizen (Корея) при 280 нм.

2.16. Обрахунок та аналіз отриманих результатів

Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням пакету програм Excel 2021 та середовища R (версія 4.4.1). Перевірку нормальності розподілу даних здійснювали за допомогою критерію Шапіро–Уїлка.

Результати представляли у вигляді медіани та міжквартильного інтервалу. Для оцінки відмінностей між двома незалежними групами застосовували U-критерій Манна–Уїтні. При порівнянні більше ніж двох незалежних груп використовували критерій Краскела–Уолліса з подальшим проведенням попарних порівнянь за допомогою U-критерію Манна–Уїтні (Kühnast, 2008).

Статистичну значущість відмінностей оцінювали при рівні значущості $p < 0,05$.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Отримання антитіл I-5A та їх характеристика

Для отримання моноклонального антитіла I-5A використовували культуру гібридом, створену на базі Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України (Lugovska, 2020). Культуру клітин двократно промивали від DMSO 40 мл сольового розчину Хенкса після поступового розмороження на водяній бані при 37°C. Нарощування культури клітин спершу проводили у кондиційному середовищі, а через 24 год клітини переводили у 10% середовище для гібридом. На рисинку 3.1. представлено типову мікрофотографію культури гібридомних клітин I-5A.

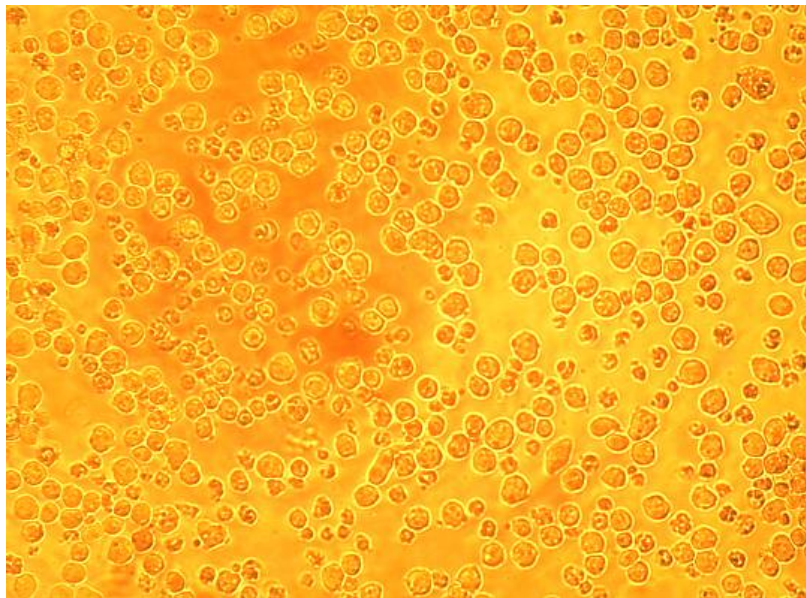


Рис. 3.1. Мікрофотографія культури гібридоми I-5A у 10% середовищі для гібридом (Об.×10, Ок.×10)

Після досягнення високої конфлюентності культуральну рідину гібридоми I-5A перевірили на наявність антитіл. Для цього було проведено

непрямий твердофазний імуноферментний аналіз. У якості антигенів використовували фібрин та фібриноген (рис. 3.2).

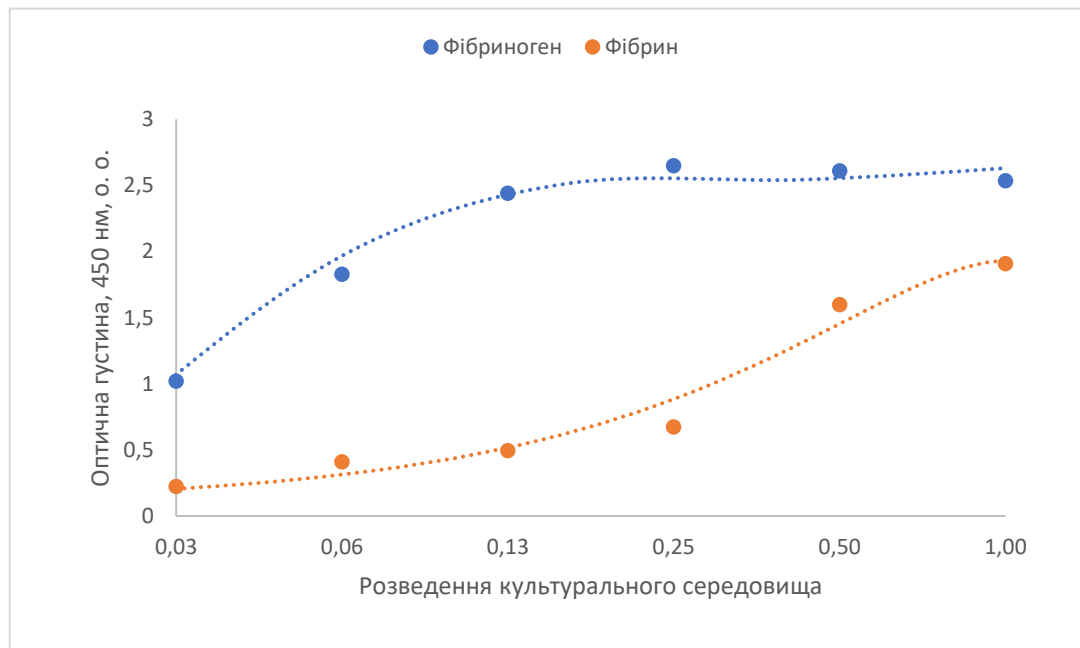


Рис. 3.2. Результати непрямого імуноферментного аналізу, виконаного з метою перевірки потенціалу зв'язування антитіла I-5A з молекулами фібриногену і фібрину за різних розведень культурального середовища

Як видно з рисунку 3.2, культуральне середовище гібридами I-5A містило високий титр антитіл, специфічних до фібриногену та фібрину. Отже, моноклональні антитіла, напрацьовані культурою гібридами I-5A, є активними та специфічними.

Гібридомну культуру пересіювали у флакон об'ємом 200 мл та залишили на тиждень у CO₂-інкубаторі для подальшого синтезу антитіл. Після культивування середовище було відібрано та відфільтровано для хроматографічного очищення антитіл. Для захисту протеїнів від протеолізу додавали Контривен (1:5000).

Хроматографічне очищення проводили на Protein G Sepharose об'ємом 5 мл, зрівноважений 0,01 М калій-фосфотним буфером, рН 7,0. Сорбцію культурального середовища проводили зі швидкістю 0,5 мл/хв. Protein G Sepharose промивали буфером для нанесення для видалення незв'язаної

фракції. Елюцію антитіла проводили зі швидкістю 0,5 мл/хв 0,01 М гліциновим буфером, рН 3,0 (рис. 3.3). Нейтралізацію рН в елюаті проводили 0,1 М калій-фосфатним буфером, рН 9 з розрахунку 200 мкл буферу на 1 мл елюату.

Для концентрації та діалізу застосовували прилад для ультрафільтрації з мембраною РМ-10. У результаті отримали 1,7 мг моноклонального антитіла І- 5А.

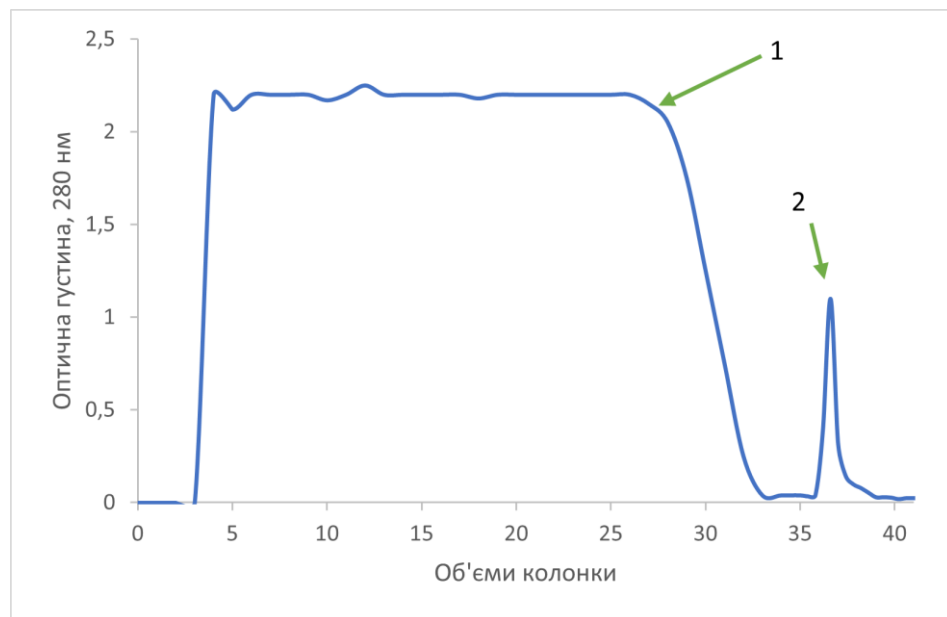


Рис. 3.3. Хроматограма очищення моноклонального антитіла І-5А з культурального середовища гібридоми І-5А на колонці з Protein G Sepharose: 1 – незв'язана фракція, 2 – елюат, який містив цільове антитіло

Наступним кроком було визначення активності та специфічності очищеного антитіла І-5А за допомогою непрямого твердофазного імуноензимного аналізу. У якості антигенів було обрано фібрин, фібриноген D- димер та E-фрагмент. Як видно з рисунку 3.4, отримане моноклональне антитіло І-5А зв'язувалось з фібрином та фібриногеном, що відповідає його паспортній специфічності (Lugovska, 2020).

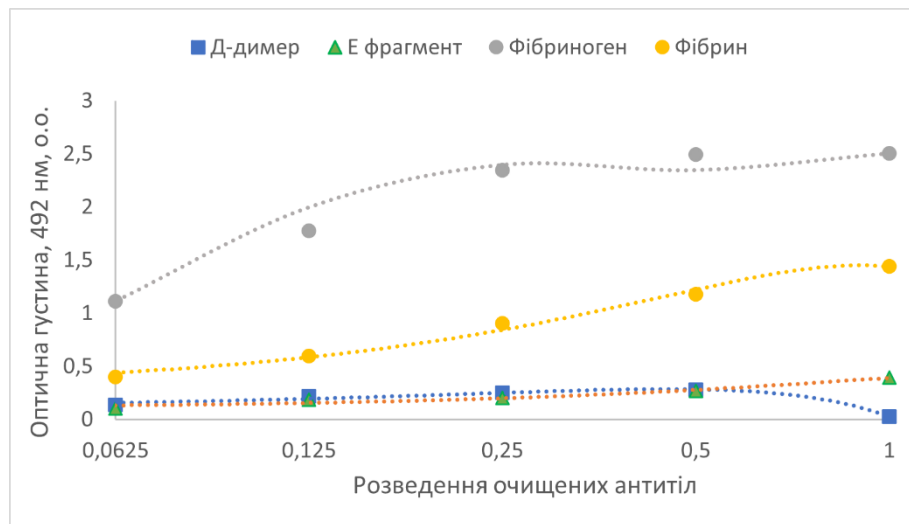


Рис. 3.4. Результати непрямого імуноферментного аналізу, виконаного з метою перевірки потенціалу зв'язування очищених моноклональних антитіл I-5A з молекулами фібриногену, фібрину, E-фрагменту фібриногену та D-димеру за різних розведень вихідного розчину антитіл

За результатами імуноензимного аналізу спостерігали високу специфічність антитіла до фібриногену та меншу специфічність до фібрину. Специфічність до E-фрагменту та D-димеру була очікувано найнижчою, адже моноклональне антитіло I-5A є специфічним до α C-ланцюга фібрин(оген)у, а саме – фрагменту 537-595 (Lugovska, 2020), який відсутній як в E регіоні фібрин(оген)у, так і в D-димері.

Щоб підтвердити епітоп отриманого моноклонального антитіла I-5A, було проведено Вестерн-блот аналіз (рис. 3.5, Б). У якості антигенів було використано фібриноген, desAB фібрин, desAB-desA α 414-610 фібрин та desAB-desB β 15-42 фібрин. Електрофорез проводили в присутності β - меркаптоетанолу, адже за таких умов можливо детектувати, в якому саме ланцюгу молекули фібрин(оген)у розташовано епітоп антитіла. На рисунку 3.5 представлено електрофореграму та відповідну блотограму, на якій видно розташування ланцюгів фібриногену та його похідних.

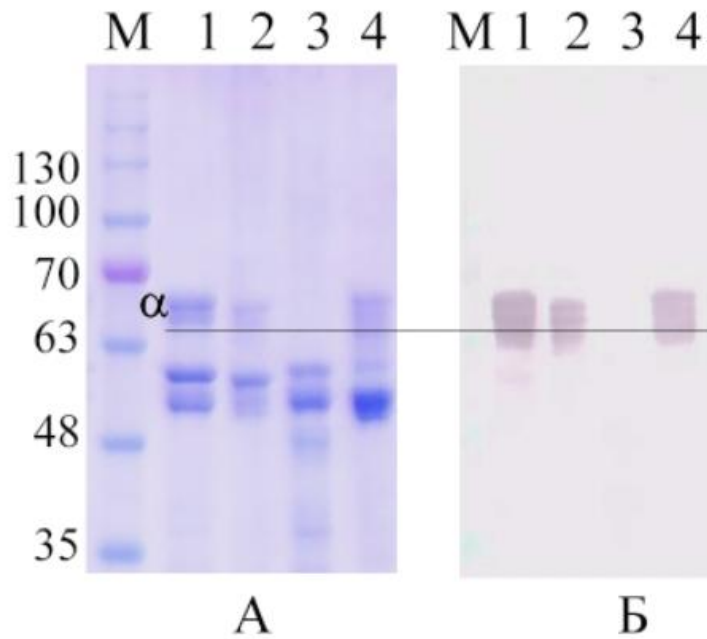


Рис. 3.5. Електрофореграма розділення (А) фібриногену (1), desAB фібрин (2), desAB-desA α 414-610 фібрину (3) та desAB-desB β 15-42 фібрину (4) за присутності β -меркаптоетанолу та блотограма за результатами імунодекції фібриногену моноклональними антитілами I-5A (Б)

Результати вестерн-блот аналізу свідчать, що моноклональне антитіло I-5A є специфічним до A α -ланцюга фібриногену та його похідних. Через відсутність цього A α -ланцюга у desAB-desA α 414-610 фібрині, антитіла не зв'язуються з цим антигеном.

Було отримано та очищено моноклональне антитіло I-5A. Його характеристика показала, що воно є активним та специфічним до фібриногену та фібрину. Було підтверджено, що епітоп отриманого антитіла I-5A знаходиться в A α -ланцюзі фібрину та фібриногену, а саме в межах α C регіону.

3.2. Створення системи для кількісного визначення ранніх форм розчинного фібрину

Тромбін каталізує перетворення фібриногену на фібрин шляхом послідовного відщеплення фібринопептидів А та В, унаслідок чого утворюється фібрин desAB. Окремі молекули фібрину можуть циркулювати в кровотоці у вигляді комплексів із фібриногеном та фібрином. Такий розчинний фібрин є ранньою формою, що утворюється безпосередньо під дією тромбіну. З часом ранні форми розчинного фібрину піддаються фібринолізу, що забезпечує елімінацію продуктів розщеплення фібрину з кровотоку. Плазмін здійснює протеолітичне відщеплення α C-регіонів фібрину з утворенням похідних типу desA-des α C.

Використання бісайтового імуноензимного аналізу із застосуванням антитіла, специфічного до фібрину, та антитіла, специфічного до α C-регіону, дозволяє селективно детектувати лише той розчинний фібрин, який не зазнав плазмінового гідролізу, тобто ранні форми розчинного фібрину.

Попередньо в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України було створено тест-систему для кількісного визначення розчинного фібрину з використанням моноклонального антитіла I-3C, як catch-антитіла, та моноклонального антитіла II-4d, як tag-антитіла. Епітоп антитіла II-4d знаходиться на γ -ланцюгу фібрин(оген)у в межах 86-240 амінокислотних залишків, тож така тест-система виявляє розчинний фібрин, незалежно від наявності у нього α C регіону (рис. 3.б.).

З метою створення тест-системи для визначення концентрації ранніх форм розчинного фібрину у плазмі крові було запропоновано використовувати як catch-антитіло I-3C, отримане на базі Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України (Lugovska, 2020). Епітопом цього моноклонального антитіла є фрагмент 122-134 β -ланцюга фібрину desAB. В якості tag-антитіла для виявлення ранніх форм розчинного фібрину було запропоноване антитіло I-5A. Епітопом цього моноклонального антитіла є фрагмент 509-610 $A\alpha$ -ланцюга

фібрин(оген)у, тож воно дає змогу детектувати розчинний фібрин, що не піддавався плазміновому гідролізу (рис. 3.6).

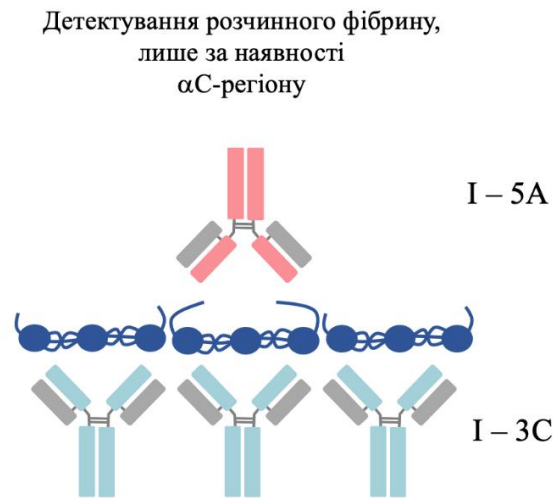


Рис. 3.6. Схема імунодетекції розчинного фібрину з використанням моноклональних антитіл I-5A

Оскільки антитіло I-5A було запропоновано використовувати як tag-антитіло, то його було біотинільовано. Для цієї процедури використовували N-гідроксисукцинімідне похідне біотину, яке розводили у диметилсульфоксиді за концентрації 1 мг/мл. Антитіло I-5A змішували з розчином похідного біотину у співвідношенні 8:1. Після інкубації та діалізу було отримано розчин вторинних антитіл концентрацією 0,57 мг/мл.

На першому етапі було підібрано концентрацію catch- та tag-антитіл. Для цього на мікропланшет для імуноензимного аналізу було адсорбовано антитіло I-3C в концентрації 2 мкг/мл, 4 мкг/мл та 6 мкг/мл. Після іммобілізації catch-антитіл до лунок було додано розчин калібратора (фібрин desAB), в різних концентраціях для побудови калібрувальної кривої, та плазму крові донорів (концентрація розчинного фібрину в нормі не повинна перевищувати 3 мкг/мл).

Після сорбції розчинного фібрину вносили tag-антитіло I-5A в концентрації 2 мкг/мл (для лунок з концентрацією I-3C 2, 4 та 6 мкг/мл), або

4 мкг/мл (для лунок з концентрацією I-3С 4 та 6 мкг/мл), або 6 мкг/мл (для лунок з концентрацією I-3С 6 мкг/мл).

На рисунку 3.7 представлені калібрувальні криві для визначення концентрації раннього розчинного фібрину з використанням зазначених комбінацій концентрацій catch- та tag-антитіл. В усіх представлених випадках калібрувальні криві мали високу достовірність апроксимації ($R^2 > 0,98$). Однак придатним для детекції референтних значень розчинного фібрину були наступні умови: 6 мкг/мл I-3С та 6 мкг/мл I-5А.

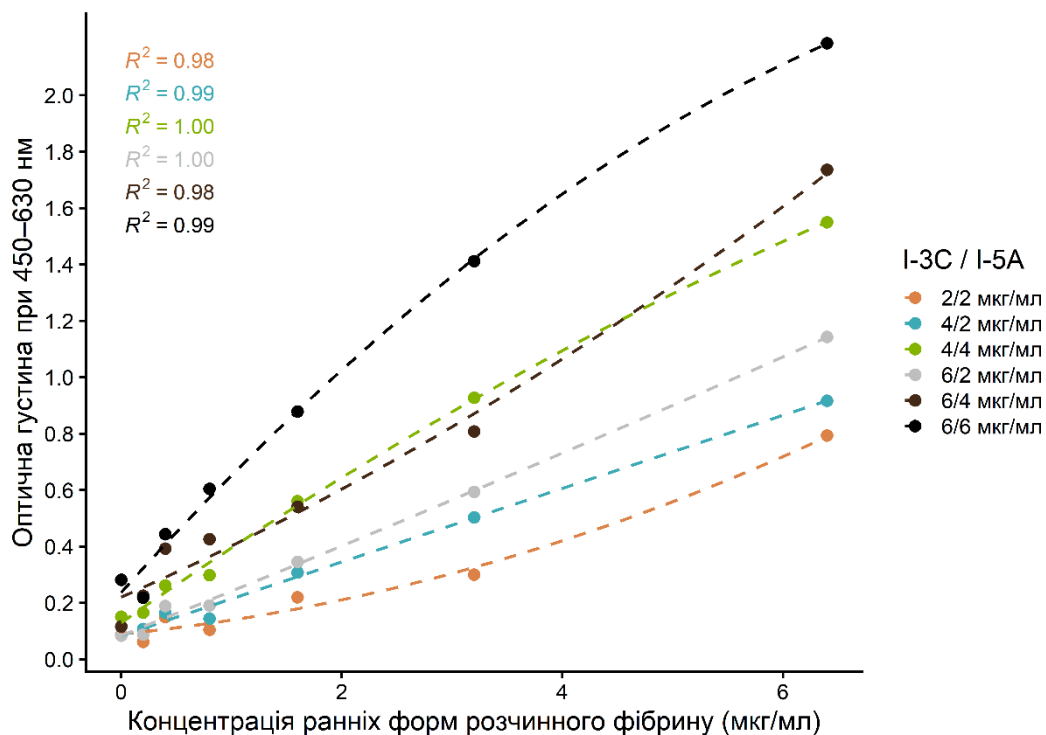


Рис. 3.7. Калібрувальні криві для визначення концентрації ранніх форм розчинного фібрину за різної концентрації антитіл I-5А та I-3С

Встановлено, що оптимальними умовами проведення аналізу є використання моноклональних антитіл I-3С та I-5А у концентрації 6 мкг/мл, що забезпечує високу лінійність калібрувальної кривої ($R^2 > 0,98$) та чутливість методу в діапазоні референтних значень розчинного фібрину, що дозволяє застосовувати її для аналізу клінічних зразків.

3.3. Апробація розробленого методу кількісного визначення ранніх форм розчинного фібрину

Військові дії супроводжуються цілим спектром травм, пов'язаних з порушенням функціонування системи гемостазу. Більшість з них пов'язано з масивними кровотечами, і пацієнти отримують відповідне лікування. В той же час, акубаротравма та опіки безпосередньо не асоційовані з системою гемостазу, тому лікарі не приділяють належної уваги діагностиці її стану при цих ураженнях. Нами було проаналізовано стан системи гемостазу пацієнтів з акубаротравмою та опіковою травмою і проведено апробацію розробленого методу кількісного визначення ранніх форм розчинного фібрину в плазмі крові цих пацієнтів.

3.3.1. Характеристика стану системи гемостазу пацієнтів з акубаротравмою

В дослідження було включено 22 зразки плазми крові пацієнтів віком 25- 56 років з акубаротравмою, з дефектом звукопровідного апарату, сенсоневральною або кондуктивною приглухуватістю. Пацієнти були госпіталізовані в ДУ "Інститут отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка НАМН України" протягом 2 місяців після отримання акубаротравми.

Перш за все, було охарактеризовано стан системи гемостазу пацієнтів з акубаротравмою за такими параметрами, як концентрація фібриногену та D- димеру, протромбіновий індекс (ПІ), вміст протеїну С (табл. 3.1). Слід зазначити, що у третини пацієнтів концентрація фібриногену зростала до 4 мг/мл і більше, а вміст протеїну С був нижчий за 85%. В той же час, достовірне підвищення концентрації D-димеру вказує на наявність у кровотоці згустків, які зазнали розщеплення фібринолітичною системою.

Таблиця 3.1

Характеристика системи гемостазу пацієнтів з акубаротравмою
Me (min-max)

Параметри	Фібриноген, мг/мл	ПІ, %	Концентрація D-димеру, нг/мл	Вміст протеїну С, %
Пацієнти з акубаро- травмою (n=22)	2,8 (1,8-4,7)	109 (68-113)	150 (34-771)*	96 (60-111)
Референтна група (РГ) (n=11)	2,5 (2,3 – 3,0)	100 (90 – 110)	80 (59 – 110)	100 (90 – 110)

* $p < 0,05$ порівняно з РГ за критерієм Вілкоксона-Манна-Уїтні

На наступному етапі досліджень визначали концентрацію розчинного фібрину та ранніх форм розчинного фібрину в плазмі крові цих пацієнтів. Як видно з рисунку 3.8, вміст ранніх форм розчинного фібрину був підвищений порівняно з контрольною групою. Дані аналізу рівня розчинного фібрину та ранніх форм розчинного фібрину показали, що 27,8% від загальної кількості розчинного фібрину становлять його ранні форми. Таке відсоткове співвідношення свідчить про тривалу активацію коагуляційного каскаду за участю тромбіну.

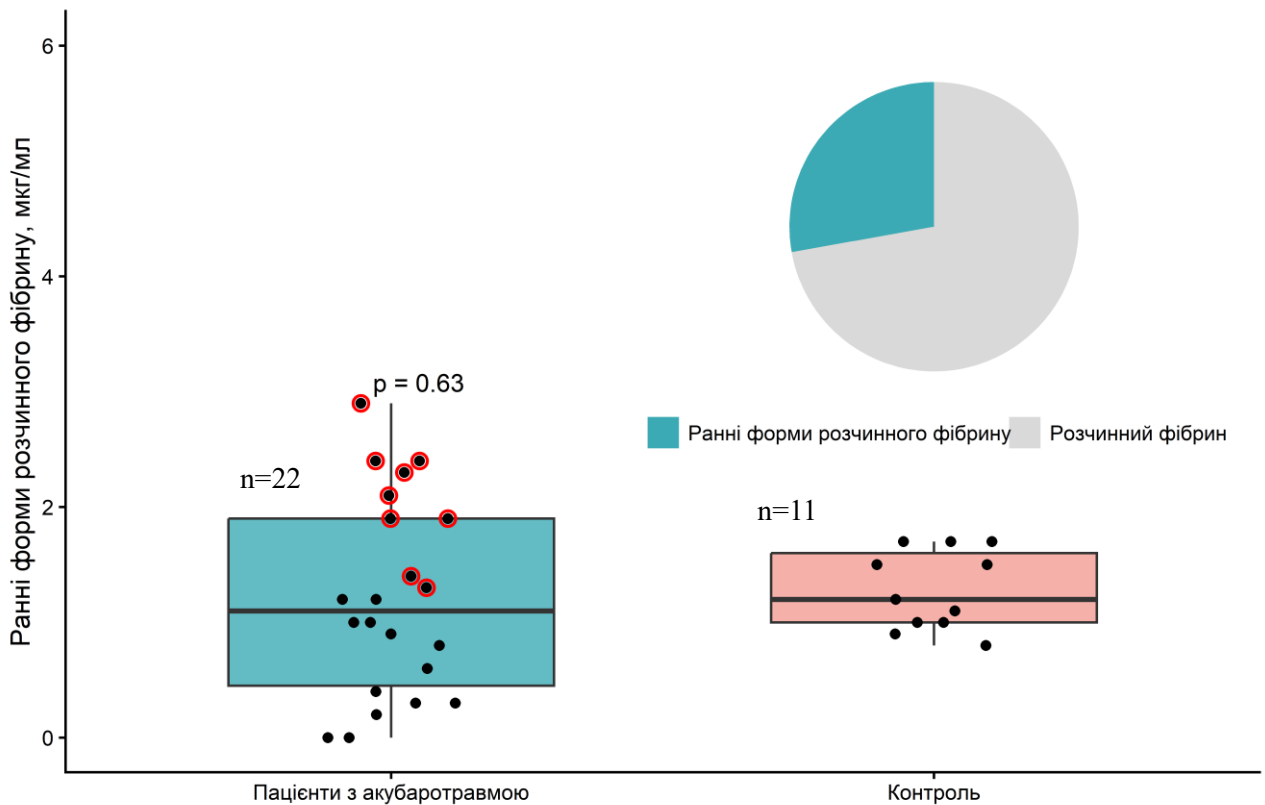


Рис. 3.8. Концентрація ранніх форм розчинного фібрину та їх внесок в загальний пул розчинного фібрину в плазмі крові пацієнтів з акубаротравмою. Дані представлені у вигляді медіани (лінія в середині боксу) та міжквартильного інтервалу (межі боксу); вертикальні лінії відображають діапазон значень без викидів. Кожна точка відповідає окремому зразку. Червоним позначені пацієнти, у яких концентрація ранніх форм розчинного фібрину перевищує медіану контрольної групи

3.3.2. Характеристика стану системи гемостазу пацієнтів з опіковою травмою

Всього в дослідження було включено 14 зразків плазми крові пацієнтів віком 25-66 років з опіковою травмою II-III ступеня, площею опіку до 20%. Хворі перебували на лікуванні в КНП "Київська міська клінічна лікарня №2". Плазму крові пацієнтів відбирали протягом п'яти днів після госпіталізації.

На першому етапі було охарактеризовано загальний стан системи гемостазу цих пацієнтів. З табл. 3.2. видно, що концентрація фібриногену достовірно зростала в плазмі крові пацієнтів з опіковою травмою. Фібриноген є білком гострої фази запалення, тому зростання його концентрації в плазмі крові цих пацієнтів відображає запальну відповідь організму. Водночас, при активації системи зсідання крові, висока концентрація фібриногену може бути фактором ризику виникнення тромбозів, оскільки це збільшує прокоагулянтний потенціал системи гемостазу. В той же час, достовірне зростання концентрації D-димеру підтверджує наявність внутрішньосудинного тромбоутворення, оскільки D-димер є продуктом розщеплення фібринових згустків.

Таблиця 3.2

Характеристика системи гемостазу пацієнтів з опіковою травмою
Me (min-max)

Параметри	Фібриноген, мг/мл	ПІ, %	Концентрація D- димеру, нг/мл	Вміст протеїну С, %
Пацієнти з опіковою травмою (n=14)	4,7 (3,5 – 6)*	75 (63-117)*	583 (88 – 4000)*	90 (48 – 130)
Референтна група (РГ) (n=11)	2,5 (2,3 – 3,0)	100 (90 – 110)	80 (59 – 110)	100 (90 – 110)

* $p < 0,05$ порівняно з РГ за критерієм Вілкоксона-Манна-Уїтні

Слід зазначити, що ПІ у цих пацієнтів був зниженим, тобто загальний час зсідання плазми крові був уповільнений. Однак, суттєвого споживання протеїну С не спостерігалось, хоча в окремих пацієнтів вміст протеїну С був

знижений вдвічі. Це може свідчити про дисбаланс між про- та антикоагулянтною ланками системи гемостазу і про необхідність проведення відповідної терапії.

На наступному етапі було визначено концентрацію розчинного фібрину та ранніх форм розчинного фібрину в плазмі крові пацієнтів з опіками. Як видно з рисунку 3.9, концентрація ранніх форм розчинного фібрину становить незначну частку загальної концентрації розчинного фібрину. Це може свідчити про відносно ефективну роботу системи фібринолізу та узгоджується з появою D-димеру в плазмі крові цих пацієнтів як результату роботи фібринолітичної системи.

Таким чином, було проаналізовано стан системи гемостазу пацієнтів з акубаротравмою та опіковою травмою. В обох групах пацієнтів спостерігали підвищення концентрації D-димеру, як маркера розщеплення внутрішньосудинних тромбів.

В той же час, пацієнти з опіками мали ознаки протромботичного стану, зокрема підвищення концентрації розчинного фібрину на фоні запального процесу. Ми припускаємо, що це пов'язано з малим терміном після травмування. У пацієнтів з акубаротравмою виявлено віддалені наслідки травми, а саме накопичення розчинного фібрину, який є маркером активації системи зсідання крові.

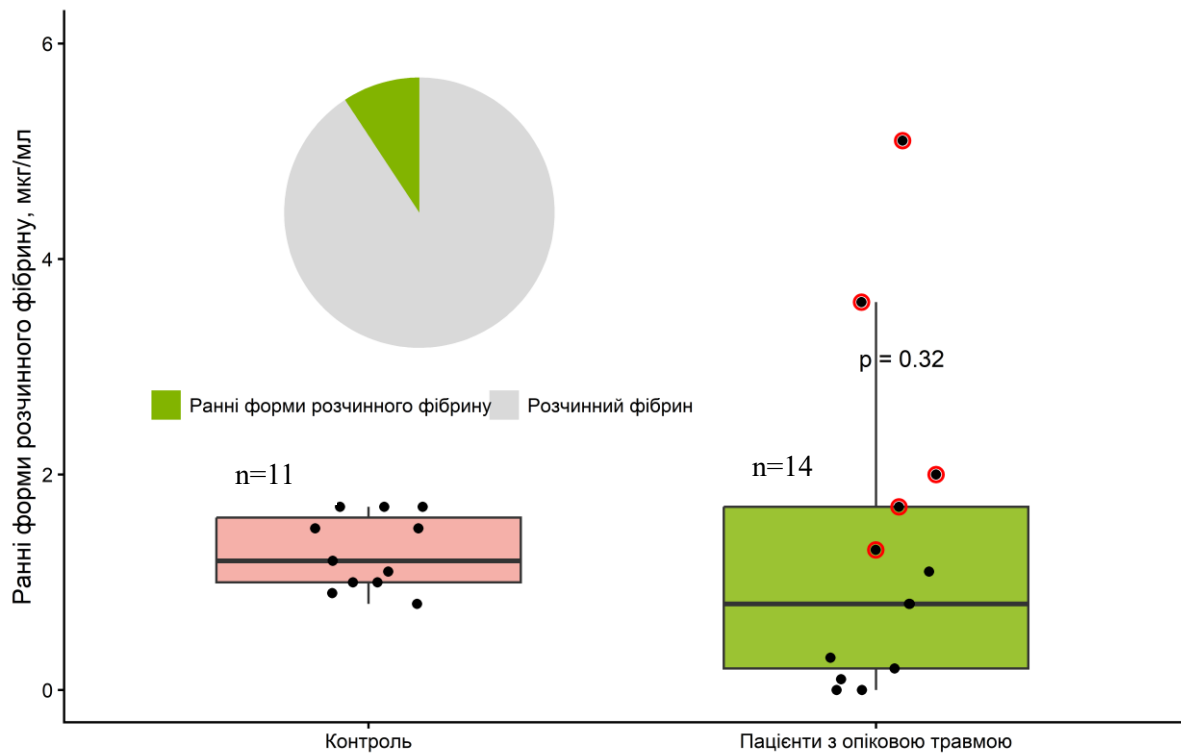


Рис. 3.9. Концентрація ранніх форм розчинного фібрину та їх внесок в загальний пул розчинного фібрину в плазмі пацієнтів з опіковою травмою. Дані представлені у вигляді медіани (лінія в середині боксу) та міжквартильного інтервалу (межі боксу); вертикальні лінії відображають діапазон значень без викидів. Кожна точка відповідає окремому зразку. Червоним позначені пацієнти, у яких концентрація ранніх форм розчинного фібрину перевищує медіану контрольної групи

3.4. Характеристика стану системи гемостазу пацієнтів з посттравматичним стресовим розладом

Нами було проаналізовано стан системи гемостазу пацієнтів із посттравматичним стресовим розладом (ПТСР), плазму крові яких було надано Тернопільським національним медичним університетом імені І.Я. Горбачевського. У дослідження було включено 36 пацієнтів, яких розподілили на три групи залежно від ступеня тяжкості ПТСР: легкий ($n = 15$), середній ($n = 15$) та тяжкий ($n = 6$).

Критеріями виключення були епілепсія, тяжка черепно-мозкова травма, серйозні соматичні ушкодження та тяжка акустична травма.

На першому етапі було охарактеризовано загальний стан системи гемостазу цих пацієнтів. З табл. 3.3. видно, що у пацієнтів із ПТСР відзначено тенденцію до підвищення концентрації фібриногену. У окремих випадках його рівень майже вдвічі перевищував контрольні значення, що може бути пов'язано з розвитком запальної відповіді; водночас залежності цього показника від ступеня тяжкості ПТСР встановлено не було.

Також у пацієнтів виявлено зниження рівня протеїну С при тяжкому перебігу ПТСР, що може вказувати на активацію коагуляційного каскаду та часткове виснаження факторів згортання крові.

Таблиця 3.3

Характеристика системи гемостазу пацієнтів з посттравматичним стресовим розладом
Me (min-max)

Параметри		Фібриноген, мг/мл	ПІ, %	Вміст протеїну С, %
Пацієнти з ПТСР	Легкий ступінь (n=15)	4,7 (3,8-5,3)	100 (88-100)	95 (83-108)
	Середній ступінь (n=15)	4,8 (3,8-5,7)	98,5 (91-100)	110 (90-110)
	Тяжкий ступінь (n=11)	4,1 (2,0-5,0)	100 (100-109)	75 (60-100)
Референтна група (РГ)		2,5 (2,3 – 3,0)	100 (90 – 110)	100 (90 – 110)

Результати застосування розробленої тест-системи для визначення рівня раних форм розчинного фібрину показали, що його концентрація є вищою у пацієнтів із легким ступенями ПТСП (рис. 3.10).

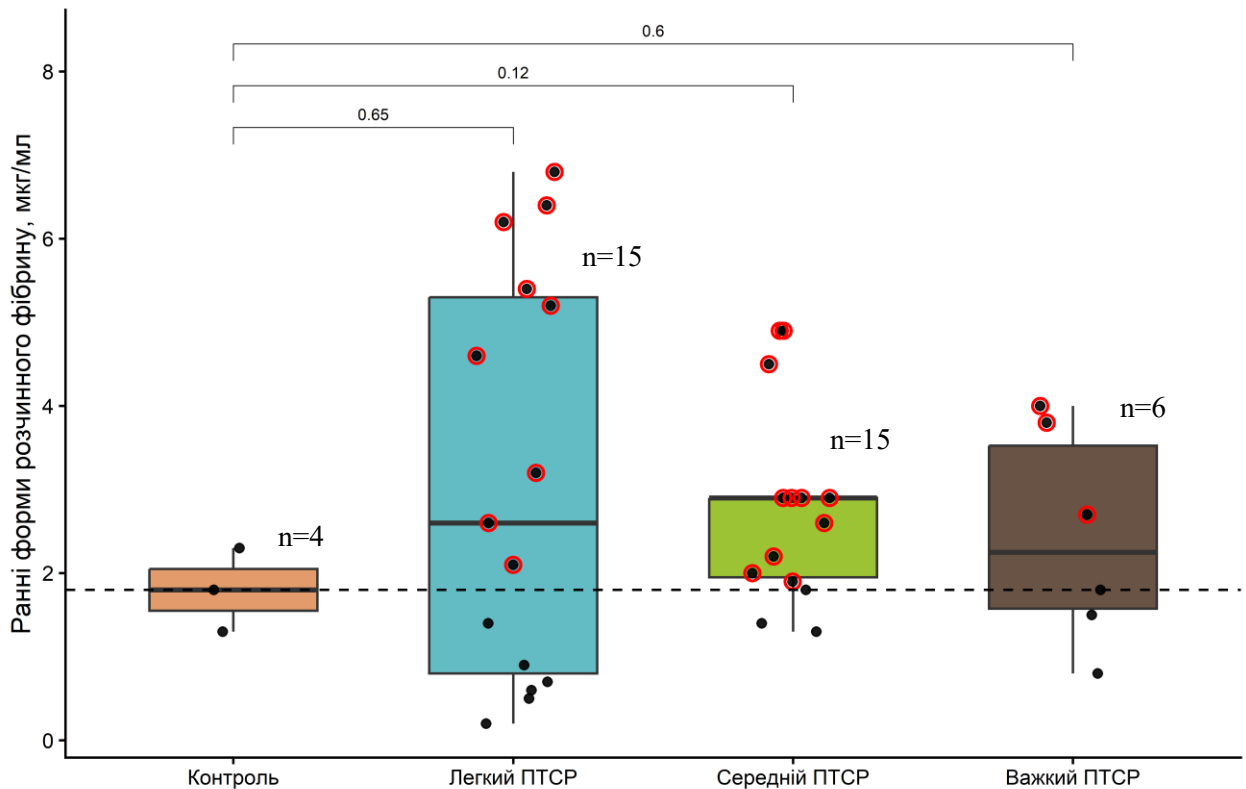


Рис. 3.10. Концентрація раних форм розчинного фібрину в плазмі крові пацієнтів з ПТСП різного ступеня тяжкості. Дані представлені у вигляді медіани (лінія в середині боксу) та міжквартильного інтервалу (межі боксу); вертикальні лінії відображають діапазон значень без викидів. Кожна точка відповідає окремому зразку. Червоним позначені пацієнти, у яких концентрація раних форм розчинного фібрину перевищує медіану контрольної групи

Важливою ознакою підвищеного прокоагулянтного потенціалу є також зростання рівня D-димеру у пацієнтів усіх досліджуваних груп, що свідчить про наявність у кровотоці фібринових утворень або мікротромбів, які піддаються фібринолітичному розщепленню. Встановлено, що у пацієнтів із

середнім та тяжким перебігом ПТСР рівень D-димеру є достовірно вищим порівняно з особами з легким ступенем розладу (рис. 3.11).

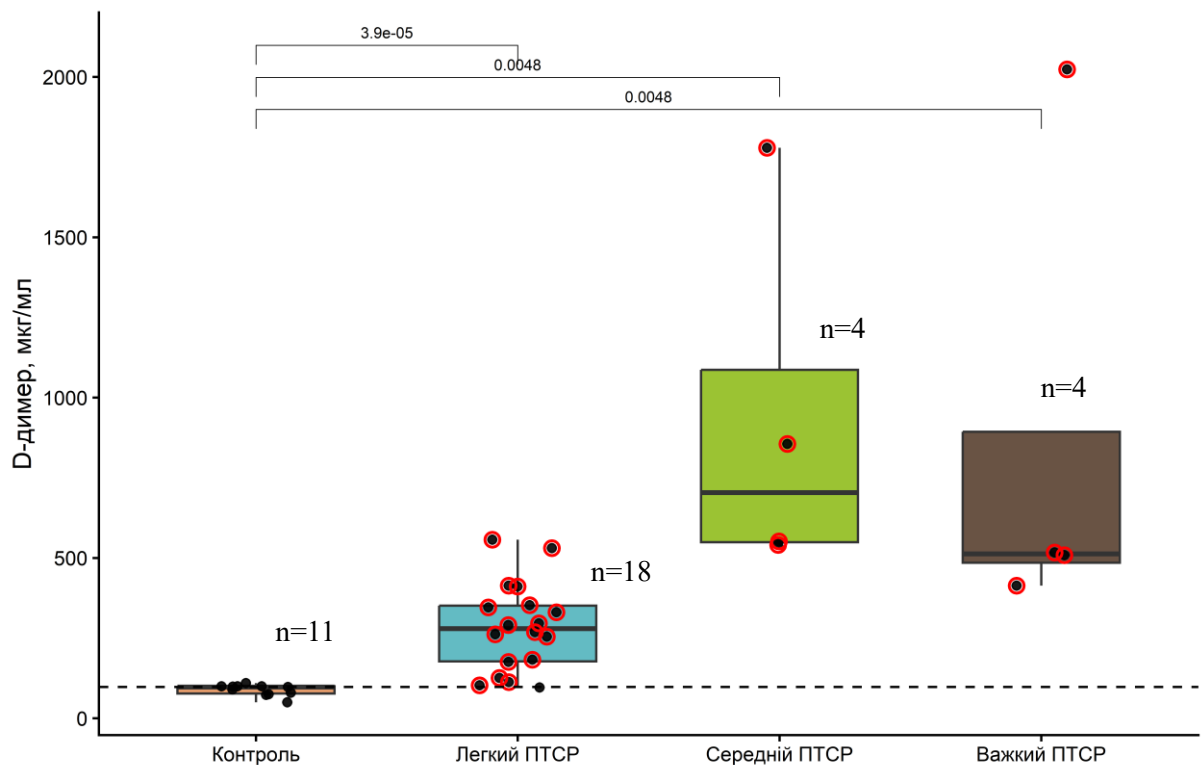


Рис. 3.11. Концентрація D-димеру в плазмі крові пацієнтів з посттравматичним стресовим розладом різного ступеня тяжкості. Червоним позначені пацієнти, у яких концентрація ранніх форм розчинного фібрину перевищує медіану контрольної групи. Дані представлені у вигляді медіани (лінія в середині боксу) та міжквартильного інтервалу (межі боксу); вертикальні лінії відображають діапазон значень без викидів. Кожна точка відповідає окремому зразку. Червоним позначені пацієнти, у яких концентрація ранніх форм розчинного фібрину перевищує медіану контрольної групи

Цікаво, що саме у пацієнтів з легким ступенем ПТСР концентрація D-димеру в плазмі крові зростала помірно, на тлі підвищення концентрації ранніх форм розчинного фібрину. В той час як в групах пацієнтів з середнім і тяжким ступенем ПТСР стрімке підвищення концентрації D-димеру

супроводжувалось помірною появою ранніх форм розчинного фібрину. На основі цих даних, ми припускаємо, що у пацієнтів з легким ступенем ПТСР наявна активація каскаду зсідання, що не призводить до генералізованого формування фібринових депозитів. Натомість при середньому та важкому ступені ПТСР активація зсідання призводить формування фібринових депозитів та активації фібринолізу. Наслідком роботи фібринолітичної системи є з одного боку утворення D-димеру, а з іншого низький рівень ранніх форм розчинного фібрину, тобто відщеплення α C-регіонів від молекул фібрину, що циркулюють в кровотоці. Антикоагуляційна ланка (зокрема протеїн С) при цьому виснажується (табл. 3.3) і не може компенсувати прокоагулянтні процеси.

Отже, отримані дані свідчать про наявність комплексних порушень у системі гемостазу при ПТСР, що характеризуються активацією коагуляційних процесів, посиленням фібринолізу та зниженням активності антикоагулянтної системи. Сукупність цих змін може створювати передумови для розвитку внутрішньосудинного тромбоутворення та пов'язаних із ним ускладнень.

ВИСНОВКИ

У ході виконання дипломної роботи було досліджено функціональний стан системи гемостазу за умов посттравматичного стресового розладу, акубаротравми, опікової травми та обґрунтовано доцільність використання ранніх форм розчинного фібрину як раннього маркера протромботичного стану.

1. Було отримано моноклональне антитіло I-5A та показано, що воно є активним та специфічним до α C- регіону молекули фібрин(оген)у .
2. Було оптимізовано умови імуноензимного аналізу для кількісного визначення ранніх форм розчинного фібрину у плазмі крові з використанням моноклональних антитіл I-5A та I-3C у концентрації 6 мкг/мл для обох.
3. Визначено ранні форми розчинного фібрину у плазмі крові пацієнтів з акубаротравмою та опіковою травмою.
4. Показано, що у пацієнтів з посттравматичним стресовим розладом незалежно від тяжкості захворювання порушується робота системи гемостазу і показано тенденцію до підвищення рівня ранніх форм розчинного фібрину у пацієнтів з ПТСР на фоні зростання концентрації D-димеру.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Горбаченко, В.А., Олянін, В.В. та Лук'янець, О.О. (2024). Фізіологічні механізми стресу та посттравматичний стресовий розлад. *Фізіологічний журнал*, 70(6), с. 98.
2. Заїчко, Н.В., Чернишенко, Т.М., Платонова, Т.М. та Волков, Г.Л. (2006). Вплив розчинного фібрину на процеси зсідання крові та агрегації тромбоцитів. *Український біохімічний журнал*, 78(3), сс. 118-123.
3. Комісаренко, С.В., Корда, М.М., Гула, Н.М., Тихомиров, А.О., Косякова, Г.В., Шевчук, О.О., Венгер, О.П., Люта, О.О., Данилков, Р.С., Корольова, Д.С. та Чернишенко, В.О. (2025). *Біохімічні маркери ПТСР: методичні рекомендації*. Київ: Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України.
4. Чернишенко, В.О. (2019). Механізми екстрасудинного та внутрішньосудинного тромбоутворення: фундаментальні дослідження для потреб клінічної практики. В: *Засідання Президії НАН України*. Київ, Україна, 27 лютого 2019, сс. 50-56.
5. Чернишенко, В.О., Максимович, Я.С., Корольова, Д.С., Платонова, Т.М. та Остапченко, Л.І. (2010). Зміни у плазмовому та тромбоцитарному гемостазі при гострій виразковій хворобі шлунка. *Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія*, 1, сс. 79-85.
6. Al Nakhebi, O.A.S., Albu-Kalinovic, R., Neda-Stepan, O., Giurgi-Oncu, C., Crişan, C.A., Enatescu, V.R. and Marinescu, I. (2025). Post-traumatic stress disorder (PTSD) and cardiovascular diseases: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Medicine*, 14(22), p. 7979.
7. Al-Samkari, H., Karp Leaf, R.S., Dzik, W.H., Carlson, J.C.T., Fogerty, A.E., Waheed, A., Goodarzi, K., Bendapudi, P.K., Bornikova, L., Gupta, S., Leaf, D.E., Kuter, D.J. and Rosovsky, R.P. (2020). COVID-19 and coagulation: bleeding and thrombotic manifestations of SARS-CoV-2 infection. *Blood*, 136(4), pp. 489-500.
8. Blombäck, B., Hessel, B., Hogg, D. and Therkildsen, L. (1978). A two-step fibrinogen-fibrin transition in blood coagulation. *Nature*, 275(5680), pp. 501-505.

9. Brennan, S.O., Davis, R.L., Mosesson, M.W., Hernandez, I., Lowen, R. and Alexander, S.J. (2007). Congenital hypodysfibrinogenaemia (fibrinogen Des Moines) due to a gamma320Asp deletion at the Ca²⁺ binding site. *Thrombosis and Haemostasis*, 98(2), pp. 467-469.
10. Buitrago, L., Lefkowitz, S., Bentur, O., Padovan, J. and Collier, B. (2021). Platelet binding to polymerizing fibrin is avidity driven and requires activated α IIb β 3 but not fibrin cross-linking. *Blood Advances*, 5(20), pp. 3986-4002.
11. Chernyshenko, V., Shteinberg, K., Lugovska, N., Ryzhykova, M., Platonova, T., Korolova, D. and Lugovskoy, E. (2019). Preparation of highly-concentrated autologous platelet-rich plasma for biomedical use. *Ukrainian Biochemical Journal*, 91(2), pp. 19-27.
12. Cilia La Corte, A.L., Philippou, H. and Ariëns, R.A.S. (2011). Role of fibrin structure in thrombosis and vascular disease. In: R. Donev, ed. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*. Oxford: Academic Press. Ch. 3, pp. 75-127.
13. Coughlin, S.S. (2011). Post-traumatic stress disorder and cardiovascular disease. *The Open Cardiovascular Medicine Journal*, 5, pp. 164-170.
14. Dempfle, C.E. (1999). The use of soluble fibrin in evaluating the acute and chronic hypercoagulable state. *Thrombosis and Haemostasis*, 82(2), pp. 673-683.
15. Eshel, Y., Kimhi, S., Marciano, H. and Adini, B. (2023). Predictors of PTSD and psychological distress symptoms of Ukraine civilians during war. *Disaster Medicine and Public Health Preparedness*, [online] 17, p. e429. Available at: <https://doi.org/10.1017/dmp.2023.69> (Accessed 20 Feb. 2026).
16. Evans, E., Courtois, G.M., Kilian, P.L., Fuller, G.M. and Crabtree, G.R. (1987). Induction of fibrinogen and a subset of acute phase response genes involves a novel monokine which is mimicked by phorbol esters. *The Journal of Biological Chemistry*, 262(22), pp. 10850-10854.
17. Everse, S.J., Spraggon, G., Veerapandian, L., Riley, M. and Doolittle, R.F. (1998). Crystal structure of fragment double-D from human fibrin with two different bound ligands. *Biochemistry*, 37(24), pp. 8637-8642.

18. Fait, K., Vilchinsky, N., Dekel, R., Levi, N., Hod, H. and Matetzky, S. (2018). Cardiac-disease-induced PTSD and fear of illness progression: capturing the unique nature of disease-related PTSD. *General Hospital Psychiatry*, 53, pp. 131-138.
19. Fel, S., Jurek, K. and Lenart-Kłoś, K. (2022). Relationship between socio-demographic factors and posttraumatic stress disorder: a cross sectional study among civilian participants' hostilities in Ukraine. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(5), p. 2720.
20. Francis, C.W., Alkjaersig, N., Galanakis, D.K., Graeff, H., Owen, J., Gaffney, P. and Marder, V.J. (1987). Terminology for macromolecular plasmic derivatives of crosslinked fibrin. *Thrombosis and Haemostasis*, 57(1), pp. 110-111.
21. Galanakis, D., Nuovo, G., Spitzer, S., Kaplan, C., Scharrer, I. and Goethe-Universität, J.W. (1996). Fibrinogen mRNA and antigen co-present in human trophoblasts in situ: possible implications. *Thrombosis Research*, 81(2), pp. 263-269.
22. Hall, C.E. and Slayter, H.S. (1959). The fibrinogen molecule: its size, shape and mode of polymerization. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 5(1), pp. 11-16.
23. Havermans, D.C.D., Coeur, E.M.N., Jiaqing, O., Rippey, C.S., Cook, J.M., Olf, M., Hoeboer, C., Sobczak, S. and Lawrence, K.A. (2025). The diagnostic accuracy of PTSD assessment instruments used in older adults: a systematic review. *European Journal of Psychotraumatology*, 16(1), p. 2498191.
24. Hogan, K.A., Gorkun, O.V., Lounes, K.C., Coates, A.I., Weisel, J.W., Hantgan, R.R. and Lord, S.T. (2000). Recombinant fibrinogen Vlissingen/Frankfurt IV. The deletion of residues 319 and 320 from the gamma chain of fibrinogen alters calcium binding, fibrin polymerization, cross-linking and platelet aggregation. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(23), pp. 17778-17785.
25. Hudson, N.E. (2017). Biophysical mechanisms mediating fibrin fiber lysis. *BioMed Research International*, [online] 2017, p. 2748340. Available at: <https://doi.org/10.1155/2017/2748340> (Accessed 20 Sep. 2025).

26. Iba, T., Levy, J.H., Levi, M. and Thachil, J. (2020). Coagulopathy in COVID-19. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 18(9), pp. 2103-2109.
27. Innocenti, F., Lazzari, C., Ricci, F., Paolucci, E., Agishev, I. and Pini, R. (2021). D-dimer tests in the emergency department: current insights. *Open Access Emergency Medicine*, 13, pp. 465-479.
28. Johnson, E.D., Schell, J.C. and Rodgers, G.M. (2019). The D-dimer assay. *American Journal of Hematology*, 94(7), pp. 833-839.
29. Kühnast, C. and Neuhäuser, M. (2008). A note on the use of the non-parametric Wilcoxon-Mann-Whitney test in the analysis of medical studies. *GMS German Medical Science*, [online] 6, Doc02. Available at: <https://journals.publisso.de/en/journals/gms/volume6/000047> (Accessed 17 Feb. 2026).
30. Lim, H.Y., Donnan, G., Nandurkar, H. and Ho, P. (2022). Global coagulation assays in hypercoagulable states. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, 54(1), pp. 132-144.
31. Litvinov, R.I., Pieters, M. and de Lange-Loots, Z. (2021). Fibrinogen and fibrin. In: J.R. Harris and J. Marles-Wright, ed. *Macromolecular Protein Complexes III: Structure and Function*. *Subcellular Biochemistry*, vol. 96, pp. 471-501.
32. Lugovskoy, E.V., Gritsenko, P.G., Kapustianenko, L.G., Kolesnikova, I.N., Chernishov, V.I. and Komisarenko, S.V. (2007). Functional role of Bbeta-chain N-terminal fragment in the fibrin polymerization process. *The FEBS Journal*, 274(17), pp. 4540-4549.
33. Lugovska, N.E., Kolesnikova, I.M., Stohnii, Ye.M., Chernyshenko, V.O., Rebriev, A.V., Kostiuchenko, O.P., Gogolinska, G.K., Dziubliuk, N.A., Varbanets, L.D., Platonova, T.M. and Komisarenko, S.V. (2020). Novel monoclonal antibody to fibrin(ogen) α C-region for detection of the earliest forms of soluble fibrin. *Ukrainian Biochemical Journal*, 92(3), pp. 58-70.
34. Mao, S.Y. (2010). Biotinylation of antibodies. In: C. Oliver and M. Jamur, ed. *Immunocytochemical Methods and Protocols*. *Methods in Molecular Biology*. Vol. 588, pp. 49-52.

35. Maity, H., Wei, A., Chen, E., Haidar, J.N., Srivastava, A. and Goldstein, J. (2015). Comparison of predicted extinction coefficients of monoclonal antibodies with experimental values as measured by the Edelhoch method. *International Journal of Biological Macromolecules*, 77, pp. 260-265.
36. Medved, L., Tsurupa, G. and Yakovlev, S. (2001). Conformational changes upon conversion of fibrinogen into fibrin: the mechanisms of exposure of cryptic sites. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 936, pp. 185-204.
37. Medved, L., Weisel, J.W. and International Society on Thrombosis and Haemostasis (2009). Recommendations for nomenclature on fibrinogen and fibrin. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 7(2), pp. 355-359.
38. Mutch, N.J., Koikkalainen, J.S., Fraser, S.R., Duthie, K.M., Griffin, M., Mitchell, J., Watson, H.G. and Booth, N.A. (2010). Model thrombi formed under flow reveal the role of factor XIII-mediated cross-linking in resistance to fibrinolysis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 8(9), pp. 2017-2024.
39. Nossel, H.L. (1976). Radioimmunoassay of fibrinopeptides in relation to intravascular coagulation and thrombosis. *The New England Journal of Medicine*, 295(8), pp. 428-432.
40. Padhi, B.K., Khatib, M.N., Serhan, H.A., Gaidhane, A.M., Rustagi, S., Zahiruddin, Q.S., Sharma, R.K. and Satapathy, P. (2024). Cardiovascular impact of post-traumatic stress disorder: a systematic review and meta-analysis. *Current Problems in Cardiology*, [online] 49(8), p. 102632. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cpcardiol.2024.102632> (Accessed 20 Apr. 2026).
41. PLOS ONE Editors (2022). Retraction: plasma D-dimer predicts short-term poor outcome after acute ischemic stroke. *PLOS ONE*, 17(3), p. e0266437 . Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0266437> (Accessed 20 Jan. 2025).
42. Price, C.P., Fay, M. and Hopstaken, R.M. (2021). Point-of-care testing for D-dimer in the diagnosis of venous thromboembolism in primary care: a narrative review. *Cardiology and Therapy*, 10(1), pp. 27-40.

43. Quinn, J., Panasenکو, S.I., Leshchenko, Y., Gumeniuk, K., Onderková, A., Stewart, D., Gimpelson, A.J., Buriachyk, M., Martinez, M., Parnell, T.A., Brain, L., Sciulli, L. and Holcomb, J.B. (2024). Prehospital lessons from the war in Ukraine: damage control resuscitation and surgery experiences from point of injury to role 2. *Military Medicine*, 189(1-2), pp. 17-29.
44. Raynal, B., Cardinali, B., Grimbergen, J., Profumo, A., Lord, S.T., England, P. and Rocco, M. (2013). Hydrodynamic characterization of recombinant human fibrinogen species. *Thrombosis Research*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2013.04.005> (Accessed 23 Sep. 2024).
45. Refaai, M.A., Riley, P., Mardovina, T. and Bell, P.D. (2018). The clinical significance of fibrin monomers. *Thrombosis and Haemostasis*, 118(11), pp. 1856-1866.
46. Riley, R.S., Gilbert, A.R., Dalton, J.B., Pai, S. and McPherson, R.A. (2016). Widely used types and clinical applications of D-dimer assay. *Laboratory Medicine*, 47(2), pp. 90-102.
47. Seligowski, A.V., Webber, T.K., Marvar, P.J., Ressler, K.J. and Philip, N.S. (2022). Involvement of the brain-heart axis in the link between PTSD and cardiovascular disease. *Depression and Anxiety*, 39(10-11), pp. 663-674.
48. Singh, N., Pati, H.P., Tyagi, S., Upadhyay, A.D. and Saxena, R. (2017). Evaluation of the diagnostic performance of fibrin monomer in comparison to D-dimer in patients with overt and nonovert disseminated intravascular coagulation. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*, 23(5), pp. 460-465.
49. Surma, S. and Banach, M. (2021). Fibrinogen and atherosclerotic cardiovascular diseases: review of the literature and clinical studies. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1), p. 193.
50. Swieringa, F., Spronk, H.M.H., Heemskerk, J.W.M. and van der Meijden, P.E.J. (2018). Integrating platelet and coagulation activation in fibrin clot formation. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis*, 2(3), pp. 450-460.

51. Tasić, N., Paixão, T.R.L.C. and Gonçalves, L.M. (2020). Biosensing of D-dimer, making the transition from the central hospital laboratory to bedside determination. *Talanta*, 207, p. 120270.
52. Udovenko, A., Makogonenko, Y., Korolova, D., Druzhyna, N., Chernyshenko, V. and Komisarenko, S. (2023). Formation and elimination of soluble fibrin and D-dimer in the bloodstream. *Croatian Medical Journal*, 64(6), pp. 421-429.
53. Vidali, S., Morosetti, D., Cossu, E., Luisi, M.L.E., Pancani, S., Semeraro, V. and Consales, G. (2020). D-dimer as an indicator of prognosis in SARS-CoV-2 infection: a systematic review. *ERJ Open Research*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1183/23120541.00260-2020> (Accessed 12 Dec. 2024).
54. Vilar, R., Fish, R.J., Casini, A. and Neerman-Arbez, M. (2020). Fibrin(ogen) in human disease: both friend and foe. *Haematologica*, 105(2), pp. 284-296.
55. Weisel, J.W. and Litvinov, R.I. (2017). Fibrin formation, structure and properties. *Sub-cellular Biochemistry*, 82, pp. 405-456.
56. Weitz, J.I., Fredenburgh, J.C. and Eikelboom, J.W. (2017). A test in context: D-dimer. *Journal of the American College of Cardiology*, 70(19), pp. 2411-2420.
57. Wells, P.S., Ihaddadene, R., Reilly, A. and Forgie, M.A. (2018). Diagnosis of venous thromboembolism: 20 years of progress. *Annals of Internal Medicine*, 168(2), pp. 131-140.
58. Wiersinga, W.J., Rhodes, A., Cheng, A.C., Peacock, S.J. and Prescott, H.C. (2020). Pathophysiology, transmission, diagnosis and treatment of coronavirus disease 2019 (COVID-19): a review. *JAMA*, 324(8), pp. 782-793.