

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики

Доцент, к.б.н, Олексій Юрійович Нипорко

Протокол № ____ засідання кафедри

Від «__» _____ 20__ р.

**ЗАСТОСУВАННЯ МЕТОДУ ВИЗНАЧЕННЯ ЗАГАЛЬНОГО
ГЕМОСТАТИЧНОГО ПОТЕНЦІАЛУ ДЛЯ ХАРАКТЕРИСТИКИ
СТАНУ СИСТЕМИ ГЕМОСТАЗУ В НОРМІ ТА ЗА ДЕЯКИХ
ПАТОЛОГІЙ**

Випускна кваліфікаційна робота магістра

Студентки спеціальності

091 біологія

ОП «Біоінформатика і структурна біологія»

Удовенко Анастасії Вадимівни

Робота виконана у відділі структури
та функції білка Інституту біохімії
ім. О.В. Палладіна НАН України
під керівництвом
д.б.н., проф. **Є.М. Макогоненко**

Науковий керівник від кафедри
Завідувач кафедри
молекулярної біотехнології та
біоінформатики, доцент, к.б.н.,
Нипорко Олексій Юрійович

Оцінка захисту роботи

АНОТАЦІЯ

Дипломна робота: 44 с., 4 табл., 10 рис., 59 посилань.

Дипломна робота присвячена застосуванню методу визначення загального гемостатичного потенціалу плазми крові людини для оцінки стану системи гемостазу в плазмі крові людини в нормі та за деяких патологій, пов'язаних з порушенням системи гемостазу. Дослідження проводили в плазмі крові донорів та пацієнтів, хворих на стеноз аорти, стенокардію та Covid 19. Зразки плазми крові аналізували за допомогою турбідиметричних кривих, що описують процес формування і гідролізу фібринового згустку, ініційованого АЧТЧ-реагентом за параметрами гемостатичного потенціалу (ЗП – потенціал зсідання, ЗГП – загальний гемостатичний потенціал, ФП – фібринолітичний потенціал) та окремих ділянок турбідиметричної кривої (τ – лаг-період, Н – максимальна мутність згустку, L – час напів-лізису згустку). Також визначали концентрації молекулярних маркерів – фібриногену, розчинного фібрину, D-димеру в плазмі крові. Було показано обома підходами підвищену активність системи гемостазу у перехворівших на Covid-19 пацієнтів. Розроблено метод визначення концентрації тромбіну в плазмі крові на основі параметра t турбідиметричної кривої, що дозволяє кількісно охарактеризувати процес активації системи згортання. Запропоновано схему зв'язку молекулярних механізмів, які реалізуються на різних стадіях турбідиметричних кривих, що описують процес згортання плазми крові людини. Розроблено метод визначення параметрів турбідиметричних кривих, які мають колоколоподібну форму, і можуть бути охарактеризовані кінетичними параметрами швидкісних циклічних процесів, що лежать в основі скорочення-розслаблення гладеньких м'язів. Встановлено, що концентрація розчинного фібрину має слабкий рівень кореляційного зв'язку з такою D димеру і не є прямим попередником останнього.

Ключові слова: система гемостазу, згортання крові, фібриноліз, загальний гемостатичний потенціал, фібрин, D-димер, фібриноген.

ABSTRACT

Diploma work: 44 pages, 4 tables, 10 fig., 59 references

Diploma work is devoted to the using of the hemostasis potential method for the human blood plasma state estimation of the hemostasis system in the norm and some pathologies associated with a violation of the hemostasis system. The studies were performed in the blood plasma of donors and patients with aortic stenosis, angina and had Covid 19. Blood plasma samples were analyzed using turbidimetric curves describing the process of formation and hydrolysis of plasma clot initiated by APTT reagent after the parameters of hemostatic potential (CP – coagulation potential, OHP - overall hemostasis potential, FP – fibrinolytic potential) and individual sections of the turbidimetric curve (τ – lag period, H - maximum turbidity of the clot, L - half-lysis time of the clot). Concentrations of molecular markers - fibrinogen, soluble fibrin, D-dimer in blood plasma were also determined. Both approaches showed increased activity of the coagulation system in 19 patients who had Covid 19. It was found that the concentration of soluble fibrin has a weak level of correlation with such D dimer and is not a direct precursor of the latter. A method for determination the concentration of thrombin in blood plasma based on the parameter τ of the turbidimetric curve has been developed, which allows to quantitatively characterize the process of activation of the coagulation system. It was proposed the scheme of molecular mechanisms describing process of coagulation and hydrolysis of human blood plasma clot at various stages of turbidimetric curves. A method for determining the parameters of turbidimetric curves, which have a bell-like shape and can be characterized by the kinetic parameters of the velocity cyclic processes underlying the contraction and relaxation of smooth muscles, has been developed.

Key words: hemostasis system, blood coagulation, fibrinolysis, total hemostatic potential, fibrin, D-dimer, fibrinogen.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

TF – тканинний фактор

Fg – фібриноген

t-PA – тканинний активатор плазміногену

FpA – фібринопептид А

FpB – фібринопептид В

fdesA – фібрин, з відщепленими обома FpA

fdesAB – фібрин, з відщепленим FpB

Sf – розчинний фібрин

PAI-1 – інгібітор активатора плазміногену І типу

Glu-Pg – глу-плазміноген

α 2AP – α 2-антиплазмін

TPS – трис-фосфатний буфер

HEPES – 4-(2-гідроксиетил)-1-піперазинетансульфоновою кислота

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ	2
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	4
ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1. Огляд літератури	8
1.1 Система гемостазу людини	10
1.2 Система зсідання крові.....	10
1.3 Фібринолітична система.....	12
1.4. Дослідження стану системи гемостазу	14
РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи досліджень.....	18
2.1 Матеріали	18
2.2 Методи.....	18
2.2.1 Отримання плазми з крові донорів.....	18
2.2.2 Визначення загального гемостатичного потенціалу плазми крові людини	19
2.2.3 Рекальцифікація плазми	20
2.2.4 Імуноферментний аналіз	20
2.2.5 Визначення фібриногену в плазмі крові.....	21
РОЗДІЛ 3. Результати досліджень та їхнє обговорення	22
3.1. Характеристика молекулярних взаємодій кривої утворення і руйнування згустку плазми крові.....	22
3.2 Визначення величини гемостатичного потенціалу та концентрації молекулярних маркерів стану системи гемостазу в плазмі крові пацієнтів, що перехворіли на Covid-19.....	25
3.3 Побудова калібровочної кривої для тромбіну.....	28
3.4 Метод для розрахунку параметрів гемостатичного потенціалу.....	32
ВИСНОВКИ	37
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ	388

ВСТУП

Сучасна медична діагностика має технічні, технологічні і біотехнологічні можливості найбільш детально охарактеризувати стан системи гемостазу людини, виявивши всі відхилення в його організмі починаючи з порушень в геномі і закінчуючи повною характеристикою кожного компоненту системи гемостазу, і дати рекомендації відносно деталей необхідного лікування. Не торкаючись фінансових, організаційних та етичних аспектів таких можливостей, цей підхід, як і ідея 4P медицини, поки що є питанням, можливо недалекого, але майбутнього. Сучасна медична практика потребує методів, які б достатньо швидко, надійно і повно давали б оцінку стану системи гемостазу хворих. Одним із таких методів є метод Лі і Уайта [53]. Це найпростіша модель оцінки стану системи гемостазу хворого. Її простота і наглядність, можливість візуально оцінити процес зсідання крові відносять цю модель до класу так званих visual assay, які дослівно дають можливість спостерігати процес аналізу в реальному часі.

Використаний нами як основа для модифікації метод гемостатичного потенціалу M. Blomback [58] ґрунтується на турбідиметричній кривій утворення і гідролізу згустку плазми крові, ініціацію якого викликає АЧТЧ реагент. Привабливість цього методу полягає в простоті, візуальності і аналізі стану системи гемостазу в реальному часі. Існує багато модифікацій цього методу. Переваги методу в тому, що він дає числову інформацію про здатність плазми крові окремого хворого утворювати (гемостатичний потенціал), гідролізувати (фібринолітичний потенціал) та підтримувати гемостатичний баланс (загальний гемостатичний баланс) між ними; вказує на порушення зсідання плазми крові в каскаді внутрішнього шляху для подальшого виявлення фактору зсідання, що викликає це порушення.

Метою роботи було визначити стан системи гемостазу у хворих, що перенесли захворювання на Covid 19, з застосуванням методу гемостатичного потенціалу та визначити концентрації молекулярних маркерів у плазмі крові хворих за допомогою імунохімічних тест систем, розроблених в Інституті біохімії НАН України.

Відповідно до мети були поставлені завдання:

- 1) Визначити величини параметрів гемостатичного потенціалу та параметрів турбідиметричних кривих формування та гідролізу згустків плазми крові хворих на Covid 19;
- 2) Оцінити наявність зв'язку між параметрами гемостатичного потенціалу та концентраціями молекулярних маркерів в плазмі крові хворих;
- 3) Розробити метод визначенні концентрації тромбіну в плазмі крові пацієнтів з захворюваннями на стеноз та стенокардію;
- 4) Розробити метод розрахунку величин параметрів, що отримуються за методом визначення гемостатичного потенціалу, з використанням моделі мультипараметричного аналізу механокінетики скорочення гладенького м'язу в ізометричних умовах.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Система гемостазу людини

Система гемостазу людини – одна з основних систем організму, що з одного боку сприяє збереженню крові у рідкому стані, а з іншого забезпечує захист від кровотечі. Пошкодження судини і порушення цілісності ендотелію викликає комплексну гемостатичну реакцію – утворення тромбу у місці ураження і після закриття пошкодження повернення до стану спокою [1]. Внаслідок активації системи згортання крові, що запускається позасудинним компартментом, що містить молекули ТФ – ініціюється каскад реакцій і, як наслідок, утворюється згусток [2]. Для розчинення утвореного згустку на наступному етапі запускається система фібринолізу. Регуляція каскаду коагуляції та фібринолітичної системи здійснюється широким спектром кофакторів, рецепторів та інгібіторів [3].

Гемостаз являє собою складну систему, що складається з клітинних і гуморальних компонентів, що включає у себе систему тромбоцитів, процес коагуляції, антикоагулянтний та фібринолітичний шляхи. Ендотеліоцити судин, тромбоцити, еритроцити відносяться до клітинних компонентів. До гуморальних: протеїни плазми крові – фактори системи зсідання, білки фібринолітичної системи, антикоагулянтна система протеїну С, калікреїн-кінінова система та інгібітори цих систем [4, 5]

Зазвичай розрізняють первинний і вторинний гемостаз. Після пошкодження судини відбувається активація первинного гемостазу. Це відбувається у декілька етапів: відбувається вазоконстрикція завдяки гладком'язовим клітинам, агрегація тромбоцитів на поверхні клітин ендотелію. Утворюється протромбіназний комплекс і, як наслідок, утворюється тромбін. Цей процес у свою чергу ініціює перетворенню фібриногену у фібрин, який є відіграє ключову роль у формуванні згустку,

утворюючі гелеподібний, тривимірний каркас поверх тромбоцитарної пробки, щоб запечатати розрив та запобігти крововтраті – вторинний гемостаз [6, 7, 8].

Гемостаз являє собою рівноважну, контрольовану систему, де усі її компоненти функціонують як єдине ціле. Дерегуляція проявляється кровотечею (гіпокоагуляція) або тромбозом (гіперкоагуляція). Як наслідок, можуть виникнути такі патології як: гемофілія – недостатнє згортання, у випадку надмірного згортання – тромбоз, що може призвести до ряду інших захворювань: інсульту, інфаркту, тромбоемболії та інших захворювань [9]. Прикладом дерегуляції може слугувати утворення альвеолярно-капілярних мікротромбів, які були виявлені при гістологічному аналізі легеневих судин у пацієнтів із Covid-19 [10]. Від аномальної роботи системи коагуляції напряду залежить тяжкість коронавірусної хвороби. З'являється все більше даних про венозну тромбоемболію, артеріальні тромбози та інфаркти міокарда у хворих. Гістопатологія зразків легень часто виявляє фібринові закупорки у дрібних кровоносних судинах пацієнтів. Як відомо, це є одним із головних факторів смертності внаслідок цього захворювання [11].

Отже, активація системи гемостазу може відбуватись з двох причин: у випадку пошкодження цілісності ендотеліального шару судини задля швидкої зупинки кровотечі для попередження крововиливу та з іншого боку, у випадку залучення системи гемостазу в якості складової запального процесу в організмі у відповідь на патологію. Тромб відіграє важливу фізіологічну функцію у першому випадку, а у другому ускладнює патологічний процес, що виникнув [12].

1.2 Система зсідання крові

Існують два шляхи запуску коагуляційного каскаду: зовнішній – шлях тканинного фактору та внутрішній – контактний. Модель гемостазу, що розглядає два окремих шляхи активації коагуляції, має назву «каскадна». У випадку пошкодження судини активація системи гемостазу відбувається за механізмом зовнішнього шляху, а внутрішній шлях активації залучається при патологіях [13]. ТФ ініціює запуск зовнішнього шляху, зв'язується з сериною протеазою, активованим VII фактором крові (FVIIa), у результаті відбувається активація X фактору (FXa) та фактору IX (FIXa). FIXa, у свою чергу, утворює комплекс з кофакторним білком – активованим фактором VIII (FVIIIa), що також призводить до активації X фактору (FXa). FXa у присутності іонів Ca зв'язується з активованим кофактором білкового фактору V (FVa). Як наслідок, утворюється протромбіназа – прокоагулянтний комплекс, що призводить до перетворення протромбіну в тромбін (рис. 1.1). Потім тромбін виконує деякі прокоагулянтні функції включаючи активацію тромбоцитів, FV, фактору XIII (FXIIIa), фактору XI (FXIa) та перетворення фібриногену на фібрин [14, 15].

Активація фактору XII (FXIIa) ініціює контактний шлях коагуляції за участі високомолекулярного кініногену (НК) та прекалікреїну плазми (PK). FXIIa, що утворився сприяє перетворенню PK на калікреїн та активує FXI (FXIa). Після цього утворюється комплекс внутрішньої тенази завдяки протеолізу FIX до FIXa з FXIa, що у свою чергу призводить до активації фактору X (FXa). FXa у взаємодії з активованим фактором V (FVa) призводить до утворення тромбіну (**рис. 1.1**) [16]. Внутрішній шлях активації – контактний, названий таким чином через можливість його запуску без додавання ТФ до крові або плазми у системі *in vitro*. Активатором у цьому випадку може виступати скляна пробірка. Не дивлячись на важливу роль у активації згустку *in vitro*, існує припущення, що контактний шлях не має впливу на систему гемостазу *in vivo* [17]. Існує припущення, що однією з

функцій внутрішнього шляху *in vivo* є утворення медіатору запалення – брадикініну, що утворюється коли калікреїн розщеплює НК [18]. Був також виявлений ряд активаторів внутрішнього шляху *in vivo* – нейтрофільні та поліфосфатні позаклітинні сітки [19]. Нові данні можуть свідчити про те, що при патологічних станах активація внутрішнього шляху може грати ключову роль [20].

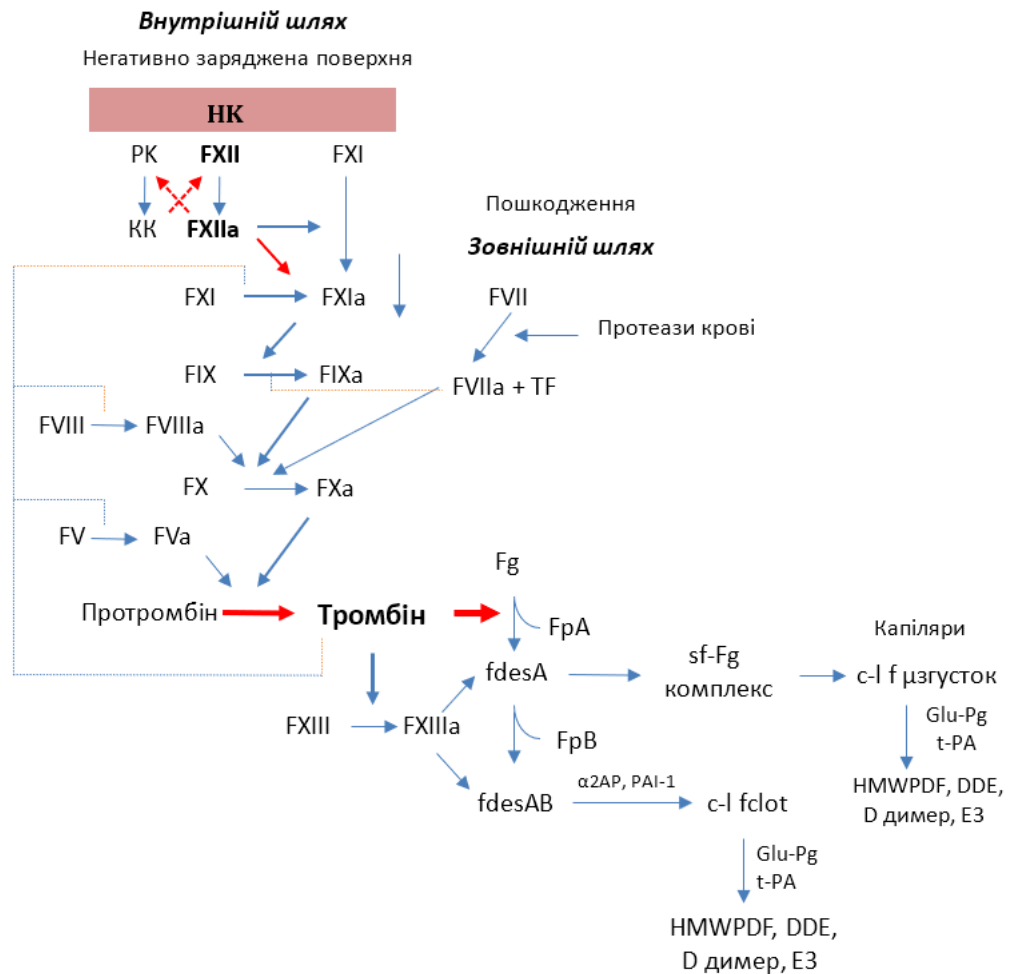


Рис. 1.1. Молекулярні взаємодій системи зсідання крові. sf-Fg – комплекс розчинного фібриногену з Sf (розчинний в плазмі крові), c-I fclot – поперечно прошитий FXIIIa згусток фібрину, c-I f μзгусток – FXIIIa поперечно прошитий мікрозгусток фібрину; HMWPDF – продукти деградації (високомолекулярні) поперечно прошитого фібрину, DDE – DDE тріада; E3 – продукт руйнування плазміном DDE тріади.

В нормальних *in vivo* умовах, TF є ключовим елементом фізіологічного гомеостазу, а зовнішній і внутрішній шляхи функціонують як єдине ціле [21].

1.3 Фібринолітична система

Завдяки системі фібринолізу видаляються та розчиняються фібринові згустки, утворені в судинній системі. Плазмін – фермент, котрий розщеплює фібрин, його попередником є плазіноген. Ендотеліальні клітини експресують два активатори плазіногену: тканинний і урокіназний (t-PA, u-PA), що перетворюють плазіноген у плазмін [22]. Інгібування утвореного плазіну відбувається завдяки інгібіторам протеази серпинового типу, α 2-антиплазіном. В той час як t-PA- та u-PA-опосередкована активація плазіногену інгібується завдяки інгібітору активатору плазіногену PAI-1 – протеаза серпинового типу. У плазмі крові активація t-PA- та u-PA плазіногену буде неефективною, до того ж утворений плазмін буде швидко інгібуватись α 2-антиплазіном. Молекулярні механізми, що сприяють перетворенню плазіногену у плазмін, потребують утворення потрібних комплексів між матрицею, активатором плазіногену і плазіногеном. При цьому, двома основними місцями для цього будуть слугувати поверхня клітин та полімер фібрину. Фібрин виступає в якості каркасу для активації плазіногену за допомогою t-PA і в той же час перешкоджає дії α 2-антиплазіну [23].

Фібрин є не тільки субстратом для плазіну, а ще й ініціюючим фактором фібринолізу. У нормальних умовах фібрин утворюється тільки для того, щоб створити тимчасовий матрикс для фібринової «пробки» під час закриття рани або у випадку утворенню кров'яного згустку, який треба потім вчасно видаляти. Протеоліз відбувається за рахунок С-кінцевих залишків лізину, що утворюються на поверхні фібрину. Ці залишки розпізнаються завдяки сайтам зв'язування лізину, що розташовані в крінгл-доменах

плазміногену [24, 25]. Зв'язування сприяє підсиленню активаторної активності t-PA, тому зв'язаний з фібрином плазміноген значно швидше перетворюється на плазмін. Тобто фібрин відіграє роль кофактору для t-PA. t-PA самостійно селективно зв'язується з фібрином, на відміну від u-PA [26]. У судинному фібринолізі t-PA відіграє важливу роль, в той час як u-PA має вирішальний вплив при патологіях та у процесах ремоделювання тканин [27].

Плазмін, зв'язуючись із фібриновим каркасом, від'єднує від нього фрагменти і згусток поступово розчиняється. Лізис інгібують α 2-антиплазмін, макроглобулін – інгібітори плазміну, PAI-1, PAI-2 – інгібітори активаторів плазміногену і TAFI – активований тромбіном інгібітор фібринолізу. Антиплазмін – один із найпотужніших фібринолітичних інгібіторів, діє безпосередньо на плазмін. Швидкість асоціації між антиплазміном та плазміном є найшвидшою поміж усіх серинових протеаз та їх інгібіторів [28]. TAFI функціонує для стабілізації тромбів, ферментативно видаляє С-кінцеві залишки лізину з фібрину. Це сприяє опосередкованому інгібуванню розщеплення фібрину тим, що знижує можливість t-PA та плазміногену зв'язуватись з поверхнею фібрину [29]. TAFI, активований тромбіном, є ще одною ланкою, окрім фібрину, що підтримує коагуляцією.

Процеси утворення згустків та система фібринолізу дуже тісно пов'язані між собою. Схема молекулярних взаємодій системи зсідання крові та фібринолізу представлені на **рис. 1.1**. Підсилює гідроліз згустку тромбін, котрий стимулює вихід t-PA з ендотелію. В свою чергу тромбін також активує фермент, котрий ковалентно прошиває згусток – фактор XIII, що сприяє тому, що згусток стає більш стійким до гідролізу. Тромбін також активує TAFI, що гальмує гідроліз [30]. Надлишок тромбіну, що утворюється за активації системи гемостазу, швидко інактивується у крові. Фібрин, що утворився, гідролізується плазміном.

1.4 Дослідження стану системи гемостазу

Гемостаз забезпечує зберігання крові у рідкому стані та водночас сприяє зупинці кровотечі при пошкодженнях кровоносних судин. Виникнення геморагічного стану або тромбоутворення свідчать про зміну у роботі системи гемостазу. Деякі з цих патологій є причиною смертності серед хворих у більше ніж половині випадків. Прикладом таких захворювань можуть слугувати: атероматоз і синдром дисемінованого внутрішньосудинного згортання (ДВЗ-синдром) [31].

У патогенезі COVID-19 пошкодження мікроциркуляції вносить вирішальний внесок. Дисфункція ендотелію, що викликана здатністю SARS-CoV-2 проникати у клітини ендотелію, є основною причиною порушення роботи мікроциркуляції. Коронавірусна інфекція здатна викликати специфічні порушення у роботі системи гемостазу, найчастіше гіперкоагуляційного характеру, значно рідше виявляються геморагічні прояви [32].

Важливим фактором для ефективного лікування захворювань, пов'язаних з аномальною роботою системи гемостазу, є лабораторна діагностика. Для точної діагностики порушення роботи системи гемостазу зазвичай необхідно встановити сімейний і особистий анамнез розладів гемостазу, зробити точний збір симптомів та клінічних ознак та поєднати з результатами, отриманими завдяки лабораторній діагностиці. При поєднанні усіх цих аспектів можна підвищити ефективність діагностики. Таким чином, у лабораторній практиці застосовуються тести першої лінії – скринінгові, у якості швидких та недорогих, для виявлення дисбалансу між окремими частинами системи гемостазу та для характеризувannya окремих компонентів коагуляційного каскаду [33]. До скринінгових тестів відносять: час зсідання крові по Лі-Уайту – загальний коагуляційний тест, час рекальцифікації стабілізованої плазми, частково активований тромбoplastиновий час

(АЧТЧ), протромбіновий час, тромбіновий час, рептилазний час. Після цього слід використовувати більш конкретно спрямовані аналізи для уточнення характеру та тяжкості порушень – тести другої та третьої лінії, уточнюючі тести, для визначення вмісту окремих компонентів системи гемостазу. До уточнюючих тестів відносять: визначення D-димеру, визначення вмісту антитромбіну III, визначення рівня $\alpha 2$ -антиплазміну, визначення рівня плазміногену, визначення загальної фібринолітичної активності в плазмі крові.

Процес згортання крові достатньо складний у дослідженні, тому були вироблені декілька надійних підходів для оптимізації результатів. Загальну схему проведення досліджень представлено на **рис. 1.2**.

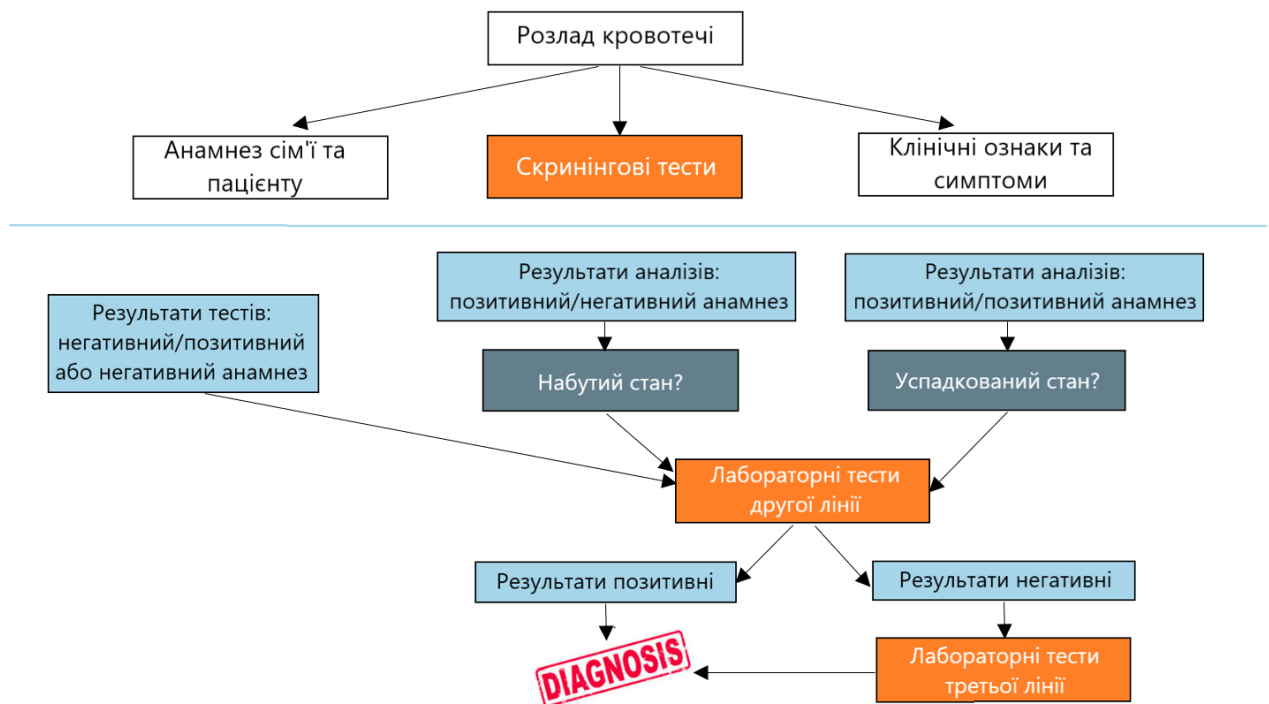


Рис. 1.2. Загальна схема проведення досліджень при розладах кровотечі.

Для цього тести першої лінії мають передувати виконанню тестів другої лінії та у деяких випадках цього буде достатньо для визначення початкового діагнозу. Для остаточного діагнозу проводять тести третьої лінії і отримані

дані корелюються з результатами першої та другої лінії – цих даних цілком достатньо для встановлення остаточного діагнозу [34].

Метод загального гемостатичного потенціалу. Одним із методів визначення загальних параметрів стану системи гемостазу є метод загального гемостатичного потенціалу. Використовується для кількісного визначення фібрину у плазмі крові. ЗГП – це технічно простий аналіз, який можна використати з мінімальними витратами у простій лабораторії, описаний вперше Blomback та колегами [35, 36]. Метод демонструє баланс між утворенням фібрину, що викликаний тромбіном або ТГ, з фібринолізом, що ініційований t-РА.

Принцип методу полягає в генерації кривої часу фібрину за показаннями оптичної щільності. Завдяки методу ЗГП можна *in vitro* дати кількісну оцінку коагуляційного та фібринолітичного потенціалів у бідній на тромбоцити плазмі і виміряти комплексну дію прокоагулянтів, антикоагулянтів та фібринолітичних факторів. Метод може бути використаний для оцінки стану як гіперкоагуляції так і відхилень фібринолізу. У медичній практиці, цей метод був використаний для характеристики гіперкоагуляційних станів: легеневої емболії, ішемічної хвороби серця, шизофренії, антифосфоліпідного синдрому [38-41].

Фібриноген. Одним із найважливіших показників у оцінці стану системи гемостазу – вміст фібриногену. Зниження рівню фібриногену спостерігається при гострому ДВЗ-синдромі, при введенні коагулопатичних препаратів, при вроджених гіпо- і дисфібриногеміях або при дилуційній коагулопатії [35].

Підвищення концентрації фібриногену може вказувати на розвиток запального або інфекційного процесів у організмі, а також при аутоімунних захворюваннях. Дослідження анамнезу та проведення лабораторного тестування при гіперкоагуляційних синдромах, особливо у випадку поєднання великої кількості фібриногену з скороченням тромбінового, протромбінового часу та активованого часткового тромбопластинового часу, дозволяє визначити першопричину гіперфібриногемії.

Одними із базових методів по оцінці стану системи гемостазу є кількісний аналіз фібриногену за методом Клауса та по Рутбергу, за допомогою тромбіну та тромбіноподібних елементів [36]. Також можна визначити концентрацію фібриногену спектрофотометрично за методом Беліцера і Варецької [6].

Розчинний фібрин. Вільно циркулюючий у крові у вигляді олігомерів фібрину разом з фібриногеном, він виступає у якості маркера у згортальному каскаді системи гемостазу. Фактор XIIIa відповідає за стабілізацію олігомерного фібрину, що на пряму залежить від концентрації тромбіну, плазміну та FXIII, утворюється каркас для тромбу у вигляді фібринової тривимірної сітки і розщеплення фібрину.

Підвищення його рівню концентрації у плазмі крові на пряму пов'язано з утворенням тромбіну та комплексів мономерного фібрину з фібриногеном і з олігомерним Sf та свідчить про внутрішньосудинне тромбоутворення [42].

D-димер. D-димер – специфічний продукт деградації фібрину, що утворюється внаслідок дії плазміну у процесі лізису згустку зокрема під дією плазміну. Для кількісного визначення D-димеру використовуються методи: ELISA, турбідиметрії, імунодифузії, латекс-аглотинації.

При розщепленні плазміном нерозчинного фібрину утворюються епітопи D-димеру, на відміну від фібриногену та розчинного фібрин-мономеру, що не утворюють епітопів. У вищеперерахованих методах використовуються моноклональні антитіла до епітопів D-димеру, визначати можна в плазмі, сироватці крові та у сечі.

Визначення кількості D-димеру дозволяє оцінити як відбувається процес розщеплення фібрину під час фібринолізу та при тромбоутворенні. Також можна проаналізувати ступінь внутрішньосудинного зсідання крові [43].

Кількісне визначення D-димеру проводиться для діагностики тромбозів глибоких вен, претромботичних станів, ДВЗ-синдромі, різних серцевих захворюваннях, онкологічних захворюваннях, ускладненнях під час вагітності та при хворобах печінки [44-50].

РОЗДІЛ 2

Матеріали і методи досліджень

2.1 Матеріали.

У роботі було використано такі матеріали та реактиви: плазма донорів, цитрат Na, NaCl. АЧТЧ (активованій частково тромбопластиновий час) реагент фірми Ренам (РФ), рекомбінантний тканинній активатор плазміногену (t-PA) фірми Boehringer Ingelheim (Німеччина). Fg – отримували у відділі з донорської цитратної плазми шляхом висолювання 16% розчином сульфату натрію. 0.02 / 0.05 М HEPES рН 7.4, t-PA, 0.25 М CaCl₂, моноклональні антитіла ПІ-3b, фібрин-специфічні моноклональні антитіла FnI-3C, мічені біотином антитіла ПІ-4d, 0,01 / 0.05 М калій фосфатний буфер рН 6.0, 0.05% Tween-20, 0.02% TBS, 3.5% розчин знежиреного молока, H₂SO₄, 0.03% перекис водню, 0.04% о-фенілендіамін, 1.5% оцтова кислота.

Зразки крові донорів надані Центром крові Головного військового клінічного госпіталю Міністерства оборони України м. Києва.

Обладнання, яке використовувалось під час дослідів: термостат – ТС – 80M2, рН-метр, терези аналітичні, спектрофотометр СФ2000, центрифуга Eppendorf 5702, пластикові кювети для турбідиметричного аналізу та планшети для імуноферментного аналізу («Sarstedt», Німеччина), програмні пакети Excel, SigmaPlot та Origin.

2.2 Методи

2.2.1 Отримання плазми з крові донорів

Кров донорів або пацієнтів стабілізували цитратом Na у співвідношенні 1:9 (1 об'єм плазми на 9 об'ємів 3.8% цитрату Na). Далі проводилося

центрифугування впродовж 40 хвилин при 160 g при 25°C для отримання плазми, збагаченої тромбоцитами (PRP).

Бідну на тромбоцити плазму отримували центрифугуванням при 300 g протягом 15 хв при 25°C, Плазму крові відібрали до стерильних пробірок, частину заморозили при -196°C з використанням рідкого азоту, іншу частину досліджували *ex temporo*. До проведення наступних досліджень плазма крові зберігалася при -30°C. Для проведення досліджень її розморожували при 37°C на водяній бані протягом 30 хвилин.

2.2.2 Визначення загального гемостатичного потенціалу плазми крові людини

Експеримент проводили в 0.05 М НЕРЕС буфері, рН 7.4, 0.1 М NaCl, 6.2 мМ CaCl₂, 40 μл плазми крові та у присутності і відсутності 75 IU/мл t-PA. Загальний об'єм інкубаційного середовища – 400 μл. Згортання плазми крові ініціювали додаванням розчину 25 мМ CaCl₂ та реєстрували на спектрофотометрі СФ 2000.

Визначили величини таких параметрів: загальний гемостатичний потенціал (ЗГП, оо.*с.), а також τ – лаг-період, с, V₁ – швидкість латеральної асоціації протофібрил, о.о./с, Н – максимальна мутність згустку, о.о., L – час напівлізису згустку, с, V₂ – швидкість гідролізу фібринового згустку, -о.о./с
ФП – фібринолітичний потенціал, ЗП – потенціал згортання, проаналізувавши отримані турбідиметричні криві, турбідиметричні криві та їх аналіз представлено на **рис. 3.1**.

2.2.3 Рекальцифікація плазми

Рекальцифікацію плазми контролювали турбідиметричним методом шляхом реєстрації розсіяння світла при 405 нм на спектрофотометрі СФ 2000. Реакція полягає у зсідання безтромбоцитарної плазми при додаванні до неї хлориду кальцію до оптимальної концентрації.

Нормальне значення 60-120 с у вероналовому буфері, рН 7.4. Згусток формували в кюветі, у яку послідовно додавали 0.05 М HEPES буфер, рН 7.4, що містив 0.1 М NaCl, 80 μ л плазми крові з t-РА у різних концентраціях та без t-РА. Процес зсідання плазми крові ініціювали додаванням 25 мМ CaCl₂ до 6.2 мМ концентрації. Кінцевий об'єм реакційної суміші становив 400 мкл.

2.2.4 Імуноферментний аналіз

Для визначення концентрації D-димеру та розчинного фібрину у плазмі крові використовували імуноензимний метод з застосуванням моноклональних антитіл, що були отримані у відділі молекулярної імунології Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України. У якості catch-антитіл для сорбції на полістирольному планшеті були використані відповідно D-димер-специфічні моноклональні антитіла III-3b та фібрин-специфічні моноклональні антитіла I-3C. Мічені біотином антитіла II-4d, з епітопом у D-доміні фібриногену, використовувалися в якості tag-антитіл.

Антигени моноклональних антитіл I-3c розводили 0.02 М HEPES, рН 7.4 з 0.3 М NaCl до концентрації 0.01 мг/мл і вносили в лунки мікропланшету. Проводили інкубацію протягом 16 год при +4°C. Лунки промивали тричі 0,01 М калій фосфатним буфером, рН 7.4, що містив 0.14 М NaCl, 0.05% Tween-20, 0.02% TPS, для видалення антигену, що не зв'язався. 3.5% розчином знежиреного молока в TPS проводили блокування місць неспецифічного зв'язування білку протягом 1 години при 37°C. Лунки тричі промивали за

допомогою TPS. Далі в лунки додавали по 0.1 мл плазми крові в 10-кратному розведенні та інкубували протягом 1 год при 37°C. Лунки знову тричі промивали за допомогою TPS.

У якості вторинних антитіл вносили у лунки мікропланшету по 0.1 мл в концентрації 2 $\mu\text{г}/\text{мл}$ біотинільовані моноклональні антитіла II-4d. Інкубували протягом 1 год, потім тричі промивали за допомогою TBS та наносили кон'югант стрептавідин-HRP, розведений у 5000 разів TPS. Знову проводили інкубацію впродовж 1 год. Лунки мікропланшету після цього тричі промивали TBS та вносили в кожен з них по 100 $\mu\text{л}$ 0.05 М калій фосфатного буферу рН 6.0 з 0.03% перекисом водню та 0.04% о-фенілендіаміном. Інкубували до появи забарвлення протягом 30 хв. Реакцію зупиняли додаванням у лунки по 50 $\mu\text{л}$ 2 N H_2SO_4 . Екстинкції в лунках мікропланшету вимірювали при довжині хвилі 492 нм за допомогою мікропланшетного рідера Thermo Multiskan EX (Німеччина).

2.2.5 Визначення фібриногену в плазмі крові

За допомогою спектрофотометричного методу було визначено вміст Fg у плазмі крові. Для цього у скляну пробірку додавали 0.2 мл плазми та 1.7 мл 0.1 М фосфатного буфера рН 7.0. Додаванням 0.1 мл анциструну (2 NIH/мл), тромбін-подібного ензиму, ініціювали зсідання плазми крові.

Проводили інкубацію впродовж 30 хв при 37°C та після цього викручували на скляну паличку утворений згусток фібрину, після промивали та розчиняли його у 5 мл 1.5% оцтової кислоти. Вимірювали поглинання при довжині хвилі 280 та 320 нм та визначали концентрацію протеїну за формулою $C_{\text{Fg}} = (E_{280} - E_{320})/1.506$ та виражали у мг/мл плазми крові.

РОЗДІЛ 3

Результати досліджень та їхнє обговорення

3.1. Характеристика молекулярних взаємодій кривої утворення і руйнування згустку плазми крові

Метод визначення гемостатичного потенціалу плазми крові базується на турбідиметричних кривих, які відображають структурні зміни в згустку в процесі його формування та гідролізу і молекулярні механізми яких достатньо вивчені. Тому важливо було розглянути окремі стадії з точки зору молекулярних процесів, які відбуваються в ці проміжки часу на турбідиметричній кривій та як вони характеризують параметри методу. Зсідання плазми крові ініціювали додаванням АЧТЧ реагенту, а процес лізису спостерігався тільки у присутності t-РА (рис. 3.1).

Величина гемостатичного потенціалу має три основні складові: ЗП (потенціал згортання) – характеризує роботу контактного шляху коагуляційного каскаду; ФП (фібринолітичний потенціал) – показує здатність системи фібринолізу гідролізувати утворений згусток; ЗГП (загальний гемостатичний потенціал) – показує чи збалансована система гемостазу між утворенням і руйнуванням згустку в плазмі крові.

ЗП та ЗГП є основними параметрами та визначаються за допомогою інтегрувального обчислення площі поверхні, що охоплюють ці криві, рис. 3.1. Ці параметри є кількісним вираженням здатності системи гемостазу плазми крові пацієнта відповідно формувати згусток та підтримувати баланс між коагуляційною та фібринолітичною ланками гемостазу. ФП представляє різницю між величинами ЗП та ЗГП.

Окремі стадії турбідиметричної кривої дають декілька параметрів:

τ – лаг-період, що корелює з протромбіновим часом, демонструє швидкість утворення протофібрил фібрину завдяки утворенню тромбіну, що розщеплює фібриноген і активує фактор XIII. Ця величина безпосередньо

свідчить про відщеплення α C-регіонів фібрину [51, 52]. Далі активація плазміногену на порядок пришвидшується завдяки появі C-кінцевого лізину на молекулі фібрину. Також за дії плазміна на фібрин відщеплюються продукти деградації фібрину – утворення DDE тріади, D-димеру, E3 фрагментів. Плазмін надалі не руйнує утворені D-димери. На цьому етапі руйнування згустку значно пришвидшується і стрімко завершується [53].

Процес поступового розщеплення утвореного фібринового згустку плазміном характеризується за допомогою наступних параметрів:

L – величина, що залежить від діаметру фібрил, від швидкості активації t-PA плазміногену, демонструє час напівлізису згустку та напряму корелює з концентрацією плазміногену і t-PA.

V₂ – величина, що залежить від концентрації плазміну і інгібіторів плазміну та показує швидкість руйнування згустку фібрину. TAFI, інгібітор фібринолізу, інгібітори плазміногену (PAI1 та PAI2) та інгібітори плазміну (α_2 -антиплазмін, макроглобулін), уповільнюють гідроліз згустку.

Таким чином, проаналізувавши турбідиметричну криву можна проаналізувати хід взаємодії основних складових системи гемостазу, з'ясувати молекулярні перетворення та їх швидкість в процесі утворення та руйнування фібринового згустку, а саме: концентрацію та швидкість активації тромбіну, фібриногену та його перетворення у фібрин, швидкість латеральної асоціації протофібрил, структуру утвореного фібринового згустку, а також здатність до активації системи фібринолізу і процеси розчинення плазміном згустків.

3.2 Визначення величини гемостатичного потенціалу та концентрації молекулярних маркерів стану системи гемостазу в плазмі крові пацієнтів, що перехворіли на Covid-19

Дослідження системи гемостазу у хворих на COVID-19 показали потужну активацію системи згортання в ході захворювання, що часто приводило до тяжких наслідків. Нашим завданням було охарактеризувати стан системи гемостазу у хворих, що перенесли захворювання і порівняти його з таким донорів.

Завдяки появі везикул з тканинним фактором активується зовнішній шлях системи згортання крові під час запального процесу [55]. Маркером її активації є розчинний фібрин, який вільно плаває у кров'яному руслі у вигляді олігомерів, що містять ковалентно прошиті за допомогою FXIIIа молекули desA фібрину і його X-фрагментів, та не здатні призводити до активації плазміногену t-PA. Олігомери фібрину при певних умовах здатні утворювати мікрозгустки, що формують на своїй поверхні активаторний комплекс плазміноген-мікрозгусток t-PA з утворенням плазміну, котрий у свою чергу їх руйнує з вивільненням D-димеру. Маркером і каскаду зсідання і фібринолітичного процесу є саме D-димер [59]. Проводити дослідження краще комплексно визначаючи концентрацію D-димеру та розчинного фібрину та їх відношення між собою та до основних параметрів системи гемостазу.

Для характеристики параметрів формування та гідролізу фібринового була обрана вибірка з 19 пацієнтів, перехворівших на COVID-19 та донорів. Отримані дані демонструють такі параметри: лаг-період, швидкість латеральної асоціації протофібрил, максимальна мутність, час напівлізису згустку, загальний гемостатичний потенціал, фібринолітичний потенціал та потенціал згортання.

У **таблиці 3.1** продемонстровано параметри стану системи гемостазу, отримані за допомогою методу загального гемостатичного потенціалу, де

досліджувалась плазма донорів, групи пацієнтів, що перехворіли на Covid-19, з підвищеним рівнем розчинного фібрину та D-димеру відповідно $18,8 \pm 2,3$ μ /мл та 377 ± 331 нг/мл ($n=5$). Плазма крові інших 14 пацієнтів, мала підвищений рівень лише розчинного фібрину – $39,7 \pm 22,1$ μ /мл і в межах норми рівень D-димеру – $56,3 \pm 12,8$ нг/мл.

Таблиця 3.1

Параметри формування та гідролізу згустку в плазмі крові донорів та пацієнтів, що перехворіли на Covid-19

	Середнє гр. РФ+ДД	Середнє гр. РФ	Донори
τ , с	86 ± 11	$96,4 \pm 21,7$	140 ± 23
H, о.о.	$0,14 \pm 0,08$	$0,41 \pm 0,15$ *	$0,39 \pm 0,02$
L, с	768 ± 113	869 ± 224	954 ± 45
ЗП	150 ± 101	357 ± 141 *	365 ± 17
ЗГП	$103,8 \pm 69,8$	$270,6 \pm 119,3$ *	275 ± 15
ФП	$46,03 \pm 32,40$	$93,33 \pm 32,46$	90 ± 11

Подані в таблиці 3.1 дані вказують на те, що в обох досліджуваних групах виявлено підвищену прокоагулянтну активність в системах гемостазу. Про це свідчить скорочення лаг-періоду, що вказує на прискорене утворення тромбіну, підвищений рівень розчинного фібрину. Це говорить про підвищену активність коагуляційної компоненти гемостазу.

Слід відмітити, що особи з нормальним рівнем D-димеру мають величини параметрів системи гемостазу близькі до таких у донорів. У групі осіб з підвищеним рівнем розчинного фібрину і D-димеру величини параметрів вказують на підвищену активність фібринолітичної системи, а саме: зменшується показник максимальної мутності H, зменшений ЗП, ЗГП та ФП вказують на зменшену здатність плазми формувати фібриновий згусток. З іншого боку наявність підвищеного рівня D-димеру свідчить про підвищену активність фібринолітичної системи, ніж у донорів та групи, де

наявний лише розчинний фібрин. Це пов'язано насамперед з підвищеною здатністю плазми до формування мікрозгустків, які є стимуляторами активації плазміногену *in vivo*, підвищеним рівнем активатору плазміногену (t-PA), зниженим рівнем інгібіторів фібринолізу та наявністю протеаз, що пов'язані з запальним процесом. У досліджуваній групі, де наявний лише розчинний фібрин в декілька разів вищий показник максимальної мутності, що свідчить про утворення фібрил з більшим діаметром. У цій системі *in vitro* можлива більша кількість інгібіторів фібринолізу, що зменшує швидкість активації плазміногену, внаслідок чого утворюються крупніші згустки. Інакша ситуація може відбуватись у подібній системі *in vivo*, де скоріш за все утворення мікрозгустків не відбувається, а видалення розчинного фібрину відбувається за альтернативними механізмами за допомогою макрофагів або роботою трансендотеліальних транспортуючих систем у міжклітинний простір. У цій же системі параметр згортаючого потенціалу перевищує той же показник у системі РФ + ДД, що вказує на формування більшого за розміром часом напів-життя згустку. Це підтверджує і коефіцієнт відношення ЗП\ФП, який у донорів становить $365/90 = 4.05$, у осіб з нормальним рівнем D-димеру 3.83, а у групі з підвищеним рівне обох параметрів становить 3.25. Остання величина вказує на зміщення рівноваги балансу у системі гемостазу цієї групи осіб, у бік фібринолізу, що погоджується з величинами параметрів H, ЗГП, L.

Таблиця 3.2

Рівень молекулярних маркерів стану системи гемостазу в плазмі крові донорів та пацієнтів, що перехворіли на Covid-19 (n=19)

Плазма крові	Фібриноген, мг/мл	Розчинний фібрин, мкг/мл	DD, нг/мл
Донори	2,8 ±0,36	2,6±0,67	62 ±16
Пацієнти	2,7±1	39,7±22	56,3±12,7
Норма	3	7 - 10	100

D-димер є специфічним продуктом деградації полімерного прошитого фактором XIIIa фібрину, що утворюється під дією плазміну і деяких фібринолітиків під час лізису згустку, його розглядають як основний маркер тромбофілії. Дослідження цього показника використовують при діагностиці тромботичних станів при патологіях та захворюваннях. Для цього використовується імуноензимний метод з використанням моноклональних антитіл. Розчинний фібрин є олігомерами фібрину desA та фібриногену, які вільно циркулюють у кровотоці. Тестування на розчинний фібрин є важливим для прогнозування поведінки системи гемостазу у хворих після оперативних втручань, проте воно рідко використовується у клінічній практиці.

Таким чином, дослідження дозволило встановити, що у перехворівших на Covid-19 пацієнтів рівень Fg та D-димеру має незначні відхилення відносно донорів, а концентрація розчинного фібрину збільшена в 4 рази відносно норми і у 15 разів відносно донорів. Таке значне збільшення концентрації розчинного фібрину може свідчити про високий ступінь активації системи зсідання крові. Наслідком цього може стати загроза внутрішньосудинного тромбоутворення у пацієнтів.

3.3 Побудова калібровочної кривої для тромбіну

Для кількісної оцінки швидкості активації коагуляційної компоненти системи гемостазу плазми крові людини використовують такий параметр як час згортання плазми крові. В основі цього типу коагуляційних тестів

лежить швидкість активації і концентрація тромбіну, що продукується коагуляційною системою. Нашим завданням було розробити на основі коагуляційних тестів метод кількісного визначення в плазмі крові концентрації тромбіну, як самостійного ензиму. Для цього ми використали один із параметрів, що характеризує турбідиметричну криву методу гемостатичного потенціалу, а саме параметр τ – лаг-період, довжина якого визначається швидкістю утворення вільного ензиму – тромбіну і його фібріногенолітичною активністю на момент початку стадії латеральної асоціації протофібрил.

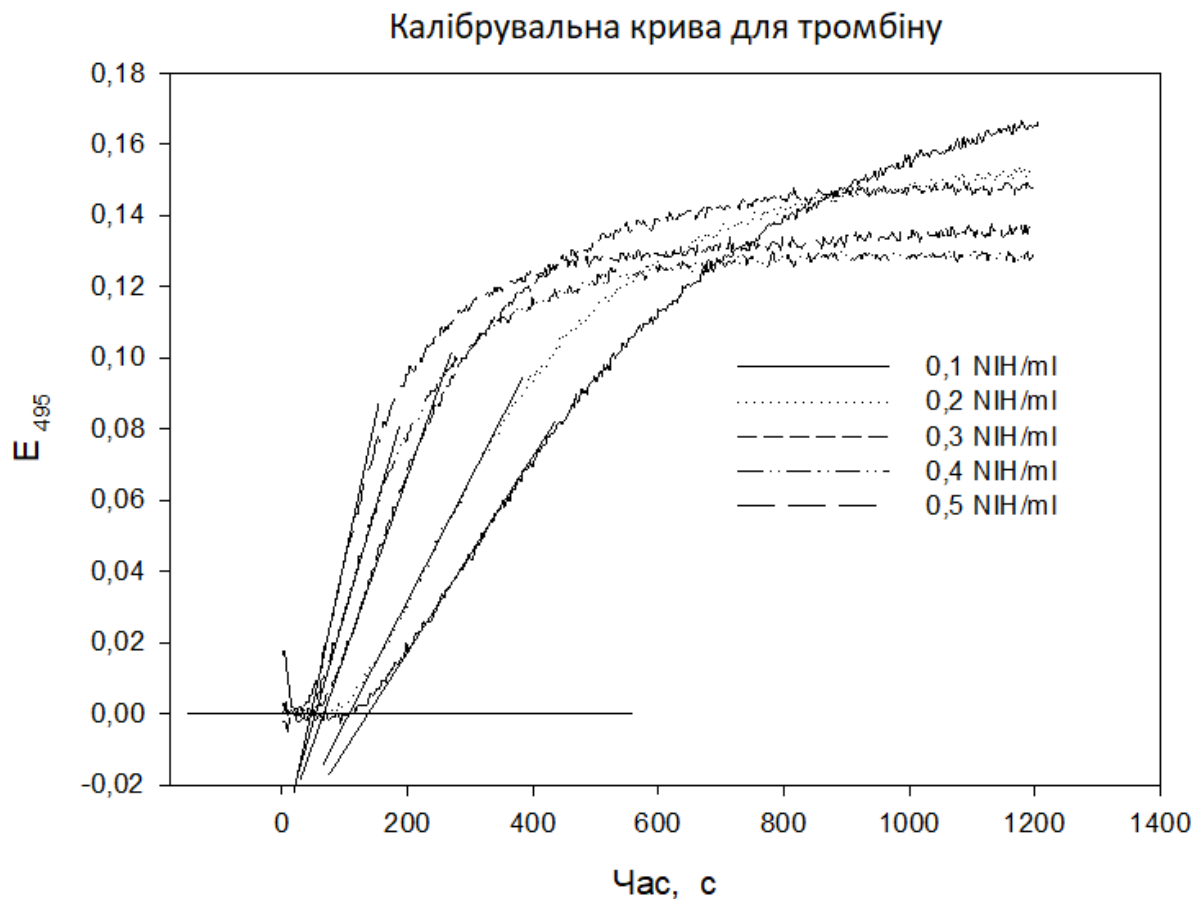


Рис. 3.2. Турбідиметричні криві, побудовані на плазмі донорської крові з використанням серії стандартних концентрацій тромбіну від 0,1 до 0,5 NIH одиниць в 1 мл розчину плазми.

Для побудови калібровочних кривих був використаний тромбін високого ступеня очистки з питомою активністю у 2000 NIH одиниць на мг білка. На **рис. 3.2** наведено типовий результат експерименту, на якому представлено серію турбідиметричних кривих, які використали для визначення величин τ . Одержані величини τ в 3 експериментах були використані для побудови калібрувальної кривої в координатах $1/\tau$ (V) – концентрація тромбіну в мл реакційного середовища.

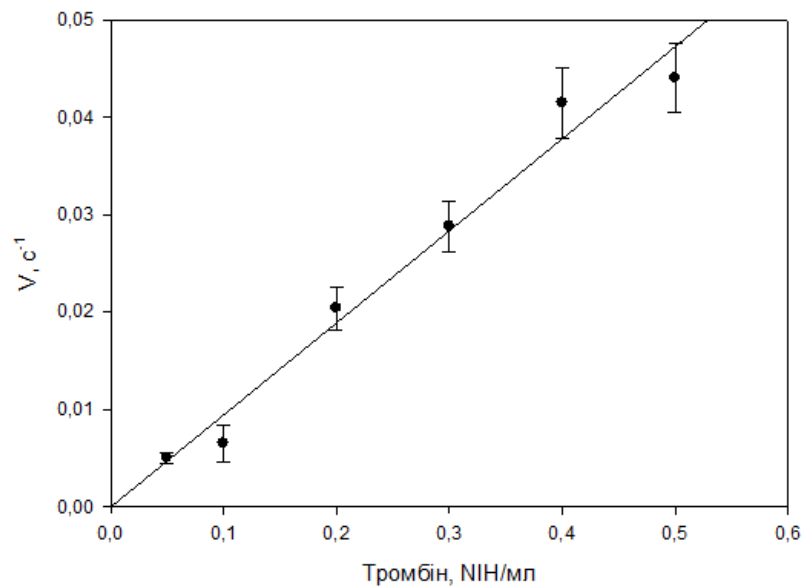


Рис. 3.3. Калібрувальна крива для визначення концентрації тромбіну в плазмі крові людини, (n=3).

Таблиця 3.3

Визначення концентрації тромбіну в плазмі крові хворих на стеноз коронарної артерії (А) та стенокардію (Б).

А.

Параметри	τ , s (без t-PA)	τ , s (з t-PA)	V, s ⁻¹ (без t-PA)	V, s ⁻¹ (з t-PA)	NIH/мл	NIH/мл
Донори	140±23	145±23	0,0071±0,0011	0,0069±0,0011	0,32	0,31
Всі пацієнти	184±39	185±39	0,0054±0,0011	0,0054±0,0011	0,25	0,25
Група А	180±33	180±33	0,0056±0,0010	0,0056±0,0011	0,25	0,25
Група В	188±128	189±29	0,0053±0,0036	0,0053±0,0008	0,24	0,24
Група С	195±65	195±65	0,0051±0,0017	0,0051±0,0017	0,23	0,23

Б.

Параметри	τ , s (без t-PA)	τ , s (з t-PA)	V , s ⁻¹ (без t-PA)	V , s ⁻¹ (з t-PA)	НІН/мл	НІН/мл
Донори	140±23	145±23	0,0071±0,0011	0,0069±0,0011	0,32	0,31
Всі пацієнти	166±36	167±31	0,0060±0,0015	0,0060±0,0011	0,27	0,27
Група А	134±26	174±26	0,0075±0,0014	0,0057±0,0009	0,34	0,26
Група В	156±32	157±33	0,0064±0,0013	0,0063±0,0013	0,29	0,29
Група С	169±38	169±38	0,0059±0,0013	0,0059±0,0013	0,27	0,27

В таблиці 3.3 наведено результати визначення концентрації тромбіну з використанням калібровочної кривої для плазми крові хворих на стеноз і стенокардію. Величини активності тромбіну коливаються в межах 0,24-0,34 НІН одиниць в 1 мл розчину плазми, що співпадає з даними літератури [58].

3.4 Метод для розрахунку параметрів гемостатичного потенціалу

При комплексному дослідженні стану системи гемостазу потрібно враховувати величини багатьох параметрів: лаг-період, максимальна мутність згустку, час напівлізису, швидкість лізису згустку, загальний гемостатичний, фібринолітичний, згортальний потенціали. Для пришвидшення та покращення якості досліджень необхідно автоматизувати процес обчислень.

Для цього був використаний емпіричний мультипараметричний метод аналізу спонтанної скорочувальної відповіді гладенького м'яза в ізометричних умовах, розроблений С.А. Костеріним і співроб. [56, 57]. Цей метод розрахунку базується на емпіричному рівнянні залежності сили скорочення від часу (моменту) скорочувального циклу:

$$(1) \quad f = A \cdot t^n \cdot e^{-kt}, \quad \text{де}$$

A , n і k є константами.

$$\text{З рівняння (1) слідує, що} \quad (2) \quad A = (e/\tau_0) \cdot F_{\max} = (k \cdot e/n)^n \cdot F_{\max},$$

де

$$\tau_0 = (\tau_C + \tau_R)/2 = n/k, \tau_C = (n - \sqrt{n})/k, \tau_R = (n + \sqrt{n})/k,$$

тому

$$\tau_0 - \tau_C = (\sqrt{n}/k), \tau_R - \tau_0 = (\sqrt{n}/k), \tau_C - \tau_R = 2(\sqrt{n}/k),$$

$$(\tau_R - \tau_C)/(\tau_R - \tau_0) = 2, (\tau_R - \tau_0)/(\tau_0 - \tau_C) = 1.$$

Типова загальна ізометрична механокінетична крива процесу спонтанного скорочування-розслаблення розділена умовно на дві ділянки – скорочення і розслаблення. Для їх характеристики використовують такі параметри: параметри f і τ показують миттєві значення сили та момент часу у ході скорочувального циклу; F_C і F_R показують величину сили у точці перегину; τ_C та τ_R – моменти часу в точках перегину; F_{\max} – значення максимальної сили скорочення в момент часу t_0 (1).

Було знайдено, що рівняння (1) досить точно відображує кінетику процесу скорочення-розслаблення гладенького м'яза. При певних умовах, а саме, значення f_C у фазі скорочення в момент часу t_C , коли $t < t_0$, а значення сили f_R у фазі розслаблення в момент часу $t + \Delta t > t_0$ (Δt константа, введена дослідником), то рівняння (1) і (2) дають

$$(3) \quad \ln(f_R/f_C) = -k \cdot \Delta t + n \cdot \ln(1 + \Delta t/t).$$

Це рівняння показує, що механокінетичні криві скорочення-розслаблення гладеньких м'язів можуть бути лінеаризовані в координатах $(\ln(f_R/f_C)) - (n \cdot \ln(1 + \Delta t/t))$. У відповідності з цим рівнянням константа k (розмірність якої час⁻¹) розраховують (з ряду значень величин Δt), як довжину відрізка, що відсікається графіком при екстраполяції до осі ординат, а константа n (безрозмірна величина), як коефіцієнт нахилу (tg) цього графіка. Отримані експериментальні значення констант k і n дозволили авторам запропонувати рівняння для визначення величині миттєвої сили скорочення в момент часу t для механокінетичної кривої, яка описує куполоподібну динаміку спонтанного скорочення-розслаблення гладенького м'яза в ізометричних умовах.

$$(4) \quad f = F_{max} \cdot (kt/n)^n \cdot e^{-kt}$$

Отримані турбодиметричні криві представлено на **рис. 3.4**.

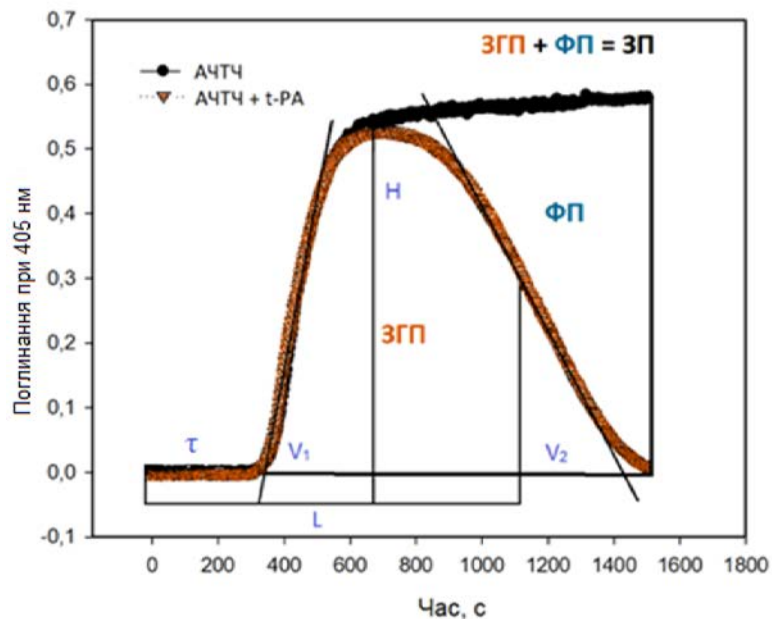


Рис. 3.4. Турбодиметричні криві згортання плазми крові донорів у присутності АЧТВ реагента та згортання і розчинення плазми крові у присутності АЧТВ реагента і t-РА (тканинного активатора плазміногену). Величини гемостатичного потенціалу розраховували шляхом інтегрування відповідних ділянок турбодиметричних кривих. $\Phi\Pi = \text{ЗП} - \text{ЗГП}$.

Слід відмітити, що процеси формування і розчинення згустків плазми крові при вибраних нами експериментальних умовах демонструють динаміку залежності оптичної густини від часу куполоподібної форми.

Параметри турбодиметричної кривої, представленої на **рис. 3.4 та 3.5** можуть бути розраховані за схемою запропонованою в статті [56, 57].

Для отримання колоколоподібної кривої була проведена серія дослідів для того щоб підібрати оптимальні умови. Проведені досліди з різними концентраціями t-РА: 125, 100 та 75 IU/ml (**рис. 3.5**).

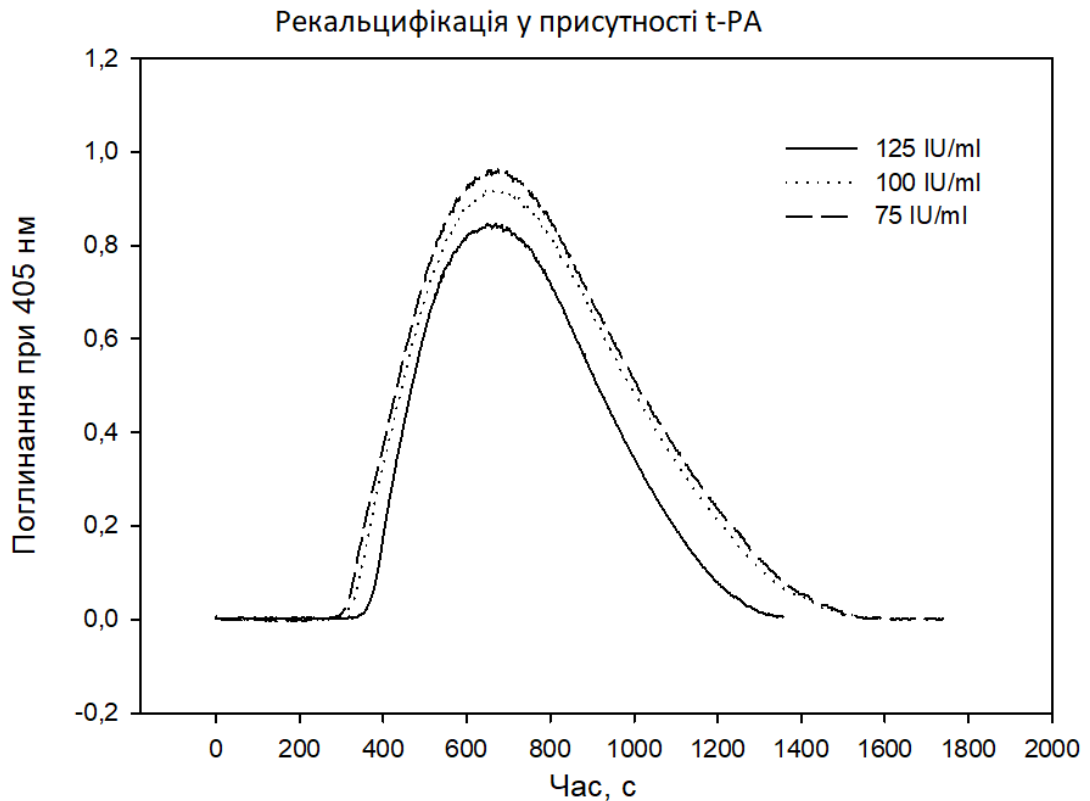


Рис. 3.5. Динаміка зміни оптичної густини плазми крові в процесі формування і розчинення згустку, що ініціюється рекальцифікацією плазми, від концентрації t-PA.

Представлені результати показують, що турбідиметричні криві, які описують процеси згортання і розчинення згустків у плазмі крові і мають колоколоподібну форму при концентрації t-PA 75 IU/мл (**рис. 3.5**) можуть бути охарактеризовані кінетичними параметрами швидкісних циклічних процесів, що лежать в основі скорочення-розслаблення гладеньких м'язів. Це зайвий раз підкреслює, що в основ регуляції систем згортання, фібринолізу і їх балансу знаходяться кінетичні механізми.

Для розрахунку кінетичних параметрів k і n використовували рівняння:

$$\ln(fR/fc) = -k \cdot \Delta t + n \cdot \ln(1 + \Delta t/t).$$

Величини, $\ln(fR/fc)$ та $\ln(1 + \Delta t/t)$, необхідні для лінеаризації турбідиметричної кривої, знаходили, як описано у статті [56, 57].

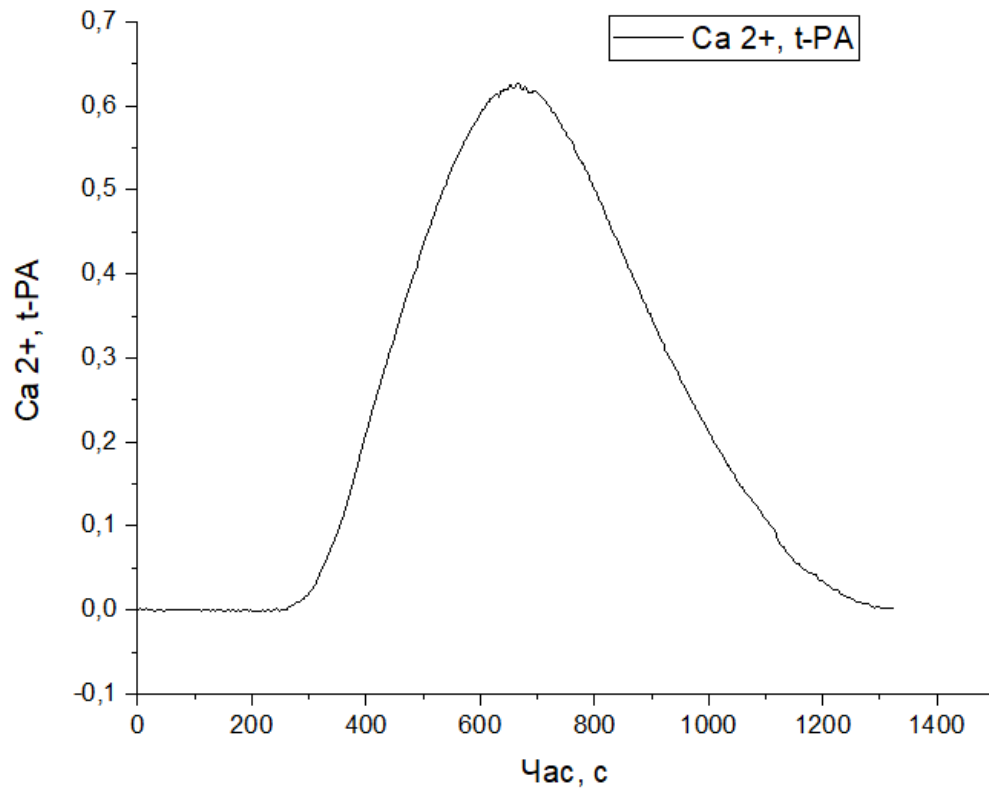


Рис. 3.6. Колоколоподібна турбідиметрична крива, при концентрації t-PA 75 IU/мл.

Приймаємо точку закінчення лаг-фази (249 с) за початковий момент часу і лінеаризуємо (крок часу $\Delta t=400$ с) (**рис. 3.7**):

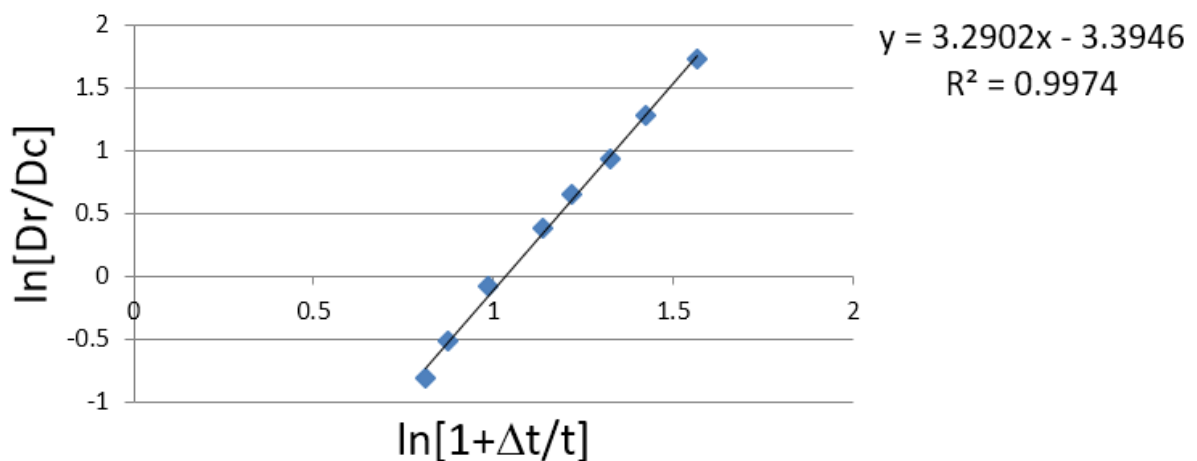


Рис. 3.7. Крива для знаходження констант n і k .

Знайдені величини n і k (інтервал часу 250 с, $R^2=0.99$) і інші параметри наведено у **таблиці 3.4**.

Таблиця 3.4

Знайдені параметри турбідиметричної кривої

$\Delta t, c$	n	k	D_{max}	τ_c (зрост.)	τ_R (спаду)	D_c (зрост.)	D_R (спаду)	V_c (зрост.)	V_R (спаду)
400	3,29	0,0085	0.6264	173,96	601,44	0,275	0,433	0,00287	0,00131

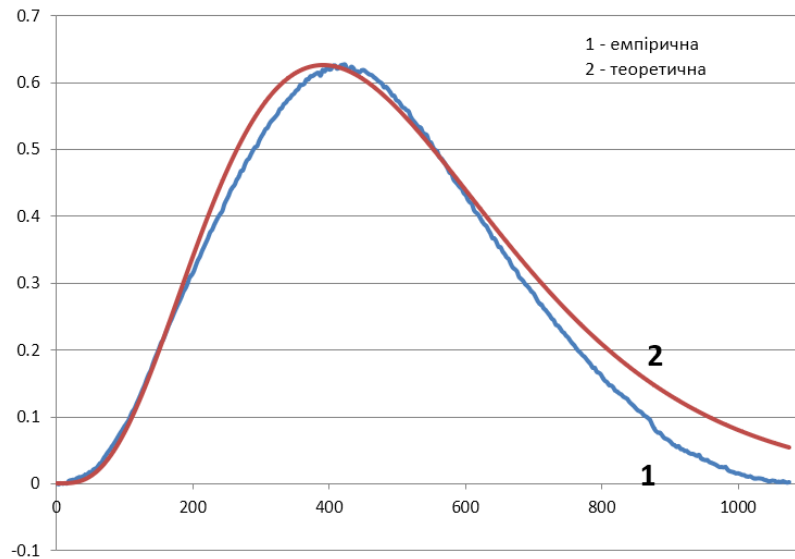


Рис. 3.8. Експериментальні та теоретично розраховані (за показниками n і k) графіки турбідиметрії.

Розраховані площі під експериментальною та теоретичною кривою становлять 306,87 та 306,65 відповідно, що підтверджує можливість використання цього методу для аналізу параметрів методу гемостатичного потенціалу плазми крові.

Представлені результати показують, що турбідиметричні криві, які описують процеси згортання і розчинення згустків у плазмі крові і мають колоколоподібну форму, можуть бути охарактеризовані кінетичними параметрами швидкісних циклічних процесів, що лежать в основі скорочення-розслаблення гладеньких м'язів. Це зайвий раз підкреслює, що в основ регуляції систем згортання, фібринолізу і їх балансу знаходяться кінетичні механізми.

ВИСНОВКИ

1. Запропоновано схему зв'язку між параметрами методу визначення гемостатичного потенціалу, що визначають стан системи гемостазу в плазмі крові людини та молекулярними механізмами, що лежать в основі цих параметрів, в процесі формування та гідролізу згустку в плазмі крові.

2. Визначення величин параметрів гемостатичного потенціалу, турбідиметричних кривих формування та гідролізу згустків та концентрації молекулярних маркерів у плазмі крові осіб, що перехворіли на Covid 19, показало, що а) у всіх осіб підвищений рівень розчинного фібрину; б) у 21% осіб підвищений рівень D-димеру, що вказує на 2 шляхи виведення розчинного фібрину із плазми крові: фібринолітичний та поглинання клітинами і трансепітеліальним транспортом; в) коефіцієнт гемостатичного балансу у більшості осіб відповідає такому донорів, у осіб з D-димером - зміщений у бік фібринолізу. У всіх осіб, що перенесли Covid 19 існує загроза тромбозу, з меншою ймовірністю у 21% осіб з D-димером.

3. На основі параметра τ турбідиметричних кривих формування і гідролізу згустку розроблено метод визначенні концентрації тромбіну і визначена його концентрація в плазмі крові пацієнтів з захворюваннями на стеноз та стенокардію.

4. Показано, що модель мультипараметричного аналізу механокінетики скорочення гладенького м'язу в ізометричних умовах може бути основою для розробки методу розрахунку величин параметрів, що отримуються за методом визначення гемостатичного потенціалу.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Doris Barcellona, Francesco Marongiu. The hemostatic system. 1st Part. *Journal of Pediatric and Neonatal Individualized Medicine* 2020;9(1):e090106 doi: 10.7363/090106
2. John H McVey. The role of the tissue factor pathway in haemostasis and beyond. 2016 Sep;23(5):453-61. doi: 10.1097/MOH.0000000000000268.
3. John C Chapin, Katherine A Hajjar. Fibrinolysis and the control of blood coagulation. 2015 Jan;29(1):17-24. doi: 10.1016/j.blre.2014.09.003.
4. Остапеч М.О., Волковой В.А., Березнякова М.Є., Карабут Л.В., Фоміна Г.П. Сучасні уявлення про систему гемостазу. Актуальні проблеми транспортної медицини: навколишнє середовище; професійне здоров'я; патологія. - 2017. - № 2. - С. 18-24.
5. Zuzanna Małgorzata Łukasik, Marcin Makowski, Joanna Samanta Makowska. From blood coagulation to innate and adaptive immunity: the role of platelets in the physiology and pathology of autoimmune disorders. *Rheumatol Int.* 2018; 38(6): 959–974.
6. Ivan S. Yermolenko, Oleg V. Gorkun, Alexander Fuhrmann, Nataly P. Podolnikova, Valeryi K. Lishko, Stanislav P. Oshkadyerov, Susan T. Lord, Robert Ros, and Tatiana P. Ugarova. The Assembly of Nonadhesive Fibrinogen Matrices Depends on the α C Regions of the Fibrinogen Molecule. *J Biol Chem.* 2012 Dec 7; 287(50): 41979–41990.
7. Limei Cheng, Guo-Wei Wei, and Tarek Leil. Review of quantitative systems pharmacological modeling in thrombosis. 2019;19(3):219-240. doi: 10.4310/cis.2019.v19.n3.a1.
8. Aaron L. Fogelson¹ and Keith B. Neeves. Fluid Mechanics of Blood Clot Formation. 2015 Jan 1;47:377-403. doi: 10.1146/annurev-fluid-010814-014513.

9. Karim N, Ho SY, Nicol E, Li W, Zemrak F, Markides V, Reddy V, Wong T. The left atrial appendage in humans: structure, physiology, and pathogenesis. *Europace*. 2020;22:5–18.
10. Ackermann M, et al. Pulmonary vascular endothelialitis, thrombosis, and angiogenesis in Covid-19. *N Engl J Med*. 2020;383:120–8. doi: 10.1056/NEJMoa2015432.
11. Zuo Y, et al. Prothrombotic autoantibodies in serum from patients hospitalized with COVID-19. *Med Sci Transl*. 2020 doi: 10.1126/scitranslmed.abd3876.
12. Sandra Margetic. Inflammation and haemostasis. *Biochem Med (Zagreb)*. 2012 Feb; 22(1): 49–62.
13. Nigel Mackman, Rachel E. Tilley and Nigel S. Key. Role of the Extrinsic Pathway of Blood Coagulation in Hemostasis and Thrombosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2007;27:1687–1693.
14. Jeremy P. Wood, Paul E. R. Ellery, Susan A. Maroney, and Alan E. Mast. Biology of tissue factor pathway inhibitor. *Blood*. 2014 May 8; 123(19): 2934–2943.
15. Jeremy P. Wood, Matthew W. Bunce, Susan A. Maroney, Paula B. Tracy, Rodney M. Camire, and Alan E. Mast. Tissue factor pathway inhibitor-alpha inhibits prothrombinase during the initiation of blood coagulation. 2013 Oct 29;110(44):17838-43. doi: 10.1073/pnas.1310444110.
16. Stephanie A. Smith, Richard J. Travers, and James H. Morrissey. How it all starts: initiation of the clotting cascade. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2015; 50(4): 326–336.
17. Thomas Renné, Alvin H Schmaier, Katrin F Nickel, Margareta Blombäck, Coen Maas. In vivo roles of factor XII. 2012 Nov 22;120(22):4296-303. doi: 10.1182/blood-2012-07-292094.
18. Renné T. The factor XII-driven plasma contact system. *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*. 6th. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2013.

19. Julia E Geddings, Nigel Mackman. New players in haemostasis and thrombosis. 2014 Apr 1;111(4):570-4. doi: 10.1160/TH13-10-0812.
20. Roger J. S. Preston, Jamie M. O'Sullivan, James S. O'Donnell. Advances in understanding the molecular mechanisms of venous thrombosis. 24 March 2019. doi:10.1111/bjh.15869.
21. James S O'Donnell, Jamie M O'Sullivan, Roger J S Preston. Advances in understanding the molecular mechanisms that maintain normal haemostasis. 2019 Jul;186(1):24-36. doi: 10.1111/bjh.15872. Epub 2019 Mar 28.
22. Veronica H. Flood and J. Paul Scott. Bleeding and Thrombosis. Nelson Pediatric Symptom-Based Diagnosis, 2018.
23. M. J. Flick, T. H. Bugge. Plasminogen–receptor KT: plasminogen activation and beyond. 14 October 2016. doi:10.1111/jth.13541
24. Ruby H. P. Law, corresponding author, Guojie Wu, Eleanor W. W. Leung, Koushi Hidaka, Adam J. Quek, Tom T. Caradoc-Davies, Devadharshini Jeevarajah, Paul J. Conroy, Nigel M. Kirby, Raymond S. Norton, Yuko Tsuda and James C. Whisstock. X-ray crystal structure of plasmin with tranexamic acid–derived active site inhibitors. 2017 May 9; 1(12): 766–771.
25. Law RH, Caradoc-Davies T, Cowieson N et al. The X-ray crystal structure of full-length human plasminogen. 2012 Mar 29;1(3):185-90. doi: 10.1016/j.celrep.2012.02.012.
26. Gabriela Cesarman-Maus 1, Katherine A Hajjar. Molecular mechanisms of fibrinolysis. 2005 May;129(3):307-21. doi: 10.1111/j.1365-2141.2005.05444.x.
27. Andreasen PA, Egelund R, Petersen HH The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis. Cell Mol Life Sci 57: 25-40. February 2000.
28. Ellis V. The Plasminogen Activation System in Normal Tissue Remodeling. In: Behrendt N (ed). Matrix Proteases in Health and Disease: O-BK Wiley, 2012: 25–55.

29. M. Nesheim, I. Bajzar. Historical sketch: The discovery of TAFI. 2005 doi:10.1111/j.1538-7836.2005.01280.x.
30. Muszbek L., Berczky Z., Bagoly Z., Komaromi I., Katona E. Factor XIII: a coagulation factor with multiple plasmatic and cellular functions. *Physiol Rev.* 2011; P 931–972.
31. Момот А.П. Принципы, методы и средства лабораторной диагностики патологии гемостаза на современном этапе // Лаб. диагностика. – 2004. – № 2. – С. 52 – 70.
32. Shan A, Donovan K, MacHugh A, Pandey M, Aaron L, Bradbury CA, Stanworth SJ, Alikhan R, Von Kier S, Maher K, Curry N, Shapiro S, Rowland MJ, Thomas M, Mason R, Holland M, Holmes T, Ware M, Gurney S, McKechnie SR. Thrombotic and hemorrhagic complications in critically ill patients with COVID-19. A multicenter observational study // *Crit Care.* 2020;24(1):561.
33. Emmanuel J Favalaro, Giuseppe Lippi. Coagulation update: what's new in hemostasis testing? *Thromb Res.* 2011 Jan;127 Suppl 2:S13-6. doi: 10.1016/S0049-3848(10)70148-1
34. Giuseppe Lippi and Emmanuel J. Favalaro. Laboratory hemostasis: from biology to the bench. *journal Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, February 19, 2018. doi:10.1515/cclm-2017-1205
35. Antovic J. P., Antovic A., He S, Tengborn L, Blombäck M. Overall haemostatic potential can be used for estimation of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor-dependent fibrinolysis in vivo and for possible follow-up of recombinant factor VIIa treatment in patients with inhibitors to factor VIII. *Haemophilia.* 2002;8 (6); 781–786.
36. Antovic J. P., Antovic A. Does recombinant factor VIIa, apart from overall hemostasis, regulate TAFI dependent fibrinolysis? In vitro analysis using overall hemostasis potential (OHP) assay. *Thromb. Haemost.* 2003; 90; 620–627.
37. Jennifer Curnow. The Overall Hemostatic Potential (OHP) Assay. 2017; 1646:523-531. doi: 10.1007/978-1-4939-7196-1_38.

38. Curnow JL, Morel-Kopp MC, Roddie C, Aboud M, Ward CM. Reduced fibrinolysis and increased fibrin generation can be detected in hypercoagulable patients using the overall hemostatic potential assay. *J Thromb Haemost* 5:528–534. 2007.
39. Reddel C, Curnow J, Voitl J, Rosenov A, Pennings G, Morel-Kopp MC, Brieger D. Detection of hypofibrinolysis in stable coronary artery disease using the overall haemostatic potential assay. *Thromb Res* 131:457–462. 2013.
40. Chow V, Reddel C, Pennings G, Chung T, Ng ACC, Curnow K, Kritharides L. Persistent global hypercoagulability in longterm survivors of acute pulmonary embolism. *Blood Coagul Fibrinolysis* 26(5):537–544. 2015.
41. Chow V, Reddel C, Pennings G, Scott E, Pasqualone T, Ng ACC, Yeoh T, Curnow J, Kritharides L. Global hypercoagulability in patients with schizophrenia receiving longterm antipsychotic therapy. *Schizophr Res* 162:175–182. 2015.
42. С.В. Комісаренко, В.А. Деєв, Е.В. Луговської, І.М. Колеснікова, Т.М. Платонова, Н.Е. Луговська, О.П. Костюченко, В.О. Чернишенко, Д.С. Корольова, Т.М. Чернишенко, О.В. Ліксунов, О.В. Каширова, Е.Е. Романова. Застосування імуноензимних методів для лабораторної діагностики загрози внутрішньосудинного тромбоутворення. – К.: Видавець Бихун В.Ю., 2019.
43. Linkins, L. A. and Takach Lapner, S. Review of D-dimer testing: Good, Bad, and Ugly. *International Journal of Laboratory Hematology*, pp. 98–103. 2017.
44. Heim SW, Schectman JM, Siadaty MS, Philbrick JT. D-dimer testing for deep venous thrombosis: a metaanalysis. *Clin Chem* 2004;50:1136-47.
45. Michiels JJ, Freyburger G, van der Graaf F, Janssen M, Oortwijn W, van Beek EJ. Strategies for the safe and effective exclusion and diagnosis of deep vein thrombosis by the sequential use of clinical score, D-dimer testing, and compression ultrasonography. *Semin Thromb Hemost* 2000;26:657-67.
46. Evangelos Giannitsis, Johannes Mair, Christina Christersson, Agneta Siegbahn, Kurt Huber, Allan S Jaffe, W Frank Peacock, Mario Plebani, Kristian

Thygesen, Martin Möckel, Christian Mueller, Bertil Lindahl. How to use D-dimer in acute cardiovascular care. 2017 Feb;6(1):69-80.

47. Perrier A, Roy PM, Aujesky D, Chagnon I, Howarth N, Gourdier AL, et al. Diagnosing pulmonary embolism in outpatients with clinical assessment, D-dimer measurement, venous ultrasound, and helical computed tomography: a multicenter management study. *Am J Med* 2004;116:291-9.

48. Hong Dai, Hongxing Zhou,¹ Yingxin Sun, Zhe Xu, Shuo Wang, Tongbao Feng, and Ping Zhang. D-dimer as a potential clinical marker for predicting metastasis and progression in cancer. 2018 Nov; 9(5): 453–457.

49. Aldona Siennicka, Magdalena Kłysz, Kornel Chełstowski, Aleksandra Tabaczniuk, Zuzanna Marcinowska, Paulina Tarnowska, Jolanta Kulesza, Andrzej Torbe and Maria Jastrzębska. Reference Values of D-Dimers and Fibrinogen in the Course of Physiological Pregnancy: the Potential Impact of Selected Risk Factors—A Pilot Study. *Biomed Res Int.* 2020; 2020: 3192350.

50. Yun Li, Xingshun Qi, Hongyu Li, Junna Dai, Han Deng, Jing Li, Ying Peng, Xu Liu, Xiaolin Sun and Xiaozhong Guo. D-dimer level for predicting the in-hospital mortality in liver cirrhosis: A retrospective study. *Exp Ther Med.* 2017 Jan; 13(1): 285–289.

51. Mihalyi E., *Ann. N.Y Kinetics and molecular mechanism of the proteolytic fragmentation of fibrinogen.* *Acad. Sci.* 1983; 408; 60-70.

52. Marder V.J., Francis Ch.W., *Ann. N.Y Plasmin degradation of cross-linked fibrin.* *Acad .Sci.* 1983; 408; 389-406.

53. Макогоненко Е.М., Кирпа С.А., Луговской Э.В., Назаренко Н.А., Кудинов С.А. Кинетика активации Глу- и Лиз-фибриногена тканевым активатором в фибриновом сгустке. *Биохимия.* 1987; 52 (10); 1746-1752.

54. Furie B, Furie BC. In vivo thrombus formation // *J Thromb Haemost* 2007; 5 (Suppl. 1): 12–17.

55. Lugovskoy E.V., Gritzenko P.G., Lugovskaya N.E., Kolesnikova I.N., Komisarenko S.V. Soluble fibrin: molecular structure and quantification. *Lab. Diagnostica.* 2006; 3(37): 11-17.

56. S. Kosterin, O. Tsybalyuk, O. Holden Multiparameter analysis of mechanokinetics of the contractile response of smooth muscles // Series on Biomechanics. 2021.-.35, 1.- 14-30.

57. С.О. Костерін, С.О. Карахім Біохімічна кінетика, //Наукова думка. 2021.- С.311.

58. Баркаган З.С., Момот А.П. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза. – 2-е изд., доп. – М.: Ньюдиамед-АО, 2001. – 296.

59. He S, Antovic A, Blomback M. A simple and rapid laboratory method for determination of haemostasis potential in plasma. II. Modifications for use in routine laboratories and research work. Thromb Res 2001;103:P.355–61.