

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ КИЇВСЬКИЙ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ імені ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

Катрій Тетяна Богданівна



УДК: 577.112.7:612.115

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

03.00.04-біохімія

Автореферат
дисертації на здобуття
наукового ступеня кандидата біологічних наук

Київ - 2017

Дисертацією є рукопис

Робота виконана на кафедрі біохімії Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка

Науковий керівник:



доктор біологічних наук, старший науковий співробітник

Савчук Олексій Миколайович,
Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
завідувач кафедри біохімії ННЦ «Інститут біології та медицини»

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук, професор

Шевцова Алла Іванівна,
ДЗ «Дніпропетровська медична академія»,
професор кафедри біохімії та медичної хімії;

доктор біологічних наук, старший науковий співробітник

Верьовка Сергій Вікторович,
ДУ «Інституту отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка НАМН України»,
завідувач лабораторії біохімії

Захист дисертації відбудеться « 18 » грудня 2017 року о 16.00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.001.24 Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: м. Київ, проспект Академіка Глушкова, 2, ННЦ «Інститут біології та медицини», ауд. 434

Поштова адреса: 01601, м. Київ, вул. Володимирська 64/13, Київський національний університет імені Тараса Шевченка, ННЦ «Інститут біології та медицини», спеціалізована вчена рада Д 26.001.24

З дисертацією можна ознайомитись у Науковій бібліотеці ім. М. Максимовича Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: м. Київ, вул. Володимирська, 58

Автореферат розісланий « 16 » листопада 2017 року

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради



Н.Г. Ракша

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. У світовому масштабі понад 5 мільйонів людей помирають від інсульту щороку [Sacco RL., 2006]. В Україні даний діагноз щорічно ставиться більш ніж 100 тис. пацієнтам [Чепелевська ЛА., 2008]. За даними статистики, серед 6-ти пацієнтів, які перенесли інсульт, у 2-ох спостерігається повторне загострення хвороби протягом наступних 5 років. У більшості випадків, летальний рецидив має місце уже через рік після перенесеної гострої фази інсульту [American Heart Association, 2002]. Таким чином, частота рецидивів даного захворювання сягає 30 %, а смертність після них рівна 60 % [Prencipe M., 1998; Burn J., 1994]. На сьогодні, ішемічний інсульт є найбільш поширеним, оскільки він становить близько 70 – 80 % від всіх інсультів.

Відомо, що оптимальна превентивна стратегія варіює для кожного окремого підтипу даної хвороби, тому визначення конкретної причини загострення ішемічного інсульту має вирішальне значення. Проте, навіть після повної діагностики причина виникнення інсульту у 30 % випадків залишаються невизначеною, що різко збільшує відсоток летальних випадків [Ustrell X., 2010]. Слід підкреслити, що для судинних захворювань головного мозку, крім стадійності, характерна фазність клінічного перебігу, а саме прогресування симптомів та поступовий їх регрес. Тому важливе значення має вивчення особливостей клінічного перебігу мозкового інсульту в різні періоди після його виникнення. Більш того, чимало уваги приділяється специфічним білковим маркерам та предикторам гіперкоагуляції. При цьому питання ролі неспецифічних чинників, які прямо або опосередковано можуть відігравати певну роль у дисбалансі тих чи інших ланок системи гемостазу, залишається майже не висвітленим сьогодні.

Оскільки ключовим чинником розвитку даної патології є порушення у системі гемостазу, які часто зберігаються протягом тривалого часу після перенесеного захворювання, то пошук нових та ефективних біомаркерів, які можуть бути застосовані у діагностиці порушень на рівні коагуляційної, фібринолітичної та судинно-тромбоцитарної ланок системи гемостазу є головним флагманом для виявлення пацієнтів з високим рівнем ризику серцево-судинних захворювань [Бурлова-Васильєва М.К., 2014]. Крім цього, дисфункціонування ланок системи гемостазу може призводити до утворення у кровотоці великої кількості білкових молекул чи їх фрагментів, які не є нормою для фізіологічного стану організму. Подальша циркуляція таких неспецифічних молекул білкової природи у руслі кровотоку, в тому числі у віддалений час після загострення хвороби, може представляти собою потенційну загрозу запуску неспецифічних механізмів регуляції окремих реакцій, що протікають організмі [Williams R., 1986; de Groot P., 2014].

На сьогоднішній день, вкрай необхідним є не лише вивчення причин і механізмів розвитку ішемічного інсульту, а також поглиблення та деталізація

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

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

Дисертаційна робота виконана на кафедрі біохімії ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка у рамках науково-дослідної теми «Механізми реалізації адаптаційно-компенсаторних реакцій організму за умов розвитку різних патологій» (№ д/р 0111U004648, 2011-2015 рр.) та «Механізми регуляції метаболічних процесів в організмі за умов розвитку патологічних станів» (№ д/р 0116U002527, 2016-2018 рр.)

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

Для досягнення мети були поставлені наступні завдання:

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

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

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

Методи дослідження: у роботі були використані методи препаративної хроматографії для очищення білкових препаратів з плазми та сироватки крові людини. Активність окремих компонентів гемостатичного каскаду визначали з використанням специфічних хромогенних субстратів. Аналіз функціонування окремих параметрів системи гемостазу проводили за допомогою

хронометричних тестів. Концентрацію окремих білків системи гемостазу визначали методом імуноферментного аналізу на планшетах (ELISA). Якісний склад білкових фракцій плазми крові досліджували методами електрофорезу у поліакриламідному гелі та вестерн-блотингу з використанням специфічних антитіл. Активацію та агрегацію тромбоцитів аналізували за допомогою агрегометра.

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

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

Аналіз показників фібринолітичної ланки системи гемостазу показав значне пригнічення фібринолітичного потенціалу крові при ішемічному інсульті через рік після гострої фази. Також наші результати показали, що у хворих через рік після гострої фази обох підтипів ішемічного інсульту спостерігався аномальний рівень ТАП і ПАІ-1. Визначено, що обидва хронічні підтипи ішемічного інсульту супроводжуються значним подовженням часу лізису еуглобулінів та Хагеман-залежного фібринолізу. Зокрема, останній був подовжений в 1,9 рази за атеротромботичного та в 2,3 рази за кардіоемболічного інсульту у порівнянні з аналогічним показником здорових донорів.

Показано, що IgG за гострої фази обох підтипів інсульту індукували тромботичний ефект, який проявлявся у активації процесу гідролізу хромогенного субстрату тромбіном в середньому на 25 %. При цьому, спостерігалось 30 % інгібування гідролізу хромогенного субстрату головним антикоагулянтним фактором системи гемостазу - протейном С, активованим з його проферменту у плазмі крові, за дії фракції IgG плазми крові пацієнтів з

гострим інсультом обох підтипів. Показано, що фракція IgG плазми крові, як в гостру фазу так і через рік після ішемічного інсульту, здатна активувати агрегацію тромбоцитів здорових донорів.

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

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

Практичне значення одержаних результатів. Отримані результати можуть бути використані при розробці алгоритму лабораторної діагностики стану системи гемостазу та оцінки ефективності проведення відповідної терапії хворих з хронічним кардіоемболічним або атеротромботичним підтипом ішемічного інсульту. Численні відмінності між кількісними та якісними характеристиками досліджуваних параметрів для здорових донорів та пацієнтів, які рік назад перенесли ішемічну атаку, є підтвердженням відсутності повного оздоровлення організму, а отже і загрози рецидиву через рік після лікування гострої фази ішемічного інсульту, незважаючи на проведене лікування.

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

Різниця у якісному складі компонентів білкового профілю плазми пацієнтів з патологіями є підставою для виявлення нових цільових білків, які є

маркерами для призначення терапії та профілактики серцево-судинних захворювань у майбутньому.

Доведені ефекторні властивості імуноглобулінів класу G, які здатні провокувати порушення системи гемостазу в напрямку посилення тромбоутворення, що в свою чергу, може слугувати доказом накопичення антитіл до власних антигенів організму за ішемічного інсульту. Це відкриває новий напрямок дослідження складових імунної системи за патологічної активації ланок системи гемостазу, а також рецидиву ішемічного інсульту.

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

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

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

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

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

наукова конференція “Актуальні проблеми сучасної біохімії” присвячена 100-річчю від дня народження професора Бориса Федоровича Сухомлинова (Львів, 2016), International conference Thombosis and Embolism (Stockholm, Sweden, 2016), 2nd Prague European Days of Internal Medicine (Praque, Chech Republic, 2016), XXXth International Symposium on Technical Innovations in Laboratory Hematology (Honolulu, Hawaii, 2017), Annual meeting of the Scientific and Standardization Committee (SSC) of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH) (Berlin, Germany, 2017), 22nd Congress of the European Hematology Association (Madrid, Spain, 2017), 42th FEBS Congress (Jerusalem, Israel, 2017), 7th International Symposium on Women’s Health Issues in Thrombosis and Haemostasis (Barcelona, Spain, 2017).

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

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається з вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів власних досліджень та їх обговорення, заключення, висновків та списку літературних джерел (245 найменування). Робота викладена на 150 сторінках, проілюстрована 39 рисунками та 19 таблицями.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи досліджень

Для проведення дослідження було виконано клініко-лабораторне обстеження групи пацієнтів з ішемічним інсультом, як у гостру фазу, так і через 1 рік після перенесеної гострої фази хвороби. Група складалася з 122 хворих. Дослідження включало два підтипи гострого ішемічного інсульту: атеротромботичний ішемічний інсульт (n=66) та кардіоеMBOLІчний ішемічний інсульт (n=56). Ці ж групи пацієнтів через 1 рік після гострої фази ішемічного інсульту також були включені у дослідження. Вік пацієнтів складав 73 ± 8 років. Хворі перебували на стаціонарному лікуванні у I та II неврологічних відділеннях Київської міської клінічної лікарні № 4. Діагноз ішемічного інсульту був підтверджений нейровізуально, за допомогою КТ- або МРТ головного мозку. Всі хворі або їх родичі добровільно погодилися на участь у клінічному дослідженні та дали письмову згоду на участь у ньому. Хворі у стані коми, з вираженою дихальною недостатністю або з підозрою на онкологічне захворювання були виключені з дослідження. При надходженні до стаціонару, кожному пацієнту вводили аспірин у дозі 325 мг з наступним щоденним прийомом 100 мг аспірину. З другої доби перебування у стаціонарі пацієнти отримували низькомолекулярний гепарин у профілактичній дозі. В дослідженні взяли участь практично здорові донори (n=35) без тромботичних

захворювань в анамнезі, які за статтю та віком відповідали досліджуваним групам пацієнтів.

Матеріал для дослідження був наданий фахівцями Національного медичного університету імені О.О. Богомольця з дотриманням етичних норм: Гельсінської декларації (1964 р.), Конвенції про захист прав і достоїнства людини у зв'язку з використанням досягнень біології і медицини (Конвенція про права людини і біомедицину 1996 р.), закону України «Про трансплантацію органів та інших анатомічних матеріалів людині (1999 р.)», згідно договору про сумісні дослідження.

Стан системи гемостазу оцінювали за вмістом РФМК [Токар А.В., 1994], протромбінового пулу [Raksha N.G., 2014], вмістом ТАП, ПАІ-1, загальним часом лізису еуглобулінів та Хагеман-залежним фібринолізом, активністю плазміногену та α_2 -антиплазміну [Грицюк О.Й., 1994, Козлов А.А., 2013]. У якості неспецифічних чинників білкової природи досліджувалися IgG (отримані методом афінної хроматографії) та пептиди з молекулярною масою до 5 кДа (отримані за методикою [Ніколайчук В.В., 1991]), які були отримані з плазми крові пацієнтів з АІ та КІ в гостру фазу хвороби та через 1 рік після неї. Характеристику одержаних фракцій проводили електрофоретично в 7,5-12 % ДСН-ПААГ за методом *Laemmli* [Hockfield S., 1993] та за допомогою хроматографії, що розподіляє за розміром, використовуючи носій Superdex 200 [Huse K., 2002], протеїн А-сефарозу, Superdex 75 [Huse K., 2002] та Sephadex 15 [Hong *et al.*, 2012]. Вестерн-блотинг та імуноферментний аналіз (ELISA) досліджуваних фракцій здійснювали відповідно до стандартного протоколу [Harlow Ed, 1988; Hockfield S., 1993]. Дослідження агрегації тромбоцитів проводили на фотооптичному агрегометрі AP2110 «Солар» (Білорусь) [Голдобин В.В., 2012]. Потенційний вплив IgG та ПП на функціонування ключових факторів системи гемостазу визначали, використовуючи специфічні хромогенні субстрати [Katrii T, 2016; Козлов А, 2013].

Аналіз електрофореграм та вестерн-блотограм проводили за допомогою TotalLab 2. 01. Статистичну обробку та аналіз експериментальних даних проводили з використанням Origin 7.0. Вірогідність результатів визначали за t-критерієм Стьюдента. Криві, що представлені на рисунках, є типовими для серії повторних дослідів.

Результати досліджень та їх обговорення

Стан системи гемостазу у пацієнтів з атеротромботичним та кардіоемболічним ішемічним інсультом через 1 рік після гострої фази. Оцінка загального стану системи гемостазу пацієнтів, які 1 рік назад перенесли гостру фазу ішемічного інсульту, свідчить про відсутність повного відновлення організму через 1 рік після захворювання, отже порушення та відхилення від норми зберігається навіть у віддалені терміни після загострення (табл. 1).

Показники системи гемостазу у пацієнтів з атеротромботичним та кардіоеMBOLІЧНИМ іШЕМІЧНИМ ІНСУЛЬТОМ

Досліджуваний параметр	Донори	АП 1 рік	КІІ 1 рік
Концентрація РФМК, мкг/мл	2,0 ± 0,1	8,1 ± 2,6*	14,8 ± 3,4*
Вміст протромбінового пулу, у.о./мл	0,47 ± 0,02	0,47 ± 0,08	0,43 ± 0,08
Активність плазміногену, %	100 ± 5,0	91,3 ± 3,5	93,4 ± 8,4
Активність α2-антиплазміну, %	100 ± 5,0	90,8 ± 3,9	91,1 ± 6,5
Рівень фактору фон Віллебранда, %	100 ± 5,0	145 % (для 75 % досліджуваних) 100 % (для 25 % досліджуваних)	160 % (для 70 % досліджуваних) 100 % (для 30 % досліджуваних)
Рівень інгібітору активаторів плазміногена 1 типу, %	100 ± 5,0	140 % (для 20 % досліджуваних) 100 % (для 80 % досліджуваних)	135 % (для 25 % досліджуваних) 100 % (для 75 % досліджуваних)
Рівень тканинного активатора плазміногена, %	100 ± 5,0	130 % (для 55 % досліджуваних) 65 % (для 20 % досліджуваних) 100 % (для 25 % досліджуваних)	120 % (для 35 % досліджуваних) 70 % (для 15 % досліджуваних) 100 % (для 50 % досліджуваних)
Кількість тромбоцитів, ×1000/мкл	205,6 ± 47,6	162,9 ± 35,8	177,5 ± 39,1
Ступінь агрегації тромбоцитів, %	66,2 ± 6,5	55,8 ± 9,6	60,6 ± 21,4

* - достовірні зміни відносно контролю, $p \leq 0,05$, АП 1 рік – пацієнти, які 1 рік назад перенесли гостру фазу атеротромботичного ішемічного інсульту; КІІ 1 рік – пацієнти, які 1 рік назад перенесли гостру фазу кардіоеMBOLІЧНОГО іШЕМІЧНОГО ІНСУЛЬТУ.

Показано збереження підвищеної концентрації РФМК у плазмі крові пацієнтів через 1 рік після перенесеного АП, що становила $8,1 \pm 2,6$ мкг/мл, а для пацієнтів з КІІ цей показник відповідав $14,8 \pm 3,4$ мкг/мл (табл.1). Вміст протромбінового пулу для хворих через 1 рік АП та КІІ відповідав показнику здорових донорів, який становив $0,47 \pm 0,02$ у.о./мл.

Щодо рівня vWF у плазмі крові досліджуваних груп пацієнтів, була показана дивергенція на дві групи пацієнтів, які 1 рік назад перенесли гостру фазу АП. Беручи рівень vWF здорових донорів за 100 %, можемо стверджувати, що лише у 75 % пацієнтів з АП рівень vWF перевищував показник практично здорових донорів в середньому на 45 %. Серед пацієнтів, які 1 рік назад перенесли гостру фазу АП, у 25 % досліджуваних рівень vWF відповідав рівню здорових донорів. Для 30 % від усіх пацієнтів з КІІ рівень vWF відповідав показнику практично здорових донорів. Проте для 70 % хворих КІІ через 1 рік

після ішемічної атаки рівень vWF був в середньому на 60% більший ніж у здорових донорів.

Наші результати показують, що у хворих через 1 рік після гострої фази обох підтипів ішемічного інсульту рівень ТАП і ПАІ-1 відрізнялися від норми, а саме, 25 % пацієнтів, через 1 рік після КІІ мали вищий рівень ПАІ-1 на 35 %. Для 20 % пацієнтів через 1 рік після АІІ рівень ПАІ-1 був на 40 % вищий в порівнянні з нормою (табл.1).

Для 35 % пацієнтів з КІІ був характерний на 20 % вищий рівень ТАП, але 15 % пацієнтів мали на 30 % нижчий рівень ТАП. 55 % пацієнтів з АІІ показали на 30 % вищий рівень, і 20 % пацієнтів, на 35 % нижчий рівень ТАП порівняно з нормою (табл.1).

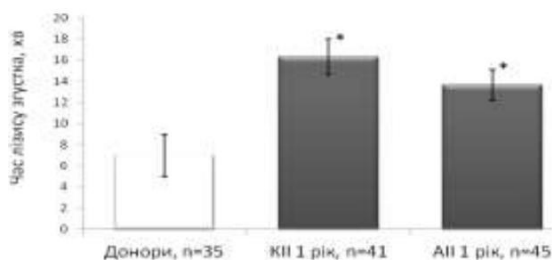


Рис. 1. Рівень Хагеман-залежного фібринолізу у хворих з ішемічним інсультом; * - статистично достовірно порівняно з донорами, $p \leq 0,05$.

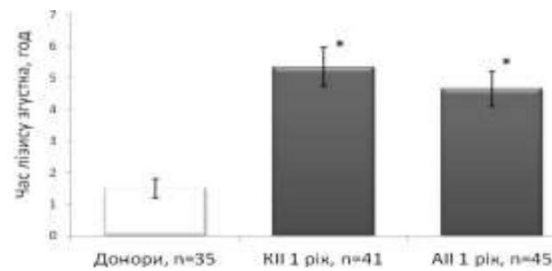


Рис. 2. Час лізису еуглобулінів у хворих з ішемічним інсультом; * - статистично достовірно порівняно з донорами, $p \leq 0,05$.

Показано значне подовження часу Хагеман-залежного фібринолізу для обох патологій (рис. 1). Через 1 рік після перенесеної гострої фази АІІ, досліджуваний показник був в 1,9 рази подовжений, а для КІІ в 2,3 рази подовжений в порівнянні з показником здорових донорів. Час лізису еуглобулінів у хворих, які 1 рік назад перенесли ішемічний інсульт був значним продовжений (рис. 2). Таким чином, виявлені зміни є свідченням низької фібринолітичної здатності плазми крові у пацієнтів, які перенесли ішемічний інсульт, навіть через 1 рік після гострої фази.

В ході проведених досліджень нами було показано, що через 1 рік після перенесеної гострої фази ішемічного інсульту, відповідно до більшості досліджених нами параметрів системи гемостазу, тромботична загроза в організмі пацієнтів зберігається. Отже, високим є ризик повторного загострення ішемічного інсульту навіть по проходженні 1 року після ішемічної атаки.

Оскільки підвищена концентрація РФМК у плазмі є маркером наявності гіперкоагуляційного стану, тому наше наступне дослідження було зосереджене на характеристиці їх якісного складу. Було показано присутність протеїнів від 35 і до більш ніж 330 кДа у фракції РФМК, отриманої з плазми крові пацієнтів з ішемічним інсультом у гострій фазі хвороби. Фракції РФМК хворих через 1 рік після загострення обох підтипів інсульту мали ще більш різноманітний вміст, а саме, вміщували білки, їх фрагменти та комплекси з молекулярними масами від 10 до 330 кДа та вище (рис. 3). Результати хроматографії, що поділяє за розмірами, доповнюють вестерн блот аналіз фракції РФМК, та засвідчують

присутність у досліджуваних фракціях білків, їх фрагментів та комплексів з молекулярними масами від 45 до більш ніж 330 кДа (рис. 4).

Оскільки тромбін є пусковим фактором коагуляції, наступним етапом було якісне дослідження протромбінового пулу у складі фракції вітамін К-залежних білків плазми крові пацієнтів з АП та КІІ. Показано, що фракції вміщували білки, їх фрагменти та комплекси з молекулярними масами від 30 до 250 кДа. Білки з молекулярною масою 70 кДа та 37 кДа відповідають протромбіну та тромбіну (рис. 5,6). Відмінності між кількісними та якісними характеристиками фракцій свідчать про порушення системи гемостазу через рік після хвороби.

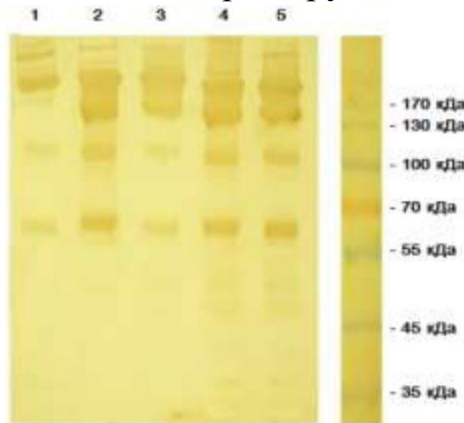


Рис. 3. Блоттограма фракції РФМК плазми крові: 1-здорові донори; 2-пацієнти з АП; 3-пацієнти з КІІ; 4-пацієнти з АП 1 рік; 5-пацієнти з КІІ 1 рік.

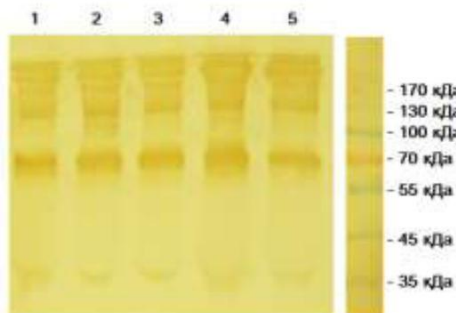


Рис. 5. Блоттограма вітамін К-залежних білків плазми крові: 1-здорових донорів; 2 – пацієнтів з АП; 3-пацієнтів з КІІ; 4 – пацієнтів з АП 1 рік; 5-пацієнтів з КІІ 1 рік

Отримані результати висвітлюють якісні відмінності складу фракцій РФМК та протромбінового пулу у пацієнтів з АП та КІІ на різних стадіях захворювання.

Дослідження ефекторних властивостей IgG утворених в організмі за атеротромботичного та кардіоеMBOLІчного підтипів ішемічного інсульту. Дослідження коливання вмісту аутоантитіл, що утворюються за ішемічного

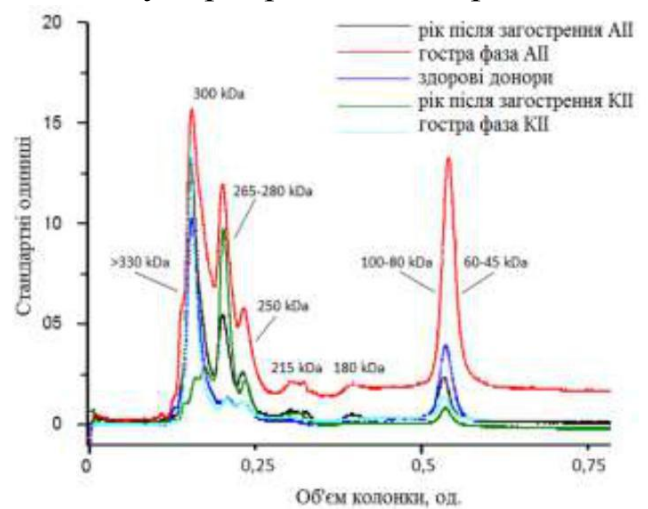


Рис. 4. Хроматограма фракції РФМК плазми крові пацієнтів з ішемічним інсультом.

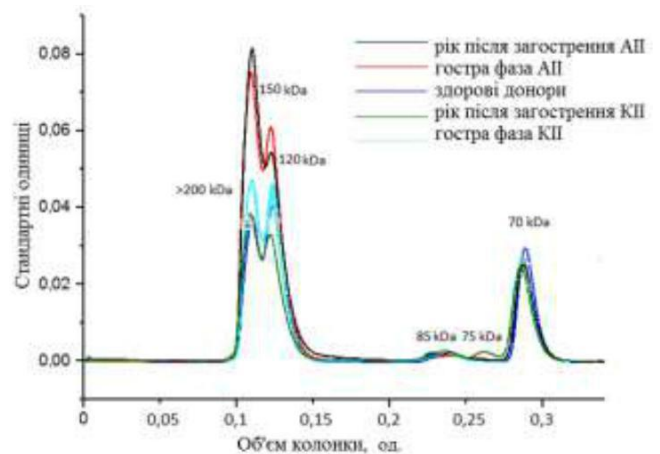


Рис. 6. Хроматограма фракції вітамін К-залежних білків плазми крові пацієнтів з ішемічним інсультом

інсульту та через 1 рік у цих самих пацієнтів показало підвищення концентрації в гостру фазу АІІ (за АІІ – $9,5 \pm 0,3$ мг/мл та за КІІ - $7,7 \pm 0,4$ мг/мл) та повернення її у норму через 1 рік після загострення АІІ (донори та пацієнти через 1 рік після АІІ або КІІ - $6,7 \pm 0,5$ мг/мл в середньому). Зважаючи на це, ми припустили, що можливий вплив аутоантитіл може бути пов'язаний з якісним складом цих білкових молекул в кровотоці.

Тому наступним етапом було дослідження впливу IgG у концентрації 1,2 мг/мл, отриманих з плазми крові пацієнтів з АІІ та КІІ в гострий період хвороби та через 1 рік після неї, на процес гідролізу хромогенного субстрату факторами системи гемостазу (тромбіном та фактором Ха) (табл. 2). Отримані результати засвідчують, що IgG гострої фази КІІ підвищували швидкість гідролізу субстрату тромбіном на 28 % та АІІ на 20 %. Показано інгубуючий ефект IgG на процес гідролізу хромогенного субстрату фактором Ха в середньому на 10%.

Таблиця 2

Гідроліз хромогенного субстрату факторами системи гемостазу за дії IgG

	Контроль (без IgG)	IgG донорів	IgG пацієнтів з КІІ		IgG пацієнтів з АІІ	
			Гостра фаза	1 рік	Гостра фаза	1 рік
Тромбін	$0,50 \pm 0,030$	$0,51 \pm 0,020$	$0,65 \pm 0,030^*$	$0,55 \pm 0,060$	$0,61 \pm 0,020^*$	$0,46 \pm 0,040$
Фактор Ха	$0,59 \pm 0,009$	$0,60 \pm 0,009$	$0,57 \pm 0,007^*$	$0,55 \pm 0,008^*$	$0,55 \pm 0,006^*$	$0,57 \pm 0,008^*$
Тромбін #	$0,66 \pm 0,011$	$0,67 \pm 0,013$	$0,57 \pm 0,006^*$	$0,47 \pm 0,021^*$	$0,59 \pm 0,031^*$	$0,48 \pm 0,028^*$
Протеїн С_A #	$0,31 \pm 0,011$	$0,31 \pm 0,015$	$0,23 \pm 0,010^*$	$0,30 \pm 0,017$	$0,22 \pm 0,016^*$	$0,28 \pm 0,020$

* - достовірні зміни відносно контролю, $p \leq 0,05$; # активація відповідного проферменту у плазмі крові екзогенним активатором

Також ми дослідили потенційний вплив IgG на процес активації проферменту (протромбіну, протеїну С) у плазмі крові та подальший гідроліз хромогенного субстрату відповідними ферментами (тромбіном та протеїном С_A) (табл. 2). Показано, що фракція IgG плазми пацієнтів з АІІ сповільнювала гідроліз субстрату тромбіном, активованим з протромбіну на 12 % у гостру фазу хвороби, та на 27 % через 1 рік після АІІ. В той час, фракція IgG за КІІ сповільнювала гідроліз на 15 % у гострій фазі, та на 30 % через 1 рік після КІІ. На 29 % сповільнювався гідроліз субстрату протеїном С, в результаті його активації у плазмі крові, за дії фракції IgG за гострого АІІ та КІІ (табл. 2).

Наступним етапом досліджували вплив фракції IgG, утворених в організмі за ішемічного інсульту, на АДФ-залежну агрегацію тромбоцитів (табл.3).

Таблиця 3

Вплив IgG пацієнтів з ішемічним інсульту на агрегацію тромбоцитів

Досліджувана група		Ступінь агрегації тромбоцитів, %
Контрольна агрегація		$42,5 \pm 5,2$
Здорові донори		$42,3 \pm 8,1$
Пацієнти з АІІ	Гостра фаза	$63,6 \pm 5,6^*$
	1 Рік	$51,8 \pm 10,4$
Пацієнти з КІІ	Гостра фаза	$61,1 \pm 5,2^*$
	1 Рік	$48,4 \pm 11,5$

* достовірно порівняно з контролем, $p \leq 0,05$.

Нами показано, що фракція IgG, отримана в гостру фазу хвороби, здатна активувати агрегацію тромбоцитів. Проте через 1 рік після ішемічного інсульту цей ефект зникає.

На наступному етапі фракцію IgG інкубували з фракцією тромбоцитів та у середовищі інкубації детектували білки, які у нормі містяться у гранулах тромбоцитів та вивільняються у разі активації останніх (рис. 7).

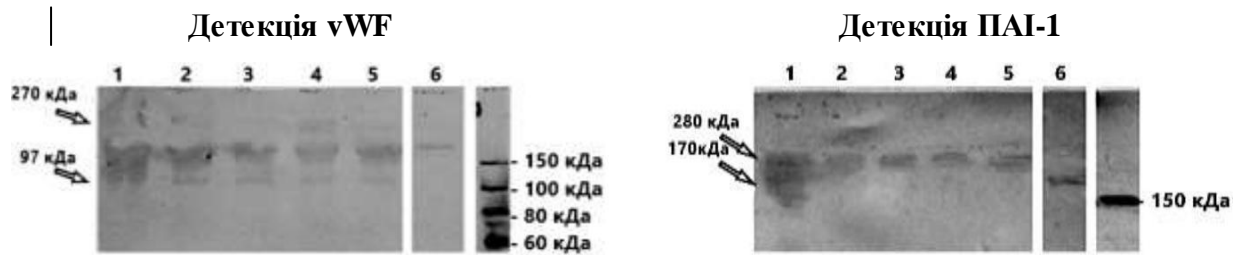


Рис. 7. Вестерн-блоттограма vWF та ПАІ-1 у середовищі інкубації тромбоцитів з IgG: 1- здорові донори; 2-пацієнти з АІІ; 3 - пацієнти з КІІ; 4- пацієнти з АІІ 1 рік; 5- пацієнти з КІІ 1 рік; 6- контроль (колаген)

Було показано, що на відміну від колагену, який виступав контролем, IgG плазми крові пацієнтів з ішемічним інсультом та здорових донорів, спричинюють секрецію vWF 270 кДа, його комплексних форм: 300 кДа та 333 кДа, та фрагментних форм: 240 кДа, 167 кДа, 97 кДа.

Також, за дії IgG плазми крові пацієнтів з ішемічним інсультом та здорових донорів з тромбоцитів вивільняються комплексні форми ПАІ-1: 280 кДа та 210 кДа. Фрагмент ПАІ-1 з молекулярною масою 170 кДа вивільнявся лише за дії IgG здорових донорів та колагену.

Дослідження ефекторних властивостей пептидного пулу утвореного в організмі за атеротромботичного та кардіоеMBOLІчного ішемічного інсульту.

Наступним завданням було проаналізувати потенційний ефекторний вплив фракції пептидів з молекулярною масою до 5 кДа отриманої з плазми крові пацієнтів досліджуваних груп. Підвищення концентрації пептидного пулу (ПП) в понад 2 рази, було показано для пацієнтів з гострим АІІ та КІІ. Проте через 1 рік після гострої фази концентрація ПП поверталася до норми. Досліджували вплив ПП пацієнтів з ішемічним інсультом на АДФ-залежну агрегацію тромбоцитів (табл.4). Показано, що ПП здорових донорів інгібував агрегацію тромбоцитів на 10 %. ПП за гострого АІІ пригнічував агрегацію тромбоцитів на 12 % та за гострого КІІ

на 23 %. Через 1 рік після перенесеного захворювання інгібуючий ефект підсилювався та становив в середньому 35 %.

Таблиця 4

Вплив пептидного пулу плазми крові пацієнтів з ішемічним інсультом на АДФ-індуковану агрегацію тромбоцитів

		Ступінь агрегації тромбоцитів, %
Контрольна агрегація		61 ± 1,2
ПП здорових донорів		55 ± 1,5*
ПП пацієнтів з АІІ	Гостра фаза	53 ± 2,1*
	1 Рік	47 ± 2,3*
ПП пацієнтів з КІІ	Гостра фаза	48 ± 2,4*
	1 Рік	44 ± 1,6*

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

Наступним етапом було дослідження якісного складу ПП (рис. 8). Пептидному пулу здорових донорів була характерна наявність лише одного піку, на противагу, якісний склад ПП пацієнтів з ішемічним інсультом був більш різноманітний та вмщував 7-8 піків залежно від підтипу інсульту та стадії хвороби.

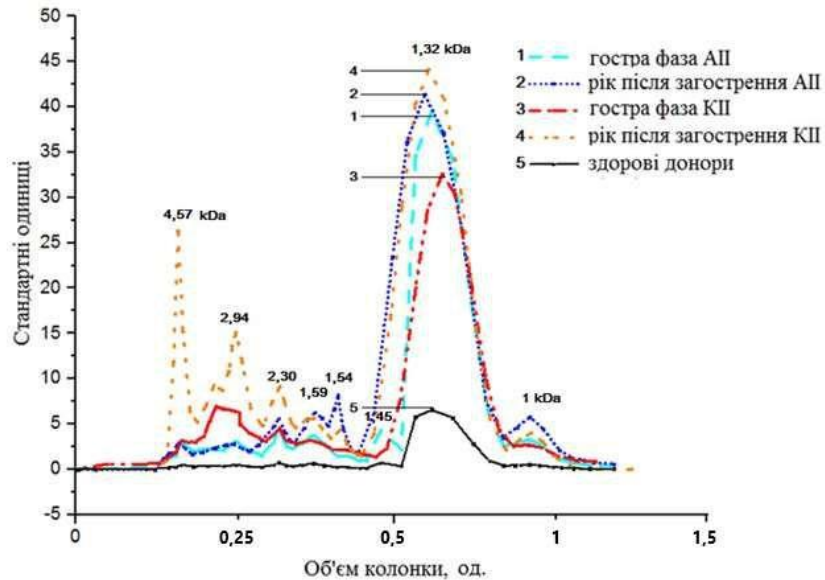


Рис.8.Хроматограма пептидного пулу плазми крові пацієнтів з ішемічним інсультом

Наступним етапом було дослідження впливу ПП, отриманого з плазми крові пацієнтів з АІІ та КІІ, як в гострий період хвороби так і через 1 рік після неї, на процес гідролізу хромогенного субстрату факторами системи гемостазу (тромбіном та фактором Ха). Обрана для дослідження концентрація ПП відповідала концентрації пептидного пулу в плазмі крові пацієнтів з відповідним підтипом ішемічного інсульту на відповідній стадії захворювання. Окрім цього, перевіряли вплив ПП у концентраціях втричі більшій, вдвічі меншій, та в чверть меншій за таку.

Показано сповільнення гідролізу субстрату тромбіном на 20 % за дії ПП донорів у концентраціях менших за концентрації пептидного пулу в плазмі крові пацієнтів у відповідних умовах. Показано пришвидшення гідролізу субстрату фактором Ха в середньому від 40 до 80 % за дії усіх фракцій ПП залежно від концентрації (табл.5).

Також було досліджено вплив фракції ПП на процес активації протромбіну, протеїну С у плазмі крові та подальший гідроліз хромогенного субстрату цими ферментами (табл. 6). Гідроліз хромогенного субстрату тромбіном, після його активації у плазмі за дії фракції ПП, як донорів, так пацієнтів з ішемічним інсультом, пришвидшився в середньому на 10 - 15 %. Пришвидшення гідролізу субстрату активованим протеїном С, після його активації у плазмі крові, за дії фракції донорів складав в середньому 20 %. Ефекторна дія фракції пацієнтів з ішемічним інсультом полягала в пришвидщенні гідролізу на 25 – 30 % в середньому.

Гідроліз хромогенного субстрату тромбіном та фактором Ха за дії ПП

Контроль				
Фактор Ха, ум.од.	0,391±0,02			
Тромбін, ум.од.	0,4242±0,02			
Пептидний пул, донори				
	0,204 мг/мл	0,068 мг/мл	0,034 мг/мл	0,017 мг/мл
Фактор Ха, ум.од.	0,346±0,02	0,62±0,02*	0,687±0,04*	0,455±0,02
Тромбін, ум.од.	0,4242±0,01	0,463±0,02	0,347±0,02*	0,374±0,02*
Пептидний пул, гостра фаза АІ				
	0,642 мг/мл	0,214 мг/мл	0,107 мг/мл	0,053 мг/мл
Фактор Ха, ум.од.	0,403±0,01	0,688±0,02*	0,724±0,02*	0,514±0,03
Тромбін, ум.од.	0,404±0,01	0,457±0,04	0,509±0,02*	0,457±0,01*
Пептидний пул, 1 рік після гострої фази АІ				
	0,297 мг/мл	0,099 мг/мл	0,049 мг/мл	0,024 мг/мл
Фактор Ха, ум.од.	0,401±0,01	0,665±0,03*	0,709±0,04*	0,441±0,03
Тромбін, ум.од.	0,443±0,01	0,408±0,02	0,434±0,04	0,379±0,01*
Пептидний пул, гостра фаза КІ				
	0,522 мг/мл	0,174 мг/мл	0,107 мг/мл	0,053 мг/мл
Фактор Ха, ум.од.	0,38±0,01	0,595±0,02*	0,709±0,03*	0,453±0,01
Тромбін, ум.од.	0,327±0,01*	0,456±0,01	0,458±0,01	0,47±0,02
Пептидний пул, 1 рік після гострої фази КІ				
	0,207 мг/мл	0,069 мг/мл	0,034 мг/мл	0,017 мг/мл
Фактор Ха, ум.од.	0,352±0,01	0,543±0,03	0,709±0,05	0,411±0,02
Тромбін, ум.од.	0,354±0,02*	0,444±0,04	0,431±0,02	0,431±0,02

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

Таблиця 6

Гідроліз хромогенного субстрату ферментами активованими у плазмі крові за дії ПП

Контроль				
Протеїн Са, ум.од.	0,895±0,02			
Тромбін, ум.од.	0,714±0,01			
Пептидний пул, донори				
	0,204 мг/мл	0,068 мг/мл	0,034 мг/мл	
Протеїн Са, ум.од.	1,064±0,03*	1,033±0,01*	1,129±0,03*	
Тромбін, ум.од.	0,709±0,02	0,775±0,01*	0,775±0,01*	
Пептидний пул, гостра фаза АІ				
	0,642 мг/мл	0,214 мг/мл	0,107 мг/мл	
Протеїн Са, ум.од.	0,774±0,03	1,054±0,01*	1,033±0,02*	
Тромбін, ум.од.	0,729±0,01	0,751±0,01*	0,772±0,01*	
Пептидний пул, 1 рік після гострої фази АІ				
	0,297 мг/мл	0,099 мг/мл	0,049 мг/мл	
Протеїн Са, ум.од.	0,766±0,04	1,048±0,03*	1,008±0,03*	
Тромбін, ум.од.	0,769±0,02*	0,761±0,01*	0,748±0,01*	
Пептидний пул, гостра фаза КІ				
	0,522 мг/мл	0,174 мг/мл	0,107 мг/мл	
Протеїн Са, ум.од.	0,888±0,03	0,855±0,02	1,01±0,02*	
Тромбін, ум.од.	0,729±0,01	0,776±0,004	0,813±0,01*	
Пептидний пул, 1 рік після гострої фази КІ				
	0,207 мг/мл	0,069 мг/мл	0,034 мг/мл	
Протеїн Са, ум.од.	1,013±0,01	1,049±0,04*	1,069±0,04*	
Тромбін, ум.од.	0,664±0,01	0,751±0,003	0,785±0,01*	

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

Наступним етапом дослідження ефекторних властивостей пептидного пулу була перевірка їх здатності активувати тромбоцити (рис. 9).



Рис.9. Вестерн-блоттограма vWF і ПАІ-1 у середовищі інкубації тромбоцитів з IgG: 1- здорові донори; 2- пацієнти з АІ; 3- пацієнти з КІ; 4- пацієнти з АІ 1 рік; 5- пацієнти з КІ 1 рік; 6- контроль (пул білків плазми крові донорів); 7- контроль (середовище інкубації тромбоцитів без чинників)

У середовищі інкубації було виявлено вільну форму vWF 270 кДа та комплексну форму ПАІ-1 170 кДа за дії фракції ПП донорів і пацієнтів з ішемічним інсультом, що є свідченням здатності ПП активувати тромбоцити шляхом вивільнення з α -гранул останніх ПАІ-1 та vWF

ВИСНОВКИ

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

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

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

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

4. Встановлено, що IgG гострої фази обох підтипів інсульту здійснювали тромботичний ефект, який проявлявся у пригніченні процесу гідролізу специфічного хромогенного субстрату головним антикоагулянтним фактором гемостазу - протеїном С, а також у активації аналогічного процесу пусковим фактором зсідання крові – тромбіном.

5. Показано, що фракції пептидного пулу пацієнтів з ішемічним інсультом, проявляли максимальні ефекторні властивості по відношенню до фактора X, пришвидшуючи гідроліз хромогенного субстрату фактором Xa на 80 %. Доведено, що аналогічна дія тромбіну пригнічувалася пептидним пулом здорових донорів, проте активувалася під впливом пептидного пулу пацієнтів з гострим ішемічним інсультом, але через 1 рік після ішемічної атаки, пептидний пул втрачав свою здатність пришвидшувати гідроліз субстрату тромбіном.
6. Показано, що фракція IgG як в гостру фазу так і через рік після перенесеного ішемічного інсульту здатна активувати агрегацію тромбоцитів здорових донорів. Доведено, що пептидний пул здатний спричинювати інгібуючий вплив на АДФ-залежну агрегацію тромбоцитів здорових донорів, через рік після перенесеного захворювання інгібуючий ефект патологічних фракцій збільшувався. Доведено, що як IgG так і пептидний пул здатні активувати тромбоцити, шляхом вивільнення з α -гранул останніх фактору фон Віллебранда та інгібітора активаторів плазміногену 1-го типу.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

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

- Серія: Проблеми регуляції фізіологічних функцій. 2016; 2(21): 53-57.
(*Особистий внесок здобувача – отримання фракції протромбінового пулу*)
7. Katrii TB., Shandyuk VYu., Raksha NG., Halenova TI., Shershnov OV., Melnyk VS., Savchuk OM. Fibrinolysis parameters in the acute and post ischemic stroke patients. Journal of Applied Pharmaceutical Science. 2017; 7(04): 96-102.
(*Особистий внесок здобувача – вимірювання параметрів фібринолізу пацієнтів з ішемічним інсультом*)
 8. Katrii TB., Shabanova NV., Ostapchuk S., Savchuk OM. The characterization of the Soluble fibrin monomer complexes in patients with acute and one year post acute ischemic stroke. Bulletin of Kyiv National Taras Shevchenko Series: Problems of regulation of physiological functions. 2017; 1(22): 58-61. (*Особистий внесок здобувача – отримання та характеристика досліджуваних фракцій РФМК*)
 9. Katrii TB. Coagulant and fibrinolytic status in atherothrombotic and cardioembolic ischemic stroke. 21th ISCOMS. Groningen, Netherlands. 3-6 June 2014, P.485.
 10. Katrii TB, Ostapchenko LI, Vovk TB, Kravchenko NK. The functioning of parameters haemostasis system under influence IgG from patients with ischemic stroke. 40th FEBS Congress. Berlin, Germany. June 4-9, 2015, P. 646.
 11. Katrii TB, Savchuk OM. Effectors properties of IgG from ischemic stroke patients. 22th ISCOMS. Groningen, Netherlands. June 2-5 2015, P.485.
 12. Катрій ТБ, Шабанова НВ, Вовк ТБ, Кравченко НК. IgG плазми крові хворих ішемічним інсультом потенційні ефектори системи гемостазу. XI Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь і поступ в біології». Львів, Україна. 20 - 25 квітня 2015 року, С. 128-129.
 13. Katrii TB, Savchuk OM, Ostapchenko LI. The effect of IgG of ischemic stroke patients on the platelet proteins secretion. ISTH. Toronto, Canada. June 20-2, 2015, P.345.
 14. Katrii TB, Savchuk OM. Qualitative composition of the acute stroke and post stroke peptide pool fraction. EHA Scientific Conference on Bleeding Disorders. Barcelona, Spain. Vol.101, S2, Sep.14-17, 2016, P.16.
 15. Katrii TB, Halenova TB, Savchuk OM. Peptides from Bloodstream of the Ischemic Stroke Patients as Effectors of Platelets Aggregation. 2nd International Conference on Biosciences Research (ICBR). Owerri, Nigeria. November 24-27, 2016, P 31.
 16. Катрій ТБ, Шабанова НВ, Терещенко ІС, Даховник АГ. IgG з плазми крові хворих ішемічним інсультом в гостру фазу та через рік після перенесеної хвороби як потенційні ефектори системи гемостазу. Міжнародна наукова конференція “Актуальні проблеми сучасної біохімії” присвячена 100-річчю від дня народження професора Бориса Федоровича Сухомлинова. Львів, Україна. 16-18 листопада, 2016, С. 368.
 17. Katrii TB, Savchuk OM, Vovk TB. Post-Stroke as well as Acute Stroke IgG as a Potential Effector of Haemostasis System. International conference Thombosis and Embolism. Stockholm Sweden. 17-18 November, 2016, P.32.

18. Katrii TB, Savchuk OM. Amidolytic thrombin activity under the ischemic stroke peptide pool influence. 61st Annual Meeting of the Society of Thrombosis and Hemostasis Research (GTH). Basel, Switzerland. 15-18 February, 2017, P. 34.
19. Katrii TB, Savchuk OM. Amidolytic activity of haemostasis factors activated from zymogens in plasma under influence of stroke peptide pool. 2nd Prague European Days of Internal Medicine. Prague, Czech Republic. 1-2 Dec., 2016, P.32.
20. Катрій ТБ, Шабанова НВ, Савчук ОМ. Концентрація РФМК у плазмі крові хворих на ішемічний інсульт. XIV International Scientific Conference of Students, PhD Students & Young Scientists Shevchenkivska vesna: Biology, April 6-8, 2016, Kyiv, Ukraine. P.211-212.
21. Katrii TB, Vovk TB, Savchuk OM. The proteins with prothrombine origine in blood plasma of ischemic stroke patients as a markers of hipercoagulation. XXVI Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis and 63rd Annual Scientific and Standardization Committee (SSC) Berlin, Germany. 8 - 13 July, 2017. P.580.
22. Katrii TB, Vovk TB, Savchuk OM. The quality composition of soluble fibrin monomer complex for acute and post acute ischemic stroke patients. 22nd Congress of the European Hematology Association to be held in Madrid, Spain from June 22 - 25, 2017. P. 648-649.
23. Katrii TB, Shabanova NV, Savchuk OM. Composition of soluble fibrin monomer complex in plasma of patients with ischemic stroke Papers and Abstracts of the 7th International Symposium on Women's Health Issues in Thrombosis and Haemostasis. March 3-5, 2017, Barcelona, Spain Thrombosis Research Vol. 151, Supplement 1, P. S111.

АНОТАЦІЯ

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

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

Під час виконання дисертаційної роботи вперше було проведено комплексне дослідження функціонування ланок системи гемостазу за різних підтипів ішемічного інсульту у віддалені терміни після перенесеної гострої фази захворювання.

Згідно отриманих результатів, у пацієнтів по проходженні 1 року після ішемічного інсульту спостерігалася тенденція до зменшення рівня гіперкоагуляційного стану в організмі порівняно з показниками у гострій фазі, проте, загроза тромбозу в організмі залишалася присутньою. Результати доводять, що такі показники як: концентрація РФМК та Хагеман-залежний фібриноліз є найбільш інформативними для діагностики пацієнтів з ішемічним інсультом через 1 року після гострої фази. Показано пригнічення фібринолітичного потенціалу організму при ішемічному інсульті через 1 рік

після гострої фази. Результати дозволяють ідентифікувати протеїни, їх фрагменти та комплекси, які наявні лише у патологічних фракціях РФМК та протромбінового пулу, та які, потенційно, можуть відігравати ключову роль у загостренні ішемічного процесу. Доведені ефекторні властивості IgG, утворених в організмі за ішемічного інсульту, в напрямку посиленого тромбоутворення. Це відкриває новий напрямок дослідження складових імунної системи за патологічної активації системи гемостазу. Показано антитромботичний вплив пептидів з молекулярною масою до 5 кДа, який може бути використаний для корекції лікування та попередження рецидиву досліджуваних патологічних станів організму.

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

АННОТАЦІЯ

Катрий Т.Б. Функционирование системы гемостаза у пациентов с ишемическим инсультом на разных стадиях болезни. - Квалификационная научный труд на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04-биохимия. - ННЦ «Институт биологии и медицины», Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, 2017.

В диссертационной работе впервые было проведено комплексное исследование функционирования сосудисто-тромбоцитарного, коагуляционного и фибринолитического звеньев системы гемостаза при различных подтипов ишемического инсульта в отдаленные сроки после перенесенной острой фазы заболевания.

Согласно полученным результатам, у пациентов по прохождении 1 года после ишемического инсульта наблюдалось тенденция к уменьшению уровня гиперкоагуляционные состояния в организме, по сравнению с показателями в острой фазе, однако, угроза тромбоза в организме все еще присутствовала. Результаты показывают, что такие показатели как: концентрация РФМК и Хагеман-зависимый фибринолиз являются наиболее информативными для диагностики пациентов с ишемическим инсультом по прохождению 1 года. Показано угнетение фибринолитического потенциала организма через 1 год после ишемического инсульта. Исследования позволяют идентифицировать протеины, их фрагменты и комплексы, которые имелись только в патологических фракциях РФМК и протромбинового пула, и которые, потенциально, могут играть ключевую роль в обострении ишемического процесса. Доказанные эффекторные свойства IgG при ишемическом инсульте, а именно, их способность оказывать влияние на уровне системы гемостаза в направлении усиленного тромбообразования. Показано антитромботическое влияние пептидов с молекулярной массой до 5 кДа. Результаты могут

использоваться для коррекции лечения и предупреждения рецидива исследуемых патологических состояний организма.

Ключевые слова: атеротромботический ишемический инсульт, кардиоэмболический ишемический инсульт, система гемостаза, гиперкоагуляция, фибринолиз, сосудисто-тромбоцитарного звена системы гемостаза, иммуноглобулины класса G, пептидный пул.

SUMMARY

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

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

The comprehensive study of the hemostasis system of the patients with the different subtypes of ischemic stroke during the acute phase as well as 1 year past acute phase was carried out. The influence of nonspecific protein factors on the key parameters of the hemostasis system was investigated.

The concentration of the SFMC in the plasma of patients past 1 year of acute AIS was 8 times higher and 1 year past CIS was 14 times higher than in healthy condition. Past 1 year of both subtypes of ischemic stroke, the extension of the eugrobulins lysis time and the Hageman-dependent fibrinolysis were showed.

According to the level of vWf 1 year past ischemic attack only 38 % of patients with atherothrombotic stroke had a factor level on 50 % higher than norm. But 40 % of patients with CIS level of vWf was increased an average on 75 %. Elevated levels of TPA and PAI-1 by 30% were observed.

Results allow to identify the proteins, their fragments and complexes, from the SFMC and prothrombin pool fractions, which, potentially, could play a key role in exacerbation of the ischemic process. Specifically, proteins with molecular weights 215 and 118 kDa, with the fibrinogen antigenic determinant were identified only in the blood plasma of the patients with stroke. The presence of a protein with a molecular weight of 75 kDa, with the thrombin antigenic determinant, was identify in the blood plasma of patients who 1 year past suffered CIS. These facts may have an important etiologic significance. It require further and more detailed research.

Significantly increased IgG concentration as well as peptide pool (proteins from blood plasma with MW up to 5 kDa) during the acute phase of AIS and CIS was shown, but 1 year past stroke their concentration returns to normal. It was showed that IgG fraction from plasma of the patients in the acute phase of ischemic stroke was able to activate ADP-dependent platelet aggregation an average by 15 % and the peptide pool obtained from the blood plasma of the healthy donors and patients with ischemic stroke, was able to inhibit the ADP-dependent platelet aggregation an average by 25 %. The effector properties of IgG and peptide pool with Mr up to 5 kDa from the blood plasma of the patients with ischemic stroke have been proved.

The results showed the effector properties of proteins circulated in the bloodstream after the ischemic stroke event and proved their ability to initiate the biochemical reactions and processes that are unusual for normal physiological state of the organism.

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