

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

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики

к.б.н. Нипорко Олексій Юрійович

Протокол №__ засідання кафедри

Від" __" _____ 2023 р.

**Визначення активності РАІ-1 як прогностичного маркера порушень
гемостазу**

Випускна кваліфікаційна робота бакалавра

студента спеціальності

091 Біологія

ОПП «Біологія (високі технології)»

Налбат Альона Михайлівна

Науковий керівник від кафедри

професор кафедри молекулярної

біотехнології та біоінформатики

професор **Дзядевич Сергій Вікторович**

Робота виконана у відділі хімії та біохімії ферментів Інституту біохімії ім.

О.В. Палладіна НАН України під керівництвом старшого наукового

співробітника, к.б.н. **Т.А. Яценко**

Київ – 2023 р.

АНОТАЦІЯ

Налбат А.М. Визначення активності PAI-1 як прогностичного маркера порушень гемостазу – Випускна кваліфікаційна робота бакалавра за спеціальністю 091 Біологія ОП «Біологія (високі технології)».

У даній роботі було проведено визначення активності PAI-1 в плазмі та сироватці крові умовно-здорових донорів та пацієнтів з патологічними станами, пов'язаними з порушеннями гемостазу (пост-COVID-19 синдром, серцево-судинна недостатність, політравма).

Встановлено, що високий рівень PAI-1 свідчить про супресію фібринолітичної системи та підвищений ризик тромбозу, а також асоціюється з дисфункцією ендотелію у пацієнтів з пост-COVID-19 синдромом та хронічною серцевою недостатністю. В той же час, помірне зниження активності PAI-1 та значна активація tPA у пацієнтів з політравмою спряє розвитку кровотеч у останніх. Отже, активність PAI-1 є біомаркером розвитку порушень гемостазу тромботичної та геморагічної природи.

Отримані результати можуть бути використані для подальшої розробки рекомендацій для діагностики порушень гемостазу.

Ключові слова: гемостаз, PAI-1, пост-COVID-19 синдром, tPA, uPA, хронічна серцева недостатність, політравма.

ЗМІСТ

ВСТУП	4
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	6
1.1 Природа PAI-1	6
1.2. Структура PAI-1	8
1.3. Функції PAI-1	11
1.4. Роль PAI-1 в розвитку захворювань.....	14
1.4.1. Роль PAI-1 в розвитку серцево-судинних захворювань	18
1.4.2. COVID-19 як протромботичний стан	20
1.4.3. Порушення гемостазу при політравмі	22
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ	24
2.1. Матеріали.....	24
2.2. Методи.....	24
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ	27
3.1. Аналіз плазми і сироватки крові умовно-здорових донорів	27
3.2. Визначення PAI-1 в сироватках крові хворих на хронічну серцеву недостатність	28
3.3. Аналіз активності PAI-1 плазми крові пацієнтів з політравмою	29
3.4. Аналіз активності PAI-1 у пацієнтів з пост-Covid-19 синдромом	31
ВИСНОВКИ.....	34
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	35

ВСТУП

PAI-1 є одним з ключових компонентів фібринолітичної системи, головним ендogenousним високоспецифічним інгібітором активаторів плазміногену, що обмежує утворення плазміну, інактивуючи активатори плазміногену (tPA та uPA). PAI-1 гальмує утворення центрального ензиму фібринолітичної системи – плазміну, в такий спосіб сповільнюючи руйнування внутрішньосудинних тромбів.

PAI-1 є ключовим регулятором фібринолітичного потенціалу крові і одним з найбільш вагомих біохімічних маркерів, що характеризують гемостатичний баланс організму. PAI-1 продукується багатьма типами клітин в нормі та за патологічних умов, таких як серцево-судинні захворювання, сепсис, запалення, порушення обміну речовин, (ожиріння та діабет), PAI-1 може бути диференційовано регульованим у різних типах клітин та рівень його активності в крові і тканинах може змінюватись. Так, велику кількість PAI-1 виділяють пухлинні, ендотелійні та епітелійні клітини у відповідь на дію запальних цитокінів, гіпоксичних чи апоптотичних факторів. Зміни активності PAI-1 в кровотоці призводять до зміни фібринолітичного потенціалу крові, гіперпродукція цього інгібітора сприяє розвитку тромбозів та тромбоемболій. Рівень активності PAI-1 в біологічних зразках і клінічному матеріалі може використовуватись як маркер розвитку запальних, метаболічних, онкологічних захворювань та станів, пов'язаних з дисфункцією ендотелію, а також як прогностичний маркер тромботичних процесів та у випадку дефіциту PAI-1 - кровотеч.

За даними ВООЗ серцево-судинні захворювання тромботичної природи займають провідну позицію причин смерті. Тромбоутворення є найсуттєвішою ознакою розвитку серцево-судинних захворювань і значною причиною інвалідизації пацієнтів. Інфаркт, ішемічний інсульт, тромбоемболії, тромбози глибоких вен є не тільки гіперкоагулянтними, а й

гіпофібринолітичними процесами, що мають в своїй основі зниження фібринолітичного потенціалу і підвищення активності PAI-1.

Гострий респіраторний дистрес синдром, викликаний коронавірусною інфекцією SARS-CoV2 (Covid-19), спричиняє широкий спектр ускладнень, серед яких тромбози займають перше місце. Широко використовуваний для виявлення тромбозів D-димер є діагностичним маркером, оскільки свідчить про вже наявний згусток, який лізується, тоді як підвищена активність PAI-1 є прогностичним маркером, що може бути корисним для передбачення тромбоутворення.

Метою даного дослідження було продемонструвати діагностичний потенціал способу визначення активності PAI-1 як біомаркера порушень гомеостазу, розробленого відділі хімії та біохімії ферментів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України. У зв'язку з цим було поставлено завдання апробувати спосіб на зразках плазми та сироватки крові умовно здорових донорів та пацієнтів з пост-COVID-19 синдромом, серцево-судинними захворюваннями і політравмою. Одержані в результаті проведеного дослідження дані можуть бути застосовані в подальшому визначенні та прогнозуванні пацієнтів хворих на COVID-19.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Природа PAI-1

PAI-1 – глікопротеїн, що належить до інгібіторів серинових протеаз (SERPINs) тому також називається серпін E1. Відомо чотири види інгібіторів активаторів плазміногена. Тип 1 (PAI-1) раніше відомий як PAI ендотелійних клітин. Тип 2 (PAI-2) плацентарний PAI. Тип 3 (PAI-3) ідентичний інгібітору активованого протеїна C. Тип 4 – протеазний нексін 1 (PN-1) – називається також нейрит-стимулюючим фактором гліального походження. Людський ген PAI-1 розташований на хромосомі 7 (q21.3-q22), охоплює приблизно 12,200 пар основ і складається з дев'яти екзонів і восьми інтронів [15].

PAI-1 широко розповсюджений в різних типах тканин організму (кров, м'які тканини, тканини паренхіматозних органів, стінки судин, нервова тканина і т. ін.). Основною функцією PAI-1 в кровотоці є інгібування активаторів плазміногену (tPA і uPA) і в такий спосіб регулювання швидкості фібринолізу та часу життя тромбів. В тканинах PAI-1 також виконує сигнальну функцію та бере участь в регулюванні міграції клітин, оскільки регулюючи активність протеаз (в першу чергу uPA) може змінювати швидкість деградації позаклітинного матриксу [3].

За звичайних умов PAI-1 присутній у плазмі при низьких концентраціях 2-46 нг/мл. Концентрація PAI-1 варіює в залежності від расової/етнічної приналежності та статі. Було показано, що концентрація PAI-1 в плазмі визначається генетично. Встановлено зв'язок між одним варіантом послідовності ДНК PAI-1 людини, поліморфізмом промотора -675 4G/5G та концентраціями PAI-1 плазми. Було висловлено припущення, що додатковий гуанін в ланцюжку промоторної ДНК (алель 5G) може регулювати процес транскрипції, створюючи сайт зв'язування інгібітору транскрипції або модифікує його для фактора транскрипції. Тому особи, гомозиготні 4G, як правило, мають найвищі, а гомозиготні 5G - найнижчі концентрації PAI-1.

Однак ці відносини все ще вивчаються і щодо деяких аспектів ведуться суперечки [40]. Концентрація PAI-1 в крові і інших тканинах може швидко змінюватися у відповідь на ряд стимулів, демонструючи динамічне регулювання. PAI-1 може синтезуватися в різних типах тканин і клітин(рис.1), таких як епітелій печінки та селезінки, адипоцити, гепатоцити, тромбоцити, мегакаріоцити, макрофаги, гладком'язові клітини та клітини плаценти та ендотелію [2].

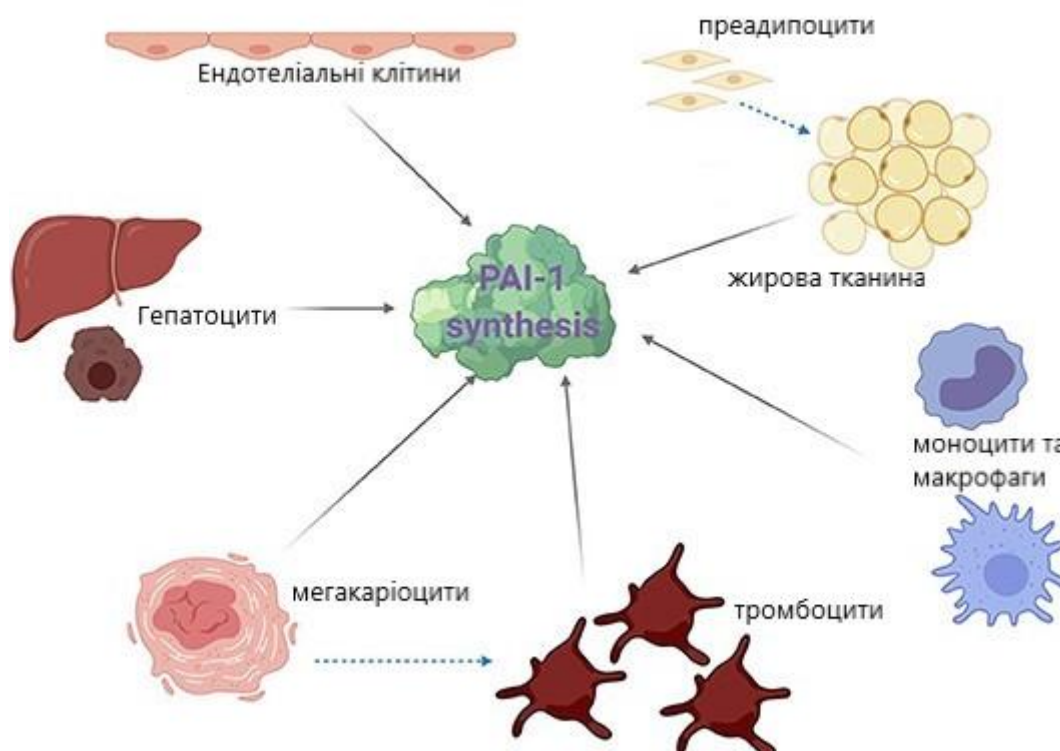


Рис.1. PAI-1 виробляється різними типами клітин, включаючи наступні: ендотеліальні клітини, жирові клітини, гепатоцити, лейкоцити (моноцити та макрофаги), мегакаріоцити та тромбоцити. Пунктирні стрілки демонструють диференціацію клітин, а тверді стрілки вказують на синтез PAI-1[28].

PAI-1 існує в кровотоці і тканинах в декількох конформаційних формах. Крім активної та неактивної форм, існує також латентна форма. PAI-1 завжди синтезується в активній формі, але спонтанно перетворюється в неактивну форму з періодом напівжиття від 1 до 2 годин в фізіологічному середовищі. В плазмі активна форма PAI-1 може бути стабілізована шляхом зв'язування з вітронектином, тим самим збільшуючи свій час існування в кровотоці.

Латентна форма може бути штучно перетворена в активну форму під дією денатуратів, негативно заряджених фосфоліпідів або вітронектину, хоча ця третя реакція дуже повільна. PAI-1 — єдиний серпін, який може здійснювати зворотний конформаційний перехід між активним і латентним станами. Коефіцієнт інактивації також стрімко знижується при більш низькому рН, наприклад в ішемізованих тканинах, що потенційно збільшує здатність до подальшого інгібування фібринолізу [2].

Експресія і вивільнення клітинами PAI-1 регулюються різними факторами, включаючи фактори росту (наприклад, TGF- β , EGF, PDGF), запальні цитокіни (наприклад, TNF- α і інтерлейкін-1 β), гормони (наприклад, інсулін, глюкокортикоїд і ангіотензин II), глюкозид і ендотоксин грам-негативних бактерій, ліпопротеїни дуже низької щільності (VLDL) та низької щільності (LDL), а також деякі терапевтичні агенти, такі як дексаметазон та інсулін [20].

Активність PAI-1 регулюється на транскрипційному рівні. Основним регулятором експресії PAI-1 та, у свою чергу, місцевої активності PAI-1 є трансформуючий фактор росту TGF- β . Активність TGF- β , з іншого боку, сама по собі регулюється PAI-1, оскільки система активації плазміногену опосередковано через uPA здатна активувати латентний TGF- β , який індукує PAI-1, тим самим відключаючи власний механізм активації; ця регуляторна петля задіяна до процесу загоєння ран [20].

1.2. Структура PAI-1

PAI-1 - одноланцюговий глікопротеїн масою 47-50 кДа, що складається з 379 або 381 амінокислот, в залежності від гетерогенності N-кінцевого регіону, спричиненої двома можливими точками відщеплення сигнальних пептидів.

PAI-1 є глобулярним протеїном з трьома β -листами (A, B, і C) і 9 α -спіралями (hA–hI) (рис 2).

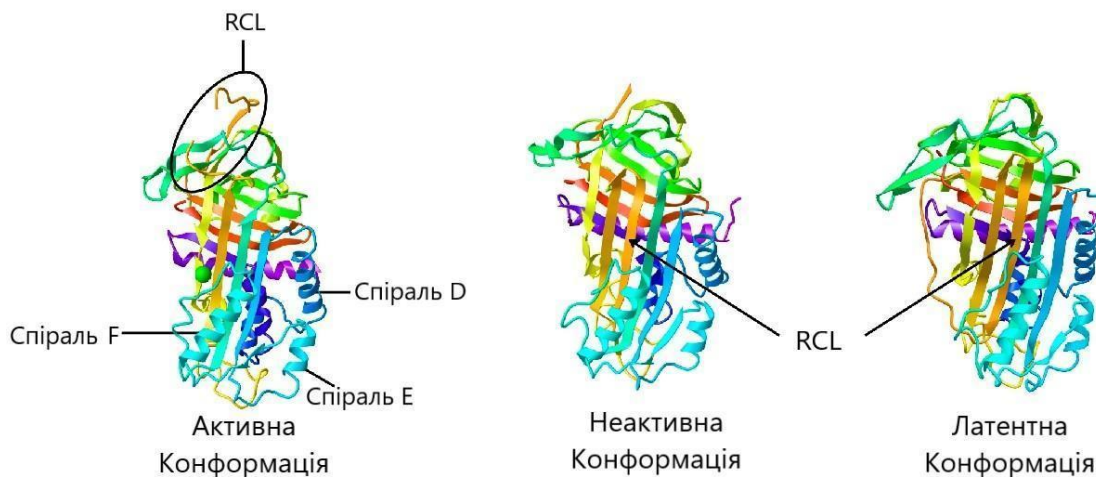


Рис 2. Зображення кристалічної структури активної форми інгібітора активатора плазміногену-1 (РАІ-1) [9].

Для процесу інгібування РАІ-1 активаторів плазміногену та інших протеаз важливою є відкрита петля реакційного центру (RCL) РАІ-1. RCL містить 26 залишків, які імітують звичайний субстрат активаторів плазміногену.[19]. У РАІ-1 відсутні залишки цистеїну, але міститься кілька метионінових залишків, які можуть пояснити його здатність до незворотної інактивації окислювальними агентами. Відсутність залишків цистеїну і тому дисульфідних зв'язків може в свою чергу пояснити його нестабільність[3]. РАІ-1 виділяється як одноланцюгова молекула, що містить два окремих домени; (1) петля реакційного центру (RCL), пов'язана гнучкою лінкерною ділянкою зі (2) структурним доменом, що представлений спіральною D (HD), спіральною E (HE) і спіральною F (HF) ділянками. Домен RCL є первинним сайтом зв'язування uPA та tPA і містить пептидний зв'язок P1-P1', який взаємодіє з цими протеазами. Зв'язування структурного домену РАІ-1 (HD, HE і HF ділянки) з вітронектином перешкоджає наступному зв'язуванню вітронектину з інтегринами і стабілізує РАІ-1 в його активній формі, збільшуючи його афінність до uPA/ tPA в 200 разів [14].

Нещодавно була також встановлена 3D-структура латентної форми РАІ-1. У цій структурі вся амінокінцева сторона реактивної центральної петлі

вставляється як центральна нитка в β -лист А. це пояснює підвищення стабільності латентного PAI-1, а також відсутність в молекули інгібіторної активності [3]. Окрім латентної форми PAI-1, також була ідентифікована друга неактивна форма, яка є результатом окиснення одного або декількох критичних залишків метионіну в активному PAI-1. Аналіз окисленого PAI-1 показує, що інактивація корелює зі швидкими конформаційними змінами в структурі, що відрізняються як від активного, так і латентного PAI-1. Оксидативна інактивація PAI-1 може бути важливим механізмом контролю системи активації плазміногену. Активні форми кисню, що виробляються локально нейтрофілами або іншими клітинами, можуть інактивувати PAI-1 і, таким чином, дозволити плазміну активно генеруватися на місцях зараження або в зонах ремоделювання тканин [3].

При взаємодії з активаторами плазміногену PAI-1 зв'язується через реактивний центр P1-P1 і кілька екзобайт-областей, прилеглих до RCL, утворюючи надмолекулярний комплекс Міхаеліса. Згодом серин активної ділянки активатора (tPA-Ser478 або uPA-Ser195) атакує зв'язок P1-P1, щоб сформувати проміжний продукт з PAI-1. Успішне розщеплення цього зв'язку призводить до проміжного продукту ацильованого ензиму, в якому активатор ковалентно зв'язується з залишками P1 в PAI-1. Далі проміжний ацил-ензимний продукт перетворюється на незворотно заінгібований комплекс, повністю вставляючи N-термінальну частину RCL (P1-P1) в центральну частину β листа А. Одночасно, активний центр активатора плазміногену деформується стисненням, що стабілізує комплекс інгібітор-активатор [14]. Заінгібований активатор в зміненій конформації набуває вищої афінності до манозних рецепторів гепатоцитів і таким чином видаляється з кровотоку. Крім того, комплекс PAI-1/активатор плазміногену може виконувати сигнальну роль, зв'язуючись зі специфічними клітинними рецепторами [7].

1.3. Функції PAI-1

PAI-1 є компонентом фібринолітичної системи і одним з основних регуляторів швидкості руйнування фібринових депозитів в кровотоці та поза судинним руслом. Фібринолітична система, основною задачею якої в кровоносних судинах є своєчасне руйнування тромбів і відновлення нормального кровотоку, є багатокомпонентною і чітко регульованою ензимною системою. PAI-1 утворює ковалентний зв'язок з tPA і uPA (за молярного співвідношення 1:1) і блокує деградацію фібринових згустків, запобігаючи утворенню основного фібринолітичного ензиму плазміну з неактивного попередника плазміногену (рис.3). Також в цей спосіб PAI-1 може регулювати і нефібринолітичний протеоліз в судинах і інших системах органів і тканин організму, наприклад активність металопротеїназ, тромбіну, протеїну С.

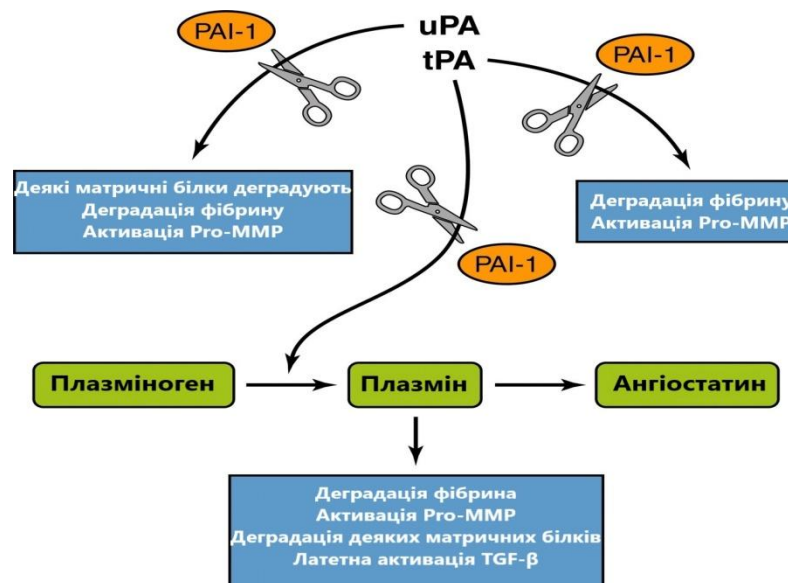


Рис. 3. Інгібіторна активність PAI-1 в регуляції фібринолізу та деградації міжклітинного матриксу [1].

tPA, як правило, відповідає за активацію внутрішньосудинного плазміногену, а його активність регулюється наявністю фібрину. PAI-1 здатен зв'язуватись з tPA та фібрином, утворюючи потрібний комплекс і блокуючи не тільки напряму активацію плазміногену на поверхні фібрину,

але також блокуючи наступне зв'язування вільного активатора з фібрином шляхом конкуренції за центр зв'язування. В кровотоці PAI-1 міститься як в плазмі крові, так і депонований в α -гранулах тромбоцитів, звідки вивільнюється під час активації і дегрануляції цих клітин в місці тромбоутворення, локально підвищуючи антифібринолітичний потенціал і продовжуючи час життя тромбу [22].

uPA є основним активатором плазміногену міграційно активних клітинах, де регулює утворення позаклітинних протеаз, в тому числі плазміну. Активність uPA регулюється наявністю рецептора uPA (uPAR) на різних клітинах. Тому PAI-1 здатний пригнічувати не тільки внутрішньосудинний фібриноліз, але й клітинно-асоційований протеоліз і в такий спосіб може регулювати фізіологічний стан клітин через взаємодію з uPA, пов'язану з урокіназним рецептором (uPAR). За відсутності PAI-1, uPA, зв'язана з uPAR, призводить до конформаційної зміни в рецепторі, яка збільшує афінність uPAR до вітронектину або інших інтегринів і, таким чином, підтримує клітинну адгезію. Однак зв'язування PAI-1 з комплексом uPA-uPAR може порушити цю взаємодію з вітронектином або інтегринами, ослаблюючи клітинну адгезію та посилюючи міграцію. PAI-1 також може безпосередньо взаємодіяти з В-доменом вітронектину з більшою афінністю, ніж uPAR, таким чином зменшуючи клітинну адгезію[27]. Взаємодіючи з комплексом uPA/uPAR, PAI-1 локалізується до поверхні клітини, полегшуючи таким чином взаємодію між комплексом PAI-1/uPA/uPAR та LRP1. Згодом інтернаціоналізація комплексу через ендоцитоз деградує PAI-1/uPA комплекс і вивільнює uPAR до клітинної поверхні. Оскільки uPAR і LDLR-рецептори також важливі для внутріклітинної сигналізації, зв'язування PAI-1 або PAI-1/uPA комплексу може або опосередковано впливати на сигнальну активність, регулюючи рівні рецепторів на поверхні клітини, або безпосередньо індукуючи активність рецепторів через пряму взаємодію[27].

На додаток до своєї здатності зв'язувати та інактивувати активатори плазміногену, PAI-1 також має інші ліганди, які можуть бути посередниками функцій PAI-1. До таких лігандів належать глюкозаміноглікани, матриксні протеїни, та scavenger-рецептори, такі як члени надродини рецепторів ліпопротеїнів низької щільності (LDLR), зокрема рецептор ліпопротеїн-асоційованого протеїну (LRP) [3]. Завдяки цим взаємодіям, функції PAI-1 поширюються на різні фізіологічні процеси, незалежні від його антипротеазної активності.

PAI-1 захищає пухлинні клітини від апоптозу за декількома механізмами: пригнічує Fas-опосередкований апоптоз в декількох ракових клітинах людини, включаючи метастази до мозку, шляхом контролю активності перицелюлярних протеаз; відсутність позаклітинного PAI-1 у пухлинних клітинах призводить до більш високих рівнів активованої каспази 9; PAI-1 також сприяє виживанню клітин через здатність пригнічувати каспазу 3, захищаючи клітини пухлини від апоптозу, викликаного хіміотерапією[21].

Дослідження також показали, що PAI-1 відіграє роль у старінні. PAI-1, цільовий p53 і TGF β , регулюється при старінні фіброblastів і пригнічує вивільнення та біодоступність багатьох факторів росту. Пригнічення PAI-1 при старінні фіброblastів стимулює проліферацію і дозволяє їм обійти старіння. PAI-1 також може стимулювати відпочинок, пригнічуючи uPAR і uPA [15].

Інгібуючи клітинну адгезію до вітронектину, PAI-1 може мати про- та антиапоптичні ефекти. PAI-1 здатен стимулювати апоптоз, але оскільки клітини відокремлюються від вітронектину і мігрують до інших протеїнів ЕСМ, вони можуть протистояти апоптозу [15]. Позаклітинний PAI-1 також пригнічує FasL розщеплюючи і вивільняючи на поверхню пухлинні клітини, захищаючи їх від FasL-опосередкованої і хіміотерапіє-індукованої клітинної смерті. Взаємодіючи з LRP-1, PAI-1 індукує c-Jun/ERK сигналізацію, в

результаті чого збільшується виробництво антиапоптичних протеїнів, таких як Bcl 2 і Bcl-X.L [15].

1.4. Роль PAI-1 в розвитку захворювань

Гемостаз є важливим фізіологічним процесом для підтримки судинної цілісності і забезпечення адекватного кровотоку по всій системі кровообігу. Тому вона вимагає динамічної взаємодії між судинною системою, тромбоцитами крові, коагулянтною системою і фібринолітичною системою.

Зміни продукції і активності PAI-1 спричинюють порушення гемостатичного балансу, пов'язані з дисфункцією фібринолітичної системи. Ця система є невід'ємною складовою гемостатичної системи організму, вона знаходиться в стані динамічної рівноваги з системою зсідання крові. Надмірна активація системи зсідання або пригнічення активності фібринолітичної системи супроводжуються тромбоутворенням, що веде до розвитку серцево-судинних захворювань таких як інфаркт міокарду та ішемічний інсульт. Гіперфібриноліз пов'язаний з геморагічними ускладненнями різного ступеня важкості. Збільшення рівня PAI-1 в плазмі крові свідчить про супресію фібринолітичної системи та підвищений ризик артеріального та венозного тромбозу за серцево-судинних та онкологічних захворювань, в той час як низький рівень активності цього серпіну супроводжується ризиком розвитку геморагій (рис. 4).

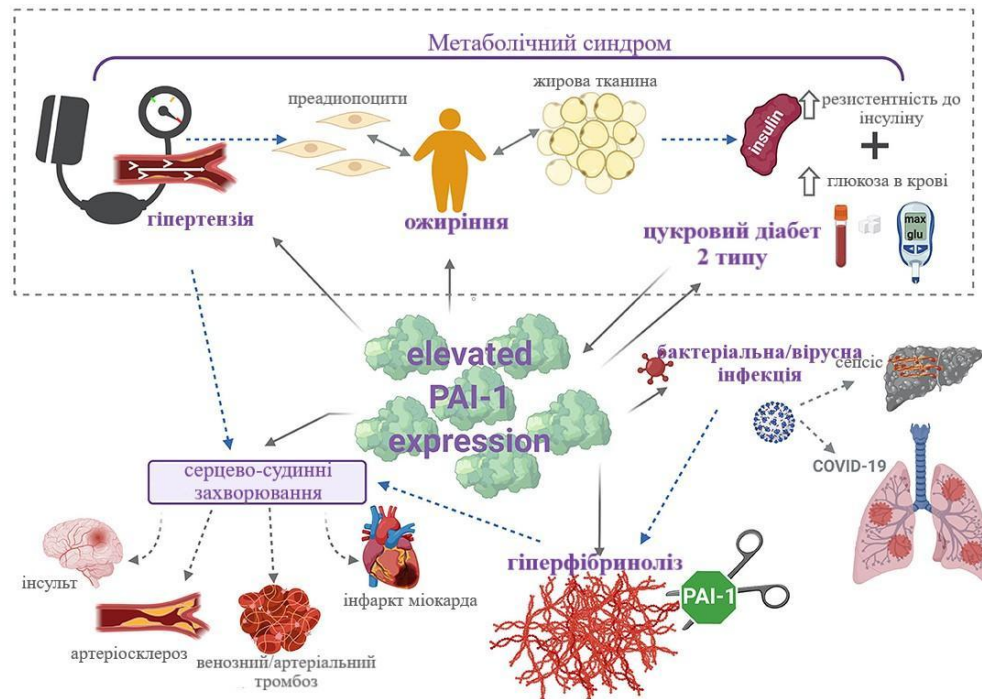


Рис. 4. PAI-1 модулює тромбоз і запалення через численні патофізіологічні механізми [28].

tPA і PAI-1 в декількох незалежних дослідженнях були визначені як маркери ризику для серцево-судинних захворювань, оскільки ризик тромбозу може визначатись балансом між PAI-1 і tPA. Таким чином, підвищення рівня PAI-1 в плазмі крові може викликати протромботичний стан внаслідок гіпофібринолізу. Загальний рівень PAI-1, більший ніж 100 нг/мл, та активність вільного інгібітора, що перевищує 31 МО/мл, вказують на підвищений ризик розвитку серцево-судинних захворювань та тромботичних ускладнень. У здорових людей рівень PAI-1 в плазмі крові перевищує tPA у співвідношенні понад 4:1, при цьому більшість PAI-1 видаляється з крові печінкою. При патологічних станах вироблення PAI-1 може регулюватися прозапальними факторами, такими як $\text{TNF}\alpha$, $\text{TGF}\beta$, IL6 , що вказує на прямий зв'язок високих рівнів цього інгібітора з розвитком захворювань. Підвищені рівні PAI-1 також пов'язані з ослабленою фібринолітичною активністю при інсульті та ішемічній хворобі серця [19]. Прогресуюче збільшення PAI-1 за гострого інфаркту міокарду є несприятливим прогностичним показником і свідчить про дисфункцію ендотелію [6].

За розвитку зляжкісних новоутворень знижується антитромбогенний потенціал ендотелію кровоносних судин та активуються процеси внутрішньосудинного зсідання крові. Найбільш частим та загрозливим клінічним ускладненням порушень гемостатичного балансу у хворих онкологічного профілю є венозний тромбоемболізм, який суттєво впливає на перебіг та кінцевий результат онкологічного захворювання, і саме функціонально активний PAI-1 є біологічним маркером венозного тромбоемболізму. Клінічна оцінка ролі uPA та PAI-1 в пухлинах людини показала, що рівень і співвідношення цих компонентів в пухлинній тканині можуть розглядатись як біологічно значущі фактори прогнозу при зляжкісних новоутвореннях, зокрема пухлинах молочної залози та яєчників [4-5].

Численні дослідження, опубліковані в кінці 1990-х і на початку 2000-х років, показали, що PAI-1 надекспресується більшістю ліній ракових клітин людини, зокрема тими, що походять від твердих пухлин і в більшості пухлин людини.[15] Його експресія позитивно корелює з поганими клінічними результатами у хворих на рак молочної залози, яєчників, сечового міхура, товстої кишки та недрібноклітинного раку легень. В результаті цих спостережень прогнозна цінність тканинного рівня uPA та PAI-1 була випробувана у великому перспективному клінічне дослідження для пацієнтів з раком молочної залози без залучення вузла. В цьому дослідженні пацієнти з високим рівнем uPA та / або PAI-1 в пухлинній тканині, визначені МФА, були рандомізовані для шести курсів хіміотерапії або для спостереження було не тільки підтверджено довгострокові прогнозні ефекти uPA/ PAI-1, але також продемонстровано переваги авідуючої хіміотерапії в групі з високим рівнем uPA та PAI-1 [15].

Крім того, рівень PAI-1 в плазмі крові прямо корелює із ступенем інсулінорезистентності і є прогностичним маркером розвитку цукрового діабету, а також підвищується за ожиріння і метаболічного синдрому. Кілька епідеміологічних досліджень показали, що підвищені рівні циркуляції PAI-1 і

PAI-1 активності є важливою особливістю або навіть маркером метаболічних розладів, включаючи ожиріння, діабет 2-го типу і метаболічний синдром. Зв'язок між інгібітором інгібітора плазміногену PAI-1 та метаболічним синдромом з ожирінням було встановлено багато років тому. Підвищені рівні PAI-1 тепер можна вважати справжнім компонентом синдрому [18].

Метаболічний синдром пов'язаний з підвищеним ризиком розвитку серцево-судинних захворювань, і може включати надмірну експресію PAI-1. Механізми поза експресією PAI-1 під час ожиріння складні, і можна уявити, що кілька індукторів беруть участь у множинних місцях синтезу одночасно. Цікаво, що нещодавні дослідження *in vitro* та *in vivo* [29] показали, що крім його ролі в атеротромбозі, PAI-1 також бере участь у розвитку жирової тканини та контролі сигналізування інсуліну в адипоцитах. Ці результати свідчать про те, що інгібітори PAI-1 використовуються для контролю атеротромбозу та інсулінорезистентності.

Кілька груп підкреслили виняткові зв'язки між високим рівнем плазми PAI-1 і вісцеральним ожирінням наприклад, зміни рівня PAI-1 під час програми зниження ваги корелювали зі змінами вісцерального жирового депо. Ектоматичне накопичення жиру в печінці людини також було пов'язане з підвищеною експресією PAI-1 [13].

Також, PAI-1, як і характерний тільки для вагітних жінок PAI-2, тісно пов'язаний з рядом патологій жіночої репродуктивної системи. Прогресування під час вагітності ендотелійної дисфункції, що проявляється в надпродукції інгібітора, – одна з причин дисфункції плаценти, передчасного відшарування плаценти, захворюваннями плода та ін. [26].

В той же час дефіцит PAI-1 або низький рівень активності цього інгібітора призводить до гіперактивації фібринолітичної системи і супроводжується ризиком розвитку геморагічних ускладнень, які проявляються надмірною кровоточивістю за хірургічного втручання та ряду патологічних станів, таких як гемофілія, лейкози, захворювання печінки, штучний кровообіг тощо [12].

Хворі на коронавірусну хворобу-19 (COVID-19) також знаходяться під високим ризиком тромботичного артеріального та венозного емболізму. У пацієнтів з COVID-19 збільшуються повідомлення про венозну тромбоемболію, а також описано артеріальний тромбоз, включаючи інсульт та інфаркт міокарда. Гістопатологічне дослідження зразків хворих з тяжким перебігом демонструє фіброз і емболізацію дрібних судин фібриновими відкладеннями, причому своєчасний фібринолітичний процес видалення цих відкладень блокується гіперпродукцією PAI-1 запаленими тканинами уражених ГРДС легень [23].

1.4.1. Роль PAI-1 в розвитку серцево-судинних захворювань

Існують вагомі докази, які підтверджують роль PAI-1 у розвитку серцево-судинних захворювань, оскільки PAI-1 є первинним інгібітором фібринолітичної системи, підвищення рівня PAI-1 створює протромботичний стан, що може сприяти розвитку серцево-судинних захворювань [28]. t-PA і PAI-1 в деяких дослідженнях були визначені як маркери ризику для серцево-судинних захворювань. Оскільки фібринолітична система активується шляхом перетворення плазміногену на плазмінові протеази, такі як tPA та uPA, яким протидіє PAI-1, в кінцевому рахунку, часто ризик тромбозу визначається балансом між PAI-1 і t-PA [18]. Таким чином, підвищення рівня плазменного PAI-1 може викликати гіпофібринолітичний стан.

Запалення, хронічне чи гостре, пов'язане з циркулюванням в кровотоці підвищеної кількості прозапальних цитокінів, протеїнів активованої імунної відповіді та активованих клітин. При запальних станах прозапальні фактори, такі як TNF α , TGF β та інсулін, стимулюють експресію PAI-1, а активовані клітини вивільняють інгібітор у збільшеній кількості, зміщуючи гемостатичний баланс в протромботичну і гіпофібринолітичну сторону і збільшуючи ризики тромбоутворення [18]. Ренкенс та інші повідомили, що миші з дефіцитом PAI-1 показали зниження ранньої індукції IL-6, основного

запального цитокіну, в плазмі і тканинах з подальшим зниженням білків гострої фази [41]. Таким чином, PAI-1 може мати прозапальну властивість, беручи участь у запаленні судин.

Найрозповсюдженішими тромботичними станами з високою летальністю і інвалідизацією є інфаркт міокарда і ішемічний інсульт, які виникають, коли тромбоз призводить до оклюзії в головній артерії, що подає кров до серця або мозку. Ці артеріальні ускладнення є також типовими для вже існуючого атеросклерозу. Незважаючи на успіхи в терапії, спрямованій на основний атеросклероз, тромботичні події, пов'язані з атеросклерозом, залишаються звичайним явищем і все ще відбуваються навіть у пацієнтів, які інтенсивно лікуються ліпідознижувальними засобами.

Венозна тромбоемболія (VTE), об'єднуючий термін для тромбозу глибоких вен (DVT) і тромбоемболії легеневої артерії (PE), є ще одним поширеним захворюванням тромботичної природи, що вражає від 1 до 2 осіб на 1000 осіб на рік. Ожиріння є основним фактором ризику для VTE. Венозні тромбози та венозні тромбоемболії є іншими поширеними ускладненнями серцево-судинних, запальних, онкологічних захворювань, і мають значну розповсюдженість та притаманну їм високу летальність. Активність PAI-1 в крові є одним з ключових чинників розвитку венозної тромбоемболії, а отже є важливим діагностичним маркером [31].

Атеротромбоз - складне захворювання, при якому важливу роль відіграють запалення, відкладення холестерину LDL і утворення бляшок, однак відома і роль PAI-1. Атеросклеротичні бляшки на стінках судин можуть спричинити запалення судин і скупчення імунних клітин, які можуть пригнічувати синтез колагену, тим самим перешкоджаючи відновленню та підтримці фіброзних бляшок. З іншого боку, активація макрофагів може призвести до активації матричних металопротеїназ (MMPs), які сприяють вразливості бляшки до розриву і активації тромбоутворення на місці бляшки за кількома механізмами. Контакт з колагеном бляшки викликає активацію тромбоцитів,

а тканинний фактор, що виробляється макрофагами і клітинами гладких м'язів, активує каскад згортання крові, що призводить до формування фібриново-тромбоцитарного згустку[30]. Ушкодження ендотелію в місці розриву бляшки також стимулює синтез PAI-1, який пригнічує лізис тромбу та пролонгує місцеве запалення, що в кінцевому результаті може призводити до відриву тромбу від стінки судини та емболізації життєво важливих судин .

1.4.2. COVID-19 як протромботичний стан

Станом на 12 квітня 2023 року у понад 700 мільйонів людей у всьому світі діагностували COVID-19 (коронавірусна хвороба 2019 року, збудником якої є вірус SARS-CoV-2), у тому числі понад 900 тисяч смертей, що представляє собою серйозну проблему для громадського здоров'я у всьому світі. COVID-19 має багато клінічних і патологічних характеристик, спільних з ГРВІ та Близькосхідним респіраторним синдромом (MERS), викликаним вірусом MERS-CoV. Ці віруси потрапляють у клітини-господарі, які експресують ангіотензинперетворюючий фермент 2 (ACE2). Клінічно альвеолярні клітини 2 типу в легенях є переважною мішенню, що призводить до важкої пневмонії, однак також уражаються багато інших органів, включаючи нирки та серцево-судинну систему, що призводить до поліорганної недостатності та дисфункції ендотелію, наслідком якої є надекспресія PAI-1. В уражених тканинах виникає гостра запальна реакція, яка проявляється у вигляді набряку, інфільтрації макрофагами та внутрішньоальвеолярного відкладення фібрину, що призводить до гострого респіраторного дистрес-синдрому (ГРДС) і гострої дихальної недостатності [32]. Дані досліджень показують, що цитокіновий шторм та тромбози тісно пов'язані з прогресуванням хвороби, що пояснює поганий прогноз у пацієнтів з COVID-19 [33]. Характерною ознакою COVID-19 є наявність венозних та артеріальних мікротромбозів, які тягнуть за собою посилення запалення, ішемізацію тканин, тромбози крупніших судин на додачу до інших серцево-судинних ускладнень, таких як міокардит, серцева недостатність, васкуліт(рис.5). Дані

досліджень рівнів PAI-1 як в крові, так і в уражених тканинах хворих демонструють надзвичайно високі рівні інгібітора, що вказує на розвиток тяжкої ендотеліальної дисфункції та вкрай високі ризики тромбозів [34].

Tahsin et al. підкреслили, що рівень PAI-1 у плазмі крові у хворих на SARS підвищений в 4 рази порівняно з пацієнтами з іншою інфекційною пневмонією та в 5 разів порівняно зі здоровим контролем. Рівень вітронектину (протеїну, що стабілізує активну форму PAI-1 в кровотоці) у плазмі крові також був п'ятикратно підвищений порівняно зі здоровими людьми, що призводить до підвищення антифібринолітичного потенціалу хворих та пролонгації часу напівжиття тромбів. Подібна ситуація спостерігається і для COVID-19 [35].

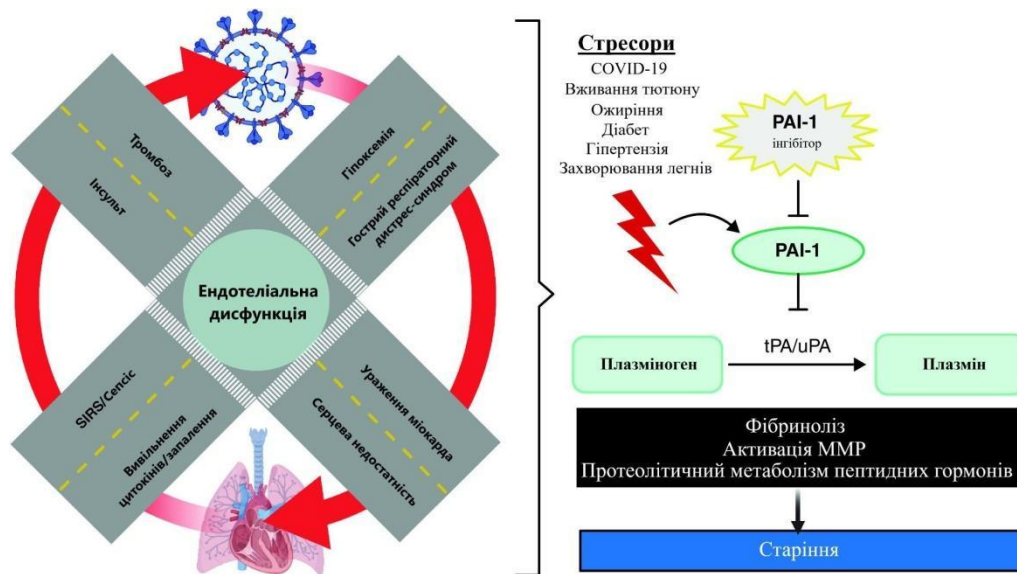


Рис.5. Центральна роль ендотеліальної дисфункції та PAI-1 на перетині легеневих і серцево-судинних ускладнень при інфекції COVID-19 [34].

Підвищення ризику тромбозу в пацієнтів з COVID-19 було підтверджено помітним зниженням лізису тромбу через 30 хвилин за допомогою тромбоеластографії (ТЕГ) у важкохворих пацієнтів із COVID-19. Оцінка плазми COVID-19 ex vivo також відзначила подовжений час лізису згустку, який був більш вираженим серед важкохворих пацієнтів з COVID-19 [25].

Вважається, що існує кілька механізмів підвищеної продукції PAI-1 при COVID-19. Один з них полягає в стимуляції прозапальними цитокінами експресії інгібітора ендотелійними та гладеньком'язовими клітинами судин. Відповідно до іншого, інгібування ACE2 вірусними часточками призводить до накопичення ангіотензину II, надлишок якого стимулює до збільшення PAI-1 і зниження фібринолізу [32].

Отже, визначення активності та кількості PAI-1 може бути ефективним інструментом прогнозування розвитку ускладнень COVID-19 та ГРДС.

1.4.3. Порухення гемостазу при політравмі

Політравма визначається як наявність в пацієнта ≥ 3 травм для двох або більше різних ділянок тіла з одним або більше додатковими ознаками з п'яти фізіологічних параметрів, таких як вік, свідомість, гіпотонія, коагулопатія та ацидоз [40]. Гострий респіраторний дистрес-синдром (ГРДС) є поширеним ускладненням у жертв політравми, особливо з травмами грудної клітки, і є основною причиною смертності та захворюваності. Багато тих, хто вижив, відчувають когнітивні та функціональні порушення, психіатричні наслідки та погіршення якості життя. ГРДС — це небезпечний для життя клінічно визначений гетерогенний стан як за етіологією, так і за клінічним перебігом, який спричинений або прямим ураженням (таким як пневмонія, забій легені, аспірація шлункового вмісту та інгаляційне ураження), або непрямим ураженням (таким як сепсис, переливання продуктів крові, гострий панкреатит і травми інших областей, окрім грудної клітки) легені, викликаючи пошкодження епітелію та ендотелію які сприяють надмірному інтра-альвеолярному відкладенню фібрину і розвитку фіброзу [36].

Індукована травмою коагулопатія (ТІК) присутня приблизно у однієї третини пацієнтів із тяжкою травмою на момент госпіталізації та пов'язана з чотирикратним ризиком смертності. Системний гіперфібриноліз є особливо летальним компонентом ТІК, пов'язаний з більш ніж 60% смертністю.

Розуміння ролі плазміноген-плазмінової системи в травмі знаходиться в зародковому стані, але хоча неканонічні медіатори лізису тромбу можуть відігравати певну роль у гіперфібринолізі ТІК, підвищений рівень tPA спостерігався у пацієнтів з коагулопатією. Крім того, ефективність застосування аналогів лізину транексамової та амінокапронової кислот вказує на роль системи tPA/плазміноген/плазмін як основних факторів розвитку травма-асоційованих кровотеч [37].

PAI-1 є потужним прокоагулянтом через інгібування tPA/uPA, тромбомодуліну та активованого протеїну С. Тривають наукові дебати щодо ролі PAI-1 у коагулопатії після травми, причому деякі дослідники відстоюють модель піку виснаження PAI-1 як основну причину коагулопатії, тоді як інші припускають що цей інгібітор не відіграє суттєвої ролі на фоні потужніших процесів коагуляції і фібринолізу [38].

Отже дослідження ролі PAI-1 та його зв'язку з плазмін-генеруючою активністю тканинного активатора як чинників розвитку ТІК та травма-асоційованих кровотеч представляють інтерес, оскільки результати таких досліджень дозволять прогнозувати зсуви гемостатичного балансу в пацієнтів з політравмою та покращити підбір і ефективність методів їх лікування.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1. Матеріали

У роботі було використано такі реактиви та матеріали: Glu-плазміноген людини, контрикал (AWD, Німеччина), Д-фрагмент фібриногену бика, хромогенний субстрат плазміну S₂₂₅₁ і тканинний активатор (Актилізе, Boehringer, Німеччина), хроматографічні носії, солі і реактиви виробництва Sigma Aldrich та Merck (США); мікротитрувальні планшети ("Greiner", Німеччина), нітроцелюлозна мембрана 0,45 мкм (Thermo Scientific), реагенти для підсиленої хемілюмінесценції виробництва Sigma Aldrich. В якості дослідних зразків використовували плазму крові умовно здорових донорів, сироватку крові хворих на серцево-серцеві захворювання та пацієнтів з пост-Covid-19 синдромом, а також плазму крові пацієнтів з політравмою. Всі учасники надали згоду на використання матеріалу для дослідження.

2.2. Методи

Glu-плазміноген людини виділяли з донорської цитратної плазми афінною хроматографією на лізин-сефарозі за присутності інгібітора протеїназ контрикалу [42].

Фібриноген одержували із плазми крові бика методом фракційного висолювання сульфатом натрію із деякими модифікаціями [43].

D_{EDTA}-T-фрагмент одержували шляхом гідролізу фібриногену бика трипсином за присутності 50 мМ EDTA за масового співвідношення фібриноген : трипсин – 2500 : 1 протягом 48 годин при кімнатній температурі. Продукти гідролізу розділяли іонообмінною хроматографією на CM-Sephadex G-50 та концентрували з використанням фільтраційних систем Amicon (Millipore). Чистоту одержаних препаратів оцінювали електрофорезом в поліакриламідному гелі.

Плазму крові умовно здорових донорів та пацієнтів з політравмою одержували з цільної крові з 3,8 % цитрату натрію 9:1 центрифугуванням при 3000 g протягом 20 хв при 4°C. Зберігали при -20°C, перед використанням розморожували при 37°C.

Сироватки крові пацієнтів з пост-COVID-19 синдромом та хворих на серцево-судинні захворювання одержували шляхом природного зсідання свіжої цільної крові в скляній пробірці протягом 30 хв за температури 20±5°C з наступним відділенням сироватки та її центрифугуванням протягом 15 хв при 2000 g за температури 20±5°C.

Активність PAI-1 в зразках плазми визначали за зниженням активності внесеного тканинного активатора, яку детектували по рівню активації внесеного плазміногену. Активацію Glu-плазміногену тканинним активатором визначали за швидкістю вивільнення *n*-нітроаніліну зі специфічного хромогенного субстрату S₂₂₅₁ плазміном, що утворювався протягом реакції. В лунки мікротитрувальних планшетів вносили: плазма (сироватка) – 5 мкл (5 мкл сироватки, розведеної 1:1 робочим буфером), D_{EDTA}-T-фрагменти фібриногену – 120 мкг/мл, Glu-плазміноген – 40 мкг/мл; тканинний активатор – 5 мкл розчину 50 МО/мл та субстрат S₂₂₅₁ (кінцева концентрація 0,3 мМ). Реакцію проводили при 37°C в 0,05 М трис/HCl буфері, що містив 0,15 М NaCl, рН 7,4. Об'єм реакційної суміші – 0,1 мл. Тривалість реакції 80 хв. Поглинання *n*-нітроаніліну реєстрували за довжини хвилі 405 нм на мікрорідері Multiscan Titertek (Фінляндія).

Калібрувальну криву для визначення активності PAI-1 будували за активністю тканинного активатора (0-50 МО/мл). Оскільки одна одиниця активності PAI-1 відповідає такій кількості інгібітора, яка інгібує 1 МО тканинного активатора, залежність E₄₀₅ від кількості одиниць tPA є обернено пропорційною кількості одиниць PAI-1. Як контроль використовували поглинання реакційної суміші, що не містить екзогенних плазміногену та тканинного активатора.

Розрахунок активності PAI-1 в зразках проводився за формулою:

$$A_{PAI-1} = A \times k,$$

де A_{PAI-1} – активність інгібітора в зразку, МО/мл; A – активність інгібітора в реакційному середовищі, визначена за калібрувальною кривою, МО/мл; k – коефіцієнт пропорційності (для плазми складає 1,1 = розведення крові антикоагулянтном; для сироватки 2 = розведення сироватки робочим буфером).

Для визначення PAI-1 в зразках крові умовно здорових, пост-COVID-19 та хворих на серцево-судинні захворювання використовували метод Western Blot аналізу. Після електрофорезу в поліакриламідному гелі 8% з додецилсульфатом натрію розділені протеїни (маркери молекулярних мас 10-170 кДа та Glu-плазміноген) переносили на нітроцелюлозну мембрану (GVS, США) шляхом мокрого переносу [44] Після блокування 2% розчином БСА, мембрану інкубували з одержаними поліклональними антитілами кроля проти PAI-1 людини (1 мкг/мл). Надлишок антитіл відмивали 0,05 М трис/НСІ буферному розчині з 0,15 М NaCl рН 7,4 з 0,05% Tween-20 та 0,05 М трис/НСІ буферному розчині з 0,15 М NaCl рН 7,4. Взаємодію антитіл детектували з використанням вторинних антикролячих антитіл, кон'югованих з пероксидазою хрину (Sigma, США), відповідно до рекомендацій виробника. В якості субстрату пероксидази використовували розчин 0,3% перекису водню в присутності 2,5 мМ люмінола та 0,5 мМ кумарової кислоти в 100 мМ трис/НСІ рН 8,1. Сигнал візуалізували з використанням радіографічної плівки.

Статистична обробка результатів та розрахунок кінетичних параметрів та констант виконувалась з використанням програмного забезпечення MS Office Excel. Графічна обробка результатів була виконана за допомогою ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/download.html>).

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Аналіз плазми і сироватки крові умовно-здорових донорів

Для підбору оптимальних умов даного методу було порівняно активність PAI-1 в плазмі і сироватці крові умовно-здорових донорів, результати наведено на рис. 2. Для дослідження використано зразки донорів різної статі і з різних вікових груп (19-60 років), що не мають захворювань в гострій фазі (рис.6).

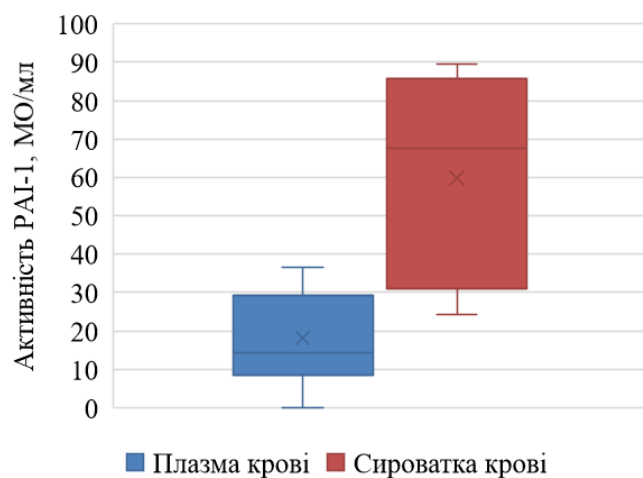


Рис. 6. Активність PAI-1 в плазмі і сироватці крові умовно-здорових донорів.

Встановлено, що активність PAI-1 в дослідженій плазмі крові умовно-здорових донорів знаходиться в межах 0-36,5 МО/мл, тоді як активність інгібітора в сироватці крові суттєво вища: 30,7 – 89,4 МО/мл. Така різниця в рівнях активності PAI-1 між зразками плазми і сироватки крові пояснюється тим, що при утворенні згустку в сироватці відбувається активація тромбоцитів, які представляють собою депо інгібітора в кровотоці, і концентрація PAI-1 може 10-кратно збільшуватись [45].

Вимірювання активності PAI-1 в сироватці представляє інтерес, оскільки враховує не тільки плазмовий пул інгібітора, а й депонований в клітинах. Оскільки даних літератури щодо нормальних рівнів активності PAI-1 в

сироватці здорових людей недостатньо, рекомендовано для аналізу застосовувати зразки плазми крові. Оскільки накопичення і вивільнення PAI-1 тромбоцитами пов'язане з низкою фізіологічних та патологічних процесів, аналіз PAI-1 в сироватці та порівняння з його вмістом в плазмі крові представляє дослідницький інтерес, оскільки різниця вмісту плазменного та тромбоцитарного інгібітора потенційно може бути характеристичною для деяких захворювань та дозволить краще зрозуміти механізми розвитку гіпофібринолізу і пов'язаного з ним тромбозу.

3.2. Визначення PAI-1 в сироватках крові хворих на хронічну серцеву недостатність

Хронічна серцева недостатність це клінічний синдром з прогресуючим характером, типовими рисами якого є порушення гемодинаміки, зниження толерантності до фізичних навантажень, затримка в організмі рідини і обмеження тривалості життя, що найчастіше пов'язано з ішемічною хворобою серця [46]. Крім того, хронічна серцева недостатність пов'язана з метаболічними порушеннями, такими як гіпертензія, діабет, метаболічний синдром, що асоційовані з розвитком протромботичних станів і високими ризиками тромбоемболізму.

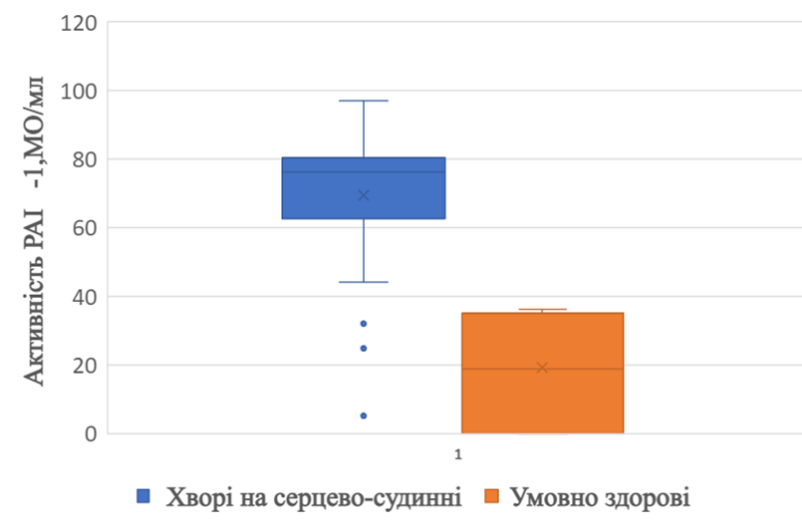


Рис.7. Активність PAI-1 в зразках сироватки крові хворих на хронічну серцеву недостатність в порівнянні зі зразками умовно-здорових донорів.

Дослідження активності PAI-1 в зразках плазми крові хворих на хронічну серцеву недостатність показало, що активність PAI-1 у хворих в середньому втричі вище, ніж у умовно-здорових донорів (рис.7), що вказує на розвиток дисфункції ендотелію у хворих на хронічну серцеву недостатність. Крім того, рівень активності PAI-1 корелював з клінічними ознаками захворювання та результатами тестів: зниження ендотелій-залежної вазодилатації, а отже зниженням функції ендотелію і розвитком ендотелійної дисфункції.

Підвищення активності інгібітора урокінази та тканинного активатора плазміногену у хворих на ХСН демонструє зміщення гемостатичного балансу крові цих хворих в сторону гіперкоагуляції та гіпофібринолізу, що в свою чергу є фактором ризику розвитку тромботичних процесів. Відомо, що пацієнти з ХСН мають високі ризики розвитку тромбозів [39], а отже підвищення активності PAI-1 відіграє в процесі тромбоутворення у таких пацієнтів ключову роль.

Отже, PAI-1 є показовим маркером цього захворювання і може використовуватись в його діагностиці.

3.3. Аналіз активності PAI-1 плазми крові пацієнтів з політравмою

Політравма, як правило, відноситься до пацієнтів з важкими травмами з двома або більше значними травматичними травмами з загальним балом тяжкості травми понад 15 або зменшеною шкалою травми > 2 в принаймні двох регіонах оцінки тяжкості травм [47].

Встановлено, що у пацієнтів з політравмою баланс фібринолітичної системи зміщено в сторону гіперфібринолізу: активність PAI-1 в зразках плазми крові пацієнтів з політравмою в межах норми (< 31 од/мл), тоді як активність тканинного активатора підвищена на порядок (норма < 2 од/мл), - що вказує на ймовірність кровотеч у таких пацієнтів (рис. 8).

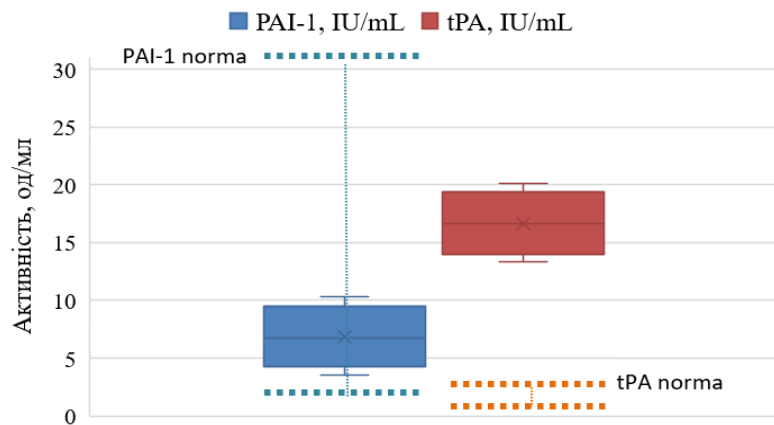


Рис.8. Активність PAI-1 та тканинного активатора плазміногену в плазмі крові пацієнтів з політравмою.

Отримані нами результати узгоджуються з даними літератури, оскільки зниження активності PAI-1 було продемонстровано у пацієнтів з обширними ураженнями і гіперфібринолізом. Крім того, PAI-1, як відомо, інактивується взаємодією з рядом протеолітичних ензимів, включаючи активований протеїн С і нейтрофільну еластазу, які самі можуть бути збільшені в умовах травми, запалення і шоку тому стало загальноприйнятим, що деградація PAI-1 APC з отриманою неконтрольованою tPA в першу чергу відповідає за патологічно високий рівень плазмін-опосередкованого гіперфібринолізу при травмі. Проте, є також дані, що вказують на зниження активності PAI-1 внаслідок надлишкової активності тканинного активатора, що вивільнюється ендотелієм судин у відповідь на травму і призводить до гіперфібринолізу і, як наслідок, масивних кровотеч та геморагічного шоку [16].

Отже, гіперфібриноліз у пацієнтів з політравмою може бути спричинений зміщенням балансу фібринолітичної системи внаслідок зниження активності PAI-1 та підвищення активності tPA, що вивільнюється ендотелієм судин у відповідь на травму. Цей дисбаланс фібринолітичної системи сприяє розвитку гіперфібринолізу та може призводити до масивних кровотеч та геморагічного шоку. Таким чином, контроль активності компонентів фібринолітичної системи ц пацієнтів з множинними травмами та забиттям

внутрішніх органів з використанням тесту на активність активаторів та інгібіторів фібринолізу може сприяти підбору оптимального лікування.

3.4. Аналіз активності PAI-1 у пацієнтів з пост-Covid-19 синдромом

Дослідження активності PAI-1 в зразках плазми крові пацієнтів (вік 30-75 років), що протягом останніх 3х місяців перенесли Covid-19 різного ступеню тяжкості та мають пост-COVID-19 синдром, що супроводжується підвищенням маркерів зсідання крові, показало двократне підвищення активності PAI-1 у таких пацієнтів відносно норми ($58 \pm 6,5$ од/мл проти 1-31 од/мл в нормі відповідно до референсних значень [17]) (рис.9). В референсній групі (донори вікової групи 32-67 років, відібрані виключно за показником відсутності Covid-19) значення активності PAI-1 теж були підвищені відносно норми (38-58 од/мл), однак достовірно нижче групи з пост-COVID-19 синдромом. В той же час рівень активності інгібітора в зразках контрольної групи (умовно-здорові донори віком 18-31 рік) був близьким до норми (0,1-36,2 од/мл).

Встановлено, що немає кореляції між ступенем тяжкості перенесеної хвороби і рівнем активності PAI-1.

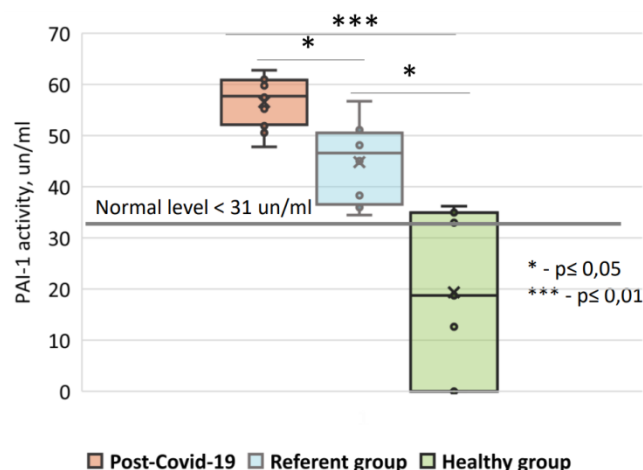


Рис.9. Активність PAI-1 в плазмі крові пацієнтів з пост-Covid-19 (n=45) в порівнянні з референсною групою (n=19) та контрольною групою (n=11).

Оскільки високий рівень PAI-1 є маркером ендотеліальної дисфункції, отримані результати вказують на негативний вплив інфікування вірусом SARS-CoV-2 на стан ендотелію, внаслідок чого збільшується продукування ним цього інгібітора, що може бути одним з факторів розвитку тромбозів. Ці результати узгоджуються з даними, щодо стимуляції вірусом SARS-CoV2 експресії PAI-1 опосередковано через сигналінг інтерлейкінів, TGF- β , TNF- α та інших прозапальних цитокінів, що викидаються в кровотік внаслідок ураження вірусом легеневого та судинного епітелію [34].

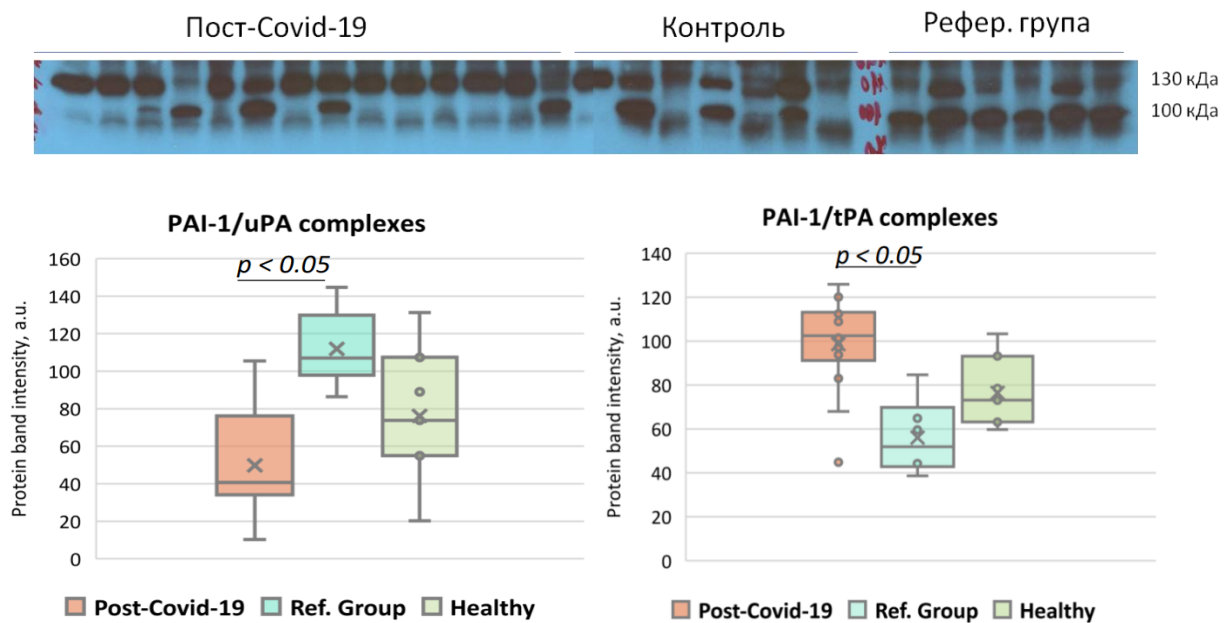


Рис.10. Комплекси PAI-1 з активаторами плазміногену в плазмі крові пост-Covid-19 пацієнтів, референтної групи та умовно здорових пацієнтів.

Ми вимірювали рівень антигену tPA в плазмі та PAI-1(рис.10) і виявили помітно підвищені рівні tPA та PAI-1 у пацієнтів, госпіталізованих із COVID-19. Обидва фактори продемонстрували сильні кореляції з кількістю нейтрофілів і маркерами активації нейтрофілів. Високі рівні tPA та PAI-1 асоціювалися з погіршенням респіраторного статусу. Високі рівні tPA, зокрема, тісно корелювали зі смертністю та значним посиленням спонтанних ex vivo тромболісис. Хоча як tPA, так і PAI-1 підвищені серед пацієнтів з COVID-19, надзвичайно високі рівні tPA підсилюють спонтанний фібриноліз і суттєво пов'язані зі смертністю деяких пацієнтів. Ці дані вказують на те, що

фібринолітичний гомеостаз при COVID-19 є складним, у підгрупі пацієнтів спостерігається баланс факторів, які можуть сприяти фібринолізу. Необхідне подальше вивчення tPA як біомаркера.

Отже, ці дані свідчать про зміщення гемостатичного потенціалу у пацієнтів з COVID-19 в сторону протромботичних станів. Спостерігається незбалансованість факторів, що можуть сприяти збільшеному часу лізису фібрину, що на фоні характерного для COVID-19 прокоагулянтного стану може призводити до появи венозних та артеріальних тромбів.

ВИСНОВКИ

Проведені нами дослідження продемонстрували ефективність визначення активності PAI-1 та в деяких випадках – tPA, як ефективних біомаркерів порушень гемостазу, а саме фібринолізу:

1. Встановлено, що активність PAI-1 в сироватці і плазмі здорових донорів відрізняється завдяки тромбоцитарному пулу інгібітора, що вивільняється в сироватці.
2. Показано, що за пост-COVID-19 синдромом, при розвитку серцево-судинних захворювань, пов'язаних з ендотелійною дисфункцією (хронічна серцева недостатність), активність PAI-1 суттєво підвищується, що може спричиняти тромботичні стани.
3. За травматичного ураження судин при політравмі активність PAI-1 падає значно нижче норми, тоді як уражений ендотелій продукує високоактивний тканинний активатор, що може призводити до гіперфібринолізу і геморагій.

Отже, в цій роботі показано, що запропонований Інститутом біохімії ім. О.В. Палладіна спосіб визначення активності PAI-1 дозволяє швидко і з високою точністю визначити рівень цього інгібітора і може бути застосований як лабораторний інструмент. Проведена нами апробація способу визначення активності PAI-1 показала його потенціал як дослідницького інструменту та лабораторного методу для визначення порушень гемостазу і діагностики захворювань, що викликають ці порушення: метод може бути застосований для моніторингу розвитку захворювань, пов'язаних з дисфункцією ендотелію судин, та ефективності їх лікування.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Eddy A. A., Fogo A. B. Plasminogen activator inhibitor-1 in chronic kidney disease: evidence and mechanisms of action. *Journal of the American society of nephrology*. 2006. Vol. 17, no. 11. P. 2999–3012.
2. A. Tjärnlund-Wolf et al. Plasminogen activator inhibitor-1 and thrombotic cerebrovascular diseases /. *Stroke*. 2012. Vol. 43, no. 10. P. 2833–2839.
3. Plasminogen activator inhibitor 1: physiological and pathophysiological roles / B. R. Binder et al. *Physiology*. 2002. Vol. 17, no. 2. P. 56–61.
4. Bollen L., Peetermans M., Peeters M., Van Steen K., Hoylaerts M.F., Declerck P.J., Verhamme P., Gils A. Active PAI-1 as marker for venous thromboembolism: case-control study using a comprehensive panel of PAI-1 and TAFI assays // *Thromb. Res.* – 2014. – 134 (5). – P. 1097–1102.
5. Brazionis L., Rowley K., Jenkins A. et.al. Plasminogen activator inhibitor-1 activity in type 2 diabetes: a different relationship with coronary heart disease and diabetic retinopathy // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2008. – 28 (4). – P. 786–791
6. Brown N.J. Therapeutic potential of plasminogen activator inhibitor-1 inhibitors // *Ther. Ad. Cardiovas. Dis.* – 2010. – 4 (5). – P. 315–324
7. Chandler WL, Alessi MC, Aillaud MF, Henderson P, Vague P, Juhan-Vague I. Clearance of tissue plasminogen activator (TPA) and TPA/plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) complex: relationship to elevated TPA antigen in patients with high PAI-1 activity levels. *Circulation*. 1997; 96(3):761-8. doi: 10.1161/01.cir.96.3.761.
8. Christopher S. Coffey,¹ Folkert W. Asselbergs,² Patricia R. Hebert The Association of the Metabolic Syndrome with PAI-1 and t-PA Levels *Cardiol Res Pract.* 2011; 2011: 541467. Published online 2011 Apr 4. doi: 10.4061/2011/5414

9. Fasih Ahmad Rahman; Krause, Matthew Paul. PAI-1, the Plasminogen System, and Skeletal Muscle Int J Mol Sci. 2020 Oct; 21(19): 7066. Published online 2020 Sep 25 .doi:10.3390/ijms21197066
10. Ju Tang, Wei Zhu, Xiaoliang Mei & Zhenxiang Zhang Plasminogen activator inhibitor-1: a risk factor for deep vein thrombosis after total hip arthroplasty Journal of Orthopaedic Surgery and Research Published: 10 January 2018
11. Koji Yamamoto, Kyosuke Takeshita, Tetsuhito Kojima, Junki Takamatsu, Hidehiko Saito Author Notes Aging and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) regulation: implication in the pathogenesis of thrombotic disorders in the elderly Cardiovascular Research, Volume 66, Issue 2, May 2005, Pages 276–285, <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.11.013>
12. Lee M.H., Vosburgh E., Anderson K., McDonagh J. Deficiency of plasma plasminogen activator inhibitor 1 results in hyperfibrinolytic bleeding // Blood. – 1993. – 81. – P. 2357–2362
13. Links, Causes, and Consequences PAI-1 and the Metabolic Syndrome 24 Aug 2006 <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000242905.41404>.
14. Machteld Sillen and Paul J. Declerck Targeting PAI-1 in Cardiovascular Disease: Structural Insights Into PAI-1 Functionality and Inhibition Int J Mol Sci. 2021 Mar; 22(5): 2721. Published online 2021 Mar 8. doi:10.3390/ijms22052721
15. Marta Helena Kubala and Yves Albert DeClerck The Plasminogen Activator Inhibitor-1 Paradox in Cancer: A Mechanistic Understanding. Author manuscript; available in PMC. Published in final edited form as: Cancer Metastasis Rev. 2019 Sep; 38(3): 483–492. doi: 10.1007/s10555-019-09806-4
16. Michael P. Chapman, MD, Ernest E. Moore, MD, Hunter B. Moore, MD, Eduardo Gonzalez Overwhelming tPA Release, not PAI-1 Degradation, is Responsible for Hyperfibrinolysis in Severely Injured Trauma Patients J

- Trauma Acute Care Surg. Author manuscript; available in PMC 2017 Jan 1. Published in final edited form as: *J Trauma Acute Care Surg.* 2016 Jan; 80(1): 16–25. doi: 10.1097/TA.0000000000000885
17. Pagana K.D., Pagana T.J. *Mosby's Manual of Diagnostic and Laboratory Tests.* 6th edition. — New York: Mosby, 2017. — 1171 p.
 18. Randal J Westrick 1, Daniel T Eitzman Plasminogen activator inhibitor-1 in vascular thrombosis *Curr Drug Targets.* 2007 Sep;8(9):966-1002. doi: 10.2174/138945007781662328.
 19. Richard G. Jung, Pouya Motazedian, F. Daniel Ramirez, Trevor Simard Association between plasminogen activator inhibitor-1 and cardiovascular events: a systematic review and meta-analysis *Thromb J.* 2018 Jun 5;16:12. doi: 10.1186/s12959-018-0166-4.eCollection 2018
 20. Songul Yasar Yildiz , Pinar Kuru, Ebru Toksoy Oner, and Mehmet Agirbasli Functional Stability of Plasminogen Activator Inhibitor-1 *ScientificWorldJournal.* 2014;2014:858293. doi:10.1155/2014/858293.Epub 2014 Oct 15.
 21. Veronica R. Placencio^{1,2} and Yves A DeClerck Plasminogen Activator Inhibitor-1 in Cancer: Rationale and Insight for Future Therapeutic Testing *Cancer Res.* Author manuscript; available in PMC 2016 Aug 1. Published in final edited form as: *Cancer Res.* 2015 Aug 1; 75(15): 2969–2974 15. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-0876
 22. Wagner OF, de Vries C, Hohmann C, Veerman H, Pannekoek H. Interaction between plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) bound to fibrin and either tissue-type plasminogen activator (tPA) or urokinase-type plasminogen activator (uPA). Binding of tPA/PAI-1 complexes to fibrin mediated by both the finger and the kringle-2 domain of tPA. *J Clin Invest.* 1989; 84(2):647-55. doi: 10.1172/JCI114211.

23. Whyte CS, Morrow GB, Mitchell JL, Chowdary P, Mutch NJ. Fibrinolytic abnormalities in acute respiratory distress syndrome (ARDS) and versatility of thrombolytic drugs to treat COVID-19. *J Thromb Haemost.* 2020 Jul;18(7):1548-1555. doi: 10.1111/jth.14872. Epub 2020 Jun 3. PMID: 32329246; PMCID: PMC7264738.
24. Yohei Hisada, Kenison B. Garratt, Anam Maqsood, Steven P. Grover Plasminogen activator inhibitor 1 and venous thrombosis in pancreatic cancer *Blood Adv.* 2021 Jan 26;5(2):487-495. doi:10.1182/bloodadvances.2020003149.
25. Yu Zuo, Mark Warnock, Alyssa Harbaugh, Srilakshmi Yalavarthi(2021) Plasma tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in hospitalized COVID-19 patients *Sci Rep.* 2021 Jan 15;11(1):1580. doi: 10.1038/s41598-020-80010-z
26. Ye Y., Vattai A., Zhang X. Role of Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 in Pathologies of Female Reproductive Diseases // *Int J Mol Sci.* – 2017. – 18(8). – 1651
27. Sillen M., Declerck P. J. A narrative review on plasminogen activator inhibitor-1 and its (patho)physiological role: to target or not to target?. *International journal of molecular sciences.* 2021. Vol. 22, no. 5. P. 2721.
28. Morrow G. B., Whyte C. S., Mutch N. J. A serpin with a finger in many pairs: pai-1's central function in thromboinflammation and cardiovascular disease. *Frontiers in cardiovascular medicine.* 2021. Vol. 8.
29. Alessi M.-C., Juhan-Vague I. PAI-1 and the metabolic syndrome. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 2006. Vol. 26, no. 10. P. 2200–2207.
30. Aso Y. Plasminogen activator inhibitor (PAI)-1 in vascular inflammation and thrombosis. *Frontiers in bioscience.* 2007. Vol. 12, no. 8-12. P. 2957

31. T. Frischmuth et al. Elevated plasma levels of plasminogen activator inhibitor-1 are associated with risk of future incident venous thromboembolism *Journal of thrombosis and haemostasis*. 2022.
32. Kwaan H. C., Lindholm P. F. The central role of fibrinolytic response in COVID-19—A hematologist’s perspective. *International journal of molecular sciences*. 2021. Vol. 22, no. 3. P. 1283.
33. P. Huang et al. A vicious cycle: in severe and critically ill COVID-19 patients *Frontiers in immunology*. 2022. Vol. 13.
34. Khan S. S. The Central Role of PAI-1 in COVID-19: thrombosis and beyond. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2021. Vol. 65, no. 3. P. 238–240.
35. Kellici T. F., Pilka E. S., Bodkin M. J. Therapeutic potential of targeting plasminogen activator inhibitor-1 in COVID-19. *Trends in pharmacological sciences*. 2021. Vol. 42, no. 6. P. 431–433.
36. L. L. Negrin et al. Impact of polytrauma and acute respiratory distress syndrome on markers of fibrinolysis: a prospective pilot study *Frontiers in medicine*. 2020. Vol. 7.
37. M. P. Chapman et al. Overwhelming tPA release, not PAI-1 degradation, is responsible for hyperfibrinolysis in severely injured trauma patients *Journal of trauma and acute care surgery*. 2016. Vol. 80, no. 1. P. 16–25.
38. M. Condrón et al. The procoagulant molecule plasminogen activator inhibitor-1 is associated with injury severity and shock in patients with and without traumatic brain injury *Journal of trauma and acute care surgery*. 2018. Vol. 85, no. 5. P. 888–893.
39. T. Xu et al. Heart failure is associated with increased risk of long-term venous thromboembolism *Korean circulation journal*. 2021. Vol. 51, no. 9. P. 766.

40. K. P. Iyengar et al. Risks in the management of polytrauma patients: clinical insights Orthopedic research and reviews. 2023. Volume 15. P. 27–38
41. Renckens R, Roelofs JJ, de Waard V, Florquin S, Lijnen HR, Carmeliet P, van der Poll T. The role of plasminogen activator inhibitor type 1 in the inflammatory response to local tissue injury. *J Thromb Haemost.* 3:1018-25 (2005)
42. Deutsch D. G., Mertz E. T., Plasminogen: purification from human plasma by affinity chromatography // *Science.* – 1970. – N 170(3962). – P. 1095–1096
43. Varetskaya T. V. Microheterogeneity of fibrinogen. *Cryofibrinogen // Ukr. Biokhim. Zhurn.* – 1960. – N 32. – P. 13–24.
44. Tsang V. C. W. Enzyme-linked immuno-electrotransfer blot techniques (EITB) for studying the specificities of antigens and antibodies separated by gel electrophoresis. *Methods Enzymol.* 1983; 92: 377–391.
45. Platelets retain high levels of active plasminogen activator inhibitor 1 / H. Brogren et al. *PLoS ONE.* 2011. Vol. 6, no. 11. P. e26762.
46. Ramani G. V., Uber P. A., Mehra M. R. Chronic heart failure: contemporary diagnosis and management. *Mayo clinic proceedings.* 2010. Vol. 85, no. 2. P. 180–195.
47. Butcher N. E., D’Este C., Balogh Z. J. The quest for a universal definition of polytrauma. *Journal of trauma and acute care surgery.* 2014. Vol. 77, no. 4. P. 620–623.