

**Національна академія наук України
Інститут молекулярної біології та генетики НАН України**



ЧЕРНИШЕНКО Володимир Олександрович

УДК 577.112.7:612.115

Пошук та вивчення механізмів дії нових біологічно активних сполук та біоматеріалів, що впливають на зсідання крові

03.00.20 – біотехнологія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора біологічних наук

Київ – 2021

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України.

Науковий консультант: академік НАН України, доктор біологічних наук, професор **КОМІСАРЕНКО Сергій Васильович**, головний науковий співробітник Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України.

Офіційні опоненти: академік НАН України, доктор біологічних наук, професор **СОЛДАТКІН Олексій Петрович**, завідувач відділу біомолекулярної електроніки Інституту молекулярної біології та генетики НАН України;

доктор біологічних наук, професор **ВЕРЬОВКА Сергій Вікторович**, завідувач лабораторії біохімії ДУ «Інститут отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка» НАМН України;

член-кореспондент НАМН України, доктор медичних наук, професор **ПАРХОМЕНКО Олександр Миколайович**, завідувач відділу реанімації та інтенсивної терапії ДУ ННЦ «Інститут кардіології імені академіка М.Д. Стражеска» НАМН України.

Захист відбудеться 23 березня 2021 р. на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.237.01 в Інституті молекулярної біології та генетики НАН України за адресою: м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150.

Поштова адреса: 03680, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150. Спеціалізована вчена рада Д 26.237.01 із захистів докторських і кандидатських дисертацій.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту молекулярної біології та генетики НАН України та у бібліотеці Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна за адресою: м. Київ, вул. Леонтовича, 9.

Автореферат розіслано «__»_____ 2021 року.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
к.б.н., с.н.с.



І.В. Крупська

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Система гемостазу покликана підтримувати баланс між процесами зсідання крові та фібринолізу, забезпечуючи ефективний кровообіг та швидке припинення кровотечі в разі порушення цілісності судинної стінки. Відповідно ензимно-клітинний комплекс гемостазу готовий будь-якої миті, залежно від потреб організму, ініціювати коагуляцію чи запустити антикоагулянтні механізми або фібриноліз. У основі перемикачів між прокоагулянтним та антикоагулянтним потенціалами системи гемостазу лежать молекулярні механізми, які є предметом досліджень науковців протягом багатьох століть. Розуміння цих механізмів має не лише виключне фундаментальне значення, але і важливе практичне застосування. Володіння способами керування про- та антикоагулянтним потенціалами системи гемостазу відкриває перспективи лікування цілої низки найпоширеніших захворювань, пов'язаних з патологічним внутрішньосудинним тромбоутворенням, та порятунку пацієнтів у випадку кровотеч шляхом стимулювання екstrasудинного тромбоутворення.

Внутрішньосудинне тромбоутворення виникає внаслідок патологічної активації системи зсідання крові та проявляється у формуванні фібринових депозитів, згустків фібрину, тромбів, які повністю або частково перекривають просвіт судини, перешкоджаючи кровопостачанню життєво важливих тканин та органів. Внутрішньосудинне тромбоутворення є причиною таких захворювань, як інфаркт міокарду, тромбоемболія легеневої артерії, ішемічний інсульт, тромбоз глибоких вен нижніх кінцівок, а крім того, супроводжує низку серцево-судинних захворювань, хірургічних та гінекологічних ускладнень, онкологічних захворювань, будучи однією з основних причин смертності хворих. Тромбогенез також вносить вагомий вклад у розвиток атеросклерозу, порушень ексудації плаценти та інших судинних патологій.

Не менш небезпечним для життя та здоров'я людини є випадки, коли екstrasудинне тромбоутворення, покликане зупинити кровотечу за умов травми чи поранення, виявляється малоефективним. Кровотечі, які не вдається вчасно зупинити, є причиною летальних випадків за побутових травм чи бойових поранень, а також головним фактором ризику в хірургії, в акушерській практиці, у медицині катастроф.

Саме тому дисертаційну роботу було спрямовано на пошук способів запобігання внутрішньосудинному та стимулювання екstrasудинного тромбоутворення.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами і темами. Дисертаційну роботу виконано на базі Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України в рамках проектів НДР: № 230790 European Union, FP7/2008-2012, COMPOSITUM, Marie Curie International Research Staff Exchange Scheme (2008-2012); № 269099 European Union, FP7-PEOPLE-2010 «Photorelease», Marie Curie International Research Staff Exchange Scheme (2010); № 0112U002624 «Механізми регуляції внутрішньоклітинних сигнальних мереж, міжклітинних та міжмолекулярних взаємодій», розділ: «Моделювання системних біологічних

процесів та розробка молекулярно-динамічних схем регуляції метаболічних шляхів та міжмолекулярних взаємодій», підрозділ: «Протеом системи гемостазу у перебігу опосередкованих процесів утворення та елімінації згустку» (2012-2016); № 0114U003217 «Вивчення механізму формування фібринового каркасу тромбу та розробка діагностикумів стану системи гемостазу при запальних процесах, серцево-судинних захворюваннях та хірургічних втручаннях» (2014-2018); № 0115U003645 «Дослідження ролі В β N-доменів фібриногену в регуляції фізіологічних функцій судинної та тромбоцитарної ланок гемостазу» (2015-2016); № 0115U005241 «Створення комбінованого перев'язувального засобу для зупинки кровотеч та прискорення загоювання ран» (2015-2016); № 0115U003650 «Дослідження каліксаренів як кровозберігаючих, антифібринолітичних та антитромботичних агентів» (2016-2020); № 0117U002808 «Впровадження у виробництво гемостатичних губок на основі колагенової матриці та активатора зсідання крові» (2017); № 0118U000453 «Розробка новітніх інгібіторів зсідання крові на основі фармакологічних агентів, що інгібують ензиматичну активність тромбіну та фактору Ха» (2017-2018); № 0117U003558 «Розробка, доклінічні та клінічні дослідження універсального гемостатичного засобу на основі активатора системи зсідання крові та волокнистих вуглецевих сорбентів» (2017-2021); № 0117U004344 «Молекулярно-генетичні і біохімічні механізми регуляції клітинних та системних взаємодій за фізіологічних та патологічних станів», розділ «Дослідження системних біологічних процесів за різних патологічних станів, як основа персоніфікованої та регенеративної медицини», підрозділ «Протеїн-протеїнові та протеїн-клітинні взаємодії в системі гемостазу за норми та патології: механізми. Діагностика та корекція порушень» (2017-2021); № 0118U006207 «Біологічні ефекти N-ацилетаноламінів на пухлинні та нормальні клітини» (2018); № 0119U000661 «Клінічна апробація та впровадження методу концентрування тромбоцитів аутологічної плазми крові для клітинної терапії» (2019); № 0119U000660 «Розробка прототипу лікарського препарату з антитромботичною та проангіогенною дією на основі калікс[4]арену C-145» (2019); № 0119U001795 «Підготовка та проведення клінічних випробувань композиту адсорбційного гемостатичного аплікаційного «Карбогемостат» (2019); № 0114U003217 «Вивчення механізму формування фібринового каркасу тромбу та розробка діагностикумів стану системи гемостазу при запальних процесах, серцево-судинних захворюваннях та хірургічних втручаннях» (2019-2023).

Мета і завдання дослідження. Мета дисертаційної роботи полягала у пошуку та вивченні механізмів дії нових біологічно активних сполук та біоматеріалів, здатних впливати на зсідання крові.

Відповідно до мети було поставлено такі завдання:

1. Дослідити ендогенні та екзогенні сполуки, речовини та матеріали з метою виявлення серед них потенційних ефекторів, здатних інгібувати агрегацію тромбоцитів чи ініціювати її.

2. Розробити спосіб отримання висококонцентрованої суспензії тромбоцитів, охарактеризувати функціональну здатність отриманих тромбоцитів та апробувати суспензію для біомедичного застосування.

3. Провести випробування антитромботичного препарату калікс[4]арен C-145 *in vivo*.

4. Розробити універсальний кровоспинний засіб на основі ензимного активатора зсідання крові та активованих волокнистих вуглецевих матеріалів.

5. Охарактеризувати препарат колагену, розробити спосіб створення колагенової губки для застосування у хірургії та створити на його основі кровоспинний засіб, здатний до біодеградації.

6. Розробити спосіб отримання аутологічного фібринового композиту для прискорення загоєння ран.

7. Розробити спосіб отримання високоактивного препарату тромбіну.

Об'єкт дослідження. Система гемостазу людини.

Предмет дослідження. Способи стимулювання екстрасудинного та інгібування внутрішньосудинного тромбоутворення.

Методи дослідження. У роботі використано хроматографічні та електрофоретичні методи, агрегатометрію, спектрофлуориметрію, цитометрію, скануючу електронну мікроскопію, низку тестів для характеристики стану системи гемостазу, ультразвукову діагностику шкіри, турбідиметрію, модельні дослідження ангіогенезу та тромбогенезу в моделі *Danio rerio*, дослідження кровотечі за умов резекції печінки щурів, кровотечі з каротидної артерії щурів, резекції печінки та перелому кінцівок кролів, МТТ-тест, тест на заростання подряпини, статистичні методи аналізу.

Наукова новизна отриманих результатів. Аналіз механізмів активації системи зсідання крові дозволив обрати етап активації протромбіну як найбільш придатну потенційну мішень застосування прокоагулянтних засобів. У роботі обґрунтовано недостатню ефективність використання неспецифічних ефекторів, які активують компоненти системи зсідання крові, що знаходяться в каскаді коагуляції перед протромбіном, а також недоцільність застосування тромбіноподібних ензимів, які завершують функціонування каскаду на етапі фібриноутворення.

Такі результати дозволили вперше запропонувати ензимний активатор протромбіну для надання біоматеріалам прокоагулянтних властивостей. Створені з використанням цього підходу кровоспинні та ранозагоювальні матеріали пройшли всебічну апробацію *in vitro* та *in vivo*, яка довела їхню ефективність порівняно з аналогами та підтвердила висновок про виключне значення етапу активації протромбіну в розробці біотехнологічних підходів для стимулювання екстрасудинного тромбоутворення.

Теоретичне значення отриманих результатів. Проведене комплексне дослідження молекулярних механізмів екстрасудинного та внутрішньосудинного тромбоутворення стало запорукою формування наукової концепції, яка дозволяє проаналізувати реперні точки системи гемостазу як потенційні мішені про- та антикоагулянтних засобів. У роботі оцінено

ефективність потенційного інгібування чи активації окремих ланок гемостазу, що було підтверджено експериментально.

Практичне значення отриманих результатів. У ході роботи визначено низку біологічно активних сполук, речовин та біоматеріалів, які виступають ефекторами тромбоцитів. Сполуки, здатні інгібувати активацію тромбоцитів (метаболіти лігнанів, епігалокатехінгаллат, N-стеароїлетаноламін), можуть розглядатися як допоміжні засоби за умов проведення антикоагулянтної терапії. Діоксид силіцію, який був здатний активувати тромбоцити безпосередньо та опосередковано через активацію компонентів системи зсідання крові, є перспективним компонентом засобів зупинки локальних кровотеч. Відносно інертні нанодіаманти та фулерени можуть виступати потенційними носіями для терапевтичних сполук, що контактують з кров'ю.

У роботі обґрунтовано, охарактеризовано та апробовано нові біоматеріали прокоагулянтної дії, які можуть бути основою для створення кровоспинних медичних виробів. Зокрема описано кровоспинний засіб на основі ензимного активатора зсідання крові та активованого вуглецевого матеріалу (UA Патент № 114356, опубл. 10.03.2017, Бюл. №5.), засіб, здатний до біодеградації, на основі колагену з посиленими прокоагулянтними властивостями, створено методику отримання аутологічного фібринового композиту для прискорення загоєння ран (UA Патент №100467; опубл. 12.12.2016, Бюл. №23). Запропоновано ефективний підхід для клітинної терапії суспензією аутологічних висококонцентрованих функціонально активних тромбоцитів (UA Патент №133766; опубл. 25.04.2019, Бюл. №8.). Розроблено новий ефективний метод отримання активного тромбіну (UA Патент № 90935; опубл. 10.06.2014, Бюл. №11).

Результати, представлені в дисертації, знайшли впровадження у виробництві (спосіб отримання колагену) та у біомедицині (спосіб отримання суспензії аутологічних тромбоцитів), що підтверджено відповідними актами про впровадження.

Особистий внесок здобувача. Особистий внесок здобувача є визначальним на всіх етапах досліджень. Всю експериментальну роботу було проведено дисертантом особисто або за його безпосереднього керівництва та участі в проведенні експериментів. Роботу сплановано здобувачем спільно з науковим консультантом – академіком НАН України С.В. Комісаренком. Формування стратегії досліджень було здійснено спільно з завідувачем відділу структури та функції білка (2009-2019) чл.-кор. НАН України, д.б.н., проф. Е.В. Луговським і провідним науковим співробітником відділу, д.б.н., проф. Т.М. Платоною.

Дизайн експерименту, аналіз експериментальних даних проведено спільно зі старшим науковим співробітником, к.б.н. Горницькою О.В., науковим співробітником відділу к.б.н. Корольовою Д.С. та молодшим науковим співробітником відділу Чернищенко Т.М. Характеристику препарату колагену проведено спільно зі співробітником відділу регуляції обміну речовин, к.б.н. Володіною Т.Т.

Частину робіт з дослідження експериментальної кровотечі виконано у співпраці зі співробітниками Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України під керівництвом д.б.н., проф. В.Є. Досенка.

Роботу з характеристики активованих вуглецевих матеріалів та з вивчення кровоспинного засобу за паренхіматозних кровотеч виконано у співпраці зі співробітниками Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України під керівництвом чл.-кор. НАН України, д.мед.н. проф. В.Г. Ніколаєва.

Випробування препаратів колагену та фібринового гелю проведено у співпраці зі співробітниками Білоцерківського національного аграрного університету під керівництвом д.б.н., проф. Рубленка М.В. Синтез калікс[4]аренів для спільних досліджень здійснено співробітниками Інституту органічної хімії НАН України під керівництвом академіка НАН України, д.х.н., проф. В.І. Кальченка.

Дослідження з використанням моделі *Danio rerio* виконано спільно зі співробітниками Інституту біології Шаньдунської академії наук (Китай) під керівництвом проф. Лю Кечуна. Вивчення деяких біоматеріалів та ефекторів тромбоцитів проведено спільно зі співробітниками Брайтонського університету (Великобританія) під керівництвом к.б.н. Михаловської Л.І.

Апробація матеріалів дисертації. Результати досліджень було представлено на фахових конференціях: RECOOP 14th Bridges in life sciences and 2nd RECOOP – KFSD International Student Conference. 2019, Bratislava, Slovak Republik, April 10-14; International. Conference on Open Dialog in Applied Engineering: Recent Advances and New Frontiers. November 14-17, 2019. Madeira, Portugal; 10th RECOOP Annual Project Review Meeting, Wroclaw, October 11-12, 2019; II Международная научно-практическая конференция «Биотехнология: достижения и перспективы развития», Беларусь, Минск, 7-8 декабря, 2017; 8th RECOOP Annual Project Review Meeting. – Croatia, October 19-21, 2017; 7th TriNet Meeting - Annual Project Review Meeting. - October 7-8, 2016, Budapest, Hungary; 16th Annual NATA Symposium. Prague, Czech Republic. – 16-17 Apr. 2015; 40th FEBS Congress, The Biochemical Basis of Life. Berlin, Germany. – 6-9 Jul. 2015; BIO-2014, September 6-9, 2014, Warsaw, Poland, 2014; XXIIInd International Fibrinogen Workshop, July 4-6, 2012 Brighton, UK, 2012; XXIIIInd International Fibrinogen Workshop, July 4-6, 2014 Marseille, France; First World conference on physico-chemical methods in drug discovery and development, September 27 – October 1, 2009: abstracts – Rovinj, 2009.

Публікації. Матеріали дисертації опубліковано у 35 наукових статтях у фахових наукових журналах та закордонних виданнях, в 40 тезах доповідей на наукових конференціях, отримано 6 патентів України.

Структура та обсяг дисертації. Дисертацію викладено українською мовою на 312 сторінках комп'ютерного набору. Робота складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів та методів, експериментальної частини, яка складається з десяти розділів, висновків, списку використаних джерел, який включає 242 найменування. Результати дисертації та допоміжні матеріали проілюстровано на 152 рисунках та представлено в 21 таблиці.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи досліджень

Дослідження протеїнів.

Метод гел-електрофорезу в системі Лемлі використовували для контролю якості протеїнових препаратів.

Денситометрію електрофорезграм проводили у програмі TotalLab TL100 (Phoretix) для визначення молекулярної маси протеїнових фракцій і відсотковий розподіл протеїну між зонами.

Турбідиметричний аналіз проводили шляхом реєстрації світлорозсіювання фібриновим згустком, що утворювався у спектрофотометричній кюветі, на спектрофотометрі Optizen-POP за довжини хвилі 350 нм.

Мас-спектрометричний аналіз проводили на MALDI-TOF спектрометрі Voyager DE PRO фірми Applied Biosystems (USA). Застосовували H⁺-матричну іонізацію поліпептидів за допомогою сінапінової кислоти (Sigma-Aldrich). Отримані спектри обробляли з використанням програми Data Explorer 4.0.0.0 (Applied Biosystems).

Методи лабораторної діагностики.

Активацію протромбіну проводили з використанням активатора зсідання крові або тромбопластину.

Ензиматичну активність факторів зсідання крові визначали за допомогою специфічних активаторів та специфічних хромогенних субстратів.

Концентрацію фібриногену в плазмі крові визначали спектрофотометрично з використанням тромбіноподібного ензиму анцистрону.

Вміст розчинних фібрин-мономерних комплексів у плазмі крові здійснювали за допомогою методу паракоагуляції з використанням фосфатних буферів.

Загальний гемостатичний потенціал плазми крові визначали за методом Vlomback у модифікації д.б.н., проф. Є.М. Макогоненка.

Дослідження тромбоцитів.

Агрегатометрію виконували в збагаченій тромбоцитами плазмі крові у перші дві години після забору крові на фотооптичному агрегометрі «SOLAR AP2110» за методом Born. Оцінювали ступінь агрегації – максимальний рівень світлопропускання збагаченої тромбоцитами плазми крові після внесення індуктора агрегації; швидкість агрегації – швидкість зміни світлопропускання після внесення індуктора агрегації за перші 30 с; час агрегації – час досягнення максимального ступеню агрегації. У випадку колаген-індукованої агрегації вимірювали тривалість lag-фази.

Цитометрію проводили з використанням протокового цитометра COULTER® EPICS™ XL™ Flow Cytometer, який є системою для якісного і кількісного визначення біологічних та фізичних властивостей клітин. В ході експерименту реєстрували два типи світлорозсіювання: фронтальне (FS), яке характеризує розмір клітин, та ортогональне (SS), яке характеризує щільність цитоплазми клітини, тобто гранулярність тромбоцитів.

Скануючу електронну мікроскопію використовували для вивчення адгезії тромбоцитів до тромбогенних поверхонь з використанням Zeiss Sigma Field Emission Gun SEM.

Спектрофлуориметричні дослідження проводили для визначення дегрануляції тромбоцитів у процесі активації за допомогою приладу Signe-4M.

***In vivo* моделі.**

Оцінку кровоспинної дії біоматеріалів проводили шляхом резекції печінки щурів. Оцінювали час кровотечі та об'єм крововтрати.

Антитромботичну дію калікс[4]арену C-145 *in vivo* досліджували шляхом його введення у крайову вену вуха кролів із застосуванням канюлі розміром G22. Забір крові проводили через вказаний катетер: до введення препарату, через 2, 4 та 24 години після його одноразової ін'єкції.

Модель Zebrafish (Danio rerio) використовували для оцінки протромботичної дії активатора зсідання крові та антитромботичної і проангіогенної дії калікс[4]арену C-145.

Модель кровотечі з каротидної артерії щурів використовували для оцінки кровоспинної дії біоматеріалів на базі Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України.

Лапаротомічні дослідження та модель перелому кінцівок кролів виконували на базі Білоцерківського національного аграрного університету.

Методи клітинної біології.

Проліферацію ендотеліоцитів вивчали на лінії ендотеліоцитів свині (PAE) та на первинній культурі клітин HUVEC.

Метод «заростання подряпини» застосовували для дослідження рухливості клітин лінії H1299 у клітинному моношарі.

Медичні дослідження.

Ультразвукове дослідження шкіри (УЗД) проводили з використанням апарату для УЗД SKINSCANNER DUB CUTIS 22 с датчиком 22 МГц. Визначали загальну товщину шкіри, дерми та епідермісу окремо. Проводили диференційовані виміри шкіри чола, підборіддя, лівої та правої щоки.

Статистичну обробку та аналіз отриманих експериментальних даних виконували за допомогою пакету програм Excel 2003. Представлені на рисунках дані є типовими для серії повторюваних дослідів (не менше трьох у кожній серії).

Результати досліджень та їх обговорення

Інгібітори внутрішньосудинного тромбоутворення

Внутрішньосудинне зсідання крові є причиною більш ніж третини випадків смертності за серцево-судинних захворювань, травмах різної природи і хірургічних операціях, сепсисі, опіках, онкологічних захворюваннях, захворюваннях, пов'язаних з патологією гемостазу, та ін.

Внутрішньосудинне тромбоутворення виникає внаслідок пошкодження ендотеліальних клітин з експонуванням тромбогенних субендотеліальних структур; патологічної активації тромбоцитів; гіперактивації системи зсідання крові, що призводить до появи в кровотоці активного тромбіну; зниження фібринолітичного потенціалу; реологічних порушень та локального припинення кровотоку.

Розуміння цих процесів необхідне для розробки і удосконалення антитромботичних засобів.

На рис. 1. зображено узагальнену схему системи гемостазу, в основі функціонування якої лежить утворення фібриново-тромбоцитарного згустку – тромбу.

Дію прямих антикоагулянтів, головним чином, спрямовано на активований фактор Ха або тромбін, або ж на тромбоцити. Аналізуючи механізми внутрішньосудинного тромбоутворення, можна визначити основні мішені, дія на які призводить до його інгібування: фібрин(оген), фактори каскаду зсідання крові і тромбоцити. Інгібітори агрегації тромбоцитів є на перший погляд менш ефективними, ніж інгібітори тромбіну чи фактору Ха, однак ми розглядаємо саме тромбоцити як мішень для антитромботичних препаратів.

По-перше, існує низка механізмів активації тромбоцитів, кожен з яких може бути специфічно заінгібованим. Можливе інгібування як окремого механізму, так і декількох сигнальних шляхів. Наприклад, інгібування циклооксигенази аспірином поруч із застосуванням RGD-вмісних препаратів дозволить знизити дозу аспірину, застрахувавшись від кровотеч та забезпечивши ефективне попередження внутрішньосудинного тромбоутворення.

По-друге, дія на тромбоцити не призводить до розладу протеїнової ланки системи зсідання крові, однак зменшує загальний прокоагулянтний потенціал крові. Приміром, активація тромбіну на тлі застосування антитромбоцитарних препаратів не призводитиме до формування міцного фібриново-тромбоцитарного тромбу, проте індукуватиме генерацію активного протеїну С, який здійснює також і протизапальну дію.

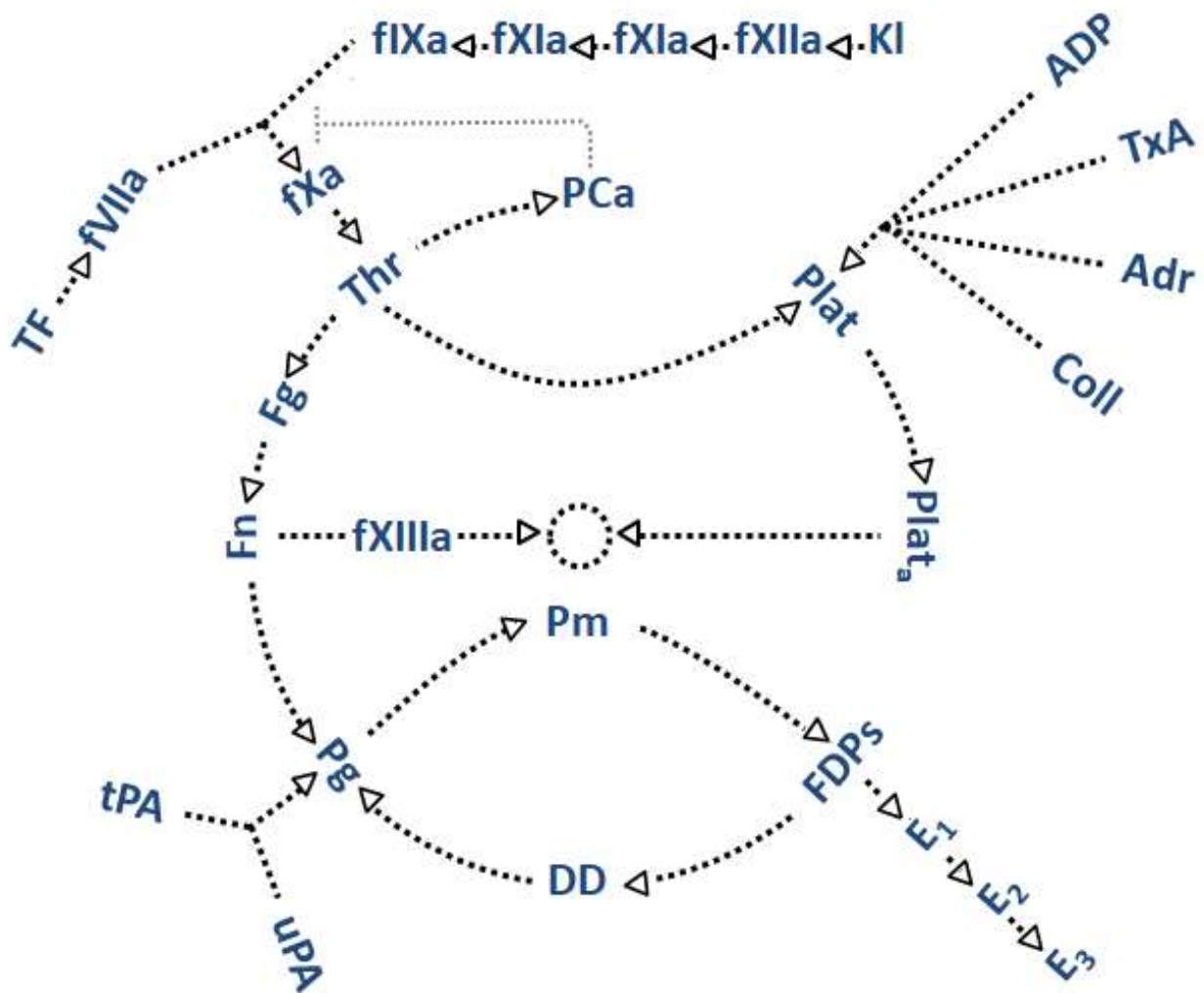


Рис. 1. Узагальнена схема системи гемостазу, що поєднує систему зсідання крові, яка призводить до формування тривимірної сітки фібрину – каркасу тромбу, тромбоцитарну ланку, активація якої призводить до формування тромбоцитарного «тіла» тромбу, систему протеїну С, яка здійснює регуляцію активності системи зсідання крові, а також систему фібринолізу, яка забезпечує гідроліз полімерного фібрину. Fg – фібриноген; Fn – фібрин; fXIIIa – активований фактор XIII; Plats – тромбоцити; Plata – активовані тромбоцити; fIXa – активований фактор IX; fXIa – активований фактор XI; fXIIa – активований фактор XII; KI – калікреїн; TF – тканинний фактор; fXa – активований фактор X; fVIIa – активований фактор VII; PCa – активований протеїн С; Coll – колаген; Adr – адреналін; TxA – тромбоксан А; ADP – аденозиндифосфат; Pp – плазміноген; Pm – плазмін; tPA – тканинний активатор плазміногену; uPA – урокіназа; FDPs – продукти деградації фібрину; DD – D-димер; E₁ – високомолекулярний E-фрагмент; E₂, E₃ – гідролізований E-фрагмент

Розробка антитромботичного препарату калікс[4]арен С-145

Можливість створення антитромботичних препаратів, які б націлено діяли на заключний етап тромбоутворення – полімеризацію фібрину – активно досліджується (Lugovskoi, 2013). Зокрема, для зменшення щільності фібринового полімеру пропонують використовувати наночастинки срібла (Shrivastava, 2011) та пептиди-інгібітори (зокрема GPRP), кон'юговані з альбуміном (Watson, 2011).

У цьому ряду калікс[4]арени, як низькомолекулярні та потенційно неімуногенні сполуки непротеїнової природи, видаються перспективними антитромботичними агентами, дію яких спрямовано саме на взаємодію А:а центрів полімеризації фібрину (Lugovskoi, 2011). При дослідженні дії калікс[4]арену С-145 *in vivo* при внутрішньовенному введенні було виявлено його значний антиполімеризаційний ефект.

Для характеристики дії С-145 на прокоагулянтний потенціал системи гемостазу використовували скринінговий коагуляційний АЧТЧ-тест. Для оцінки дії С-145 на тромбоцити використовували цитометрію, визначали зміну форми та гранулярності тромбоцитів кроля за внутрішньовенного введення С-145. Стан системи фібринолізу оцінювали за часом напівлізису фібринового згустку в плазмі крові у тесті «загальний гемостатичний потенціал» (рис. 2).

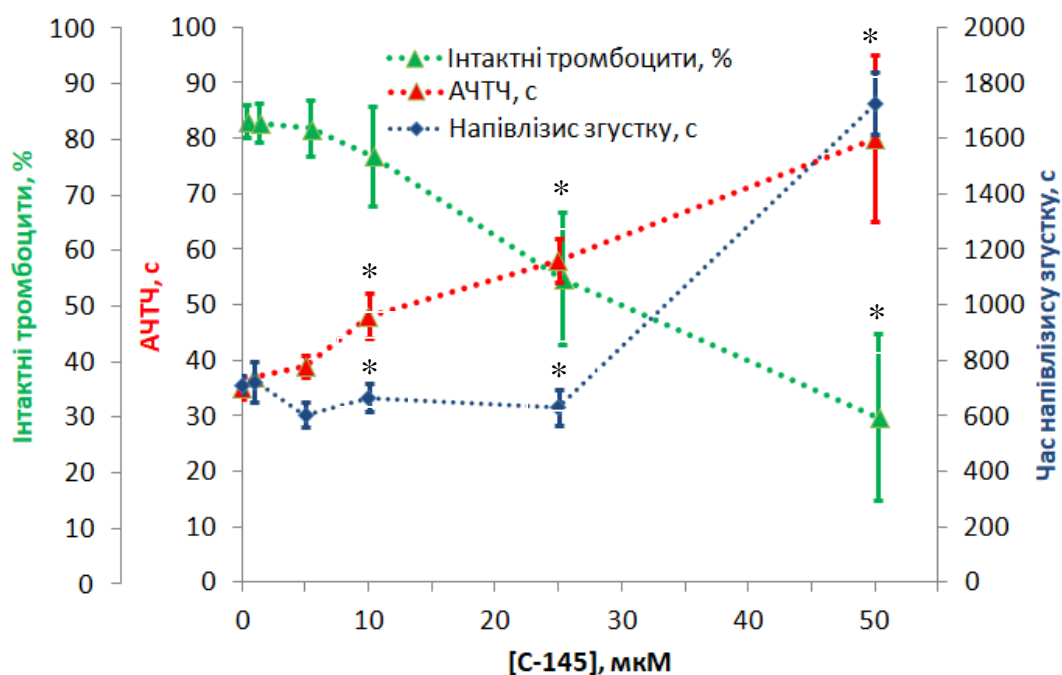


Рис. 2. Залежність часу зсідання плазми крові в тесті АЧТЧ, рівню інтактних тромбоцитів та часу напівлізису згустку від концентрації С-145 у кровотоці тварин. * – $P \leq 0,05$, $n = 5$

Було проведено серію експериментів, кожен з яких було повторено тричі. С-145 вводили внутрішньовенно у кількості 15 мг/кг, 7,5 мг/кг, 4 мг/кг та 1,5 мг/кг. За такого введення концентрація С-145 у плазмі крові піддослідних тварин становила 46 μM , 23 μM , 12,3 μM , 4,6 μM відповідно (Gorska, 2000).

Було показано, що за концентрації С-145 у кровотоці менше 12,5 μM час зсідання плазми крові у тесті АЧТЧ подовжується, водночас впливу на час напівлізису фібринового згустку не виявлено. Цей діапазон концентрацій слід вважати оптимальним для внутрішньовенного введення.

Водночас нами було виявлено суттєву дію С-145 на кількість інтактних життєздатних тромбоцитів, що загалом знижує прокоагулянтний потенціал плазми крові. Цікаво, що ми не спостерігали жодного ефекту С-145 ані на агрегаційну здатність тромбоцитів, ані на їхню форму чи гранулярність *in vitro*. Для детального вивчення активації тромбоцитів за присутності С-145 нами було використано спектрофлуориметрію з рН-чутливим зондом (акридином оранжевим), який спонтанно накопичувався у клітинах інтактних тромбоцитів та вивільнявся з клітин при їхній стимуляції ADP.

Було показано, що внесення С-145 у збагачену тромбоцитами плазму крові здорових тварин у кількостях, еквівалентних тим, які існують у кровотоці за внутрішньовенного введення С-145 лабораторним тваринам, викликає зниження здатності тромбоцитів до ADP-індукованого викиду рН-чутливого зонду, тобто – дегрануляції (рис. 3).

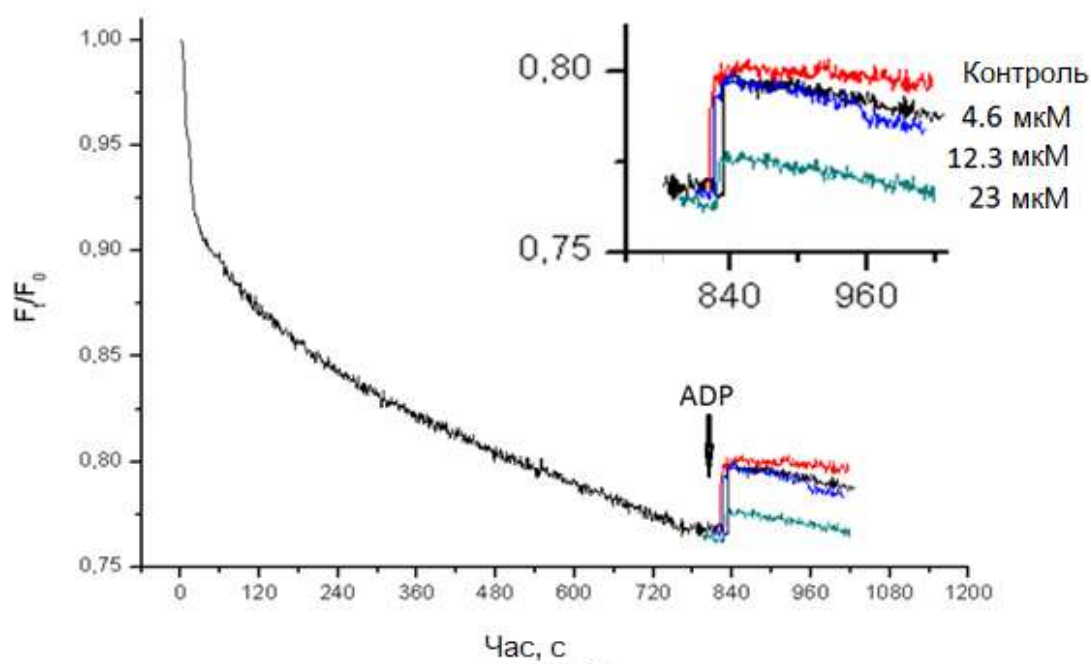
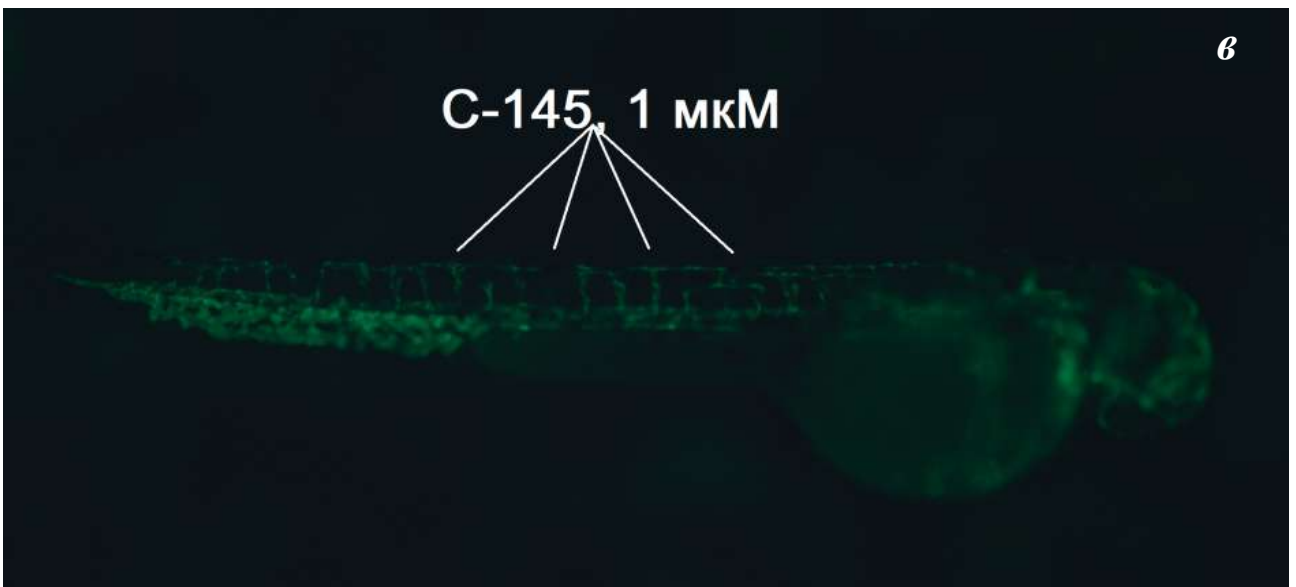
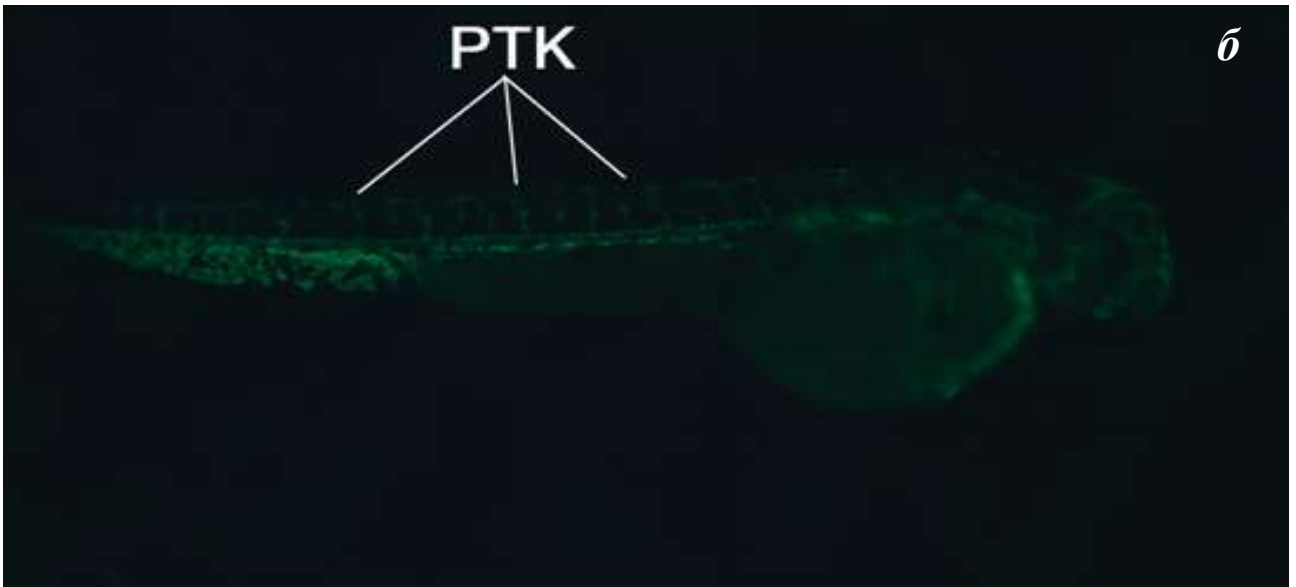
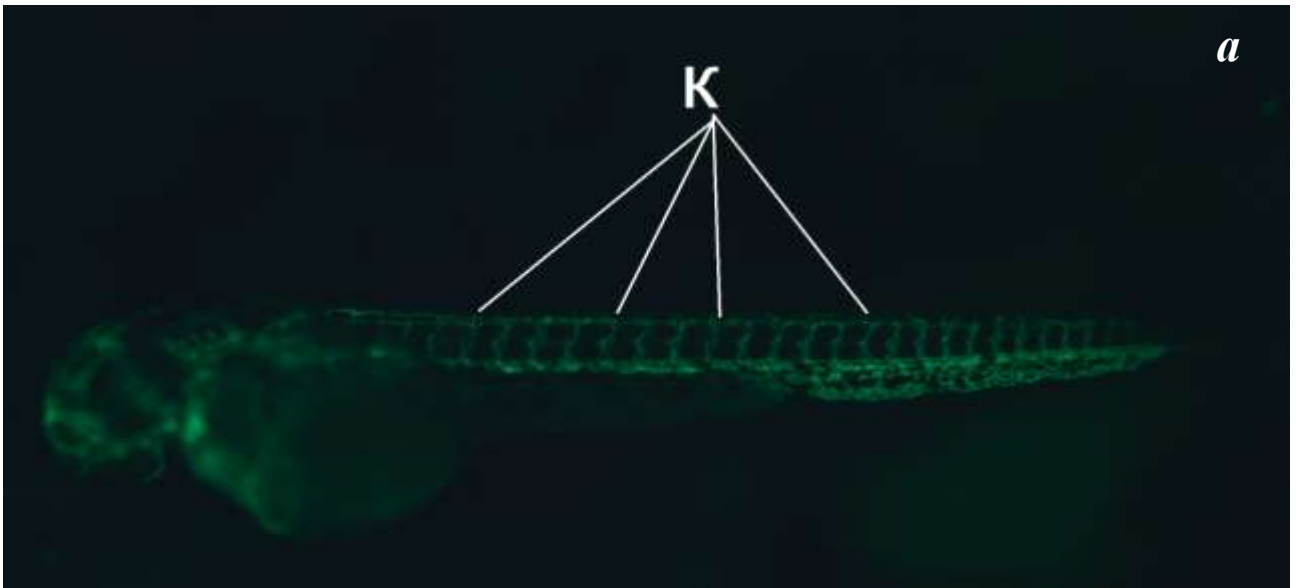


Рис. 3. Спектрофлуориметрія депонування і вивільнення з тромбоцитів людини рН-чутливого барвника за присутності калікс[4]арену С-145 у кількості 4,6; 12,3; 23 μM . Показано накопичення барвника у цитоплазмі тромбоцитів та його вивільнення під дією індуктора. F_t/F_0 – флуорисценція відносно базового значення. Дані типового експерименту, $n = 3$.

Для виявлення проангіогенних ефектів С-145 використали оригінальну модель із застосуванням рибок *Danio rerio*. Ембріони цих риб є зручною моделлю для тестування впливу малих молекул на формування підшлункових судин, які можуть бути профарбовані й візуалізовані з використанням мікроскопії у реальному часі на живих тваринах (рис. 4).



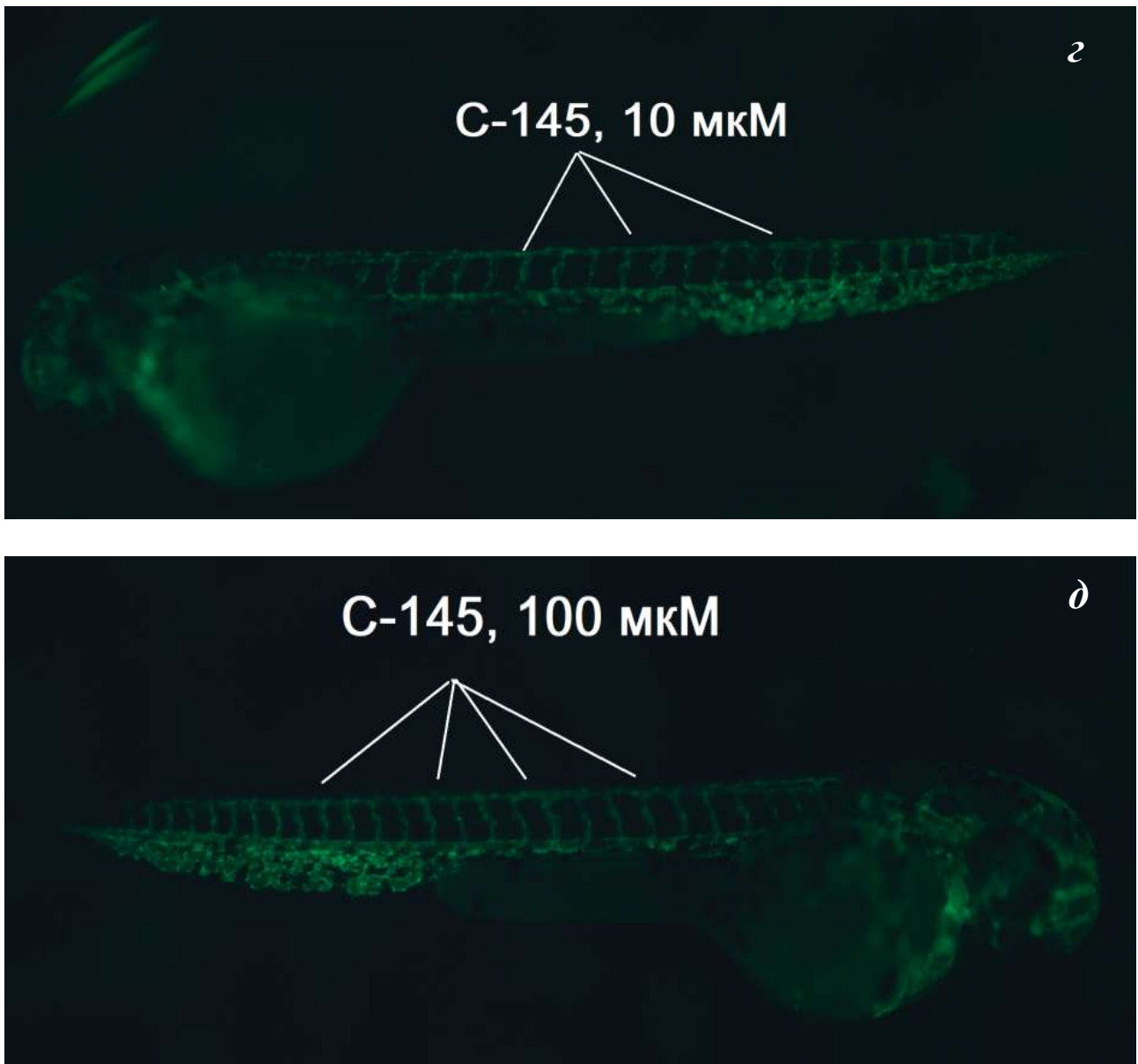


Рис. 4. Відновлення проростання міжсегментарних судин у ембріона *Danio rerio* за умов введення до культурального середовища різних концентрацій калікс[4]арену С-145 (1-100 мкМ) на тлі адміністрації антиангіогенного агента (РТК). Показано концентраційно залежне зменшення антиангіогенного ефекту РТК за присутності С-145 та практично повне відновлення міжсегментарних судин за присутності 100 мкМ С-145. *а* – контроль; *б* – за присутності антиангіогенного агента РТК; *в, з, д* – за присутності антиангіогенного агента РТК та 1 мкМ, 10 мкМ та 100 мкМ С-145 відповідно. Наведено дані типового експерименту, $n = 12$

Досліджувані сполуки додають безпосередньо до культурального середовища, в якому розвиваються риб'ячі ембріони, штучно позбавлені яйцевої оболонки за допомогою пронази. Завдяки цьому аналізовані сполуки вільно дифундують у ембріон. У якості позитивного контролю застосовували відомий антиангіогенний агент РТК, який було протестовано і на моделях ссавців. Ця сполука призупиняє ангіогенез і формування нових судин за умов постійного контакту з ембріоном. В основі методу лежить перевірка: чи нівелюватиме дію РТК введення до середовища інкубації калікс[4]арену С-145.

Під бінокулярним мікроскопом чітко видно міжсегментарні судини, які проростають від центральної осі ембріону. Водночас, при застосуванні антиангіогенного агента РТК міжсегментарні судини відсутні майже повністю.

Раніше концентрацію С-145 10 мкМ було обрано як ефективну дозу для антитромботичної дії. Як показали наші дослідження у модельній системі, вона також має проангіогенний ефект. Ефект стимулювання ангіогенезу як додатковий ефект антитромботичного препарату може мати дуже вагомe значення, зокрема, при реішемізації тканин та органів.

Таким чином, калікс[4]арен С-145 (рис. 5) може стати перспективним антитромботичним агентом, який володітиме додатковою проангіогенною дією.

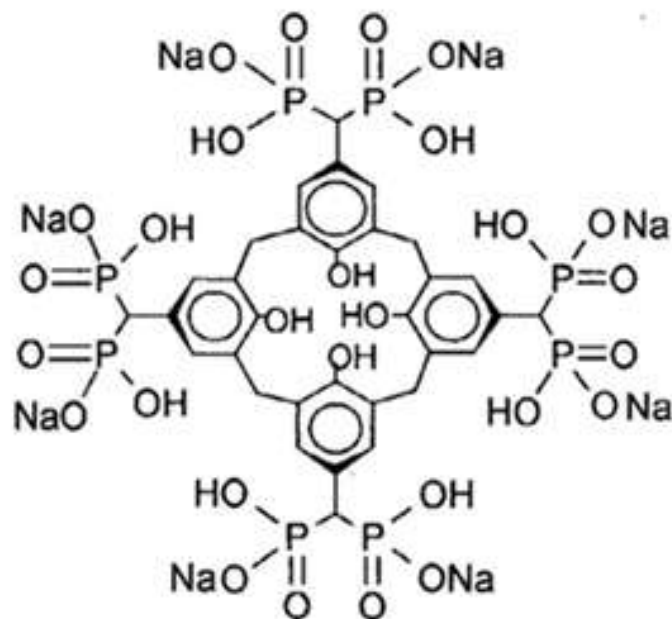


Рис. 5. Структурна формула калікс[4]арену С-145 (натрієвої солі калікс[4]арен-тетраметиленбісфосфонової кислоти). Сполука у розчині дисоціює і набуває вигляду гідрофобної чаші, по обідку якої розташовано негативно заряджені кислотні залишки

Дія екзогенних та ендогенних ефекторів на тромбоцити

*Дезінтегрин з отрути ефі багатолускової (*Echis multisquamatis*).*

Особливий інтерес у дослідників викликають інгібітори агрегації тромбоцитів, які є антагоністами тромбоцитарного рецептора фібриногену – глікопротеїну П₂У₃а (GP П₂У₃а), що відіграє ключову роль у процесі агрегації тромбоцитів. Це дає можливість створювати на основі таких компонентів отрути високоспецифічні антиагрегантні препарати для профілактики тромботичних ускладнень при захворюванні серцево-судинної системи.

У складі отрути ефі багатолускової було виявлено низькомолекулярний компонент, який ефективно знижував швидкість та ступінь ADP-індукованої агрегації тромбоцитів людини. Ефективність антиагрегантної дії сполуки зростала з часом попередньої інкубації, що свідчить про міцне зв'язування молекули з GP П₂У₃а (рис. 6, рис. 7).

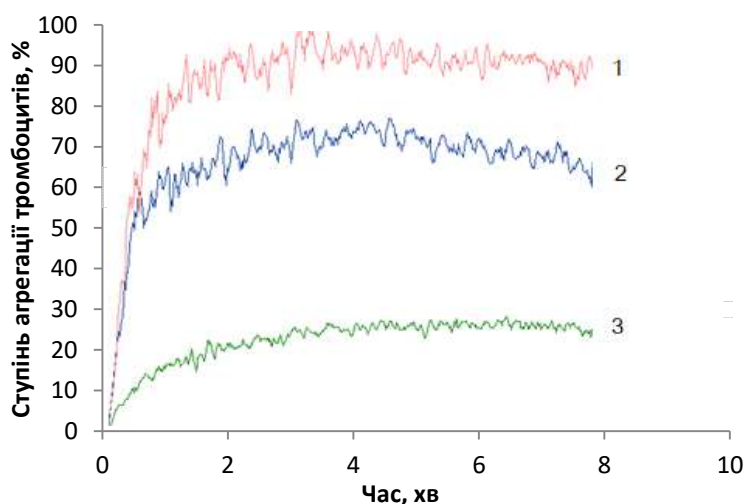


Рис. 6. Типові криві ADP-індукованої агрегації тромбоцитів людини, отримані за присутності низькомолекулярного компоненту отрути ефі багатолускової. 1 – контроль; 2, 3 – 0,012 мкг/мл та 0,025 мкг/мл досліджуваної сполуки відповідно. Дані типового експерименту, n = 3

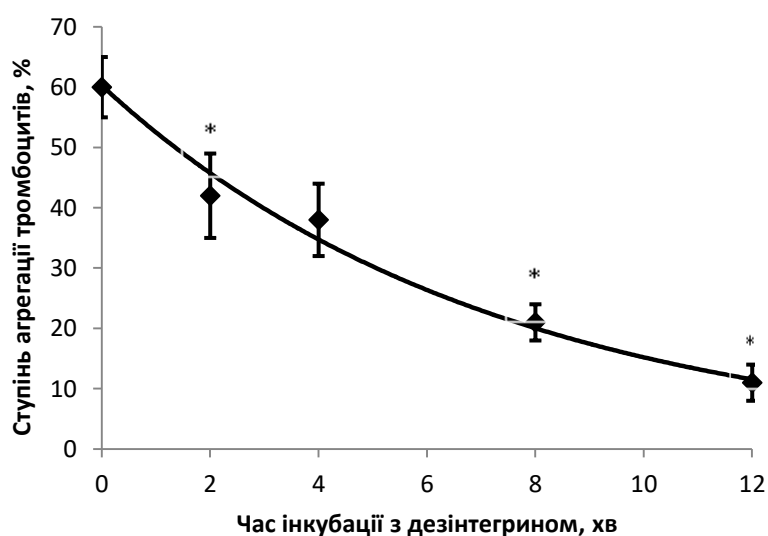


Рис. 7. Залежність ступеня ADP-індукованої агрегації тромбоцитів людини від часу попередньої інкубації з низькомолекулярним компонентом отрути ефі багатолускової (0,025 мкг/мл). * – $P \leq 0,05$, n = 5

N-стеароїлетаноламін (NSE) належить до ендоканабіноїдів, що генерується в організмі за патологічних станів та виконує регуляторну функцію, запобігаючи розбалансуванню низки біологічних процесів у організмі, зокрема він є протизапальним агентом, стимулює регенерацію тканин та органів, чинить протівірусну дію (Hula, 2017).

Вивчення здатності NSE діяти на тромбоцити дозволило виявити помірний антиагрегантний ефект на ADP-індуковану агрегацію тромбоцитів. Щоб переконатися у специфічності ефекту NSE на тромбоцити, ми порівнювали його антиагрегантну дію з активністю близької за структурою ліпофільної сполуки – N-олеоїлетаноламіну (NOE). Було проведено дослідження ADP-індукованої агрегації тромбоцитів з використанням серії концентрацій NSE та NOE – від 10^{-10} до 10^{-4} М. Було виявлено, що на відміну від NSE, NOE не мав здатності пригнічувати агрегацію тромбоцитів (рис. 8). Натомість введення NSE в концентрації 10^{-7} та 10^{-8} М знижувало ADP-індуковану агрегацію тромбоцитів ADP на 30-40 %.

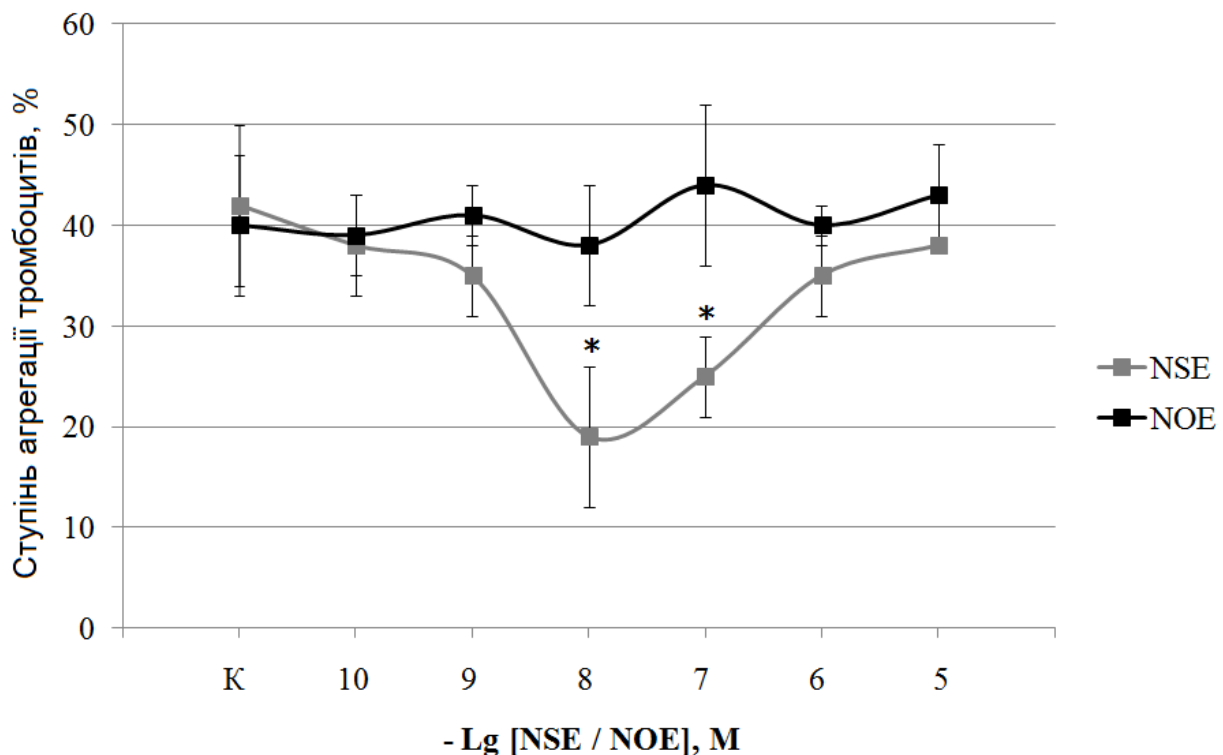


Рис. 8. Залежність ступеня ADP-індукованої агрегації тромбоцитів людини від кількості внесеного NSE і NOE. * – $P \leq 0,05$, $n = 5$

Для вивчення зв'язування тромбоцитів з фібриногеном, яке є неодмінною умовою їхньої агрегації, було розроблено підхід з використанням непрямого імуноензимного аналізу, у якому визначали відносну кількість фібриногену, який зв'язався з адгезованими до пластику тромбоцитами, за допомогою моноклональних антитіл до фібриногену.

Продемонстровано, що за концентрацій NSE 10^{-7} та 10^{-8} М зв'язування фібриногену з адгезованими тромбоцитами зменшувалося на 25-30 % порівняно з контролем (рис. 9а). NSE в концентрації 10^{-6} та 10^{-9} М не впливав на зв'язування фібриногену з адгезованими тромбоцитами, що підтверджує дані агрегатометрії.

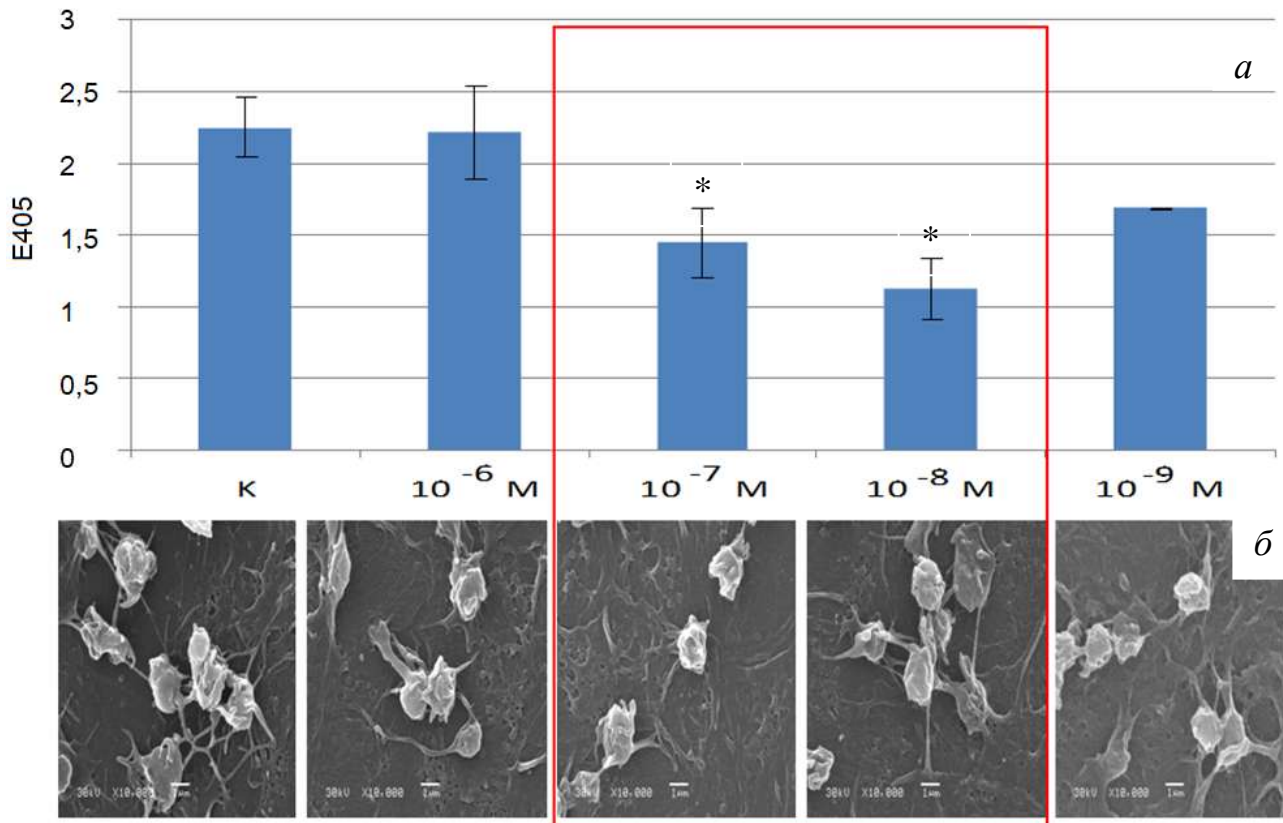


Рис. 9. Результати непрямого сендвіч-ELISA зв'язування фібриногену з активованими тромбоцитами (а) за присутності різних концентрацій NSE; зв'язування тромбоцитів з фібриногеном, сорбованим на пластику (б) за різних концентрацій NSE. * – $P \leq 0,05$, $n = 5$

За даними скануючої електронної мікроскопії, значної зміни ступеня адгезії тромбоцитів до вкритої фібриногеном поверхні не спостерігали (рис. 9б). Однак, тромбоцити за присутності NSE в концентраціях 10^{-7} та 10^{-8} М переважно зберігали округлу форму та мали меншу кількість псевдоподій, що свідчить про меншу активацію та узгоджується з даними кількісного тесту.

Можна припустити, що здатність NSE інгібувати агрегацію тромбоцитів насамперед пов'язано з прямим інгібуванням зв'язування тромбоцитів з фібриногеном, можливо, завдяки порушенню динамічного розподілу інтегринових рецепторів у мембрані тромбоцитів за присутності NSE.

Галлат епігалокатехіну (EGCG). EGCG є однією з основних біологічно активних сполук зеленого чаю. Раніше було показано його здатність впливати на функціональну активність тромбоцитів. Зокрема було показано, що EGCG блокує фосфоліпазу PLC γ 2, а також фосфорилування тирозинових залишків протеїнів. Відомо також, що EGCG також зменшує концентрацію цитозольного кальцію, викид арахідонової кислоти та секрецію серотоніну.

Такі властивості дозволяють припустити можливість застосування EGCG для консервування тромбоцитів, інгібування апоптозу клітин, тощо. EGCG як біологічно активну добавку також рекомендовано для використання при серцево-судинних захворюваннях та за дисфункції тромбоцитів.

Ми провели комплексне дослідження дії різних концентрацій EGCG на ступінь активації та агрегації тромбоцитів, а також дослідили можливість застосування цієї сполуки як протекторної молекули за умов гемодіалізу з застосуванням карбонових сорбентів.

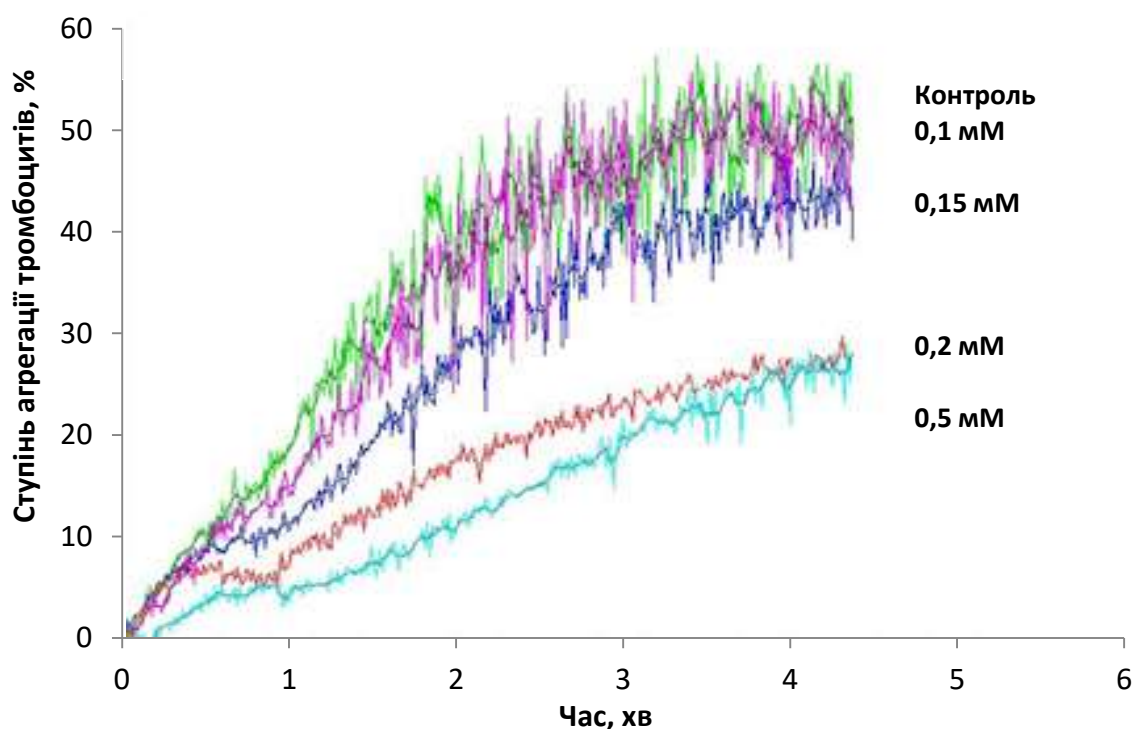


Рис. 10. Типові криві ADP-індукованої агрегації тромбоцитів людини, отримані за присутності 0,1-0,5 мМ галлату епігалокатехіну на ADP-індуковану агрегацію тромбоцитів людини у збагаченій тромбоцитами плазмі крові. Дані типового експерименту, n = 3

Виявлено концентраційну залежність інгібіторної дії EGCG на процес агрегації тромбоцитів (рис. 10). IC₅₀ приблизно дорівнює 0,18 мМ. Нами було показано, що EGCG не діє на тромбоцити у стані спокою, але зменшує ступінь агрегації та активації тромбоцитів, проактивованих низкою агоністів (тромбін, ADP і PAF).

Оскільки концентрацію EGCG, застосовану в досліджах *in vitro*, неможливо досягнути в плазмі крові *in vivo*, ми припускаємо застосування цієї сполуки як протекторного агента *in vivo* і як терапевтичного агента при гемоперфузії чи клітинній терапії *ex vivo*.

Тому наступною метою дослідження було вивчення впливу епігалокатехінгаллату (EGCG) на взаємодії карбонової матриці та тромбоцитів людини. Для цього 1,5 мл колонки було заповнено карбоною матрицею, преінкубованою з розчином EGCG. Збагачену тромбоцитами плазму крові людини пропускали через колонки з немодифікованим карбоном і карбоном, модифікованим EGCG. Скануюча електронна мікроскопія дозволила виявити активацію тромбоцитів, адгезованих до карбонової матриці. Адгезія тромбоцитів до матриці, обробленої EGCG, була значно меншою (рис. 11).

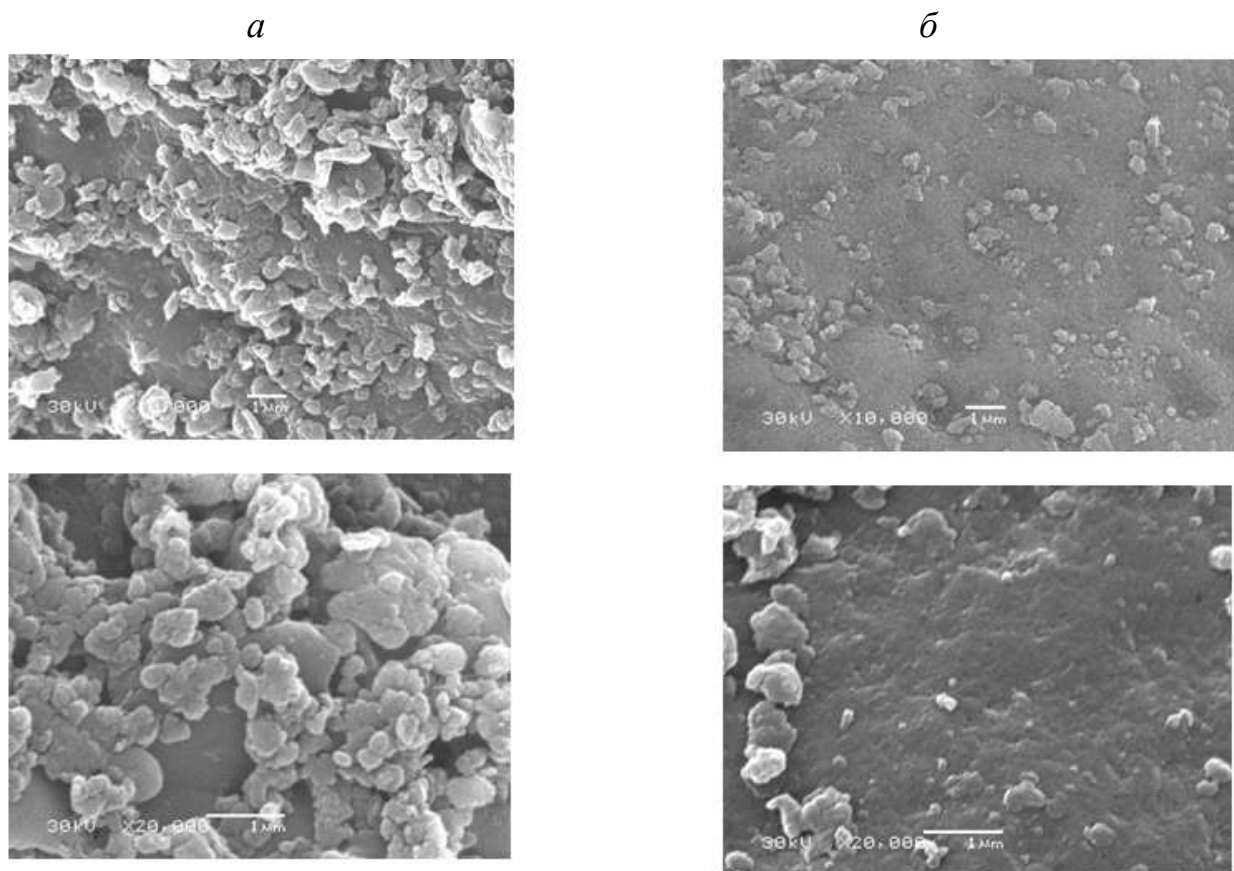


Рис. 11. Скануюча електронна мікроскопія карбонових матриць після контакту зі збагаченою тромбоцитами плазмою крові. а – карбонова матриця, яку застосовують для гемоперфузії; б – карбонова матриця, попередньо проінкубована з розчином EGCG. Дані типового експерименту, n = 3

Таким чином, EGCG виявився ефективним інгібітором процесів активації та агрегації тромбоцитів. Тромбоцити, профільтовані через карбонову матрицю, попередньо проінкубовану з EGCG, зберігали здатність до активної дегрануляції у відповідь на активатори. Дослідження дозволяють рекомендувати EGCG як потенційний протекторний агент для гемоперфузії.

Метаболіти лігнанів. Диглюкозид секоізоларициресинолу (SDG) – попередник ентеродіолу (EL) та ентеролактону (ED). Фізіологічна концентрація обох метаболітів у плазмі крові може сягати 1 мМ. Ми вивчали дію біологічних метаболітів лігнанів на активацію та агрегацію тромбоцитів.

Показано, що як ED, так і EL у фізіологічній концентрації (0,8 мМ) знижували ступінь агрегації тромбоцитів, індукованої ADP, з 64 % до 40 % та 30 % відповідно (рис. 12).

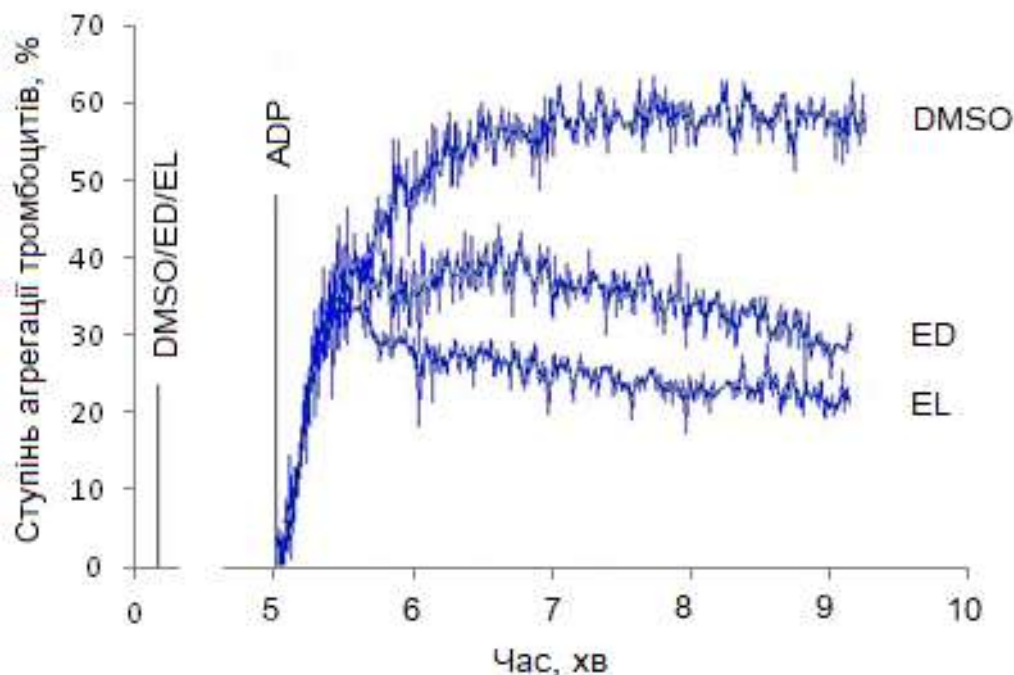
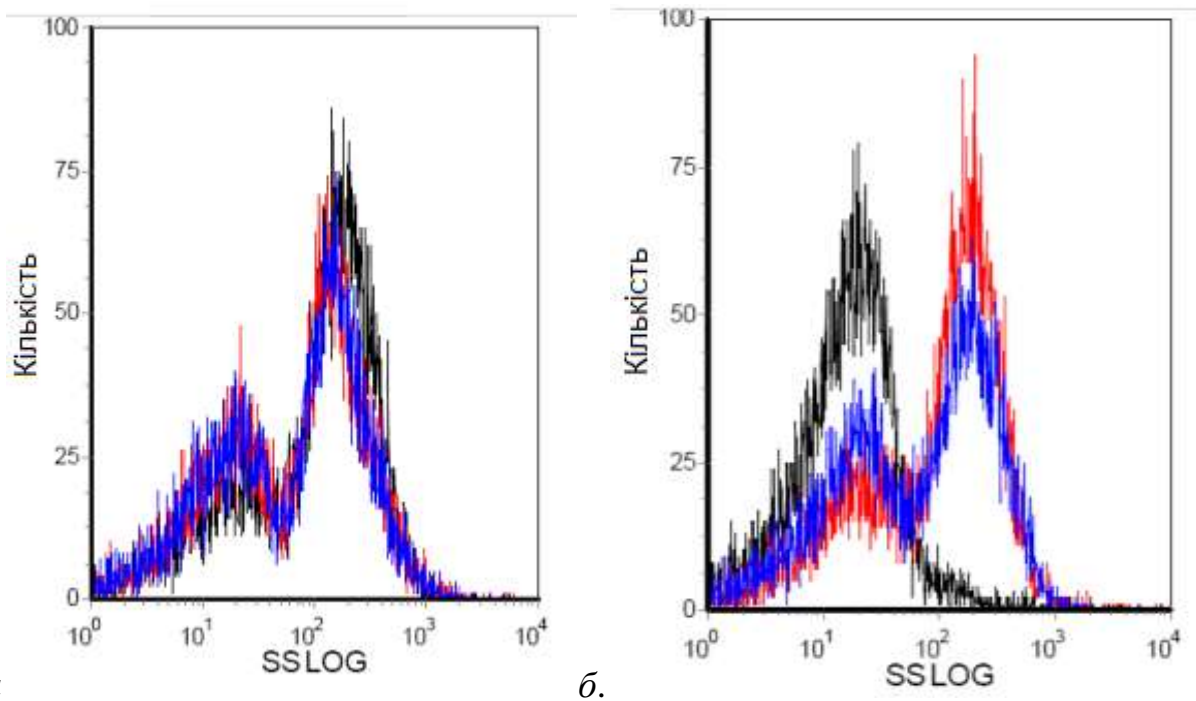


Рис. 12. Типові криві ADP-індукованої агрегації тромбоцитів людини, отримані за присутності ентеродіолу та ентеролактону (0,8 мМ). Показано точки внесення DMSO (контроль), ентеродіолу (ED), ентеролактону (EL) та ADP. Дані типового експерименту, n = 3

Ми досліджували зміну форми та гранулярності тромбоцитів під час активації. Методом протокової цитометрії відмитих тромбоцитів за присутності 0,8% DMSO, 0,8 мМ ентеродіолу (ED), та 0,8 мМ ентеролактону (EL) показано, що як ED так і EL інгібують ADP-індуковану дегрануляцію тромбоцитів та зміну їхньої форми при активації, реалізуючи протекторну дію (рис. 13, рис. 14).

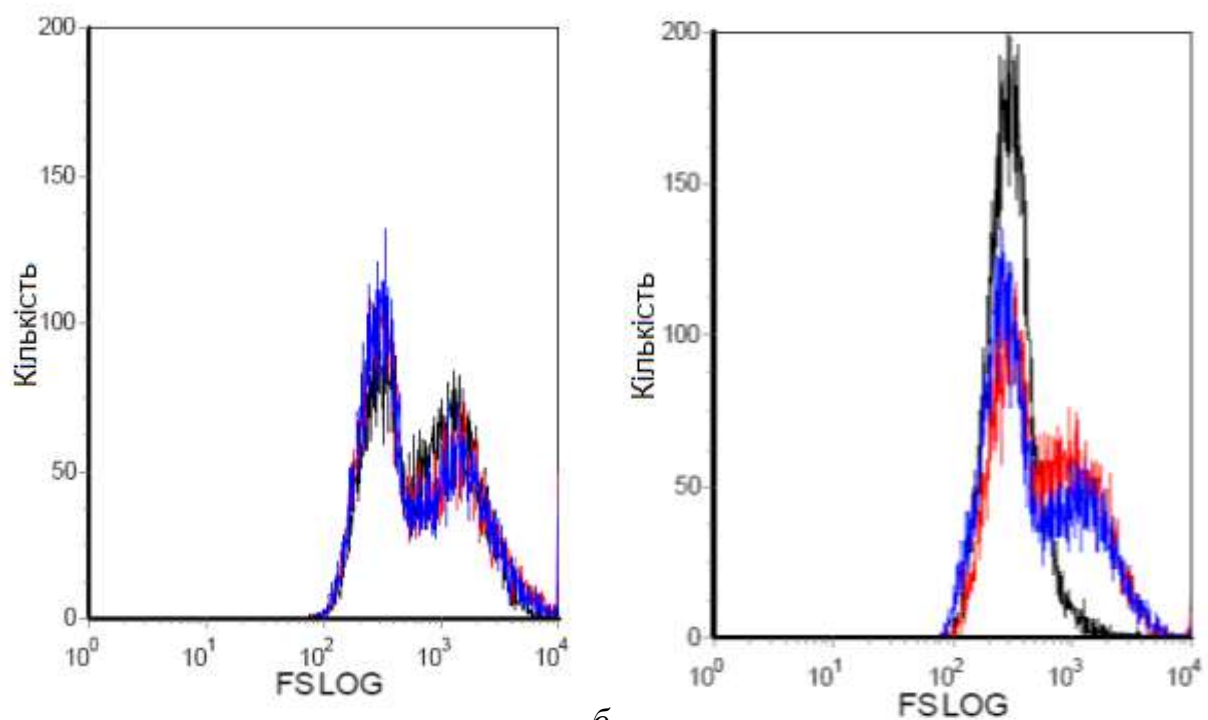
Таким чином, дія лігнанів на агрегацію тромбоцитів здійснюється саме на етапі активації. Таким чином, ентеродіол та ентеролактон інгібують агрегацію тромбоцитів, індуковану PAF, колагеном та ADP, володіючи помірною антиагрегаційною активністю в фізіологічно можливому діапазоні концентрацій. За допомогою цитометрії показано, що цей антиагрегантний ефект відбувається за рахунок пригнічення активації тромбоцитів.



a

б.

Рис. 13. Типові криві розподілу тромбоцитів відповідно до ортогонального світлорозсіювання (SS) у цитометричних дослідженнях до (*a*) та після стимуляції 25 мкМ ADP (*б*) за присутності 0,8 % DMSO (чорна крива), 0,8 мМ ентеродіолу (ED – червона крива), та 0,8 мМ ентеролактону (EL – синя крива). Дані типового експерименту, $n = 3$



a.

б.

Рис. 14. Типові криві розподілу тромбоцитів відповідно до фронтального світлорозсіювання (FS) у цитометричних дослідженнях до (*a*) та після стимуляції 25 мкМ ADP (*б*) за присутності 0,8 % DMSO (чорна крива), 0,8 мМ ентеродіолу (ED – червона крива), та 0,8 мМ ентеролактону (EL – синя крива). Дані типового експерименту, $n = 3$

Біоматеріали, модифіковані аргатробаном. Аргатробан – низькомолекулярний прямий інгібітор тромбіну, який застосовується як антикоагулянт за наявності тромбозу. Одними з матеріалів, що використовують для стентування судин, є полівінілхлорид (PVC) та поліуретан (PU). При стентуванні важливою задачею є попередження тромбоутворення в місці операції та на матеріалі стенту. В Брайтонському університеті (Великобританія) було синтезовано PVC та PU, модифіковані аргатробаном. Нашою метою було дослідити взаємодію тромбоцитів із цими біоматеріалами.

Було показано, що як полівінілхлорид та поліуретан, так і їхні модифіковані аргатробаном форми не впливають на тромбоцити у стані спокою та не інгібують ADP-індуковану агрегацію тромбоцитів (рис. 15 а, б). Натомість, тромбін-індукована агрегація тромбоцитів за присутності обох модифікованих біоматеріалів суттєво пригнічувалась (рис. 15 в, г). Таким чином, модифікація біоматеріалів інгібіторами тромбіну є перспективним способом зменшення їхньої тромбогенної активності.

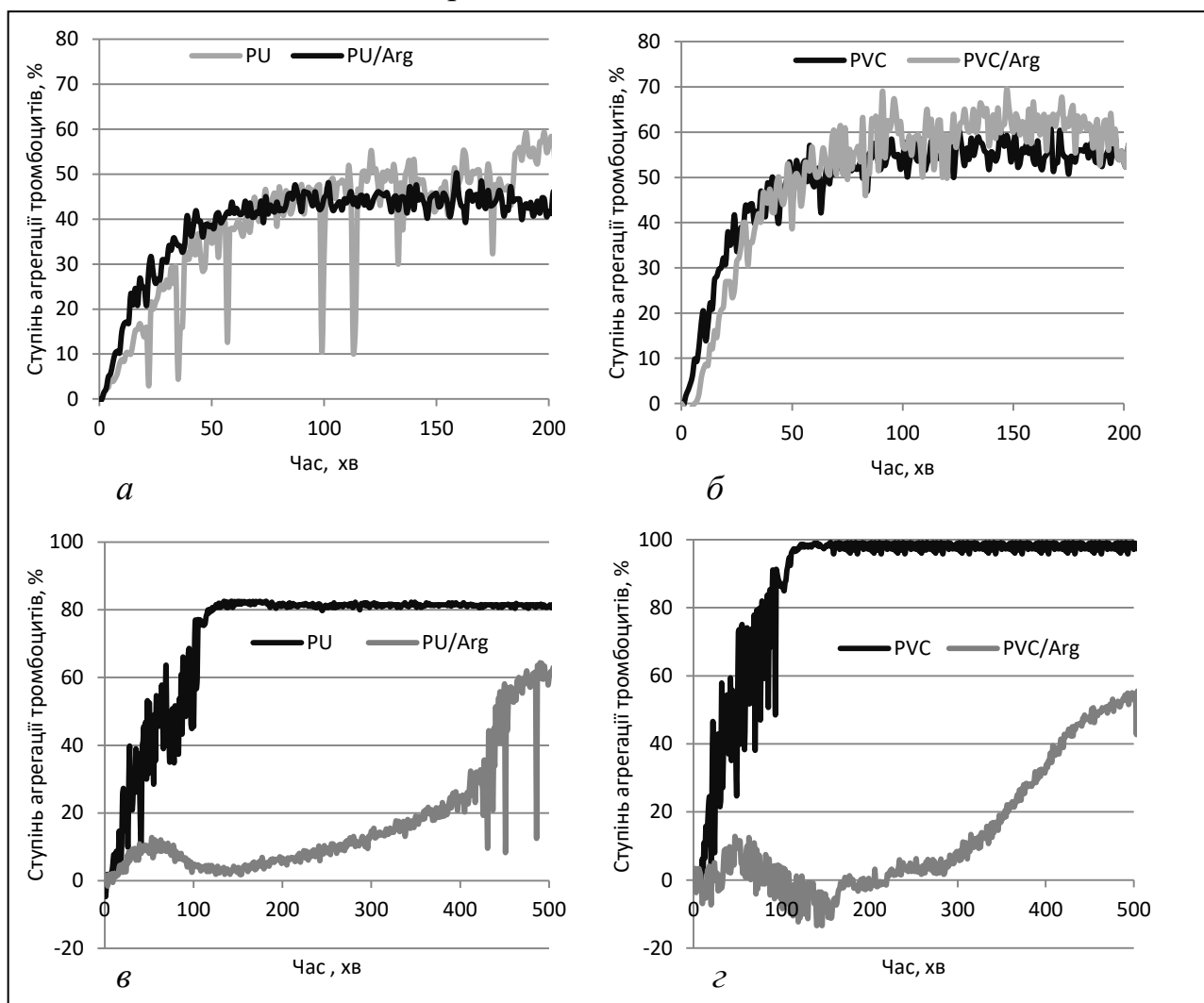


Рис. 15. Типові криві ADP-індукованої (а, б) та тромбін-індукованої (в, г) агрегації тромбоцитів людини, отримані за присутності біоматеріалів: полівінілхлориду (PVC – б, г) та поліуретану (PU – а, в), без модифікації (чорні криві) та модифікованих інгібітором тромбіну аргатробаном (сірі криві). Дані типового експерименту, n = 3

Наночастинки діоксиду силіцію завдяки своїй великій сорбційній ємності ($300 \text{ м}^2/\text{мг}$) здатні сорбувати макромолекули та бути носіями для них, а також бути основою для збирання макромолекулярних комплексів. Раніше було показано здатність наночастинок силіцію розміром 10-40 нм стимулювати індуковану активацію системи зсідання крові завдяки активації контактної фази коагуляційного каскаду (Gryshchuk, 2018).

Нами було виявлено здатність наночастинок силіцію безпосередньо активувати тромбоцити у збагаченій тромбоцитами плазмі крові без додаткового стимулювання (рис. 16). Це відкриває перспективи використання діоксиду силіцію як компонента кровоспинних засобів.

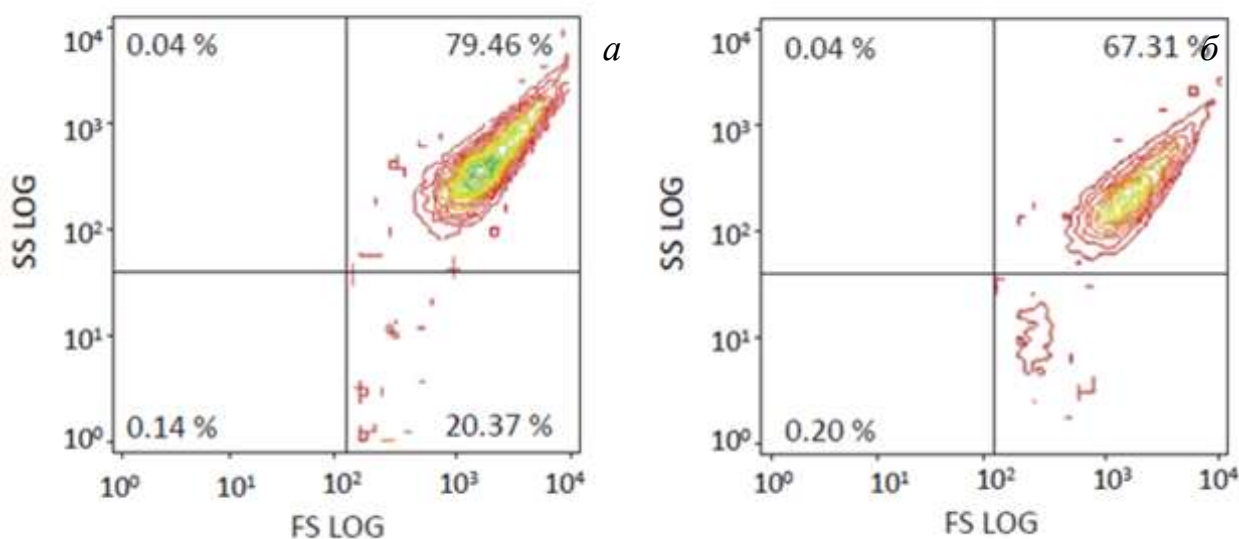


Рис. 16. Типовий розподіл тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові відповідно до фронтального (FS) та бічного (SS) світлорозсіювання за присутності 1 мг/мл наночастинок діоксиду силіцію; а – контрольна проба. б – через 2 години інкубації. Дані типового експерименту, n = 3

Фрагменти фібриногену-фібрину. Розчинний фібрин представлений комплексами олігомерів фібрину та фібриногену, які з'являються і циркулюють у кровотоці за патологічної генерації тромбіну та є маркером розвитку внутрішньо судинного тромбоутворення. У модельній системі нами було показано, що внесення у збагачену тромбоцитами плазму крові фібрин-мономеру збільшує ступінь агрегації тромбоцитів (таблиця 1).

Вочевидь, це можна пояснити зв'язуванням розчинного фібрину з інтегриновими рецепторами тромбоцитів, що загалом збільшує стабільність фібриново-тромбоцитарного згустку.

Таблиця 1

Показники ADP-індукованої агрегації тромбоцитів плазми крові донорів до внесення екзогенного розчинного фібрин-мономеру та за його присутності.

Показники агрегації тромбоцитів (n=30)	До внесення фібрин-мономеру	За присутності фібрин-мономеру
Ступінь агрегації, %	67,6±3,13	79,4±3,29*
Швидкість агрегації, %/хв	52,0±2,61	61,5±2,51*
Час агрегації, с	375,5±18,2	387,9±15,6

Примітка. * – результати достовірні при $P \leq 0,05$, $n = 5$

Відомо, що на поверхні фібриногену та його фрагментів знаходяться центри зв'язування з інтегринами тромбоцитів. Багатоточкове зв'язування однієї молекули фібрин(оген)у з тромбоцитами і призводить до агрегації тромбоцитів. Нами було показано важливість $V\beta N$ -доменів фібриногену (N-кінцевих ділянок $V\beta$ -ланцюгів у підтримці агрегації тромбоцитів. Це стало можливим завдяки дослідженню процесу агрегації відмитих тромбоцитів за присутності фібриногену, позбавленого цих ділянок (рис. 17).

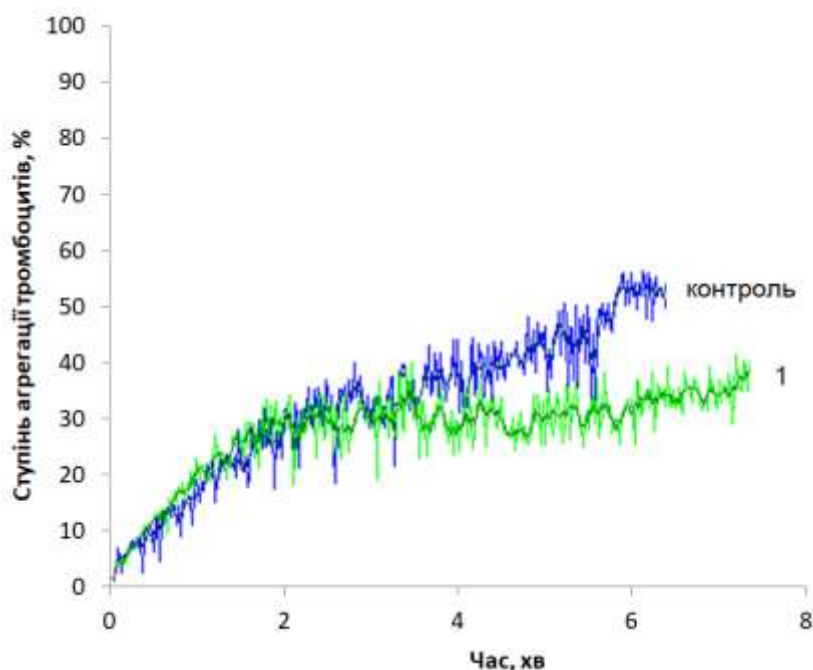


Рис. 17. Типова крива ADP-індукованої агрегації тромбоцитів за присутності нативного фібриногену (контроль) або фібриногену $desV\beta(1-42)_2$ (1). Дані типового експерименту, $n = 5$

Про унікальну роль $V\beta N$ -доменів фібриногену у взаємодіях з клітинами свідчать також виявлені нами порушення проліферації ендотеліоцитів та міграції ракових клітин за присутності форм фібрину та фібриногену, позбавлених цих ділянок молекули, у порівнянні з нативними формами фібрин(оген)у.

Втім, дія фрагментів фібриногену-фібрину на тромбоцити може бути і специфічною. Раніше нами було показано здатність послідовностей V β 15-42 утворювати активаторний комплекс з протромбіном, що призводило до неензиматичної генерації тромбіноподібної активності.

Методом протокової цитометрії в модельних системах з використанням плазми крові людини, плазми крові, дефіцитної на протромбін, та ресуспендованих тромбоцитів показано, що E-фрагмент фібрину, зокрема, E₁ викликає збільшення розміру та зниження гранулярності тромбоцитів в порівнянні з контролем, що свідчить про їхню активацію (рис. 18). Таким чином, показано, що за присутності E₁-фрагменту фібрину в плазмі крові відбувається неензиматична активація протромбіну, наслідком якої є активація тромбоцитів та підвищення ступеню їхньої агрегації.

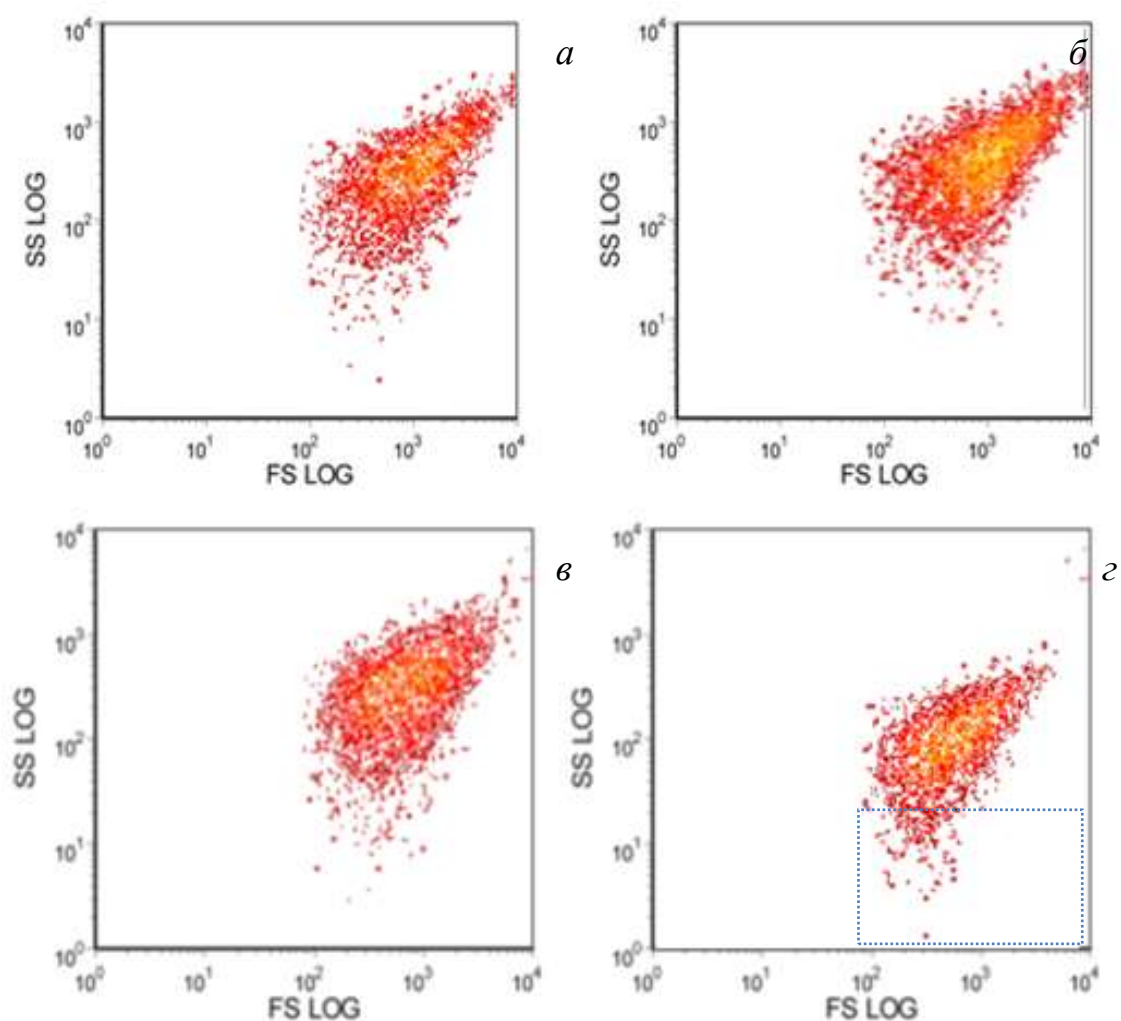


Рис. 18. Типовий розподіл тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові відповідно до фронтального (FS) та бічного (SS) світлорозсіювання за присутності E-фрагменту фібрину. Тромбоцити, ресуспендовані в плазмі крові людини, позбавленої протромбіну: (а) – контроль, (б) – за присутності E₁-фрагменту. Тромбоцити ресуспендовані в плазмі крові людини: (в) контроль, (г) – за присутності E₁-фрагменту. Позначено зону активованих тромбоцитів. Дані типового експерименту, n = 5

Виключне значення фібриногену, розчинного фібрину та його E₁-фрагмент-вмісних продуктів гідролізу робить фібриноген потенційною мішенню для терапевтичних препаратів, спрямованих на зниження прокоагулянтного потенціалу плазми крові.

Нанодіаманти. Активне обговорення можливості використання наночастинок для адресної доставки терапевтичних молекул, обумовлює необхідність ґрунтовного дослідження їхньої взаємодії з компонентами системи гемостазу, зокрема з тромбоцитами – найчутливішого її компоненту. Показано, що контакт із суспензією нанодіамантів (середній розмір 4 нм) не змінює їхньої здатності тромбоцитів активуватися та ефективно агрегувати (рис. 19).

Підвищення концентрації нанодіамантів у суспензії створює стеричні перешкоди для агрегації тромбоцитів, крім того було виявлено помірне прискорення активації факторів каскаду зсідання крові за присутності нанодіамантів.

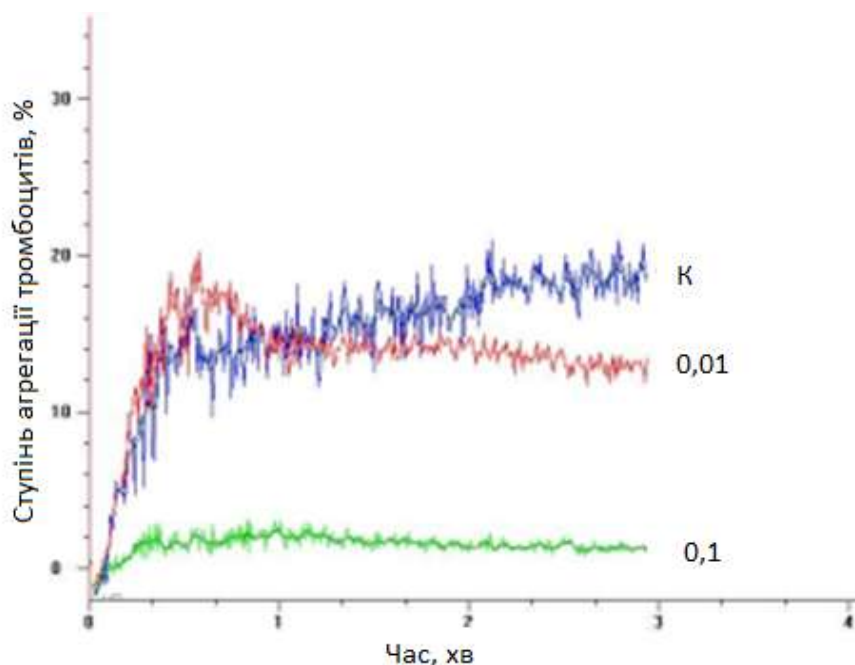


Рис. 19. Типові криві ADP-індукованої агрегації тромбоцитів людини, отримані за присутності 0,01 мг/мл та 0,1 мг/мл суспензії нанодіамантів. Дані типового експерименту, n = 5

Фулерен C-60. Цитометричні дослідження тромбоцитів, що контактували з наночастинами фулерен C-60 (розмір частинок 0,7 нм) впродовж двох годин, не виявили змін форми та гранулярності клітин (рис. 20). Наші дослідження також не виявили дії фулерену C-60 на окремі компоненти системи гемостазу. Таким чином, фулерен C-60 може розглядатися як потенційний біоінертний носій, здатний контактувати з кров'ю без інгібіторного чи активаторного ефекту на гемостаз.

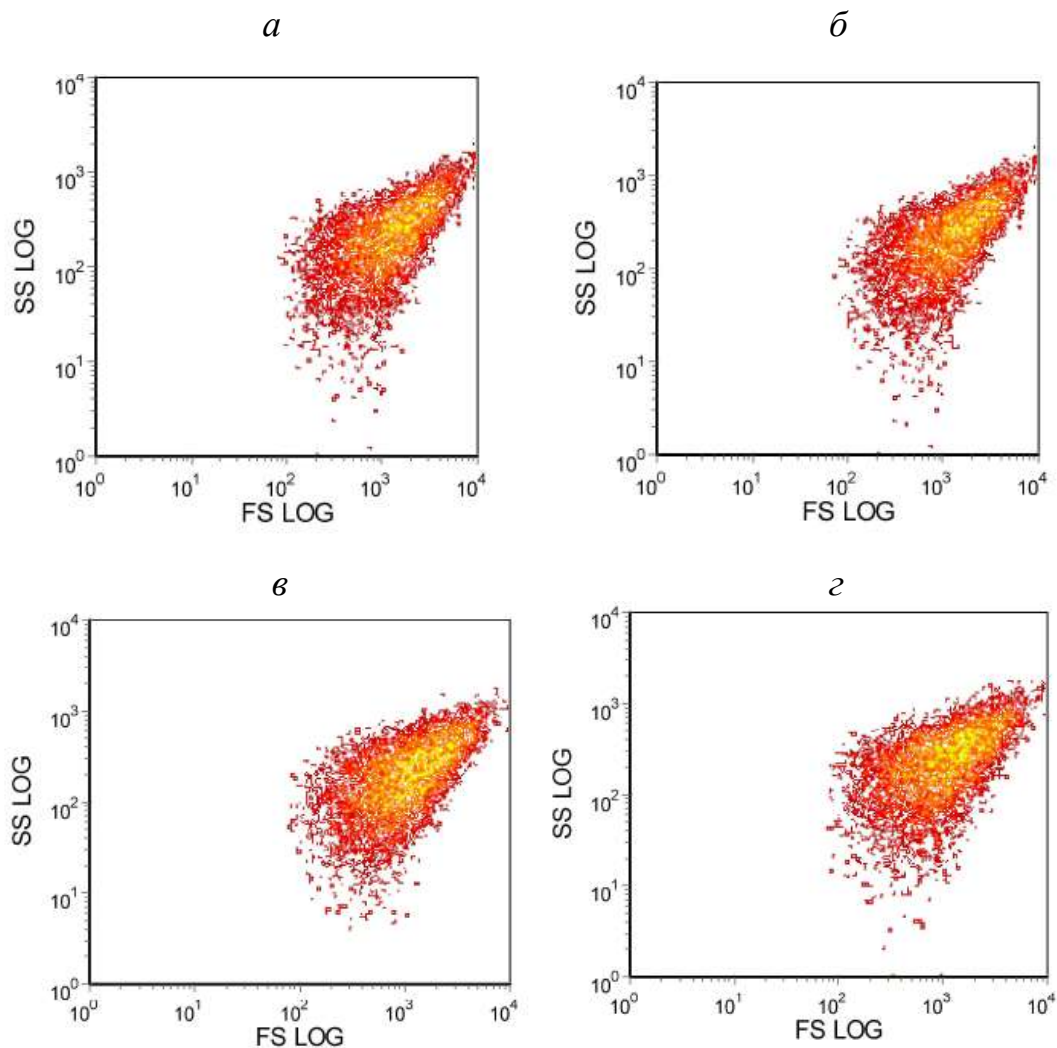


Рис. 20. Типовий розподіл тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові відповідно до фронтального (FS) та бічного (SS) світлорозсіювання за присутності 1 мг/мл наночастинок фулерену C-60 (б, г); а, в – контрольні проби; а, б – на початку експерименту, в, г – через 2 години інкубації. Дані типового експерименту, n = 3

Метод концентрування тромбоцитів аутологічної плазми крові для клітинної терапії та його клінічне випробування

Клітинна терапія – один із сучасних медичних підходів, в основі якого лежить використання живих клітин для прискорення регенерації та загоєння тканин, зниження інтенсивності запальних процесів. Серед методів клітинної терапії найбільшого поширення набуло використання збагаченої тромбоцитами плазми крові. На сьогодні її застосовують при дентальній імплантації для запобігання запаленню ясен, в ортопедії – як протизапальний засіб, в дерматології – для лікування та регенерації шкіри, тощо.

Однак, дотепер не існувало стандартизованого методу отримання суспензії тромбоцитів для клітинної терапії, крім того, жоден з існуючих

методів не передбачав функціональної характеристики клітин у готовій до використання суспензії.

Розробляючи спосіб отримання концентрованої суспензії тромбоцитів для клітинної терапії, ми виходили з таких міркувань:

а) більша концентрація тромбоцитів у суспензії буде терапевтично ефективнішою;

б) тромбоцити в суспензії для клітинної терапії повинні бути “живими” та здатними до активації.

В основі цих вимог лежить механізм терапевтичної дії тромбоцитів. Ці клітини забезпечують утворення кров'яного згустку в місці поранення, а компоненти їхніх гранул, які вивільняються під час активації, стимулюють як відновлення ушкодженої судини, так і загоєння рани. В гранулах неактивованого тромбоцита містяться ростові фактори, про- та антизапальні цитокіни, молекули, які стимулюють клітинну адгезію, тощо. Саме тому й важливо, щоб ці компоненти вивільнялися у зоні введення суспензії тромбоцитів внаслідок їхньої активації.

Розроблений нами метод ґрунтується на диференційному центрифугуванні аутологічної збагаченої тромбоцитами плазми крові. Для функціональної характеристики отриманої суспензії тромбоцитів використовували протокову цитометрію, яка дозволяє оцінити форму та гранулярність тромбоцитів як показники їхнього нативного стану, а також агрегатометрію, яка безпосередньо свідчить про здатність тромбоцитів активуватися та формувати агрегати.

Проточна цитометрія за бічним та фронтальним світлорозсіюванням суспензії тромбоцитів дозволяє виділити популяції інтактних (I) та активованих (A) тромбоцитів (рис. 21).

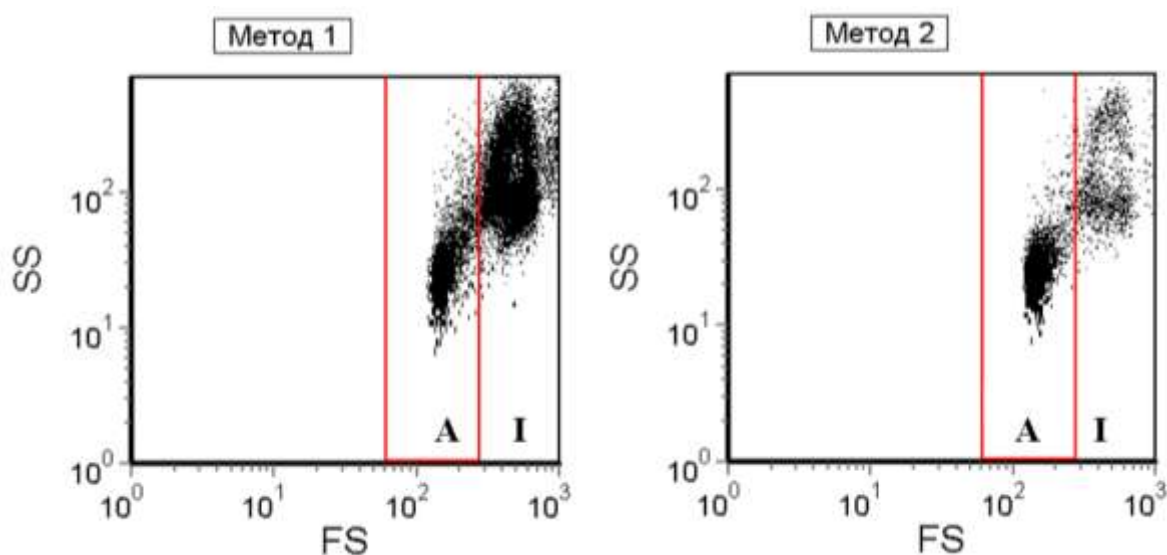


Рис. 21. Типовий розподіл тромбоцитів у зразках суспензії, отриманої за допомогою розробленого нами методу (метод 1) та комерційно доступного методу, за фронтальним (FS) та бічним (SS) світлорозсіюванням. А – активовані тромбоцити; I – інтактні тромбоцити. Дані типового експерименту, n = 3

Використання розробленого методу (метод 1) дозволило отримати суспензію тромбоцитів, у якій вміст морфологічно змінених клітин не перевищував 30 %, тоді як у препаратах, отриманих одним зі стандартних комерційно доступних методів, понад 60% клітин були активованими у процесі приготування суспензії (метод 2).

Отримані запропонованим способом тромбоцити були здатні до агрегації, індукованої ADP і, таким чином, у готовому препараті вони були нативними і здатними активуватися й вивільняти вміст своїх гранул. Тромбоцити, отримані одним з комерційно доступних методів Plasmolifting[®], здатності агрегувати не мали. Цю методику було успішно адаптовано для регенерації шкіри на базі клініки ТОВ “ВІКЮР”. Використання концентрованої суспензії функціонально активних тромбоцитів дозволило досягнути бажаного терапевтичного ефекту, який оцінювали за допомогою ультразвукового дослідження шкіри (рис. 22).

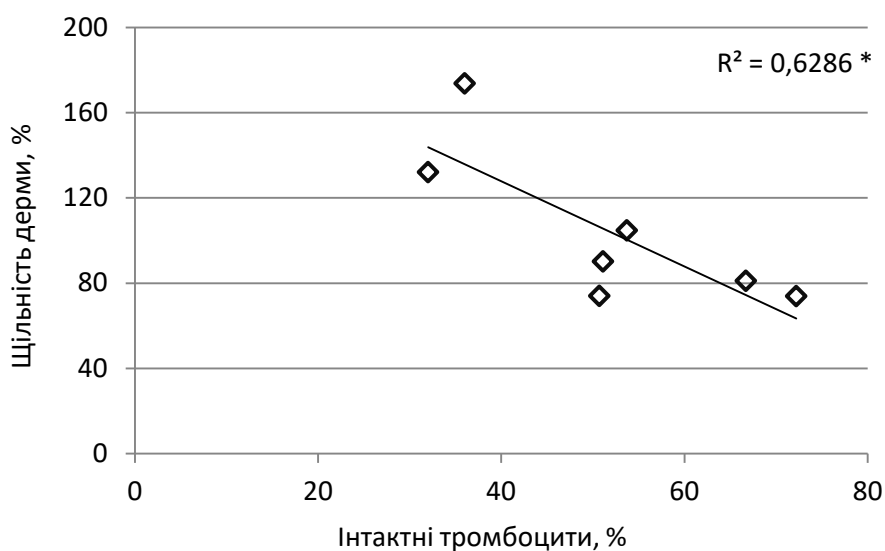


Рис. 22. Кореляційна залежність щільності дерми на 14 добу після процедури клітинної терапії від кількості інтактних тромбоцитів у суспензії, використаній для клітинної терапії. * – помірна сила кореляційного зв'язку за Пірсоном

Таким чином, вперше було створено стандартизований спосіб отримання нативних функціонально активних тромбоцитів. Завдяки високій концентрації клітин у суспензії та їхній здатності вивільняти вміст гранул в зоні ураження було досягнуто бажаного терапевтичного ефекту на механічні характеристики шкіри.

Основні результати частини роботи, присвяченої пошуку речовин та матеріалів, здатних інгібувати внутрішньосудинне тромбоутворення, узагальнено на рис. 23.

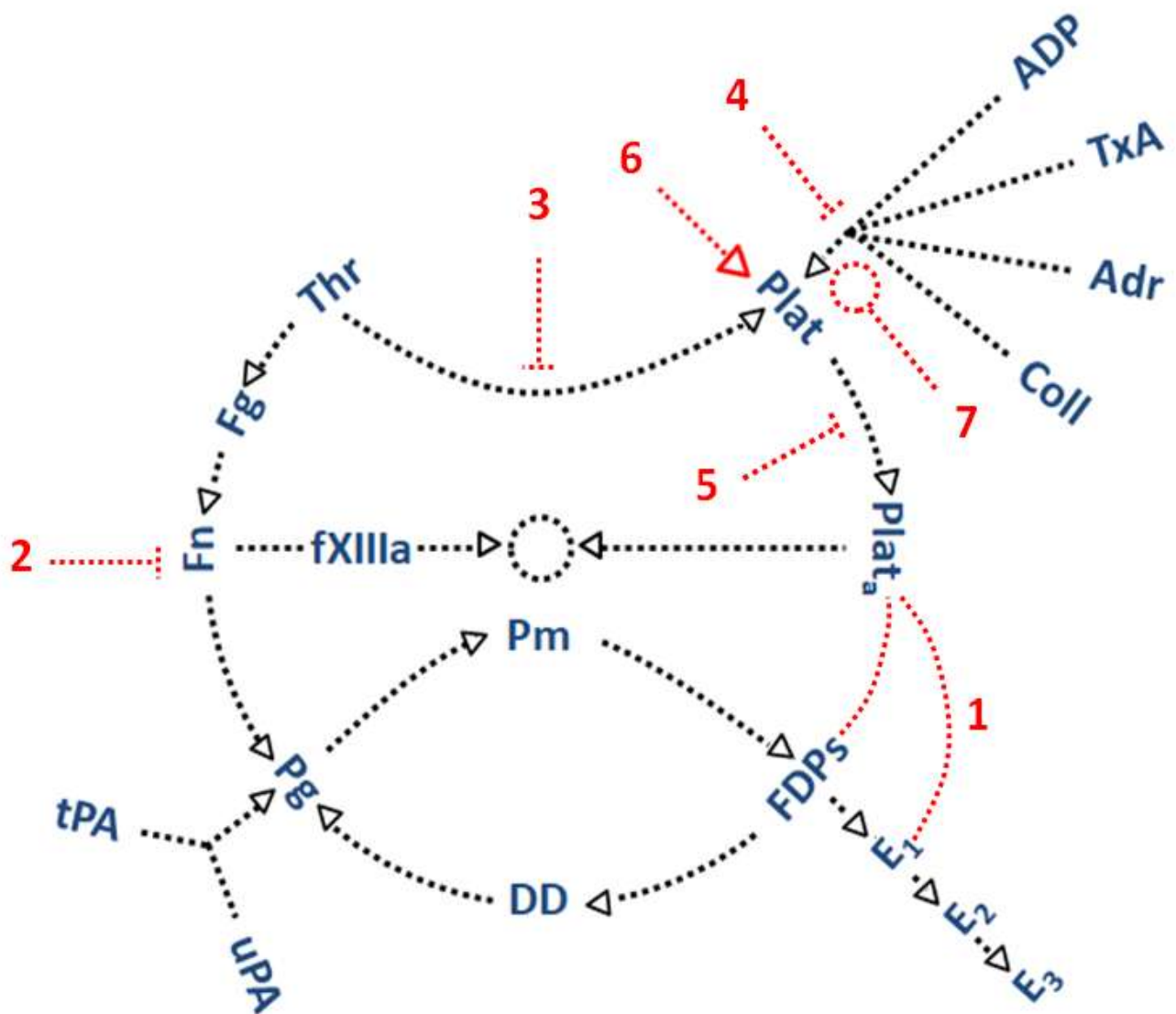


Рис. 23. Узагальнена схема системи гемостазу із позначеними вузловими точками, до яких знайдено ефектори. Стимулюють агрегацію тромбоцитів: 1 – фрагменти фібрину; 6 – наночастинки діоксиду силіцію. Інгібують активацію та агрегацію тромбоцитів: 3 – аргатробан-модифіковані біоматеріали; 4 – інгібітори сигнальних каскадів (NSE, EGCG, ED, EL, тощо); 5 – антагоністи GРІІІа-рецепторів. Не діють на тромбоцити: 7 – фулерени, нанодіаманти. Інгібують полімеризацію фібрину: 2 – калікс[4]арен С-145. Fg – фібриноген; Fp – фібрин; fXIIIa – активований фактор XIII; Plat – тромбоцити; Plat_a – активовані тромбоцити; Coll – колаген; Adr – адреналін; TxA – тромбоксан α; ADP – аденозиндифосфат; Pg – плазміноген; Pm – плазмін; tPA – тканинний активатор плазміногену; uPA – урокіназа; FDPs – продукти деградації фібрину; DD – D-димер; E₁ – високомолекулярний E-фрагмент; E₂, E₃ – гідролізований E-фрагмент

Способи стимулювання екстрасудинного тромбоутворення

Потреба ініціювати тромбоутворення виникає у разі порушення цілісності стінок судин, внутрішніх або зовнішніх кровотеч, які загрожують порушенням кровопостачання тканин та органів організму і повинні бути якомога скоріше припинені. Біотехнологічні задачі ініціювання тромбоутворення є важливою проблемою, яку ставить перед дослідниками медицина катастроф та хірургія.

Очевидним є три принципові способи локального вирішення проблеми кровотечі: внесення екзогенних активованих факторів, застосування неспецифічних або високоселективних активаторів факторів каскаду зсідання крові.

За умов порушення цілісності стінки судин чи у випадку патологічної активації зсідання крові ініціація тромбоутворення відбувається за фізіологічними механізмами зовнішнього та внутрішнього шляхів коагуляційного каскаду. Відповідно активувати ці механізми можливо, використовуючи неспецифічні фізіологічні активатори: для зовнішнього шляху зсідання крові – тромбoplastин, для внутрішнього – речовини, що мають негативно заряджені негативні поверхні (каолін).

Дія тромбoplastину або ж каоліну не передбачає прямої активації протромбіну, натомість утворення тромбіну здійснюється опосередковано через цілу низку факторів системи зсідання, які в свою чергу активуються в присутності неспецифічних активаторів (фактори IX, VII, X та ін.). З огляду на це, активність вказаних факторів та їх вміст у досліджуваній плазмі крові може мати вплив на ефективність тромбоутворення.

Існують підходи, які ґрунтуються на використанні екзогенних трансглутаміназ, за своєю дією аналогічних фібрин-стабілізуєчому фактору XIIIa. Ідея підвищення ефективності екстрасудинного тромбоутворення шляхом застосування трансглутаміназ полягає у стабілізації ендогенних фібринових полімерів та прошивці їх із прилеглими тканинами.

Заслуговує на увагу також підхід із використанням тромбіноподібних ензимів, які ініціюють перетворення фібриногену на фібрин, здатний до полімеризації. Такі ензими, на відміну від тромбіну, відщеплюють лише один з фібринопептидів та не мають здатності активувати фактор XIII зсідання крові, внаслідок чого ініціюють формування непрошитого ковалентно, а отже нестабільного, фібринового згустку з низькою щільністю.

Описуючи специфічні активатори, можна уявити собі гіпотетичний ензимний активатор для кожного із факторів каскаду зсідання крові. Однак, селективна активація окремих факторів на початкових етапах каскаду коагуляції буде менш ефективною, порівняно з потужною хвилеподібною дією каоліну чи тромбoplastину. На ділі достатньо активними прокоагулянтами можуть бути активатори ензимів заключних ланок каскаду коагуляції – протромбіну та фактора X.

Ключовими перевагами активаторів протромбіну перед іншими специфічними активаторами екстрасудинного тромбоутворення є те, що вони:
а) призводять до активації ендогенного протромбіну зі значним потенціалом

утворення тромбіну; б) генеруючи тромбін, запускають активацію тромбоцитів; в) призводять до формування ковалентно стабілізованого згустку.

Відтак подальші експерименти ґрунтувалися на модифікації біоматеріалів різної природи активатором протромбіну, вивченні їхніх прокоагулянтних властивостей *in vitro* та кровоспинної дії *in vivo*.

Створення та випробування кровоспинного засобу «Карбогемостат».

Модифікація активатором зсідання крові активованих волокнистих вуглецевих матеріалів (АУВМ «Днепр-М») дозволила створити інноваційний кровоспинний засіб для швидкої та ефективної зупинки кровотеч – «Карбогемостат». На сьогодні засіб пройшов доклінічні випробування, зареєстровано товарний знак, отримано патент на винахід.

Створенню «Карбогемостату» передували тривалі дослідження властивостей активатора зсідання крові. Зокрема було визначено специфічність його дії на плазмі крові різних видів ссавців (рис. 24).

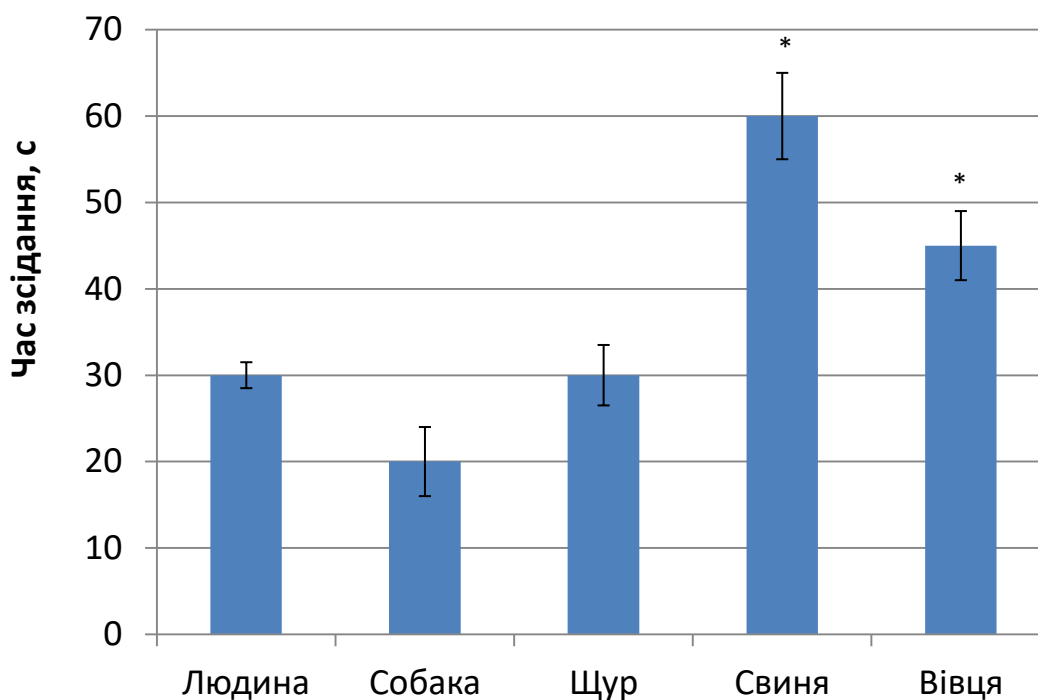


Рис. 24. Час зсідання плазми крові людини, собаки, щура, свині, вівці, ініційований 0,006 мг/мл ензимного активатора за присутності 10^{-4} М CaCl_2 . * – $P \leq 0,05$, $n = 5$

Зокрема було показано, що активатор однаково ефективно викликає коагуляцію плазми крові людини, щура і собаки, а плазму крові свині та вівці згортає вдвічі менш ефективно. Це пов'язано з природою амінокислот, які знаходяться у S1, S2 та S3 центрах протромбіну людини (Ser-**Glu**-Tyr), щура (Asp-**Glu**-Phe), собаки (Glu-**Glu**-Phe) – з одного боку, та вівці (Asp-His-Phe) і свині (Asp-Asp-Phe) – з іншого.

Можна припустити, що для ефективної дії активатора на протромбін необхідна присутність у центрах S1 амінокислотного залишку з ароматичними кільцями – фенілаланіну та тирозину, а у центрі S2 – негативно зарядженої глютамінової кислоти. Заміна цього залишку на залишки His або Asp у вівці та свині відповідно знижувала ефективність дії активатора на протромбін цих тварин.

Кровоспинну ефективність «Карбогемостату» вивчали у прямому експерименті, порівнюючи його здатність зупиняти кровотечу з печінки щура з відомими кровоспинними препаратами «Селох» та «Yunann Baiyao» (YB).

Лапаротомію проводили з розрізом середньої лінії живота, а суспензійні зв'язки печінки вивільняли на чашку Петрі. Неанатомічну хірургічну резекцію проводили до лівої частки печінки. Кровоспинні матеріали наносили на травмовану поверхню печінки відразу після перерізу. Масу тканини і крові, що проливали на чашку Петрі, контролювали через 3 хвилини від початку поперечного перерізу (рис. 25).

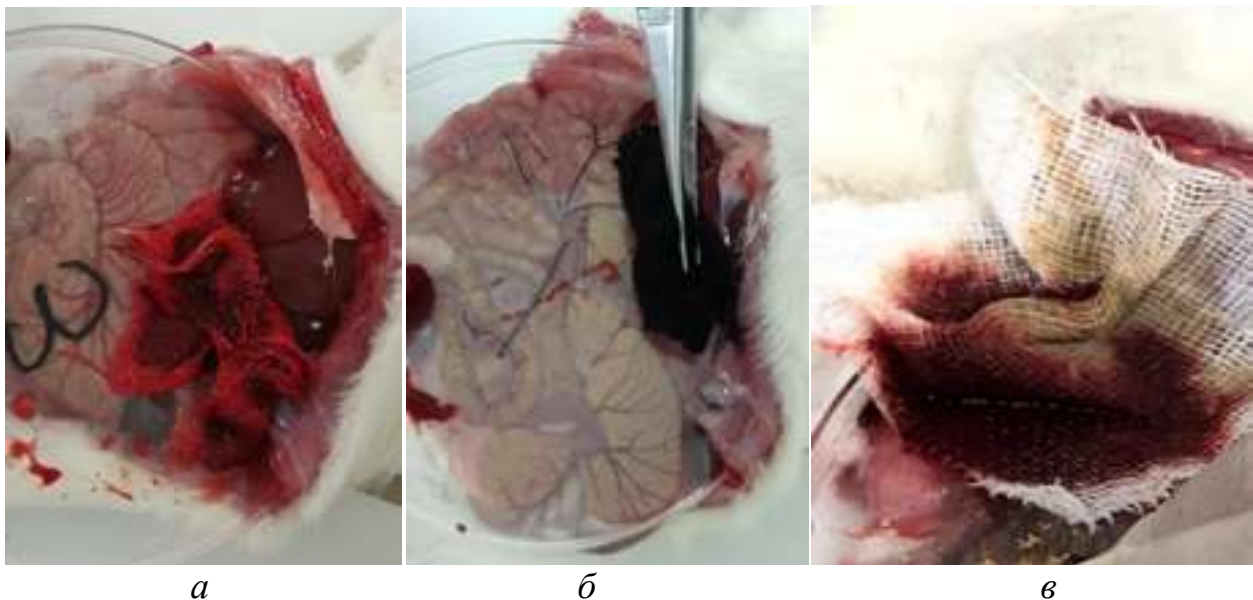


Рис. 25. Типовий експеримент із зупинки кровотечі з печінки щура медичним бинтом (а), «Карбогемостатом» (б) «Yunann Baiyao» (в)

На рис. 26 наведено діаграми, що представляють результати експериментів у кожній з чотирьох груп. Кожна точка демонструє об'єм кровотечі однієї тварини. Можна відзначити значні індивідуальні особливості окремих тварин. Однак, об'єм кровотечі у всіх щурів, яким для зупинки крововтрати застосовували «Карбогемостат», не перевищував 1 г, тоді як величина об'єму кровотечі для «Селох», і «YB» за такої постановки експерименту достовірно не відрізнялися від контрольних.

Значну кровоспинну дію «Карбогемостату» було підтверджено також на моделі судинної кровотечі з каротидної артерії щурів та стегнової артерії свиней.

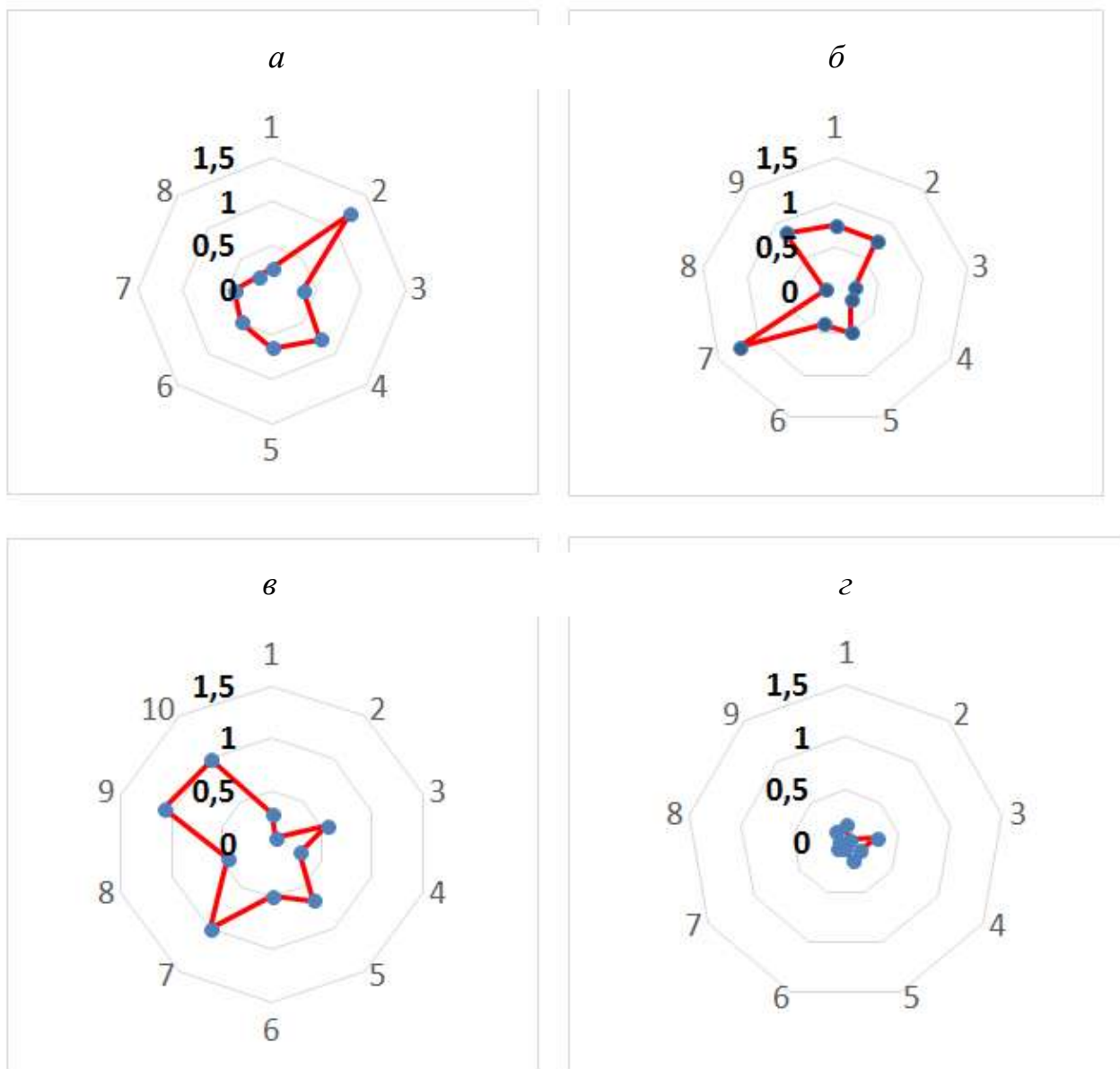


Рис. 26. Діаграми, що демонструють розподіл величин об'єму кровотеч у шурів за лапаротомії та зупинки кровотечі кровспинними засобами. *a* – зупинка кровотечі медичною марлею; *б, в, з* – зупинка кровотечі із застосуванням гемостатичних засобів «Celox», «Yunann Baiyao» та «Karbogemostat» відповідно

На окрему увагу заслуговує гістологічне дослідження судин та прилеглих тканин у шурів, яким зупиняли кровотечу «Karbogemostatом» та відомим кровоспинним засобом «QuikClot» (рис. 27).

Показано, що застосування «QuikClot» призводило до перекривання просвіту судини внутрішньосудинним тромбом. Застосування «Karbogemostat» не призводило до закупорки судини, що може бути пов'язано з тим, що а) активатор не дифундує з АУВМ, тоді як каолін легко змивається з бинта у випадку «QuikClot»; б) «Karbogemostat» швидше зупиняє кров, призводячи до утворення, головним чином, екстрасудинного тромбу.

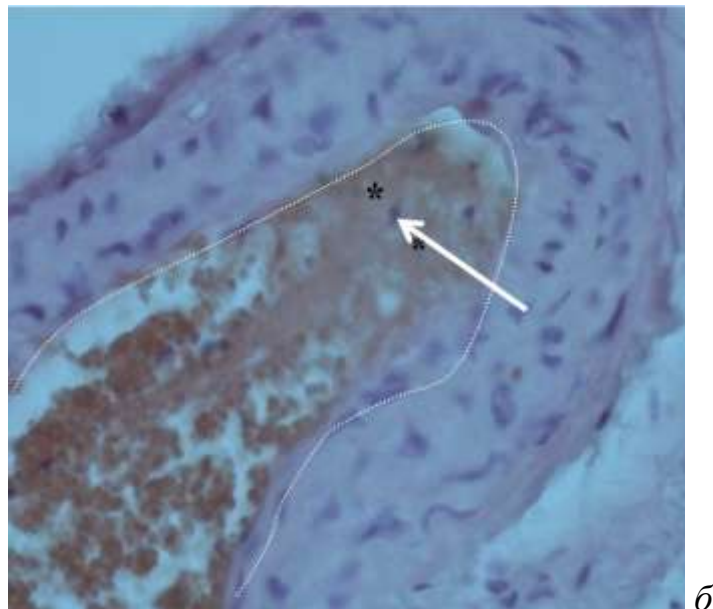
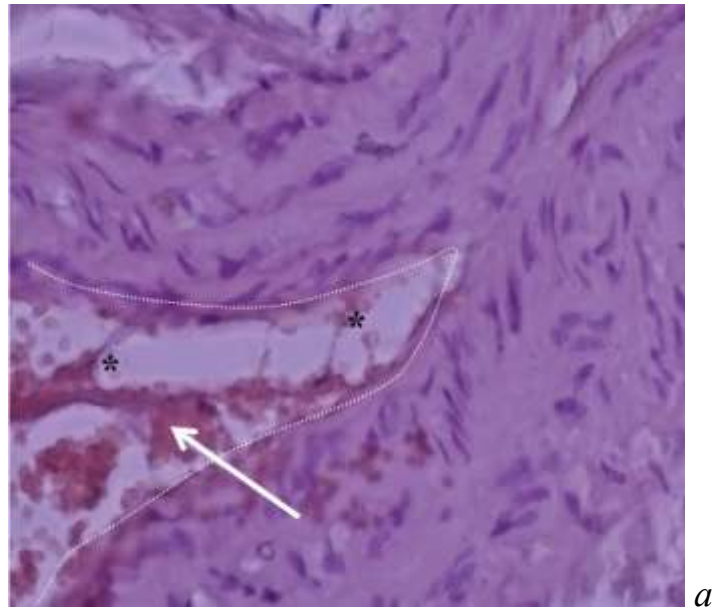


Рис. 27. Каротидна артерія щура після розрізу та двох годин аплікації «Карбогемостату» (а) та «QuikClot» (б). ↑ - тромб; пунктирна лінія – внутрішній край судини

Важливими також є дані щодо появи у кровотоці піддослідних тварин розчинних фібрин-мономерних комплексів (РФМК), що свідчать про генерацію ендогенного тромбіну та загрозу внутрішньосудинного тромбоутворення. У всіх тварин, яким було застосовано «QuikClot», РФМК накопичувалися, тоді як застосування «Карбогемостату» не викликало генерацію РФМК.

Таким чином, на основі активатора зсідання крові та активованого волокнистого вуглецевого матеріалу створено «Карбогемостат» - універсальний засіб для зупинки кровотеч. На моделях судинної та паренхіматозної кровотечі у лабораторних тварин продемонстровано його вищу ефективність порівняно з комерційно доступними кровоспинними засобами.

Одержання аутологічного фібринового композиту. Після хірургічного втручання або порушення цілісності тканин внаслідок травми окрім пріоритетної задачі – зупинки кровотечі – постають також інші не менш важливі виклики: запобігти інфекції, призупинити запалення та відновити порушену цілісність та функції тканин. Одним з методів, спрямованих на вирішення цих задач, є застосування фібринового гелю, який *a priori* має високу адгезію, призводить до герметизації поверхні рани та прискорює репаративні процеси. На відміну від синтетичних аналогів, такий гель не ушкоджує поверхню тканин і розсмоктується за досить короткий час.

Нами було використано активатор зсідання крові для отримання фібринового композиту безпосередньо у аутологічній плазмі крові піддослідної тварини, забраної перед оперативним втручанням. Правильно підібране співвідношення активатора до плазми крові дозволило формувати фібринову матрицю безпосередньо у об'ємі рани.

Було проведено дослідження за умов лапаротомії та перелому кінцівки кролів. Показано стимуляцію ранозагоєння та регенерації тканини створеним за розробленою методикою фібриновим композитом (рис. 28).

Зокрема за умов застосування при переломі кінцівки кроля відзначено зменшення набряку та прискорення зрощування кістки, порівняно із групою, що перебувала на самореабілітації.



Рис. 28. Рентгенограма кінцівок кроля на 18 добу після перелому за умов застосування фібринового гелю (а) та за умов самореабілітації (б)

Створення гемостатичних губок на основі колагенової матриці і активатора зсідання крові. Одним з біоматеріалів, який є потенційно біосумісним і може застосовуватись у хірургії, є колаген. Нашу роботу було спрямовано на розробку на основі колагенової матриці та активатора зсідання крові виробу медичного призначення з високими гемостатичними та ранозагоювальними властивостями для використання у хірургічній та ветеринарній практиці для зупинки капілярних та судинних кровотеч.

Колагенові матриці виготовляли шляхом ліофілізації тонкого шару колагену, змішаного з активатором зсідання крові. Порівнювали прокоагулянтні властивості модифікованої та немодифікованої колагенової матриці.

Показано, що немодифікований колаген не здатен індукувати агрегацію тромбоцитів. Проінкубовані з ним тромбоцити ефективно агрегують за дії ADP. В той самий час, колаген, модифікований активатором зсідання крові, викликає активацію тромбоцитів, їхню агрегацію та формування фібриново-тромбоцитарного згустку (рис. 29).

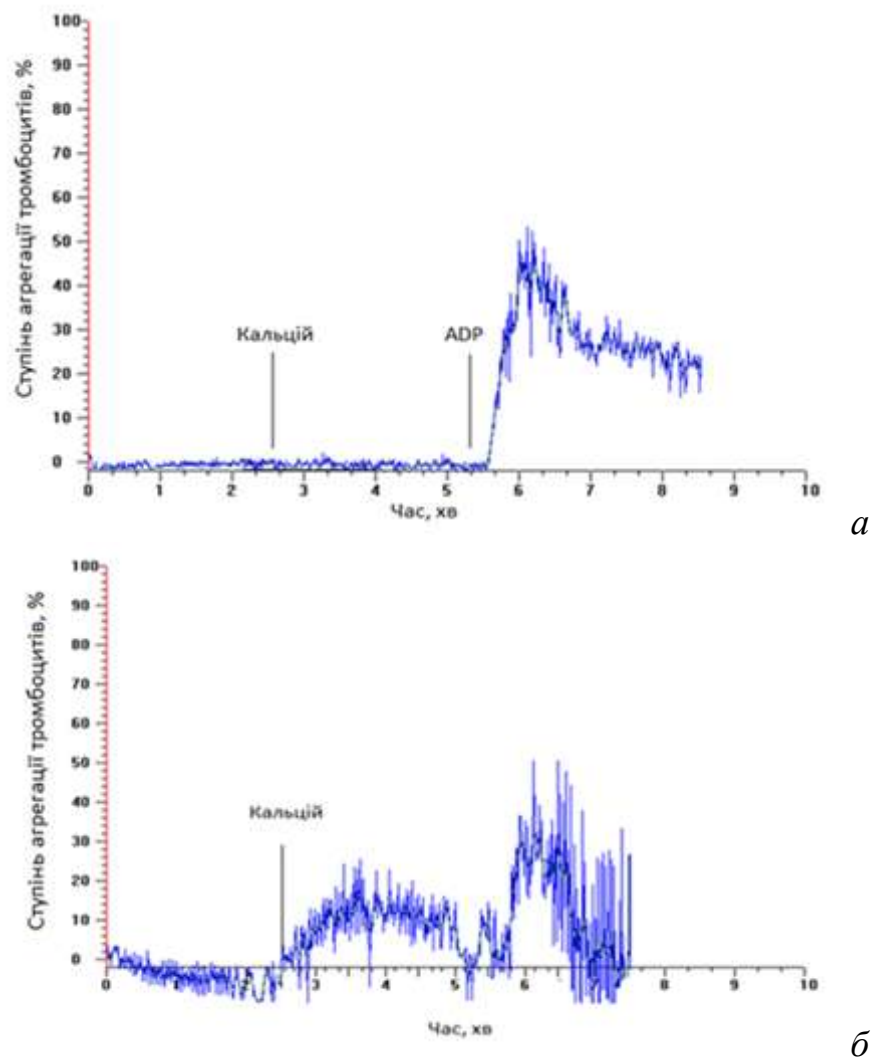


Рис. 29. Агрегація тромбоцитів людини за присутності подрібненої колагенової матриці (а) та колагенової матриці, модифікованої активатором зсідання крові (б). 2,5 хв – внесення CaCl_2 ($2 \cdot 10^{-3}$ М), 5 хв – внесення ADP (2,5 мкМ)

Саме такий колаген з посиленою кровоспинною дією було використано у вивченні кровоспинної та ранозагоювальної дії на моделі кровотечі з печінки кролів, порівняно з комерційно доступним препаратом колагену.

На рис. 30 помітно, що комерційно доступний зразок колагену активно просякає кров'ю, тоді як кровотеча у випадку застосування створеного нами біоматеріалу швидко зупиняється (рис. 30б). При застосуванні немодифікованого зразка колагенової матриці втрата крові складала у середньому 0,36 г, час зупинки кровотечі – 2,0 хв; в групі із застосуванням колагенової матриці, модифікованої активатором зсідання крові, крововтрата складала 0,21 г, час зупинки кровотечі – 1,1 хв.



Рис. 30. Просочування комерційно доступного колагену (а) та колагену з посиленою кровоспинною дією (б) під час операції на печінці кроля. Відмічено високу сорбційну здатність і ефективне поглинання крові

Таким чином, створена нами колагенова матриця, модифікована ензимним активатором зсідання крові, продемонструвала свою ефективність для зупинки кровотечі з печінки. Вона володіла виключною кровоспинною дією, яка не була властива комерційно доступному зразку колагену, та була здатна до біодеградації.

Розробка умов отримання стабільного препарату тромбіну. Препарати тромбіну з плазми крові тварин використовуються в лабораторній та клінічній практиці для діагностики порушень функціонування системи зсідання крові та фібринолізу.

Відомо, що для отримання тромбіну як сировину використовують очищений протромбін або суміш вітамін К-залежних протеїнів (фактори зсідання крові II, VII, X, IX та протеїн С). Активація протромбіну *in vitro* здійснюється декількома способами. Метою нашої роботи була розробка оптимального способу отримання високоочищеного препарату тромбіну для використання в лабораторній і клінічній практиці та проведення порівняльного кількісного та якісного аналізу кінцевого виходу продукту – препарату тромбіну, отриманого з протромбіну різними методами.

Виключна ефективність запропонованого нами ензимного активатора протромбіну зробила можливим розглядати його як інструмент для активації протромбіну не лише у випадку зупинки кровотечі, але і у препаративному отриманні тромбіну. Отримували тромбін, змішуючи протромбін з активатором, іммобілізованим на BrCN-Sepharose, з розрахунку 1 мг протромбіну на 1, 2 та 3 одиниці активності сорбенту, та інкубували протягом 1, 1,5 та 2,5 год при температурі 37 °С (таблиця 2).

Таблиця 2

Активність тромбіну, отриманого за допомогою іммобілізованого активатора протромбіну (A-Sepharose)

Час інкубації, год	Активність тромбіну, NIH/мг		
	1 одиниця активності сорбенту	2 одиниці активності сорбенту	3 одиниці активності сорбенту
1	195±30	420±48 *	463±57 *
1,5	305±25 *	632±45 *	695±70 *
2,5	370±48 *	687±65 *	743±80 *

*Примітка. $P \leq 0,05$, $n = 5$

Проведені порівняльні дослідження дозволили підібрати умови, які дозволяють отримувати високоактивний препарат тромбіну. Розроблений спосіб активації протромбіну дозволяє отримувати тромбін високої активності, який не потребує проведення діалізу та додаткової очистки від активатора протромбіну. Іммобілізований активатор протромбіну багаторазового використання є стабільним та стандартизованим.

Основні результати частини роботи, присвяченої стимулюванню екstrasудинного тромбоутворення, узагальнено на рис. 31.

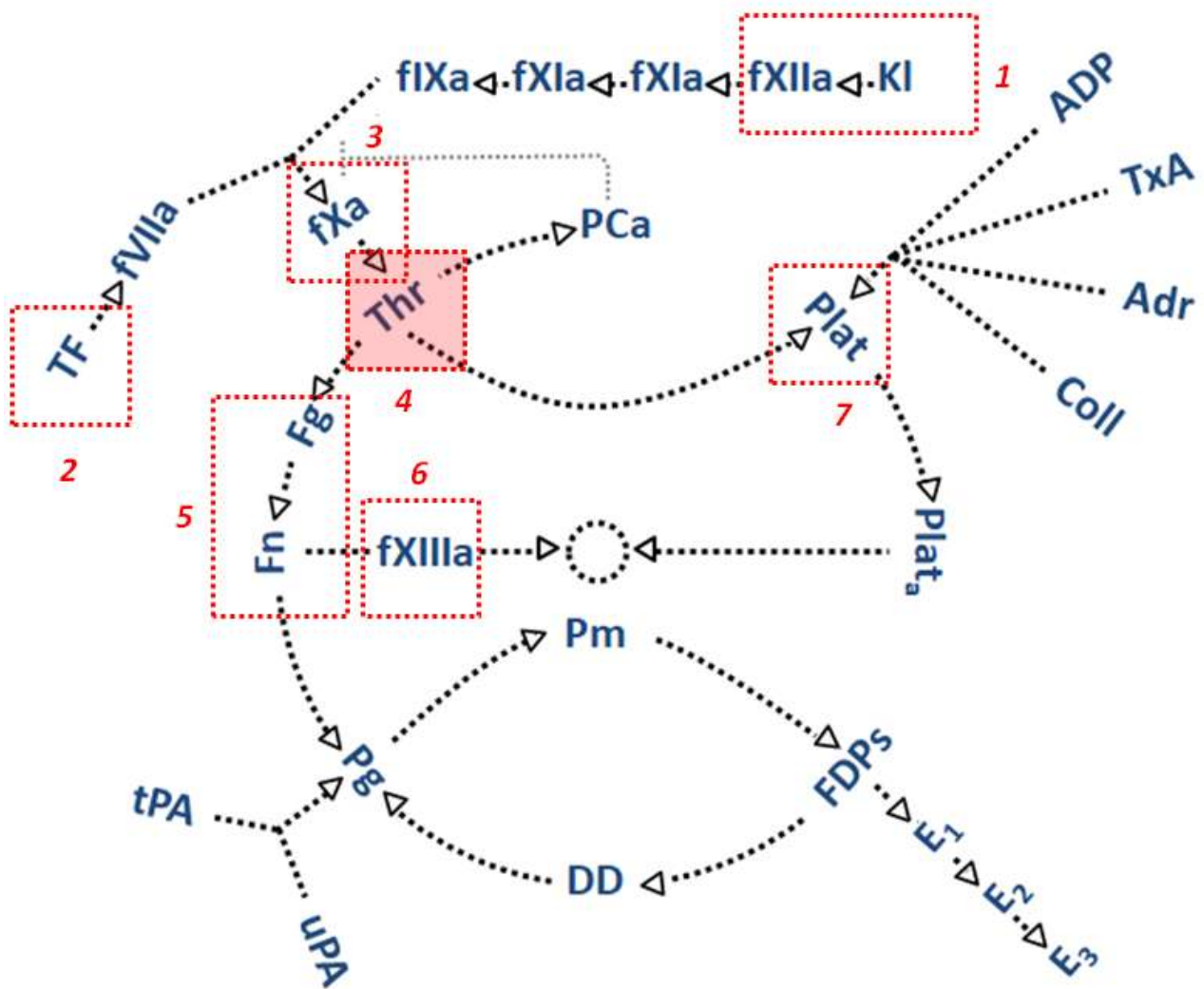


Рис. 31. Узагальнена схема системи гемостазу із позначеними вузловими точками, діючи на які можна стимулювати екстраваданне тромбоутворення. 1 – каолін; 2 – тканинний фактор; 3 – активатори фактора X; 4 – активатори протромбіну; 5 – тромбіноподібні ензими; 6 – трансглютамінази; 7 – активатори тромбоцитів. Застосований нами ензим є активатором протромбіну, а отже призводить до генерації тромбіну, тим самим активуючи фібриноутворення, ковалентну стабілізацію фібринового згустку та тромбоцити, забезпечуючи ефективну зупинку кровотечі. Fg – фібриноген; Fn – фібрин; fXIIIa – активований фактор XIII; Plat – тромбоцити; Plat_a – активовані тромбоцити; fIXa – активований фактор IX; fXIa – активований фактор XI; fXIIa – активований фактор XII; KI – калікреїн; TF – тканинний фактор; fXa – активований фактор X; fVIIa – активований фактор VII; PCa – активований протеїн C; Coll – колаген; Adr – адреналін; TxA – тромбоксан α; ADP – аденозиндифосфат; Pg – плазміноген; Pm – плазмін; tPA – тканинний активатор плазміногену; uPA – урокіназа; FDPs – продукти деградації фібрину; DD – D-димер; E₁ – високомолекулярний E-фрагмент; E₂, E₃ – гідролізований E-фрагмент

ВИСНОВКИ

Аналіз молекулярних механізмів внутрішньосудинного та екстрасудинного тромбоутворення дозволив обрати агрегацію тромбоцитів і полімеризацію фібрину найбільш перспективними об'єктами дії нових антитромботичних препаратів, а стадію активації протромбіну – ключовою мішенню для специфічних кровоспинних засобів. Відповідно визначено низку біологічно активних сполук, речовин та біоматеріалів, які виступають ефекторами тромбоцитів. Запропоновано модифікацію біоматеріалів різної природи ензимним активатором протромбіну для надання їм кровоспинних властивостей. Доведено ефективність такої модифікації в моделях *in vitro* та *in vivo*.

1. Виявлено здатність фібрину та його корових фрагментів стимулювати активацію та агрегацію тромбоцитів та показано залучення ділянок ВβN-домену до такої стимуляції.

2. Показано, що метаболіти лігнанів (ентеродіол та ентеролактон), епігалокатехінгаллат, N-стеароїлетаноламін пригнічують агрегацію та активацію тромбоцитів людини; антитромботична активність цих сполук свідчить про їх додатковий терапевтичний ефект.

3. Показано відсутність впливу фулерену C-60 (розмір частинок 0,7 нм) та нанодіамантів (розмір частинок 4 нм) на тромбоцити людини та на систему гемостазу за концентрацій, пропонованих як терапевтичні, що дозволяє розглядати ці сполуки як перспективні носії терапевтичних препаратів, що контактують з кров'ю.

4. Виявлено помірну здатність діоксиду силіцію (розмір частинок від 10 до 40 нм) активувати тромбоцити людини та значну його здатність посилювати індуковану активацію тромбоцитів завдяки активації контактної системи зсідання крові.

5. Підтверджено антитромботичні властивості поліуретану та полівінілхлориду, модифікованих ковалентно іммобілізованим інгібітором тромбіну аргатрабаном, що дозволяє рекомендувати такий спосіб модифікації для надання біоматеріалам антитромбогенних властивостей.

6. Розроблено спосіб отримання висококонцентрованої суспензії тромбоцитів людини для біомедичного застосування. Показано, що отримана розробленим способом суспензія тромбоцитів містить більшу кількість нативних функціонально активних клітин та є більш ефективною для клітинної терапії порівняно з суспензією тромбоцитів, отриманої одним з комерційно доступних способів.

7. Виявлено проангіогенний та антикоагулянтний ефект калікс[4]арену C-145. Оптимальну дозу калікс[4]арену C-145 для внутрішньовенного введення було визначено як 4 мг/кг.

8. На основі активатора зсідання крові та активованого волокнистого вуглецевого матеріалу створено універсальний засіб для зупинки кровотеч – «Карбогемостат». На моделях судинної та паренхіматозної кровотечі

лабораторних тварин продемонстровано його вищу ефективність порівняно з комерційно доступними кровоспинними засобами.

9. Розроблено спосіб виготовлення аутологічного фібринового гелю, придатного для прискорення загоєння кісткової та паренхіматозної тканини.

10. Створено здатну до біодеградації колагенову матрицю, модифіковану ензимним активатором для надання їй прокоагулянтних властивостей, та успішно апробовано її за умов операції на печінці кролів.

СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Савчук О.М., **Чернишенко В.О.**, Платонова Т.М., Краснобрига Є.М., Беляєв А.В., Мороз Є.Д., Волков Г.Л. Розчинні фібрин-мономерні комплекси – маркери розвитку внутрішньосудинного мікрозсідання крові. Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. 2006; 1: 57-63. (*Особистий внесок: проведення електрофоретичного аналізу складу фракцій розчинного фібрину*).

2. Корольова Д.С., **Чернишенко В.О.**, Платонова Т.М. Вплив гепарину на показники тестів протромбінового та екамулінового часу. Лаб. діагностика. 2006; 4: 22-26. (*Отримання активатора протромбіну екамуліну, аналіз експериментальних даних*).

3. Корольова Д.С., **Чернишенко В.О.**, Платонова Т.М. Тромбопластин та його використання у клінічній лабораторній діагностиці. Експериментальна фізіологія та біохімія. 2007; 4(40): 65-70. (*Особистий внесок: пошук та аналіз джерел літератури, постановка експерименту, виконання тесту «Протромбіновий час»*).

4. Корольова Д.С., Горницька О.В., **Чернишенко В.О.**, Платонова Т.М. Вплив продуктів розщеплення протромбіну на активацію та агрегацію тромбоцитів. Укр. біохім. журн. 2009; 5: 58-65. (*Особистий внесок: проведення електрофоретичного аналізу продуктів розщеплення протромбіну*).

5. Грищенко В.А., Томчук В.А., Литвиненко О.М., Платонова Т.М., **Чернишенко В.О.** Діагностика порушень коагуляційних процесів при медикаментозному гепатиті та їх корекція. Лаб. Діагностика. 2010; 3: 20-25. (*Особистий внесок: дослідження функції тромбоцитів при медикаментозному гепатиті*).

6. Шевчук С.В., Горницька О.В., Чернишенко Т.М., Краснобрига Є.М., Корольова Д.С., Платонова Т.М., **Чернишенко В.О.** Комплексна діагностика тромбофілії за системного червоного вовчака. Лаб. діагностика. 2010; 1: 3-7. (*Особистий внесок: виконання діагностичних тестів, аналіз отриманих даних*).

7. **Чернишенко В.О.**, Платонова Т.М., Максимович Я.С., Корольова Д.С., Остапченко Л.І. Зміни у плазмовому та тромбоцитарному гемостазі при гострій виразковій хворобі шлунка // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. 2010; 1: 79-85. (*Особистий внесок: проведення експерименту, аналіз стану системи гемостазу щурів за умов виразкової хвороби шлунка*).

8. Кошель Т.А., **Чернышенко В.А.**, Черенок С.А., Колесник Е.А. Исследование механизма ингибирования полимеризации фибрина каликсаренбисфосфоновой кислотой и ее мононатриевой солью // Приложение к журналу «Вести Национальной академии наук Беларуси», серия биологических наук. 2012; 3: 95-98. (*Особистий внесок: вивчення дії калікс[4]арену C-145 на окремі ланки системи зсідання крові*).
9. Чернышенко Т.М., Грищук В.І., Галаган Н.П., **Чернышенко В.О.**, Горницька О.В., Платонова Т.М., Луговської Е.В. Вплив високодисперсного кремнезему на активацію факторів системи зсідання крові // *Biotechnologia Acta*. 2013; 6(1): 81-85. (*Особистий внесок: аналіз отриманих даних, аналіз активації системи зсідання крові за присутності діоксиду кремнію*).
10. **Chernyshenko V.O.**, Platonova T.M., Makogonenko Y.M., Rebriev A.V., Mikhalovska L.I., Chernyshenko T.M., Komisarenko S. Fibrin(ogen)olytic and platelet modulating activity of a novel protease from the *Echis multisquamatis* snake venom // *Biochimie*. 2014; 105: 76-83. (*Особистий внесок: отримання ензиму, отримання частково гідролізованих форм фібриногену, вивчення їхньої здатності підтримувати агрегацію тромбоцитів, аналіз результатів*).
11. Korolova D.S., **Chernyshenko V.O.**, Chernyshenko T.M., Gornytska O.V., Chernyshenko V.O., Platonova T.N. Meizothrombin Preparation and Its Role in Fibrin Formation and Platelet Aggregation // *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 2014; 5: 588-595. (*Особистий внесок: електрофоретичний аналіз продуктів розщеплення протромбіну, аналіз отриманих даних*).
12. **Chernyshenko V.O.**, Chernyshenko T.M., Korolova D.S., Volynets G.P., Kolesnikova I.N., Platonova T.M., Lugovskoy E.V. Non-enzymatic activation of prothrombin induced by interaction with fibrin β 26–42 region // *Acta biochimica Polonica*. 2015; 62(3): 517-522. (*Особистий внесок: формування ідеології дослідження, постановка дослідів, аналіз результатів*).
13. Khanal M., Raks V., Issa R., **Chernyshenko V.O.**, Barras A., Garcia Fernandez J.M., Mikhalovska L.I., Turcheniuk V., Zaitsev V., Boukherroub R., Siriwardena A., Cooper I.R., Cragg P.J., Szunerits S. Nanodiamonds: Selective Antimicrobial and Antibiofilm Disrupting Properties of Functionalized Diamond Nanoparticles Against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* // *Particle and Particle Systems Characterization*. 2015; 32(8): 1-9. (*Особистий внесок: вивчення дії нанодіамантів на формування біоплівки*).
14. **Chernyshenko V.O.** Limited proteolysis of fibrinogen by fibrinogenase from *Echis multisquamatis* venom. *Protein J*. 2015; 34(2): 130-134. (*Особистий внесок: одноосібна робота*).
15. **Chernyshenko V.O.**, Korolova D.S., Dosenko V.E., Pashevin D.O., Kalchenko V.I., Pirogova L.V., Chernyshenko T.M., Lugovska O.E., Kravchenko N.A., Makogonenko Y.M., Lugovskoy E.V. and Komisarenko S.V. Calix[4]arene C-145 Effects on Plasma Haemostasis // *Pharmaceutica Analytica Acta* – 2015. – 6(8) – 1-5. (*Особистий внесок: формування ідеології дослідження, постановка дослідів, аналіз результатів*).
16. Korolova D.S., **Chernyshenko V.O.**, Platonova T.M., Chernyshenko T.M., Lugovskoy E.V. Detection of Prethrombin 1 in Human Blood Plasma

International Blood Research & Reviews. 2016; 5(2): 1-7. (*Особистий внесок: аналіз результатів, формування структури статті, електрофоретичний та вестерн-блот аналіз продуктів розщеплення протромбіну*).

17. Nidialkova N.A., Varbanets L.D., **Chernyshenko V.O.** Isolation and purification of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* IMV B-7465 peptidase with specificity toward elastin and collagen // Ukr. Biochem. J. 2016; 88(3): 18-28.

(*Особистий внесок: електрофоретичний аналіз фракції протеїназ, визначення специфічності протеїнази*).

18. Stohnii E.M., Korolova D.S., **Chernyshenko V.O.**, Nidialkova N.A., Rebriev A.V., Varbanets L.D., Hadzhynova V.E., Chernyshenko T.M. Kolesnikova I.M., Lugovskoy E.V. Mapping of Residues of fibrinogen Cleaved by protease II of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* IMV B-7465 // Ukr. Biochem. J. 2016; 88: 6-13. (*Особистий внесок: формування ідеології дослідження, постановка дослідів, аналіз результатів*).

19. **Chernyshenko V.O.**, Korolova D.S., Nikolaenko T.V., Dosenko V.E., Pashevin D.O., Kalchenko V.I. et al. Calix[4]arene C-145 effects on cellular haemostasis. Biotech. Acta. 2016; 9(3): 37-43. (*Особистий внесок: формування ідеології дослідження, постановка дослідів, аналіз результатів*).

20. **Chernyshenko V.O.**, Pirogova L.V., Cherenok S.V., Dosenko V.E., Pashevin D.O., Kalchenko V.I., Makogonenko E.M., Lugovskoy E.V. Effects of Calix[4]arene C-145 on overall haemostatic potential of blood plasma *in vitro* and *in vivo*. J. Int. Res. in Med. Pharm. Sci. 2016; 10(3): 146-151. (*Особистий внесок: формування ідеології дослідження, аналіз результатів*).

21. **Chernyshenko V.O.**, Petruk N.A., Korolova D.S., Kasatkina L.O., Gornytska O.V., Platonova T.M. et al. Antiplatelet and anti-proliferative action of disintegrin from the venom of *Echis multisquamatis*. Croat. Med. J. 2017; 58: 87-95. (*Особистий внесок: формування ідеології дослідження, постановка дослідів, аналіз результатів*).

22. Gryshchuk V.I., **Chernyshenko V.O.**, Chernyshenko T.M., Hornytska O.V., Galagan N.P., Platonova T.M.. Silica Nanoparticles Effects on Hemostasis. In "Immune Aspects of Biopharmaceuticals and Nanomedicines". Edited By Raj Bawa, Janos Szebeni, Thomas J Webster, Gerald F. Audette. 2018: 731-752. (*Особистий внесок: формування структури роботи, аналіз результатів*).

23. **Chernyshenko V.O.**, Savchuk O.V., Cherenok S.O., Silenko O.M., Negelia A.O., Kasatkina L.O., Pirogova L.V., Didkivskyi V.A., Yusova O.I., Kalchenko V.I., Garmanchuk L.V., Grinenko T.V., Lugovskoy E.V., Komisarenko S.V. Haemostasis modulation by calix[4]arene methylenebisphosphonic acid C-145 and its sulfur-containing analogue. Ukr. Biochem. J. 2018; 90(6): 21-30. (*Особистий внесок: формування ідеології дослідження, постановка дослідів, аналіз результатів*).

24. Dziuba O.S., **Chernyshenko V.O.**, Hudz Le A., Kasatkina L.O., Chernyshenko T.M., Klimenko P.P. et al. Blood coagulation and aortic wall integrity in rats with obesity-induced insulin resistance. Ukr. Biochem. J. 2018; 90(2): 6-15. (*Особистий внесок: формування ідеології дослідження, постановка дослідів, аналіз результатів*).

25. Дзюблюк Н.А., **Чернишенко В.О.**, Броварська О.С., Варбанець Л.Д. Порівняльна характеристика протеаз *Bacillus thuringiensis* IMV-7324, *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* IMB-7465. Мікробіол. журн. 2018; 80(5): 37-47. (Особистий внесок: електрофоретичний аналіз фракції протеїназ, визначення специфічності протеїнази).
26. **Chernyshenko V.O.** Mechanisms of intravascular and extravascular blood clotting: fundamental studies for clinical practice. Visn. Nac. Acad. Nauk Ukr. 2019; 4: 50-56. (Особистий внесок: одноосібна робота).
27. **Chernyshenko V.O.**, Snezhkova E.O., Mazur M., Chernyshenko T., Platonova T., Sydorenko O., Lugovskoi E., Nikolaev V. Blood coagulation parameters in rats with acute radiation syndrome receiving activated carbon as a preventive remedy. Ukr. Biochem. J. 2019; 91(2): 52-62. (Особистий внесок: аналіз функції тромбоцитів за умов розвитку гострого запалення).
28. Gryshchenko V.A., Musiychuk V., **Chernyshenko V.O.**, Gornytska O., Platonova T. Evaluation of biochemical indicators in blood plasma of rats with tetracycline-induced hepatosis and their correction by milk phospholipids. Ukr. Biochem. J. 2019; 91(1): 92-99. (Особистий внесок: аналіз функції тромбоцитів за умов розвитку гострого запалення).
29. **Chernyshenko V.O.**, Shteinberg K.M., Lugovska N.E., Ryzhykova M.V., Platonova T.M., Korolova D.S., Lugovskoy E.V. Preparation of highly-concentrated autologous platelet-rich plasma for biomedical use. Ukr. Biochem. J. 2019; 91(2): P.74-82. (Особистий внесок: формування ідеї досліджень, оптимізація методу концентрування тромбоцитів).
30. Комісаренко С.В., Деєв В.А., Луговської Е.В., **Чернишенко В.О.** та ін. Методичні рекомендації «Застосування імуноензимних методів для діагностики загрози внутрішньосудинного тромбоеутворення». 2019; «Видавець Бихун В.Ю.»: 36. (Особистий внесок: узагальнення результатів).
31. Sakovich V.V., Stohniy Ye.M., Zhernossekov D.D., Rebriev A.V., Korolova D.S., Marunych R.Yu., **Chernyshenko V.O.** New metalloprotease from the cultural fluid of *Pleurotus ostreatus*. Biotechnologia Acta. 2019; 12(6): 35-45. (Особистий внесок: формування ідеї досліджень, аналіз результатів, оформлення статті).
32. Stohnii Y.M., Ryzhykova M.V., Rebriev A.V., Kuchma M.D., Marunych R.Y., **Chernyshenko V.O.**, Shablii V.A., Lypova N.M., Slominskiy O.Yu., Garmanchuk L.V., Platonova T.M., Komisarenko S.V. Aggregation of platelets, proliferation of endothelial cells and motility of cancer cells are mediated by the B β 1(15)-42 residue of fibrin(ogen) // Ukr. Biochem. J. 2020; 92(2): 72-84. (Особистий внесок: формування ідеї досліджень, аналіз результатів, оформлення статті).
33. Tkachenko O.S., Hudz Ie.A., Kosiakova H.V., Klymenko P.P., Stohnii Y.M., Didkivskyi V.A., Т.М. Chernyshenko, **Chernyshenko V.O.**, Platonova T.M. Protective action of N-stearoylethanolamine on blood coagulation and arterial changes in spontaneously hypertensive rats fed cholesterol-rich diet. Ukr. Biochem. J. 2020; 92(2): 60-70. (Особистий внесок: вивчення ефектів NSE на агрегаційну здатність тромбоцитів).

34. Lugovska N.E., Kolesnikova I.M., Stohnii Ye.M., **Chernyshenko V.O.**, Rebriev A.V., Kostiuchenko O.P., Gogolinska G.K., Dziubliuk N.A., Varbanets L.D., Platonova T.M., Komisarenko S.V. Novel monoclonal antibody to fibrin(ogen) α C-region for detection of the earliest forms of soluble fibrin. Ukr.Biochem.J. 2020; 92(3): 58-70. *(Особистий внесок: формування ідеї досліджень, аналіз результатів, оформлення статті).*

35. Stohnii Y.M., Sakovich V., **Chernyshenko V.O.**, Chernishov V.I., Chernyshenko T.M., Kolesnikova I.M., Kucheriavyi Y.P., Zhernossekov D.D. Fibrin(ogen)olytic and platelet modulating properties of a novel protease from the culture fluid of *Pleurotus ostreatus*. JBR. 2020; 4: 14-27. *(Особистий внесок: формування ідеї досліджень, аналіз результатів, оформлення статті).*

ПАТЕНТИ

1. Патент на корисну модель №90935 Україна. МПК с12N 9/74 (2006 01) Опубл. 16.06.2014, Бюл. 11. Спосіб отримання тромбіну. Платонова Т.М., Корольова Д.С., Чернишенко Т.М., Горницька О.В., Грищук В.І., **Чернишенко В.О.**, Луговської Е.В., Комісаренко С.В.

2. Патент на корисну модель №100467 Україна. МПК (2015. 01). А61Р 19/00 А61Р 31/00. Спосіб одержання аутологічного фібринового гелю для стимуляції регенерації кісткових і м'яких тканин і зниження інтенсивності запальних процесів. Комісаренко С.В., Луговської Е.В., Рубленко М.В., Андрієць В.Г., Корольова Д.С., Чернишенко Т.М., Горницька О.В., Платонова Т.М., Макогоненко Є.М., **Чернишенко В.О.**

3. Патент на корисну модель № 114356 Україна. МПК А61F13/00 (2006 01) А61К 38/43 (2006.01) Опубл. 10.03.2017 Бюл. №5. Гемостатичний комбінований засіб для зупинки масивних кровотеч, у тому числі за гемофілії /Комісаренко С.В., Луговської Е.В., Ніколаєв В.Г., Платонова Т.М., Досенко В.Є., Сахно Л.О., Снежкова Є.О., Чернишенко Т.М., Корольова Д.С., **Чернишенко В.О.**, Горницька О.В., Коротич В.Г.

4. Патент на винахід № 114356 Україна. Гемостатичний комбінований засіб для зупинки масивних кровотеч, у тому числі за гемофілії /Комісаренко С.В., Луговської Е.В., Ніколаєв В.Г., Платонова Т.М., Досенко В.Є., Сахно Л.О., Снежкова Є.О., Чернишенко Т.М., Корольова Д.С., **Чернишенко В.О.**, Горницька О.В., Коротич В.Г.

5. Патент на корисну модель № 138359. Опубл. Бюл. №22 від 25.11.2019 Спосіб кількісного визначення ензиматичної активності бактеріальної Ca^{2+} -незалежної трансглютамінази: Грищук В.І., Стогній Є.М., **Чернишенко В.О.**, Чернишенко Т.М., Луговська Н.Е.

6. Патент на корисну модель №133766. Опубл. 25.04.2019, Бюл. №8. Спосіб одержання аутологічної, збагаченої тромбоцитами плазми крові людини з вмістом тромбоцитів понад 1 млн/мкл для медичного застосування. Луговської Е.В., **Чернишенко В.О.**, Корольова Д.С., Штайнберг К.М.

АНОТАЦІЯ

Чернишенко В.О. Пошук та вивчення механізмів дії нових біологічно активних сполук та біоматеріалів, що впливають на зсідання крові. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – «біотехнологія». – Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, 2021.

Дисертацію присвячено пошуку способів керування процесом зсідання крові: стимулювання екстрасудинного і інгібування внутрішньосудинного тромбоутворення. Ефективне екстрасудинне тромбоутворення є неодмінною умовою ефективної зупинки кровотечі й відповідно припинення крововтрати. Натомість внутрішньосудинне тромбоутворення – патологічний процес, який призводить до ішемізації життєво важливих тканин та органів. Тому мета дисертації, спрямована на вирішення біотехнологічних завдань, в кінцевому рахунку має вагоме медико-біологічне підґрунтя.

Проведений автором аналіз молекулярних механізмів внутрішньосудинного та екстрасудинного тромбоутворення дозволив обрати агрегацію тромбоцитів і полімеризацію фібрину найбільш перспективними об'єктами дії нових антитромботичних препаратів, а стадію активації протромбіну – ключовою мішенню для специфічних кровоспинних засобів.

Відповідно визначено низку біологічно активних сполук, речовин та біоматеріалів, які виступають ефекторами тромбоцитів. Зокрема, показано, що метаболіти лігнанів (ентеродіол та ентеролактон), епігалокатехінгаллат, N-стеароїлетаноламін, антагоністи інтегринових рецепторів пригнічують процеси агрегації та активації тромбоцитів людини; діоксид силіцію та E₁-вмісні фрагменти фібрину посилюють активацію тромбоцитів, а нанодіаманти, фулерен C-60 та біоматеріали (поліуретан, полівінілхлорид) є біологічно інертними щодо тромбоцитів. Виявлено антикоагулянтний та проангіогенний ефекти калікс[4]арену C-145 в моделях *in vivo*.

Запропоновано модифікацію біоматеріалів різної природи ензимним активатором протромбіну для надання їм кровоспинних властивостей, та створено: «Карбогемостат» на основі активованого волокнистого вуглецевого матеріалу; колагенову матрицю з посиленою кровоспинною дією, аутологічний фібриновий композит. Доведено ефективність такої модифікації в моделях *in vitro* та *in vivo*. Розроблено унікальний спосіб отримання тромбіну.

Ключові слова: тромбоутворення, кровотеча, тромбоз, наночастинки, ензими, активатори протромбіну, фібрин, тромбоцити, тромб.

SUMMARY

Chernyshenko V.O. Search and study of the mechanisms of action of biologically active compounds acting on the blood coagulation. – Qualification scientific work with the manuscript copyright.

Thesis for the Degree of Doctor of Biological Sciences, Speciality 03.00.20 – ‘Biotechnology’. Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2021.

The thesis is devoted to the search of the way to control the blood coagulation: stimulation of the extravascular and prevention of the intravascular clotting. Effective extravascular thrombus formation is the important for effective termination of bleeding and prevention of blood loss. On the other hand, intravascular thrombosis is the pathological process leading to the ischemia of important tissues and organs. That is why the aim of the thesis being focused on biotechnological aims finally achieves the medical goals.

Author performed the analysis of molecular mechanisms of extravascular and intravascular coagulation that allowed selecting the platelet aggregation and fibrin polymerization as the most promising targets of antithrombotic action; the prothrombin conversion to thrombin was selected as the main object of procoagulant action of hemostatics.

Several biologically active compounds and biomaterials were selected as the platelet effectors. In particular, metabolites of lignans (entherodiol and entherolacton), epigallocatechin gallate, N-stearoylethanolamine, integrin receptors antagonists were shown to inhibit platelet activation and aggregation; silica dioxide and E₁-containing fragments of fibrin enhanced platelet aggregation; nanodiamonds and fullerene C-60 as well as some biomaterials (PU and PVC) did not act on platelets directly. The antithrombotic and proangiogenic action of calix[4]arene C-145 were found in studies *in vivo*.

The modification of different biomaterials by enzyme prothrombin activator was proposed for the increasing of their hemostatic properties. The ‘Carbohemostat’ based on the activated carbon adsorptive material, procoagulant collagen matrix and autologous fibrin composite were developed. The efficacy of such modification was proved in studies *in vitro* and *in vivo*. The unique way to thrombin preparation was developed.

Key words: blood clotting, bleeding, thrombosis, nanoparticles, enzymes, prothrombin activators, fibrin, platelets, thrombus.