

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ІМ. О.В. ПАЛЛАДІНА НАН УКРАЇНИ

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ ТА ГЕНЕТИКИ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ЧЕРНИШЕНКО ВОЛОДИМИР ОЛЕКСАНДРОВИЧ

УДК 577.112.7: 612.115

ДИСЕРТАЦІЯ

**ПОШУК ТА ВИВЧЕННЯ МЕХАНІЗМІВ ДІЇ НОВИХ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ
СПЛУК ТА БІОМАТЕРІАЛІВ, ЩО ВПЛИВАЮТЬ НА ЗСІДАННЯ КРОВІ**

03.00.20 – біотехнологія

09 – біологічні науки

Подається на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело. _____ В.О. Чернишенко

Науковий консультант

Комісаренко Сергій Васильович,
академік НАН України, професор

Київ – 2021

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 (09 – біологічні науки). – Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, м. 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.

Розглянемо основні результати роботи детальніше.

Продукти деградації фібриногену-фібрину, які накопичуються у кровотоці за низки патологій, є визнаними маркерами тромбофілії. Зокрема визначення D-димеру вважається неодмінною умовою адекватної лабораторної діагностики внутрішньосудинного тромбоутворення. Розчинний фібрин, який з'являється в кровотоці внаслідок дії малих кількостей тромбіну на фібриноген, вказує на загрозу розвитку внутрішньосудинного тромбоутворення. Олігомери розчинного фібрину можуть циркулювати у кровотоці разом із продуктами деградації фібрину, формуючи фібрин-мономерні комплекси. Проведені у роботі дослідження дозволили стверджувати, що і розчинний фібрин, і продукти деградації фібрину не лише свідчать про тромбофілію, але і самі можуть призводити до підвищення прокоагулянтного потенціалу системи зсідання крові. Зокрема, В β N-домен-вмісні фрагменти фібрину здатні неензиматично активувати протромбін, призводячи до внутрішньосудинної генерації тромбіноподібної активності.

Серед запропонованих способів інгібування агрегації тромбоцитів варто відзначити застосування антагоністів інтегринових рецепторів. Формування агрегатів тромбоцитів можливе лише опосередковано завдяки взаємодії полівалентної молекули фібриногену з численними інтегриновими рецепторами тромбоцитів. Відтак, сполуки, здатні блокувати рецептори GPІІb/ІІІa (дезінтегрини), інгібують безпосередньо стадію формування фібриново-тромбоцитарного тромбу, не перешкоджаючи активації тромбоцитів, їхній дегрануляції та вивільненню компонентів гранул.

Низькомолекулярні хімічні сполуки виявилися недостатньо ефективними дезінтегринами, порівняно з поліпептидами. Зокрема поліпептид із отрути ефі

багатолускової (*Echis multisquamatis*) ефективно блокував рецептори GPIIb/IIIa за високих концентрацій та тривалої попередньої інкубації повністю запобігаючи утворенню агрегатів тромбоцитів. Синтез низькомолекулярних антагоністів інтегринових рецепторів слід вважати надзвичайно перспективним напрямком, успішне виконання якого потенційно дозволить створити антитромботичні засоби нового типу.

На окрему згадку заслуговують сполуки, здатні інгібувати сигнальні каскади тромбоцитів, зокрема такі, які можуть потрапляти у кров як метаболіти біологічно активних добавок, які приймаються перорально. Так, результатом споживання насіння льону є поява у кровотоці лігнанів – ентеродіолу та ентеролактону. Галлат епігалокатехіну з'являється у кровотоці при споживанні зеленого чаю. N-стеароїлетаноламін потрапляє у кровоток у незмінному вигляді, всмоктуючись із кишечника як жиророзчинна сполука. Кожна із цих сполук різною мірою зменшує здатність тромбоцитів відповідати активацією на дію агоніста. Водночас, ентеродіол та ентеролактон можуть розглядатися як антитромботичні засоби за фізіологічно можливих концентрацій, галлат епігалокатехіну може бути застосований *ex vivo*, наприклад у випадку гемодіалізу, а інгібіторна дія N-стеароїлетаноламіну є додатковою перевагою його застосування при різноманітних запальних процесах.

Дослідження дії наночастинок на агрегацію тромбоцитів дозволило визначити фулерени C₆₀ та нанодіаманти як потенційно інертні щодо системи зсідання крові. Не стимулюючи агрегацію тромбоцитів та не ініціюючи коагуляційний каскад, ці наночастинки можуть розглядатися як перспективна основа для доставки лікарських засобів. З іншого боку, наночастинки діоксиду силіцію здатні стимулювати активацію тромбоцитів та запускати контактну фазу системи зсідання крові. З огляду на виключну сорбційну ємність діоксиду силіцію, його можна розглядати як основу для створення кровоспинних засобів.

Дослідження функціонування тромбоцитарної ланки гемостазу дозволило розробити методичні підходи до отримання висококонцентрованої суспензії тромбоцитів. Отримані запропонованим способом тромбоцити у готовому препараті були нативними і здатними активуватися й вивільняти вміст своїх

гранул. Тромбоцити, отримані методом порівняння, здатності агрегувати не мали. Розроблену методику було успішно впроваджено для використання у регенерації шкіри.

Здійснюючи пошук потенційних антитромботичних засобів, було розглянуто калікс[4]арен С-145, який показав виражену антитромботичну дію *in vitro* та *in vivo*. Завдяки безпосередній взаємодії гідрофобної частини молекул з центром полімеризації фібрину «А», калікс[4]арен С-145 прямо інгібує формування протофібрил фібрину, запобігаючи утворенню полімерного фібрину – каркасу тромбу. Експериментальні дані засвідчили, що калікс[4]арен С-145 забезпечує стійку антитромботичну дію за умов внутрішньосудинного введення лабораторним тваринам. Визначено ефективну дозу для введення.

Пошук способів стимулювання екstrasудинного тромбоутворення дозволив обрати ензимний активатор зсідання крові як найефективнішу діючу речовину кровоспинного засобу.

Використання ензимного активатора зсідання крові дозволило розробити спосіб одержання аутологічного фібринового гелю для прискорення загоєння ран. Ефективно перетворюючи плазму крові пацієнта на гель, активатор дозволяє сформувати фібриновий корок у місці ушкодження при хірургічному втручанні, ізолювати поверхню рани, створити субстрат для регенерації тканин, тощо.

Також ензимний активатор зсідання крові було використано для модифікації біоматеріалів. Зокрема, модифікація активованих волокнистих вуглецевих волокон дозволила створити кровоспинний засіб Карбогемостат, який при прямому порівнянні показав кровоспинну дію на рівні з кращими світовими аналогами.

Модифікація колагенової матриці дозволила запропонувати біоматеріал, здатний до біодеградації, який не лише стимулює ранозагоєння, але і запобігає крововтраті під час хірургічного втручання.

В основі дії розроблених кровоспинних засобів лежала генерація тромбіну, власне ендогенний тромбін і забезпечував стійку кровоспинну дію. Відтак ензимний активатор було також використано для отримання активного препарату тромбіну.

Таким чином, робота є комплексним дослідженням механізмів екстраваданного та внутрішньосудинного тромбоутворення. Фокусуючись на спільності та відмінності у механізмах цих типів тромбоутворення, було обрано мішені, перспективні для терапевтичної дії майбутніх кровоспинних і антитромботичних препаратів.

Карбогемостат успішно пройшов доклінічні випробування, спосіб отримання колагену було впроваджено у виробничу практику, а спосіб концентрування суспензії тромбоцитів – у клінічну практику.

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

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

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ

1. Савчук О.М., **Чернишенко В.О.**, Платонова Т.М., Краснобрижа 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.
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.
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.
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.
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.
6. Шевчук С.В., Горницька О.В., Чернишенко Т.М., Краснобрижа Є.М., Корольова Д.С., Платонова Т.М., **Чернишенко В.О.** Комплексна діагностика тромбофілії за системного червоного вовчака. Лаб. діагностика. 2010; 1: 3-7.

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.

8. Кошель Т.А., **Чернышенко В.А.**, Черенок С.А., Колесник Е.А. Исследование механизма ингибирования полимеризации фибрина каликсаренбисфосфоновой кислотой и ее моносодиевой солью // Приложение к журналу «Вести Национальной академии наук Беларуси», серия биологических наук. 2012; 3: 95-98.

9. Чернишенко Т.М., Грищук В.І., Галаган Н.П., **Чернишенко 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.

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.

11. Korolova D.S., **Chernyshenko V.O.**, Chernyshenko T.M., Gornyska 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.

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.

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.

14. **Chernyshenko V.O.** Limited proteolysis of fibrinogen by fibrinogenase from *Echis multisquamatis* venom. *Protein J*. 2015; 34(2): 130-134..

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.

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.

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.
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.
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.
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.
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*. *Croatian Medical Journal.* 2017; 58: 87-95.
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.
23. **Чернишенко В.О.**, Савчук О.В., Черенок С.О., Силенко О.М., Негеля А.О., Касаткіна Л.О., Пирогова Л.В., Дідківський В.А., Юсова О.І., Кальченко В.І., Гарманчук Л.В., Гриненко Т.В., Луговської Е.В., Комісаренко С.В. Дія калікс[4]арен-метиленбісфосфонової кислоти С-145 та її сірковмісного аналога на гемостаз. *Укр. біох. журн.* 2018; 90(6): 21-30.
24. Dziuba O.S., **Chernyshenko V.O.**, Hudz Le A., Kasatkina L.O., Chernysenko T.M., Klimentenko 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.
25. Дзюблюк Н.А., **Чернишенко В.О.**, Броварська О.С., Варбанець Д.Д. Порівняльна характеристика протеаз *Bacillus thuringiensis* IMV-7324, *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* IMB-7465. *Мікробіол. журн.* 2018; 80(5): 37-47.
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.
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.

28. Gryshchenko V.A., Musiychuk V., **Chernyshenko V.O.**, Gornyt'ska O., Platonova T. Evaluation of biochemical indicators in blood plasma of rats with tetracycline-induced hepatitis and their correction by milk phospholipids. Ukr. Biochem. J. 2019; 91(1): 92-99.

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.

30. Комісаренко С.В., Дєєв В.А., Луговської Е.В., **Чернишенко В.О.** та ін. Методичні рекомендації «Застосування імуноензимних методів для діагностики загрози внутрішньосудинного тромбоутворення». 2019; «Видавець Бихун В.Ю.»: 36.

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.

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., Slominskyi 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.

33. Tkachenko O.S., Hudz Ie.A., Kosiakova H.V., Klymenko P.P., Stohnii Y.M., Didkivskyi V.A., T.M. 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.

34. Lugovska N.E., Kolesnikova I.M., Stohnii Ye.M., **Chernyshenko V.O.**, Rebriev A.V., Kostiuhenko 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.

35. Stohnii Y.M., Sakovich V., **Chernyshenko V.O.**, Chernishov V.I., Chernyshenko T.M., Kolesnikova I.M., Kucheriavyyi 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.

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’ (09 – biological sciences). – 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), epigallocatechingallate, 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.

Let's focus on main results more precisely.

Fibrin degradation products accumulating in the bloodstream during several pathologies are known markers of thrombophilia. In particular the determination of D-dimer is assumed the obedient part of laboratory diagnostics of the intravascular thrombus formation. Soluble fibrin appears into the bloodstream as a result of thrombin action on the fibrinogen and indicates the danger of intravascular clotting. Oligomers of the soluble fibrin are circulating as the complexes with fibrin degradation products, forming soluble fibrin monomeric complexes. Performed studies allowed concluding that soluble fibrin and the products of fibrin degradation not only indicate thrombophilia, but also induce the increasing of procoagulant potential of blood coagulation system. In particular, B β N-domain-containing fragments cause activation of prothrombin inducing the appearance of intravascular thrombin-like activity.

Among proposed ways of inhibition of platelet aggregation we can focus on the application of the antagonists of integrin receptors. The formation of platelet aggregates is possible only as a result of multiple interactions of polyvalent fibrinogen molecule with different platelets. So molecules that can block the receptors GPIIb/IIIa (disintegrins) inhibit directly the formation of fibrin-platelet thrombus in the same time allowing the activation and degranulation of platelets.

Low-molecular weight chemical compounds not enough effective disintegrins in comparison to polypeptides. In particular disintegrin from the venom of *Echis multisquamatis* effectively blocked receptors GPIIb/IIIa, at the high concentrations and in the case of long pre-incubation completely blocked the platelet aggregation.

Synthesis of low-molecular weight antagonists can be assumed as the extremely prospective approach for the development of potential antithrombotic drugs of a new type.

It is worth to mention the compounds that can inhibit signal cascades of platelets, in particular those that can be found in the bloodstream as the metabolites of food

supplements administered per oral. For example as the result of flax consuming – enterodiol and enterolactone. Epigallocatechin gallate can be accumulated in the bloodstream after the consuming of green tea. N- stearoylethanolamine can be absorbed in the bloodstream unchanged as the fat-soluble compound. Each of these compounds in a similar way can decrease the ability of platelets to respond to the action of agonist. In the same time enterodiol and enterolactone can be assumed as the antithrombotic applications being accumulated in the bloodstream in active concentrations. Epigallocatechin gallate can be used only *ex vivo*, for example in hemodialysis. The inhibitory action of NSE can be an additional advantage of this anti-inflammatory medicine.

Study of nanoparticles action on platelet aggregation allowed to select fullerenes C60 and nanodiamonds as the hemostatically inert. Not stimulating the platelet aggregation and non initiating coagulation cascade these nanoparticles can be assumed as the prospective carriers for drug delivery. On the other hand silica nanoparticles were able to activate platelets and the contact system of blood coagulation. Taking into consideration the unique sorption potential of silica we can discuss its application as the platform for the development of procoagulant anti-bleeding devices.

Study of functioning of platelets allowed us to develop the method of concentrating of the platelet rich blood plasma. Obtained platelets in highly concentrated suspension were alive, active and native, they were able to be activated and to release the constituents of platelet granules. Platelets obtained using the alternative methods were not able to be activated. The developed method was approved in clinics for the skin regeneration.

Studying the antithrombotic preparations we were focused on calix[4]arene C-145 that possessed strong antithrombotic action *in vitro* and *in vivo*. Thanks to the direct interaction of hydrophobic part of the molecule with the ‘A’-knob of fibrin polymerization C-145 directly inhibits the formation of fibrin protofibrils that are the carcass of thrombus. Experimental results witnessed that C-145 possess strong antithrombotic action in the case of intravascular administration into the bloodstream of laboratory animals. Effective dose of action of C-145 was determined.

Search of the approaches for the stimulation of extravascular thrombus formation allowed selecting the activator of blood coagulation as the most effective compound of anti-bleeding agents.

Application of activator of blood coagulation allowed to develop the method of obtaining of fibrin gel from the autologous blood plasma. Effectively converting blood plasma to gel, activator allows to form the fibrin clot in the place of wound during surgery, to isolate the wound surface and to support the regeneration of tissue, etc.

Also the enzymatic activator of blood clotting was used for the modification of biomaterials. In particular, modification of activated carbon tissue allowed developing of the hemostatic agent Carbohemostat that in the direct comparison to the commercially available devices showed the exceptional efficacy.

Modification of collagen matrix with the enzymatic activator of blood clotting allowed proposing the biodegradable material that can stimulate the wound healing and also can prevent the blood loss during the surgery.

All three hemostatic biomaterials are based on the generation of thrombin. In particular endogenous thrombin makes possible the efficient anti-bleeding action. The same enzyme was also used for the production of active preparation of thrombin.

Thus, this work is the complex study of molecular mechanisms of intravascular and extravascular blood clotting. Focusing on the common and different aspects of these processes we selected the targets promising for therapeutic action of future anti-bleeding and antithrombotic drugs.

Carbohemostat was successfully passed preclinical studies, the method of preparation of collagen matrix was implemented into the manufacture and the method of preparation of highly concentrated platelet suspension was implemented in clinical practice.

Study was performed in Palladin Institute of biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv.

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

LIST OF PUBLICATIONS

1. Savchuk O.M., **Chernyshenko V.O.**, Platonova T.M., Krasnobryzha E.M., Beliaiev A.V., Moroz Y.D., Volkov G.L. Soluble fibrin-monomeric complexes as markers of intravascular blood microcoagulation. *Exp and clin physiology and biochemistry*. 2006; 1: 57-63.
2. Korolova D.S., **Chernyshenko V.O.**, Platonova T.M. Action of heparin on the tests of prothrombin and ecamulin time. *Lab diagnostics*. 2006; 4: 22-26.
3. Korolova D.S., **Chernyshenko V.O.**, Platonova T.M. Thromboplastin and its use in laboratory diagnostics. *Exp and clin physiology and biochemistry*. 2007; 4(40): 65-70.
4. Korolova D.S., Hornytska O.V., **Chernyshenko V.O.**, Platonova T.M. Action of prothrombin claeavage products on activation and aggregation of platelets. *Ukr biochim zhurn*. 2009; 5: 58-65.
5. Grishchenko V.A., Tomchuk V.A., Lytvynenko O.M., Platonova T.M., **Chernyshenko V.O.** Diagnostics of blood coagulation disorders in drug-induced hepatitis and their correction. *Lab diagnostics*. 2010; 3: 20-25.
6. Shevchuk S.V., Hornytska O.V., Chernyshenko T.M., Krasnobryzha E.M., Korolova D.S., Platonova T.M., **Chernyshenko V.O.** Complex diagnostics of thrombophilia at systempus lupus erythematosis. *Lab diagnostics*. 2010; 1: 3-7.
7. **Chernyshenko V.O.**, Platonova T.M., Maksymovych Ya.S., Korolova D.S., Ostapchenko L.I. Changes in plasma and cellular hemostasis at acute ulcer disease. *Exp and clin physiology and biochemistry*. 2010; 1: 79-85.
8. Koshel T.A., **Chernyshenko V.O.**, Cherenok S.O., Kolesnik E.A. Study of the mechanism of fibrin polymerization inhibition by calixarenemethylenebisphosphonic acid and its monosodium salt. Addendum to 'Reports of NAS of Belarus'. 2012; 3: 95-98.
9. Chernyshenko T.M., Gryshchuk V.I., Galagan N.P., **Chernyshenko V.O.**, Hornytska O.V., Platonoa T.M., Lugovskoi E.V. Action of amorphous silica on the activation of blood coagulation factors. *Biotechnologia Acta*. 2013; 6(1): 81-85.
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.
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.

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.
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.
14. **Chernyshenko V.O.** Limited proteolysis of fibrinogen by fibrinogenase from *Echis multisquamatis* venom. *Protein J.* 2015; 34(2): 130-134..
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.
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.
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.
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.
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.
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.
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*. *Croatian Medical Journal*. 2017; 58: 87-95.
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.

23. **Chernyshenko V.O.**, Savchuk O.V., Cherenok S.O., Silenko O.M., Negelia A.O., Kasatkina L.O., Pirogova L.V., Didkivskiy 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.

24. Dziuba O.S., **Chernyshenko V.O.**, Hudz Le A., Kasatkina L.O., Chernysenko 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.

25. Dziubliuk N.A., **Chernyshenko V.O.**, Brovarska O.S., Varbanets L.D., Comparative characterization of proteases from *Bacillus thuringiensis* *IMV-7324*, *Bacillus thuringiensis var. israelensis* *IMB-7465*. *Microbiol J.* 2018; 80(5): 37-47.

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.

27. **Chernyshenko V.O.**, Snezhkova E.O., Mazur M., Chernysenko 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.

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 hepatitis and their correction by milk phospholipids. *Ukr. Biochem. J.* 2019; 91(1): 92-99.

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.

30. Komisarenko S.V., Deev V.A., Lugovskoi E.V., **Chernyshenko V.O.**, et al. Methodological recommendations ‘Application of immunoenzyme methods for the diagnostics of intravascular blood coagulation’. 2019. ‘Bykhun V.Yu.’ - 36 p.

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.

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., Slominskyi 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.

33. Tkachenko O.S., Hudz Ie.A., Kosiakova H.V., Klymenko P.P., Stohnii Y.M., Didkivskiy V.A., T.M. 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.

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.

35. Stohnii Y.M., Sakovich V., **Chernyshenko V.O.**, Chernishov V.I., Chernyshenko T.M., Kolesnikova I.M., Kucheriavyy 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.

ЗМІСТ

<u>СПИСОК СКОРОЧЕНЬ</u>	<u>24</u>
<u>ВСТУП.....</u>	<u>26</u>
<u>РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ</u>	<u>33</u>
1.2. СПОСОБИ ЗАПОБІГАННЯ ВНУТРІШНЬОСУДИННОМУ ТРОМБОУТВОРЕННЮ	42
1.2.1. БІОЛОГІЧНО АКТИВНІ СПОЛУКИ ТА РЕЧОВИНИ, АНТИКОАГУЛЯНТНА ДІЯ ЯКИХ СПРЯМОВАНА НА ФІБРИНОГЕН.....	42
1.2.2. ГЕПАРИНИ.....	44
1.2.3. СИНТЕТИЧНІ ІНГІБІТОРИ ФАКТОРІВ КАСКАДУ ЗСІДАННЯ КРОВІ.....	46
1.2.4. ІНГІБІТОРИ АГРЕГАЦІЇ ТРОМБОЦИТІВ	48
1.3. СПОСОБИ СТИМУЛЮВАННЯ ЕКСТРАСУДИННОГО ТРОМБОУТВОРЕННЯ.....	56
1.3.1. НЕСПЕЦИФІЧНІ АКТИВАТОРИ КАСКАДУ КОАГУЛЯЦІЇ	57
1.3.2. АКТИВАТОРИ ФАКТОРА X.....	58
1.3.3. АКТИВАТОРИ ПРОТРОМБІНУ	59
1.3.4. ТРОМБІНОПОДІБНІ ЕНЗИМИ.....	61
1.3.5. ТРАНСГЛУТАМІНАЗА.....	62
<u>РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ</u>	<u>63</u>
2.1. МАТЕРІАЛИ.....	63
2.1.1. РЕАГЕНТИ.....	63
2.1.2. ЦІЛЬНА КРОВ	63
2.1.3. ПЛАЗМА КРОВІ	64
2.1.4. ФІБРИНОГЕН.....	64
2.1.5. ЗБАГАЧЕНА ТРОМБОЦИТАМИ ПЛАЗМА КРОВІ (ЗТПК)	64
2.1.6. ВІДМИТІ ТРОМБОЦИТИ.....	64
2.1.7. КОНЦЕНТРОВАНА СУСПЕНЗІЯ ТРОМБОЦИТІВ.....	64
2.1.8. ЕНЗИМНИЙ АКТИВАТОР ЗСІДАННЯ КРОВІ.....	65

	19
2.1.9. КОЛАГЕНОВІ ГУБКИ	65
2.2. МЕТОДИ	66
2.2.1. ЙОНООБМІННА ХРОМАТОГРАФІЯ	66
2.2.2. ГЕЛЬ-ФІЛЬТРАЦІЯ	66
2.2.3. АГРЕГАТОМЕТРІЯ	66
2.2.4. ЦИТОМЕТРІЯ	67
2.2.5. ЕЛЕКТРОФОРЕЗ У ПОЛІАКРИЛАМІДНОМУ ГЕЛІ	67
2.2.6. ДЕНСИТОМЕТРІЯ ЕЛЕКТРОФОРЕГРАМ	68
2.2.7. ТУРБІДИМЕТРІЯ	68
2.2.8. МАС-СПЕКТРОМЕТРІЯ	68
2.2.9. УЛЬТРАЗВУКОВЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ШКІРИ	69
2.2.10. МЕТОДИ ЛАБОРАТОРНОЇ ДІАГНОСТИКИ	69
2.2.11. МОДЕЛІ <i>IN VIVO</i>	72
2.2.12. ПЛАЗМОЛІФТИНГ СУСПЕНЗІЄЮ АУТОЛОГІЧНИХ ТРОМБОЦИТІВ	74
2.2.13. ПРОЛІФЕРАЦІЯ ЕНДОТЕЛІОЦИТІВ	75
2.2.14. МЕТОД «ЗАРОСТАННЯ ПОДРЯПИНИ»	75
2.2.15. СТАТИСТИЧНА ОБРОБКА ДАНИХ	76

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ **77**

РОЗДІЛ 3. ДІЯ ЕКЗОГЕННИХ ТА ЕНДОГЕННИХ ЕФЕКТОРІВ НА ТРОМБОЦИТИ **77**

3.1. КОМПОНЕНТИ СИСТЕМИ ЗСІДАННЯ КРОВІ ТА ЇХНІ ФРАГМЕНТИ.....	77
3.1.1. ПРОДУКТИ ДЕГРАДАЦІЇ ФІБРИНОГЕНУ-ФІБРИНУ	77
3.1.2 РОЗЧИННІ ФІБРИН-МОНОМЕРНІ КОМПЛЕКСИ	81
3.1.3. ВVN-ДОМЕН ФІБРИН(ОГЕН)У	82
3.2. АНТАГОНІСТИ GРІVША-РЕЦЕПТОРІВ.....	89
3.2.1. ДЕЗІНТЕГРИНИ ОТРУТИ ЗМІЙ.....	89
3.2.2. НИЗЬКОМОЛЕКУЛЯРНІ ХІМІЧНІ СПОЛУКИ.....	93
3.3. ІНГІБІТОРИ СИГНАЛЬНИХ КАСКАДІВ ТРОМБОЦИТІВ.....	96

3.3.1. Дія лігнанів на активацію та агрегацію тромбоцитів	96
3.3.2. Ефект епігалокатехінгаллату (EGCG) на тромбоцити у стані спокою, активацію та агрегацію тромбоцитів	102
3.3.3. N-стеароїлетаноламін	111
3.3.4. Інгібітори циклооксигенази	123
3.4. Наночастинки	126
3.4.1. Наночастинки силіцію	126
3.4.2. Нанодіаманти	129
3.4.3. Фулерени.....	131
3.5. Біоматеріали, модифіковані аргатробаном	139
3.6. Отримання та характеристика високонцентрованої суспензії тромбоцитів.....	144

РОЗДІЛ 4. ЗАСТОСУВАННЯ ВИСОКОКОНЦЕТРОВАНОЇ АУТОЛОГІЧНОЇ ПЛАЗМИ КРОВІ В КЛІНІЧНИХ ВИПРОБУВАННЯХ.. 148

РОЗДІЛ 5. РОЗРОБКА АНТИТРОМБОТИЧНОГО ПРЕПАРАТУ КАЛІКС[4]АРЕН С-145..... 162

5.1. Особливості дії С-145 на полімеризацію фібрину	162
5.2. Дослідження С-145 <i>IN VIVO</i>	167
5.3. Дія калікс[4]арену С-145 на ангіогенез у моделі <i>Danio rerio</i>	176

РОЗДІЛ 6. СТВОРЕННЯ ТА ВИПРОБУВАННЯ КРОВOSPИННОГО ЗАСОБУ КАРБОГЕМОСТАТ

6.1. Гемостатики локальної дії.....	180
6.2. Біоінформатичний аналіз послідовностей протромбіну людини та ряду лабораторних тварин	186
6.3. Характеристика дії ензимного активатора зсідання крові на фібриноген та клітини крові	196

6.4. ЕФЕКТИВНІСТЬ ДІЇ ЕНЗИМНОГО АКТИВАТОРА ЗСІДАННЯ КРОВІ ЗА ПРИСУТНОСТІ ГЕПАРИНУ <i>IN VITRO</i>	198
6.5. ВИЗНАЧЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ДІЇ ЕНЗИМНОГО АКТИВАТОРА ЗСІДАННЯ КРОВІ НА ЗСІДАННЯ ПЛАЗМИ КРОВІ, ДЕФІЦИТНОЇ НА КОАГУЛЯЦІЙНІ ФАКТОРИ VIII ТА IX .	200
6.6. АКТИВНІСТЬ ЕНЗИМНОГО АКТИВАТОРА СИСТЕМИ ЗСІДАННЯ КРОВІ У МОДЕЛІ ZEBRAFISH	202
6.7. ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОЦЕСУ АКТИВАЦІЇ ПРОТРОМБІНУ ЕНЗИМНИМ АКТИВАТОРОМ СИСТЕМИ ЗСІДАННЯ КРОВІ.....	204
6.8. ІММОБІЛІЗАЦІЯ ЕНЗИМНОГО АКТИВАТОРА ЗСІДАННЯ КРОВІ НА МАТРИЦЯХ...	205
6.8.1. ТКАНИННІ МАТРИЦІ ДЛЯ ІММОБІЛІЗАЦІЇ ЕНЗИМНОГО АКТИВАТОРА	206
6.8.2. МОДИФІКАЦІЯ ДІОКСИДУ СИЛІЦІЮ ЕНЗИМНИМ АКТИВАТОРОМ.....	210
6.9. РОЗРОБКА УМОВ ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВАЦІЙНОЇ ЗДАТНОСТІ КОМПЗИТУ АДСОРБЦІЙНОГО ГЕМОСТАТИЧНОГО АПЛІКАЦІЙНОГО КАРБОГЕМОСТАТ	212
6.10. ВИЗНАЧЕННЯ МІЦНОСТІ ІММОБІЛІЗАЦІЇ ЕНЗИМНОГО АКТИВАТОРА ЗСІДАННЯ КРОВІ	213
6.11. ДОСЛІДЖЕННЯ КОАГУЛЯЦІЙНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ГЕМОСТАТИКА, ЯКИЙ РОЗРОБЛЕНО З ВИКОРИСТАННЯМ ЕНЗИМНОГО АКТИВАТОРА ЗСІДАННЯ КРОВІ, В МОДЕЛЯХ <i>IN VIVO</i>.....	215
6.11.1. ПОРІВНЯННЯ КРОВОСПИННИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ КАРБОГЕМОСТАТУ, YUNANN BAICAO ТА CELOX НА МОДЕЛІ ПАРЕНХІМАТОЗНОЇ КРОВОТЕЧІ У ЩУРІВ.	215
6.11.2. ОЦІНКА КРОВОСПИННОЇ ДІЇ КАРБОГЕМОСТАТУ НА МОДЕЛІ МАСИВНОЇ КРОВОТЕЧІ ПРИ ТРАВМІ СТЕГНОВОЇ АРТЕРІЇ СВИНІ	221
6.11.3. ОЦІНКА ЕФЕКТИВНОСТІ ДІЇ КАРБОГЕМОСТАТУ НА МОДЕЛІ МАСИВНОЇ КРОВОТЕЧІ З КАРОТИДНОЇ АРТЕРІЇ ЩУРІВ.....	224
6.11.4. ГІСТОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ СТРУКТУРИ СУДИН ТА ПРИЛЕГЛИХ ТКАНИН В МОДЕЛІ МАСИВНОЇ КРОВОТЕЧІ З КАРОТИДНОЇ АРТЕРІЇ ЩУРА ЗА УМОВ ЗАСТОСУВАННЯ ГЕМОСТАТИЧНОГО ЗАСОБУ	225
<u>РОЗДІЛ 7. ОДЕРЖАННЯ АУТОЛОГІЧНОГО ФІБРИНОВОГО КОМПЗИТУ</u>	<u>235</u>

7.1. РОЗРОБКА СПОСОБУ ОДЕРЖАННЯ ФІБРИНОВОГО ГЕЛЮ	235
7.2. СТИМУЛЯЦІЯ РЕПАРАТИВНОГО ОСТЕОГЕНЕЗУ ТА ЗНИЖЕННЯ ІНТЕНСИВНОСТІ ЗАПАЛЬНИХ ПРОЦЕСІВ ПРИ ЗАСТОСУВАННІ ФІБРИНОВОГО ГЕЛЮ.....	238
7.3. ПРОВЕДЕННЯ АПРОБАЦІЇ РОЗРОБЛЕНОГО ФІБРИНОВОГО КОМПОЗИТУ ЗА ХІРУРГІЧНИХ ВТРУЧАНЬ ДЛЯ ПЕРЕВІРКИ ЕФЕКТИВНОСТІ ЗАГОЄННЯ РАНИ НА ПЕЧІНЦІ.....	241

РОЗДІЛ 8. СТВОРЕННЯ ГЕМОСТАТИЧНИХ ГУБОК НА ОСНОВІ КОЛАГЕНОВОЇ МАТРИЦІ І АКТИВАТОРА ЗСІДАННЯ КРОВІ

8.1. КОЛАГЕНОВІ ГУБКИ ЯК ГЕМОСТАТИЧНІ АГЕНТИ.....	244
8.2. ХАРАКТЕРИСТИКА ЗРАЗКІВ КОЛАГЕНУ.....	248
8.2.1. АМІНОКИСЛОТНИЙ СКЛАД.....	248
8.2.2. РОЗЩЕПЛЕННЯ КОЛАГЕНУ ЕНЗИМАМИ: ХІМОТРИПСИНОМ, ТРИПСИНОМ ТА ПЛАЗМІНОМ.....	254
8.3. СТВОРЕННЯ ТА ВИПРОБУВАННЯ ЛАБОРАТОРНИХ ЗРАЗКІВ КОЛАГЕНОВОЇ МАТРИЦІ <i>IN VITRO</i>	255
8.3.1. СПОСІБ ВИРОБНИЦТВА КОЛАГЕНОВОЇ МАТРИЦІ	255
8.3.2. ВИЗНАЧЕННЯ ДІЇ ДОСЛІДНИХ ЗРАЗКІВ КОЛАГЕНОВОЇ МАТРИЦІ НА ТРОМБОЦИТИ ЛЮДИНИ У ЗБАГАЧЕНІЙ ТРОМБОЦИТАМИ ПЛАЗМІ КРОВІ	257
8.4. ВИПРОБУВАННЯ ОТРИМАНИХ ЗРАЗКІВ КОЛАГЕНОВОЇ МАТРИЦІ НА МОДЕЛЯХ <i>IN VIVO</i>	264
8.4.1. ОЦІНКА ЕФЕКТИВНОСТІ ГЕМОСТАТИЧНИХ ЗАСОБІВ НА МОДЕЛІ ПАРЕНХІМАТОЗНОЇ КРОВОТЕЧІ, ОЦІНКА КРОВОВТРАТИ ПРИ ЗАСТОСУВАННІ РІЗНИХ ЗРАЗКІВ КОЛАГЕНОВОЇ МАТРИЦІ.....	264
8.4.2. МАКРОМОРФОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ЗАГОЄННЯ РАН ПЕЧІНКИ ПРИ ЗАСТОСУВАННІ ОТРИМАНИХ ЗРАЗКІВ КОЛАГЕНОВОЇ МАТРИЦІ.....	268
8.4.3. ГІСТОЛОГІЧНИЙ АНАЛІЗ ЗРАЗКІВ УРАЖЕНИХ ТКАНИН ПЕЧІНКИ	270
8.4.4. ХАРАКТЕРИСТИКА СТАНУ СИСТЕМИ ЗСІДАННЯ КРОВІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ТВАРИН НА 1-У ТА 14-ТУ ДОБУ ПІСЛЯ ОПЕРАЦІЇ.....	276

**РОЗДІЛ 9. РОЗРОБКА УМОВ ОТРИМАННЯ СТАБІЛЬНОГО ПРЕПАРАТУ
ТРОМБІНУ..... 279**

**9.1. ОТРИМАННЯ ТРОМБІНУ АКТИВАЦІЄЮ ПРОТРОМБІНУ ЗА ПРИСУТНОСТІ 25-40%
ЦИТРАТУ НАТРІЮ 280**

**9.2. ОТРИМАННЯ ТРОМБІНУ ШЛЯХОМ АКТИВАЦІЇ ПРОТРОМБІНУ
ТРОМБОПЛАСТИНОМ ЗА ПРИСУТНОСТІ ЙОНІВ КАЛЬЦІЮ 281**

**9.3. ОТРИМАННЯ ТРОМБІНУ ШЛЯХОМ АКТИВАЦІЇ ПРОТРОМБІНУ ЕНЗИМНИМ
АКТИВАТОРОМ ЗСІДАННЯ КРОВІ, ІММОБІЛІЗОВАНИМ НА BRCN-SEP HAROSE 282**

РОЗДІЛ 10. ЗАКЛЮЧЕННЯ..... 284

ЛІТЕРАТУРА..... 290

СПИСОК СКОРОЧЕНЬ

АЧТЧ – активований частковий тромбопластиновий час

АФЛ – антифосфоліпідні антитіла

АТ III – антитромбін III

ВЗК – внутрішньосудинне мікрозсідання крові

ГПТ – гепарин-індукована тромбоцитопенія

ДФФ – диізопропілфторфосфат

ЗГП – загальний гемостатичний потенціал плазми крові

ЗП – потенціал зсідання плазми крові

ЗТПК – збагачена тромбоцитами плазма крові

ІФА – імуноензимний аналіз

МонАТ – моноклональні антитіла

НМГ – низькомолекулярна форма гепарину

ВМГ – високомолекулярний гепарин

ПААГ – поліакриламідний гель

Пг – плазміноген

ПДФ – продукти деградації фібрину

ПАІ-1 – інгібітор 1 активатору плазміногену

ПЧ – протромбіновий час

РФ – розчинний фібрин

РФМК – розчинні фібрин-мономерні комплекси

Ск – стрептокіназа

ТАП (t-РА) – тканинний активатор плазміногену

ТЧ – тромбіновий час

Фг – фібриноген

ФНФП – функціонально неактивні форми протромбіну

ФП – фібринолітичний потенціал плазми крові

Фп - фібринопептиди

ADP – аденозиндифосфат

D – фрагмент фібриногену

DD – фрагмент стабілізованого фібрину

GP – глікопротеїн

PAI – інгібітор активатора плазміногену

pC – протеїн C

PIVKA – протеїн, який утворюється в результаті дефіциту вітаміну K

PGI₂ – простагландин I₂

pNA – *para*-нітроанілін

RVV – активатор фактору X системи зсідання крові, виділений з отрути гадюки

Расела

SDS – додецилсульфат натрію

TAFI – інгібітор фібринолізу, який активується тромбіном

TFPI – інгібітор шляху тканинного фактора

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Система гемостазу покликана підтримувати баланс між зсіданням крові та фібринолізом, забезпечуючи ефективний кровообіг та швидке припинення кровотеч за умов 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 потенціалом системи гемостазу лежать молекулярні механізми, які є предметом досліджень науковців протягом багатьох десятиліть. Розуміння цих механізмів має не лише виключне фундаментальне значення, але і важливе практичне застосування. Володіння способами керування про- та антикоагулянтним потенціалом системи гемостазу відкриває перспективи лікування цілої низки найпоширеніших захворювань, пов'язаних з патологічним внутрішньосудинним тромбоутворенням, та порятунку пацієнтів за умов 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 організму. Воно є причиною таких захворювань, як інфаркт міокарду, тромбоемболія легеневої артерії, ішемічний інсульт, тромбоз глибоких вен нижніх кінцівок, а крім того супроводжує низку серцево-судинних та онкологічних захворювань, хірургічних та гінекологічних ускладнень, 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 головною причиною загибелі військових під час бойових травм, є

головним фактором ризику в хірургії, в акушерській практиці, у медицині катастроф.

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

Дисертаційну роботу виконано на базі Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України в рамках проєктів 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 діагностиків стану системи гемостазу при запальних процесах, серцево-судинних захворюваннях та хірургічних втручаннях» (2014-2018); № 0115U003645 «Дослідження ролі ВбетаN-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); № 0117V002808 «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 діагностиків стану системи гемостазу при запальних процесах, серцево-судинних захворюваннях та хірургічних втручаннях» (2019-2023).

Мета і завдання. 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 її та апробувати для біомедичного застосування.
3. Провести випробування антитромботичного препарату калікс[4]арен C-145 *in vivo*.
4. Розробити універсальний кровоспинний засіб на основі 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. Створити спосіб отримання високоактивного препарату тромбіну.

Методи дослідження: У роботі використано хроматографічні та електрофоретичні методи, агрегатометрію, спектрофлуориметрію, цитометрію, скануючи 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, рецекції печінки та переламу 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 активаторів, які активують компоненти системи зсідання крові, які 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 кровозупинні 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.

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 прямо 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 розроблено підходи до створення, охарактеризовано та апробовано нові біоматеріали з прокоагулянтною дією, 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). Створено унікальний 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. Вся експериментальна робота проводилась 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 здійснювались спільно з завідувачем відділу структури та функції білка (2009-2019) чл.-кор. НАН України, проф. Е.В. Луговським, провідним науковим співробітником відділу, проф. Т.М. Платоновою. 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 Чернишенко Т.М. Характеристику препарату колагену проведено спільно зі співробітником відділу регуляції обміну речовин к.б.н. Володіною Т.Т. Частина експериментальних робіт, присвячену дослідженням експериментальної кровотечі, виконано у співпраці зі співробітниками Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України під керівництвом д.б.н., проф. В.Є. Досенка. Робота з характеристики активованих вуглецевих матеріалів та з вивчення кровоспинного засобу за паренхіматозних кровотеч виконана у співпраці зі співробітниками Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України під керівництвом чл.-кор. НАН України, 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, 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. – 807-8 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 7 патентів України на корисну модель та винахід.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів та методів, експериментальної частини, яка складається з 10 розділів, висновків, списку використаних джерел, який включає 242 найменування. Робота викладена на 312 сторінках машинописного тексту. Результати дисертації та допоміжні матеріали проілюстровано на 152 рисунках та представлено в 21 таблиці.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. РЕГУЛЬОВАНА РІВНОВАГА СИСТЕМИ ГЕМОСТАЗУ

Кровообіг забезпечує інтеграцію тканин і органів у єдине ціле, постачаючи до них поживні речовини та кисень, забезпечуючи елімінацію метаболітів, транспортуючи гуморальні регулятори та компоненти імунної системи. Порушення кровообігу призводить до тяжких наслідків для всього організму. При цьому, такі порушення можуть бути викликані як масивною кровотечею, так і локальним припиненням кровотоку, головним чином спричиненим внутрішньосудинним тромбоутворенням. До найвідоміших (і найнебезпечніших) захворювань, спричинених тромбоутворенням, належить припинення кровопостачання окремих органів (ішемічний інсульт) або серця (тромбоз коронарної артерії), емболізація судин легенів (тромбоемболія легеневої артерії), а також атеротромбоз та атеротромбоз судин.

Підтримку циркуляції крові в судинах та швидке припинення кровотеч забезпечує система гемостазу, що включає клітинний компонент (тромбоцити та ендотелій судин) і ензимні комплекси, кожен з яких виконує свою чітко детерміновану функцію – протромбіназу і теназу, а також антикоагулянтну і фібринолітичну системи, тощо. Каскади ензимів перебувають у постійній динамічній рівновазі, порушення якої і призводить до розладів у кровообігу.

Залежно від обставин, задачею біохіміків та клініцистів є пошук способів запобігання ендогенному тромбоутворенню (у випадку тромбофілії) або ж навпаки – прискоренню чи ініціації екзогенного формування кров'яного згустку (за кровотеч). В основі екзогенного чи ендогенного тромбоутворення лежать одні й ті самі механізми, розуміння яких дозволяє вирішувати обидва завдання.

Існує два принципові механізми ініціації зсідання крові. Перший полягає у активації і адгезії тромбоцитів біля місця пошкодження і веде до утворення тромбу, який і призупиняє втрату крові [1]. Другий механізм реалізовується завдяки функціонуванню протеїнових факторів зсідання крові, однак слід

пам'ятати, що у організмі обидва механізми запускаються одночасно, тісно пов'язані один з одним, взаєморегулюються і не функціонують ізольовано [2].

Процес зсідання крові починається з активації досить незначної кількості ензимів-активаторів – факторів зсідання крові – і, хвилеподібним шляхом призводить до масової появи в кровотоці активних форм ензимів. Більшість реакцій процесу зсідання крові відбувається не у вільному розчині, де ці реакції були б занадто розрізнені, а на поверхні фосфоліпідних мембран, просторово зближуючись шляхом специфічної сорбції. Така сорбція забезпечується кластерами фосфатидилсерину, які з'являються на пошкоджених мембранах ендотелію або ж на мембранах активованих тромбоцитів [3].

Активація процесу зсідання крові може відбуватись двома різними шляхами: внутрішнім (контактна система) і зовнішнім. Обидва шляхи характеризуються серією реакцій ініціації на межі прокоагулянтної поверхні і плазми крові, кожна з яких включає активацію плазменної протеїнази [2].

Контактна система активації зсідання крові запускається одразу ж після ушкодження ендотелію судин за рахунок утворення на активаційній поверхні комплексу, що складається з кініногену, прекалікреїну, факторів XII та XI. У складі цього комплексу відбувається активація протеїнів шляхом їх конформаційних змін. Зв'язування цього комплексу з ендотелієм судин контролюється протеїнкаіназою C та протеїном проміжних волокон цитоскелету – цитокератином [4].

Компоненти контактної системи (фXII, прекалікреїн, високомолекулярний кініноген – ВМК) не беруть безпосередньої участі в швидкому утворенні фібринового згустку, однак мають важливі функції у фібриноутворенні при запальних процесах та загоєнні ран. Активація фXII (фактор Хагемана) відбувається паралельно за двома механізмами: твердофазним – за рахунок адсорбції на поверхні ушкодженої судини, і рідкофазним – під впливом протеолітичних ензимів. В результаті протеолізу фXII утворюється його дволанцюгова форма. Основними субстратами фXIIa у плазмі крові є прекалікреїн та фXI, зв'язані на контактній поверхні у комплексі з ВМК [5].

Прекалікреїн активується фактором XIIa до калікреїну, що у свою чергу здатен активувати фXII. Крім того, калікреїн відщеплює від молекули ВМК нонапептид – брадикінін, що є важливою діагностичною ознакою активації системи зсідання крові і, приєднуючись до брадикінінових рецепторів клітин, чинить вплив на внутрішньоклітинне середовище, зокрема спричинює вивільнення цитокінів, фактора некрозу пухлин, ін. Саме ВМК і фXII, взаємодіючи з калікреїном, активують фXI, що є останньою ланкою в контактній активації системи зсідання крові [6].

Зовнішній шлях активації відіграє провідну фізіологічну роль в системі зсідання крові. Його ініціатором виступає тканинний фактор (ТФ) – інтегральний мембранний протеїн, що експресується після пошкодження стінки кровоносної судини і є рецептором факторів зсідання VII і VIIa. При контакті невазкулярних клітин з кров'ю відбувається негайне формування комплексу між ТФ і фVII. Останній постійно циркулює в крові і активується, зв'язуючись з ТФ. При експонуванні ТФ відбуваються також конформаційні перебудови клітинних мембран, які полягають у появі на їхній поверхні кластерів фосфатидилсерину та фосфатидилетаноламіну – місць специфічної сорбції факторів зсідання крові [7].

Функцією комплексу активованого фVII, ТФ та мембранних фосфоліпідів є протеоліз пептидних зв'язків у специфічних до цього комплексу субстратах за присутності йонів Ca^{2+} , зокрема при активації фX. Комплекс ТФ/фVIIa здатен активувати також і фIX. Фактор IX, крім того, активується фактором XI, який утворюється в кульмінації внутрішнього шляху системи зсідання крові. Однак, повне злиття внутрішнього та зовнішнього шляхів системи зсідання крові відбувається на етапі активації фактору X [8].

Активация фX може здійснюватись за участі різних компонентів: комплексу ТФ, фVIIa і Ca^{2+} (теназа зовнішнього шляху зсідання крові) і комплексу фIXa, VIIa (активується тромбіном), фосфоліпідів та Ca^{2+} (теназа внутрішнього шляху зсідання крові) за рахунок відщеплення фрагменту від важкого ланцюга молекули протеїну. Теназа внутрішнього шляху зсідання крові має особливе значення як додатковий механізм підсилення при фізіологічних ушкодженнях кровоносних

судин, коли кількість ТФ може бути досить незначною. Також фХа властивий автокаталіз. Інгібіторами активації фХ є антитромбін III та α_2 -макроглобулін.

Основна функція фХа – перетворення протромбіну в активний тромбін – здійснюється у складі протромбіназного комплексу. Активація протромбіну при цьому в 30 тис. разів швидша, ніж активація під дією некомплексного фХа. До складу протромбіназного комплексу, крім фХа, входять фVa, Ca^{2+} і фосфоліпіди клітинної мембрани.

Протромбін – односторонній протеїн із трьома мікрогетерогенними глікозильними залишками, приєднаними до пептидного ланцюга через залишки аспарагіну. Асиметрична молекула протромбіну, що має молекулярну масу 72 кДа, утворена декількома структурними і функціональними доменами.

На N-кінці знаходиться гла-домен (гомологічний гла-доменам інших вітамін K-залежних протеїнів), за ним розташовано два крингли (ділянки, що містять по 83 амінокислотних залишки і по три дисульфідні містки), які, вірогідно, мають функцію взаємодії з субстратом, кофакторами чи рецепторами. Просторова структура гла-домена залежить від присутності в середовищі йонів кальцію.

В С-кінцевій ділянці молекули протромбіну знаходиться каталітичний домен, гомологічний відповідним доменам серинових протеїназ (включаючи трипсин). Активація протромбіну – швидкоплинний процес, що здійснюється протромбіназним комплексом (протромбіназою) переважно на поверхні фосфоліпідних мембран. Тромбін, утворений внаслідок протромбіназної реакції, має додаткові субцентри (екзосайти) зв'язування субстратів та рецепторів. Виділяють аніонзв'язувальний екзосайт 1, що впізнає та зв'язує фібрин, фібриноген, тромбомодулін, кофактор II гепарину, гірудин (прямий інгібітор тромбіну) та аніонзв'язувальний екзосайт 2, що відповідає за зв'язування гепарину і виконує цілий спектр найрізноманітніших регуляторних функцій. Зокрема, взаємодіючи з тромбоцитарними рецепторами, він стимулює адгезію (специфічне злипання) тромбоцитів та їх прикріплення до ушкодженої поверхні ендотелію. Тромбін також бере участь в реакціях оберненого зв'язку, таким чином саморегулюючись. З одного боку, в комплексі з тромбомодуліном тромбін активує протеїн C і тим самим знижує активність прокоагулянтної ланки системи

гемостазу: активований протеїн С розщеплює та інактивує VIIIa та Va фактори зсідання крові.

Але з іншого боку – тромбін безпосередньо активує фактори зсідання, зокрема фХІ. Реакції оберненого зв'язку характерні для всіх компонентів системи гемостазу та й загалом для всіх біохімічних реакцій, що відбуваються в організмі. Основною ж функцією тромбіну є перетворення ключового компоненту системи зсідання крові – фібриногену (фактора І) – на нерозчинний фібрин.

Отже, дію всіх ензиматичних каскадів гемостазу в кінцевому підсумку спрямовано на єдину молекулу – фібриноген. Фібриноген – це великий глікопротеїн з молекулярною масою 340 kDa. Його сформовано з двох субодиниць, кожна з яких у свою чергу складається з трьох ланцюгів, сполучених між собою дисульфідними зв'язками: $A\alpha$ ($A\alpha 1-610$), $B\beta$ ($B\beta 1-461$) та γ ($\gamma 1-411$) [9]. N-кінцеві ділянки трьох пар ланцюгів розташовано у центральному E-регіоні молекули, C-кінцеві ділянки кожного з пари ланцюгів $B\beta$ та γ формують βC - та γC -домени, структурно та функціонально об'єднані у два дистальні D-регіони [10]. C-кінцеві ділянки $A\alpha$ -ланцюга молекули фібриногену є лабільними та просторово неупорядкованими. Вони сполучаються завдяки електростатичним зв'язкам з центральним E-регіоном молекули та між собою, формуючи αC -регіон [11].

Саме фібриноген, за умови активації системи гемостазу, зазнає обмеженого протеолізу тромбіном. Втрачаючи послідовно відщеплювані тромбіном фібринопептиди А і В (термінальні N-кінцеві ділянки ланцюгів $A\alpha 1-16$ та $B\beta 1-14$), фібриноген перетворюється на фібрин-мономер, здатний до спонтанної полімеризації з формуванням тривимірної сітки полімерного фібрину, що складає каркас тромбу [12]. Полімеризація фібрину забезпечується нековалентними зв'язками, а саме електростатичними взаємодіями, водневим зв'язуванням і гідрофобними контактами амінокислотних залишків, що входять в центри полімеризації молекул фібрину. До центрів полімеризації історично відносять центри «А» та «В» у E-регіоні молекули та комплементарні до них центри полімеризації «а» та «b» у D-регіонах. У 2007 році під керівництвом проф., чл.-

кор. НАН України Е.В. Луговського було відкрито додаткову пару центрів полімеризації «С» і «с» [13].

Треба сказати, що процес полімеризації фібрину, так само як і усі процеси зсідання крові, підлягає жорсткій регуляції. Зокрема, відщеплення фібринопептидів А відбувається пізніше, ніж відщеплення фібринопептидів В. За цією невеличкою деталлю насправді ховається цілий ряд тонких механізмів регуляції функціонування тромбіну, плазіногену та асоціації протофібрил. Завершальним етапом формування тривимірної фібринової сітки можна вважати їхню ковалентну прошивку фактором XIIIa. Фактор XIIIa – трансглютаміназа – сполучає сусідні залишки амінокислоти глутаміну зв'язками, які за міцністю не поступаються внутрішньомолекулярним, власне, ковалентним зв'язкам. Сайти ковалентної прошивки містяться в D-доменах молекули, що просторово зближуються при утворенні протофібрил. Тут, до речі, також не обійшлося без регуляторної ролі тромбіну: він здатен безпосередньо активувати фактор XIIIa.

Протофібрили завжди галузяться, вигинаються, асоціюють і утворюють тривимірну сітку фібрил, яка є основою фібриново-тромбоцитарного тромбу. Фібриноген та фібрин містять на своїй поверхні активні центри, здатні зв'язуватися з рецепторами на поверхні тромбоцитів та ендотеліальних клітин. Ця властивість молекули фібрину чудово ілюструє єдність плазменного та клітинного гемостазу. Адже молекули фібрину можуть сполучатися одночасно з кількома тромбоцитами, полегшуючи їхню агрегацію, утворювати місточки між тромбоцитами та ендотеліальними клітинами, притягуючи тромбоцитарні агрегати до місць ушкодження судини. Нарешті, існування фібриноген-тромбоцитарних зв'язків забезпечує специфічне зв'язування агрегованих тромбоцитів з фібриновим згустком і формування міцного і надійного тромбу.

Активация, адгезія та агрегація тромбоцитів неможливі без участі фібриногену; ці процеси відбуваються одночасно з перебігом каскаду зсідання крові, полімеризації фібрину та результуються утворенням фібриново-тромбоцитарного тромбу. На молекулі фібриногену існує шість основних сайтів, які забезпечують зв'язування з тромбоцитарними інтегринами GPIIb/IIIa. Це

додекапептид на С-кінцях обох γ -ланцюгів (γ 400-411) і RGD-послідовності α -ланцюгів (α 95-98, α 572-574) [14, 15].

Утворившись, кров'яний згусток повинен врешті-решт бути елімінованим. Цю функцію виконує система фібринолізу. На поверхні полімерного фібрину стають доступними ділянки зв'язування плазміногену та тканинного активатора плазміногену (ТАП). Циркуюючи в крові, ці протеїни не зближуються, натомість на фібрині вони опиняються просторово близько, і активатор активує плазміноген шляхом протеолізу з утворенням активного плазміну. Плазмін, у свою чергу, починає розщеплювати пептидні зв'язки у лабільних (неструктурованих, придатних до протеолізу) ділянках фібрину, таким чином руйнуючи тромб. Саме тому систему плазміногену, його активаторів та інгібіторів і названо системою фібринолізу. В результаті утворюються продукти гідролітичного розщеплення фібрину (ПРФ), що структурно відповідають основним доменам фібриногену і мають ідентичні назви – D і E. Крім того, при розщепленні ковалентно прошитого фібрину, утворюється D-димер (D-димер), що складається з двох D-доменів різних молекул фібрину (Рис. 1.1). Згадаймо також систему протеїну С, про яку йшлося вище. Активується тромбіном – продуктом активації системи зсідання крові – протеїн С пригнічує процес коагуляції. Схожа ситуація і у системі фібринолізу. Мембранний комплекс тромбін-тромбомодулін активує інгібітор активації плазміногену (ПАІ).

Безперечно, це не єдині активатори та інгібітори системи фібринолізу. Їх є цілий спектр, але хотілося б зосередити увагу на тих із них, які поєднують непоєднуване – про- та антикоагулянтну ланки системи гемостазу. Той самий протеїн С, що є природнім антикоагулянтом, тобто безпосередньо регулює процес зсідання крові, також має і профібринолітичну активність. Вона виявляється у взаємодії з інгібітором активації плазміногену, внаслідок чого вивільняється раніше заінгібований (позбавлений функціональної активності в комплексі з інгібітором) активатор плазміногену.

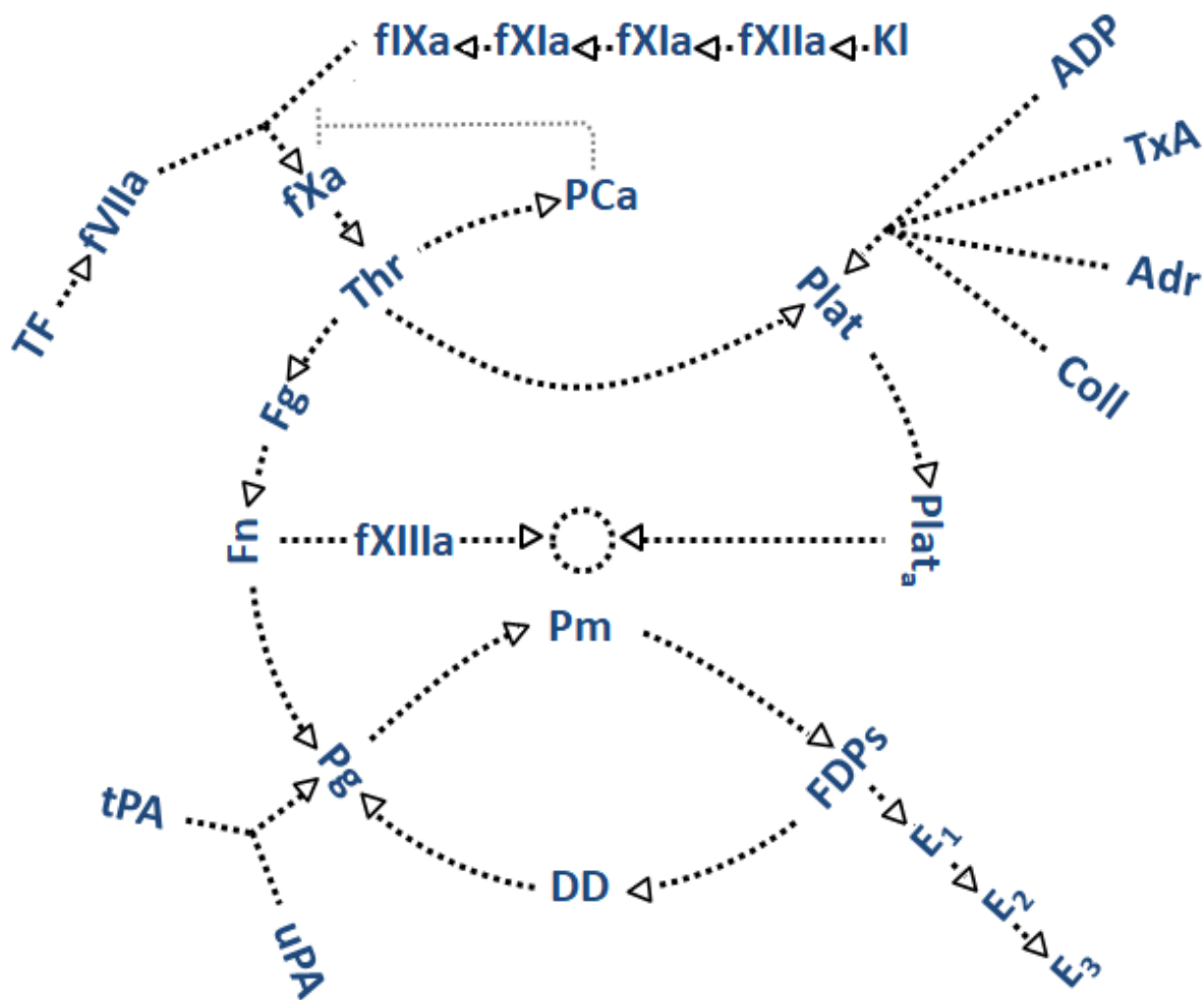


Рис. 1.1. Узагальнена схема системи гемостазу, що поєднує систему зсідання крові, яка призводить до формування тривимірної сітки фібрину – каркасу тромбу, тромбоцитарну ланку, активація якої призводить до формування тромбоцитарного «тіла» тромбу, систему протеїну С, яка здійснює регуляцію активності системи зсідання крові, а також систему фібринолізу, яка забезпечує гідроліз полімерного фібрину.

Fg – фібриноген; Fn – фібрин; fXIIIa – активований фактор XIII; 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 С; Coll – колаген; Adr – адреналін; TxA – тромбоксан А; 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.

Контактна система активації, яка є одним із пускових механізмів каскаду зсідання крові, є також і механізмом запуску фібринолізу. Зокрема, збирання на поверхні клітини комплексу протеїнів контактної фази та їхнє перетворення, призводить до вивільнення із клітин ендотелію депонованого (запасеного) тканинного активатора плазміногену. Крім того, фактор XIIa є непрямим активатором плазміногену, а калікреїн (ще один протеїн контактної фази) безпосередньо активує урокіназу – активатор плазміногену.

Дуже цікавим є зв'язок системи зсідання крові та фібринолізу через клітинну ланку гемостазу. Усі реакції зсідання крові, що проходять на поверхні або за участі клітин крові, призводять до вивільнення з клітинних гранул компонентів фібринолізу. Таким чином, система гемостазу, попри свою позірну різнонаправленість, дивує цілісністю і внутрішньою залежністю компонентів, жоден з яких не може функціонувати окремо, оскільки будь-яка зміна одного компоненту веде за собою ланцюжок змін інших. І у цій динамічності – справжня біологічна рівновага.

1.2. СПОСОБИ ЗАПОБІГАННЯ ВНУТРІШНЬОСУДИННОМУ ТРОМБОУТВОРЕННЮ

Внутрішньосудинне зсідання крові є причиною більш ніж третини смертності за серцево-судинних захворювань, при травмах різної природи і хірургічних операціях, сепсисі, опіках, онкологічних захворюваннях, захворюваннях, пов'язаних з патологією гемостазу, та ін. Внутрішньосудинне тромбоутворення виникає внаслідок дії таких факторів, як пошкодження ендотеліальних клітин з експонуванням тромбогенних субендотеліальних структур; патологічна активація тромбоцитів; гіперактивація системи зсідання крові, що призводить до появи в кровотоці активного тромбіну; зниження фібринолітичного потенціалу; реологічні порушення та локальне припинення кровотоку. Розуміння цих процесів необхідне для розробки і удосконалення антитромботичних засобів [16, 17].

Відповідно до способу надання антикоагулянтного ефекту розрізняють антикоагулянти прямої та непрямой дії. Антикоагулянти непрямой дії (ще відомі як антагоністи вітаміну К) діють опосередковано, перешкоджаючи карбоксилюванню вітамін-К залежних факторів каскаду зсідання крові, головним чином протромбіну [18]. Сьогодні варфаринотерапія знайшла широке застосування у пацієнтів з ризиком внутрішньосудинного тромбоутворення. Регулярний прийом варфарину дозволяє уникнути ризиків тромбозів, однак не виключає загрози кровотеч, вимагає певних дієтарних обмежень та потребує постійного лабораторного контролю [19, 20].

1.2.1. Біологічно активні сполуки та речовини, антикоагулянтна дія яких спрямована на фібриноген

Безпосередньо знизити прокоагулянтний потенціал плазми крові можна шляхом дефібринування. Кількадесят років тому для цього пропонували використовувати анкрод – фібриногеназу з отрути *Calloselasma rhodostoma* [21, 22]. Створений на основі цього ензиму препарат «Арвін» широко використовували у клінічних дослідженнях [23]. Будучи тромбіноподібним ензимом, анкрод викликав появу у кровотоці фібрину desA, який не стабілізувався

фактором XIIIa та відповідно мусив швидко і ефективно виводитися з кровотоку завдяки системі фібринолізу [24]. Проте, свідоме генерування у кровотоці полімерного фібрину, хай навіть нестабілізованого, є ризикованою справою. Фібрин desA також може бути субстратом для компонентів системи фібринолізу, гіперактивація якої загрожує кровотечами [25].

Інший клас ензимів, який застосовувався у клінічній практиці та може мати антикоагулянтну дію, – це фібринолітики. Головною функцією препаратів на їхній основі є тромболітична дія, тобто гідроліз уже сформованих у кровотоці згустків [26], однак вони також можуть розщеплювати і фібриноген, який присутній у кровотоці, тим самим чинячи антикоагулянтну дію [27]. На окрему увагу заслуговують ензими, специфічні насамперед до фібриногену, який циркулює у кровотоці. Обмежений протеоліз фібриногену такими ензимами зменшує здатність фібриногену до перетворення на фібрин та полімеризації, водночас не призводить до виведення фібриногену з кровотоку, що дозволяє частково гідролізованій молекулі виконувати свої інші фізіологічні функції [28, 29]. Ідея використання фібриногеназ як засобів зниження прокоагулянтного потенціалу наразі не знайшла широкої підтримки, однак продовжує обговорюватися у наукових роботах [30].

Можливість створення антитромботичних препаратів, які б направлено діяли на заключний етап тромбоутворення – полімеризацію фібрину – активно досліджується [31, 32]. Зокрема, для зменшення щільності фібринового полімеру пропонують використовувати наночастинки срібла [33] та пептиди-інгібітори (зокрема GPRP), кон'юговані з альбуміном [34].

У цьому ряду перспективними антитромботичними агентами видаються калікс[4]арени, як низькомолекулярні та потенційно неімуногенні сполуки непротеїнової природи, дія яких спрямована саме на взаємодії A:a центрів полімеризації фібрину [35]. При дослідженні дії калікс[4]арену C-145 *in vivo* при внутрішньовенному введенні було виявлено його значний антиполімеризаційний ефект.

1.2.2. Гепарини

Серед найпоширеніших антикоагулянтів прямої дії варто виділити гепарини, які застосовуються перентерально та у комплексі з антитромбіном III інгібують активність тромбіну та фактора Ха. Лікарський препарат гепарину є сумішшю глюкозаміногліканів гетерогенної полісахаридної природи (D-глюкозаміну і/або α -ідуронової чи D-глюктуронової кислот) [36].

Препарати гепарину введені в кровотік залишаються активними впродовж 4-6 годин. За цей період гепарин інактивується ензимом гепариназою, що продукується печінкою і нирками. Оскільки гепариназна активність крові хворих не визначається, при введенні гепарину необхідний ретельний контроль за показниками зсідання крові [37].

Зв'язування антитромбіну III із гепарином призводить до конформаційних змін у молекулі, які забезпечують більшу спорідненість антитромбіну III до тромбіну та інших факторів зсідання крові і, як наслідок, збільшують інгібувальні властивості антитромбіну в 1000 – 5000 разів [38].

Молекула гепарину містить у своєму складі велику кількість відновлених агентів, а тому має властивість зв'язуватися з вільними плазматичними протеїнами і форменими елементами крові. Так, гепарин має помірну спорідненість до фібриногену та протромбіну, що також вносить вклад у пригнічення прокоагулянтної активності плазми крові. Крім того, гепарин діє на інші фактори гемокоагуляції, зокрема IX, XI, Va та XII. Таким чином, дія гепарину поширюється фактично на всі ланки системи зсідання крові [39, 40]. Комплекси гепарину з адреналіном здатні перешкоджати перетворенню фібрин-мономеру в полімер і тим самим блокувати протромботичну здатність адреналіну [41]. Однак головним механізмом дії гепаринів на систему зсідання крові все ж є інгібування Ха та Па факторів зсідання крові.

Для інгібування Ха фактора зсідання крові достатньо низькомолекулярного гепарину, оскільки в комплексі [гепарин + АТIII + Ха] останній зв'язується лише із антитромбіном III (АТIII). Натомість, для інгібування тромбіну необхідно утворення потрійного комплексу із залученням не менш як 18 залишків сахаридів

у молекулі гепарину, що можливо при молекулярній масі порядку 5400 Da. В цьому випадку гепарин взаємодіє як з тромбіном, так і з антитромбіном, визначаючи формування потрійного комплексу [42, 43].

Таким чином, нефракціонований, або ж високомолекулярний, гепарин (ВМГ) рівною мірою інгібує як тромбін, так і фактор Ха. В той самий час, низькомолекулярний гепарин (НМГ) завдяки коротшому ланцюгу інгібує лише фактор Ха, який має найбільше значення на ранніх стадіях тромбоутворення.

Важливою ознакою НМГ є також його невисока здатність до сорбції на поверхні ендотелію судин та клітинах крові і взаємодії з протеїнами системи гемостазу. Тому НМГ значно рідше, ніж ВМГ призводить до тромбоцитопеній і не має інгібувального ефекту на фVa [44].

Найчастішим побічним ефектом терапії ВМГ є кровотечі [45]. Ще одним із побічних ефектів гепарину є гепарин-індукована тромбоцитопенія (ГІТ) [46]. Дослідження показали, що у більш як 8 % хворих, яким проводили гепаринотерапію, у кровотоці виявляються антитіла до гепарину, пов'язані з ГІТ. Механізм розвитку ГІТ обумовлений імунною відповіддю, антигеном для якої є комплекс фактору 4 тромбоцитів (ф4т) і гепарину [47]. В нормі ф4т – невеличка позитивно заряджена молекула, що знаходиться в α -гранулах тромбоцитів. Коли тромбоцити активуються, ф4т вивільняється в кровоток і частково сорбується на поверхні тромбоцитів. Комплекс антитіло-ф4т-гепарансульфат, що формується на негативно заряджених поверхнях, може активувати тканинний фактор і, таким чином, активувати каскад зсідання крові [48]. Саме тому при проведенні гепаринотерапії підрахунок кількості тромбоцитів здійснюють кожні чотири дні [49].

Гепарин також є важливим регулятором активності протеїну С (рС). У серинпротеїназному домені протеїну С розташовано гепарин-зв'язувальний сайт, який є важливим у гепарин-стимульованому інгібуванні рСа його інгібітором [50].

Таким чином, проведення гепаринотерапії вимагає постійного контролю за станом системи гемостазу. Гепарин має властивість зв'язуватися і утворювати стійкі комплекси з вільними протеїнами і форменними елементами крові, а отже може викривляти результати коагуляційних тестів. При цьому, чим більша

кількість протеїнів системи зсідання крові задіяна у діагностичному тесті, тим більшу похибку може вносити присутність гепарину. Приміром, поява у пробі фібринового згустку, який фіксується при проведенні тесту тромбопластиновий час, здійснюється опосередковано цілою низкою факторів системи зсідання крові, які в свою чергу активуються в присутності екзогенного тромбопластину (фактори IX, VII, X та ін.). Проведені дослідження показали значний вплив препаратів гепарину на результати даного тесту. Так, мінімальна кількість нефракціонованого гепарину, що вводиться в організм (5000 од.), призводить до зниження протромбінового індексу на 30 % [51].

1.2.3. Синтетичні інгібітори факторів каскаду зсідання крові

Усі ці недоліки та висока крос-селективність гепарину, а також необхідність перентерального введення, обумовили пошук нових ефективних засобів зниження прокоагулянтного потенціалу плазми крові. З цією метою було створено сполуки, які селективно інгібують активований фактор коагуляції X або тромбін [52]. Прямі інгібітори цих факторів коагуляції виявилися ефективними та безпечними. На сьогодні вони все більше застосовуються поряд із антикоагулянтами непрямой дії.

Успішність інгібіторів зсідання крові, дію яких спрямовано на тромбін, пояснюється тим, що саме цей ензим є ключовим в системі коагуляції завдяки здатності каталізувати перетворення фібриногену на фібрин і стимулювати активацію і агрегацію тромбоцитів, а фактор X об'єднує «зовнішній» і «внутрішній» шляхи коагуляційного каскаду і перетворює протромбін на активний ензим [53].

Синтетичні низькомолекулярні інгібітори тромбіну мають цілий ряд переваг перед антикоагулянтами, які використовують в клініці в даний час: це швидкість дії, висока ефективність, передбачувана фармакокінетика, відсутність необхідності постійного моніторингу стану гемостазу [54].

Найвідомішим прямим інгібітором активності тромбіну є дабігатран. Сьогодні на його основі створено декілька лікарських препаратів, які

застосовуються в клініці [55, 56]. Справді, інгібування тромбіну є одним з найочевидніших способів запобігання тромбоутворенню, однак є низка причин, чому інгібування фактора Ха може бути більш ефективним.

Активація системи зсідання крові призводить до утворення протромбіназного комплексу на клітинних мембранах. Фактор Ха, як частина цього комплексу, є єдиним ензимом, відповідальним за постійне утворення тромбіну в кровотоці. На відміну від тромбіну, який діє на різні протеїнові субстрати, включно з фібриногеном і PAR-рецепторами, фактор Ха має один фізіологічний субстрат, а саме протромбін [57, 58].

Фактор Ха є ключовою точкою «посилення» в коагуляційному каскаді: одна молекула фактора Ха генерує понад 1000 молекул тромбіну, тому безпосереднє інгібування фактора Ха, як спосіб непрямого інгібування утворення тромбіну, забезпечує потужний контроль утворення фібрину – основи тромбу. Перебуваючи в складі протромбіназного комплексу, фактор Ха має каталітичну активність в 10 разів вищу, ніж вільний ензим. Для досягнення антикоагулянтного ефекту необхідно пригнічувати значно меншу кількість фактора Ха, ніж тромбіну, що обумовлено різною концентрацією в крові їхніх зимогенів (1,4 μ M протромбіну проти 150 нM фактора X) [2, 3].

Непрямий доказ гіпотези про перевагу фактора Ха як терапевтичної мішені, в порівнянні з тромбіном, також можна знайти в клінічних випробуваннях для профілактики тромбозу глибоких вен. Було доведено, що фондапарин (антитромбін III-залежний інгібітор фактора Ха) за ефективністю антикоагулянтної дії перевершує низькомолекулярний гепарин [59].

На сьогодні препарати на основі інгібіторів фактора Ха використовують для профілактики внутрішньосудинного тромбоутворення за більшості серцево-судинних патологій. Ці препарати знижують ризик тромбоутворення, але в деяких випадках можуть призводити до кровотечі. Клінічні дослідження свідчать, що за показниками безпеки та ефективності їх можна порівняти з варфарином, однак на відміну від антикоагулянтів непрямої дії прямі антикоагулянти мають антидот, що робить їхнє застосування більш прийнятним [60, 61].

Перший пероральний інгібітор фактора Ха, ривароксабан, був схвалений у Сполучених Штатах Америки в 2011 році [62]. Інгібітори фактору Ха апіксабан і едоксабан схвалені і ще знаходяться в розробці (всі інгібітори фактора Ха мають суфікс «Ха-ban» [Ten-A-Ban], щоб позначити їх механізм дії).

У літературі є достатньо даних з розробки низькомолекулярних інгібіторів тромбіну і фактора Ха. Описано дослідження молекулярного моделювання, раціональне проектування і синтез нової серії карбоксилатних сполук бісфеніламідину, які є інгібіторами фактору Ха. Досліджено підходи до ефективного пошуку нових інгібіторів з використанням програмних рішень *de novo* і рентгенівської кристалічної структури фактора Ха [63].

Існують також спроби створення прямих інгібіторів факторів зсідання крові, розміщених у коагуляційному каскаді до протромбінази. Зокрема, основний компонент теназного комплексу – фактор Va – може бути заінгібований рекомбінантним аналогом протеїну C – дротекогіном [64]. При цьому такий препарат матиме окрім антикоагулянтної дії ще й протизапальні властивості. Уже зараз його пропонують для лікування сепсису [65, 66].

1.2.4. Інгібітори агрегації тромбоцитів

Механізми агрегації тромбоцитів. Агрегацію тромбоцитів визначають як процес взаємозв'язку між двома тромбоцитами. Після адгезії дископодібна форма тромбоцитів змінюється на сферичну. При цьому з гранул вивільняються агоністи, що активують тромбоцити (ADP, серотонін, тромбоксан A₂, адреналін, тромбін та ін.). В результаті потрапляння цих речовин у кровоток здійснюється механізм позитивного зворотного зв'язку, що проявляється в посиленні першочергової агрегації тромбоцитів з одночасним залученням в процес агрегації сусідніх неактивованих клітин. При пошкодженні ендотелію тромбоцити вступають в контакт з протеїнами субендотелію – колагеном, фактором фон Вілебранда, тромбоспондином, фібронектином та ін. [67].

Цитоплазматична мембрана ендотеліальних клітин синтезує тромбомодулін, який зв'язує тромбін, завдяки чому останній втрачає здатність до згортання, але

зберігає активуючий ефект на систему двох найважливіших антикоагулянтів – протеїну С і Z. Ендотеліальні клітини продукують тканинний активатор плазміногену, фіксують на своїй поверхні антикоагулянтний комплекс антитромбін III + гепарин, секретують фактор фон Віллебранда, фібронектин, який зв'язується з рецепторами елементів крові і ендотеліальних клітин, а також з фібрином, що сприяє зміцненню тромбу [68].

Виділяють первинну і вторинну фази агрегації. Первинна – зворотна агрегація: під впливом ADP тромбоцити скупчуються і утворюють пухкий тромбоцитарний корок, проникний для плазми крові. Тромбоцити з'єднуються один з одним фібриногеновими містками. Вторинна фаза – необоротна агрегація. В даному випадку тромбін, що до цього утворився, діє на рецептори тромбоцитів і призводить до їх руйнації і злиття в суцільну масу. Новоутворений тромбоцитарний корок є непроникним для плазми крові. Для нормальної агрегації тромбоцитів необхідні три умови: підвищена вірогідність контакту між двома тромбоцитами, наявність йонів кальцію і фібриногену. У випадку порушення однієї з умов агрегація тромбоцитів не відбувається. Нормальна плазма крові містить достатню для агрегації кількість кальцію та фібриногену, котрі містяться в гранулах тромбоцитів. Під час агрегації обидва компоненти вивільнюються і включаються в тромбоцитарний корок [69].

У випадку переродження судини агрегація тромбоцитів дуже суттєва для формування тромбоцитарного тромбу і для утворення паталогічного тромба біля місця розриву атеросклеротичної бляшки. До початкового контакту тромбоцитів з пошкодженою стінкою судини (адгезія) залучено багато адгезивних субстратів (фактор фон Віллебранда, колаген) і тромбоцитарних рецепторів (GPIIb-V-IX, GPIIbIIIa або $\alpha IIb\beta 3$, $\alpha 2\beta 1$). Взаємодія між зв'язаним з матриксом фактором фон Віллебранда і GPIIb в першу чергу слугує для скупчення тромбоцитів на площі пошкодження і, частково, передумовою для утримання інтегрин-опосередкованої клітини [70].

Традиційна модель агрегації тромбоцитів, в якій інтегрину GPIIbIIIa відводиться виняткова роль у взаємодії тромбоцит-тромбоцит, виглядає таким чином: введення антагоніста в суспензію тромбоцитів викликає активацію

GPIIb/IIIa, в результаті чого даний інтегрин набуває підвищеної спорідненості до фібриногену. Фібриноген зв'язується з тромбоцитами, що призводить до стабілізації агрегації. Фактор фон Вілебранда стає лігандом для активації тромбоцитів. Зв'язування його з GPIIb-V-IX викликає активацію тромбоцитів незалежно від введення індуктора. В той час як взаємодія фактора фон Вілебранда-GPIIbα необхідна для ініціації взаємодії тромбоцит-тромбоцит, незворотна агрегація тромбоцитів потребує вторинної адгезивної взаємодії між фактором фон Вілебранда і GPIIb/IIIa [71].

Адгезивно-агрегаційна функція тромбоцитів у значній мірі залежить від транспорту йонів кальцію в цих клітинах, а також від утворення із мембранних фосфоліпідів арахідонової кислоти і циклічних похідних простагландинів. При цьому в самих тромбоцитах утворюється потужний стимулятор агрегації і ангіоспазма – тромбоксан A₂, а в ендотеліальних клітинах – антиагрегант і вазодилататор – простациклін. При пошкодженні ендотелію починає переважати утворення тромбоксану. Цей дисбаланс між тромбоксаном і простацикліном різко підсилює агрегацію.

Основну роль в агрегації тромбоцитів відіграє глікопротеїн GPIIb/IIIa. У стані спокою фібриноген плазми крові не зв'язується з поверхнею тромбоцитів. Центри зв'язування фібриногену з рецепторами експонуються тільки після активації тромбоцитів; процес зв'язування сильно залежить від наявності йонів кальцію і не спостерігається при відсутності двухвалентних катіонів. Невеликі агрегати тромбоцитів формуються завдяки фібриногеновим місткам між двома сусідніми тромбоцитами, а також за участі міжклітинних взаємодій і перетворень обернених мікро- і макроагрегатів у незворотні структури [72].

Адгезія тромбоцитів призводить до їх активації. Неактивовані тромбоцити, що циркулюють у крові людини, містять у цитоплазмі багато неполімеризованого актину, а також гранул різного складу. За дії хімічних речовин, що зв'язуються з рецепторами на зовнішній стороні їх мембрани, наприклад колагену, тромбоцити активуються. Така активація – початковий етап згортання крові. На поверхні активованого тромбоциту вип'ячуються чисельні псевдоподії. У тромбоцитів, як і у більшості ядерних клітин, молекулярною основою утворення псевдоподій є

полімеризація актинових мікрофіламентів з розчинного актину. До мікрофіламентів приєднуються міозин та інші молекули. В результаті псевдоподії, як і у більшості клітин, стають скорочувальними, здатними прикріплюватися до різноманітних поверхонь, наприклад до колагенових волокон [73].

Активація тромбоцитів – складний процес, що регулюється: а) змінами в метаболічних і біохімічних механізмах; б) зміною форми тромбоцитів; в) активацією рецепторів поверхні тромбоцитів; г) зміною в орієнтації мембранних фосфоліпідів [74]. Зміни в орієнтації фосфоліпідів поблизу плазматичної мембрани створюють для активованої поверхні можливості асоціації на ній коагуляційних факторів і формування каталітичного протромбіназного комплексу. Це призводить до підвищеної секреції тромбіну і зміцнення кров'яного згустку за допомогою поперечної прошивки фібрину [75].

В подальшому тромбоцити активуються колагеном і першими порціями тромбіна, що утворюється в місцях пошкодження стінки судини. Продукти цих реакцій активують протеїнкіназу C, а також підвищують концентрацію кальція в цитозолі тромбоцитів. Окрім тромбіну активацію тромбоцитів викликають фактор агрегації тромбоцитів, ADP, що виділяються з клітини при їх пошкодженні, а також катехоламіни, серотонін та ін. Всі ці агенти мають специфічні рецептори на тромбоцитарній плазматичній мембрані. В результаті виникає ряд послідовних реакцій [76]:

1. Форма тромбоцитів змінюється, вони утворюють довгі псевдоподії.
2. На поверхні мембрани тромбоцита з рецепторів GPIIb і GPIIIa формується об'єднаний рецептор GPIIb/IIIa, з яким зв'язується фібриноген і інші адгезивні протеїни, внаслідок чого тромбоцити приклеюються один до одного.
3. З фосфоліпідів мембран вивільнюється арахідонова кислота, яка, окислюючись, утворює ряд похідних, в тому числі простагландин PGH₂ – кофактор активації тромбоцитів і тромбоксан A₂, який також здатен активувати тромбоцити.
4. Секретується ADP, котрий володіє здатністю активувати тромбоцити і залучати нові до утворення тромбу.

5. На поверхні тромбоцитів мембрани реорганізуються і відбувається експозиція фосфоліпідів, необхідних для подальшого утворення коагуляційних комплексів ензим-кофактор. Секреція тромбоцитарного фактора V з α -гранул тромбоцитів забезпечує ключовий компонент для формування одного з комплексів ензим-кофактор. В результаті утворюється додаткова кількість тромбіна, яка призводить до перетворення фібриногену на фібрин і утворення фібринових ниток, що радіально відходять від тромбоцитарного агрегату і сприяють формуванню тромбоцитарного тромба, який закриває судину.

6. Всередині тромбоцитів активується механізм скорочення тромбоцитарного актоміозина. Тромбоцитарний згусток зжимається, забезпечуючи більш ефективне прикріплення до місця пошкодження судини.

Стінка судини має неперервний шар ендотелію, котрий слугує бар'єром між тромбоцитами що циркулюють і субендотеліальним матриксом. У нормі клітини ендотелію щільно прилягають один до одного і слабо взаємодіють з клітинами, що циркулюють в крові [77]. Бар'єрна функція ендотелію порушується при його пошкодженні. При цьому на поверхні пошкодженого ендотелію експонуються протеїни, які включаються в процеси зсідання крові і запалення. Тромбін, що утворюється, викликає вивільнення цитокінів, вазоактивних агентів і факторів росту. Під їх дією фенотип ендотеліальних клітин змінюється з тромборезистентного на прокоагулянтний і запальний, внаслідок чого проензими зсідання крові перетворюються в активні протеїнази [78]. При цьому на поверхні субендотелію експонуються адгезивні протеїни, необхідні для розпізнавання і зв'язування своїх лігандів на моноцитах. Перший етап взаємодії тромбоцитів з субендотелієм відбувається за допомогою адгезивних рецепторів – GPIb-IX-V, які опосередковують рух і прилипання тромбоцитів біля місця пошкодження судини [79]. Далі рецептори колагену $\alpha 2\beta 1$ і GPVI беруть участь в адгезії і викликають активацію тромбоцитів, внаслідок чого з щільних гранул вивільнюється ADP, а з α -гранул – фібриноген, фактор V і P-селектин [80]. Компоненти гранул стимулюють коагуляційну відповідь в результаті експонування на поверхні тромбоцитів P-селектина [81]. Тромбоцити генерують також ліпідні медіатори, одним з яких є тромбоксан A₂. ADP діє на тромбоцити за допомогою рецепторів

P2Y₁ і P2Y₁₂, тоді як тромбоксан A₂ активує на поверхні тромбоцитів тромбоксан-простаноїдний рецептор. Вивільнюються компоненти щільних гранул, які підтримують подальшу активацію тромбоцитів і сприяють їх залученню до місця пошкодженої судини. Тромбоцити, що взаємодіють з цими посередниками, підлягають реорганізації актинового цитоскелету, внаслідок чого змінюють форму. З'являються псевдоподії, котрі формують комірчасту сітку тромбоцитів в тромбоцитарному корку. Крім цього експонуються тканинний фактор, що ініціює появу тромбіна. Тромбін активує тромбоцити за допомогою взаємодії рецепторів PAR-1 і PAR-4, а також перетворює фібриноген на фібрин, який стабілізує тромбоцити в фібриново-тромбоцитарному тромбі [82, 83].

Активацію тромбоцитів викликають колаген і низка розчинних агоністів (ADP, тромбін, тромбоксан A₂), взаємодіючи зі специфічними мембранними рецепторами. Ці рецептори зв'язані з G-протеїнами, котрі підсилюють активацію. Паралельно в комплексі зі специфічними рецепторами антагоністи інгібують процес активації тромбоцитів [84].

Взаємодія тромбоцитів з колагеном, фактором фон Вілебранда, ADP, тромбоксаном A₂ і тромбіном викликає внутрішньоклітинні сигнали, які ініціюють активацію рецептора фібриногену – інтегрину GPIIb/IIIa (α IIb β 3), внаслідок чого він зв'язується з фібриногеном. Утворюється поперечно зшиті агрегати, накопичення яких у місцях пошкодження судини призводить до зупинки кровотечі [85].

Адгезія тромбоцитів опосередкована структурово відмінними групами мембранних рецепторів, кожному з яких притаманні конкретні властивості, необхідні для виконання специфічних функцій при відповіді на пошкодження. Наприклад, при витoku крові через ушкоджену судину лейкоцити повільно рухаються до поверхні ендотелію внаслідок взаємодії лейкоцитарних глікопротеїнів з селектинами. Тромбоцити також переміщуються як на пошкоджену поверхню ендотелію, так і на поверхню судини. В останньому випадку переміщення відбувається шляхом взаємодії комплексу GPIb-V-IX з фактором фон Вілебранда на субендотелії. Процес переміщення може бути уповільнений клітинами крові: вони потрапляють до потрібного місця і

закріплюються завдяки регуляторній взаємодії між адгезивними рецепторами і будь-яким лігандом ендотеліальних клітин або адгезивних протеїнів матриксу [86].

Хоча адгезивні рецептори виправдовують свою назву, будь-яке тлумачення їх як клітинної зв'язки не зовсім коректне. Більшість з них, якщо не всі, беруть участь в контакті із зовнішнім і внутрішнім клітинним матриксом. При порушенні судинної системи тромбоцити стають доступними для компонентів екстрацелюлярного матрикса. Взаємодія тромбоцитів з цими протеїнами може бути прямою і опосередкованою, але принципово важливе значення має колаген.

Класи інгібіторів агрегації тромбоцитів. Таким чином, активація тромбоцитів є результатом багатьох сигналів, що надходять від різних рецепторів, кожний з яких вносить вклад у формування тромбоцитарного тромбу. Не дивно, отже, що саме тромбоцити є однією з головних мішеней антитромботичної терапії. Інгібітори агрегації тромбоцитів переважно спрямовано на певні етапи цього процесу і поділяються на групи залежно від мішеней інгібування.

Відомо антагоністи рецепторів P2Y₁₂, які активуються під дією ADP [87]. До таких препаратів належать трікагрелор, клопідогрел та прасутрел. Усі ці засоби широко застосовуються при захворюваннях, пов'язаних з внутрішньосудинним зсіданням крові, у тому числі за інфаркту міокарду [88].

Попри це, найпоширенішим інгібітором активації тромбоцитів лишається аспірин – інгібітор циклооксигенази [89]. Цим аспірин завдячує невисокій вартості та вичерпній інформації щодо можливих побічних ефектів, а насамперед – високій ефективності [90]. Однак, існує значна частина пацієнтів, що мають вроджену резистентність до аспірину, яку дуже важко передбачити [91, 92]. Тому пошук і розробка нових інгібіторів агрегації тромбоцитів триває.

Існують також інгібітори фосфодіестерази, які перешкоджають гідролізу cAMP та cGMP. Антишемічний потенціал виявили препарати цієї групи цилостазол [93] і дипірідамомол [94].

Іншою великою групою інгібіторів агрегації тромбоцитів є антагоністи GPIIb/IIIa рецепторів, або ж дезінтегрини. Для збирання та активації

глікопротеїнового комплексу рецептора фібриногену GPIIb/IIIa на поверхні тромбоцитів є необхідним внутрішньоклітинний сигнал, який індукується зовнішнім сигналом (ADP, колаген, тощо) і реалізується через G-протеїни [95,96]. Між афінною та неафінною формами GPIIb/IIIa існує алостерична рівновага [97,98]. Афінна форма здатна зв'язувати фібриноген та підтримувати агрегацію. На цьому етапі зв'язування фібриногену з GPIIb/IIIa є зворотнім [99]. Взаємодія фібриногену з GPIIb/IIIa спричинює експонування ліганд-індукованих ділянок зв'язування, які залучено до процесу агрегації тромбоцитів – антитіла до цих ділянок інгібують агрегацію тромбоцитів [100]. Багатоточкове зв'язування фібриногену та GPIIb/IIIa призводить до незворотної міжмолекулярної взаємодії [101], а також призводить до кластеризації рецепторів на поверхні тромбоцитів та запуску сигналіngu, який викликає посилення активації тромбоцитів. Завершальним етапом взаємодій фібриногену та GPIIb/IIIa є ретракція (ущільнення) фібриново-тромбоцитарного тромбу [102].

Основним класом антагоністів GPIIb/IIIa-рецепторів є RGD-вмісні протеїнові препарати [103]. Однак, слід відзначити, що з їх допомогою не можна заінгібувати взаємодію тромбоцитарних рецепторів та фібриногену, яка найефективніше здійснюється завдяки С-кінцевому додекапептиду γ -ланцюга молекули фібриногену. Розробки RGD-вмісних препаратів тривають [104]. Зокрема це є актуальним питанням тому, що дезінтеgrини є потенційними антипроліферативними агентами, запобігаючи адгезії ракових клітин. Деякі з них були успішно випробувані на моделях канцерогенезу у лабораторних тварин [105].

Що ж до інгібування агрегації тромбоцитів, перспективними є препарати, створені на основі антитіл до GPIIb/IIIa рецепторів. Зокрема абциксимаб використовується за ішемічної хвороби серця [106]. Активним інгібітором агрегації тромбоцитів виявилася синтетична гетероциклічна сполука тирофібан.

Таким чином, можна визначити основні мішені, дія на які призводить до інгібування процесу тромбоутворення: фібрин(оген), фактори каскаду зсідання крові та 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 каскаду чи механізму, так і декількох механізмів. 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. 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.

1.3. 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 екстрасудинного тромбоутворення (зупинка кровотечі) 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.

На першому способі ґрунтується єдиний дієвий антидот проти кровотеч за передозування ліків чи за вроджених патологій зсідання крові – трансфузія [107, 108]. Переливати пацієнту можна кров, тромбоцитарну масу, плазму крові, однак найефективнішим є застосування протромбінового концентрату, що містить у своєму складі висолені з плазми крові людини вітамін К-залежні фактори зсідання

крові [109]. Поруч із ним застосовують також рекомбінантні або очищені з плазми крові активовані фактори коагуляції [110].

Неспецифічні та високоселективні агенти, що активують коагуляцію, розглянемо окремо.

1.3.1. Неспецифічні активатори каскаду коагуляції

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 [111]. Відповідно активувати ці механізми можливо, використовуючи неспецифічні фізіологічні активатори: для зовнішнього шляху зсідання крові – тромбoplastин, для внутрішнього – речовини, що мають негативно заряджені поверхні.

Тромбoplastин – препарат, отримуваний із тканин різного походження (найчастіше мозку), що володіє прокоагулянтною активністю і здатен за лічені секунди призвести до зсідання донорської плазми крові. До складу препарату входять мієлінові оболонки, окремі мембрани та навіть органели клітин. Коагуляційну активність препарату тромбoplastину обумовлює тканинний фактор [112].

Тканинний фактор є мембранним глікопротеїном молекулярною масою 45 кДа, що міститься в мембранах ендотеліальних та гладеньком'язових клітин, а також у мембранах моноцитів та макрофагів і завжди функціонує виключно у комплексі з фосфоліпідною матрицею. Молекула тканинного фактора має три домени: гідрофільні E- та C-домени і гідрофобний домен, представлений у мембранній фазі.

В процесі пошкодження зовнішньої клітинної мембрани втрачається нормальний асиметричний розподіл ліпідів між її зовнішньою та внутрішньою поверхнями. Разом із цим на поверхні ушкодженої клітини з'являється тканинний фактор, який за участі йонів Ca^{2+} одразу ж формує комплекс із фактором VII, активуючи його. Зв'язаний із ліпідною мембраною, цей комплекс переводить у

дієву форму фактори IX і X. Крім цього, важливою є здатність тканинний фактор до утворення регуляторних комплексів, зокрема потрійного комплексу з VIIa і антитромбіном III, а також комплексу з інгібітором шляху тканинного фактора – TFPI та факторами Xa і VIIa [113].

Між тим, важко уявити застосування тканинного фактора природного походження як прокоагулянтного агенту. Тканинний фактор можна отримати рекомбінантний, однак як трансмембранний протеїн, він потребуватиме ліпідної матриці.

Тому тканинний фактор і не розглядають як основу для створення препаратів з прокоагулянтною дією. А ось речовини та біоматеріали, здатні запускати контактну систему активації, досить поширені в біомедицині.

Яскравим прикладом таких препаратів є каолін-вмісні речовини [114]. Зокрема, найпоширеніший у клінічній практиці АЧТЧ-тест виконується із використанням реагенту, що містить каолін та елагову кислоту [115]. Активація калікреїн-кінінової системи призводить до генерації теназного та протромбіназного комплексу і, зрештою, до появи тромбіну [116]. Помірна активація цього механізму має місце в тій чи іншій мірі при контакті крові з будь-якою негативно зарядженою поверхнею [117].

Як бачимо, 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 може мати вплив на ефективність тромбоутворення [118].

1.3.2. Активатори фактора X

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 ефективна, порівняно з потужною хвилеподібною дією каоліну чи

тромбопластину. На ділі достатньо активними прокоагулянтами можуть бути активатори ензимів заключних ланок каскаду коагуляції – протромбіну та фактора X.

Активатори фактора X зсідання крові знайдено у складі отрути змії родин *Viperidae* та *Crotalidae*, а також у складі отрути деяких представників роду *Elapidae*. Серед них є як серинові протеїнази, так і металопротеїнази [119]. Найвідомішим активатором фактора X є RVV-X з отрути гадюки Рассела (*Daboia russelli*), який знайшов застосування у клінічній лабораторній діагностиці [120]. Ця металопротеїназа складається з важкого ланцюга, що формує каталітичний домен, і двох легких ланцюгів, які мають гомологію з C-лектинами [121].

Активатор фактора X було описано зокрема у складі отрути пустельної кобри (*Walterinnesia aegyptia*) та гюрзи (*Vipera lebetina*) [122, 123, 124]. Усі вони активують проензим безпосередньо, незалежно від присутності фосфоліпідів, що відрізняє механізм їхньої дії від механізму дії тенаси. Однак, їх ніколи не пропонували для застосування як індукторів коагуляції.

1.3.3. Активатори протромбіну

Активація протромбіну видається найбільш перспективним способом стимулювання тромбоутворення, оскільки призводить до генерації внутрішньосудинного тромбіну, який у свою чергу не лише перетворює розчинний фібриноген на нерозчинний фібрин, але і викликає його ковалентну стабілізацію. Щоправда, відомо способи зупинки локальної кровотечі шляхом застосування безпосередньо екзогенного тромбіну, який покликаний відразу запускати процес зсідання крові, перетворюючи фібриноген на фібрин з його подальшою полімеризацією і формуванням тривимірного каркасу тромбу. Проте, екзогенний тромбін може бути заінгібованим ендogenousними антикоагулянтними протеїнами, зокрема антитромбіном, та втратити свою активність. Крім того, екзогенний тромбін може бути внесений у поверхню рани одноразово лише в обмеженій кількості, яка не буде достатньою для забезпечення ефективної зупинки кровотечі.

Активатори ендogenous протромбіну позбавлені цих недоліків та можуть бути застосовані для локальної зупинки кровотечі. Перспективними агентами, здатними безпосередньо активувати протромбін, є ензими отрути змій. Серед ензимів зміїної отрути, що здатні активувати протромбін виділяють фактор X-подібні та екарин-подібні. Фактор X-подібні ензими активують протромбін через стадію претромбіну 2, розщеплюючи зв'язок Arg274-Thr275 і утворюючи фрагмент 1,2. Отримують такі ензими з отрути австралійських елапід. Екарин-подібні ензими розщеплюють у молекулі протромбіну зв'язок Arg320-Phe321 з утворенням мезотромбіну, який перетворюється на α -тромбін через стадію мезотромбіну [125].

До останньої групи активаторів протромбіну належить, зокрема, екарин, який отримують з отрути *Echis carinatus* з роду *Viperidae*. Ця металопротеїназа знайшла широке застосування у клінічній практиці і є комерційно придатним препаратом завдяки можливості отримання високоочищеної фракції ензиму, що дозволяє провести його детальну біохімічну і біофізичну характеристику [126, 127]. Аналогом екарину є екамулін – ензим, який виділяють із отрути близького до *Echis carinatus* виду, що мешкає в середній Азії – *E. multisquamatis* [128, 129].

Нефізіологічні активатори протромбіну активують усі форми протромбіну, навіть ті, що не могли б бути активованими за фізіологічним шляхом активації. Активація протромбіну екамуліном та екарином відбувається через стадію утворення проміжного продукту – мезотромбіну, при розщепленні зв'язку Arg320-Phe321 без вивільнення пептиду. Мезотромбін, в свою чергу, автокаталітично перетворюється на мезотромбін 1 (при розщепленні зв'язку Arg 156-Ser157), а потім і на α -тромбін [130].

Хоча екамулін та екарин мають подібні функції та є компонентами отрути близьких видів змій, в їх структурі є значні відмінності. Так, екарин – одноланцюговий глікопротеїн із молекулярною масою 63 kDa, 17 % маси якого складає вуглеводний компонент. Натомість екамулін при SDS електрофорезі дає дві смуги з молекулярними масами 67 kDa і 27 kDa, при цьому найвищу коагуляційну активність мають фракції, що містять обидва ці компоненти в

рівних співвідношеннях. Компонент масою 27 кДа містить два ланцюги (13 кДа, 14 кДа). Ізоелектрична точка екамуліну становить 4,3-4,5 [131].

Активатор протромбіну з отрути *E. multisquamatis* – екамулін – слугує для визначення вмісту протромбіну і виявлення його функціонально неактивних форм. Цей тест, що отримав назву ‘екамуліновий час’, ґрунтується на здатності екамуліну активувати як протромбін, так і його функціонально неактивні форми – декарбоксильований протромбін, що утворюється при дефіциті вітаміну К, та претромбін. Останній з’являється в кровотоці під дією тромбіну і є одним з маркерів внутрішньосудинного зсідання крові.

1.3.4. Тромбіноподібні ензими

Ще однією альтернативою застосування екзогенного тромбіну для припинення екстрасудинної кровотечі є застосування тромбіноподібних ензимів. Їхнім головним джерелом так само є отрута змій [132].

Серед тромбіноподібних ензимів отрути змій відносно широке застосування у клінічній практиці для дефібринування та лабораторної діагностики знайшли анкрод (тромбіноподібний ензим із отрути *Colloselasma rhodostoma*) та батроксобін (*Bothrops moojeni*) [133]. Ці ензими належать до класу серинових протеїназ. Діючи за схожим механізмом, вони, на відміну від тромбіну, відщеплюють лише один з фібринопептидів – А [134]. Крім того, тромбіноподібні ензими, на відміну від тромбіну, не мають здатності активувати фактор XIII зсідання крові, внаслідок чого ініціюють формування непрошитого ковалентно, а отже нестабільного, фібринового згустку з низькою щільністю та міцністю.

В останні роки було запропоновано використання гемокоагулази – аналога рептилази – для зупинки локальних кровотеч [135, 136, 137]. Було відзначено ефективність такого кровоспинного агента і його здатність ініціювати утворення desA фібрину. Порівнюючи перспективу застосування активаторів протромбіну та тромбіноподібних ензимів, слід надати перевагу першим, оскільки вони а) призводять до активації ендogenous протромбіну з необмеженим потенціалом

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

1.3.5. Трансглутаміназа

Завершальним етапом формування тромбу є ковалентна стабілізація фібрину фактором XIIIa – фізіологічною трансглутаміназою, яка активується тромбіном. У людини описано дев'ять видів трансглутаміназ, які відіграють важливу роль у підтриманні гомеостазу та мають значення при розвитку певних патологічних процесів. Трансглутамінази відносяться до ензимів, які каталізують утворення ковалентних ізопептидних зв'язків між глютамільними та лізиновими залишками протеїнів [138].

Ідея підвищення ефективності екстрасудинного тромбоутворення шляхом застосування трансглутаміназ полягає у стабілізації ендогенних фібринових полімерів та прошивці їх із прилеглими тканинами. Запропоновано посилювати тромбоутворення фактором XIIIa системи зсідання крові або його аналогами з трансглутаміназною активністю [139]. Проте, хоча такі ензими і діють на завершальному етапі зсідання крові, здійснюючи ковалентну стабілізацію полімерного фібрину, вони не здатні ініціювати перетворення фібриногену на фібрин з подальшою його полімеризацією та формуванням тривимірного каркасу тромбу, тому не можуть слугувати основою для створення ефективних гемостатиків .

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. МАТЕРІАЛИ

2.1.1. Реагенти

Акриламід, біс-акриламід, бензамідин («Sigma», США); ЕДТА («Serva», США), суміш протеїнів – маркерів молекулярної маси для електрофорезу («Fermentas», Європейський союз); Q-Sepharose, Sephacryl S₂₀₀, Superdex G-75, («Pharmacia», Швеція), PD-10, BrCN-Sepharose (Amersham biosciences, Швеція); хромогенні субстрати S2238 D-Phe – Pip – Arg – pNA·2 HCl, S2366 pуроGlu – Pro – Arg – pNA·2 HCl, S2765 D-Arg – Gly – Arg – pNA·2 HCl, S2302 D-Pro – Phe – Arg – pNA·2 HCl «Chromogenix» (Швеція), SDS («Bio-Rad Laboratories», США), отрута гадюки Рассела – RVV («Sigma», США), тромбін («Merck», Німеччина), ADP («Merck», Німеччина); тромбопластин, АЧТЧ тест-набір реахром протеїн С, ліофілізована плазма крові донорів («Ренам», Росія); трис («Диа-М», Росія), діагностичний набір для вивчення агрегації тромбоцитів («Технология-Стандарт», Росія); гепарин (5000 МО/мл Фарма Лайф, ТОВ, м. Львів, Україна), варфарин («Фарма Старт», м. Київ, Україна), планшети для імуноензимного аналізу (Linbro, США), активовані вуглецеві волокнисті сорбенти АУВМ-«Днепр»-МН, питома адсорбційна поверхня яких складала не менш 1800 г/см² (Броварський завод порошкової металургії, Україна), марля медична за ДСТУ 9412-9, пробірки для плазмоліфтингу («PLASMOLIFTING®», Росія), крем Емла 5% («Ресифарм карлскога АБ», Швеція).

Решта використаних реактивів – вітчизняного виробництва категорії х.ч.

2.1.2. Цільна кров

Цитратну плазму крові донорів або піддослідних тварин отримували згідно [140]. Кров брали з вени гострою сухою голкою з великим діаметром, без шприца (для запобігання гемолізу). При заборі крові перші 5–6 крапель відкидали. У поліетиленову пробірку дозатором вносили 3,8 % розчин цитрату натрію та

змішували з кров'ю у співвідношення 1:9. Пробірку з сумішшю щільно закривали і повільними рухами обережно декілька разів перемішували (не струшуючи).

2.1.3. Плазма крові

Осадження формених елементів крові проводили центрифугуванням протягом 10 хв з прискоренням 1400 g. Плазму крові (супернатант) переносили у поліетиленову пробірку. Зберігали плазму крові при температурі -20 °С.

2.1.4. Фібриноген

Фібриноген одержували з плазми крові людини шляхом висолювання 16 % сульфатом натрію за методом, який було розроблено у відділі структури та функції білка. Вміст фібриногену, здатного до полімеризації під дією тромбіну, становив 95-98 %. Чистоту препарату перевіряли електрофоретично.

2.1.5. Збагачена тромбоцитами плазма крові (ЗТПК)

Збагачену тромбоцитами плазму крові отримували центрифугуванням цільної цитратної крові (3,8% розчин цитрату натрію змішували з кров'ю у співвідношенні 1:9) при 300 g протягом 15 хв.

2.1.6. Відмиті тромбоцити

Відмиті тромбоцити людини отримували шляхом гель-фільтрації збагаченої тромбоцитами плазми крові на Sepharose 2В за методом [141]. Популяцію тромбоцитів, яка частково містила активовані тромбоцити, отримували за механічної стимуляції тромбоцитів шляхом триразового ресуспендування і осадження (при 340 g впродовж 15 хв) відмитих тромбоцитів людини.

2.1.7. Концентрована суспензія тромбоцитів

Осадження формених елементів крові проводили центрифугуванням протягом 30 хв з прискоренням 200 g. Збагачену тромбоцитами плазму крові (супернатант) переносили у поліетиленову пробірку та повторно центрифугували

20 хв з прискоренням 450 g. Концентровану суспензію тромбоцитів аутологічної плазми крові отримували, ресуспендуючи осад в плазмі крові.

2.1.8. Ензимний активатор зсідання крові

Ензимний активатор зсідання крові отримували з цільної отрути за допомогою хроматографії на Q-Sepharose, як описано [142].

2.1.9. Колагенові губки

Технологія створення гемостатичної колагенової губки ґрунтується на методі сублімаційної (ліофільної) сушки тонкого шару колагену. В процесі ліофілізації кристалів замороженої води в глибокому вакуумі можна отримати губку, яка має велику кількість пор.

Промисловий препарат колагену прогрівали до +40 °С на водяній бані протягом 20 хв при постійному перемішуванні. Таким чином, робили розведення отриманого колагену фізіологічним розчином для досягнення оптимальної плинності, необхідної для утворення рівномірного шару. До колагену додавали розчин ензимного активатора зсідання крові, перемішували та наносили на рівну поверхню з розрахунку 0,1 г/см².

Підготовані таким чином зразки заморожували при температурі -20°С від 2 до 12 годин. Ліофілізацію проводили під вакуумом з використанням ліофільної сушки LyoQuest (Іспанія) протягом 6-8 годин. Висушені зразки колагенової матриці легко відділяли від поверхні та зберігали у герметичних пакетах при кімнатній температурі.

Отримані нами колагенові губки не розчиняються у спирті та воді, вони здатні поглинати 6,0-8,0 г фізіологічного розчину на 1 г ліофілізованого препарату колагену.

2.2. МЕТОДИ

2.2.1. Йонообмінна хроматографія

Йонообмінну хроматографію проводили на хроматографічній системі низького тиску Akta Prime (GE Healthcare Life Sciences, США). Використовували іонообмінну хроматографію на Q-Sepharose. Швидкість нанесення та елюції – 1 мл/хв.

2.2.2. Гель-фільтрація

Хроматографію, що розділяє за розміром, проводили на хроматографічній системі низького тиску Akta Prime (GE Healthcare Life Sciences, США). Використовували для цього Superdex G-75. Швидкість нанесення та елюції – 1 мл/хв.

2.2.3. Агрегатометрія

Агрегацію тромбоцитів вивчали в збагаченій тромбоцитами плазмі крові людини людини (200-300 тис тромбоцитів/мкл). Перед дослідженням агрегації проводили скринінгову оцінку агрегації тромбоцитів донорів. При виявленні гіпоагрегації збагачену тромбоцитами плазму крові не використовували. Агрегатометрію виконували в перші три години після забору крові на фотооптичному агрегометрі “SOLAR AP2110” згідно [140].

В кювету агрегометру вносили 430 мкл ЗТПК і 20 мкл 0,025 М CaCl_2 та інкубували *ex tempore* 5 хв. при температурі 37°C. Агрегацію тромбоцитів ініціювали внесенням одного з індукторів агрегації тромбоцитів: ADP (у концентрації 12,5 та 10 μM), колагену (2 мкг/мл) та адреналіну (0,8 та 0,6 мкг/мл). Процес агрегації реєстрували протягом 10 хв. в режимі роботи без нормування результатів вимірів за початковим рівнем світлопропускання.

Оцінювали ступінь агрегації – максимальний рівень світлопропускання ЗТПК після внесення індуктора агрегації; швидкість агрегації – швидкість зміни

світлопропускання ЗТПК після внесення індуктора агрегації за перші 30 с; час агрегації – час досягнення максимального ступеню агрегації. Для колаген-індукованої агрегації вимірювали тривалість lag-фази.

2.2.4. Цитометрія

Активацію тромбоцитів вивчали цитофлуориметричним методом з використанням протокового цитофлуориметра COULTER® EPICS™ XL™ Flow Cytometer, який являє собою систему для якісного і кількісного визначення біологічних та фізичних властивостей клітин. В ході експерименту реєстрували два типи світлорозсіювання: пряме, що характеризує розмір клітин, та бічне, яке характеризує щільність цитоплазми клітини, тобто гранулярність тромбоцитів [143]. В пробірку для протокового цитофлуориметра вносили 1 мл відмитих тромбоцитів людини і CaCl_2 до кінцевої концентрації 0,0001 М. У суспензію тромбоцитів додавали фібриногеназу з отрути *E. multisquamatis* в 0,05 М трис-НСІ буфері, рН 7,4, який містив 0,13 М NaCl у концентрації 0,007 мг/мл. Тромбоцити інкубували при температурі 25°C впродовж 90 хв. Параметри активації тромбоцитів, зміну розміру та гранулярності тромбоцитів фіксували за зміною величини прямого та ортогонального світлорозсіювання [143].

2.2.5. Електрофорез у поліакриламідному гелі

Чистоту отриманих препаратів контролювали електрофоретично за методом Лемлі, в якому використовували трис-гліцинову систему на приладі для вертикального гель-електрофорезу у пластинках 10% ПААГ [144].

Зразки для електрофорезу готували наступним чином: до розчину протеїну з концентрацією 1 мг/мл додавали буфер для зразків, що містив 5% сахарозу або гліцерин, 2% SDS та бромфенол до появи забарвлення. Зразки нагрівали до кипіння. Для відновлення дисульфідних зв'язків зразки попередньо обробляли 5% β -меркаптоетанолом протягом 10 хв. Розділення проводили при електричному струмі 19 мА для концентруючого гелю і 36 мА для розподільного.

Проявлення гелю для виявлення ділянок, що містять протеїни, проводили забарвленням у фарбуючому розчині (0,125% Кумассі G-250 в 25% ізопропанолі та 10% оцтової кислоти) протягом 10 хвилин. Для видалення залишків барвника використовували 2–8% розчин оцтової кислоти. Роздільна здатність методу 1 мкг білка.

Для встановлення молекулярної маси протеїнів використовували суміш протеїнів з відомими молекулярними масами (Fermentas, Європейський союз): № SM0671 (170; 130; 100; 72; 55; 40; 33; 24; 17 кДа) та № SM0431 (116; 66,2; 45; 35; 25; 18,4; 14,4 кДа). Для якісної та кількісної оцінки протеїнового складу зразків проводили денситометрію ПААГ з використанням пакету TotalLab v2.01.

2.2.6. Денситометрія електрофореграм

Отримані електрофореграми аналізували у програмі TotalLab TL100 (Phoretix) для визначення молекулярної маси протеїнових фракцій і відсотковий розподіл протеїну між зонами.

2.2.7. Турбідиметрія

Турбідиметричний аналіз проводили шляхом реєстрації світлорозсіювання фібриновим згустком, що утворювався у спектрофотометричній кюветі. Вимірювання проводили на спектрофотометрі-2000 (Росія) за довжини хвилі 350 нм.

2.2.8. Мас-спектрометрія

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) [145].

2.2.9. Ультразвукове дослідження шкіри

Ультразвукове дослідження шкіри (УЗД) проводили з використанням апарату для УЗД SKINSCANNER DUB CUTIS 22 с датчиком 22 МГц. Визначали товщину шкіри разом, дерми та епідерміса окремо, щільність шкіри разом, дерми та епідерміса окремо. Виміри проводили диференційовано шкіри чола, підборіддя, лівої та правої щоки.

2.2.10. Методи лабораторної діагностики

Визначення протромбінового часу (ПЧ). У скляну конічну пробірку вносили 0,1 мл плазми крові, що досліджується, і прогрівали 1 хв при температурі 37°C. Після цього додавали 0,1 мл тромбoplastину і 0,1 мл 0,025 М розчину хлориду кальцію і визначали час зсідання плазми крові, помірно струшуючи пробірку у водяній бані при температурі 37°C. Час зсідання плазми крові донорів в тесті ПЧ становив 18 ± 2 с [146]. Результати цього тесту можна представити наступним чином:

- протромбіновий індекс (відношення часу зсідання плазми крові донорів до часу зсідання плазми крові, що досліджується, у відсотках);
- міжнародне нормалізоване відношення (МНВ - відношення часу зсідання плазми крові, що досліджується, до часу зсідання плазми крові донора у ступені, що дорівнює міжнародному індексу чутливості тромбoplastину).

Визначення вмісту протромбіну за допомогою хромогенного субстрату. Активацію протромбіну проводили з використанням ензимного активатора зсідання крові або тромбoplastину. Ензиматичну активність утвореного в тесті тромбіну визначали за розщепленням тромбін-специфічного хромогенного субстрату S2238 (H-D-Phe-Pip-Arg-pNA). Для цього 10 мкл плазми крові донорів вносили в інкубаційне середовище, додавали 10 мкл 0,025 М хлориду кальцію, 10 мкл активатора, 195 мкл 0,05 М трис-НСl буферу, рН 7,4 з вмістом 0,13 М NaCl, 25 мкл 2 мМ хромогенного субстрату S2238. Інкубацію проводили при

температурі 37 °С впродовж 10 хв. Кількість розщепленого субстрату визначали спектрофотометрично за довжини хвилі 405 нм на мікропланшетному спектрофотометрі Thermo Multiskan EX Фінляндія [147].

Результати протромбінового тесту з використанням хромогенного субстрату виражали у вигляді протромбінового відношення (ПВ) згідно з формулою:

$$\text{ПВ} = (\text{A}_{\text{П}}/\text{A}_{\text{Д}})^{\text{МІЧ}}$$

де: $\text{A}_{\text{П}}$ – амідолітична активність плазми крові пацієнта під дією тромбoplastину; $\text{A}_{\text{Д}}$ – амідолітична активність плазми крові донорів під дією тромбoplastину; МІЧ – Міжнародний Індекс Чутливості препарату тромбoplastину.

Результати тесту з використанням активатора зсідання крові (АВ) та хромогенного субстрату виражали аналогічно до ПВ, однак без урахування МІЧ, згідно з формулою:

$$\text{АВ} = (\text{A}_{\text{П}}/\text{A}_{\text{Д}}),$$

де: $\text{A}_{\text{П}}$ – амідолітична активність плазми крові пацієнта під дією активатора зсідання крові; $\text{A}_{\text{Д}}$ – амідолітична активність плазми крові донорів під дією активатора зсідання крові.

Визначення часу зсідання плазми крові в тесті активований частковий тромбoplastиновий час (АЧТЧ). У скляну конічну пробірку вносили 0,1 мл плазми крові, що досліджується, і додавали 0,1 мл реагента АЧТЧ. Суміш прогрівали 3 хв при температурі 37°С. Після цього додавали 0,1 мл 0,025 М розчину хлориду кальцію і визначали час зсідання плазми крові, помірно струшуючи пробірку у водяній бані при температурі 37°С. Час зсідання плазми крові донорів в тесті АЧТЧ 45±5 с .

Дослідження активації факторів зсідання крові під дією ензимного активатора зсідання крові. 1 варіант – з використанням тромбін-специфічного хромогенного субстрату S2238 (H-D-Phe-Pip-Arg-pNA). Активацію факторів зсідання крові визначали в суміші, що складалася з 0,01 мл плазми крові донорів, 0,015 мл S2238, 0,01 мл розчину CaCl_2 (0,025 М) з 0,01 мл активатору зсідання

крові в 0,05 М трис-НСІ буфері рН 7,4. Загальний об'єм реакційної суміші складав 0,25 мл. Швидкість розщеплення субстрату визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 405-495 нм на рідері Multiscan EX.

2 варіант – з визначенням часу зсідання плазми крові за присутності активатора зсідання крові. У скляну конічну пробірку вносили 0,1 мл плазми крові, що досліджується, і прогрівали 1 хв при температурі 37 °С. Після цього додавали 0,1 мл 0,025 М хлориду кальцію та 0,1 мл розчину активатора. Ретельно перемішували, і визначали час зсідання плазми крові, помірно струшуючи пробірку у водяній бані при температурі 37°С. Концентрацію активатора встановлювали таку, щоб час зсідання плазми крові донорів становив 30±2с.

Визначення концентрації фібриногену. Концентрацію фібриногену в плазмі крові визначали спектрофотометрично з використанням тромбіноподібного ензиму анцистрон-Н, виділеного з отрути щитомордника звичайного (*Agkistrodon halys halys*). Анцистрон-Н, на відміну від тромбіну, дозволяє коректно визначати вміст фібриногену в плазмі крові при гепаринотерапії, а також при накопиченні інгібіторів зсідання крові [2].

Визначення вмісту розчинних фібрин-мономерних комплексів (РФМК). Для визначення вмісту РФМК у конічну пробірку з 0,25 мл цитратної плазми крові, що досліджується, вносили 0,25 мл 0,1 М КН₂РО₄-NaOH буферу, рН 7,5 із 0,065 М хлоридом натрію, 0,2% ε-амінокапроною кислотою, 0,1 % цитратом натрію і перемішували. Після цього додавали 0,4 мл 1 М КН₂РО₄-NaOH буферу, рН 7,5, перемішували і витримували 30 хв при температурі 22 °С. Результати оцінювали візуально. Для кількісної оцінки використовували наступну шкалу:

Візуальна оцінка	Оцінка	Рівень РФМК, г/л
відсутність видимого помутніння	–	0
чітке помутніння	+	0,03
нитки	++	0,06
пластівці	+++	0,09
гелеподібний осад	++++	0,15

Визначення загального гемостатичного потенціалу. Гемостатичний потенціал плазми крові визначали спектрофотометрично на рідері Titertec Multiscan MC (Фінляндія) реєстрацією поглинання світла при 405 нм фібриновим згустком, що утворювався в лунках полістиролових мікропланшетів для ІФА. В лунки послідовно вносили 0,05 М HEPES буфер, рН 7,4, що містив 0,15 М NaCl і 5 мМ CaCl₂, 70 мкл плазми крові і rt-PA в кінцевій концентрації 75 ІУ/мл. Загальний об'єм реакційної суміші – 300 мкл. Утворення і руйнування згустка в плазмі крові відбувалося за присутності реагента АЧТЧ (індуктор згортання) і тканинного активатора плазміногена (rt-PA). Аналіз експериментальних кривих проводили за допомогою спеціалізованої комп'ютерної програми.

2.2.11. Моделі *in vivo*

Визначення антитромботичної дії С-145. Для внутрішньовенного введення калікс[4]арену С-145 препарат розчиняли у 0,9 % розчині NaCl для отримання концентрації 15 мг/мл і вводили у крайову вену вуха кролів з розрахунку 7,5 мг/кг із застосуванням канюлі Венфлон (Becton Dickinson, США) розміром G22 (0,8 мм). Забір крові проводили через вказаний катетер: до введення препарату та через 2, 4 і 24 години після його одноразової ін'єкції. Кролів утримували у віварії Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України на стандартному раціоні.

Оцінка кровоспинної дії універсального гемостатичного засобу на моделі паренхіматозної кровотечі. Для експериментальної оцінки дії гемостатичного адсорбційного перев'язувального засобу використовували модель паренхіматозної кровотечі у щурів. Операції проводили на білих нелінійних щурах масою 200±20 г розводки віварію ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького НАН України. Під загальною анестезією (внутрішньом'язове введення кетаміну у дозі 75 мг/ кг) проводили верхньосерединну лапаротомію: ліву латеральну долю печінки виводили та виконували крайову клиноподібну резекцію долі, а розміром (1,5x0,5) см та масою 0,18±0,06 г.

Для визначення кровоспинної дії гемостатиків в умовах порушення процесу зсідання крові за проведення антитромботичної терапії щурам першої групи (n=18) за 4 хвилини до резекції печінки внутрішньовенно вводили гепарин у дозі 300 ОД на 1 кг маси тіла, а щурам другої групи (n=18) протягом 2 діб перед початком експерименту за допомогою зонду вводили 1,5 мл водного розчину варфарину з розрахунку 0,1 мг на 1 кг маси тіла.

До утвореної рани, що кровоточить, прикладали наступні кровоспинні засоби: марля медична за ДСТУ 9412-9, активований вуглецевий волокнистий матеріал АУВМ та активований вуглецевий волокнистий матеріал АУВМ, модифікований активатором зсідання крові.

Хірургічне втручання супроводжувалось паренхіматозною кровотечею, інтенсивність якої оцінювали за часом кровотечі. Проводили ретельний збір усієї крові, що витікала з рани, зважували та визначали крововтрату, яку виражали у відсотках відносно маси тіла кожної тварини.

Оцінка кровоспинної дії універсального гемостатичного засобу на моделі відтворення кровотечі з каротидної артерії щурів. Досліди проводили на 15 щурах лінії Wistar, отриманих із віварію Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, середня вага тварин становила $240,5 \pm 15,5$ г (вік тварин - 5 місяці \pm 1 тиждень). Тварин, утримуваних на стандартному харчовому раціоні, було розподілено на групи. У 5 тварин (контрольна група) відтворювали кровотечу з каротидної артерії та накладали вугільний матеріал із ензимним активатором зсідання крові. Тварини дослідної групи (10 тварин) протягом 2 діб отримували перорально варфарин в дозі 0,1 мг на 1 кг маси тіла один раз на добу. Експериментальну кровотечу відтворювали через 24 години після останнього введення препарату.

Усі види кровоспинних засобів (матеріалів) притискали до рани через 2-3 секунди спонтанної кровотечі з лівої каротидної артерії та утримували протягом 3 хвилин за допомогою зажиму. Після цього зажим знімали і проводили ретельний збір усієї крові, що витікала з рани, із наступним зважуванням та вираховуванням крововтрати, яку нормалізували за масою кожної тварини та виражали у

відсотках. Протягом усього експерименту проводили визначення кардіо-гемодинамічних показників на вихідному рівні одразу після припинення притискання матеріалу до рани (0 хв), через 10 та 20 хв за наступною методикою.

Стандартний 2F катетер для реєстрації тиску (SPR-838; Millar Instruments, Houston, TX) калібрували за об'ємом шляхом занурення його до калібрувальної кювети (P/N 910-1048), залитою кров'ю щура з додаванням гепарину. Тварин анестезували за допомогою уретану (1,5 г/кг маси), фіксували на операційному столі, робили розріз шириною 2-3 см, розширювали операційну рану і препарували праву сонну артерію. На наступному етапі через праву сонну артерію ретроградно вводили катетер у лівий шлуночок (ЛШ) серця щура для запису показників кардіогемодинаміки в умовах закритої грудної порожнини за допомогою програмного забезпечення Chart™ v.5.4.2 (ADInstruments, Millar Instruments, Houston, TX). Співвідношення тиску-об'єму ЛШ аналізували за допомогою пакету програм PVAN 3.6 (ADInstruments, Millar Instruments, Houston, TX). Зауважимо, що розрахунки вели, враховуючи початкові й повторні показники калібрування катетера приладу MPVS 400 Systems.

Оцінка тромбоутворюючої дії гемостатичних засобів на моделі Zebrafish. Zebrafish (*Danio rerio*) є однією з найкращих моделей для вивчення токсикологічних досліджень. Ця крихітна риба є універсальним модельним організмом для багатьох галузей досліджень через її легке утримання, розведення та прозоре тіло під час раннього розвитку.

Ензимний активатор додавали в середовище в концентраціях 0,25; 0,5; 1; 1,5 мг/мл.

2.2.12. Плазмоліфтинг суспензією аутологічних тромбоцитів

Ін'єкцію плазми крові, збагаченої тромбоцитами, проводили за місцевого знеболення. Знеболювання забезпечували місцевою аплікацією крему Емла 5% впродовж 20 хв. 4 мл плазми крові, збагаченої тромбоцитами, вводили внутрішньшкірно, розділяючи на окремі ін'єкції:

Зона обличчя	чоло	щоки	параорбітальна	середня	підборіддя
Кількість ін'єкцій	200	250 на кожену сторону			50

2.2.13. Проліферація ендотеліоцитів

Проліферацію ендотеліоцитів вивчали на лінії ендотеліоцитів свині (PAE), люб'язно наданій д-ром І.Т. Гутом (Лондонський університет). Клітини культивували за стандартних умов при 37 °С, 5% CO₂ та 100% вологості з калікс[4]ареном C-145 або калікс[тіа-4]ареном C-145S (в концентрації 300 μМ) протягом 2 діб в середовищі DMEM (Sigma, США) та 10% ETC (Sigma, США). Визначення вмісту апоптичних клітин та розподіл згідно фаз клітинного циклу проводили методом цитометрії як описано [148].

2.2.14. Метод «заростання подряпини»

Дослідження рухливості клітин методом «заростання подряпини» у клітинному моношарі. Для проведення експериментів клітини лінії H1299 висівали у 6-лункові планшети і вирощували до 80% конфлюенту в середовищі DMEM, що містило 10% FBS. Через 24 год після висівання наносили подряпину у клітинному моношарі. Подряпину робили за допомогою носика на 10 мкл до автоматичних піпеток. Після цього середовище культивування замінювали на свіже, що містило 50 мкг/мл нативного фібриногену або ж фібриногену desBβ(1-42)₂ у тій же концентрації. Через 24 год ефективність заростання подряпини аналізували за допомогою фазово-контрастного мікроскопа. Відстань, на яку мігрували клітини, вимірювали за допомогою програмного забезпечення QuickPHOTO Camera 2.2. Кількість клітин, які мігрували, обчислювали за допомогою програмного забезпечення ImageJ software. Досліди проводили на багатолункових планшетах різного типу пластику Costar та TPP (Sigma).

2.2.15. Статистична обробка даних

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 ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

РОЗДІЛ 3. ДІЯ ЕКЗОГЕННИХ ТА ЕНДОГЕННИХ ЕФЕКТОРІВ НА ТРОМБОЦИТИ

3.1. КОМПОНЕНТИ СИСТЕМИ ЗСІДАННЯ КРОВІ ТА ЇХНІ ФРАГМЕНТИ

3.1.1. Продукти деградації фібриногену-фібрину

Високомолекулярні фрагменти фібриногену/фібрину здатні інгібувати як агрегацію тромбоцитів, так і зв'язування фібриногену з тромбоцитами. Інгібування забезпечується, з одного боку, зв'язуванням високомолекулярних фрагментів фібриногену з рецепторами тромбоцитів, а з іншого – утворенням надмолекулярних комплексів з фібриногеном. Пептиди, що відщеплюються від фібриногену, також можуть інгібувати агрегацію тромбоцитів виключно за рахунок взаємодій з самим фібриногеном.

При багатьох патологіях поряд зі збільшенням концентрації фібриногену та накопиченням розчинного фібрину спостерігається поява продуктів плазмінового розщеплення фібриногену-фібрину – D, E та DD фрагментів. Найбільший інтерес становлять D-димер та DD-E комплекс, оскільки їх поява у кровотоці викликана розщепленням стабілізованого фібрину плазміном, отже, є наслідком активації як системи зсідання крові, так і фібринолізу.

Відомо, що D-фрагмент фібриногену містить в своєму складі RGD мотив, представлений Arg-Gly-Asp-послідовністю в ділянці γ 409-411), що є потенційним сайтом зв'язування з GPIIb/IIIa-рецепторами тромбоцитів.

В ході роботи використовували плазму крові збагачену на тромбоцити та відмиті тромбоцити людини. Агрегацію тромбоцитів досліджували за присутності 12,5 μM ADP на агрегометрі SOLAR AP2110 (Білорусь) Активацію тромбоцитів досліджували на протоковому цитометрі COULTER® EPICS™ XL™ Flow Cytometer. В ході експерименту використовували ортогональне та фронтальне світлорозсіювання для характеристики щільності (гранулярності) цитоплазми

тромбоцитів і оцінки розміру та форми клітини та клітинних агрегатів відповідно. Ортогональне світлорозсіювання також може бути використане для виявлення активації тромбоцитів.

Попередні дослідження показали, що DD-фрагмент не змінює розмір та гранулярність тромбоцитів. В той же час E₁-фрагмент фібрину, викликав збільшення розміру та зниження гранулярності тромбоцитів в порівнянні з контролем, що свідчило про їхню активацію.

Крім того, дослідження на модельних системах *in vitro* показали, що один з фрагментів фібрину, а саме E-фрагмент, має спорідненість до молекули протромбіну і індукує амідолітичну та зсідуючу активність в препаратах протромбіну, причому процес є концентраційно залежним. В еквімолярному комплексі протромбіну з E-фрагментом фібрину відбувається конформаційна перебудова молекули протромбіну з формуванням активного центру без розщеплення поліпептидного ланцюга. Вивчення неензиматичної активації протромбіну в присутності E-фрагменту має теоретичне значення з точки зору вивчення молекулярних механізмів активації проензимів систем зсідання крові та фібринолізу, а також практичне значення для прогнозування розвитку тромботичних ускладнень та контролю ефективності антитромботичної терапії.

Для перевірки гіпотези участі послідовностей E₁-фрагменту в неензиматичній активації протромбіну було отримано тромбоцити, позбавлені компонентів плазми крові, які було ресуспендовано у плазмі крові донорів та у плазмі крові, дефіцитній за протромбіном.

Дослідження процесу агрегації тромбоцитів за присутності продуктів деградації стабілізованого фібрину показало, що DD-E комплекс не впливає на швидкість та ступінь агрегації тромбоцитів. В той же час за присутності E-фрагменту значно підвищується ступінь активації тромбоцитів (рис. 3.1).

В другій модельній системі (відмиті тромбоцити+плазма крові, дефіцитна на протромбін) не виявлено підвищення ступеню агрегації тромбоцитів за присутності фрагментів фібрину (рис. 3.2).

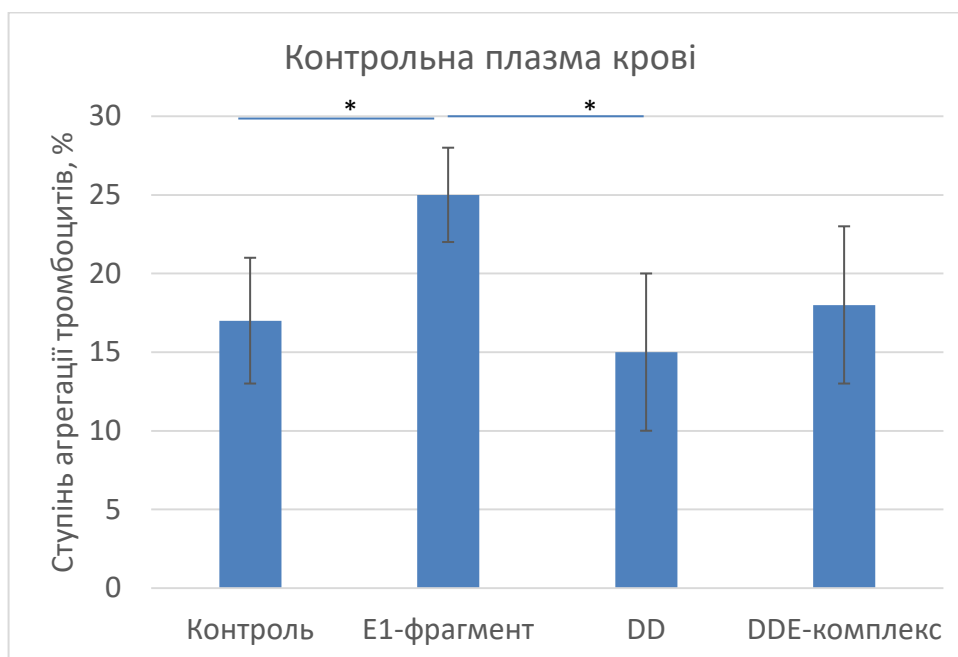


Рис. 3.1. Ступінь агрегації тромбоцитів в плазмі крові людини за присутності продуктів деградації фібрину. * – $p \leq 0,05$, $n = 5$.

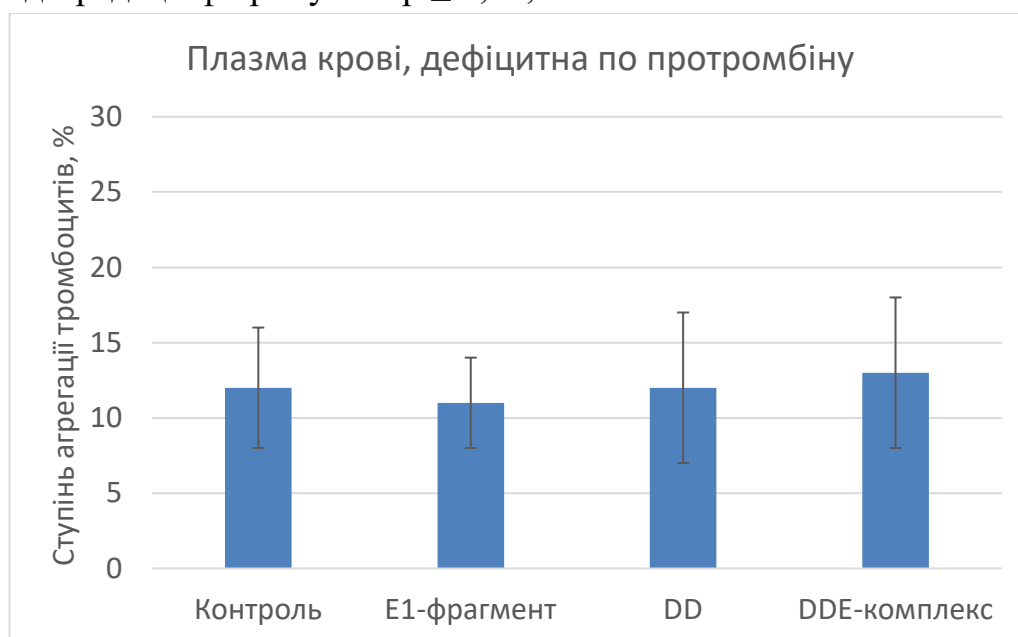


Рис. 3.2. Ступінь агрегації тромбоцитів в плазмі крові людини, дефіцитній на протромбін, за присутності продуктів деградації фібрину. * – $p \leq 0,05$, $n = 5$.

Методом протокової цитометрії показано, що E_1 -фрагмент фібрину викликає збільшення розміру та зниження гранулярності тромбоцитів в порівнянні з контролем, що свідчить про їхню активацію (рис. 3.3).

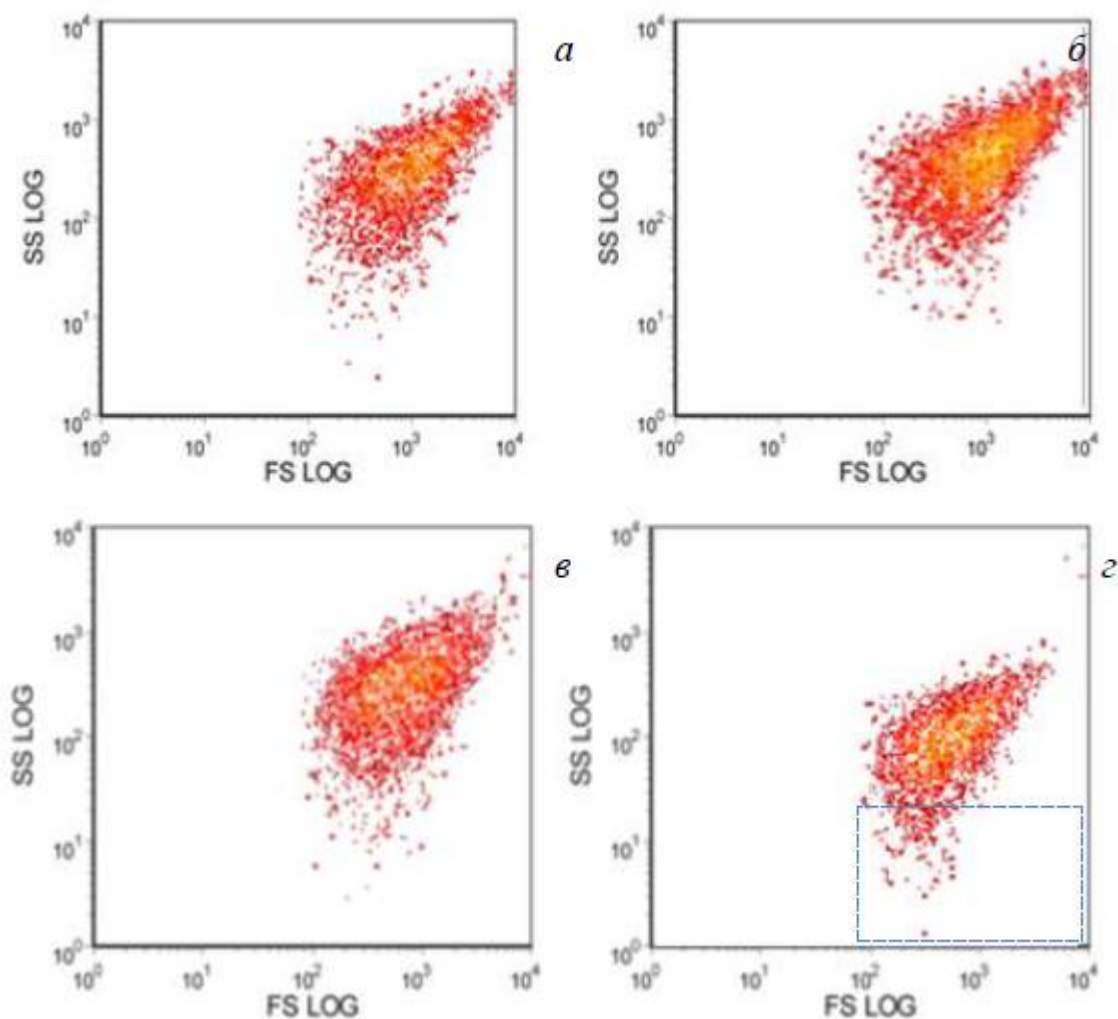


Рис. 3.3. Вплив E_1 -фрагменту на розмір та гранулярність відмитих тромбоцитів людини. FS – пряме світлорозсіювання тромбоцитів, що характеризує їх розмір, SS – бічне світлорозсіювання тромбоцитів, що характеризує гранулярність їх цитоплазми. $n = 5$.

Ресуспендовані тромбоцити в плазмі крові людини, позбавленої протромбіну: (а) – контроль, (б) – за присутності E_1 -фрагменту.

Ресуспендовані тромбоцити в плазмі крові людини: (в) контроль, (з) – за присутності E_1 фрагменту.

Таким чином, показано, що за присутності E_1 -фрагменту фібрину в плазмі крові відбувається неензиматична активація протромбіну, наслідком якої є активація та підвищення ступеню агрегації тромбоцитів.

Виявлена генерація тромбінової активності у плазмі крові за присутності фрагментів фібриногену/фібрину є фактором ризику та може призводити до порушення бар'єрної функції ендотелію.

3.1.2 Розчинні фібрин-мономерні комплекси

Відомо, що важливий внесок у внутрішньосудинне тромбоутворення робить тромбоцитарна ланка гемостазу, оскільки саме функціональна спроможність тромбоцитів значною мірою обумовлює швидкість та інтенсивність формування фібриново-тромбоцитарного згустку. Остаточо не з'ясовано, чи впливає накопичення розчинних фібрин-мономерних комплексів (РФМК) в плазмі крові на стан тромбоцитів, зокрема на процес їхньої агрегації.

Встановлено, що накопичення РФМК в плазмі крові хворих з гострим інфарктом міокарду (ГІМ) супроводжується збільшенням ступеню агрегації тромбоцитів у діагностичному тесті. Дослідження цих показників в динаміці на тлі гепаринотерапії показало, що зниження вмісту РФМК в плазмі крові хворих на ГІМ відбувалось водночас з нормалізацією процесу агрегації тромбоцитів. В той же час, після відміни гепаринотерапії мала місце “рикошетна” реакція – підвищувався вміст РФМК та зростала швидкість агрегації тромбоцитів, що свідчило про зростання гемокоагуляційного потенціалу і загрозу ретромбозу.

Ці спостереження було перевірено у модельній системі. Зокрема ми перевірили вплив РФМК на процес агрегації тромбоцитів *in vitro*. Багату тромбоцитами плазму крові донорів ділили на дві частини, в одну додавали екзогенний фібрин-мономер в концентраціях, які відповідали вмісту РФМК в плазмі крові хворих з загрозою внутрішньосудинного зсідання крові. Потім на агрегометрі AP2110 досліджували процес агрегації тромбоцитів, індукованої ADP.

Виявилось, що за присутності екзогенного розчинного фібрин-мономеру достовірно зростали швидкість та ступінь агрегації тромбоцитів (таблиця 3.1).

Крім того за зазначених умов істотно змінювався характер агрегаційної кривої. Крива агрегації тромбоцитів, індукованої ADP (12 μM), в нормі має двохфазний необоротний характер. Після внесення фібрин-мономеру вона змінювалась на однофазну необоротну. Крива агрегації тромбоцитів, індукованої низькою концентрацією ADP (2,5 μM), в нормі є оборотною з дезагрегацією, а за присутності фібрин-мономеру вона була необоротною двох- або однофазною.

Таблиця 3.1

Показники агрегації тромбоцитів плазми крові донорів, індукованої АДФ (2,5 μ M), 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 \pm 3,13	79,4 \pm 3,29*
Швидкість агрегації, %/хв	52,0 \pm 2,61	61,5 \pm 2,51*
Час агрегації, с	375,5 \pm 18,2	387,9 \pm 15,6

* – $p < 0,05$ у порівнянні зі станом “до внесення фібрин-мономеру”.

Такі зміни характеру процесу агрегації також підтверджують активацію тромбоцитів. Узагальнюючи результати проведених досліджень, можна стверджувати, що присутній в плазмі крові розчинний фібрин виконує роль катализатора, який безпосередньо прискорює процеси агрегації тромбоцитів та зсідання плазми крові і може розглядатися як маркер гіперкоагуляції. Накопичення в плазмі крові РФМК свідчить про порушення динамічної рівноваги в системі гемостазу (як у функціонуванні плазменної, так і клітинної ланок) та фібринолізу, і є загрозою розвитку тромботичних ускладнень.

3.1.3. В β N-домен фібрин(оген)у

Фібрин(оген) забезпечує нормальний перебіг агрегації тромбоцитів, утворюючи місточки між активованими тромбоцитами, одночасно зв'язуючись з GРІІbІІІа-рецепторами кількох тромбоцитів. Для вивчення ролі В β N-домену фібриногену в агрегації тромбоцитів було розроблено моделі, які склалися з тромбоцитів, позбавлених компонентів плазми крові, ресуспендованих у буфері, нативного фібриногену та фібриногену desВ β (15-42)₂. Останній отримували шляхом спрямованого протеолізу фібриногену фібриногеназою з отрути ефі багатолускової, як описано у [149]. Вивчали агрегацію тромбоцитів у обох

системах за допомогою агрегатометрії та оцінювали вплив на її перебіг відсутності у фібриногену $V\beta N$ -домену.

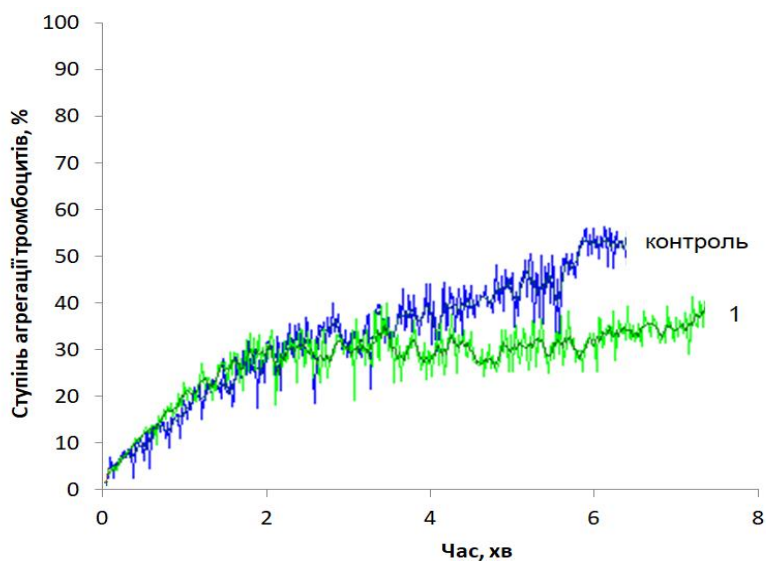


Рис. 3.4. Типова крива ADP-індукованої агрегації тромбоцитів за присутності нативного фібриногену (контроль) або фібриногену $desV\beta(1-42)_2$ (1). $n = 5$.

Причиною дезагрегації тромбоцитів у системі з фібриногеном $desV\beta(15-42)_2$, показаної на рис. 3.4, може бути порушення наступних стадій взаємодії фібриногену з тромбоцитами. Зокрема, взаємодії фібриноген- $GP_{IIb/IIIa}$ індукують структурні зміни $GP_{IIb/IIIa}$ та експонування на їхній поверхні ліганд-індукованих ділянок зв'язування [150, 151, 152]. Крім того, фібриноген, як поліафінна для $GP_{IIb/IIIa}$ молекула, здатен зв'язуватися із кількома інтегринами одночасно, що призводить до кластеризації останніх [153, 154, 155]. Обидва ці процеси викликають збільшення афінності $GP_{IIb/IIIa}$ до фібриногену та індукують клітинну відповідь, спрямовану на поглиблення активації тромбоцитів та запуск $GP_{IIb/IIIa}$ -залежного сигналіngu «ззовні-всередину». З іншого боку, такий феномен також може бути пов'язаний з порушенням власне сполучення фібриногену з $GP_{IIb/IIIa}$ -рецепторами тромбоцитів.

Вочевидь, для зв'язування фібриногену з його рецептором має значення також конформація αC -регіонів, які у нативному фібриногені зв'язані з $V\beta N$ -доменом. $V\beta N$ -домен підтримує структуру молекули, взаємодіючи з αC -доменами за участю фібринопептидів В. У форми фібриногену, позбавленої $V\beta N$ -доменів, αC -регіони відходять від остову молекули та частково втрачають свою нативну

конформацію [156]. Тому фібриноген $\text{desA}\alpha(505-610)_2$ було використано у якості контрольної проби, як фібриноген, що має нативні $\text{V}\beta\text{N}$ -домени і відсутні С-кінцеві ділянки αC -регіонів. Таку форму фібриногену отримували як описано у [157].

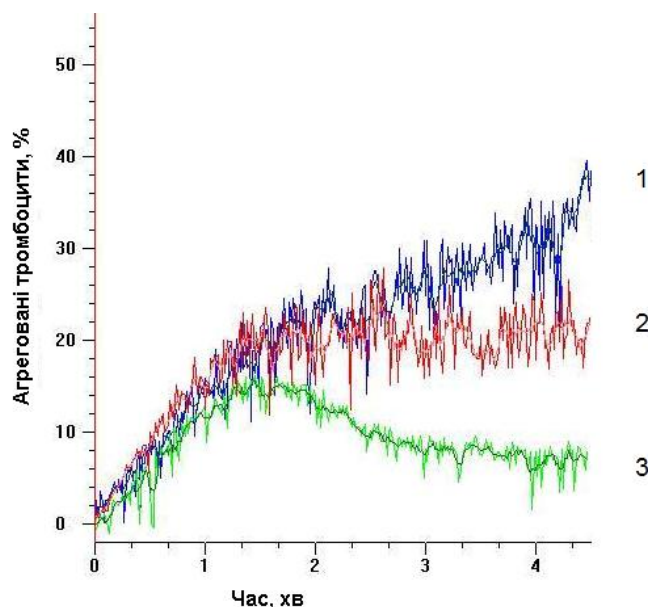


Рис. 3.5. Типові криві ADP-індукованої агрегації тромбоцитів за присутності нативного фібриногену (1) та фібриногену $\text{desV}\beta(1-42)_2$ (2) або фібриногену $\text{desA}\alpha(505-610)_2$ (3). $n = 5$.

Порівняння агрегації тромбоцитів за присутності досліджуваних форм фібриногену показало, що як фібриноген $\text{desV}\beta(1-42)_2$, так і фібриноген $\text{desA}\alpha(509-610)_2$ менш ефективно підтримують агрегацію тромбоцитів, порівняно з контрольним фібриногеном, однак у випадку фібриногену $\text{desA}\alpha(509-610)_2$ такий ефект є чіткіше вираженим. Зокрема, фібриноген $\text{desV}\beta(1-42)_2$ знижує ступінь агрегації тромбоцитів з $35 \pm 4\%$ у контролі до $21 \pm 7\%$, а фібриноген $\text{desA}\alpha(509-610)_2$ — до $12 \pm 5\%$ (рис. 3.5).

Таким чином, ефект зниження ступеня агрегації тромбоцитів за присутності фібриногену, позбавленого $\text{V}\beta\text{N}$ -доменів, імовірно, пов'язаний з участю цього домену в стабілізації структури комплексу з αC -регіонами фібриногену.

На молекулі фібриногену існує шість основних сайтів зв'язування з тромбоцитарними інтегринами: додекапептид на С-кінцях обох γ -ланцюгів ($\gamma 400-411$) і RGD-послідовності α -ланцюгів ($\alpha 95-98$, $\alpha 572-574$) [158]. Отже, одна із RGD-

послідовностей ($\alpha 572-574$), важлива, але не критична для зв'язування тромбоцитів з фібриногеном, присутня у αC -регіонах. Даний факт підтверджує наші висновки про опосередковану участь $B\beta N$ -доменів у агрегації тромбоцитів.

Послідовності $B\beta N$ -домену фібриногену та фібрину безпосередньо взаємодіють з рецепторами ендотеліоцитів: VE-кадгерином та VLDLP-рецептором [159]. Показано проліферацію ендотеліальних клітин і фібробластів на фібрині desAB та стимуляцію ним капіляроутворення у культурі ендотелію [160]. Метою роботи було вивчення проліферації ендотеліоцитів пуповинної вени людини (HUVES) на фібринових покриттях, залежно від наявності у фібрині $B\beta N$ -домену, за кількаразового пасажування клітин.

Було отримано дві форми мономерного фібрину за модифікованою методикою Varetskaia: фібрин desAB ($\alpha 17-610$; $B\beta 15-461$; $\gamma 1-411$) отримували дією на фібриноген тромбіну, а фібрин desAB $\beta(15-42)_2$ ($\alpha 17-610$; $B\beta 43-461$; $\gamma 1-411$) – за паралельної дії на фібриноген тромбіну і фібриногенази з отрути ефі багатолускової (*Echis multisquamatis*).

Поверхню чашки для культивування вкривали фібрином у кількості 35 мкг/см². Для цього фібрин-мономер розчиняли у 0,125 % оцтовій кислоті у концентрації 386 мкг/мл та вносили у чашки Петрі діаметром 35 мм, додавали 0,1 М NaH₂PO₄ (PBS) у співвідношенні 1:1 до розчину фібрину інкубували при кімнатній температурі протягом години, видаляли розчин та промивали тричі PBS. В якості контролю клітини вирощували в чашках Петрі із необробленим пластиком та вкритих колагеном I типу. За вказаний час увесь фібрин повністю зв'язувався з поверхнею у вигляді олігомерів та протофібрил фібрину.

Показано, що час подвоєння клітин лінії HUVES при культивуванні на фібрині desAB був стабільний протягом усього дослідження. Водночас, при культивуванні на фібрині desAB $\beta(15-42)_2$ спостерігали зростання значень часу генерації з кожним наступним пасажуванням: від $1,76 \pm 0,8$ на початкових пасажах до $3,85 \pm 0,1$ на 4-ому та 5-ому (рис. 3.6).

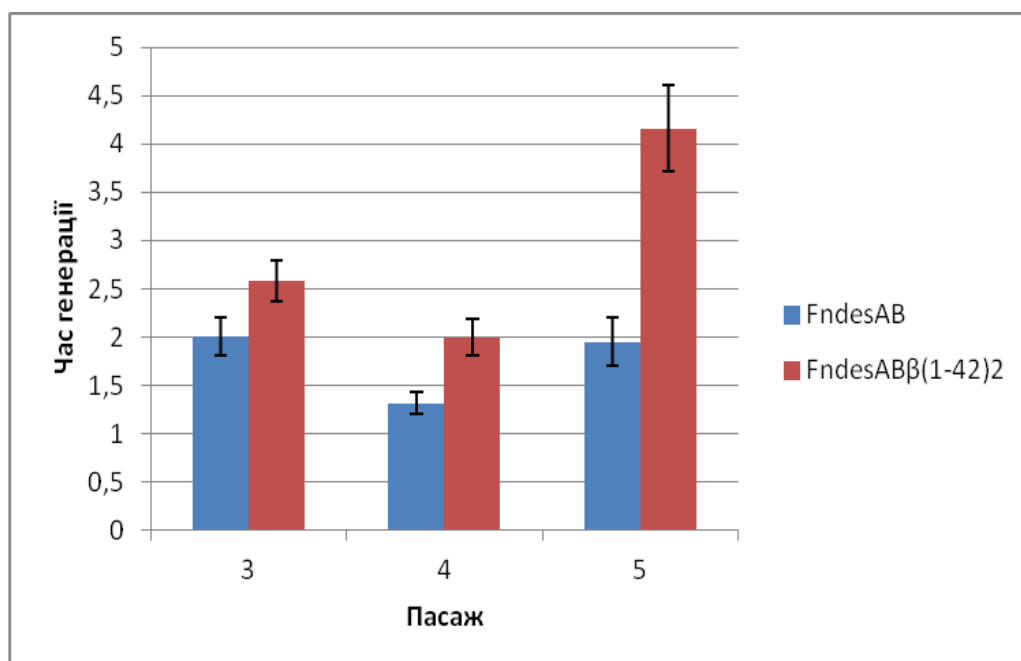


Рис. 3.6. Час подвоєння ендотеліальних клітин пуповинної вени людини на покриттях з фібрину desAB та desABβ(15-42)₂

Таким чином, відсутність послідовностей Bβ(15-42) у фібрині desABβ(15-42)₂ призводила до зниження проліферативної здатності клітин, культивованих на такому фібрині, втричі. Це свідчить про те, що взаємодія ендотеліоцитів з Bβ(15-42) відіграє регуляторну роль під час їхньої проліферації. Дані про участь Bβ(15-42) у проліферації ендотеліоцитів важливі для вивчення механізмів васкуляризації, атерогенезу та можуть стати підґрунтям для розробки протизапальних препаратів.

Взаємодія фібриногену та фібрину з клітинами є важливою складовою механізмів проліферації клітин, особливо за умов канцерогенезу, метастазування, тощо.

Відтак, вивчення особливостей взаємодій фібриногену-фібрину з переродженими клітинами є важливою складовою вивчення процесу канцерогенезу.

Було проведено дослідження проліферації ракових клітин лінії H1299 за присутності фібриногену в тесті «заростання подряпини». Після формування моношару в культурі клітин здійснювалась стандартна подряпина, після заміни поживного середовища клітини інкубували протягом доби за присутності чи за відсутності фібриногену або ж фібриногену desBβ(1-42)₂. Порівнювали кількість

клітин, що мігрували в уражену зону в контролі та при експозиції 50 мкг/мл фібриногену.

У ході експерименту було показано, що на чашках Costar клітини мігрують у зону ураження вдвічі ефективніше за присутності нативного фібриногену, ніж у контролі або ж за присутності фібриногену $\text{desB}\beta(1-42)_2$ (рис. 3.7).

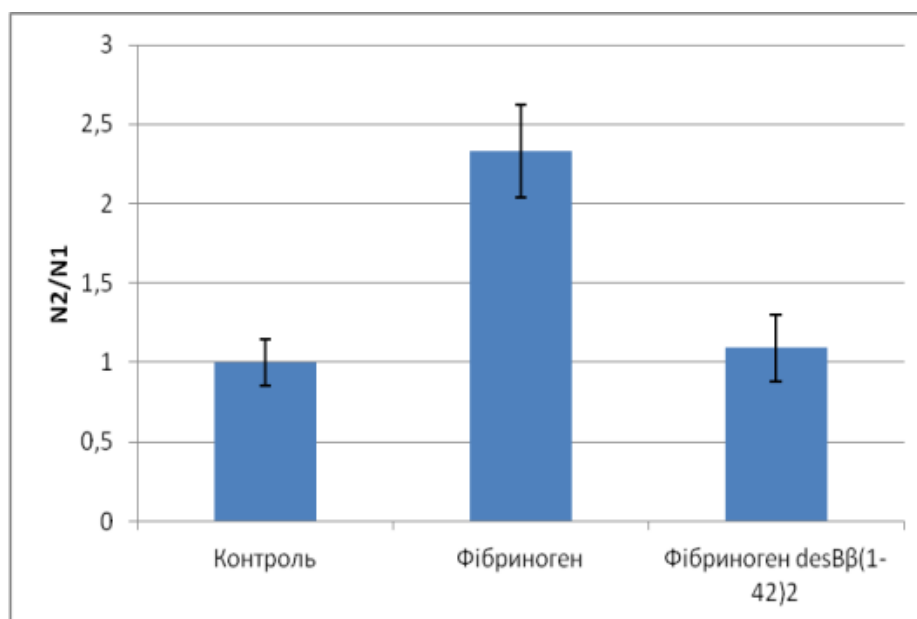


Рис. 3.7. Інтенсивність міграції клітин H1299 у тесті «заростання подряпини» за присутності контрольного фібриногену або фібриногену $\text{desB}\beta(1-42)_2$ у кількості 50 мкг/мл. Використано чашки Costar, поверхня яких має негативний заряд.

N1 – кількість клітин, що мігрували у зону заростання подряпини за 1 добу без додавання фібриногену (контроль). N2 – кількість клітин, що мігрували у зону заростання подряпини за 1 добу з додаванням фібриногену.

Оскільки чашки Costar мають гідрофобну та негативно заряджену поверхню, можна припустити, що звільнені від фібриногену ділянки пластику (подряпина) сорбували фібриноген опосередковано D-регіонами, які мають переважно позитивний заряд. N-кінці ланцюгів, розташовані у E-регіоні фібриногену, таким чином, були експоновані для зв'язування мігруючих клітин.

Водночас, на чашках TPR, що мають позитивно заряджену поверхню, спостерігали міграцію клітин на рівні з контролем у пробах з нативним

фібриногеном. У пробах з фібриногеном $\text{desB}\beta(1-42)_2$ міграція клітин у зону ураження була навіть меншою, ніж у контролі (рис. 3.8).

Імовірно, саме негативно заряджені ділянки фібриногену (E-регіон) зв'язувалися з позитивно зарядженою поверхнею пластику, утруднюючи зв'язування клітин під час міграції з активними центрами в E-регіоні.

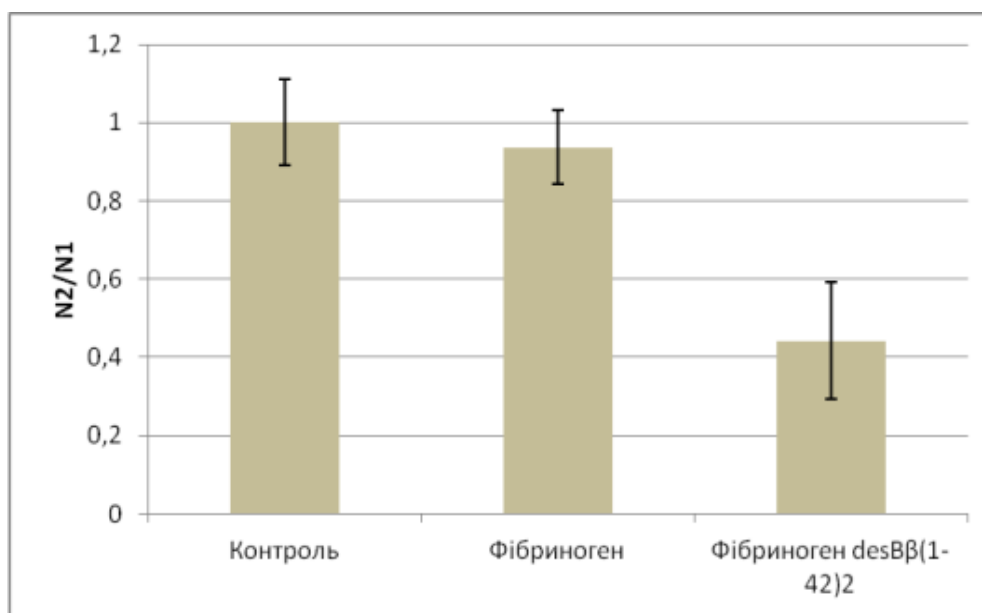


Рис. 3.8. Інтенсивність міграції клітин H1299 у тесті «заростання подряпини» за присутності контрольного фібриногену або фібриногену $\text{desB}\beta(1-42)_2$ у кількості 50 мкг/мл. Використано чашки TPP, поверхня яких має позитивний заряд.

N1 – кількість клітин, що мігрували у зону заростання подряпини за 1 добу без додавання фібриногену (контроль). N2 — кількість клітин, що мігрували у зону заростання подряпини за 1 добу з додаванням фібриногену.

Зниження міграції клітин у пробах з фібриногеном, позбавленим $\text{B}\beta\text{N}$ -доменів, вказує на важливість цих ділянок у прикріпленні ракових клітин лінії H1299 до молекул фібриногену.

Можна зробити висновок про залучення послідовностей $\text{B}\beta(1-42)$ до зв'язування з пухлинними клітинами під час їх міграції. Таким чином, терапія, спрямована на усунення чи екранування цих послідовностей у молекулі фібриногену, може бути дієвою при запобіганні метастазуванню під час лікування онкологічних захворювань.

3.2. АНТАГОНІСТИ GРІІІА-РЕЦЕПТОРІВ

3.2.1. Дезінтегрини отрути змій

До складу отрути змій входять протеїни, що впливають на систему гемостазу. Завдяки своїй специфічності та нездатності інгібуватись природними фізіологічними інгібіторами системи гемостазу людини, вони є перспективним джерелом для створення на їх основі діагностичних тестів та медичних препаратів для корекції роботи системи гемостазу. Одними із таких протеїнів є інгібітори агрегації тромбоцитів.

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

Раніше нами було показано, що в отруті ефи багатолускової (*Echis multisquamatis*) міститься низькомолекулярний протеїновий компонент, здатний пригнічувати агрегацію тромбоцитів. З використанням гель-проникної хроматографії нами було отримано низькомолекулярний поліпептид з отрути ефи багатолускової. Було встановлено, що він ефективно інгібує ADP-індуковану агрегацію тромбоцитів як в плазмі крові так і тромбоцитів позбавлених елементів плазми крові. Було показано, що отриманий інгібітор не впливає на здатність тромбоцитів активуватись під впливом тромбіну. Імуноензимним методом було показано, що даний дезагрегатор є антагоністом GРІІІа.

Для повної характеристики поліпептиду було проведено визначення індуктор-специфічності інгібування агрегації тромбоцитів та з'ясовано час взаємодії тромбоцитів з дезагрегатором, достатній для досягнення високого рівня інгібування агрегації тромбоцитів .

З використанням збагаченої тромбоцитами плазми крові людини було показано, що інгібітор агрегації тромбоцитів з отрути ефи багатолускової інгібує

не лише P2Y-опосередкований шлях агрегації тромбоцитів (ADP-стимульована агрегація), але й PAR- та адренорецептор-опосередкований шлях агрегації тромбоцитів (тромбін- та адреналін стимульована агрегація). Це пов'язано з тим, що за дії будь-якого індуктора агрегації центральна роль в утворенні фібриново-тромбоцитарного згустку належить фібриногеновим «місточкам», що зв'язують між собою клітини. Таке зв'язування проходить опосередковано через GPIIb/IIIa, що є безпосередньою мішенню досліджуваного дезагрегатора.

На рис. 3.9 представлено ристоцетин-індуковану агрегацію збагаченої тромбоцитами плазми крові. Низькомолекулярний компонент з отрути ефі багатолускової пригнічував швидкість та ступінь агрегації збагаченої тромбоцитами плазми крові (рис. 3.9 а); у концентрації 0,135 мг/мл він пригнічував агрегацію тромбоцитів на 50 % (рис. 3.9 б).

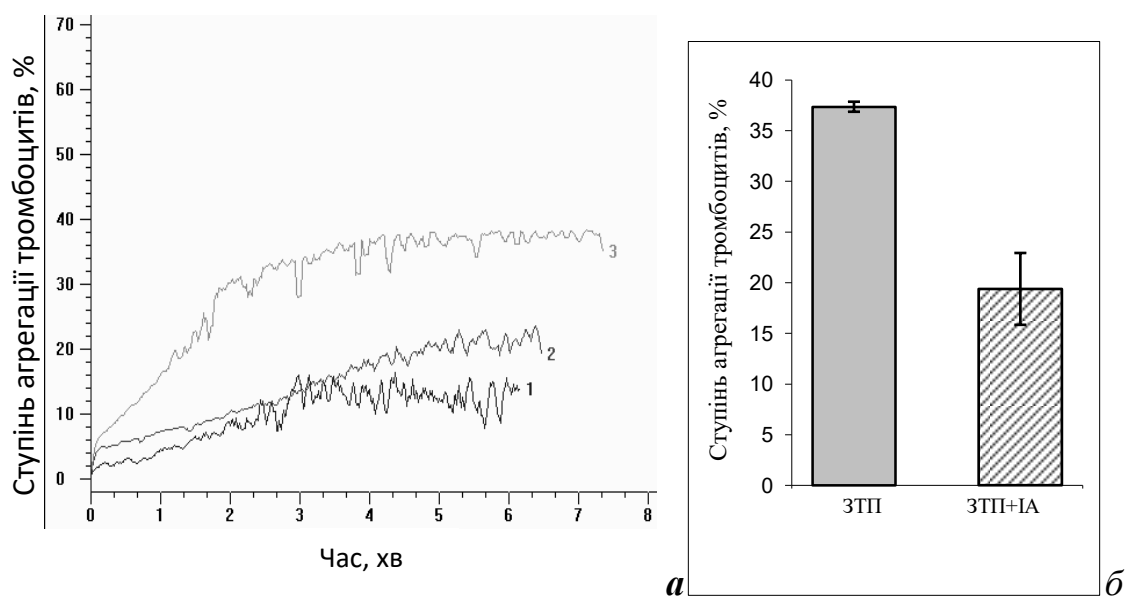


Рис. 3.9. Ристоцетин-індукована агрегація збагаченої тромбоцитами плазми крові (ЗТПК) за присутності інгібітора агрегації тромбоцитів з отрути ефі багатолускової (ІА). а - типова агрегатограма ЗТПК (3) та ЗТПК в присутності дезагрегатора (1, 2). б – середній рівень агрегації ЗТПК.

Ристоцетин викликає агрегацію тромбоцитів опосередковано через фактор фон Віллебранда. Така стимуляція тромбоцитів є фізіологічно первинною – вивільнення фактора фон Віллебранда з ендотелію стимулює початок тромбоутворення. Цей тип агрегації заслуговує на особливу увагу, оскільки фактор фон Віллебранда стимулює утворення та представлення на поверхні

тромбоцитів активного комплексу GPIIb/IIIa і безпосередньо взаємодіє з цим рецептором. Таким чином, за ристоцетин-індукованої агрегації тромбоцитів дезагрегатор з отрути ефі багатолускової вступає у конкуренцію не лише з фібриногеном, але і з фактором фон Віллебранда за зв'язування з GPIIb/IIIa.

Саме інгібування первинних етапів тромбоутворення низькомолекулярним компонентом отрути ефі багатолускової свідчить на користь його можливого використання в якості антитромботичного препарату.

Показано, що інгібування агрегації за дії сполуки є концентраційно залежним для низки індукторів агрегації тромбоцитів (ADP, адреналін, тромбін, ристоцетин). Зокрема, на рис. 3.10 представлено агрегатограму збагаченої тромбоцитами плазми крові за дії 25 та 38 мкг/мл дезагрегатора з отрути ефі багатолускової.

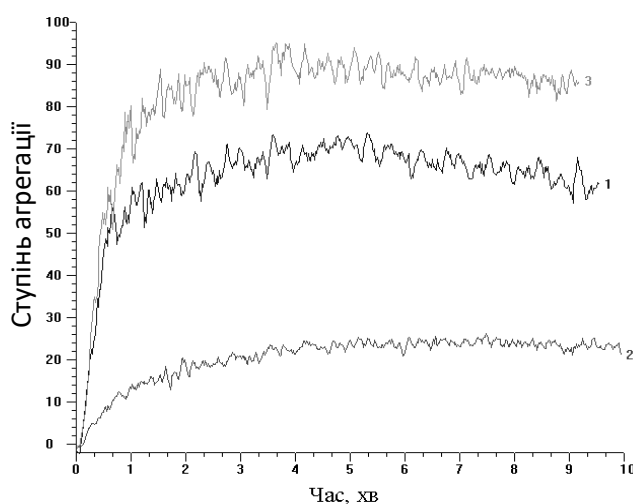


Рис. 3.10. ADP-індукована агрегація тромбоцитів людини у збагаченій тромбоцитами плазмі крові (ЗТПК). Типова агрегатограма ЗТПК (3) та ЗТПК в присутності інгібітора агрегації тромбоцитів з отрути ефі багатолускової (1 – 25; 2 – 38 мкг/мл).

Активація тромбоцитів з подальшої їх агрегацією є швидкоплинним процесом, що проходить за декілька хвилин тому важливою характеристикою антиагрегантних препаратів є швидкість їхньої дії. Існуючі препарати на основі інгібіторів агрегації тромбоцитів пригнічують агрегацію за різний час – від 20 хв для ілопросту та абциксимабу до 2-х годин для клопідогрелю.

Було показано, що ADP-індукована агрегація тромбоцитів людини у ЗТПК досягається навіть при 2-х хвилинній взаємодії з інгібітором агрегації тромбоцитів з отрути ефі багатолускової (рис. 3.11 *a*). Впродовж 12 хв інкубації дезагрегатора (у концентрації 25 мкг/мл) зі збагаченою тромбоцитами плазмою крові агрегація тромбоцитів пригнічується повністю. На 8-й хвилині за таких умов досягається пригнічення агрегаційної здатності тромбоцитів на 65 % порівняно з контролем (рис. 3.11 *б*). При цьому інкубування з тромбоцитами впродовж 5-6 хв спричиняє лише зменшення ступеня агрегації тромбоцитів, в той час як більш довготривала інкубація призводить не лише до зменшення ступеня агрегації тромбоцитів, але і зниження швидкості цього процесу (рис. 3.11 *a*).

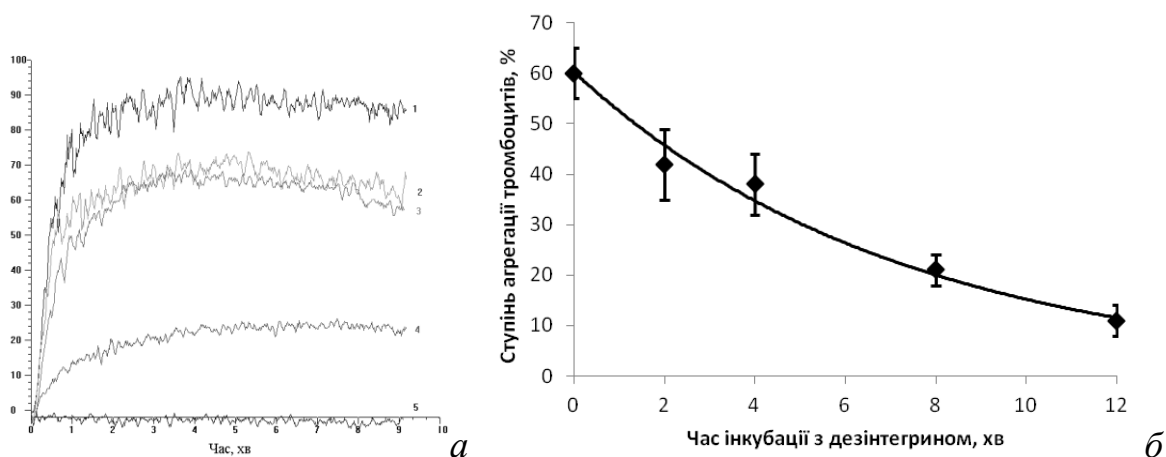


Рис. 3.11. ADP-індукована агрегація тромбоцитів людини у збагаченій тромбоцитами плазмі крові (ЗТПК). *a* – типова агрегатограма ЗТПК (1) та ЗТПК після преінкубації з інгібітором агрегації тромбоцитів з отрути ефі багатолускової (25 мкг/мл) впродовж 5 (2), 6 (3), 8 (4) та 12 (5) хв; *б* – залежність ступеню агрегації ЗТПК від часу інкубації ЗТПК з інгібітором агрегації тромбоцитів з отрути ефі багатолускової.

Причиною цього ймовірно є те, що при короткотривалій інкубації тромбоцитів з дезагрегатором механізмом інгібування агрегації тромбоцитів є лише безпосередня конкуренція дезагрегатора з GPIIb/IIIa; в той час як при довготривалій інкубації вмикаються додаткові механізми, що пригнічують внутрішньоклітинні каскади, що забезпечують активацію тромбоцитів.

Таким чином, дезагрегатор з отрути ефі багатолускової є швидкодіючим та ефективним інгібітором агрегації тромбоцитів.

3.2.2. Низькомолекулярні хімічні сполуки

Здатність молекули фібриногену зв'язуватися одночасно з кількома GPIIb/IIIa має вагомое фізіологічне значення, оскільки різні ділянки міжмолекулярних взаємодій фібриногену є важливими на різних етапах активації та агрегації тромбоцитів. Зокрема, первинне зв'язування фібриногену з GPIIb/IIIa забезпечено, головним чином, додекапептидом γ 400-411. Однак, RGD-последовності фібриногену слугують молекулярними тригерами для GPIIb/IIIa-залежних сигнальних каскадів. Показано, що точки зв'язування RGD та γ 400-411 на GPIIb/IIIa різняться, крім того, здатність GPIIb/IIIa взаємодіяти з RGD викликано первинним зв'язуванням завдяки γ 400-411. Цікаво, що ретракція згустку натомість не залежить від γ 400-411 і відбувається завдяки RGD-сайтам. Загалом, обидва типи фібриноген-тромбоцитарних взаємодій виявляються важливими для нормальної агрегації, виявляючи адитивний ефект.

Таким чином, інгібування взаємодій фібриногену з GPIIb/IIIa є ефективним для запобігання формуванню фібриново-тромбоцитарного тромбу. Препарати, що блокують такі взаємодії можуть розглядатися як перспективні антитромботичні агенти. Такими агентами можуть бути Fab-фрагменти антитіл, спрямованих на контактну зону рецептора (Амбіксімаб) або ж гетероцикли, які включають у себе трипептиди RGD (Тирофібан, Ептіфібатид).

Було проаналізовано дію низки низькомолекулярних сполук на агрегацію тромбоцитів. Сполуки було синтезовано в Інституті молекулярної біології та генетики НАН України та обрано за допомогою докінгу до контактної зони GPIIb/IIIa-рецепторів тромбоцитів.

Сполуки розчиняли в DMSO, у контрольну пробу вносили еквівалентну кількість розчинника. Результати скринінгу сполук представлено на рис. 3.12-3.15.

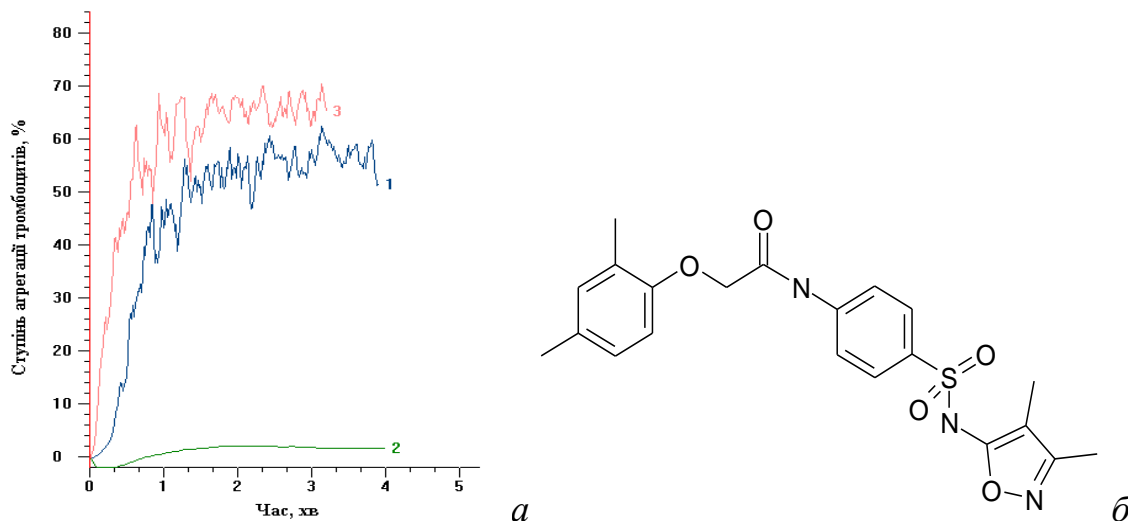


Рис. 3.12. *а* – Агрегація тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові людини, індукована 12,5 мМ ADP за відсутності (3) та в присутності інгібіторної сполуки 101648 в концентрації 0,1мМ (1) та 1мМ (2). *б* – структурна формула сполуки 101648.

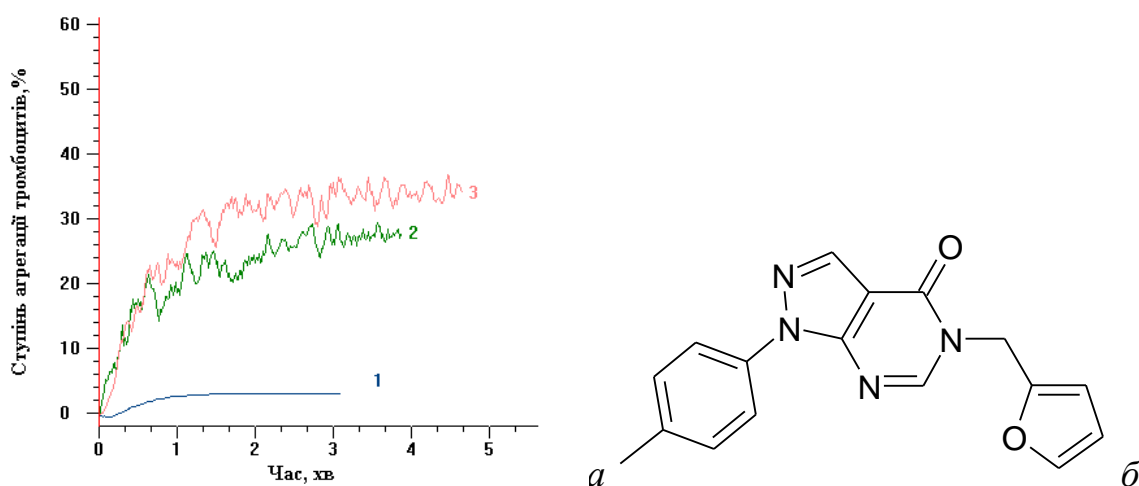


Рис. 3.13. *а* – Агрегація тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові людини, індукована 12,5 мМ ADP за відсутності (3) та в присутності інгібіторної сполуки 859879 в концентрації 0,1мМ (1) та 1мМ (2). *б* – структурна формула сполуки 859879.

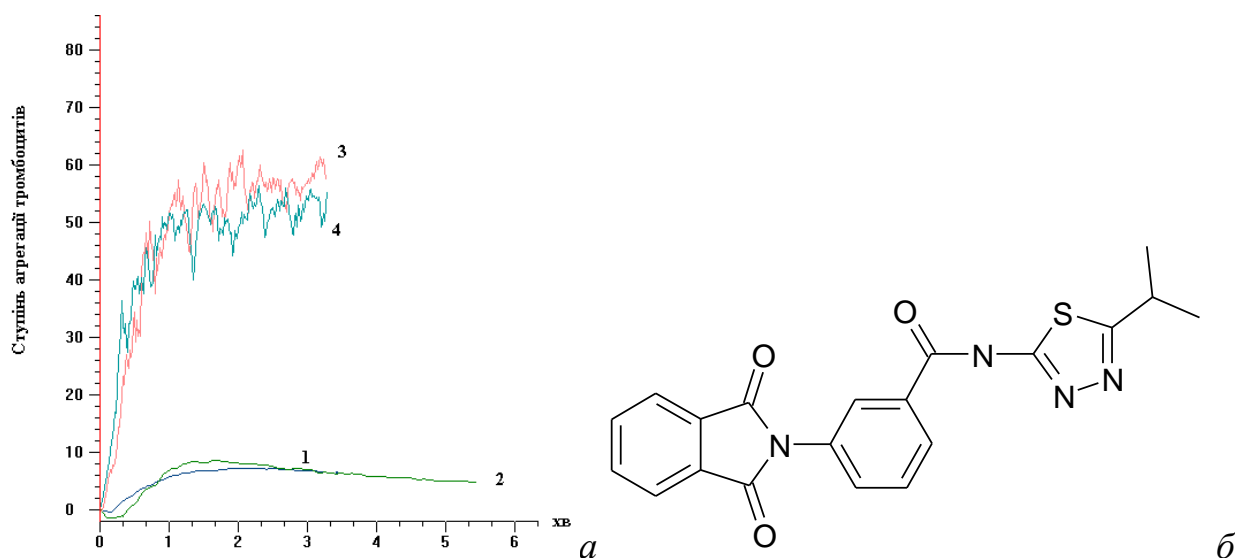


Рис. 3.14. *a* – Агрегація тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові людини, індукована 12,5 мМ ADP за відсутності (3) та в присутності інгібіторної сполуки 254144 в концентрації 0,01мМ (1) та 0,1мМ (2). *б* – структурна формула сполуки 254144.

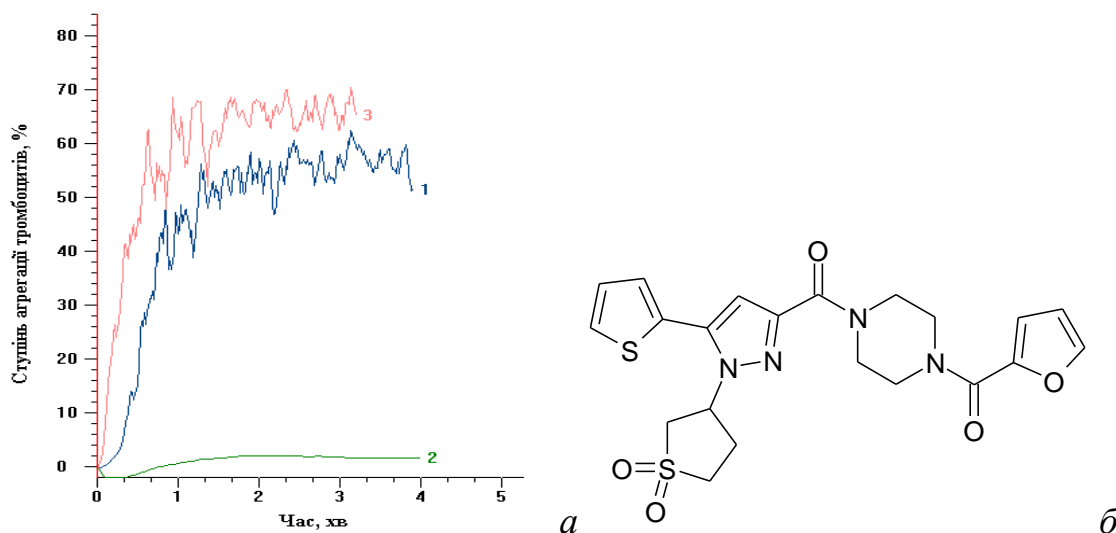


Рис. 3.15. *a* – Агрегація тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові людини, індукована 12,5 мМ ADP за відсутності (3) та в присутності інгібіторної сполуки **1182561** в концентрації 0,1мМ (1) та 1мМ (2). *б* – структурна формула сполуки **1182561**.

Таким чином, було визначено низку сполук – потенційних інгібіторів GPIIb/IIIa, на основі яких планується створення антитромботичного препарату.

3.3. ІНГІБИТОРИ СИГНАЛЬНИХ КАСКАДІВ ТРОМБОЦИТІВ

3.3.1. Дія лігнанів на активацію та агрегацію тромбоцитів

Насіння льону – джерело попередників лігнанів ссавців [161]. Зокрема, у насінні льону присутній лігнан, диглюкозид секоізолярициресинолу (SDG) – попередник ентеродіолу (EL) та ентеролактону (ED) [162]. Лігнани відомі, як антагоністи ліпідного фактора активації тромбоцитів (PAF) [163]. Окрім того, лігнани виступають інгібіторами продукції пероксидних радикалів поліморфноядерними лейкоцитами [164]. Фізіологічна концентрація ентеродіолу (EL) та ентеролактону (ED) у плазмі крові та сечі може сягати 1 мМ [165].

Фактор активації тромбоцитів (PAF) – прозапальний ліпід 1.0-алкіл-2 ацетильований аналог фосфатидилхоліну. Антагоністи PAF, якщо їх застосовувати з профілактичною метою, зменшували тяжкість перебігу гострого панкреатиту, знижуючи вміст сироваткової амілази, послаблюючи оксидативний стрес, інфільтрацію лейкоцитів, а також прямо впливаючи на концентрацію PAF у крові [166, 167].

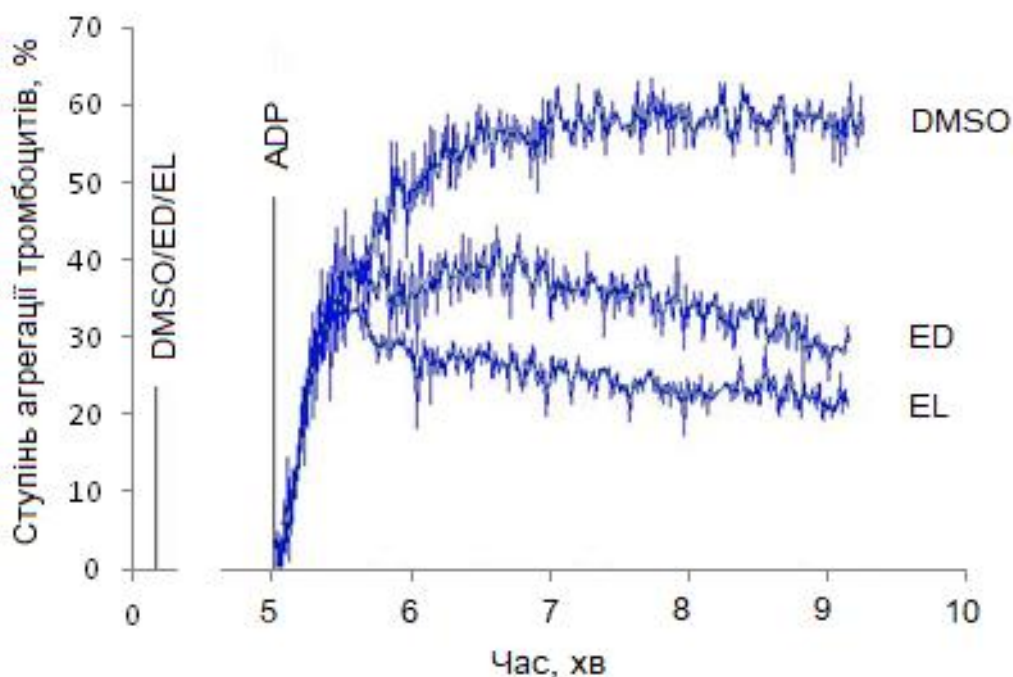


Рис. 3.16. Агрегація тромбоцитів, індукована 8 μ M ADP за присутності 0.8% DMSO, 0.8 мМ ентеродіолу (ED), та 0.8 мМ ентеролактону (EL) після інкубації протягом 5 хв.

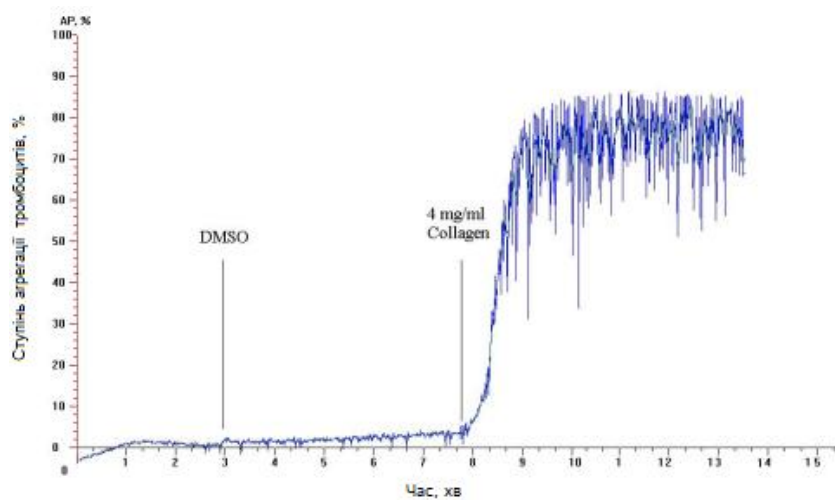
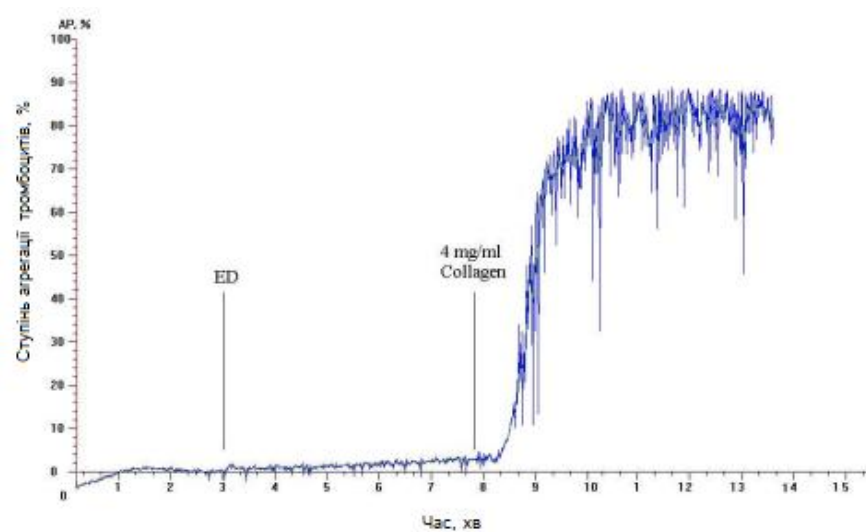
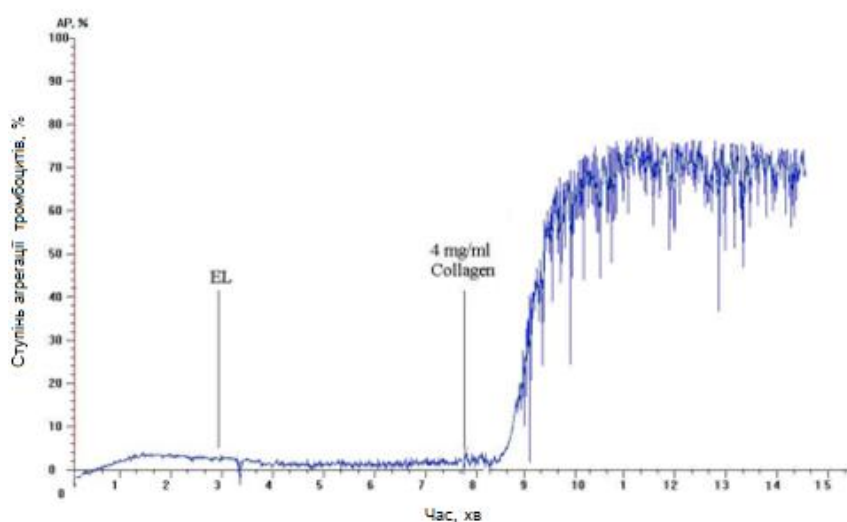
**a****б****в**

Рис. 3.17. Агрегація тромбоцитів, індукована 4 мг/мл колагену, за присутності 0.8% DMSO, 0.8 мМ (а), ентеродіолу (ED) (б), та 0.8 мМ ентеролактону (EL) (в) після інкубації протягом 5 хв.

Ми вивчали дію біологічних метаболітів лігнанів на активацію та агрегацію тромбоцитів. Обидва метаболіти ED та EL були нерозчинні у водних розчинах і ефективно розчинялися в DMSO, еквівалентний об'єм DMSO вносили в контрольну пробу.

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. 3.16).

Крім того, ED та EL подовжували lag-період колаген-індукованої агрегації тромбоцитів від 6 с до 44 с (рис. 3.17).

Для виявлення природи інгібіторного ефекту лігнанів 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. 3.18, 3.19). Таким чином, дія лігнанів на агрегацію тромбоцитів здійснюється саме на етапі активації.

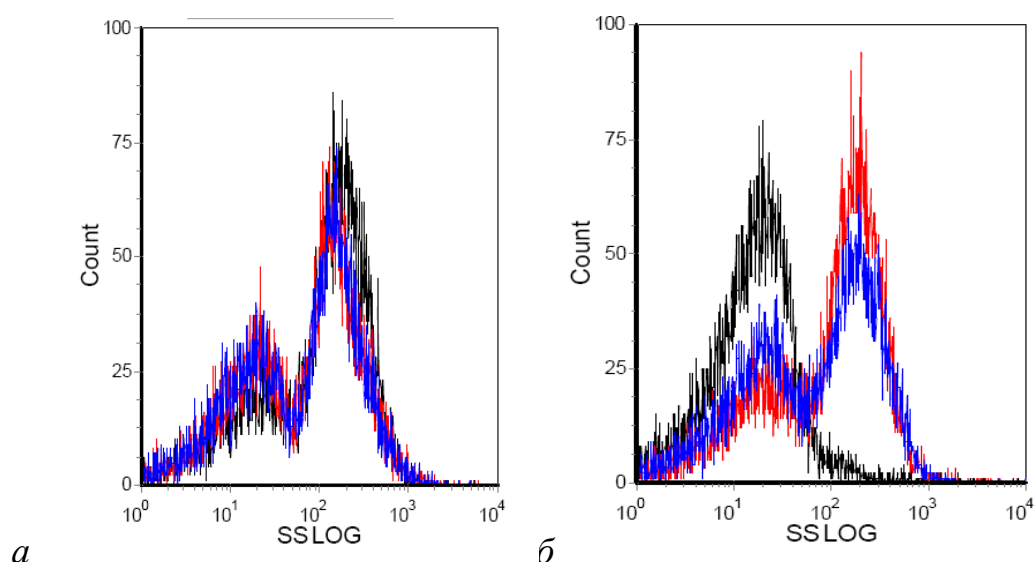


Рис. 3.18. Розподіл тромбоцитів за гранулярністю до (а) та після (б) стимуляції 25 μ M ADP за присутності 0.8% DMSO, 0.8 мМ ентеродіолу (ED), та 0.8 мМ ентеролактону (EL).

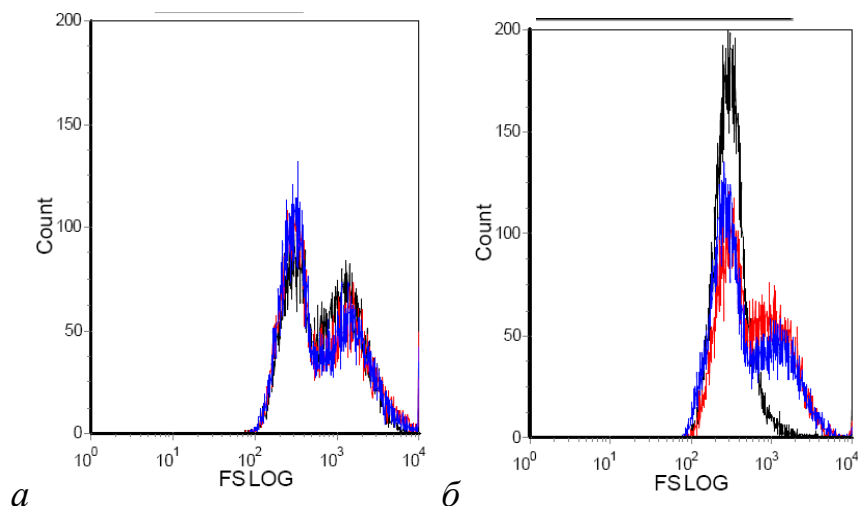


Рис. 3.19. Розподіл тромбоцитів за формою до (а) та після (б) стимуляції 25 μM ADP за присутності 0.8% DMSO, 0.8 мМ ентеродіолу (ED) та 0.8 мМ ентеролактону (EL).

Було також показано інгібіторну дію 0.8 мМ ентеродіолу (ED) та 0.8 мМ ентеролактону (EL) на агрегацію тромбоцитів, індуковану 25 нМ PAF (рис. 3.20 і 3.21). Так, EL у концентрації 0,8 мМ інгібував ступінь агрегації тромбоцитів майже у 5 разів, ED у такій самій концентрації призводив до зниження ступеня агрегації в 3-4 рази, порівняно з контролем. Обидва досліджувані агенти викликали значну дезагрегацію тромбоцитів. При цьому ефекти обох сполук, взятих у концентрації 0,08 мМ були незначними (рис. 3.20, 3.21).

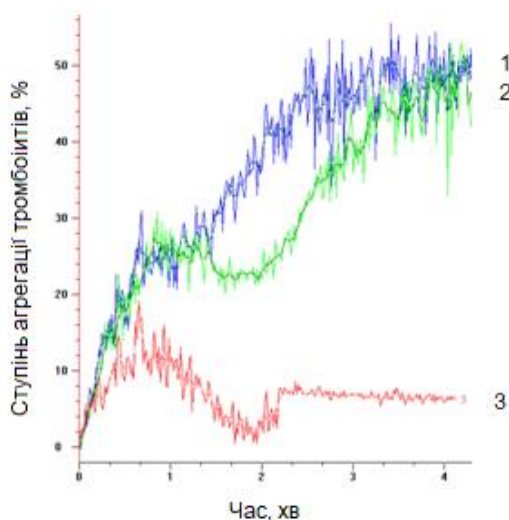


Рис. 3.20. Агрегація тромбоцитів, індукована 25 нМ PAF, за присутності 0.8% DMSO, 0.8 мМ (3) та 0.08 мМ (2) ентеродіолу (ED).

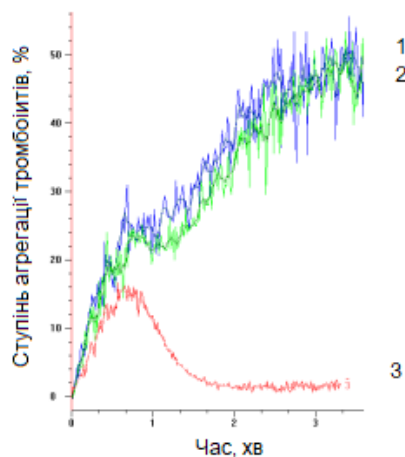


Рис. 3.21. Агрегація тромбоцитів, індукована 25 нМ PAF, за присутності 0.8% DMSO, 0.8 мМ (3) та 0.08 мМ (2) ентеролактону (EL).

Дослідження даних літератури щодо присутності PAF у плазмі крові дозволило встановити, що генерація PAF можлива як правило за запальних процесів, артритів, аутоімунних захворювань, тощо. При цьому, вміст PAF у плазмі крові більш ніж на порядок менший за той, що викликає агрегацію тромбоцитів (таблиця 3.2).

Таблиця 3.2

Концентрація PAF у плазмі крові людини в контролі та за патології, порівняно з концентраціями, що індукують агрегацію тромбоцитів

<i>Концентрація PAF у плазмі крові</i>	<i>нг/мл</i>	<i>нМ</i>	<i>Джерело</i>
Контроль	0,14	0,3	[168]
Патологія	0,3	0,6	
Важка патологія	0,8	1,5	[169]
Викликає агрегацію тромбоцитів	5-50	10-100	[170]

Для виявлення внеску PAF у сукупну агрегацію тромбоцитів, ми вивчали ADP-індуковану агрегацію тромбоцитів у плазмі крові умовно здорового донора та пацієнта з хронічним артритом, який не приймав протизапальних та імуносупресорних препаратів протягом 5 днів перед дослідом.

Показано, що у плазмі крові пацієнта з хронічним артритом ентеролактон виявляв достовірну інгібіторну дію (на понад 10 %) уже в мінімальній концентрації 0,08 мМ, тоді як у плазмі крові здорового донора такого ефекту не спостерігали (рис. 3.22).

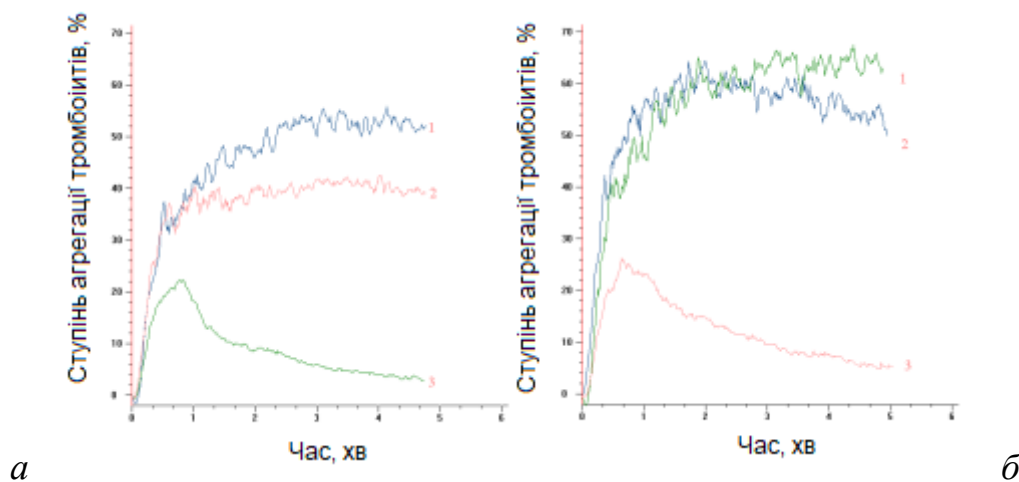


Рис. 3.22. Агрегація тромбоцитів людини, індукована ADP (8 мкМ) за присутності 0.8% DMSO (1), 0.08 мМ (2) та 0,8 мМ (3) ентеролактону (EL). Час преінкубації – 5 хв.

а – агрегація тромбоцитів людини з хронічним запальним процесом.

б – агрегація тромбоцитів здорового донора.

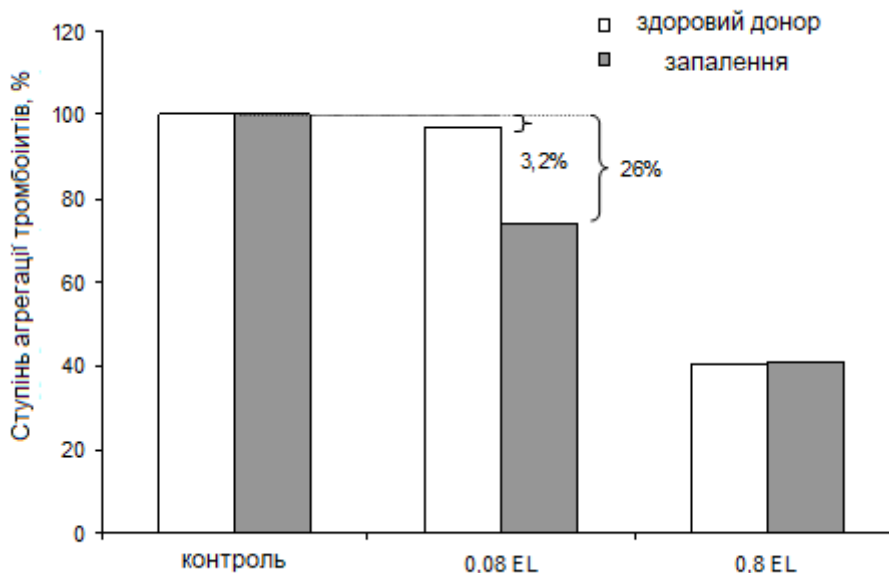


Рис. 3.23. Ступінь агрегації тромбоцитів здорового донора (білий графік) та пацієнта з хронічним артритом (сірий графік), індукована ADP (8 μ М) за присутності 0.8 % DMSO (1), 0.08 мМ (2) та 0.8 мМ (3) ентеролактону (EL). Час преінкубації – 5 хв.

Проведені підрахунки (рис. 3.23) дозволили виявити, що ефективність ЕІ як протизапального агента було на 25 % вищою за умов розвитку захворювання, пов'язаного з генерацією PAF (хронічного артриту). Можемо говорити про вклад PAF у сумарну агрегаційну здатність тромбоцитів, яку вдається нівелювати застосуванням PAF.

Таким чином, ентодіол та ентодіолон інгібують агрегацію тромбоцитів, індуковану PAF, колагеном та ADP, володіючи помірною анти-агрегаційною активністю в фізіологічному діапазоні концентрацій. За допомогою цитометрії показано, що ця антиагрегантна дія відбувається за рахунок пригнічення активації тромбоцитів.

Діючи на активацію тромбоцитів, індуковану PAF, досліджувані лігнани мають особливу антиагрегантну дію на тромбоцити в умовах патології, пов'язаної з запаленням, та можуть розглядатися, як перспективні антитромботичні агенти м'якої дії.

3.3.2. Ефект епігалокатехінгаллату (EGCG) на тромбоцити у стані спокою, активацію та агрегацію тромбоцитів

Галлат епігалокатехіну (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 фосфофліпазу PLC γ 2, а також фосфорилування тирозинових залишків протеїнів. Відомо також, що EGCG також зменшує концентрацію цитозольного кальцію, викид арахідонової кислоти, та секрецію серотоніну [171, 172]. Такі властивості дозволяють припустити можливість застосування EGCG для консервування тромбоцитів, інгібування апоптозу клітин, тощо [173]. EGCG як біологічно активна добавка також рекомендована для використання при серцево-судинних захворюваннях та за дисфункції тромбоцитів [174, 175, 176].

Ми провели комплексне дослідження дії різних концентрацій EGCG на активацію та агрегацію тромбоцитів.

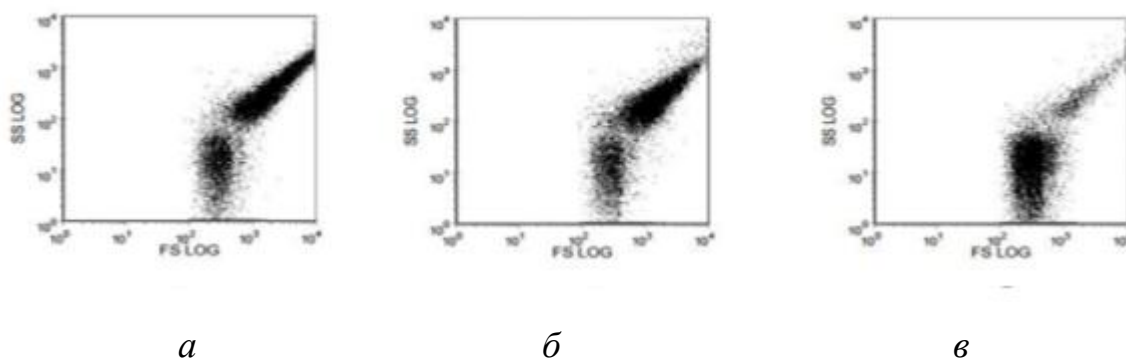


Рис. 3.24. Розподіл тромбоцитів за формою та гранулярністю після преінкубації з EGCG чи стимуляції 0,125 NIH/мл тромбіном. Цитометричний аналіз збагаченої тромбоцитами плазми крові, преінкубованої з 0.2 mM EGCG протягом 2 годин. SS – параметр гранулярності тромбоцитів; FS – параметр форми тромбоцитів (логарифмічна шкала).

a – тромбоцити у стані спокою, інкубовані протягом 2 годин з еквівалентним об'ємом буферу; *б* – тромбоцити у стані спокою, інкубовані з 0.2 mM EGCG протягом 2 годин; *в* – тромбоцити, активовані тромбіном (0,125 NIH/ml) протягом 2 хв.

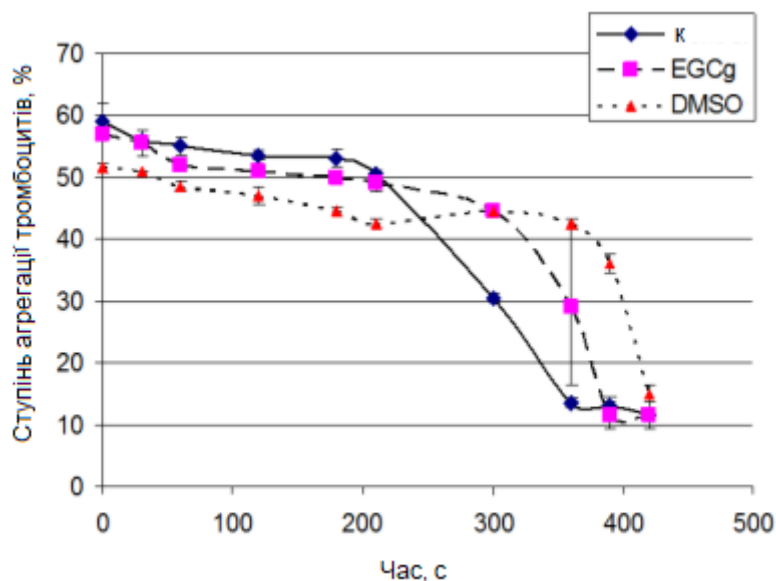


Рис. 3.25. Цитометричний аналіз тромбоцитів, стимульованих тромбіном за присутності EGCG. Тромбоцити в збагаченій тромбоцитами плазмі крові активували тромбіном (0.5 NIH/мл) за присутності EGCG (0.2 mM) або DMSO (0,8 %).

Цитометрія показала, що EGCG (0.1-0.5 mM) не впливає на форму та гранулярність тромбоцитів у стані спокою. Не було виявлено жодних достовірних змін у формі та гранулярності тромбоцитів навіть при тривалій інкубації з EGCG (рис. 3.24).

Водночас, було виявлено, що у разі активації тромбоцитів тромбіном (0.5 НН/мл), зміни форми та гранулярності тромбоцитів за присутності EGCG відбуваються відчутно повільніше (рис. 3.25). Отже, EGCG має протекторну дію, яку виявляє навіть під час активації тромбоцитів таким «сильним» агоністом, як тромбін.

Імовірно, це відбувається завдяки пригніченню біохімічних каскадів активації тромбоцитів, які ведуть до їхньої дегрануляції. Зокрема, EGCG зменшує ADP-індуковану дегрануляцію тромбоцитів у спектрофлуориметричних дослідженнях (рис. 3.26).

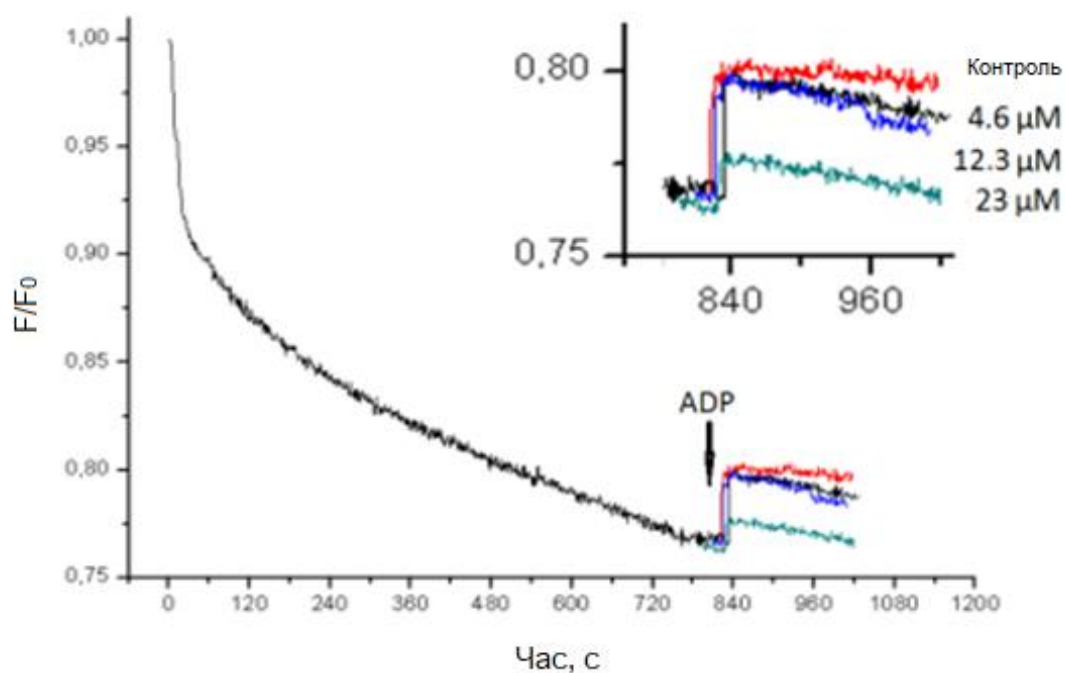


Рис. 3.26. Дегрануляція тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові, стимульованих 2 мМ ADP у присутності та за відсутності EGCG (0.1-0.5 мМ). Викид вмісту тромбоцитарних гранул оцінювали за допомогою рН-чутливого флуоресцентного зонду акридину оранжевого (АО). PBS – 0,1 М фосфатний буфер рН 6,0.

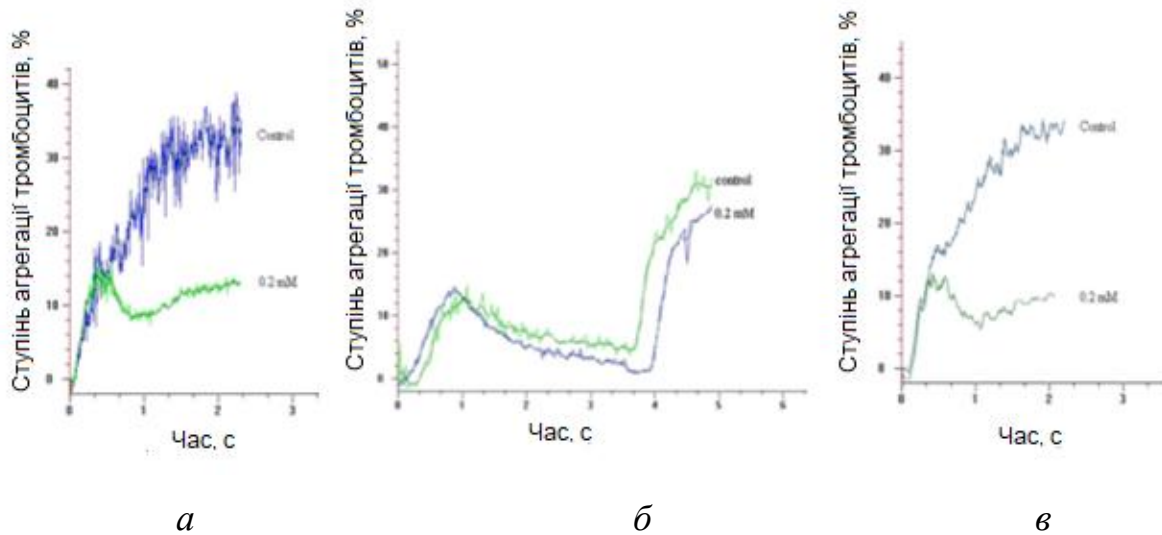


Рис. 3.27. Агрегація тромбоцитів людини у збагаченій тромбоцитами плазмі крові, індукована $2.5 \mu\text{M}$ ADP (а), 0.25 NIH/ml тромбіну (б) чи 100 nM PAF (в) за присутності 0.2 mM EGCG.

Було також показано, що преінкубація тромбоцитів з $0,2 \text{ mM}$ EGCG протягом 1 хв інгібує агрегацію тромбоцитів, індуковану ADP ($2,5 \mu\text{M}$) або фактором активації тромбоцитів (PAF, 50 нг/мл) на 50 та 75 % відповідно. Агрегація, індукована тромбіном ($0,125 \text{ NIH/мл}$), пригнічувалася значно менш виражено, що безумовно пов'язано з фібриноутворенням, яке відбувалося в збагаченій тромбоцитами плазмі крові, в якій було проведено експерименти (рис.3. 27).

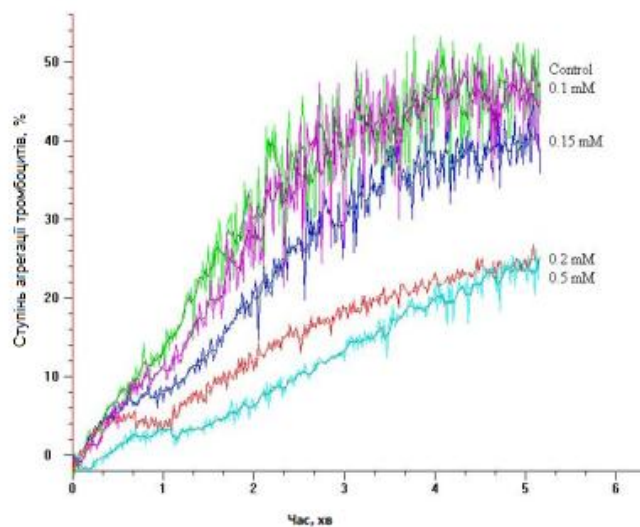


Рис. 3.28. Ефекти різних концентрацій EGCG на агрегацію тромбоцитів людини у збагаченій тромбоцитами плазмі крові. Індукція ADP ($2,5 \mu\text{M}$).

Було виявлено концентраційну залежність інгібіторної дії EGCG на агрегацію тромбоцитів (рис. 3.28). IC50 приблизно дорівнює 0,18 мМ. Нами було показано, що EGCG не діє на тромбоцити у стані спокою, але зменшує агрегацію та активацію тромбоцитів, проактивованих низкою агоністів (тромбін, ADP і PAF). Модифікація карбонових матриць EGCG дає можливість зберегти тромбоцити під час проходження через колонки з карбоном у якості сорбенту.

Відповідно до даних літератури, максимальна концентрація EGCG у плазмі крові здорових волонтерів, які вживали зелений чай – природне джерело поліфенолів – не перевищувала 326 нг/мл (0,0007 мМ) [177]. У іншому дослідженні максимальна концентрація EGCG у плазмі крові людини після вживання зеленого чаю становила 100 нг/мл (0,0002 мМ) [178]. Концентрацію EGCG у плазмі крові можна підвищити вживанням препаратів, що містять поліфеноли. Так, концентрацію EGCG понад 1000 нг/мл (0,002 мМ) вдалося досягти у щурів та мишей після вживання їм 0,6 % поліфенолового препарату зеленого чаю [179]. Щоденне введення 800 мг 94 % препарату кристалічного EGCG протягом 10 днів призводило до накопичення його у плазмі крові в кількості до 2500 нг/мл (0,005 мМ) [180].

У той же час, EGCG як антиоксидант володіє широким спектром біологічної активності. Можливо, ця сполука захищає тромбоцити, стабілізуючи поверхневі протеїни чи ліпіди від окислення.

Оскільки реально можлива концентрація EGCG у плазмі крові людини за умов прийому біологічних добавок становить 0,005 мМ, можна розглядати можливість застосування препарату лише *ex vivo*, зокрема при гемоперфузії. Гемоперфузію застосовують при лікуванні гострих отруень, передозування ліків, а також для зменшення вмісту прозапальних цитокінів та для виведення ендотоксинів. Одним з найпоширеніших способів гемоперфузії є застосування карбонових адсорбентів [181]. Щоправда, прямий контакт карбонових носіїв з кров'ю може призводити до активації клітин крові, особливо тромбоцитів, що призводить до тромбозів. Наприклад, застосування EGCG під час гемоперфузії у свиней дозволило знизити побічні ефекти [182].

Справді, EGCG безпосередньо взаємодіє з протеїнами плазми крові, що призводить до стимуляції внутрішньоклітинного сигналіngu. Численні вивчені в літературі ефекти залежать від типу клітин, ступеню їхньої стресованості чи концентрації [183]. Було виявлено, що EGCG достовірно інгібує тромбін-індуковану агрегацію тромбоцитів та підвищення внутрішньоклітинної концентрації йонів Ca^{2+} у тромбоцитах щурів за умов вживання їм зеленого чаю. Дослідники стверджують, що це відбувається завдяки пригніченню активності протеїнів Syk та Lyn [184].

EGCG в дозі 0,01 мМ і нижче дозозалежно попереджає ушкодження хромосом активними формами кисню [185]. У концентрації 0.1 мМ EGCG також корегує діастолічну дисфункцію, викликану збільшеною чутливістю мікрофіламентів до йонів Ca^{2+} , за умов моделі гіпертрофічної кардіоміопатії у мишей [186].

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

Зміни параметрів системи гемостазу, пов'язаних з тромбоцитарною ланкою, за умов гемоперфузії – відома побічна дія цієї процедури. Для її уникнення пропонують застосовувати специфічні покриття матриць для гемоперфузії. Приміром, альбумін-модифіковані матриці демонструють менш виражену дію на гемостаз [187]. Також захищає тромбоцити від активації внутрішньовенне введення простагліцину під час гемоперфузії. Зокрема це було показано шляхом визначення активності тромбоцит-специфічного тромбоглобуліну в плазмі крові до та після гемоперфузії на тлі застосування простагліцину [188]. Частково вирішуючи проблему негативної дії на тромбоцити, адміністрація простагліцину стала найпоширенішим засобом зниження ризику активації тромбоцитів при гемоперфузії [189]. Однак, тромбоцитопенія та коагулопатія досі лишаються небезпечним побічним ефектом гемоперфузії [190, 191, 192].

Нами було продемонстровано, що одним зі способів вирішення цієї проблеми є застосування гемосорбентів, модифікованих EGCG. Завдяки цій

сполучі можливе збільшення біосумісності карбонових матриць і запобігання активації на них тромбоцитів.

Тому наступною метою дослідження було вивчення 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 (ЗТПК) пропускали через колонки з немодифікованим карбоном і карбоном, модифікованим EGCG. Оцінювали зміну форми гранулярності тромбоцитів та їхньої агрегаційної здатності після проходження через сорбенти за допомогою цитометрії та агрегатометрії відповідно. Карбоновий сорбент, який контактував з тромбоцитами, надалі фіксували глутаровим альдегідом та вивчали за допомогою скануючої електронної мікроскопії.

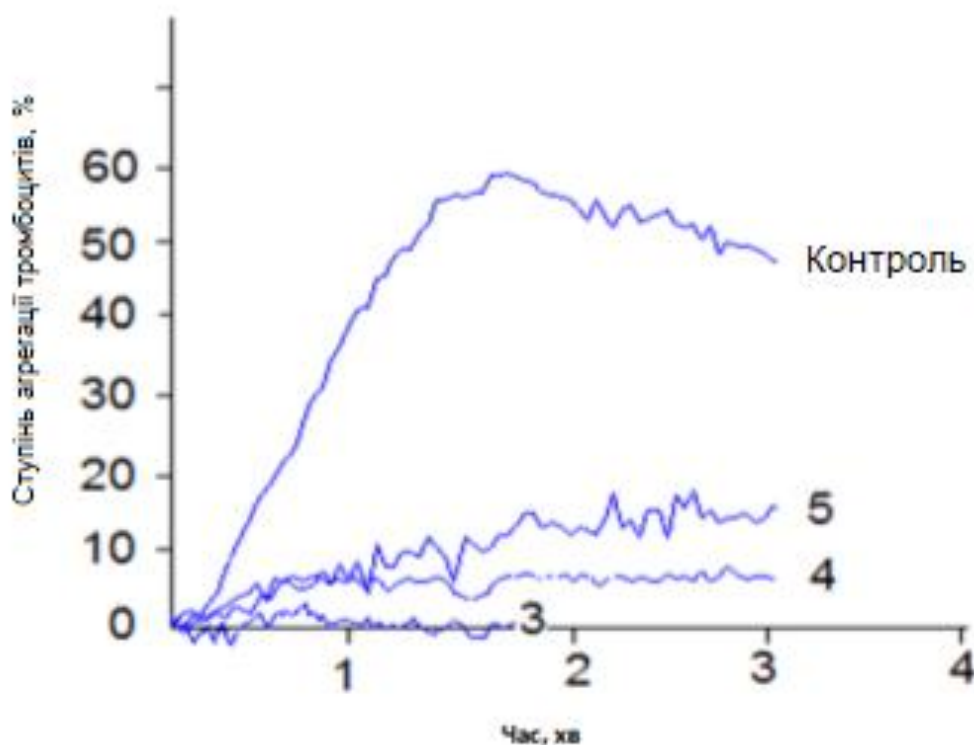


Рис. 3.29. Агрегація тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові (Контроль), у плазмі крові, профільтрованій через карбоновий носій (5), у плазмі крові, профільтрованій через карбоновий носій, преінкубований з EGCG (4).

Хоча ми не відзначили змін форми та гранулярності тромбоцитів при їх проходженні через карбоновий сорбент, модифікований та немодифікований EGCG, ступінь агрегації тромбоцитів після контакту з карбоновими носіями

зменшувався до 15 ± 4 % (немодифікований карбон) і 5 ± 3 % (карбон, модифікований EGCG). Контрольне значення – 50 % (рис. 3.29).

Скануюча електронна мікроскопія дозволила виявити активацію тромбоцитів, адгезованих до карбонової матриці. Адгезія тромбоцитів до матриці, обробленої EGCG, була значно меншою (рис. 3.30.).

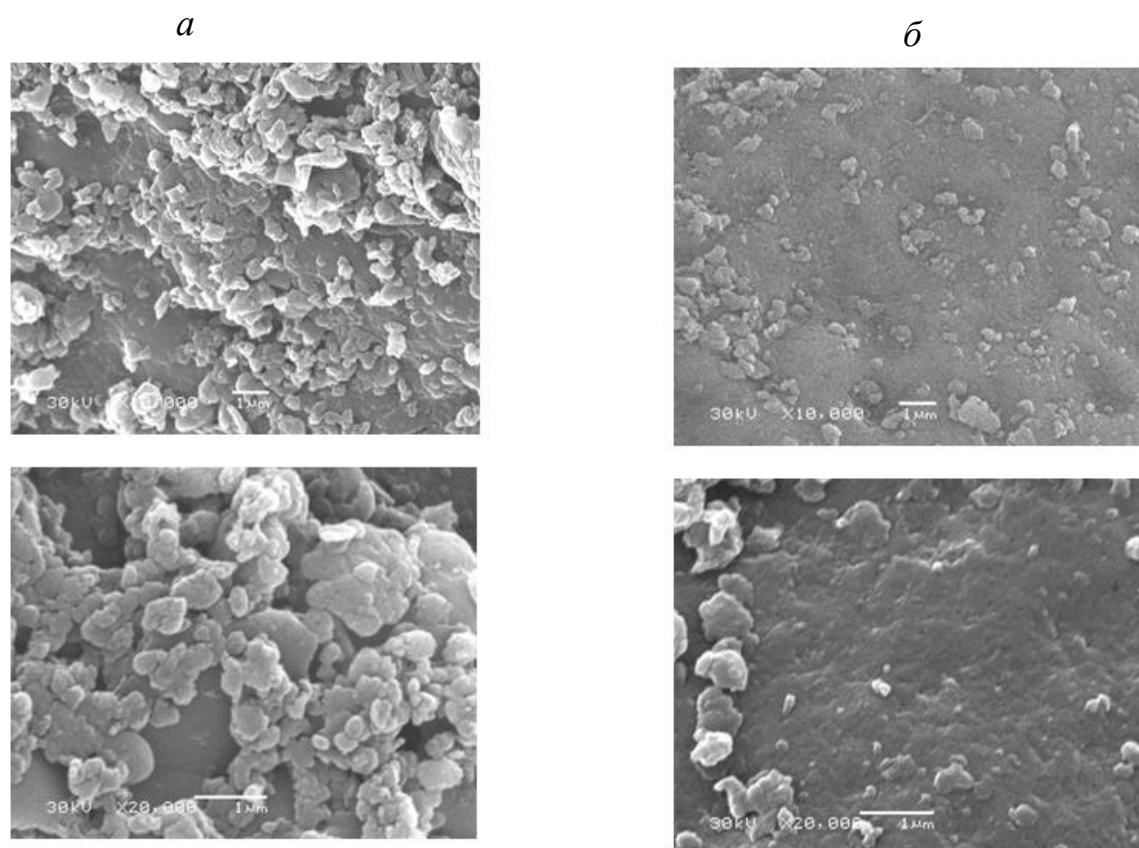


Рис. 3.30. Скануюча електронна мікроскопія карбонових матриць після контакту зі збагаченою тромбоцитами плазмою крові: *a* – матриці без попередньої обробки; *б* – матриці, преінкубовані з EGCG.

Таким чином, ми показали, що EGCG виявився ефективним інгібітором активації та агрегації тромбоцитів. Тромбоцити, профільтровані через карбонову матрицю, втрачали здатність агрегувати, однак якщо матрицю було попередньо проінкубовано з EGCG, клітини зберігали здатність до активної дегрануляції у відповідь на активатори. Це вказує на те, що модифікація карбонової матриці EGCG інгібує активність тромбоцитів, запобігає їхній активації в процесі контакту з карбоном, однак зберігає їх інтактними, здатними реагувати на стимуляцію ADP.

Цей висновок підкріплено даними скануючої електронної мікроскопії, яка показала відсутність активованих тромбоцитів на поверхні матриці, попередньо інкубованої з EGCG. Як видно з рис. 3.31, тромбоцити, які зв'язалися з карбоновою матрицею з іммобілізованим EGCG, зберігали округлу форму та не мали псевдоподій.

Можна зробити висновок, що модифікація карбонових матриць EGCG може бути корисним засобом зниження ризику тромбоутворення при гемоперфузії.

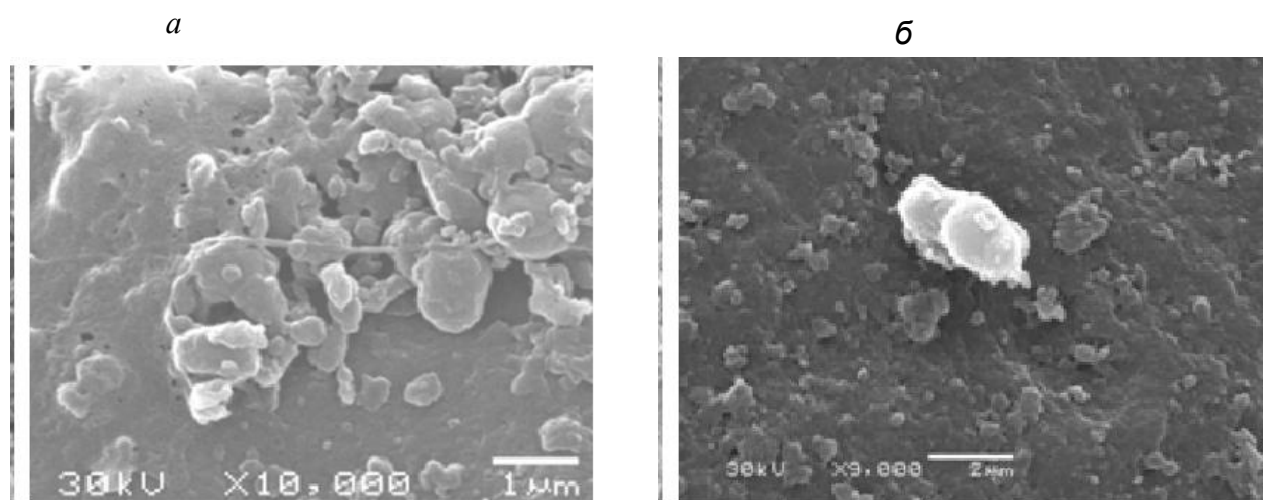


Рис. 3.31. Скануюча електронна мікроскопія карбонових матриць після контакту зі збагаченою тромбоцитами плазмою крові. *а* – матриці без попередньої обробки; *б* – матриці, преінкубовані з EGCG.

Наші дані показали незначну антиагрегантну дію EGCG на тромбоцити *in vitro*. Ця дія полягає у інгібуванні агоніст-індукованої активації та дегрануляції тромбоцитів. Беручи до уваги біосумісність EGCG, ми можемо припустити можливість його використанні як протекторного агента при гемоперфузії, гемодіалізі та за умов зберігання тромбоцитарної маси.

Моделювання взаємодії модифікованих EGCG матриць із тромбоцитами в умовах гемоперфузії, ми вивчили наслідки контакту тромбоцитів збагаченої тромбоцитами плазми з такими сорбентами. Виявлено, що модифікація карбонових матриць EGCG дозволяє уникнути активації тромбоцитів і у перспективі – запобігти зсіданню крові під час гемоперфузії.

3.3.3. N-стеароїлетаноламін

Біологічна дія ендоканабіноїдів. Низка досліджень засвідчують величезну роль ендоканабіноїдної системи в регуляції продукції активних форм кисню та перебігу запальних реакцій. Ці процеси в організмі тісно пов'язані між собою та супроводжують перебіг і розвиток майже всіх патологічних станів організму.

Так наприклад JWH-133, синтетичний агоніст CB-2 рецепторів, зменшує продукцію O_2 [193]. Цей ефект відбувається за рахунок відомих антизапальних ефектів NAE. У дослідженнях проведених на мишах лінії C57BL/6 було показано, що тетрагідроканабіол викликає підвищення секреції інтерферону гамма, молекули з відомими антизапальними властивостями.

Однак цікавим є твердження авторів цього дослідження про те, що ці ефекти не пов'язані з активацією канабіноїдних рецепторів [194]. Також існують дані які свідчать що при активації ендоканабіноїдних CB-2 рецепторів зменшується важкість атеросклеротичного ураження судин [195].

Величезну роль в запаленні відіграє баланс прозапальних та антизапальних цитокінів. Існують ряд досліджень, які вказують на діаметрально протилежні ролі рецепторів типу CB-1 та CB-2 в перебігу та розвитку запальних реакцій. У той час як активація CB-1 рецептора стимулює вироблення прозапальних медіаторів, активація CB-2 рецепторів в макрофагах викликає навпаки антизапальні ефекти [196].

Тромбоцити, як мішень дії NSE. В останні роки однією з найактуальніших проблем медицини є лікування та профілактика ішемічної хвороби серця (ІХС), гострих порушень кровообігу, в виникненні та перебігу яких провідна роль належить атеросклерозу. Незважаючи на величезні досягнення у вивченні природи атеросклерозу, в практичній медицині ще не існує достатньо ефективних і надійних засобів лікування захворювань, пов'язаних з розвитком атеросклеротичного ураження судин.

Агрегація тромбоцитів – один із ключових процесів зсідання крові та формування фібриново-тромбоцитарного тромбу, який здійснюється як при ушкодженні стінки судин для запобігання кровотечі, так і в патогенезі ряду

захворювань, які можна об'єднати поняттями атеросклероз та атеротромбоз. Препарати, які пригнічують функцію тромбоцитів, – антиагреганти – важлива складова антитромботичної терапії. За механізмом дії розрізняють інгібітори циклооксигенази (аспірин), інгібітори тромбоцитарних рецепторів до фібриногену GPIIb/IIIa (abciximab – похідне антитіла, heptapeptide, eptifibatid – циклічні три пептиди KGD), інгібітори ADP-рецепторів (клопідогрел, трикагрелор).

Кожна із цих груп препаратів має свої недоліки. Так, аспірин у деяких хворих викликає резистентність, яка розвивається за рахунок альтернативних механізмів агрегації тромбоцитів [197]. Дослідження резистентності до аспірину в значній мірі гальмується відсутністю у клініці адекватних та економічно вигідних методів її визначення. Інгібітори ADP-рецепторів мають генетичні причини різниці в дії для різних індивідів. Антагоністи GPIIb/IIIa-рецепторів знаходяться у стадії розробки або мають занадто сильну антиагрегантну дію, яка не піддається регуляції. Як речовини пептидної природи, вони є потенційно імуногенними.

Головною перевагою та відмінністю запропонованого засобу (NSE), порівняно з іншими антиагрегантами, є його м'яка дія на агрегацію тромбоцитів.

Тоді як вищезгадані препарати активно пригнічують агрегантну функцію тромбоцитів, NSE, використовуючись як самостійний протекторний препарат, має протизапальну, імуносупресорну, антиоксидантну дію і знижує агрегатний потенціал тромбоцитів, запобігаючи тромботичним ускладненням при атеросклерозі, запальних процесах, гіпертонії та інших захворюваннях, які можуть призводити до тромботичних ускладнень.

Дія NSE та NOE на агрегацію тромбоцитів людини. N-стеароїлетаноламін – дрібнодисперсний кристалічний порошок білого кольору, масний на дотик, без специфічного запаху та смаку, розчинний у органічних розчинниках, нерозчинний у воді, не виділяє токсичних речовин і не створює вибухонебезпечних сумішей. Температура плавлення 98-101 °С.

Додавання індукторів (ADP, адреналіну чи ристоцетину) до ЗТПК викликало агрегацію тромбоцитів. Додаткове введення NSE в концентрації 10^{-7} та 10^{-8} М знижувало ADP-індуковану агрегацію тромбоцитів ADP на 30 % (рис. 3.32).

Водночас, додавання NSE у концентрації (10^{-8} М) не впливало на ефект який викликало введення адреналіну. Збільшення концентрації NSE до 10^{-7} М призводило до зменшення агрегації тромбоцитів в умовах дії адреналіну (рис. 3.33).

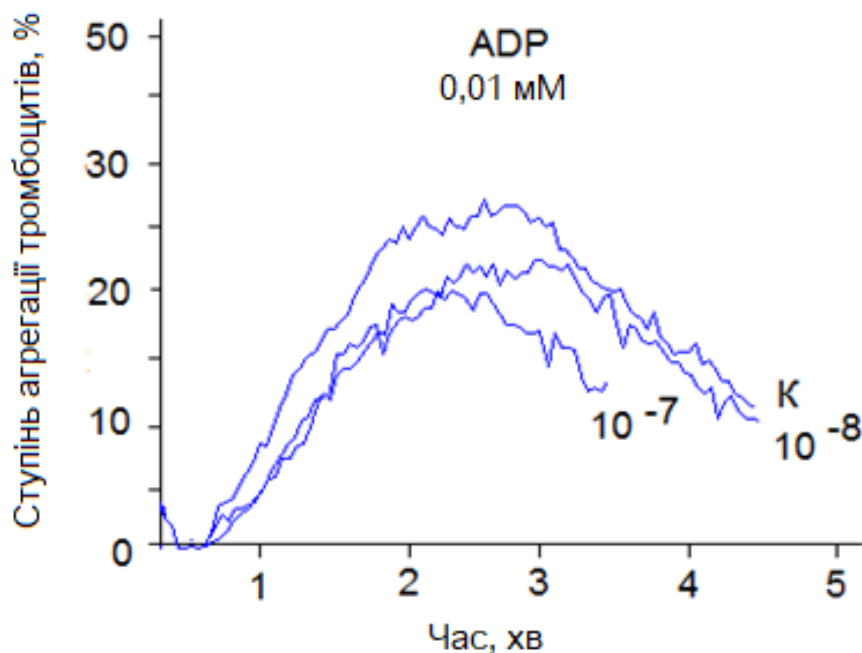


Рис. 3.32. Вплив NSE на ADP- індуквану агрегацію тромбоцитів (n=7-10).

1) **К** – “Контроль + ADP 0,01 mM”; **10^{-7}** – “Контроль + ADP 0.01mM + NSE 10^{-7} М”; **10^{-8}** – “Контроль + ADP 0.01mM + NSE 10^{-8} М”. 2) * – зміни вірогідні відносно значень у групі “Контроль + ADP 0,01 mM”.

В умовах дії ристоцетину в концентрації 0,2 мг/мл (рис. 3.34, а) застосування NSE в обох концентраціях інгібувало агрегацію тромбоцитів. При збільшенні концентрації ристоцетину в два рази (рис. 3.34, б), до 0,4 мг/мл не спостерігалось залежного від дози зростання агрегації. Однак, додавання NSE за таких умов експерименту продемонструвало що, тільки більша доза (10^{-7} М) зберігала інгібіторний ефект.

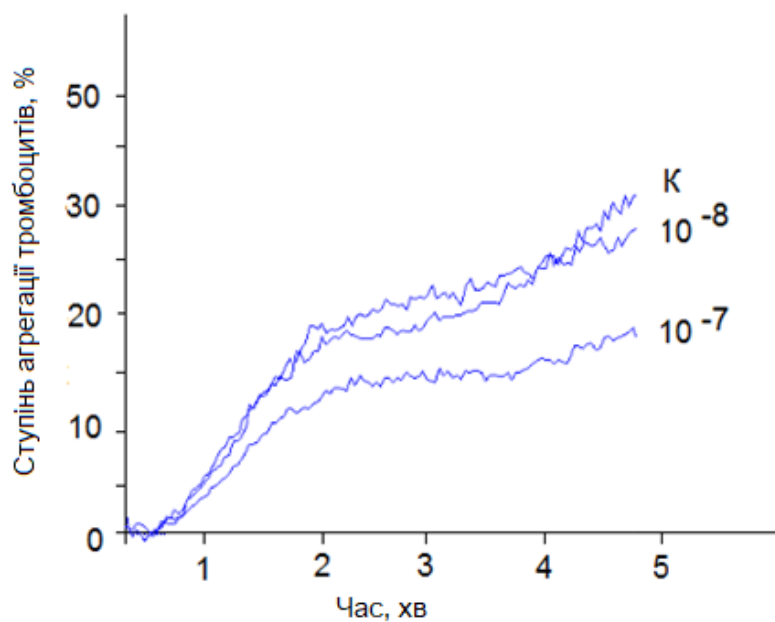


Рис. 3.33. Вплив NSE на агрегацію тромбоцитів індуковану адреналіном (n=7-10). 1) К – “Контроль + Адреналін”; 10^{-7} – “Контроль + Адреналін + NSE 10^{-7} M”; 10^{-8} – “Контроль + Адреналін + NSE 10^{-8} M”. 2) * – зміни вірогідні відносно значень у групі “Контроль + Адреналін”.

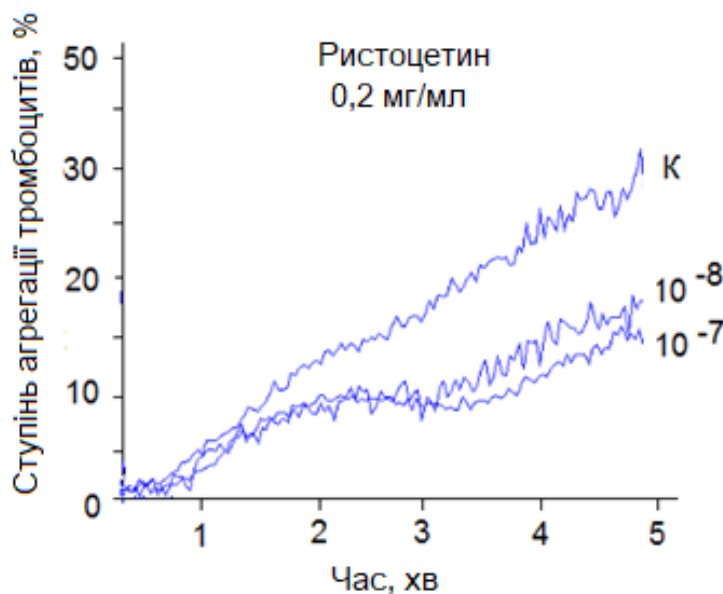


Рис. 3.34 а. Вплив NSE на агрегацію тромбоцитів, індуковану ристоцетином в концентрації 0,2 мг/мл (n=7-10).

1) К – “Контроль+ Ристоцетин 0,2 мг/мл”; 10^{-7} – “Контроль + Ристоцетин 0,2мг/мл + NSE 10^{-7} M”; 10^{-8} – “Контроль+ Ристоцетин 0,2мг/мл + NSE 10^{-8} M”; 2) * – зміни вірогідні відносно значень у групі “Контроль + Ристоцетин 0,2мг/мл”.

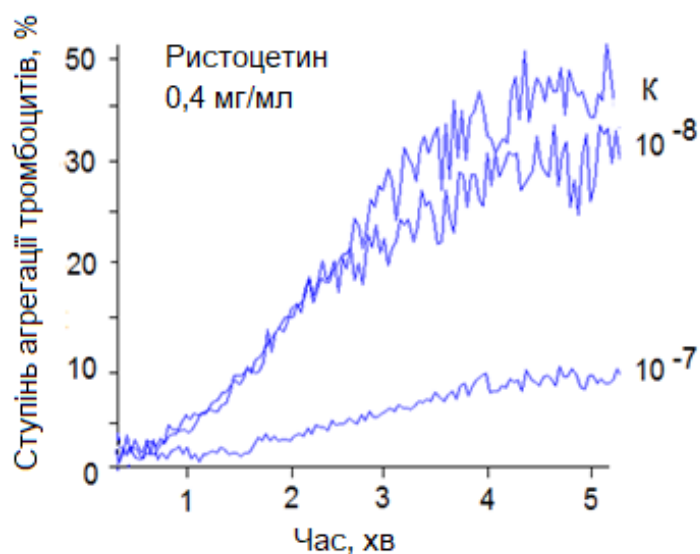


Рис. 3.34 б. Вплив NSE на агрегацію тромбоцитів індуквану ристоцетином 0,4 мг/мл (n=7-10).

1) **К** – “Контроль+ Ристоцетин 0,4 мг/мл”; **10^{-7}** – “Контроль + Ристоцетин 0,2мг/мл + NSE 10^{-7} М”; **10^{-8}** – “Контроль + Ристоцетин 0,4мг/мл + NSE 10^{-8} М”. 2) * – зміни вірогідні відносно значень у групі “Контроль + Ристоцетин 0,4 мг/мл”.

Жодного інгібіторного ефекту NAE на агрегацію тромбоцитів, індуквану «сильними» індукторами (тромбін, PAF) виявлено не було (рис. 3.35, рис. 3.36).

Отже було показано, що NSE проявляє антиагрегантний ефект в умовах застосування ADP, адреналіну, та ристоцетину в якості індукторів агрегації тромбоцитів.

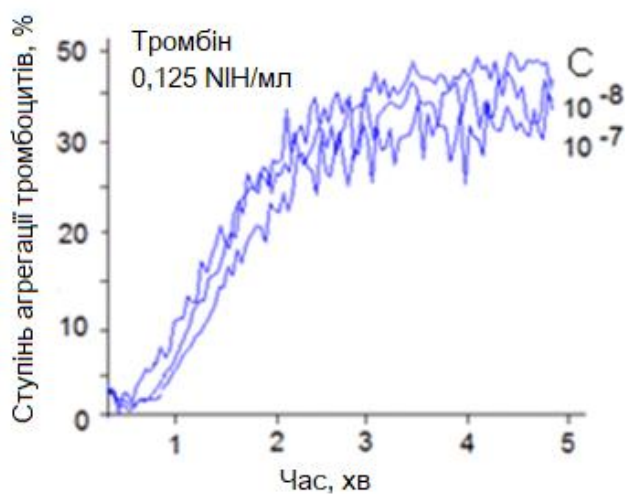


Рис. 3.35. Вплив NSE на агрегацію тромбоцитів, індуквану тромбіном 0,125 НИН/мл (n=7-10).

1) **С** – “Контроль+ Тромбін 0,125 НИН/мл”; **10^{-7}** – “Контроль + Тромбін 0,125 НИН/мл + NSE 10^{-7} М”; **10^{-8}** – “Контроль + Тромбін 0,125 НИН/мл + NSE 10^{-8} М”.

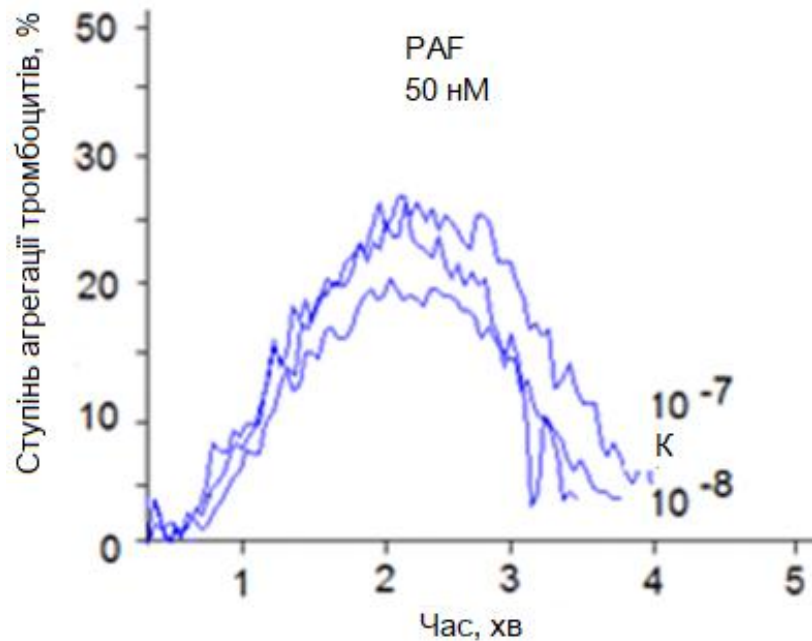


Рис. 3.36. Вплив NSE на агрегацію тромбоцитів індуковану 50 нМ PAF (platelet-activating factor – фактор, що активує тромбоцити) (n=7-10).

1) C – “Контроль+ Тромбін 0,125 NIH/мл”; 10^{-7} – “Контроль + 50 нМ PAF + NSE 10^{-7} М”; 10^{-8} – “Контроль + 50 нМ PAF + NSE 10^{-8} М”.

Щоб переконатися у специфічності ефекту NSE на тромбоцити ми синтезували близьку за структурою ліпофільну сполуку – N-олеїлетаноламін (NOE). Було проведено дослідження ADP-індукованої агрегації тромбоцитів з використанням серії концентрацій NSE та NOE – від 10^{-4} до 10^{-10} М. Було виявлено, що на відміну від NSE, NOE не володів здатністю пригнічувати агрегацію тромбоцитів (рис. 3.37).

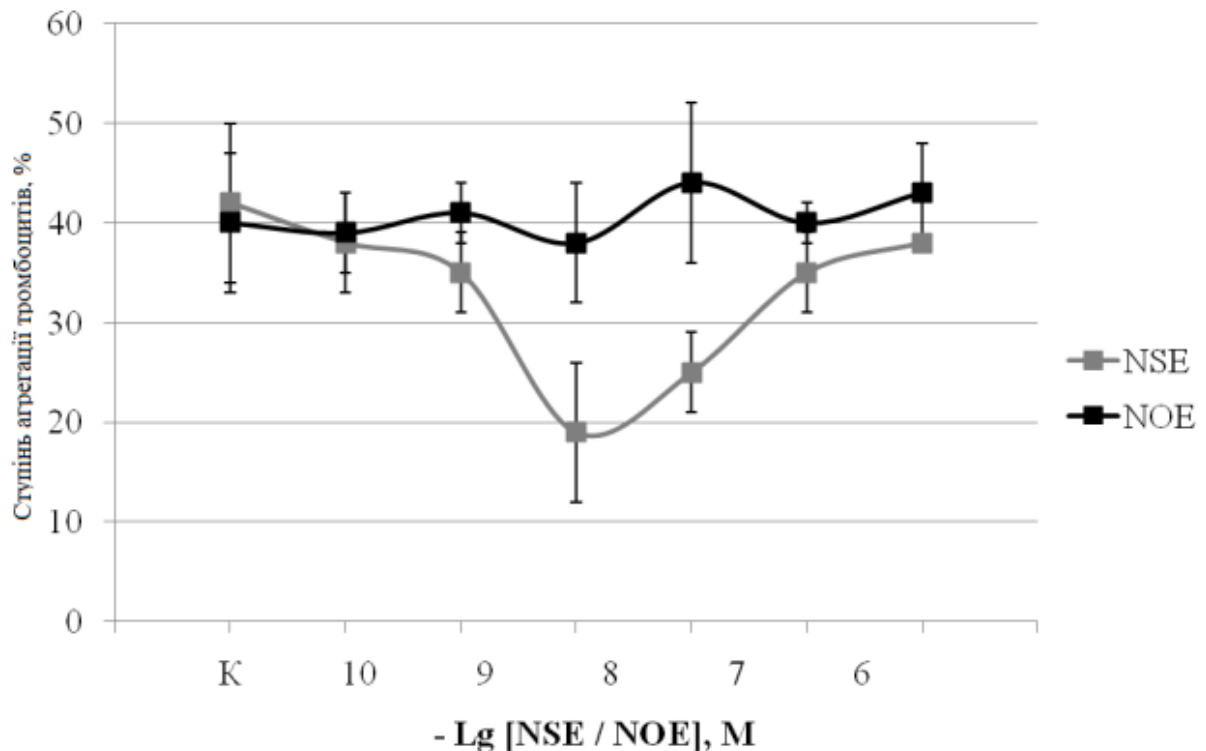


Рис. 3.37. Залежність ступеня ADP-індукованої агрегації тромбоцитів людини від кількості внесеного NSE і NOE. $p \leq 0,05$, $n = 5$.

Не дивлячись на виражені мембранопротекторні та протизапальні властивості N-стеароїлетаноламін (NSE) не активує ані TRPV1, ані CB-рецептори, але за своїми властивостями може бути зарахований до канабіміметичних сполук [198]. Його біологічну активність пов'язують з активацією рецептора PPAR γ (рецептор, що активується пероксисомним активатором γ) [199]. Цей рецептор було зокрема знайдено і на тромбоцитах [200].

Таким чином, вперше виявлений нами специфічний інгібуючий ефект на агрегацію тромбоцитів може бути пов'язано з дією NSE на активацію рецептора PPAR γ . Його подальше дослідження дозволить розкрити природу цитопротекторної дії NSE.

Вивчення дії NSE на зв'язування тромбоцитів та фібриногену. Для вивчення зв'язування тромбоцитів з фібриногеном, яке є неодмінною умовою їхньої агрегації, було розроблено підхід з використанням непрямого імуноензимного аналізу (рис. 3.38).

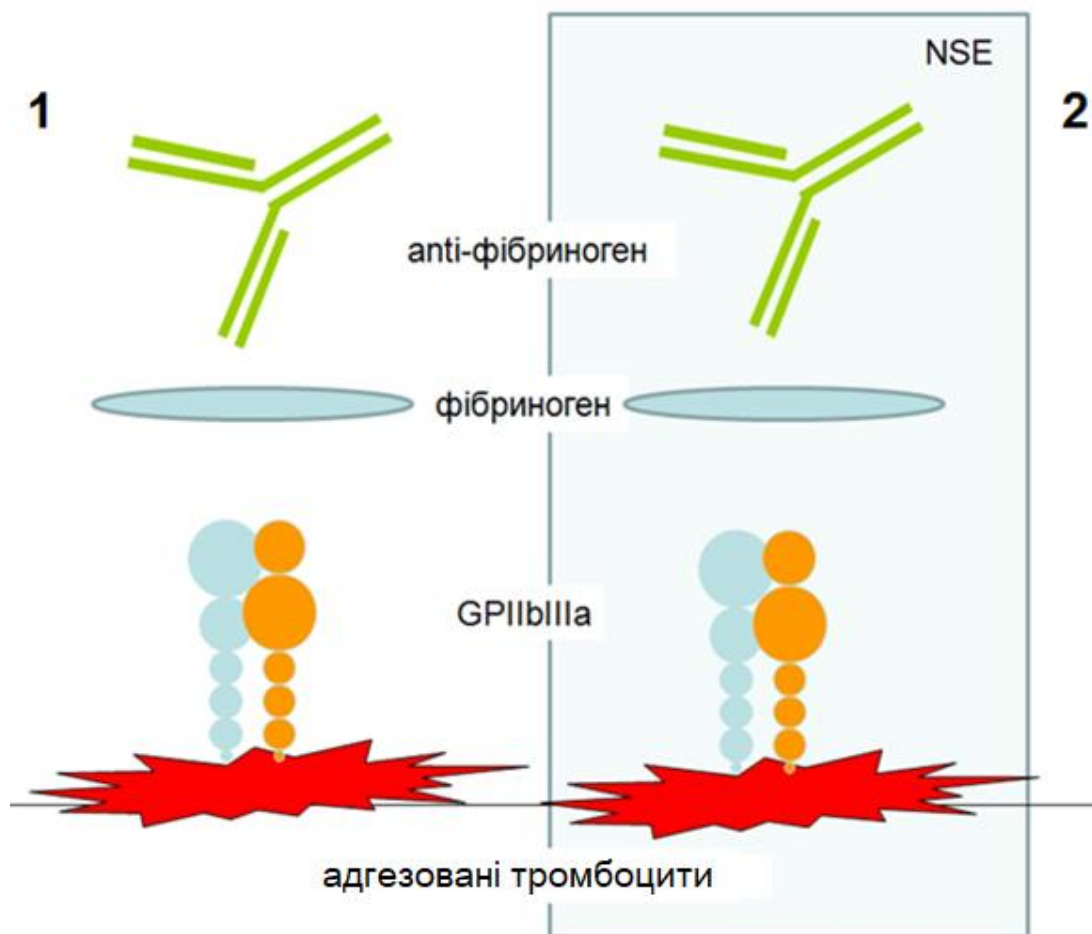


Рис. 3.38. Вивчення ефектів NSE на зв'язування фібриногену з активованими адгезованими тромбоцитами. Непряма сендвіч-ELISA:

- 1 – зв'язування фібриногену з активованими тромбоцитами;
- 2 – зв'язування фібриногену з тромбоцитами, активованими в присутності NSE (10^{-7} M).

Було продемонстровано, що за концентрацій NSE 10^{-7} та 10^{-8} M зв'язування фібриногену з адгезованими тромбоцитами зменшувалося на 25-30 % порівняно з контролем. NSE в концентрації 10^{-6} та 10^{-9} M не впливав на зв'язування фібриногену з адгезованими тромбоцитами, що підтверджує дані агрегатометрії (рис. 3.39 a).

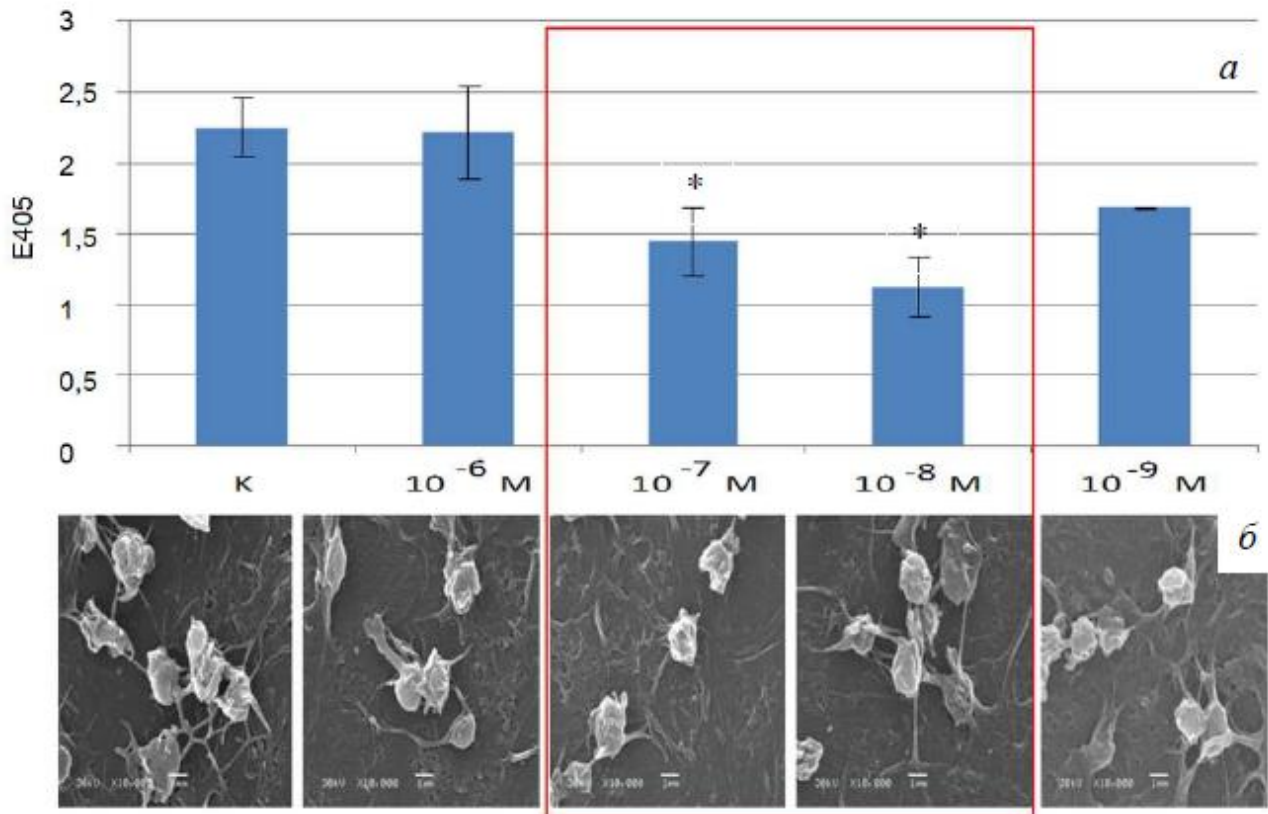


Рис. 3.39. Непряма сендвіч-ELISA зв'язування фібриногену з активованими тромбоцитами (а) за присутності різних концентрацій NSE; зв'язування тромбоцитів з фібриногеном, сорбованим на пластику (б) за присутності різних концентрацій NSE.

За даними скануючої електронної мікроскопії, значної зміни ступеня адгезії тромбоцитів до вкритої фібриногеном поверхні не спостерігали (рис. 3.39, б). 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 і фібриногену.

Активация тромбоцитів за присутності NSE. З метою вивчення дії NSE на етап активації тромбоцитів ми вивчали його дію на відповідь тромбоцитів на дію агоністів, що стимулюють клітини опосередковано G-протеїн спряженими рецепторами, наприклад, на монотропні та метаботропні пуринергічні рецептори P2X та P2Y, та зокрема вивчали секрецію під дією ристоцетину та колагену. Ефект NSE *per se* на ацидифікацію тромбоцитарних секреторних гранул

оцінювали за допомогою рН-чутливого зонду акридину оранжевого. Застосування NSE (10^{-8} and 10^{-7} M) або еквівалентного об'єму DMSO не впливало на протонний градієнт секреторних гранул тромбоцитів. Вивчали також наслідки попередньої інкубації тромбоцитів з NSE (10^{-7} M). Активували тромбоцити ADP (0,3 μ M), ристоцетином (0,4 мг/мл), епінефрином (0,6 мкг/мл) чи колагеном (0,5 мг/мл) та визначали відсоток вивільненого зонду у порівнянні з загальною кількістю акумульованого зонду.

ADP у концентрації 2 μ M викликав швидкий викид компонентів тромбоцитарних гранул. Було показано, що присутність 10^{-7} M NSE не впливало на цей процес. Однак, використання нижчих доз ADP (0,3 μ M) дозволило виявити достовірне зниження рівню викиду компонентів тромбоцитарних гранул $20,8 \pm 4\%$ у порівнянні з контролем (рис. 3.40, *a*).

Епінефрин-індукована агрегація тромбоцитів (рис. 3.40, *б*) була частково заінгібована 10^{-7} M NSE ($9,5 \pm 2,1\%$ проти $11,3 \pm 2,4\%$ у контролі). Ефекти низьких доз ADP та епінефрину на активацію тромбоцитів добре узгоджуються з даними агрегатометрії (рис. 3.40, *б*).

Іншим підходом було вивчення ристоцетин-індукованої дегрануляції тромбоцитів, опосередкованої взаємодією з фактором фон Вілебранда та глікопротеїном Ів. Цей спосіб активації пов'язано зі значною роллю сигналіngu «зовні-всередину». Було виявлено, що присутність NSE (10^{-7} M) суттєво інгібувала рівень дегрануляції – $33,3 \pm 3,5\%$ проти $44,8 \pm 4,2\%$ у контролі (рис. 3.40, *з*). Виявлений ефект узгоджується зі значним інгібуванням ристоцетин-індукованої агрегації тромбоцитів. Також було виявлено (рис. 3.40, *в*) помірне інгібування NSE дегрануляції тромбоцитів, стимульованої низькими дозами колагену (0,5 мг/мл).

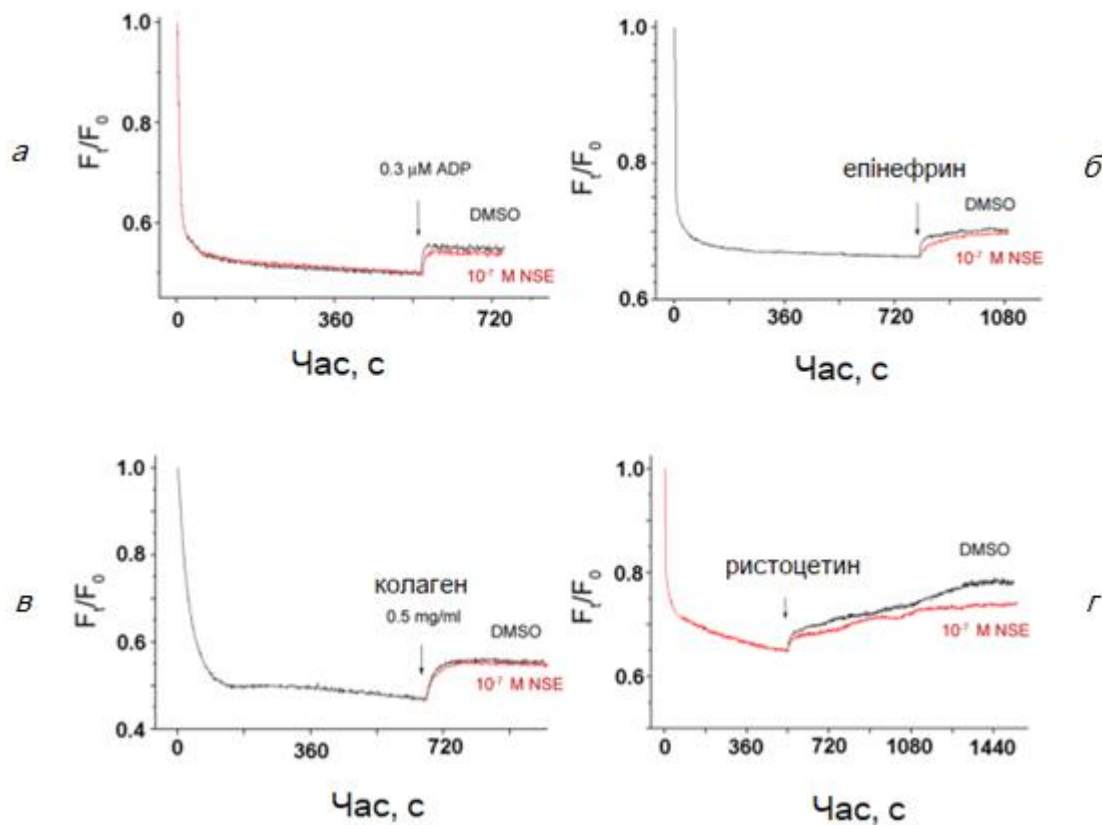


Рис. 3.40. Вивільнення тромбоцитами компонентів гранул під час індукованої активації за присутності NSE. Тромбоцити навантажували рН-чутливим зондом акридином оранжевим за присутності DMSO (контроль) та еквівалентного об'єму 10^{-7} M NSE та стимулювали $0,3 \mu\text{M}$ ADP (а), $0,6 \text{ мкг/мл}$ епінефрину (б), $0,5 \text{ мг/мл}$ колагену (в) або $0,4 \text{ мг/мл}$ ристоцетину (г). Криві типові для 5 експериментів.

Попередні експерименти з вивчення агрегації тромбоцитів за присутності NSE підтвердили висновки, зроблені за допомогою спектрофлуориметрії. Було виявлено найбільш яскравий ефект NSE на агрегацію та дегрануляцію тромбоцитів, індуковану низькими дозами ADP, епінефрином та ристоцетином.

PAF, тромбін і ADP діють через G протеїн-спарені рецептори і викликають активацію фосфоліпази PLCA_2 та $\text{PLC}\beta$. Колаген і ристоцетин (у комплексі з фактором фон-Вілебрандта) зв'язуються з інтегриновими рецепторами GPVI і GPIb-IX-V відповідно, та через кінази та адапторні протеїни стимулюють $\text{PLC}\gamma$ та збільшують продукцію інозитом-3-фосфату (IP_3). Останній взаємодіє з IP_3 -рецептором і стимулює вивільнення внутрішньоклітинного кальцію, який є одним з головних месенджерів активації тромбоцитів. Мала GTP-аза Rap1b

контролюється йонами Ca^{2+} та DAG-регульованим фактором I обміну гуанінових нуклеотидів (CalDAG-GEFI). Всі ці молекули є важливими в регуляції функції інтегринових рецепторів [201]. Зв'язування таліну і кіндліну з цитоплазматичними доменами $\beta 3$ -інтегринів призводить до конформаційних змін у екстрацелюлярному домені, що збільшує їхню афінність до лігандів, таких як фібриноген.

Порівняння дії NSE на активацію та агрегацію тромбоцитів різними агоністами показало, що інгібувальний ефект був найбільш виразний для тих індукторів, дія яких прямо чи опосередковано реалізується через інтегринові рецептори. Оскільки для ефективного функціонування цих рецепторів необхідна кластеризація та мобільність у їхній трансмембранній частині, можна припустити, що окрім специфічної дії через $\text{PPAR}\gamma$ -рецептор, NSE може модулювати мембранну плинність, тим самим гальмуючи агрегацію тромбоцитів.

Таким чином, у ході роботи було вперше показано здатність Н-стероїлетаноламіну (NSE) інгібувати агрегацію та дегрануляцію тромбоцитів активованих ристоцетином на 35 % та 25 % відповідно. Надалі необхідно було дослідити роль NSE у зв'язуванні фібриногену з активованими та адгезованими тромбоцитами.

Для досягнення поставленої мети було застосовано метод імуноензимного аналізу. Тромбоцити людини були адгезовані у 96-лунковому полістирольному планшеті. Після адгезії до лунок було додано буферний розчин, який містив ADP та NSE. Після експозиції з ADP та NSE буфер замінювали з додаванням фібриногену. Після чого відмивали та проявляли моноклональними антитілами, міченими пероксидазою хрому.

Було продемонстровано, що за концентрацій NSE 10^{-7} та 10^{-8} М зв'язування фібриногену з адгезованими тромбоцитами зменшувалося на 25-30% порівняно з контролем. NSE в концентрації 10^{-6} та 10^{-9} М не впливав на зв'язування фібриногену з адгезованими тромбоцитами, що підтверджено результатами агрегатометрії. За даними скануючої електронної мікроскопії тромбоцити за присутності NSE в концентраціях 10^{-6} та 10^{-9} М менше зв'язувалися з покритою фібриногеном поверхнею та переважно зберігали округлу форму. Здатність NSE

інгібувати агрегацію тромбоцитів, насамперед, пов'язано з прямим інгібуванням зв'язування тромбоцитів і фібриногену.

3.3.4. Інгібітори циклооксигенази

Активація, агрегація та дегрануляція тромбоцитів стає потужним поштовхом для лавиноподібної активації каскаду зсідання крові та генерації тромбіну. Активовані тромбоцити разом із утвореною сіткою полімерного фібрину формують тромб. Для попередження патологічного тромбоутворення застосовують препарати антиагрегантної дії, які знайшли широке застосування у медичній практиці, серед них відомі, зокрема, інгібітори циклооксигенази, ADP-та GPIIb/IIIa-рецепторів ($\alpha_{IIb}\beta_3$).

Циклооксигеназа – це гемвмісний мембранозв'язаний ензим з молекулярною масою 70 kDa. Під його дією арахідонова кислота перетворюється на нестабільні простагландин G2 та H2, які необхідні для утворення тромбоксана A2, важливого медіатора агрегації тромбоцитів.

Найвідомішим інгібітором циклооксигеназ, який застосовується у тому числі для зниження ризику тромбоутворення, є аспірин. Саме тому резистентність до аспірину, яка за даними зустрічається у 40 % пацієнтів, є самостійним фактором ризику повторного тромбоутворення під час лікування інфаркту міокарду та інших тромботичних ускладнень.

Тому пошук нових низькомолекулярних інгібіторів циклооксигенази для лікування пацієнтів, у яких виявлено резистентність до дії аспірину, є актуальним питанням сучасної біотехнології. Відтак у Інституті молекулярної біології та генетики НАН України було синтезовано низку сполук, які за даними молекулярного докінгу *in silico* є потенційними інгібіторами циклооксигеназ.

Нами було проаналізовано 30 таких сполук та вивчено їх дію на ADP-індуковану агрегацію тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові людини.

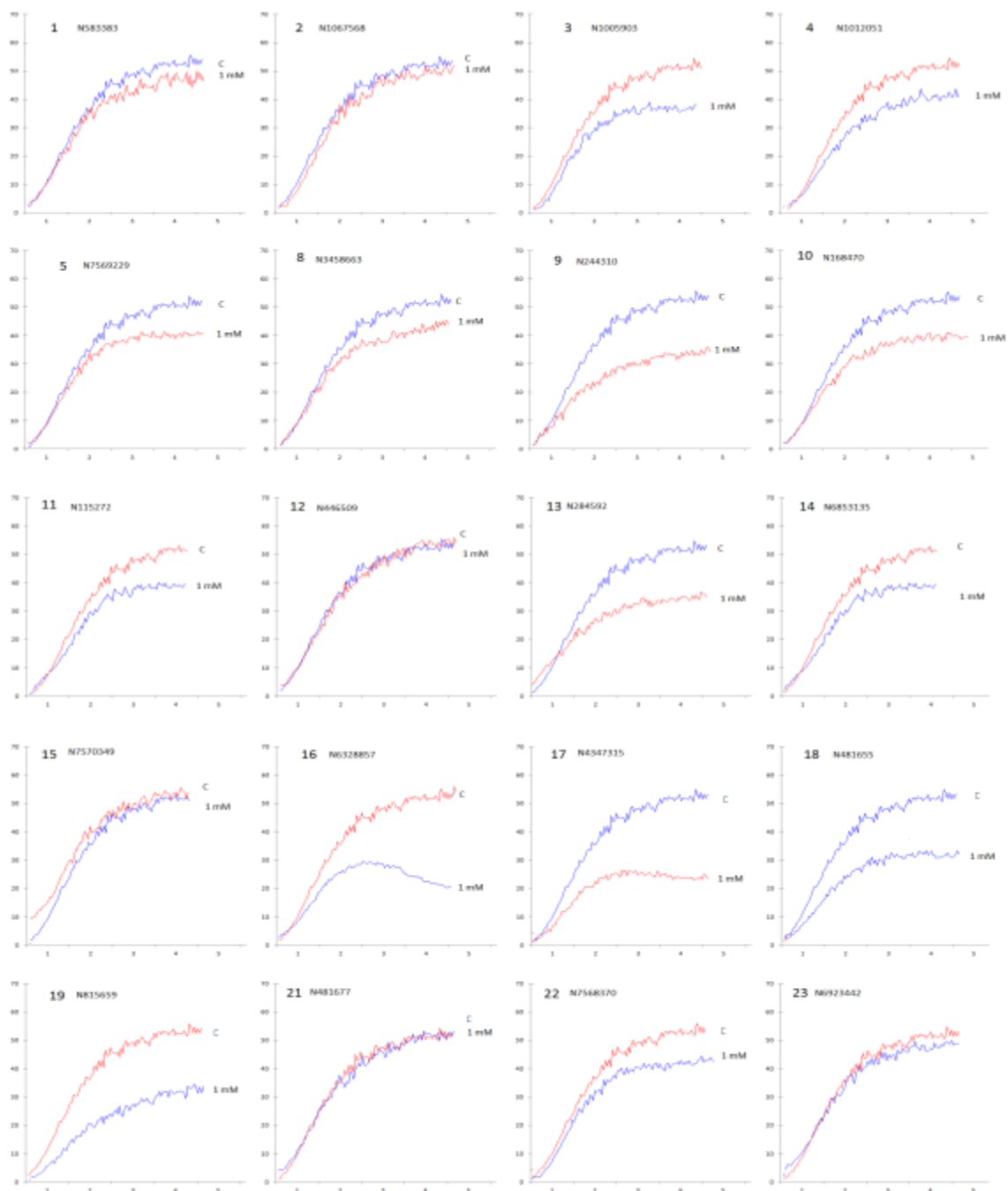


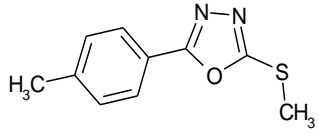
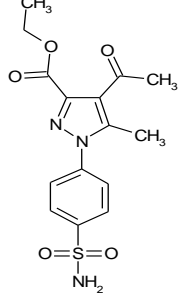
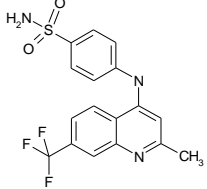
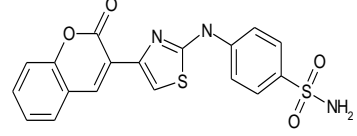
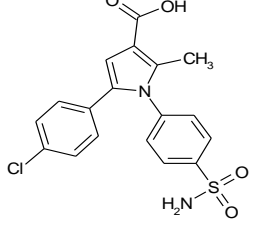
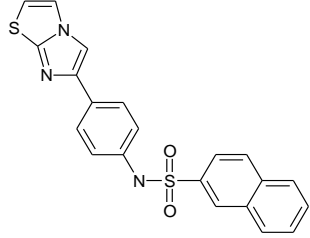
Рис. 3.41. Агрегація тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові за присутності 1 мМ синтетичних інгібіторів, порівняно з контролем (К).

Сполуки-інгібітори було розчинено у DMSO, кінцева концентрація стокового розчину всіх сполук – 0,1 М. У пробу зі збагаченою тромбоцитами плазмою крові людини вносили 3 мкл розчину при загальному об'ємі проби 300 мкл, таким чином кінцева концентрація сполук у пробі була 0,001 М. У контрольну пробу вносили еквівалентну кількість DMSO. Агрегацію тромбоцитів ініціювали внесенням 12,5 μM ADP. Сполуки, які не розчинялися у DMSO або

при внесенні у збагачену тромбоцитами плазму крові, утворювали нерозчинні агрегати до аналізу не брали. Було показано, що сполуки номер 17, 16, 19 та 9 ефективно інгібували процес агрегації тромбоцитів (рис. 3.41).

Таблиця 3.3

Характеристика деяких сполук, які виявляли максимальний інгібіторний ефект (17, 16, 19, 9) на агрегацію тромбоцитів та сполук, які не інгібували цього процесу (23, 12).

Номер	Номер сполуки	Хімічна формула	Молекулярна маса
17	4347315		206,268
16	6328857		351,38384
19	815659		381,37923
9	244310		399,45001
23	6923442		390,84825
12	446509		405,5006

Як видно з таблиці 3.3, тестовані сполуки різняться за своєю структурою, але всі мають як гідрофобні, так і заряджені групи. Сполука 16, що не лише пригнічує агрегацію тромбоцитів, але й спричиняє їх слабку дезагрегацію, несе на собі найбільше негативних зарядів. Відомо, що саме негативно заряджені сполуки (фосфоліпіди мембран та гепарини) відіграють важливу роль в регуляції системи гемостазу.

Таким чином, проведено скринінг тридцяти низькомолекулярних сполук-інгібіторів циклооксигенази за їхньою здатністю інгібувати ADP-індуковану агрегацію тромбоцитів у багатій тромбоцитами плазмі крові людини. Визначено дві сполуки, які виявляли максимальний інгібіторний ефект. Надалі, виходячи зі структури відібраних сполук, буде проведено синтез потенційних інгібіторів агрегації тромбоцитів.

3.4. Наночастинки

3.4.1. Наночастинки силіцію

Завдяки своїй великій сорбційній ємності ($300 \text{ м}^2/\text{мг}$) наночастинки силіцію 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.

Нами було виявлено здатність наночастинок силіцію безпосередньо активувати тромбоцити у збагаченій тромбоцитами плазмі крові без додаткового стимулювання (рис. 3.42). Ця знахідка відкриває перспективи використання діоксиду силіцію як компонента кровоспинних засобів.

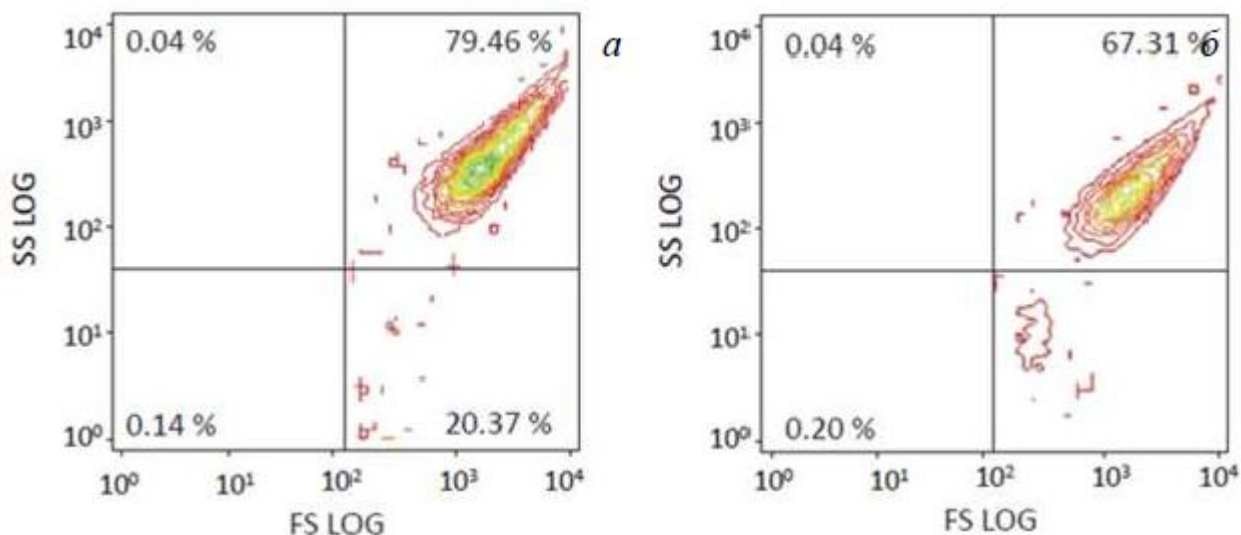


Рис. 3.42. Типовий розподіл тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові відповідно до фронтального (FS) та бічного (SS) світлорозсіювання за присутності 1 мг/мл наночастинок діоксиду силіцію (В); А – контрольна проба. В – через 2 години інкубації.

Цікаво, що наночастинок діоксиду силіцію мають інгібувальну дію на процеси агрегації тромбоцитів (рис. 3.43). Шляхом вивчення агрегації відмитих тромбоцитів за присутності різних концентрацій фібриногену нами було показано, що цей ефект пов'язано із сорбцією фібриногену (рис. 3.44).

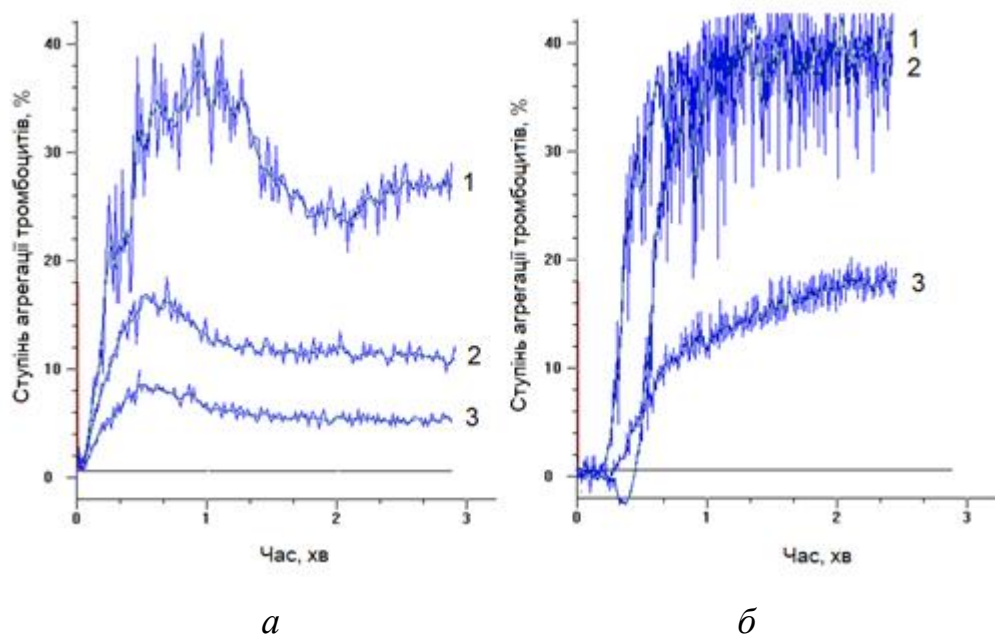


Рис. 3.43. Агрегатограми ADP-індукованої (а) та колаген-індукованої (б) агрегації тромбоцитів за присутності препарату наночастинок силіцію. 1 – контроль, 2 – 0,1 мкг/мл, 3 – 1 мкг/мл.

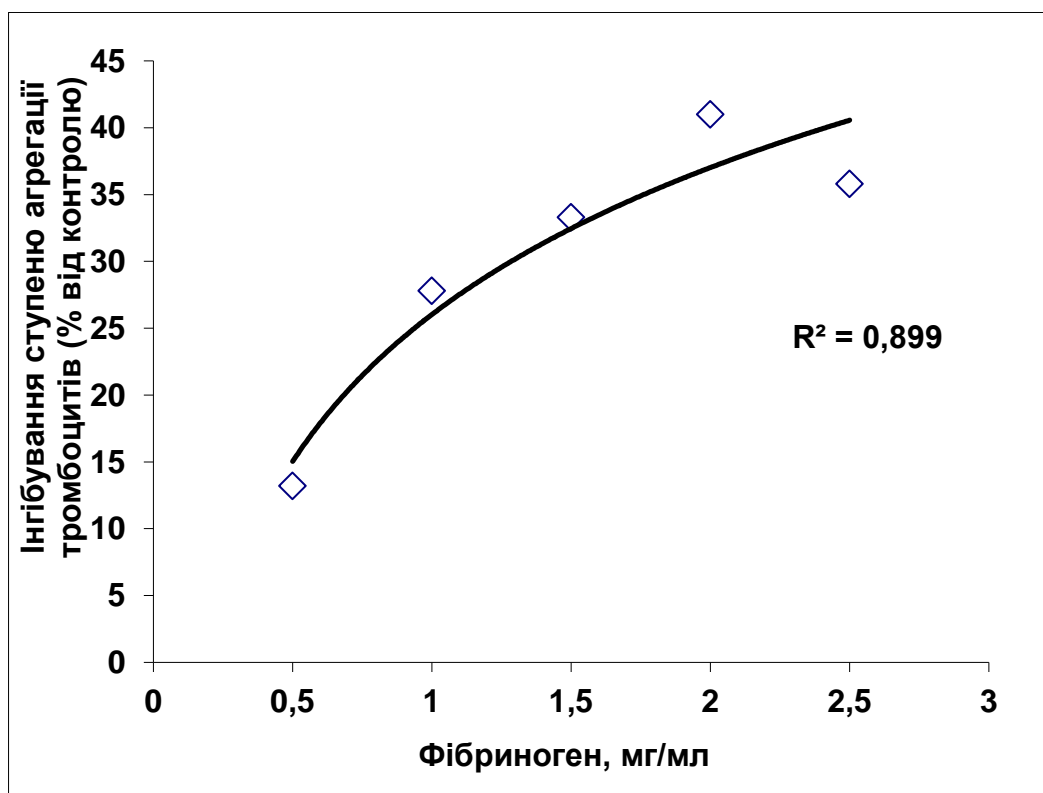


Рис. 3.44. Залежність ступеня інгібування ADP-індукованої агрегації відмитих тромбоцитів діоксидом силіцію (10 мкг/мл) від концентрації фібриногену.

3.4.2. Нанодіаманти

Наші дослідження було присвячено вивченню впливу нанодіамантів на компоненти системи зсідання крові та тромбоцити. На першому етапі було проведено вивчення сорбційних властивостей нанодіамантів, зокрема їхньої здатності сорбувати фібриноген з плазми крові. Було показано, що інкубація плазми крові людини з 100 мкг/мл суспензії нанодіамантів протягом 30 хв призводить до зниження концентрації фібриногену вдвічі (рис. 3.45).

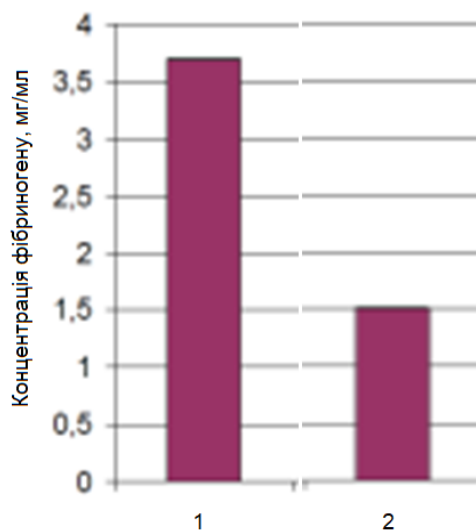


Рис. 3.45. Порівняння здатності нанодіамантів сорбувати фібриноген в плазмі крові людини. 1 – плазма крові; 2 – плазма крові, проінкубована з суспензією нанодіамантів (0,1 мг/мл).

На наступному етапі було проведено дослідження впливу *in vitro* нанодіамантів на процес активації факторів внутрішнього та зовнішнього шляхів зсідання крові.

У випадку додавання до плазми крові нанодіамантів спостерігали посилення активації факторів зовнішнього та внутрішнього шляху зсідання крові під дією активаторів: тромбопластину, екамуліну та реагенту АЧТЧ (рис. 3.46).

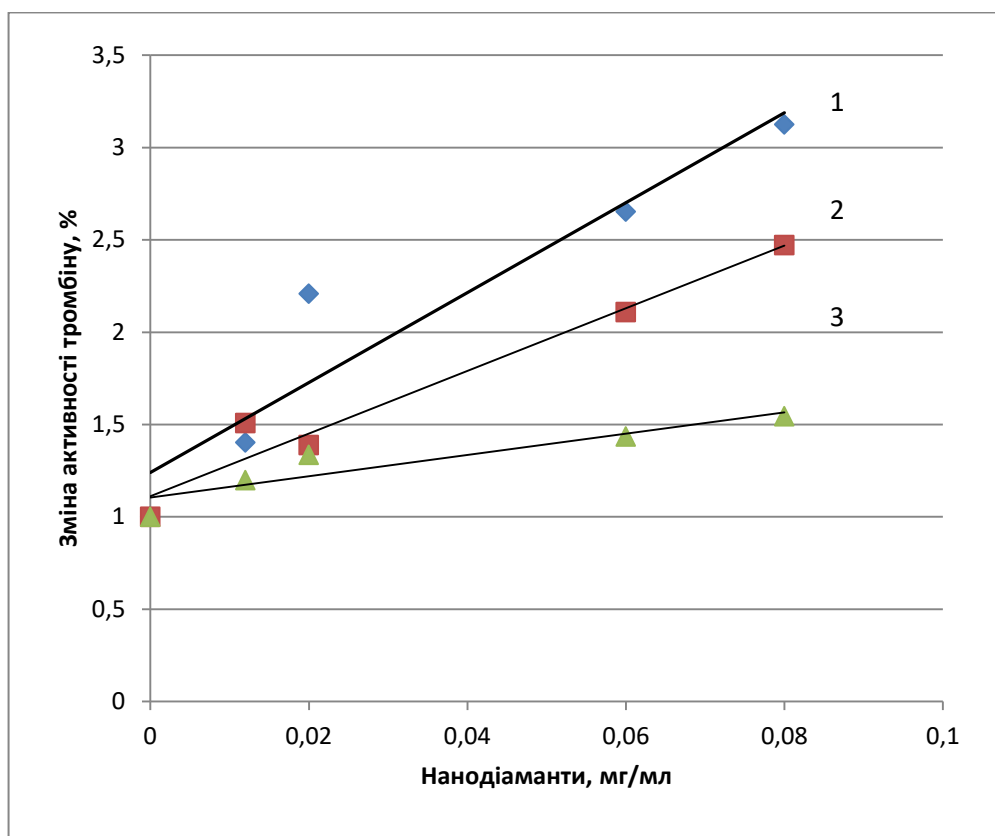


Рис. 3.46. Відносна активність тромбіну щодо хромогенного субстрату S2238 при активації протромбіну в плазмі крові реагентом АЧТЧ (1), тромбoplastином (2) та екамуліном (3) за присутності різних концентрацій нанодіамантів.

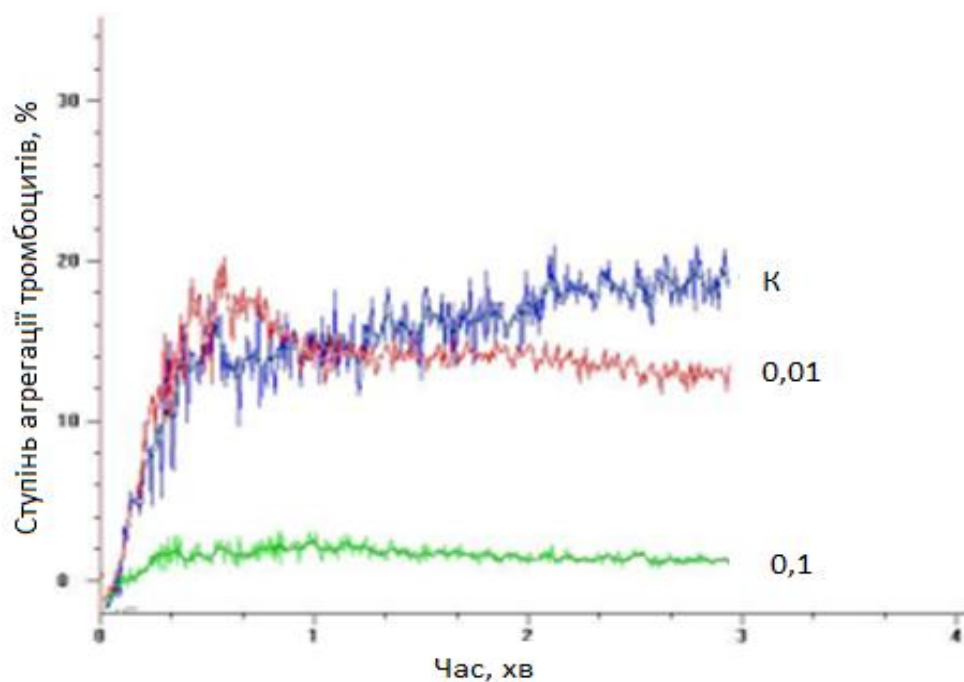


Рис. 3.47. Типові криві ADP-індукованої агрегації тромбоцитів людини, отримані за присутності 0,01 мг/мл та 0,1 мг/мл суспензії нанодіамантів.

З метою дослідження впливу нанодіамантів на ступінь агрегації тромбоцитів в умовах *in vitro* було створено модельні системи з використанням плазми крові людини, збагаченої тромбоцитами. Як індуктор агрегації використовували колаген та ADP в концентрації 0,2 мг/мл та 12,5 μM відповідно. До інкубаційної суміші для дослідження процесу агрегації входили плазма крові, збагачена тромбоцитами; нанодіаманти; 0,001 М хлориду кальцію.

За присутності нанодіамантів зміна ступеню агрегації тромбоцитів є концентраційно залежною: чим вище концентрація наночастинок, тим більше зниження ступеню агрегації тромбоцитів (рис. 3.47).

Таким чином, за присутності нанодіамантів відбувається прискорення активації факторів зсідання крові та зниження ступеню агрегації тромбоцитів. Останній процес є концентраційно залежним і пов'язаний з сорбцією фібриногену.

3.4.3. Фулерени

Фулерен C₆₀ – унікальна органічна сполука, яка була вперше синтезована 1985 року. Це третя після графіту і алмазу форма чистого вуглецю. Її молекулу можна уявити як сферичний багатогранник, складений із 20 шестикутників і 12 п'ятикутників, з атомами вуглецю в кожній із його 60 вершин. По суті, це модель футбольного м'яча, зменшеного приблизно в мільярд разів.

Виконані в останні роки експериментальні дослідження фізико-хімічних властивостей фулеренів вказують на широкі, а інколи унікальні перспективи їх практичного використання, зокрема, в мікроелектроніці (гетерофулерени як основа для нових надпровідників та фотоелектронних приладів), медицині (фулерени як сорбенти, нанотрубка як засіб транспортування в клітину лікувальних препаратів), техніці (фулерени як основа для синтезу штучних алмазів, фулерени як домішки до мастильних матеріалів). Фулерен C₆₀ володіє надзвичайно цікавими фізичними та біологічними властивостями:

- проникає через ліпідну мембрану;
- модулює транспорт йонів;

- не діє на еритроцити та не має цитотоксичної дії;
- здатен акумулювати вільні радикали;
- виявляє протипухлинну дію.

Унікальні мембранотропні властивості та нетоксичність фулерена C₆₀ робить можливим його використання як протипухлинного агента та носія терапевтичних препаратів. Водночас, необхідно оцінити дію C₆₀ на організм в цілому, зокрема на кровообіг, який є інтегральною системою організму. Оскільки фулерен C₆₀, як і ряд терапевтичних сполук, може інфільтруватися в кров або ж безпосередньо вводиться в кровоплин з лікувальною метою, вивчення його взаємодії з системою кровообігу є першочерговим завданням доклінічних випробувань.

Тому метою роботи була оцінка дії фулерену C₆₀ на ключові протеїни системи гемостазу та на тромбоцити.

Дія C₆₀ на фібриноутворення в коагуляційних тестах. Полімеризація фібрину – складний процес, що завершує каскад ензимативних реакцій зсідання крові. При активації системи зсідання крові активується тромбін, який атакує вільно плаваючий у крові розчинний протеїн фібриноген і відщеплює від нього фібринопептиди А, перетворюючи його на нерозчинний фібрин. Мономери фібрину з'єднуються латерально, формуючи протофібрили. Ті, у свою чергу, асоціюють з утворенням фібрил, які разом з тромбоцитами складають каркас тромбу.

Вивчали дію фулерена C₆₀ на полімеризацію фібрину в плазмі крові, виконуючи тести ТЧ та АЧТЧ. У якості позитивного контролю використовували калікс[4]арен С-145, який володіє яскраво вираженими антиполімеризаційними властивостями (див. Розділ 5).

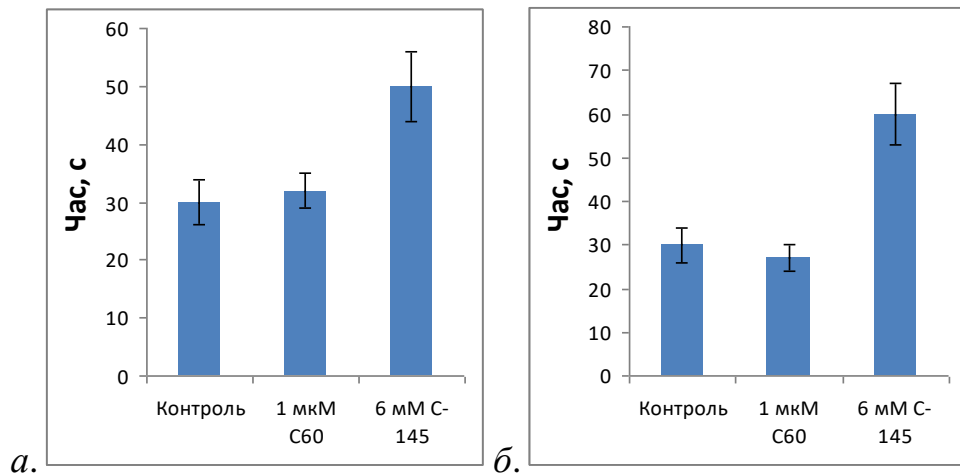


Рис. 3.48. Час утворення згустку в тестах тромбіновий час (а) та активований частковий тромбoplastиновий час (б) в присутності фулерену С60 (3 μM) та калікс[4]аренуС-145 (6 мМ).

Було показано, що фулерен С60 не володів здатністю модифікувати час зсідання плазми крові людини в тестах ТЧ та АЧТЧ (рис. 3.48). В той же час спостерігали подовження часу зсідання під дією калікс[4]арену С-145. Обидві сполуки було взято у концентраціях, які пропонуються для терапевтичного використання.

Вплив фулерену С60 на активацію протромбіну, фактора X та протеїну С. Для оцінки дії фулерену С60 на каскад системи зсідання крові визначали активацію ключових проензимів (протромбіну та фактору X). Ці вітамін К-залежні глікопротеїни циркулюють в кровотоці людини як проензими. Активована форма фактора X – фактор Ха, який з’являється внаслідок запуску каскаду системи зсідання крові. У комплексі з фактором Va і фосфоліпідною мембраною фактор Ха активує протромбін з утворенням активного тромбіну, який перетворює фібриноген на фібрин.

Активацію протромбіну та фактора X визначали за допомогою активатора протромбіну з отрути ефі багатолускової – екамуліну та активатора фактора X з отрути гадюки Рассела RVV відповідно. Для цього змішували 0,01 мл досліджуваної плазми крові, 0,015 мл S2238 (S2275 у випадку фактора X), 0,01 мл розчину CaCl_2 (0,025 M) з 0,01 мл екамуліну (RVV у випадку фактора X) в 0,05 M трис-НСІ буфері рН 7,4. Загальний об’єм реакційної суміші складав 0,25 мл.

Було показано, що фулерен С60 не впливає на процес активації протромбіну та фактору X екамуліном та RVV відповідно (Рис. 3.49).

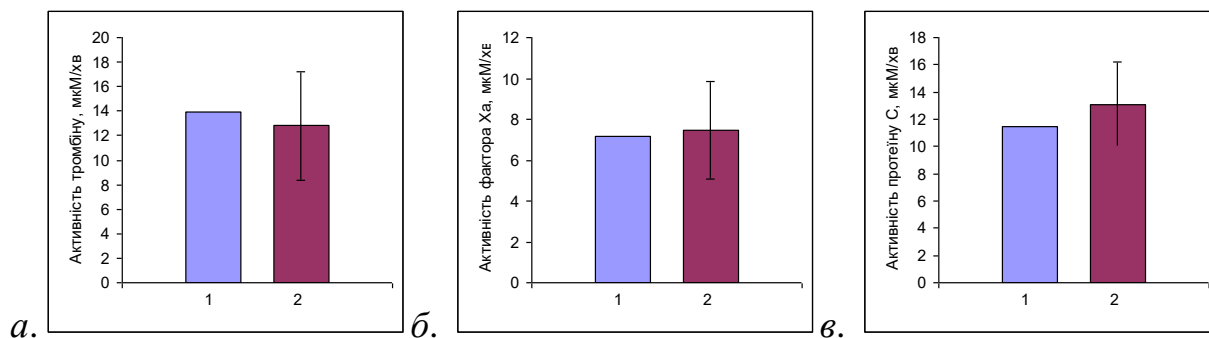


Рис. 3.49. Активність тромбіну (а), фактора Ха (б) та протеїну С (в) за відсутності (1) та в присутності 1 μМ (2) С60.

Для аналізу дії фулерену С60 на антикоагулянтну систему визначали активацію протеїну С в плазмі крові за його присутності. Активність протеїну С визначали за допомогою хромогенного субстрату S2236 («GE-Healthcare», США). Для цього змішували 0,03 мл досліджуваної плазми крові, 0,035 мл S2236 з 0,05 мл активатора протеїну С («Ренам», Росія) в 0,05 М трис-НСІ буфері рН 7,4. Загальний об'єм реакційної суміші складав 0,21 мл. Швидкість розщеплення субстрату визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 405-495 нм на рідері Multiscan EX. Як показано на рис. 3.15 в, фулерен С60 впливу на активацію протеїну С не мав.

Для оцінки безпосередньої дії фулерену С60 на утворення та лізис фібринового згустку проводили турбідиметричні дослідження та визначали загальний гемостатичний потенціал за його присутності.

Загальний гемостатичний потенціал дозволяє також оцінити стан системи фібринолізу. Фібриноліз – це процес розщеплення фібринового згустку плазміном, який перебуває у плазмі крові в неактивному стані у вигляді плазміногену. Під впливом кров'яних і тканинних активаторів плазміногену відбувається його активація .

Загальний гемостатичний потенціал плазми крові визначали спектрофотометрично шляхом реєстрації світлорозсіювання фібринового згустку, що утворювався у спектрофотометричній кюветі, в яку послідовно додавали до

0,05 М НЕРЕС-буферу рН 7,4 з 0,15 М NaCl та 0,005 М CaCl₂ 12 мкл плазми крові людини, ТАП до кінцевої концентрації 75 од/мл. Вимірювання проводили за довжини хвилі 350 нм. Ініціювали процес зсідання додаванням 5 мкл тромбопластину.

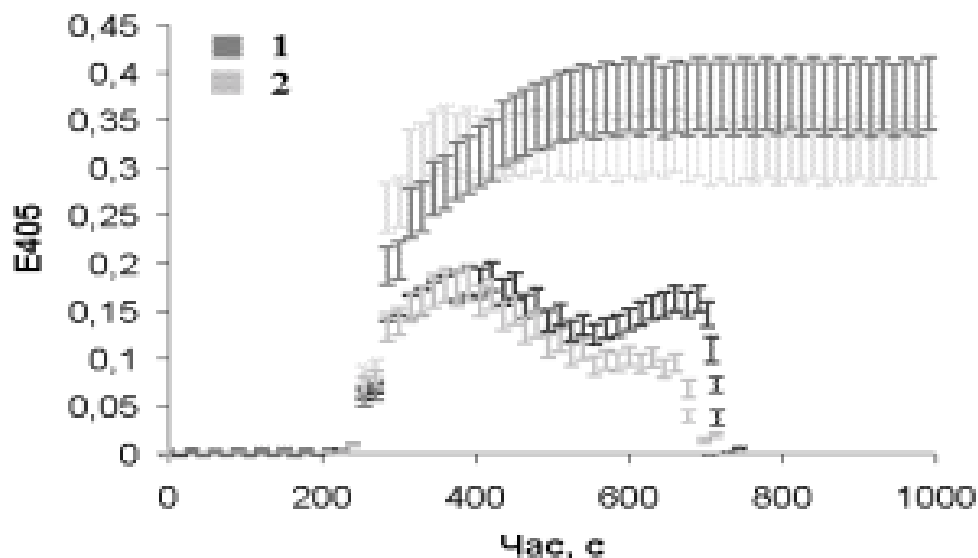


Рис. 3.50. Загальний гемостатичний потенціал плазми крові (1) у присутності 1 мМ фулерену C60 (2).

Було показано, що фулерен C60 не впливає на утворення фібринового згустку та достовірно не модифікує процес його розщеплення (рис. 3.50.).

Ковалентна прошивка фXIIIa. Одним із важливих процесів, залучених до формування фібрил, є їхня ковалентна прошивка, або ж стабілізація. Стабілізацію фібрил за присутності йонів Ca²⁺ здійснює фактор XIIIa шляхом ковалентної прошивки γ- та α-ланцюгів сусідніх молекул.

Ковалентну прошивку вивчали за допомогою електрофоретичного методу. Готували ряд мікропробірок фібриноген (2 мг/мл), CaCl₂ (0,025 М), полімеризацію фібрину індукували тромбіном (0,5 NIH/мл). Через 30, 60, 90, 120 хв зупиняли реакцію внесенням буферу для зразків, який містив 0,2% β-меркаптоетанол. Підготовлені таким чином зразки аналізували електрофоретично в 7 % ПААГ за методом Лемлі у присутності SDS. Протеїнові зони ідентифікували після фарбування Coomassie R-250 (рис. 3.51).

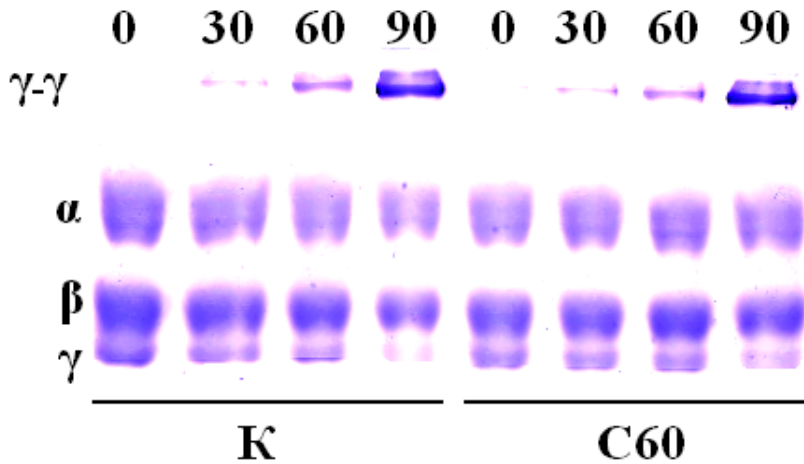


Рис. 3.51. Електрофореграма препаратів фібрину (0), приготованих через 30, 60 та 90 хв після фібриноутворення за присутності фулерену С60 та за його відсутності (К).

Було показано, що швидкість ковалентної прошивки γ -ланцюгів фібрину не залежала від присутності фулерену С60 (рис. 3.51).

Дія фулеренів на агрегацію та активацію тромбоцитів. Оскільки тромбоцити є надзвичайно чутливими клітинами, визначення дії терапевтичного агенту на тромбоцити є необхідною умовою його впровадження у клінічну практику. Дію фулеренів на агрегацію та активацію тромбоцитів вивчали за допомогою цитометрії та агрегатометрії.

Цитометрію проводили на протоковому цитометрі COULTER EPICS XL FlowCytometer, який є системою для якісного і кількісного визначення біологічних та фізичних властивостей клітин. В пробірку для протокового цитофлуориметра вносили 1 мл плазми крові, збагаченої тромбоцитами, та фіксували два типи світлорозсіювання: фронтальне, яке характеризує розмір клітин (FS), та ортогональне (SS), яке характеризує щільність цитоплазми клітини, тобто, гранулярність тромбоцитів за зміною прямого та бічного світлорозсіювання.

Агрегацію тромбоцитів вивчали за допомогою агрегометра SOLAR AP 2110. До 220 мкл плазми крові, збагаченої тромбоцитами, додавали 20 мкл CaCl_2 (0,025

М). Інкубували 5 хв у кюветі агрегометра при 37°C. Активацію тромбоцитів індукували додаванням 20 мкл ADP (125 μ M).

При дослідженні дії фулерену C60 на ADP-індуковану агрегацію тромбоцитів (рис. 3.52) показано відсутність впливу на ступінь та швидкість агрегації тромбоцитів у діапазоні концентрацій, які пропонуються для застосування у клінічній практиці. Відмічено незначне зниження ступеню агрегації тромбоцитів при концентрації C60 10 μ M, що в 10 разів перевищує максимальну терапевтичну дозу.

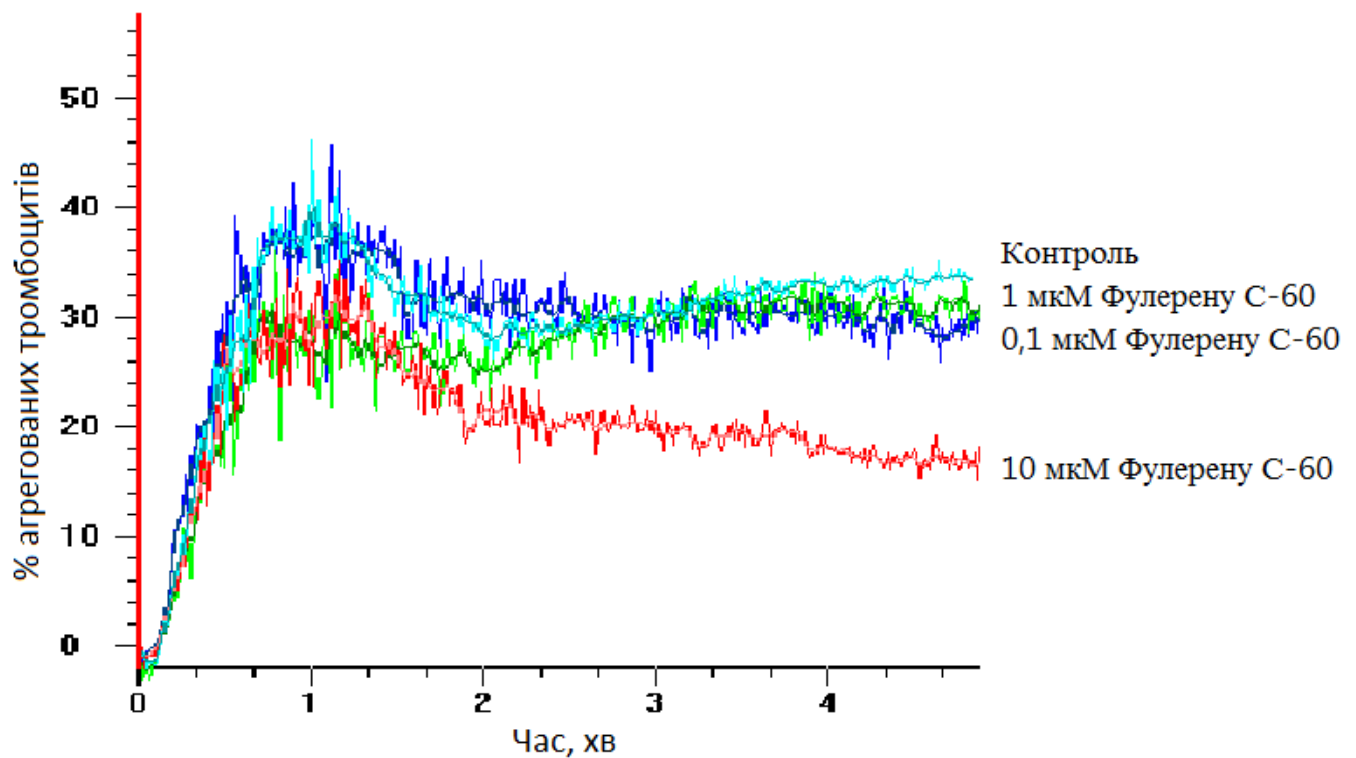


Рис. 3.52. Типові криві ADP-індукованої агрегації тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові людини за присутності фулерену С-60.

Використання методу протокової цитометрії дозволило дослідити дію фулерену C60 на форму та гранулярність тромбоцитів. Було показано, що навіть за тривалої інкубації (2 год), форма та гранулярність тромбоцитів не змінювалася, що свідчить про відсутність їхньої активації (рис. 3.53).

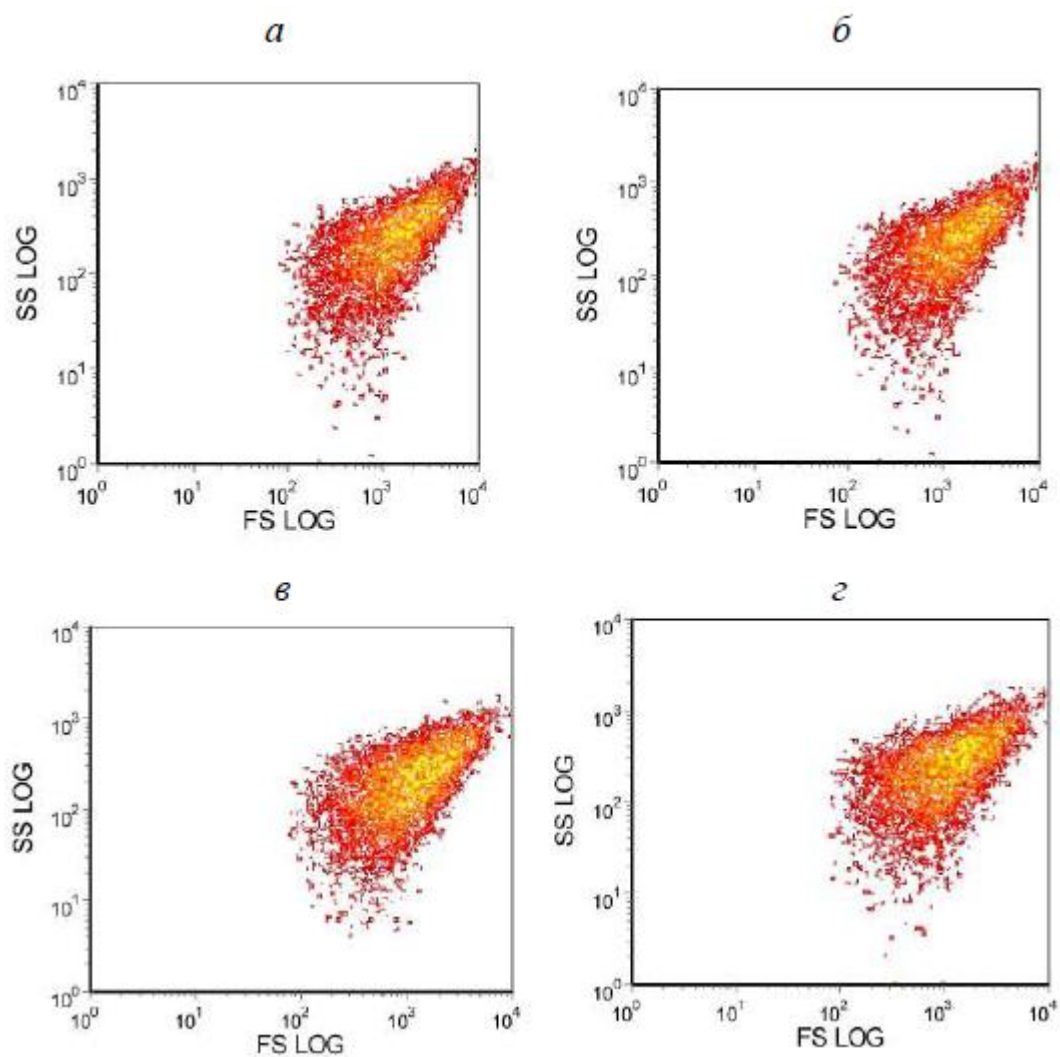


Рис. 3.53. Розподіл тромбоцитів за формою (FS) і гранулярністю (SS) за присутності 10 μ M фулерену C60 (*б*) та в контролі (*а*) через 1 год (*в*), через 2 год (*г*) після початку інкубації.

Таким чином, фулерен C-60 можна розглядати як потенційний біоінертний носій, здатний контактувати з кров'ю без інгібиторного чи активаторного ефекту на гемостаз.

3.5. БІОМАТЕРІАЛИ, МОДИФІКОВАНІ АРГАТРОБАНОМ

Аргатробан – низькомолекулярний ($M_r=508.635$) прямий інгібітор тромбіну, що застосовується як антикоагулянт у осіб з тромбозом та гепарин-індукованою тромбоцитопенією, і перевагою його є безпосереднє інгібування тромбіну.

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 School of Pharmacy and Biomolecular Sciences, University of Brighton (Великобританія) було синтезовано PVC та PU, модифіковані аргатробаном. Метою роботи було дослідити, чи зберігаються антитромботичні властивості аргатробану в іммобілізованому вигляді.

В модельній системі з використанням препарату тромбіну та тромбін-специфічного хромогенного субстрату було показано (рис. 3.54), що PVC та PU самі по собі та з технічно необхідними лігандами не впливають на активність тромбіну. Натомість присутність на матриці аргатробану знижує активність тромбіну в середовищі. Модифікування аргатробану селеном значно знижує інгібуючий ефект аргатробан-модифікованих матеріалів. Активність як мезотромбіну, так і тромбіну фіксували за розщепленням хромогенного субстрату S2238.

Щоб стандартизувати модифіковані матеріали, ми зробили калібрувальну криву залежності активності тромбіну від концентрації вільного аргатробану (рис. 3.55). Кількості діючого аргатробану відповідали 40 та 18 нг/мл вільного аргатробану для модифікованих PU та PVC матеріалів, відповідно.

Тромбін утворюється в плазмі крові з протромбіну за активації каскаду зсідання. Плазма крові, окрім протромбіну, містить велику кількість протеїнів, в тому числі проензимів серинової природи. Тому аргатробан може взаємодіяти в крові не лише з тромбіном. На наступному етапі ми перевірили, чи інгібують аргатробан-модифіковані полімери тромбін, що утворюється в плазмі крові.

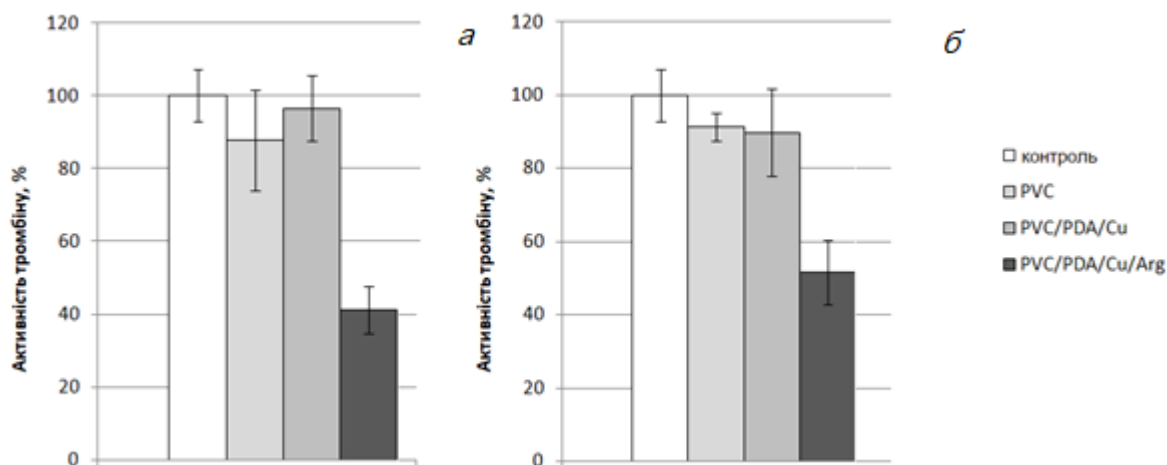


Рис. 3.54. Активність тромбіну за присутності модифікованих PU (а) та PVC (б). Контроль – активність тромбіну за відсутності полімерних матриць.

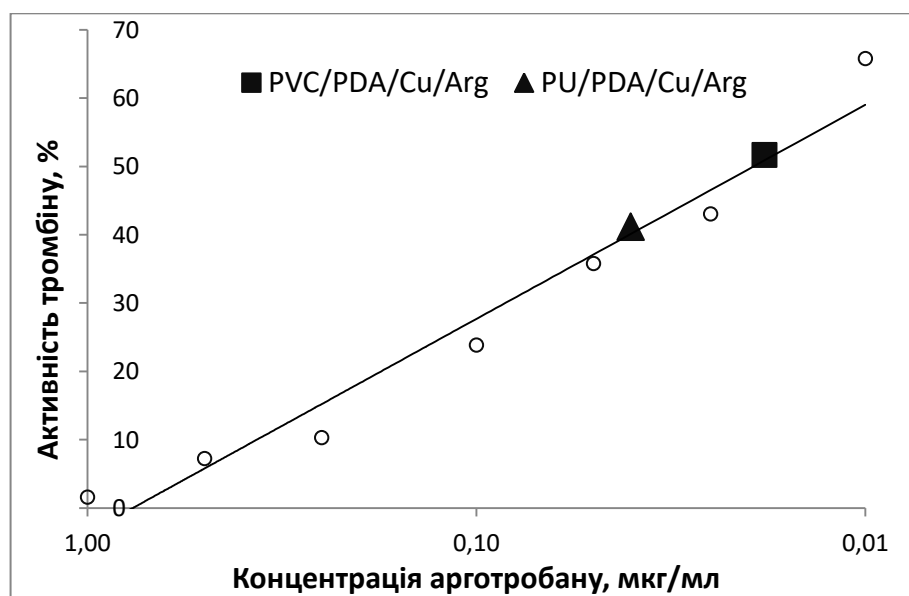


Рис. 3.55. Залежність активності тромбіну від концентрації аргатробану.

Для цього протромбін плазми крові, яку інкубували з модифікованими PU та PVC, активували ензимом з отрути *E. multisquamatis*. Активатор протромбіну з отрути *E. multisquamatis* нечутливий до фізіологічних інгібіторів плазми крові та високоспецифічно активує протромбін до мезотромбіну, який, в свою чергу, автокаталітично перетворюється на тромбін. Активність як мезотромбіну, так і тромбіну фіксували за розщепленням хромогенного субстрату S2238.

Як видно з рис. 3.56, полімерні матриці недостовірно знижують активність тромбіну в плазмі крові, в той час як аргатробан-модифіковані матриці знижують

активність тромбіну. Поліуретан, модифікований аргатробаном, має значно вираженіший ефект порівняно з модифікованим полівінілхлоридом.

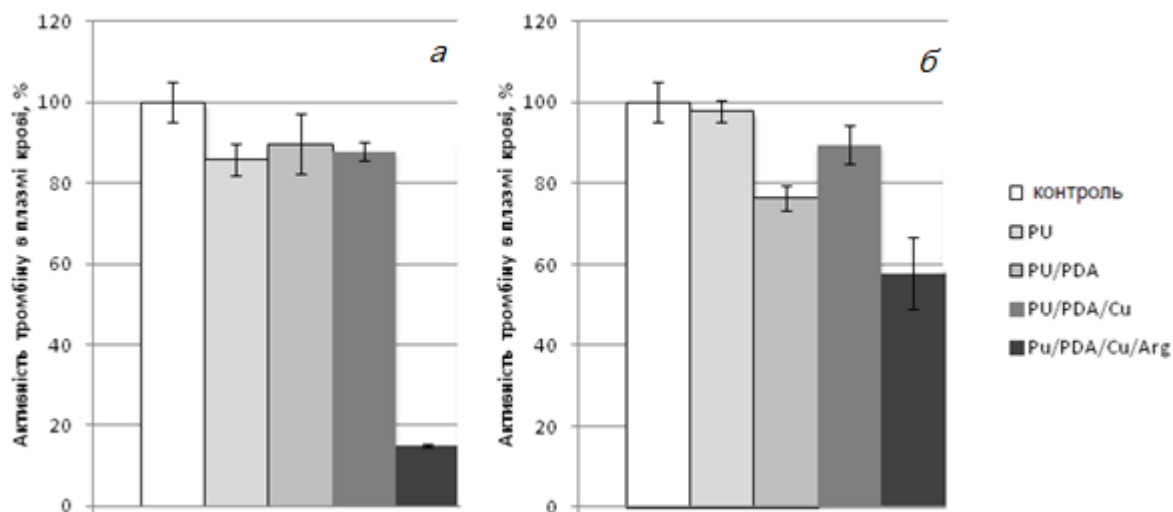


Рис. 3.56. Активність тромбіну при активації плазми крові за присутності модифікованих PU (а) та PVC (б). Контроль – активність тромбіну за відсутності полімерних матриць.

Однією з першочергових функцій тромбіну на шляху утворення тромбу є активація тромбоцитів. Тромбін активує їх в нано- та мікромольних концентраціях шляхом взаємодії з GPIIb та розщеплення ПАР-рецепторів. В свою чергу, активація тромбоцитів необоротно спричиняє ряд важливих подій, що забезпечують утворення тромбу. Тому на наступному етапі ми простежили вплив іммобілізованого аргатробану на функціонування тромбоцитів. Для цього ми використовували збагачену тромбоцитами плазму крові (ЗТПК).

Було показано (рис. 3.57), на прикладі ADP-індукованої агрегації, що модифікація аргатробаном PU та PVC не впливає на агрегацію тромбоцитів.

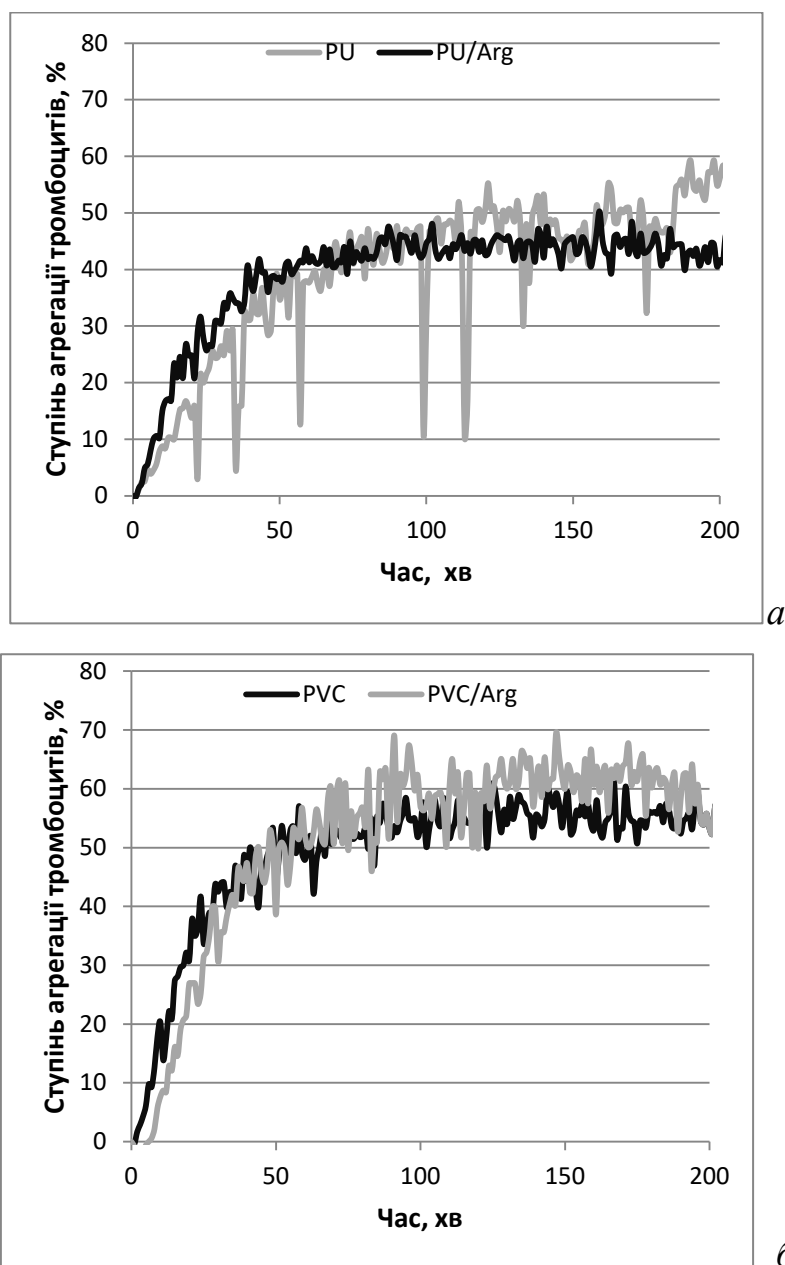


Рис. 3.57. Типова крива ADP-індукована агрегації тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові за присутності модифікованих PU (а) та PVC (б).

Тромбін-індукована агрегація тромбоцитів інгібувалась аргатробаном в складі матеріалів (рис. 3.58). Це, очевидно, пов'язано з безпосереднім інгібуванням індуктора агрегації. Таким чином, протекторна дія аргатробану в складі PU та PVC може реалізуватись і на рівні активації тромбоцитів.

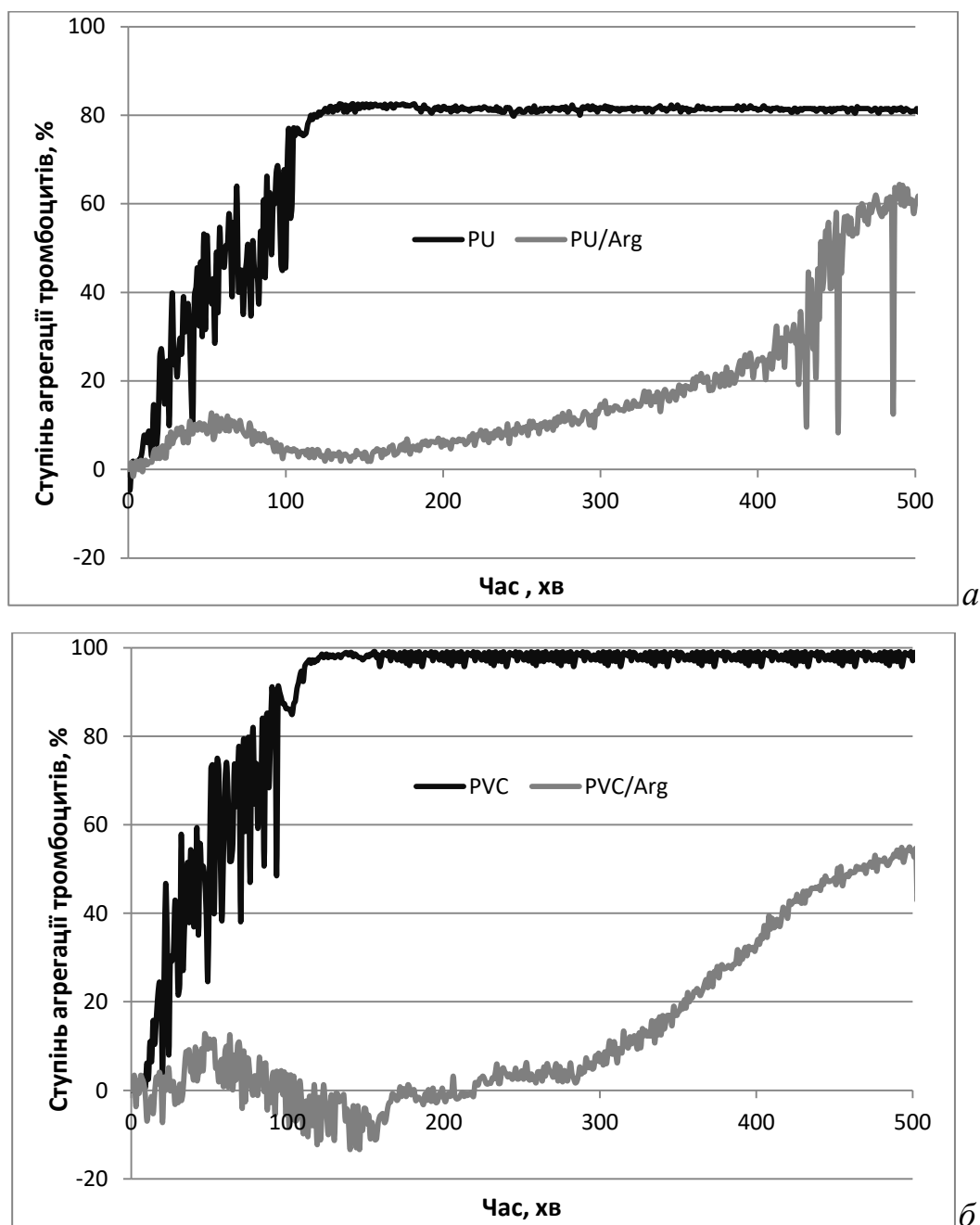


Рис. 3.58. Типова крива тромбін-індукованої агрегації ЗТП за присутності модифікованих PU (а) та PVC (б).

Таким чином, 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. Натомість, тромбін-індукована агрегація тромбоцитів за присутності обох модифікованих біоматеріалів суттєво пригнічувалась. Таким чином, модифікація біоматеріалів інгібіторами тромбіну є перспективним способом зменшення їхньої тромбогенної активності.

3.6. ОТРИМАННЯ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА ВИСОКОКОНЦЕНТРОВАНОЇ СУСПЕНЗІЇ ТРОМБОЦИТІВ

Клітинна терапія із застосуванням збагаченої тромбоцитами плазми крові (ЗТПК) – поширений підхід, який застосовується в хірургії та косметології для сприяння загоєнню ран і прискорення регенерації ділянок покривів за рахунок здатності тромбоцитів вивільняти ростові фактори. Однак, на сьогодні не існує стандартизованого способу одержання збагаченої тромбоцитами плазми крові. Для медичного застосування необхідна суспензія тромбоцитів, яка містить понад 1 млн клітин/мкл, при цьому клітини мають бути нативними (тобто – здатними до активації та селективного вивільнення ростових факторів), а також неімуногенними та апірогенними.

До сьогодні, жоден із відомих способів отримання ЗТПК для біомедичного застосування не відповідав заявленим вимогам.

Завданням досліджень була розробка способу одержання збагаченої тромбоцитами плазми крові людини, який би дозволяв одержувати нативні, непошкоджені, функціонально активні тромбоцити в достатній для ефективного терапевтичного ефекту кількості (понад 1 млн/мкл), та при цьому зменшити кількість гепарину, який використовується як антикоагулянт, необхідний для одержання таких тромбоцитів, з метою уникнення виникнення геморагій.

Задачу вирішували шляхом послідовного диференційного центрифугування цільної крові та плазми крові пацієнта з ресуспендуванням тромбоцитарної маси в меншому об'ємі аутологічної плазми крові. Розроблений спосіб дозволяє одержувати концентровану суспензію функціонально активних тромбоцитів, здатних до активації та агрегації, чого не вдається досягти жодним із відомих способів.

Для досягнення поставленої мети цільну кров центрифугували при 166 g протягом 30 хв. Відбирали верхню світло-жовту суспензію тромбоцитів. Вимірювали кількість тромбоцитів та перевіряли їх здатність агрегувати під дією 12,5 μ M ADP (рис. 3.59). Відбирали по 1,5 мл збагаченої тромбоцитами плазми крові у пластикову круглodonну пробірку та осаджували шляхом центрифугування протягом 15 хв при 200 g. Надосад (бідну тромбоцитами плазму

крові) збирали у окрему стерильну пластикову пробірку так, щоб у пробірках лишався осад тромбоцитів та 50-100 мкл плазми крові (рис. 3.60). Аналізували кількість тромбоцитів при різних розведеннях та ступінь їх агрегації: Осад тромбоцитів ресуспендували у різних об'ємах плазми крові, бідної тромбоцитами (1,2, 1,0, 0,8, 0,6, 0,4, 0,2, 0,1 мл) та визначали кількість тромбоцитів та перевіряли їх здатність агрегувати під дією 12,5 μM ADP (рис. 3.61). Таким чином, для отримання суспензії тромбоцитів з кількістю клітин понад 1 млн/мкл потрібно осадити їх зі ЗТПК та ресуспендувати у бідній тромбоцитами плазмі крові, взятій у кількості у 15 разів меншій, ніж ЗТПК. Наприклад – тромбоцити, осаджені з 1,5 мл ЗТПК слід ресуспендувати в 0,1 мл бідної тромбоцитами плазми крові. Отриману таким чином суспензію тромбоцитів аналізували агрегатометрією (таблиця 4, рис. 3.62).

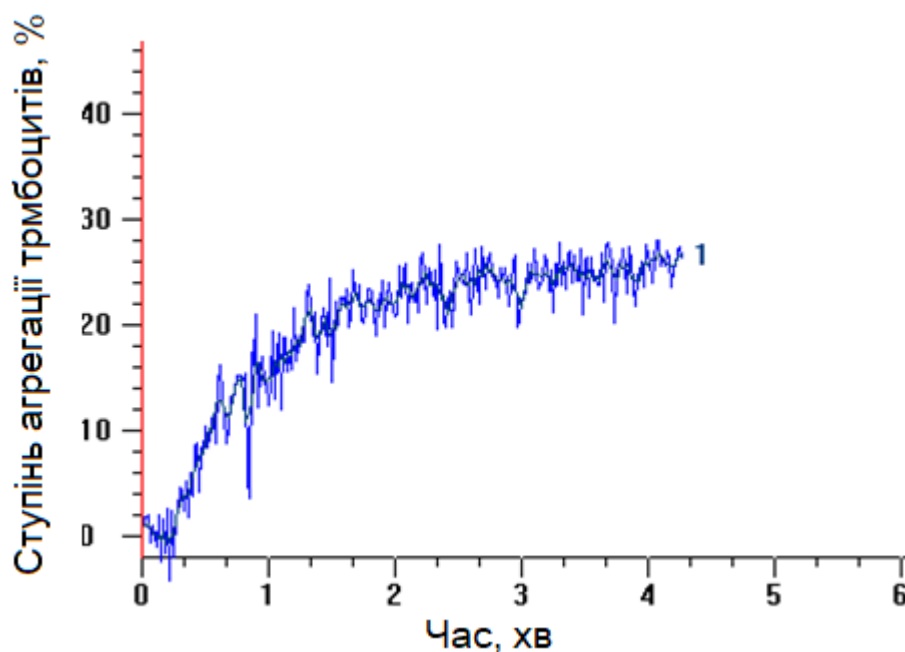


Рис. 3.59. Типова крива агрегації збагаченої тромбоцитами плазми крові. 210 тис/мкл тромбоцитів.

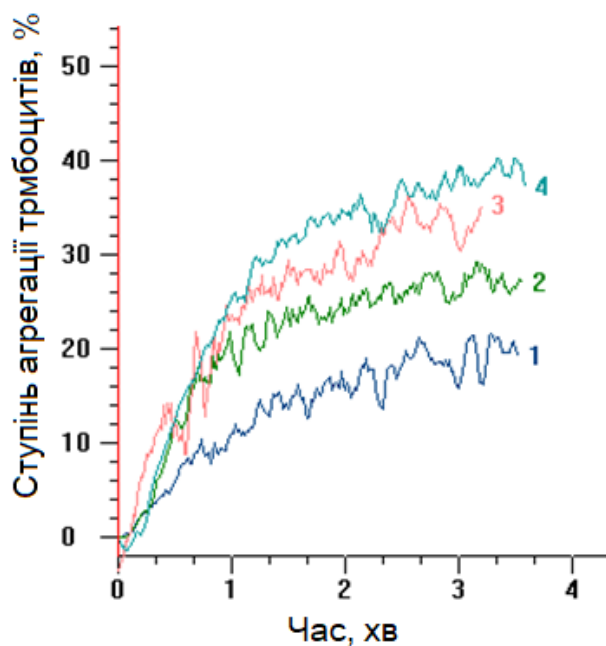


Рис. 3.60. Типові криві агрегації збагаченої тромбоцитами плазми крові. 210 тис/мкл тромбоцитів. 1 – ресуспендування у 1,0 мл; 2 – 0,8 мл; 3 – 0,4 мл; 4 – 0,2 мл.

Таблиця 3.4

Залежність ступеня агрегації та кількості тромбоцитів від ступеня концентрування.

Кількість плазми крові, у якій ресуспендували тромбоцити, осаджені з об'єму 1,5 мл ЗПК	Кількість тромбоцитів, тис/мкл	Ступінь агрегації, %
-----	206	30
1,0	307	20
0,8	500	20
0,6	630	35
0,4	700	40
0,2	720	40
0,1	1150	60

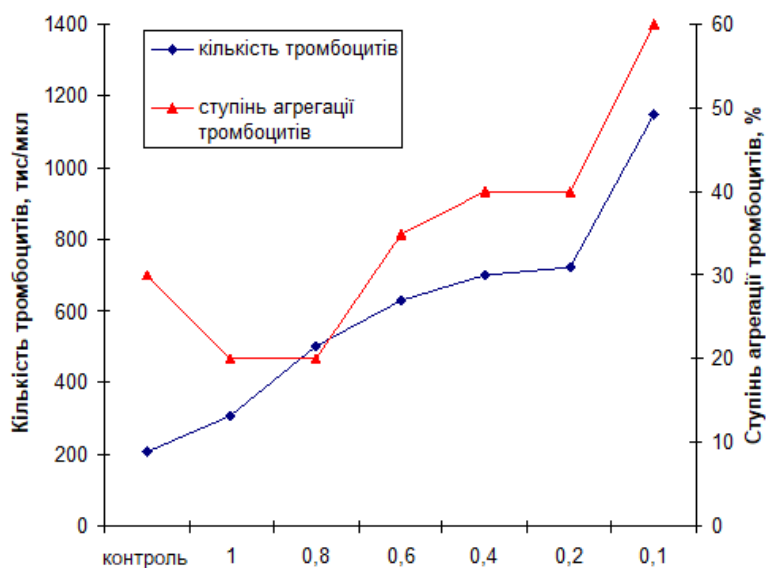


Рис. 3.61. Залежність кількості тромбоцитів та ступеню їх агрегації від об'єму, у якому вони були ресуспендовані після осадження з 1,5 мл збагаченої тромбоцитами плазми крові.

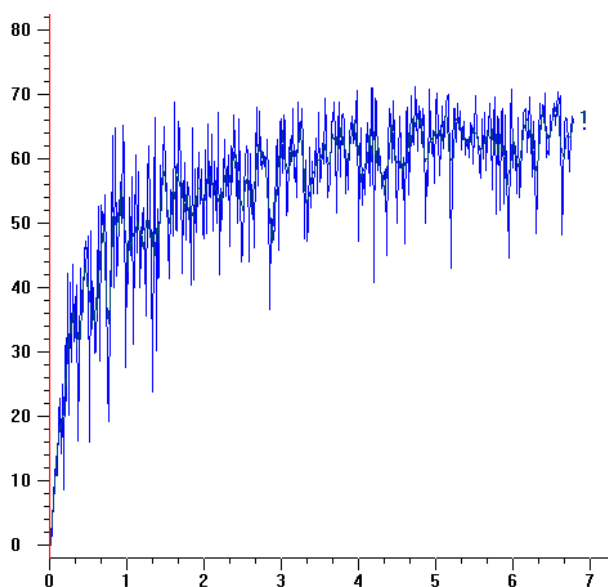


Рис. 3.62. Типова крива агрегації збагаченої тромбоцитами плазми крові. (1,1 млн/мкл тромбоцитів).

РОЗДІЛ 4. ЗАСТОСУВАННЯ ВИСОКОКОНЦЕНТРОВАНОЇ АУТОЛОГІЧНОЇ ПЛАЗМИ КРОВІ В КЛІНІЧНИХ ВИПРОБУВАННЯХ

Одним із популярних напрямків на межі медицини та косметології є ін'єкційна косметологія. Останнім часом широкого використання набув метод плазмоліфтингу, який полягає у внутрішньошкірному введенні збагаченої тромбоцитами аутологічної плазми крові пацієнтам з метою стимуляції регенерації шкіри. Регенерація та проліферація клітин шкіри після плазмоліфтингу є результатом дегрануляції вмісту тромбоцитарних α -гранул, що містять тромбоцитарний фактор росту, фактор росту β , епідермальний та ендотеліальний фактори росту.

Раніше було розроблено метод концентрування тромбоцитів аутологічної плазми крові для клітинної терапії, який дозволяє отримувати суспензію життєздатних тромбоцитів в концентрації, що перевищує фізіологічну.

Роботу було спрямовано на впровадження методу концентрування тромбоцитів аутологічної плазми крові для клітинної терапії.

Метод концентрування тромбоцитів плазми крові, розроблений в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, було впроваджено для потреб клітинної терапії на базі ТОВ «ВІКЮР».

У даній серії експериментів ми зосередилися, по-перше, на порівнянні двох методів виділення плазми крові, збагаченої тромбоцитами, для плазмоліфтингу та їх клінічних ефектів.

Відповідно до мети було поставлено такі завдання:

1. Адаптувати метод концентрування тромбоцитів у аутологічній плазмі крові для клітинної терапії.
2. Впровадити метод клітинної терапії з використанням концентрованої суспензії функціонально активних тромбоцитів у аутологічній плазмі крові на базі ТОВ «Вікюр».
3. Перевірити ефективність клітинної терапії отриманою концентрованою суспензією функціонально активних тромбоцитів у аутологічній плазмі крові.

Ультразвукове дослідження шкіри (УЗД) проводили до та на 2 і 4 тижень після плазмоліфтингу з використанням апарату для УЗД SKINSCANNER DUB CUTIS 22 з датчиком 22 МГц.

Визначали товщину шкіри разом, дерми та епідерміса окремо, щільність шкіри разом, дерми та епідерміса окремо. Виміри проводили диференційовано шкіри чола, підборіддя, лівої та правої щоки.

Ін'єкцію плазми крові, збагаченої тромбоцитами, проводили за місцевого знеболення. Знеболювання забезпечували місцевою аплікацією крему Емла 5% впродовж 20 хв. 4 мл плазми крові, збагаченої тромбоцитами, вводили внутрішньошкірно, розділяючи на окремі ін'єкції (таблиця 4.1).

Таблиця 4.1

Схема ін'єкцій шкіри обличчя збагаченою тромбоцитами плазмою крові.

Зона обличчя	чоло	щоки	параорбітальна	середня	підборіддя
Кількість ін'єкцій	200	250 на кожную сторону			50

Плазмоліфтинг. Основною функцією тромбоцитів є стимуляція зсідання крові при пошкодженні тканин. Однак крім швидкої дії, цим клітинам притаманна стимуляція процесів з віддаленим ефектом. Активуючись в місці пошкодження, тромбоцити вивільнюють α -гранули, які містять цілий ряд факторів росту (тромбоцитарний фактор росту, фактор росту β , епідермальний та ендотеліальний фактор росту). Таким чином тромбоцити стимулюють прилеглі до поранення тканини до загоєння ран та до відновлення міжклітинного фактору. Наукові дослідження показали, що збагачена тромбоцитами плазма крові (ЗТПК) прискорює процеси загоєння в найрізноманітніших тканинах.

Оскільки аутологічна ЗТПК пацієнта 100 % біосумісна, безпечна і не несе ризику зараження пацієнта, то застосування ЗТПК для лікування та омолодження шкіри лягло в основу плазмоліфтингу. Наразі ця процедура набула широкої популярності як компроміс між безопераційним та ефективним омолодженням.

В Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України було розроблено та запатентовано метод концентрування тромбоцитів аутологічної плазми крові для клітинної терапії, що відрізнявся ефективністю та простотою виконання.

Відомо, що товщина шкіри лінійно збільшується з віком до 20 років і згодом лінійно зменшується з віком (рис. 4.1). Ця динаміка характерна для шкіри будь-яких ділянок, однак найбільш вразливими є шкіра обличчя, шиї, зворотної сторони долоней.

Пацієнти, що проходять процедуру плазмоліфтингу, відзначають покращення стану шкіри: збільшення її пружності, набуття здорового кольору, згладжування зморшок тощо. Однак ці показники є виключно суб'єктивними і не можуть слугувати основою для оцінки стану шкіри.

Високочастотна ультразвукографія дозволяє детально зобразити епідерміс, дерму та верхню частину підшкірної клітковини. Класична ультразвукографія дозволяє візуалізувати всю підшкірну клітковину. У косметологічній та естетичній медицині ультразвукографію використовують для оцінки стану шкіри та для контролю результатів терапії, що застосовується для поліпшення її зовнішнього вигляду.

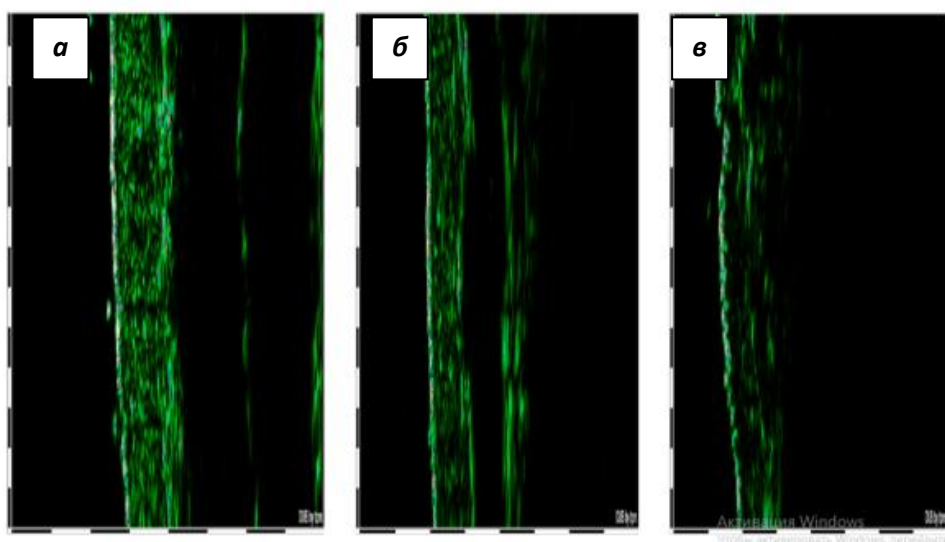


Рис.4.1. Типова ультразвукографія (22 МГц) нормальної шкіри тильної сторони долоні в 28 (а), 50 (б) та 80 (в) років.

Таким чином, аналіз стану шкіри за допомогою ультразвукографії, як метод контролю результатів клітинної терапії в косметології є новим підходом, що дасть

об'єктивну оцінку ефективності терапії, а впровадження нових методів отримання та концентрування тромбоцитів дозволить посилити регенеруючі та омолоджуючі ефекти терапії ЗТПК.

Адаптація методу концентрування тромбоцитів. В косметологічних клініках використовують недорогі центрифуги, що задовольняють потреби косметології, але мають ряд недоліків. Зокрема центрифуга 80-2S APXLAB, що використовується в клініці лікаря Запольскої (ТОВ «Вікюр»), має великий крок вибору швидкості центрифугування.

Для досягнення центрифужного поля 450g на даній центрифугі (радіус ротора = 12 см) слід встановити швидкість обертання 1800 об/хв. Однак крок виставлення швидкості становить 500 об/хв.

В таблиці 4.2 представлені дані підбору умов для осадження тромбоцитів в даних клінічних умовах.

Таблиця 4.2

Кількість тромбоцитів за різних умов центрифугування

Швидкість, об/хв	1500	2000
Час, хв		
10	-	213 тис кл/мкл
15	774 тис кл/мкл	368 тис кл/мкл
20	-	400 тис кл/мкл

Таким чином, збільшення центрифужного поля призводить до сильнішого злипання тромбоцитів в осаді, що перешкоджає якісному ресуспендуванню.

За результатами адаптації методу концентрування тромбоцитів у аутологічній плазмі крові для клітинної терапії було оформлено акт впровадження у промислове виробництво.

Підготовка до клінічних досліджень. Було підібрано однорідну групу пацієнтів 35-45 років жіночої статі зі здоровою шкірою. Пацієнти були заздалегідь проінформовані про мету та методи дослідження і давали згоду на участь в них, але не знали, яким методом користується персонал для отримання ЗТП.

Було проаналізовано два методи отримання тромбоцитів для плазмоліфтингу. На базі ТОВ «Вікюр» було отримано збагачену тромбоцитами плазму крові (ЗТПК) методом концентрування тромбоцитів у аутологічній плазмі крові у 10 пацієнтів – **метод 1**. А також ЗТП за допомогою комерційних пробірок для плазмоліфтингу, виготовлених за оригінальною технологією Plasmolifting® у 10 пацієнтів – **метод 2**.

Отриману обома методами ЗТПК аналізували агрегатометрично та цитометрично.

Як видно з рис. 4.2, ступінь ADP-індукованої агрегації тромбоцитів в ЗТПК різнився від пацієнта до пацієнта, що, ймовірно, пов'язано з різною чутливістю тромбоцитів пацієнтів до осадження та ресуспендування. Середній ступінь агрегації тромбоцитів в ЗТПК в групі 1 був дещо вищим порівняно з групою 2.

Натомість концентрація тромбоцитів в отриманих ЗТПК значно різнилась в залежності від методу. Як видно з рис. 4.3, концентрація тромбоцитів в ЗТПК, отриманій методом 1, досягала 993 тис/мкл, в той час, як другим методом максимально вдалось досягти концентрації в 245 тис/мкл.

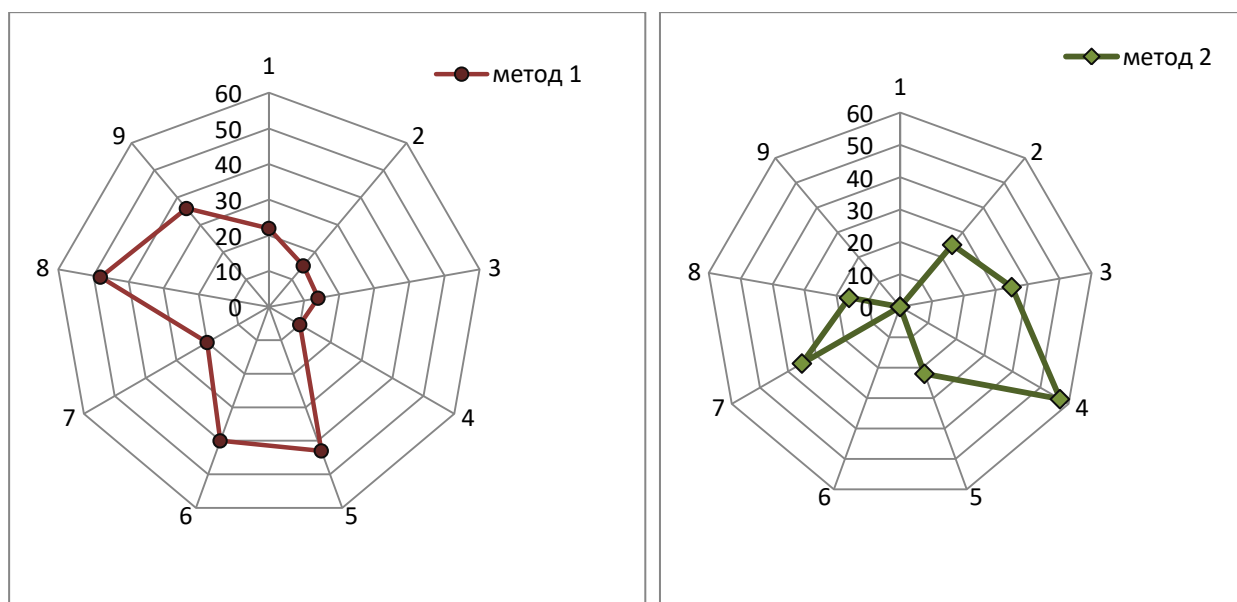


Рис. 4.2 Ступінь ADP-індукованої агрегації тромбоцитів в ЗТПК, отриманій за методом 1 та методом 2.

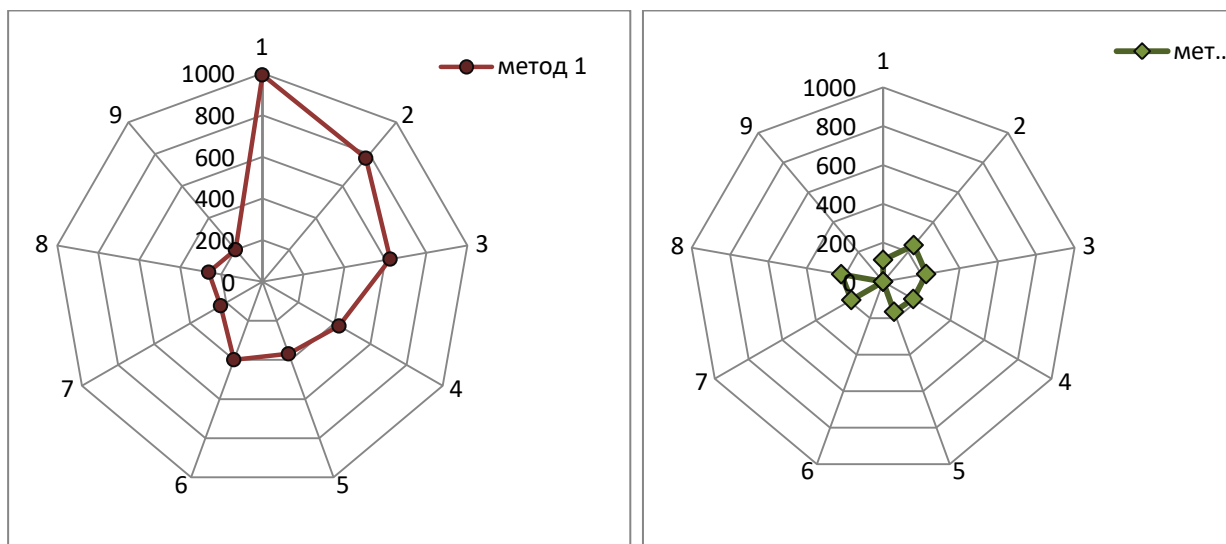


Рис. 4.3. Концентрація тромбоцитів в ЗТПК, отриманій за методом 1 та методом 2.

Суспензії тромбоцитів, отримані першим та другим методом на базі ТОВ «ВІКЮР», були проаналізовані цитометрично. Фронтальне світлорозсіювання (FS) вказує на розмір тромбоцитів, а бічне світлорозсіювання (SS) – на гранулярність.

Як видно з рис. 4.4, розподілення тромбоцитів, отриманих першим методом, характеризувалось великою популяцією інтактних тромбоцитів (праворуч), натомість тромбоцити, отримані другим способом, в більшості були активовані (популяція ліворуч).

Така тенденція була характерна для всіх пацієнтів, хоча спостерігались індивідуальні відмінності в кількості та відсотковому складі популяцій тромбоцитів в отриманій суспензії.

Таким чином, розроблений в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАНУ метод концентрування тромбоцитів аутологічної плазми крові для клітинної терапії давав змогу досягти більшої концентрації тромбоцитів в ЗТПК.

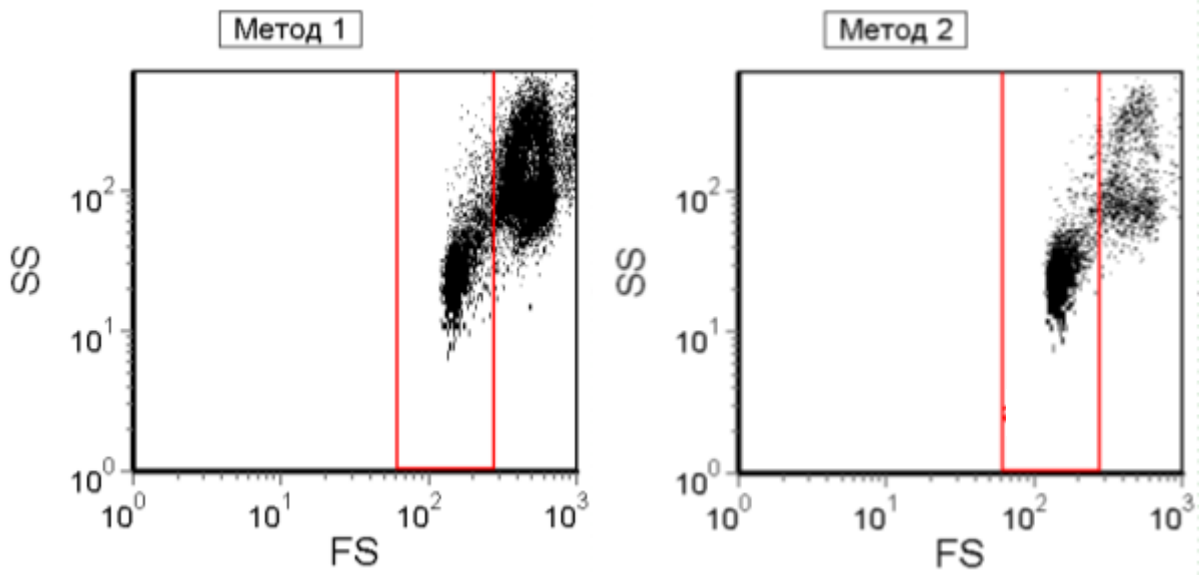


Рис. 4.4. Типове розподілення тромбоцитів за фронтальним (FS) та бічним (SS) світлорозсіюванням при отриманні суспензії тромбоцитів першим та другим методом.

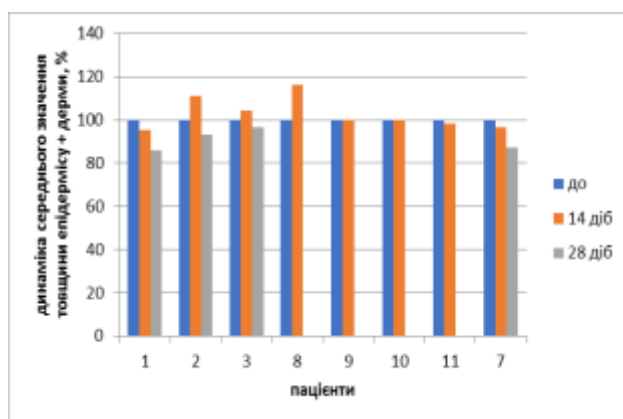
Порівняння клінічних ефектів плазмоліфтингу із застосуванням ЗТП, отриманої різними методами. Було проаналізовано стан шкіри пацієнтів за такими параметрами як товщина шкіри і епідермісу загалом, дерми зокрема та щільність шкіри і епідермісу загалом, дерми зокрема. Позитивними проявами вважається потовщення шкіри. У відповідному ультразвуковому зображенні набряк розглядався як зона низького рівня ехогенності, отримання тромбоцитів для плазмоліфтингу.

На базі ТОВ «Вікюр» пацієнтам було проведено процедуру плазмоліфтингу збагаченою тромбоцитами плазмою крові (ЗТПК) методом концентрування тромбоцитів у аутологічній плазмі крові у 10 пацієнтів – **група 1**. А також ЗТПК за допомогою комерційних пробірок для плазмоліфтингу, виготовлених за оригінальною технологією PLASMOLIFTING® у 10 пацієнтів – **група 2**.

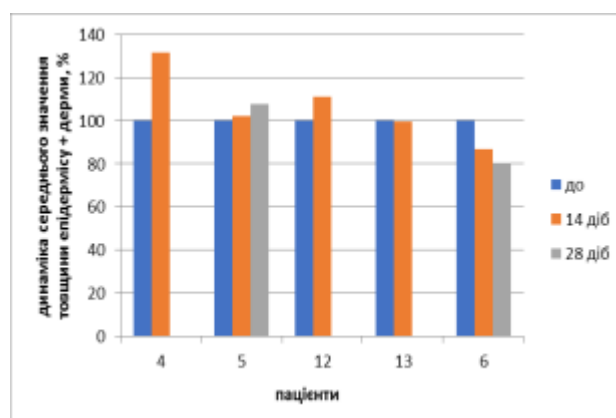
Ін'єкції та ультразвукографію проводили в зоні підборіддя, чола, зони щік, параорбітальної зони та середньої зони обличчя.

В ході проведення досліджень було показано, що пацієнти обох груп, які порівнювали в клінічних дослідженнях, мають ефект на анатомічний (рис. 4.5) і фізіологічний стан шкіри (рис. 4.6).

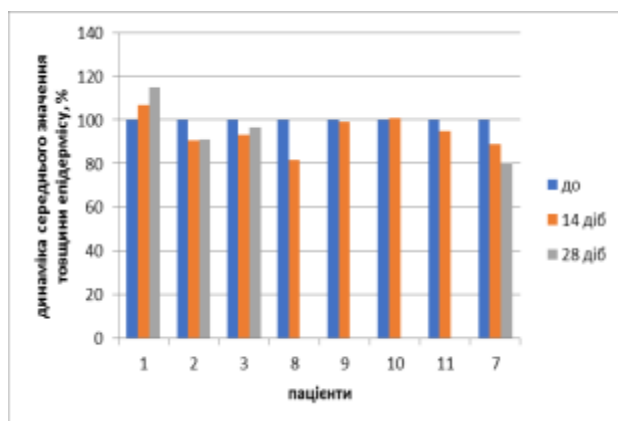
а



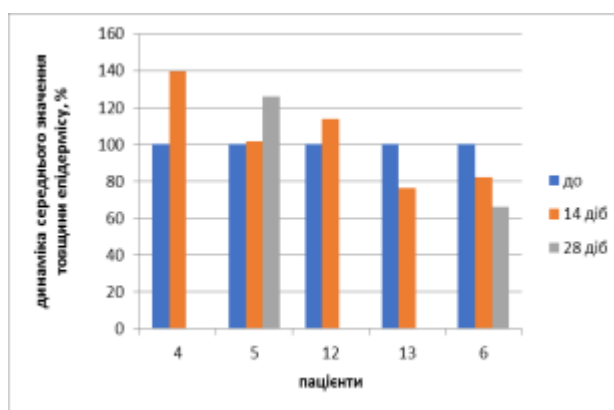
б



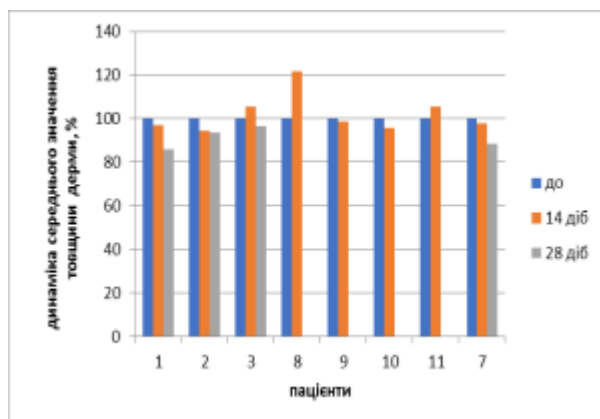
в



г



д



е

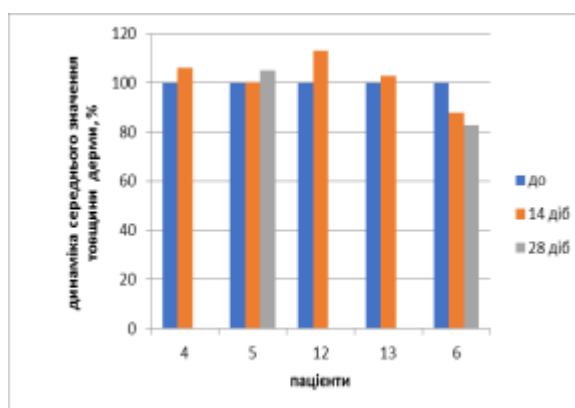
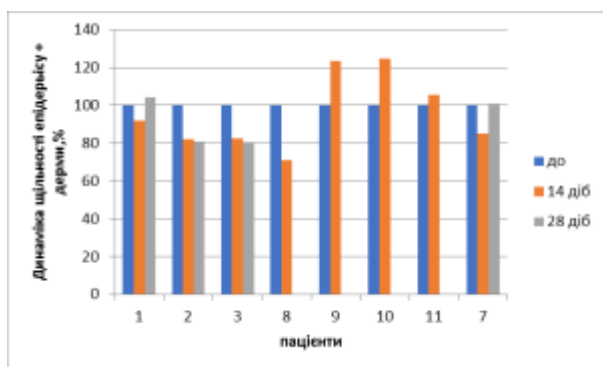
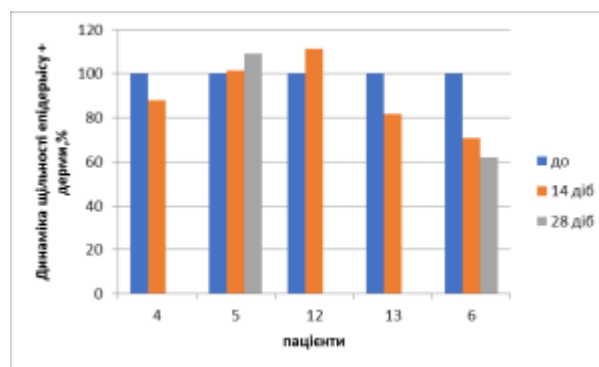


Рис. 4.5. Товщина різних шарів шкіри до та на 14 і 28 добу після проведення процедури плазмоліфтингу у пацієнтів першої (а, в, д) та другої (б, г, е) групи.

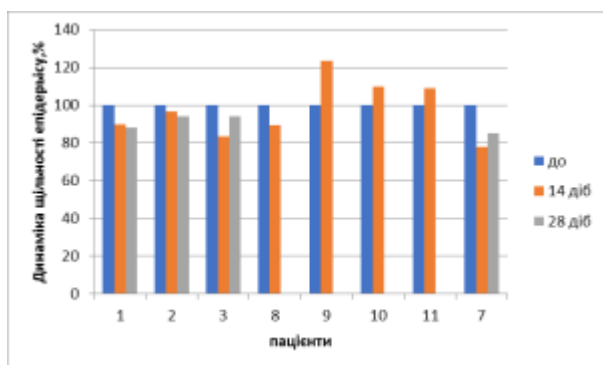
а



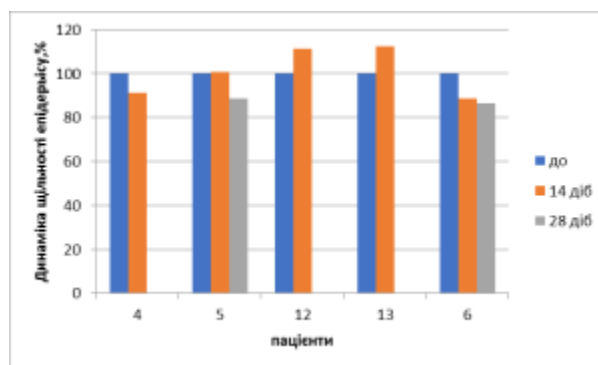
б



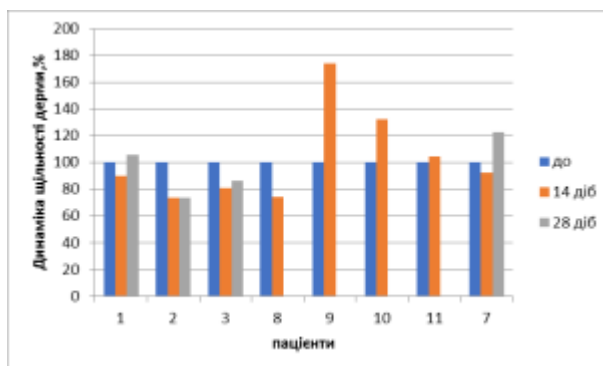
в



г



д



е

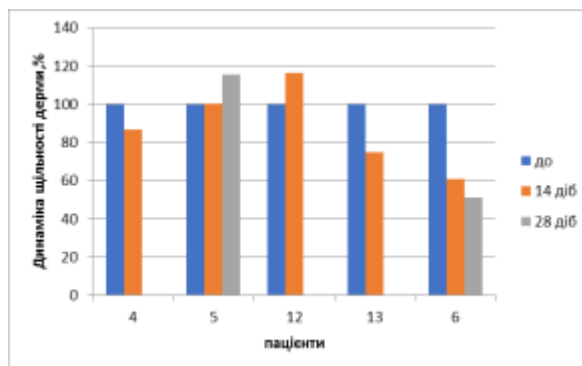


Рис. 4.6. Щільність різних шарів шкіри до та на 14 і 28 добу після проведення процедури у пацієнтів першої (а, в, д) та другої (б, г, е) групи.

У пацієнтів 9 та 10 спостерігали мінімальні зміни товщини шкіри, але різко змінювалася щільність тканин шкіри (рис. 4.5), що вказує на те, що плазмоліфтинг у всіх пацієнтів працює по-різному, але приводить до схожих результатів. Оскільки в світовій практиці нормою товщини шкіри (дерми) є діапазон 500-5000 μM , то можна вважати, що плазмоліфтинг веде до оптимізації стану шкіри різних пацієнтів різними шляхами (збільшення чи зменшення товщини або щільності), і для кожного конкретного пацієнта оптимізує конкретний параметр.

В ході проведення дослідження параметрів шкіри та параметрів тромбоцитарної маси у пацієнтів, яким проводили процедуру плазмоліфтингу першим методом, спостерігали кореляційні зв'язки між товщиною епідермального шару на 28 добу після проведення процедури від ступеню агрегації та концентрації тромбоцитів, що використовувались для процедури (рис. 4.7). Товщина епідермісу та шкіри загалом на 28 добу виражена у відсотках відносно початкової товщини епідермісу, що різнився для кожного пацієнту.

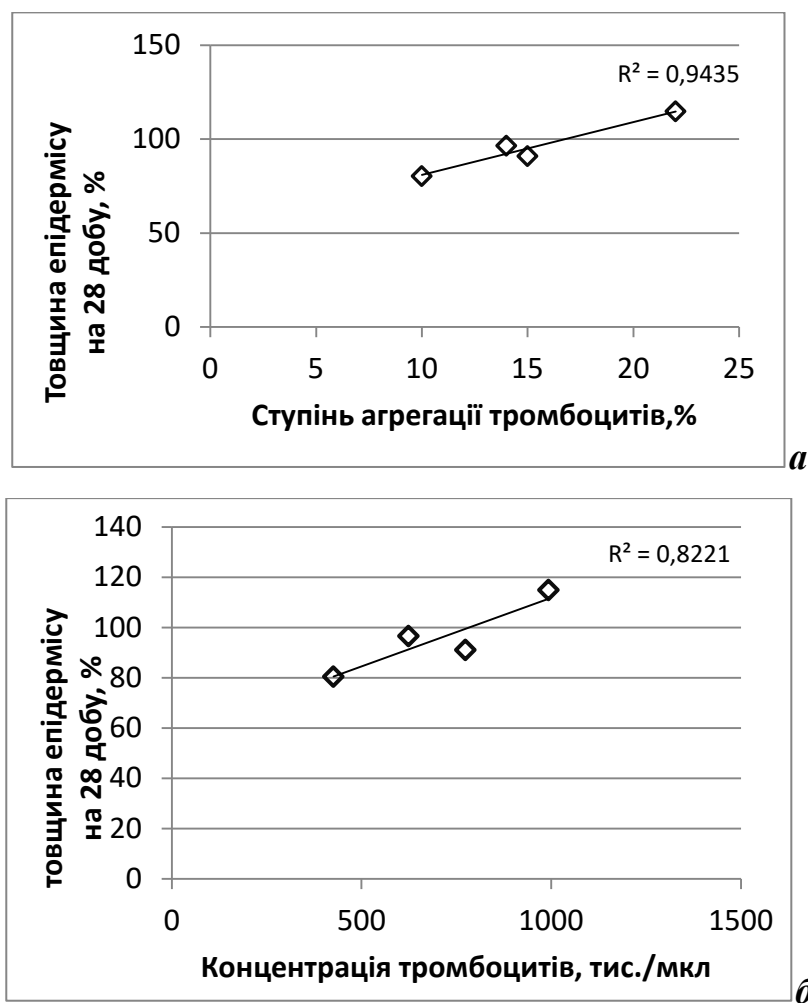


Рис. 4.7. Кореляційна залежність товщини епідермісу на 28 добу після процедури, проведеної першим методом, від ступеню агрегації тромбоцитів (а) та від концентрації тромбоцитів (б).

Найбільшу кореляцію товщини епідермісу на 28 добу після процедури у пацієнтів першої групи зафіксовано від кількості інтактних тромбоцитів, що визначали цитометрично (рис. 4.8). Товщина епідермісу та шкіри загалом на 28 добу виражена у відсотках відносно початкової товщини епідермісу, що різнився для кожного пацієнта.

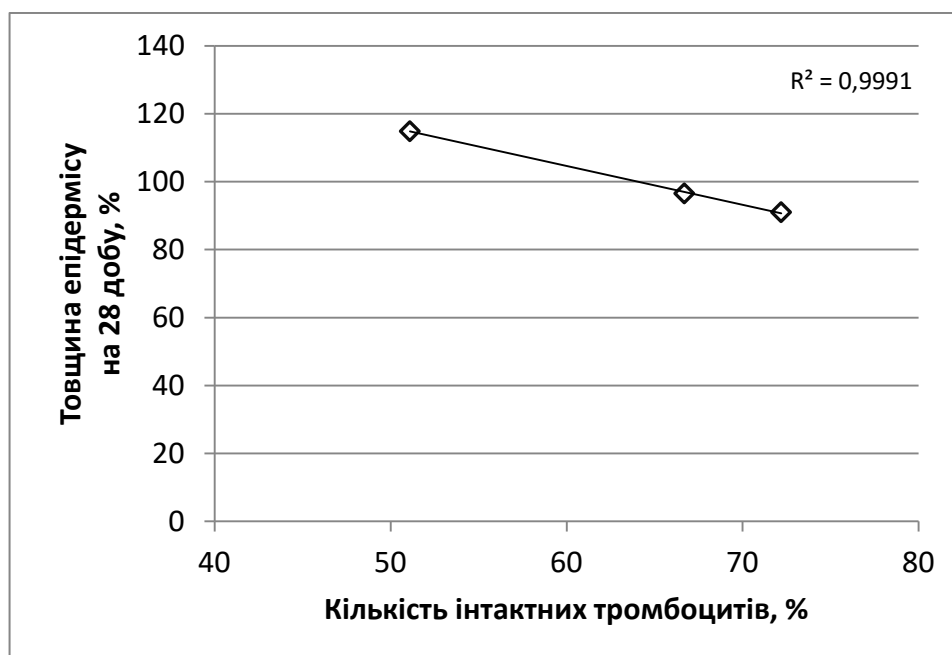


Рис. 4.8. Кореляційна залежність товщини епідермісу на 28 добу після процедури у пацієнтів першої групи від кількості інтактних тромбоцитів в суспензії, яку використовували для процедури.

Таким чином, визначаючи такі параметри стану стану тромбоцитів, як ADP-індукована агрегація, концентрація та рівень інтактних тромбоцитів, ми можемо спрогнозувати ефект процедури плазмоліфтингу на стан шкіри, а саме, товщину епідермісу через 28 днів після процедури.

Важливе значення для зовнішнього вигляду та здоров'я шкіри має її щільність, тобто гідратованість. Як набряк, так і підвищена сухість шкіри є небажаною.

Нами виявлена кореляція між кількістю інтактних тромбоцитів і щільністю шкіри загалом та епідермального шару зокрема на 28 день після проведення процедури у пацієнтів першої групи (рис. 4.9). Товщина епідермісу та шкіри

загалом на 28 добу виражена у відсотках відносно початкової товщини епідермісу, що різнився для кожного пацієнта.

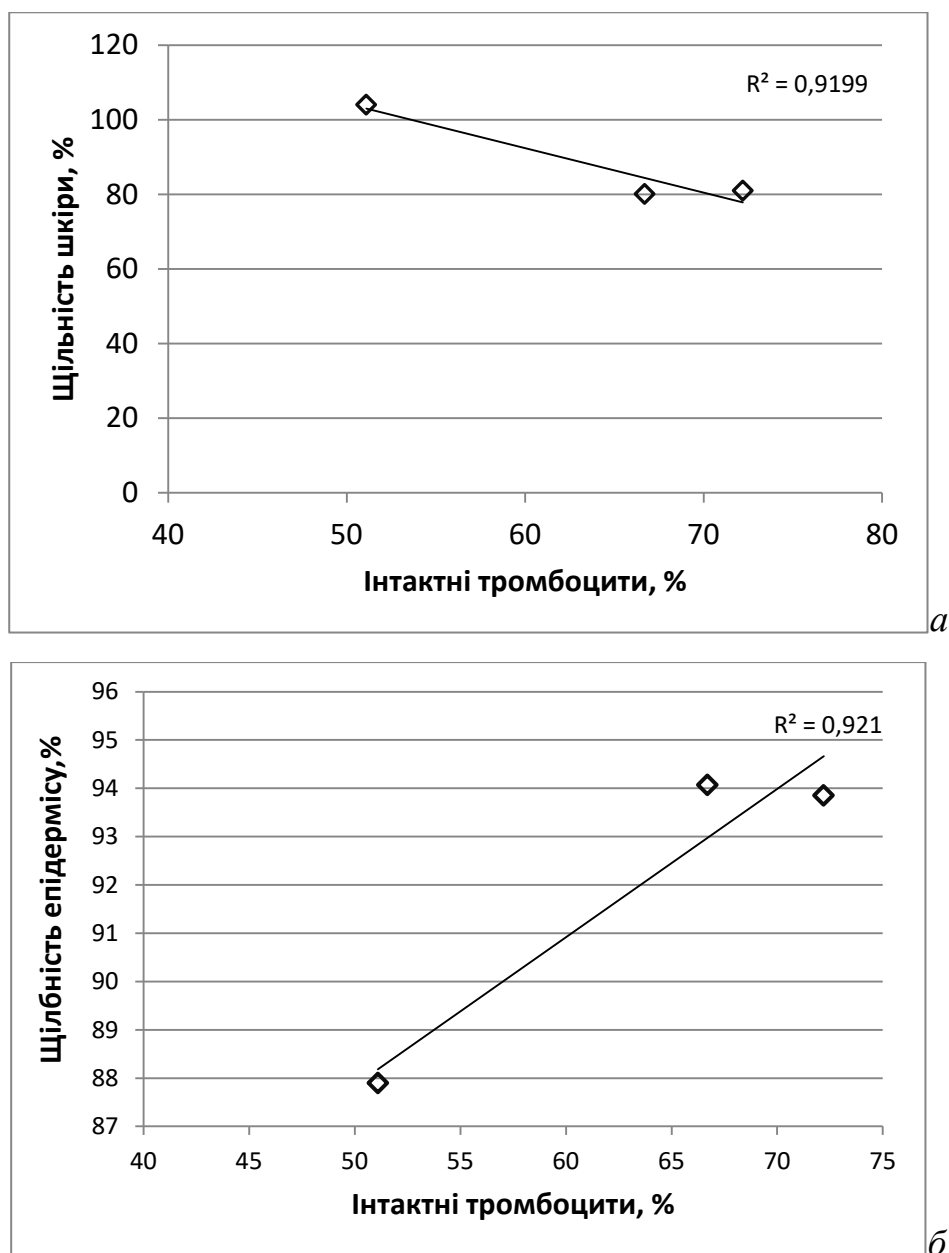


Рис. 4.9. Кореляційна залежність щільності шкіри (а) та епідермісу (б) на 28 добу після процедури від кількості інтактних тромбоцитів у пацієнтів першої групи.

Отримавши такі результати, можна було припустити, що результати, отримані за допомогою першого методу, на відміну другого методу корелюють лише із параметрами епідермісу шкіри. Проте, при подальших дослідженнях було виявлено кореляційний зв'язок між кількістю інтактних тромбоцитів та щільністю дерми як на 14, так і на 28 добу після процедури у пацієнтів першої групи (рис. 4.10).

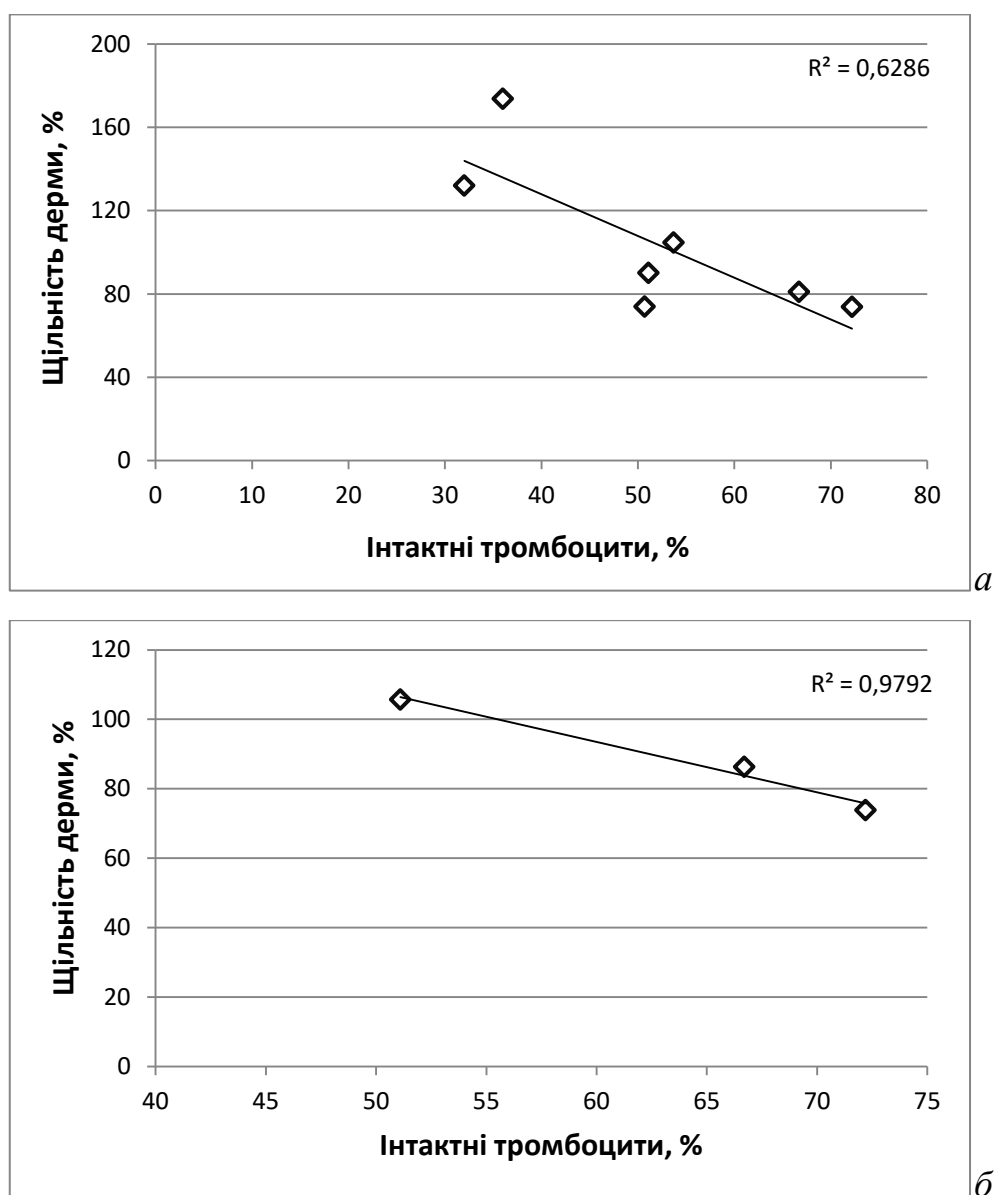


Рис. 4.10. Кореляційна залежність щільності дерми на 14 (а) та 28 (б) добу після процедури у першій групі пацієнтів від кількості інтактних тромбоцитів.

Отже, виходячи з отриманих даних, можна сказати, що одним із ключових параметрів, який необхідно визначати, є рівень інтактних тромбоцитів та їх концентрація, що є визначальним для клінічних результатів клітинної терапії. Ступінь агрегації тромбоцитів можна визначати тільки за необхідності або за бажанням пацієнта.

Контролюючи різні параметри стану тромбоцитів, можна прогнозувати зміни стану шкіри через 14 чи 28 днів після проведення плазмоліфтингу, тобто визначати доцільність проведення такої процедури.

Таким чином, було адаптовано та впроваджено у промислову практику метод концентрування тромбоцитів у аутологічній плазмі крові для клітинної терапії на базі ТОВ «ВІКЮР». Було продемонстровано ефективність отримання тромбоцитів запропонованим методом в порівнянні з методом PLASMOLIFTING®. Було доведено необхідність отримання суспензії тромбоцитів з великою концентрацією клітин та життєздатністю для віддалених клінічних ефектів.

РОЗДІЛ 5. РОЗРОБКА АНТИТРОМБОТИЧНОГО ПРЕПАРАТУ КАЛІКС[4]АРЕН С-145

5.1. ОСОБЛИВОСТІ ДІЇ С-145 НА ПОЛІМЕРИЗАЦІЮ ФІБРИНУ

Раніше було показано, що натрієва сіль калікс[4]арен-тетраметиленбісфосфонової кислоти (С-145) інгібує полімеризацію фібрину *in vitro* та *in vivo*, безпосередньо взаємодіючи з А-центрами полімеризації, та є перспективним антикоагулянт. Водночас, високі концентрації С-145 (50-100 μM) інгібували дегрануляцію тромбоцитів та сприяли проліферації ендотеліоцитів у культурі клітин. Метою роботи було диверсифікувати біологічні ефекти цілісної молекули калікс[4]арену С-145 та фрагменту його молекули (4-гідрокси-феніл-метиленбісфосфонової кислоти, рис. 5.1).

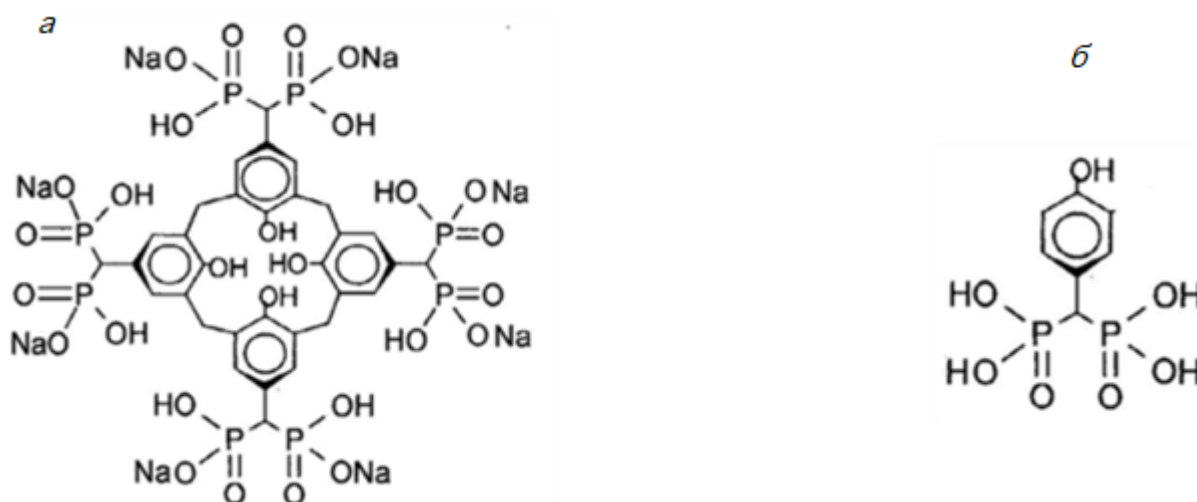


Рис. 5.1. Структурна С-145 (а) і 4-гідрокси-феніл-метиленбісфосфонової кислоти (б).

Відповідно до мети було необхідно оцінити дію С-145 та фрагменту його молекули на полімеризацію фібрину, з'ясувати дію С-145 та фрагменту його молекули на функціональний стан тромбоцитів (агрегатометрія, спектрофлуориметрія), дослідити проліферацію ендотеліоцитів у культурі клітин за присутності калікс[4]арену С-145 та фрагменту його молекули.

Було показано, що на відміну від цілої молекули С-145, 4-гідрокси-феніл-метилєнбісфосфонова кислота нездатна інгібувати полімеризацію фібрину. С-145 у концентрації 50 μM інгібував тромбін-індуковану полімеризацію фібрину на 90%. Фрагмент С-145, взятий у концентрації 200 μM , інгібіторної дії не чинив. Незначна інгібіторна дія, яку спостерігали, не носила концентраційно залежного характеру та могла бути пояснена неспецифічними взаємодіями негативно заряджених фосфатів з молекулою фібрину (рис. 5.2).

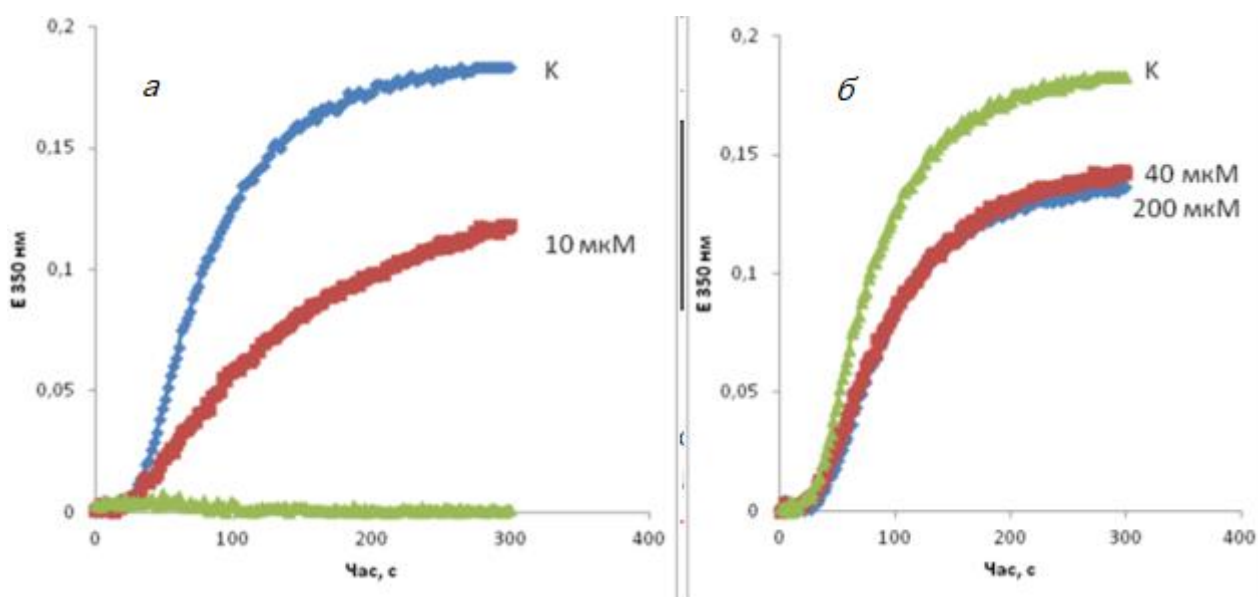


Рис. 5.2. Тромбін-індукована полімеризація фібрину (К) за присутності 10 μM та 50 μM калікс[4]арену С-145 (А) та 40 μM та 200 μM його фрагменту (Б).

Агрегацію тромбоцитів вивчали за допомогою агрегатометрії. Тромбоцити активували 12,5 μM ADP за присутності 50 та 500 μM С-145, 200 та 2000 μM 4-гідрокси-феніл-метилєнбісфосфонові кислоти. Було виявлено, що як С-145, так і його фрагмент, взяті у концентраціях, які на порядок перевищували реально застосовувані, незначно знижували ступінь агрегації тромбоцитів (рис. 5.3).

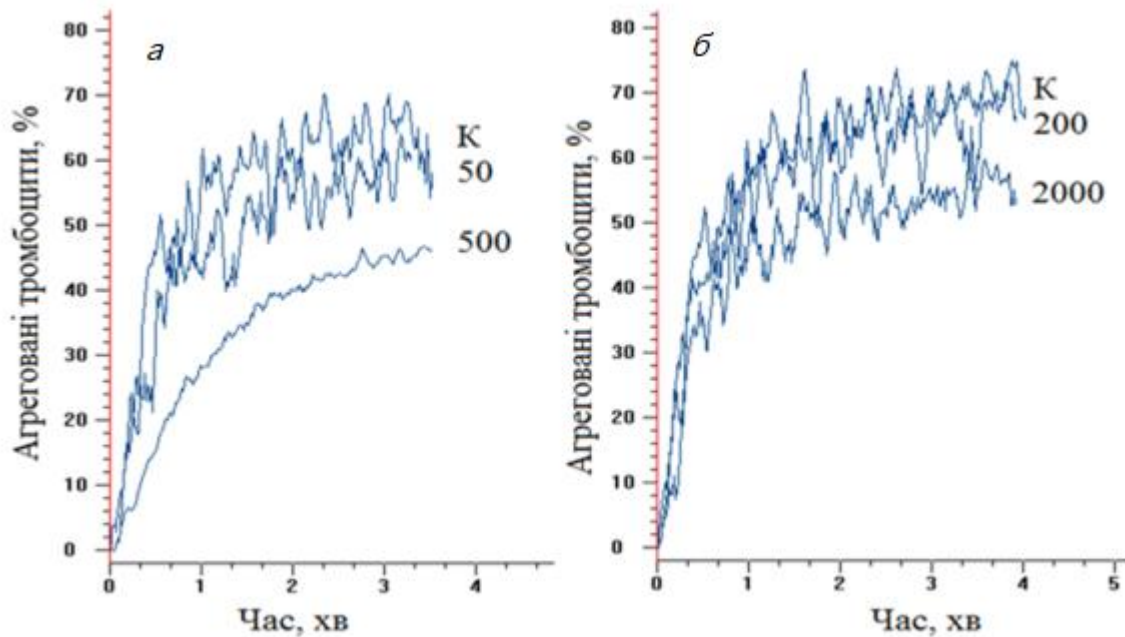


Рис. 5.3. Агрегація тромбоцитів в збагаченій тромбоцитами плазмі крові кроля (К) за присутності калікс[4]арену С-145 (*a*) у концентрації 50 μM та 500 μM і його фрагменту (*б*) у концентрації 200 μM та 2000 μM .

Активацію тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові (ЗТПК) людини визначали методом спектрофлуориметрії за вивільненням рН-чутливого флуоресцентного барвника акридинового оранжевого. Зміну інтенсивності флуоресценції фіксували у термостатованій кюветі при довжині хвилі активації 490 нм, емісії – 530 нм. Екзоцитоз обчислювали у відсотках від загальної кількості акумульованого зонду.

Показано, що 50 μM С-145 інгібував ADP-індуковану дегрануляцію тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові на 30 %, його фрагмент у концентрації 200 μM чинив схожий вплив, але дещо меншої амплітуди (інгібітор на дія на 20-25 %, рис. 5.4).

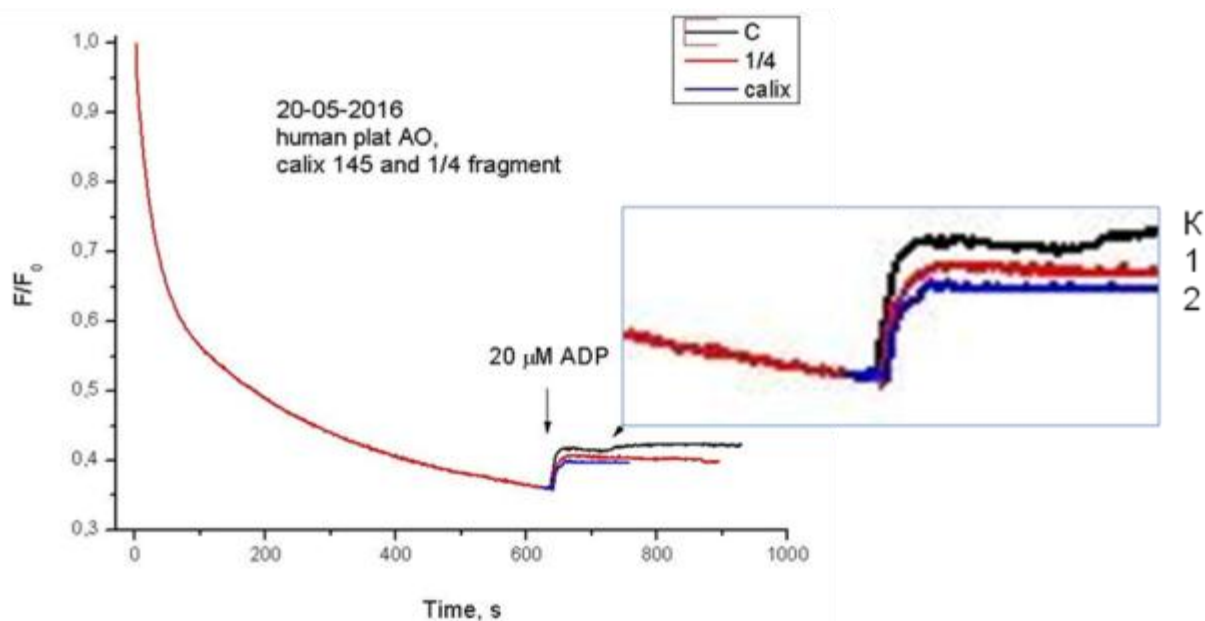


Рис. 5.4. Накопичення та вивільнення рН-чутливого барвника з тромбоцитів кроля за присутності калікс[4]арену С-145 (2) та його фрагменту (1) у концентрації 50 μM та 200 μM відповідно.

Для визначення впливу калікс[4]арену С-145 на проліферацію ендотеліоцитів було використано 2 клітинні лінії: ендотеліоцити аорти свині (РАЕ) та миші (МАЕС). Клітини інкубували в середовищі DMEM та 10% FBS за стандартних умов. Після періоду адаптації до клітин додавали калікс[4]арен С-145 (50 μM) та його фрагмент (200 μM) та культивували протягом 2 діб. Визначення цитотоксичного/пропроліферативного впливу досліджуваних агентів на ендотеліоцити проводили з використанням цитофлуориметричного аналізу, підрахунком концентрації живих і мертвих клітин за зафарбовуванням трипановим синім, а також в МТТ-колориметричному тесті.

Показано, що як С-145, так і його фрагмент при дослідженні на експериментальних моделях систем культивованих клітин аорти миші та свині викликали зменшення кількості апоптичних клітин, збільшення популяції клітин проліферативного пулу G2/M+S та концентраційно залежне збільшення кількості живих клітин на 15-25 % (рис. 5.5).

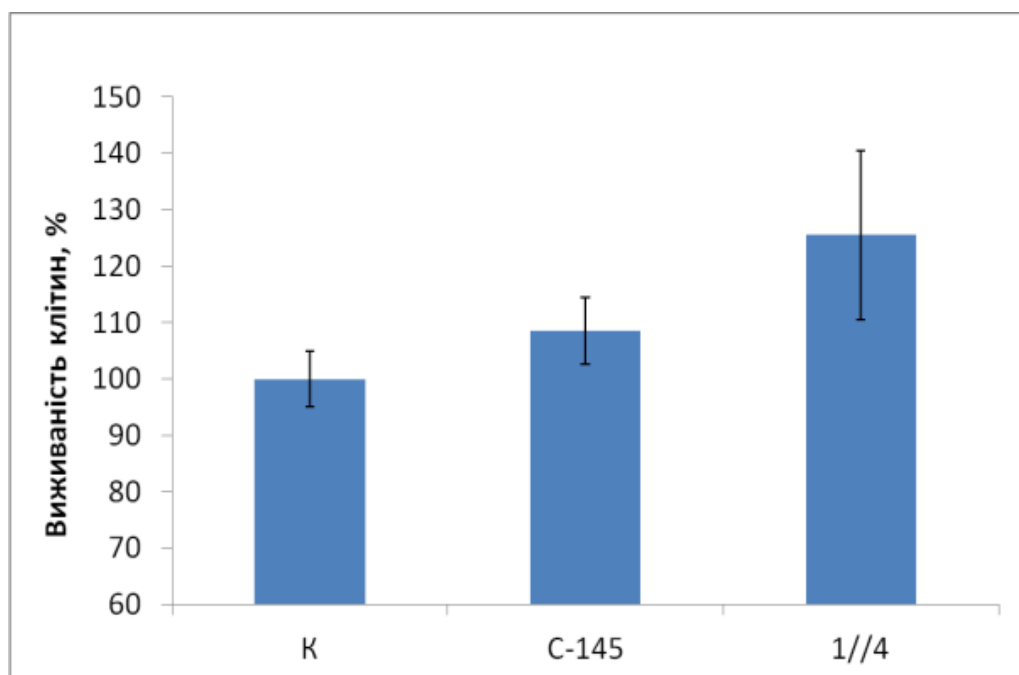


Рис. 5.5. Вживаність ендотеліальних клітин у культурі за присутності С-145 (50 μM) та фрагменту його молекули (200 μM).

Таким чином, проведено комплексний порівняльний аналіз дії калікс[4]арену С-145 та його фрагменту (4-гідрокси-феніл-метиленбісфосфонової кислоти) на полімеризацію фібрину, функцію тромбоцитів та ендотеліоцитів. Показано, що фрагмент С-145, на відміну від цілої молекули, не володіє специфічною інгібіторною дією на полімеризацію фібрину. Як С-145, так і фрагмент його молекули не інгібують агрегацію тромбоцитів, але пригнічують їхню дегрануляцію. Фрагмент С-145 сприяє проліферації ендотеліоцитів у культурі клітин. Модифікація чи заміна залишків фосфорної кислоти у молекулі С-145 може дозволити уникнути дії С-145 на клітини *in vivo*, зберігаючи при цьому антиполімеризаційні властивості препарату.

5.2. ДОСЛІДЖЕННЯ С-145 *IN VIVO*

Для характеристики впливу 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.

Було проведено серію експериментів, кожен з яких було повторено тричі. С-145 вводили внутрішньовенно у кількості 1,5; 4; 7,5; 15 мг/кг. За такого введення концентрація С-145 у плазмі крові піддослідних тварин становила 4,6 μM , 12,3 μM , 23 μM , 46 μM відповідно [202].

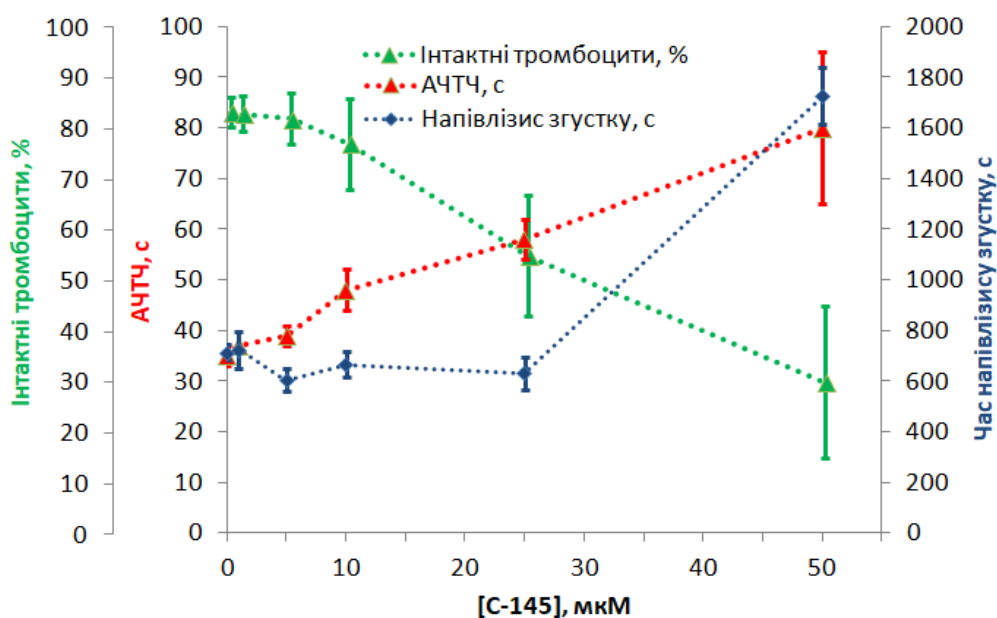


Рис. 5.6. Залежність часу зсідання плазми крові в тесті АЧТЧ, рівню інтактних тромбоцитів та часу напівлізису згустку від концентрації С-145 у кровотоці тварин. $P \leq 0,05$, $n = 5$.

Результати такого дослідження представлено на рис. 5.6. Було показано, що введення 15 мг/кг С-145 викликало максимальне гальмування полімеризації фібрину в тесті АЧТЧ, раніше показане у роботі [203]. Час зсідання плазми крові дослідних тварин подовжувався більш як удвічі. Зменшення кількості введеного С-145 викликало концентраційно-залежне зниження антиполімеризаційного ефекту. За введення 1,5 мг/кг С-145 інгібіторного ефекту не спостерігали.

За даними цитометрії, висока доза С-145 (7,5 і 15 мг/кг) викликають різке зниження кількості незмінених тромбоцитів, здатних до агрегації. Водночас, у

діапазоні 1,5-4 мг/кг (що відповідають внутрішньовенній концентрації С-145 4,6-12,3 μM) достовірних змін форми і гранулярності тромбоцитів не виявлено.

Було показано, що за введення С-145 у кількості 4 мг/кг час зсідання плазми крові дослідних тварин було подовжено у 1,5 рази порівняно з часом зсідання плазми крові контрольних тварин. Водночас, за цих умов тромбоцити зберігають здатність агрегувати, їхня форма і гранулярність не змінюється драматично, як у випадку введення 15 мг/кг С-145. Таким чином, за введення такої кількості С-145 не виникає загрози кровотечі, яка може бути ускладненням дисфункції тромбоцитів.

Надалі було вирішено провести комплексний аналіз стану системи гемостазу кролів за введення 4 мг/кг С-145. Цю концентрацію було визначено, як оптимальну, яка забезпечує з одного боку стійкий антиполімеризаційний ефект *in vivo*, а з іншого – не пригнічує функціональний стан тромбоцитів.

Вводили калікс[4]арен С -145 у кількості 12,3 μM (4 мг/кг) та визначали стан ключових параметрів системи зсідання крові. Було показано, що рівень фібриногену після адміністрації С-145 лишався незмінним та достовірно не вірізнявся через 24 та 72 години (рис. 5.7).

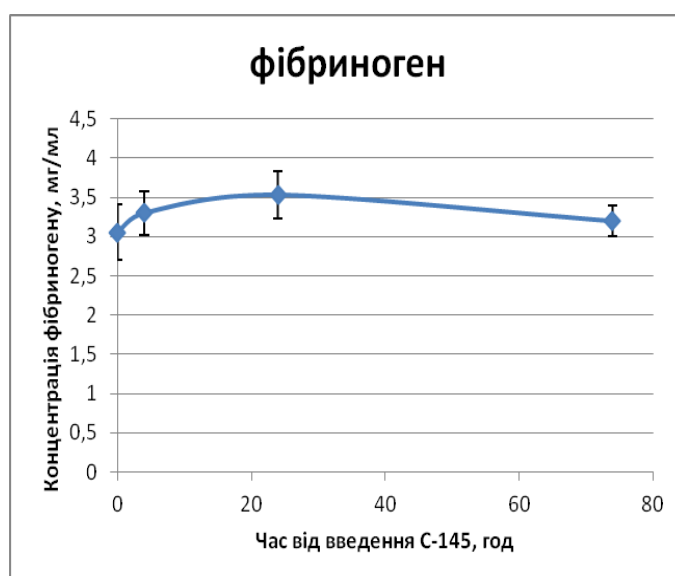


Рис. 5.7. Вміст фібриногену в плазмі крові кролів за умов внутрішньовенного введення 4 мг/кг С-145 до введення, через 4, 24 та 72 години після введення.

Оскільки фібриноген є протеїном гострої фази запалення, відсутність підвищення його рівню через 3 доби після введення С-145 може свідчити про відсутність прозапальної дії препарату.

Час зсідання плазми крові в тесті ‘тромбіновий час’ через 4 години після введення було подовжено на 25-30 %, однак його подовження було недостовірним. Попри незначний ефект С-145 на показники тесту, треба відзначити, що застосування тесту ‘тромбіновий час’ дозволяє виявити лише великі відхилення у показниках. Аналогічним чином малоінформативним виявився тест ‘протромбіновий час’ (ПЧ). Дані, представлені на рис. 5.8, вказують на подовження часу зсідання плазми крові кролів в тесті ПЧ. Показники тесту ПЧ нормалізувалися через 72 години після введення С-145.

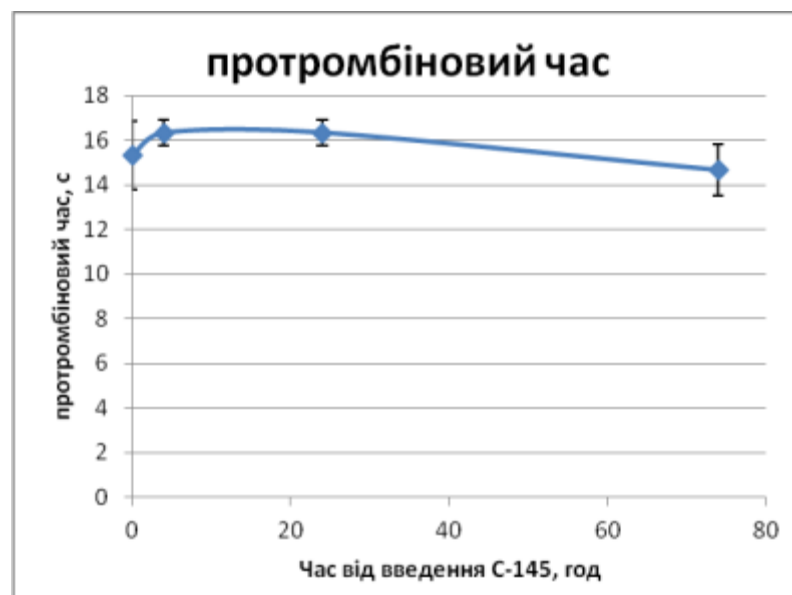


Рис. 5.8. Час зсідання плазми крові кролів в тесті ‘протромбіновий час’ за умов внутрішньовенного введення 4 мг/кг С-145 до введення, через 4, 24 та 72 години після введення.

Натомість, тест АЧТЧ показав достовірне подовження часу зсідання плазми крові кролів через 4 години після введення С-145. Ефект, хоч і послаблювався, але все ще зберігався через 24 години та повністю зникав через 72 години після введення препарату (рис. 5.9).

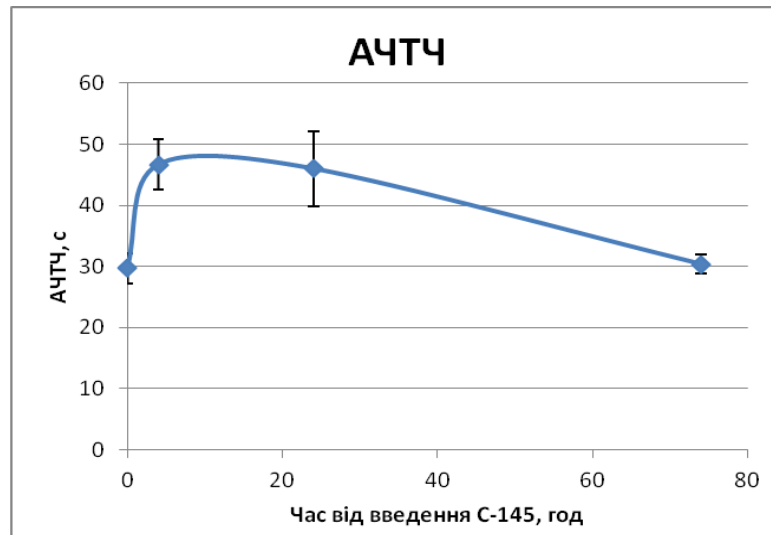


Рис. 5.9. Час зсідання плазми крові кролів в тесті ‘активованій частковий тромбопластиновий час’ за умов внутрішньовенного введення 4 мг/кг С-145 до введення, через 4, 24 та 72 години після введення.

Таким чином, показано, що С-145, введений у кількості 4 мг/кг, викликав достовірне подовження часу зсідання плазми крові в тесті АЧТЧ в 1,5 разів та не впливав на рівень фібриногену.

Надалі проводили характеристику тромбоцитарної ланки гемостазу за дії С-145. Визначали такі параметри, як форма та гранулярність тромбоцитів (протокова цитометрія), кількість тромбоцитів, агрегація тромбоцитів (агрегатометрія).

Було показано, що введення С-145 у кількості 4 мг/кг викликає зміну форми та гранулярності тромбоцитів на 10-15 %, при цьому показник значно відрізнявся у різних особин. Показник повертався до контрольних значень лише через 3 доби після введення С-145 (рис. 5.10).

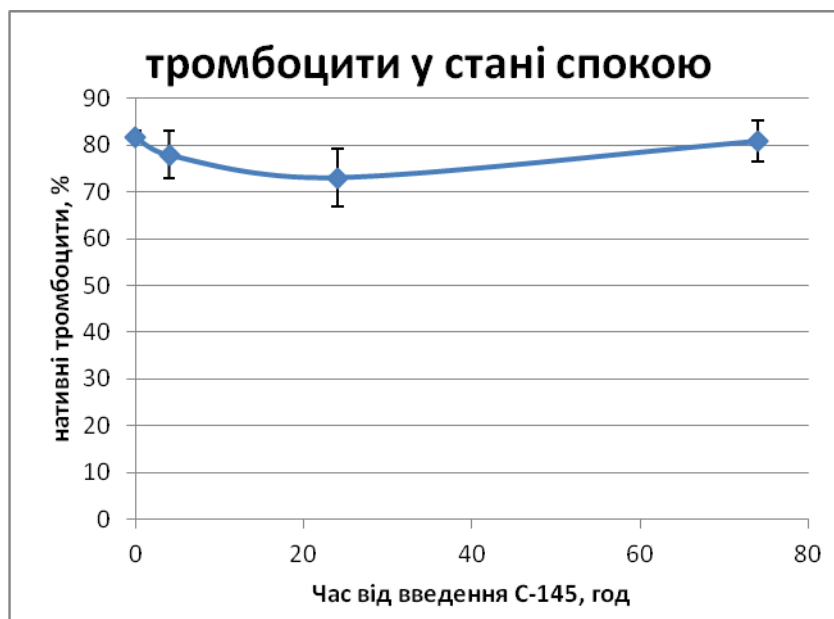


Рис. 5.10. Відсоток незмінених тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові кролів за умов внутрішньовенного введення 4 мг/кг С-145 до введення, через 4, 24 та 72 години після введення.

Кількість тромбоцитів у плазмі крові, збагаченій тромбоцитами, після введення калікс[4]арену С-145 було зменшено на 30%, однак не нижче показника норми (150 тис./ μ л – нижня межа норми). Через три доби після введення С-145 кількість тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові відновлювалася до початкового рівня (рис. 5.11).

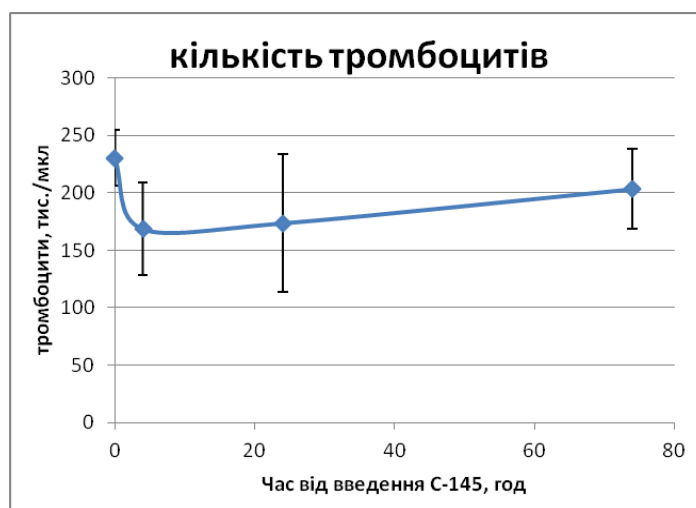


Рис. 5.11. Відсоток незмінених тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові кролів за умов внутрішньовенного введення 4 мг/кг С-145 до введення, через 4, 24 та 72 години після введення.

Водночас, ступінь агрегації тромбоцитів, обчислений у відсотках від загальної кількості тромбоцитів, суттєво не змінювався, тоді як у попередніх дослідях з високими концентраціями С-145 спостерігали зниження здатності тромбоцитів агрегувати під дією ADP від 25-35% (в контролі) до 10 % і менше. При введенні 4 мг/кг С-145 показник ступеня агрегації тромбоцитів знижувався не більш, ніж до 20 % та знаходився у межах норми (рис. 5.12).

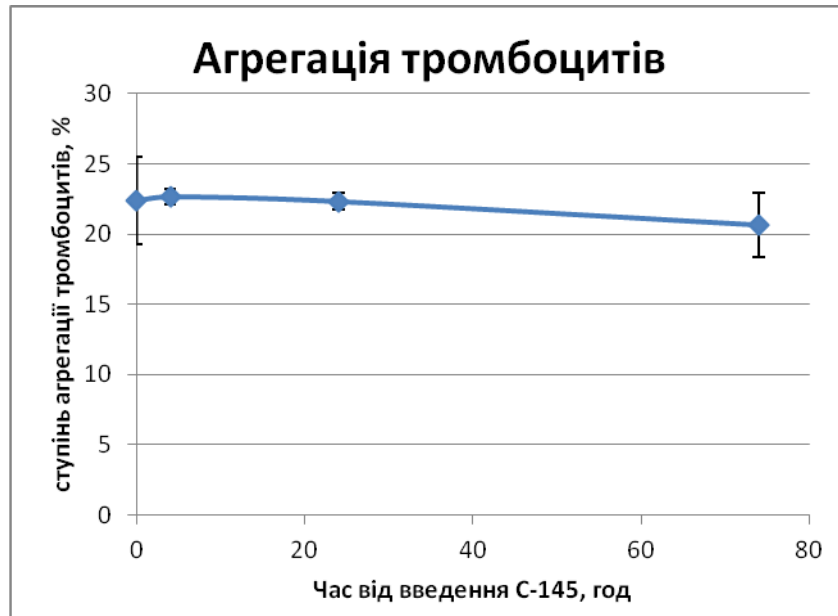


Рис. 5.12. Кількість тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові кролів за умов внутрішньовенного введення 4 мг/кг С-145 до введення, через 4, 24 та 72 години після введення.

Таким чином, було визначено оптимальну дозу С-145 для внутрішньовенного введення, яка дозволяє досягти відчутного антиполімеризаційного ефекту та уникнути антитромбоцитарної дії.

Клітинна ланка гемостазу, представлена тромбоцитами та ендотеліоцитами стінок судин, є найбільш чутливим компонентом гемостазу, оскільки першою реагує на пошкодження судин та бере безпосередню участь у формуванні фібриново-тромбоцитарного тромбу під час зсідання крові [204]. Вивчення дії на тромбоцити та ендотеліоцити будь-якого потенційного антитромботичного препарату є неодмінною умовою визначення ефективності його антикоагуляційної дії [205, 206].

Раніше при внутрішньовенному введенні калікс[4]арену С-145 кролям спостерігали тромбоцитопенію, яка, імовірно, не може бути пов'язана зі

зменшенням продукції тромбоцитів мегакаріоцитами, оскільки розвивається вже через 2 години, тоді як час напівжиття тромбоцита у кровотоці становить до 100 годин [207]. Було зроблено припущення, що калікс[4]арен С-145 викликає різке прискорення руйнування тромбоцитів. Механізм цього явища викликає надзвичайний інтерес.

Цікаво, що не було виявлено 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 було використано спектрофлуориметрію з рН-чутливим зондом (акридином оранжевим), який спонтанно накачувався у клітини 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 вивільнення рН-чутливого зонду, тобто – дегрануляції (рис. 5.13).

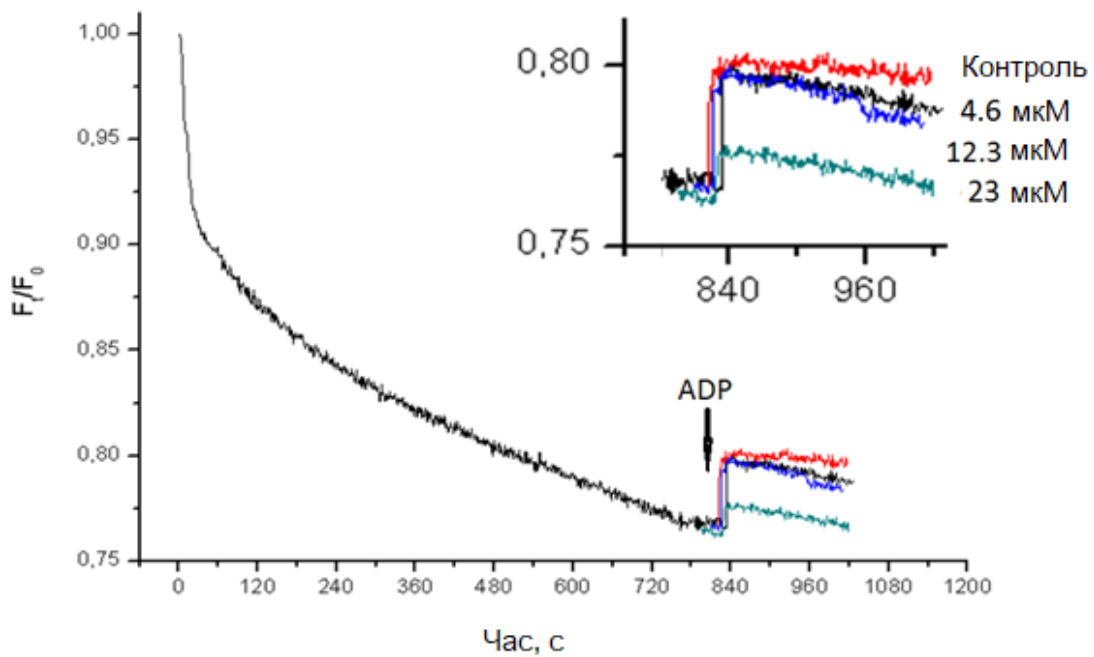


Рис. 5.13. Спектрофлуориметрія депонування і викиду з тромбоцитів людини рН-чутливого барвника за присутності калікс[4]арену С-145 у кількості 4,6; 12,3; 23 μM . Дані типового експерименту, $n = 3$.

Було показано, що ефект, який у досліді *in vitro* був мінімальним, *in vivo* виявлявся значно суттєвіше (рис. 5.14). Було показано, що при обраній оптимальній дозі С-145 виникає дисфункція тромбоцитів, яка втім не надто сильно впливає на їхню агрегаційну здатність.

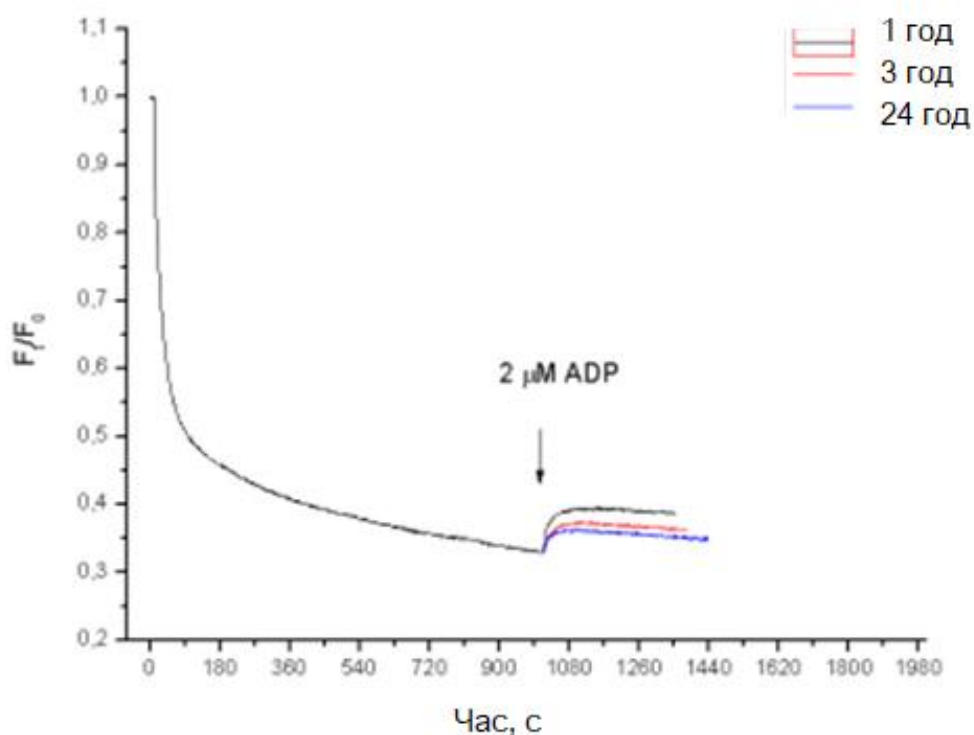


Рис. 5.14. Спектрофлуориметрія депонування і викиду з тромбоцитів кролів рН-чутливого барвника до введення йому 4 мг/кг калікс[4]арену С-145 на організм ($\sim 12,3 \mu\text{M}$ у кровотоці) та через 4 і 24 години після введення.

Пригнічення дегрануляції під дією С-145 *in vivo* було максимальним через 4 години після введення С-145, зберігалось після 24 годин та елімінувалось через три доби після введення (рис. 5.15). Дані факти узгоджуються із загальною картиною дії калікс[4]арену С-145 та особливостями його дії на тромбоцитарний гемостаз.

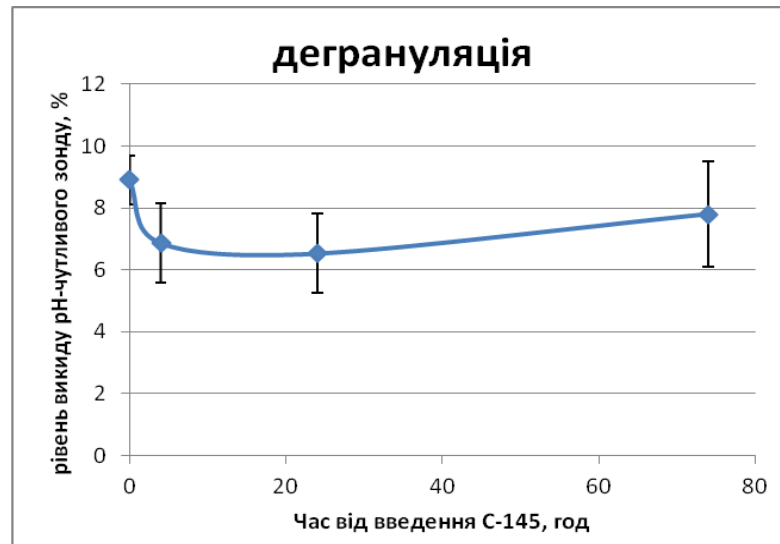


Рис. 5.15. Ефективність дегрануляції тромбоцитів кролів за умов внутрішньовенного введення 4 мг/кг С-145 до введення, через 4, 24 та 72 години після введення.

Таким чином, розкрито природу антитромбоцитарної дії С-145, яка полягає у пригніченні здатності тромбоцитів до індукованої дегрануляції в процесі активації. Даний феномен потребує подальшого ґрунтовного вивчення.

Іншим важливим показником антиполімеризаційної дії С-145 є загальний гемостатичний потенціал (ЗГП) – тест, призначений для скринінгу та оцінки рівноваги зсідання крові та фібринолізу [208]. Зазвичай активатори, що ініціюють формування тромбіну, за присутності чи у відсутності tPA вносять до плазми крові для ініціації зсідання. Зміну оптичної густини під час формування згустку та його дегградації фіксують в часі за допомогою спектрофотометра [209, 210].

Таким чином, ЗГП можна вважати базовим методом для оцінки взаємодії між прокоагулянтною та фібринолітичною ланками гемостазу. Завданням даної роботи було оцінити ефект С-145 на ЗГП у плазмі крові *in vivo* та *in vitro*.

Щоб оцінити ефект С-145 на ЗГП *in vivo*, здоровим кролям внутрішньовенно вводили 1 мл розчину С-145 у фізіологічному розчині. Оскільки загальний об'єм крові дорослого кроля становить 250 мл, рівень С-145 у крові тварин був 0.03 мг/мл (20 μ M).

Порівнювали ЗГП плазми крові кролів до введення С-145 та після 4 годин з моменту його внутрішньовенного введення. Було показано, що ін'єкція С-145 зменшує ЗГП плазми крові на 21 ± 8 %. Типові криві зміни оптичної густини

показано на рис. 5.16. Спостерігали також помірне подовження часу напіввлісусу згустку (1800 ± 50 проти 2070 ± 35 s у контролі).

Представлені дані дозволили підтвердити інгібіторну дію С-145 на прокоагулянтний потенціал плазми крові та відсутність достовірної дії на фібриноліз *in vivo*. Нарешті, використовуючи ЗГП, зроблено висновок про те, що не дивлячись на значну антикоагулянтну дію С-145, прокоагулянтна та фібринолітична ланки гемостазу за його дії знаходяться у динамічній рівновазі. Крім того, за допомогою ЗГП зменшено діючу дозу С-145 до $20 \mu\text{M}$.

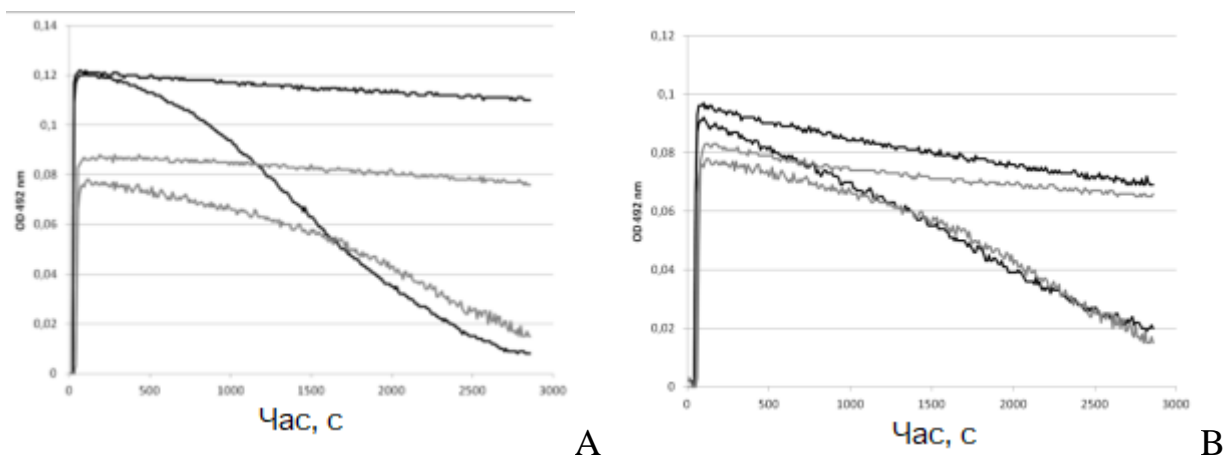


Рис. 5.16. Оптична густина плазми крові кроля під час зсідання, ініційованого АЧТЧ-реагентом, та гідролізу згустку під дією tPA за умов внутрішньовенного введення калікс[4]арену С-145 ($20 \mu\text{M}$). Криві типового експерименту.

5.3. ДІЯ КАЛІКС[4]АРЕНУ С-145 НА АНГІОГЕНЕЗ У МОДЕЛІ *Danio rerio*

Дослідження ангіогенезу з метою скринінгу проангіогенних препаратів є складним комплексним процесом, пов'язаним з моделями *in vivo*, значною тривалістю проведення дослідження та неоднозначністю результатів. Однак, було показано, що *Danio rerio* є придатною моделлю для тестування дії малих молекул на формування судин. Мережа кровоносних судин є дуже характерною для ембріонів цих риб. Зокрема, мова йде про проростання підшлункових судин, які можуть бути профарбовані й візуалізовані з використанням мікроскопії у реальному часі на живих тваринах.

Малі молекули додають безпосередньо до культурального середовища, в якому розвиваються риб'ячі ембріони, штучно позбавлені яйцевої оболонки за

допомогою пронази. Завдяки цьому вони вільно дифундують у ембріон. У якості позитивного контролю застосовують відомий антиангіогенний агент РТК, який було протестовано і на моделях ссавців. Ця сполука припиняє ангиогенез і формування нових судин за умов постійного контакту з ембріоном. У основі методу лежить перевірка: чи нівелюватиме дію РТК введення до середовища інкубації калікс[4]арену С-145.

Під бінокуляром чітко видно міжсегментарні судини, які проростають від центральної осі ембріону (рис. 5.17).

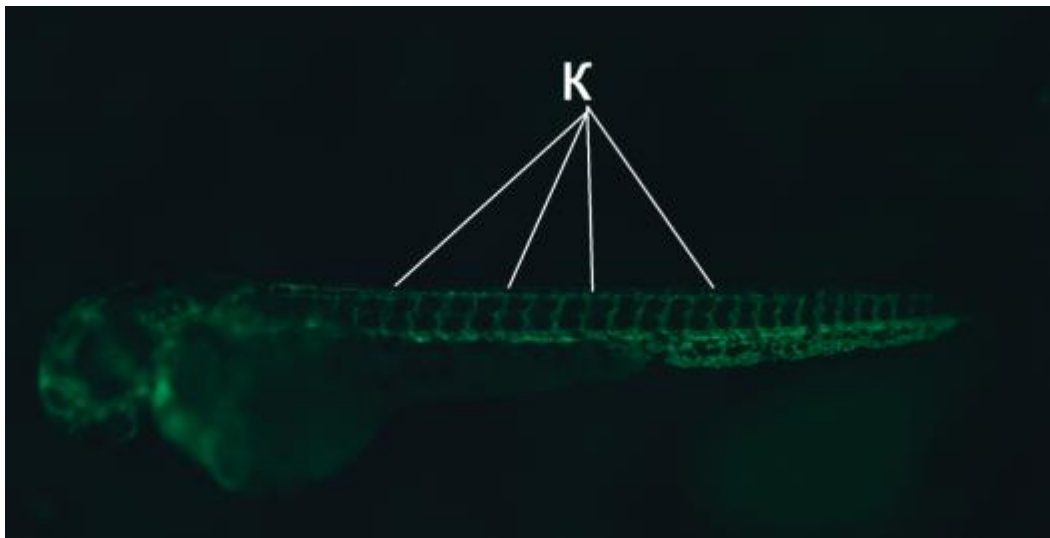


Рис. 5.17. Проростання міжсегментарних судин у ембріона *Danio rerio* у контролі.

Водночас, при застосуванні антиангіогенного агента РТК міжсегментарні судини відсутні майже повністю (рис. 5.18). Таким чином, ангиогенез було заблоковано. Важливим є виявлення ефекту С-145 на цей процес.

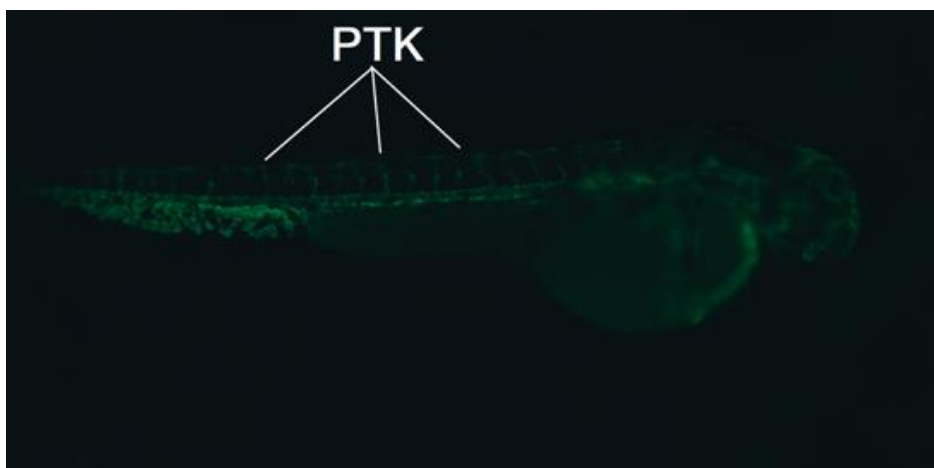


Рис. 5.18. Проростання міжсегментарних судин у ембріона *Danio rerio* за умов введення до культурального середовища інгібітора ангиогенезу РТК.

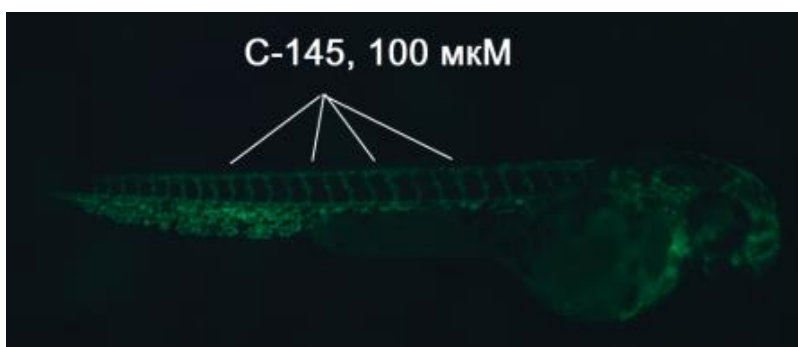
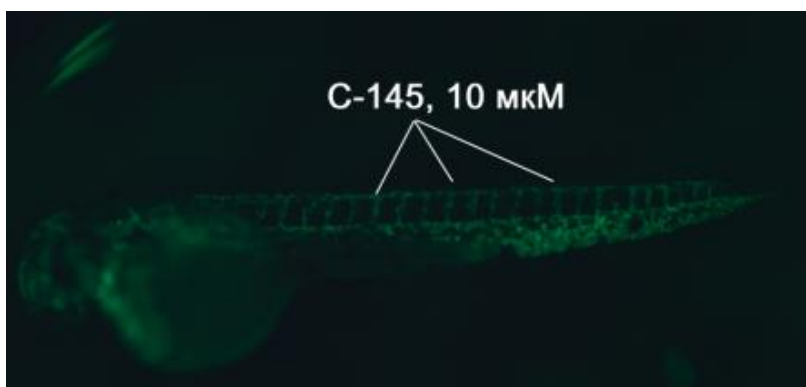
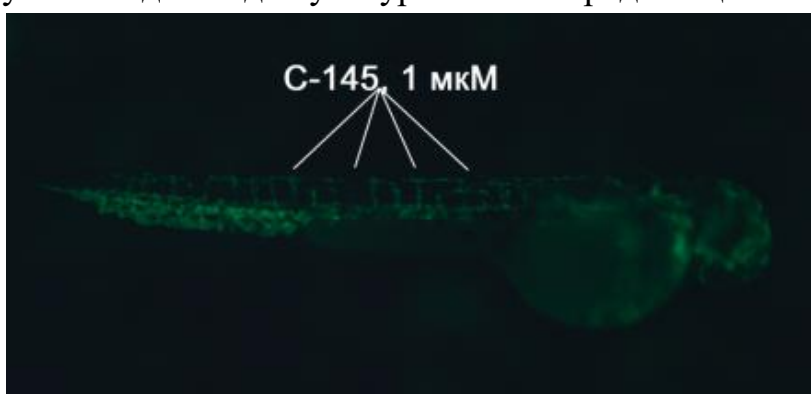


Рис. 5.19. Відновлення проростання міжсегментарних судин у ембріона *Danio rerio* за умов введення до культурального середовища різних концентрацій калікс[4]арену С-145 на тлі адміністрації антиангіогенного агента (РТК).

Як видно на рис. 5.19, введення калікс[4]арену С-145 відновлює проростання міжсегментарних судин. При цьому ефект носить дозозалежний характер.

Раніше концентрацію 10 μM було обрано як ефективну дозу для антитромботичної дії С-145. Як показали дослідження у модельній системі, вона також мала проангіогенний ефект. Для кількісної оцінки проангіогенного ефекту скористалися морфометрією у програмі ImageJ та оцінили сумарну довжину міжсегментарних судин у ембріонів *Danio rerio* в різних групах (рис. 5.20).

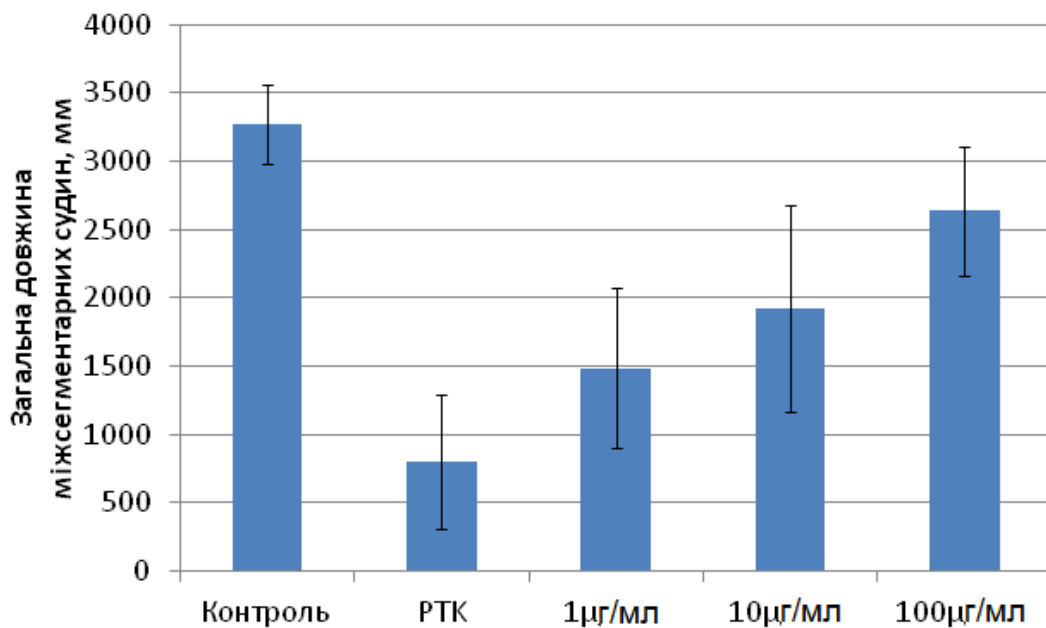


Рис. 5.20. Ефект різних концентрацій калікс[4]арену С-145 на загальну довжину міжсегментарних судин ембріона *Danio rerio* за умов його культивування з антиангіогенним агентом РТК. Результати обчислено у програмі ImageJ.

Ефект стимулювання ангіогенезу як додатковий ефект антитромботичного препарату може мати дуже вагоме значення зокрема при реішемізації тканин та органів.

РОЗДІЛ 6. СТВОРЕННЯ ТА ВИПРОБУВАННЯ КРОВОСПИННОГО ЗАСОБУ КАРБОГЕМОСТАТ

6.1. ГЕМОСТАТИКИ ЛОКАЛЬНОЇ ДІЇ

Неконтрольована масивна кровотеча є провідною причиною смерті після травм і поранень, що отримані під час бойових дій, природних і техногенних катастроф. Найбільшу небезпеку для життя являють кровотечі з судин великого і середнього калібрів, переважно артеріального типу. Частота уражень кровонесних судин під час сучасних військових конфліктів за даними різних авторів складає від 2 до 8 %. При цьому у структурі судинної травми до 70 % від усіх випадків складають ушкодження магістральних судин кінцівок, і у 60 % поранених безпосередньою причиною смерті є масивна крововтрата. Наведені факти свідчать про те, що створення нових потужних максимально безпечних засобів з виразною гемостатичною дією, які б забезпечували своєчасну зупинку масивної зовнішньої кровотечі на етапі доклінічної допомоги, є пріоритетним завданням.

За останні 20 років для екстреної зупинки зовнішньої кровотечі застосовують сучасні контактні гемостатики, які при контакті з кров'ю формують згусток (тромб) – своєрідну пробку, що закриває рану.

Існує декілька груп гемостатиків контактної дії:

- створені на основі колагену й желатину (абсорбуюча губка "Cutanplast", РФ і Індія; желатинові губки "Спонгостан", Данія; і "Жельфоум", США, губка колагенова кровоспинна, РФ);

- створені на основі цеоліту й каоліну (QuikClot виробництва Z-medica Inc, USA);

- похідні хітозану (Celox, ChitoGaze виробництва HemCon MT Inc, USA);

- фібрин-вмісні гемостатичні засоби (Fibrin Sealant Dressing).

Недоліком зазначених кровоспинних засобів є недостатній гемостатичний ефект та слабка адгезивна здатність гемостатиків, створених на основі желатину і колагену, а також послідовна активація всього коагуляційного каскаду при

застосуванні каоліну. За масивної кровотечі при порушенні функціонування системи зсідання крові (гемофілія) та за паренхіматозної кровотечі такі засоби мало ефективні.

Кровоспинний засіб гідрогель SB50 містить батроксобін – компонент отрути південноамериканської гримучої змії. Батроксобіновмісний гідрогель може бути найбільш корисним під час операційних втручань при гепаринотерапії. Однак цей засіб є малоефективним за масивної кровотечі: особливість дії батроксобіну полягає в перетворенні фібриногену на фібрин без активації фактору XIII системи зсідання крові. Такий фібрин є ковалентно нестабілізованим («непрошитий»), що призводить до швидкої елімінації згустку з рани та поновлення кровотечі.

Перспективним напрямом у цій галузі є розробка композитних кровоспинних засобів з метою вдалого поєднання функціональних та експлуатаційних властивостей окремих складових, а також пошук нескладних і оригінальних підходів щодо їх отримання.

У рамках представленої наукової роботи вирішено задачу створення вітчизняного кровоспинного матеріалу для зупинки кровотеч та прискорення загоювання ран на основі двох основних компонентів – ензимного активатора зсідання крові у якості потужного кровоспинного агенту та вітчизняних перев'язувальних засобів, основою яких є активовані активовані волокнисті вуглецеві матеріали АУВМ-"Днепр"-МН у якості активної вуглецевої матриці.

Ефективність комбінованого перев'язувального засобу визначено активністю ензимного активатора зсідання крові, який викликає швидке припинення кровотечі завдяки безпосередній активації протромбіну з подальшим формуванням ковалентно стабілізованого фібрину та високим сорбційним потенціалом АУВМ, які є не тільки матрицею для іммобілізації ензимного активатора, але й адсорбційним компонентом, здатним забезпечити захист рани від інфекції і створити умови для сприятливого перебігу раневого процесу на етапах лікування.

Одне з основних завдань роботи полягало у розробці лабораторного технологічного регламенту створення комбінованого перев'язувального засобу

для зупинки кровотеч та прискорення загоювання ран, що є технічним керівництвом до виготовлення експериментальних зразків засобу. У рамках цього завдання було окреслено коло задач: 1) оцінка гемостатичної дії дослідних зразків комбінованого перев'язувального засобу в умовах експериментально створеної масивної кровотечі з метою визначення оптимальної кількості ензимного активатора зсідання крові у складі комбінованого перев'язувального засобу; 2) визначення якісного і кількісного складу компонентів та дизайну варіантів комбінованого перев'язувального засобу, призначеного для зупинки масивних кровотеч при моделюванні гострої летальної крововтрати з стегнової артерії свині та паренхіматозної кровотечі; 3) визначення впливу опромінення на кровоспинну дію комбінованого перев'язувального засобу з метою валідації процесу його радіаційної стерилізації згідно ДСТУ ISO 11137-2003.

До сьогоднішнього дня проблема ефективного гемостазу є надзвичайно актуальною. Кровотеча може бути ускладненням багатьох уражень та захворювань, а також мати ятрогенний характер. Кровотеча під час оперативного втручання або безпосередньо після нього є одним з найбільш небезпечних ускладнень в хірургічній практиці, яке в короткі терміни може призвести до летального результату. Особливо гострою проблема зупинки кровотечі є у абдомінальній хірургії, що пов'язано з анатомо-топографічними і фізіологічними особливостями та високою частотою ушкоджень паренхіматозних органів і збільшенням кількості оперативних втручань в них [211, 212, 213, 214]. В цілому, проблема зупинки паренхіматозних кровотеч містить багато невирішених питань, що спонукає до пошуку ефективних і малотравматичних способів досягнення гемостазу [215, 216, 217, 218].

Кровотечу і крововтрату слід відносити до найбільш частих і небезпечних ускладнень внаслідок отриманих травм: частота уражень кровоносних судин по даним різних авторів досягає 8 % і серед них від 50-70 до 95% складають пошкодження артерій кінцівок [219, 220]. Слід зазначити, що під час сучасних військових конфліктів 10-15 % всіх смертей припадає на кровотечі з судин кінцівок [221, 222].

Сьогодні при статистичних дослідженнях введено поняття "Potentially survivable deaths", що відноситься до загиблих, які могли б залишитися живими при своєчасному наданні їм першої допомоги. Таким чином у сучасному військовому конфлікті триваюча зовнішня кровотеча при пораненнях кінцівок є основною потенційною причиною смерті військовослужбовців на полі бою. У зв'язку з цим важко переоцінити значення адекватної догоспітальної допомоги. Створення дешевих та високоефективних, простих у застосуванні та безпечних гемостатиків є вкрай актуальною проблемою як загальної гемостазіології, так і польової медицини.

Останнім часом за кордоном і в нашій країні все більшого поширення набувають місцеві гемостатичні засоби (МГЗ), які діють прицільно і можуть бути використані при пошкодженні великих судин і при дифузній кровоточивості [223]. Існуючі гемостатики можна умовно поділити за здатністю викликати зсідання крові пацієнта і до них пред'являються наступні вимоги:

- в мінімальні терміни повністю припиняти кровотечу;
- володіти високою адгезивністю;
- щільно прилягати до поверхні рани;
- запобігати поновленню кровотечі;
- не чинити подразливої дії на навколишні тканини;
- не мати токсичності;
- не впливати на функцію гемостазу в загальному кровообігу;
- бути зручними у застосуванні (рівномірно і одномоментно закривати раневу поверхню, легко зніматися з неї).

Велику групу МГЗ складають засоби, що містять у своєму складі колаген і желатин. До них відносяться гемостатична абсорбуюча желатинова губка "Cutanplast" (РФ і Індія), желатинова губка "Спонгостан" (Данія) і "Жельфоум" (США), губка колагенова кровозупиняюча (РФ). Терапевтична ефективність МГЗ на основі колагену визначається як дією лікарських препаратів, що входять до їх складу, так і дією унікального за своїми біологічними властивостями колагену [224], який є активним учасником процесів тканинної репарації за рахунок

посилення синтезу власного колагену і стимуляції гемостазу. Однак відзначається їх недостатній гемостатичний ефект і слабка адгезійна здатність [225].

За останні 20 років в проблемі екстреної зупинки масивних кровотеч досягнуто певного прогресу, що пов'язаний з появою нового покоління сучасних контактних гемостатиків – *гемостопів*, які при контакті з кров'ю в результаті хімічної або фізичної реакції формують псевдозгустки. Існує дві основні групи гемостатиків контактного застосування – на основі цеоліту і каоліну та на основі хітозану.

Кровозупинні засоби QuikClot (Amazon Inc., США), що призначені для зупинки зовнішніх масивних кровотеч, ефективно використовували в умовах бойових дій. Сьогодні лідером американського ринку локальних кровозупинних засобів є бинти, просочені суспензією каоліну – QuikClot 3-го покоління, які прийшли на зміну першим двом виробам і є неодмінним компонентом військових аптечок. При контакті каоліну з кров'ю негайно ініціюється процес зсідання крові шляхом активації прекалікреїна в його активну форму, що, в свою чергу, активує XII фактор зсідання крові та ініціює початок/посилення власної коагуляції.

Pusateri зі співавторами сформулювали 7 критеріїв, яким повинні відповідати ідеальні кровозупинні засоби, які призначені для використання у бойових умовах: першою і найбільш важливою характеристикою є їх здатність зупинити артеріальну кровотечу протягом 2 хвилин; зручність у використанні медичним персоналом і не тільки, тривалий термін зберігання (2-3 роки), невеликі розміри та вага, безпечність використання та нарешті, низька ціна, що сприяє поширюванню його застосування. Однак на сьогодні не існує такого продукту, що поєднує вищезазначені стандарти, тому кровозупинна дія розглядається як головний критерій при виборі гемостатичного засобу. Згідно зібраній інформації найбільш перспективними гемостопами вважаються QuikClot, ChitoGaze і Celox [226], а також фібрин-вмісна пов'язка Fibrin Sealant Dressing, що здатна контролювати агресивну фатальну кровотечу у експериментальних тварин на тлі мінімальних ускладнень [227]. Порівняльна оцінка пов'язок на основі хітозану і Fibrin Sealant показала, що на відміну від стандартних польових армійських засобів обидві зупиняли первинну артеріальну кровотечу. Слід зазначити однак,

що фібрин-вмісна пов'язка забезпечувала гемостаз терміном до 4 днів, тоді як перев'язувальний засіб на основі хітозану – не більш, ніж дві години після застосування, що передбачає ризик рецидиву кровотечі для артеріальних ран і особливо в тих випадках, коли затримується подальша допомога.

Розробкою останніх років є створений в університеті Райса (США) ефективний кровоспинний засіб, що являє собою гідрогель SB50 з синтетичних нановолокон, наповнений батроксобіном – компонентом отрути двох видів південноамериканської гримучої змії (*Bothrops atrox* і *B. moojeni*), який отримують за допомогою генетично модифікованих бактерій. Батроксобін-вмісний засіб вводять в рану, де він сприяє зсіданню крові протягом декількох секунд. Гідрогель може бути найбільш корисним під час операційних втручань, особливо у пацієнтів, які приймають антикоагулянти.

Незважаючи на певний прогрес у розв'язанні проблеми контролювання масивної кровотечі, досягнутий з появою нового покоління сучасних контактних гемостатиків, розробка нових потужних, максимально безпечних і недорогих гемостатичних засобів не втрачає актуальності.

У рамках представленої наукової роботи вирішували задачу створення двохкомпонентного аплікаційного композиту для зупинки неконтрольованих кровотеч та прискорення загоювання ран на основі ензимного активатора зсідання крові у якості потужного кровоспинного агенту та вітчизняних перев'язувальних засобів на основі активованих волокнистих вуглецевих матеріалів АУВМ-«Днепр»-МН у якості високоактивної вуглецевої матриці.

Комбінований засіб відрізняється від вищезгаданих контактних гемостатиків тим, що забезпечує припинення кровотечі завдяки формуванню аутогенного ковалентно стабілізованого полімеру фібрину та, крім того, завдяки активній вуглецевій матриці здатний захистити рану від інфекції та створити умови для сприятливого перебігу раневого процесу на наступних етапах лікування через зменшення набряку та поліпшення мікроциркуляції.

Саме високий сорбційний потенціал активованих волокнистих вуглецевих сорбентів забезпечує швидке поглинання з зони поранення великої кількості різноманітних біологічно активних компонентів, що у результаті сприяє

покращенню місцевого гемостазу, купуванню травматичного набряку, зниженню інтенсивності місцевої та загальної запальної реакції, попередженню розвитку ускладнень, прискоренню репаративних процесів та скороченню терміну загоювання ран.

6.2. БІОІНФОРМАТИЧНИЙ АНАЛІЗ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ ПРОТРОМБІНУ ЛЮДИНИ ТА РЯДУ ЛАБОРАТОРНИХ ТВАРИН

Зазвичай гемостатики, призначені для зупинки масивних кровотеч, діють на систему зсідання крові неспецифічно, активуючи каскад зсідання на ранніх етапах, зокрема, запускають калікреїн-кінінову систему контактної активації (QuickClot та інші гемостатичні засоби на основі каоліну), активують тромбоцити (колаген-вмісні губки), містять клеєві речовини (Celox та інші матеріали на основі хітозану), тощо.

Основою гемостатичної дії розробленого гемостатика є ензимний активатор зсідання крові, який діє на заключних етапах коагуляційного каскаду, безпосередньо активуючи протромбін. З огляду на це, готуючись до експериментів на крупних тваринах, було проведено біоінформатичний аналіз амінокислотних послідовностей протромбіну, які безпосередньо межують із пептидним зв'язком, розщеплюваним при активації протромбіну.

Попри високий ступінь гомології послідовностей протромбіну людини та свині (рис. 6.1), амінокислотні залишки, розміщені у S1, S2 та S3 центрах протромбіну свині, а саме Asp-Asp-Phe, у протромбіні людини замінені на Ser-Glu-Tyr. При цьому, як тирозин, так і фенілаланін, розташовані в центрі S1, мають ароматичне кільце, а розташовані у S2-центрах аспарагінова кислота і глутамінова кислота мають негативний заряд, що загалом вказує на доступність даних послідовностей для активного центру ензимного активатора.

Свиня	1	MAHVGGLWLHGCLALAVLVSLVHSQHVFMAPQQALSLLQRRARRANSGFEEEMRKGNLERE	60
Людина	624	MAHV GL L GCLALA L SLVHSQHV+APQA SLLQR RRAN+ F EE+RKGNLERE	682
Свиня	61	CVEEQCSREEAYEALES PSETDAFWAKYTACESVRKSREKLVECLEGNCAEGLGMNYRGN	120
Людина	683	CVEE CS EEA+EALES + TD FWAKYTACE+ R R+KL CLEGNCAEGLG NYRG+	742
Свиня	121	ISVTRSGIECQLWRSRYPHKPEVNSTMYPGADLRENFCRNPDSITGPWCYTTSPVRRRE	180
Людина	743	+++TRSGIECQLWRSRYPHKPE+NST +PGADL+ENFCRNP S TGPWCYTT PTVRR+	802
Свиня	181	ACSIPVCGQGRVTAELIPRSGGSTVNVSPPLETCVPERGRQYQGR LAVTSHGSPCLAWGS	240
Людина	803	CSIPVCGQ +VT + PRS GS+VN+SPPLE CVP+RG+QYQGR LAVT+HG PCLAW S	862
Свиня	241	SQAKALS KDQDFNPAVPLVENFCRNP DGDQEGAWCYVAGQPGDFEYCDLDYCEE PVDEEV	300
Людина	863	+QAKALS K QDFN AV LVENFCRNP DGD+EG WCYVAG+PGDF YCDL+YCEE V+EE	922
Свиня	301	GDALGENADAAIEGR T TADDF QPFFNEKTFGAGEADCGLRPLFEKSSLEDKTEKELFESY	360
Людина	923	GD L E++D AIEGR T ++Q FFN +TFG+GEADCGLRPLFEK SLEDKTE+EL ESY	982
Свиня	361	IEGRIVEGSDAEIGLAPQVMI FRKSPQELLCGASLISDRWVLTAAHCLLYPPWDKNFTE	420
Людина	983	I+GRIVEGSDAEIG++PQV M+FRKSPQELLCGASLISDRWVLTAAHCLLYPPWDKNFTE	1042
Свиня	421	NDLLVRIGKHSRTRYERNIEKISMLEKIYIHPRYNWRENLD RDIAL LKLRKPITFSDYIH	480
Людина	1043	NDLLVRIGKHSRTRYERNIEKISMLEKIYIH-----	1073
Свиня	481	PVCLPKETATKLLRAGYGRVTGWGNLKETWTSASEVQPSVLQVVNLPIVERLVCKAS	540
Людина	1074	-----VTGWGNLKETWTANVGKQPSVLQVVNLPIVERPVCKDS	1112
Свиня	541	TRIRITDNMFCAGYKPDEGKRGDACEGDSGGPFVMKSPFNRRWYQMGIVSWGEGCDRDGK	600
Людина	1113	TRIRITDNMFCAGYKPDEGKRGDACEGDSGGPFVMKSPFNRRWYQMGIVSWGEGCDRDGK	1172
Свиня	601	YGFYTHVFRLK KWKVIDRFG	622
Людина	1173	YGFYTHVFRLK KWKVID+FG	1194

Рис. 6.1. Пошук гомології послідовностей протромбіну людини та свині, здійснений за допомогою сервера Standard Protein BLAST. Жирним шрифтом позначено амінокислотні залишки, які знаходяться у S1, S2 та S3 центрах протромбіну, залучених під час його активації до тромбіну фізіологічним активатором. Сірим кольором додатково позначено амінокислотні залишки, які знаходяться у S1, S2 та S3 центрах протромбіну, залучені у процесі активації протромбіну використаним нами ензимним активатором.

В той же час у людини в S3-центрі розміщено серин (нейтрально-полярний амінокислотний залишок), а у свині у S3-центрі знаходиться негативно заряджена аспарагінова кислота (рис. 6.2).

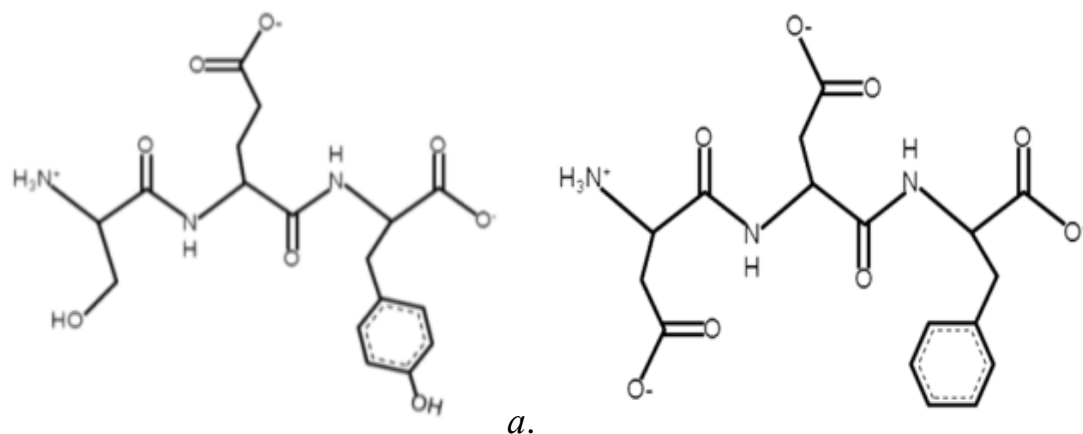


Рис. 6.2. Структурні формули амінокислот, які знаходяться у S1, S2 та S3 центрах протромбіну свині (а - Asp-Asp-Phe) та людини (б - Ser-Glu-Tyr).

Таким чином, на основі даних біоінформатичного аналізу можна припустити, що використаний нами активатор зсідання крові буде з меншою специфічністю діяти на систему зсідання крові свині у моделі гострої артеріальної кровотечі.

Попередні випробування комбінованого гемостатичного сорбційного матеріалу раніше було з успіхом проведено на щурах. Саме на моделі гострої артеріальної кровотечі у щурів було підібрано умови дослідження та підготовки матеріалу: кількість активатора, спосіб фіксації, кількість хлориду кальцію, тощо.

Такі ж самі концентрації ензимного активатора були насамперед апробовані *in vitro* і протестовані на плазмі крові людини, яка зрештою і буде головним користувачем майбутнього гемостатичного засобу. Тому ми застосували біоінформатичний підхід для порівняння послідовностей протромбіну людини та щура. Було показано, що амінокислотні залишки, розміщені у S1, S2 та S3 центрах протромбіну людини, а саме Ser-Glu-Tyr, у протромбіні щура замінені на Asp-Glu-Phe (рис. 6.3). Отже, у центрі S1 протромбіну щура та протромбіну людини знаходиться амінокислотний залишок із ароматичними кільцями – фенілаланін та тирозин відповідно. У центрі S2 у обох видів розташовано глутамінову кислоту. Лише у центрі S3, який відіграє найменшу роль у процесі впізнавання ензимом свого субстрату, спостерігаємо заміну: у щура це

амінокислотний залишок аспарагінової кислоти, у людини – амінокислотний залишок серину (рис. 6.4).

Щур	1	MLHVRGLGLPGCLALAAALASLVHSHQHVFLAPQQAALLQQRVRRANSGFLEELRKGNLERE	60
Людина	1	M HVRGL LPGCLALAAAL SLVHSHQHVFLAPQQA ALLQQRVRRAN+ FLEE+RKGNLERE	59
Щур	61	CVVEEQCSYEEAFEALESPQD TDVFWAKYTVCDL SVRKPREFMDCLEGR CAMDLGLNYHGN	120
Людина	60	CVVEE CSYEEAFEALLES TDVFWAKYT C++ R PR+ CLEG CA LG NY G+	119
Щур	121	VSVTHTGIECQLWRSRYPHRPDINSTTHPGADLKENFCRNPDSSSTSGPWCYTTDPTVRR	180
Людина	120	V++T +GIECQLWRSRYPH+P+INSTTHPGADL+ENFCRNPDSSST+GPWCYTTDPTVRR+	179
Щур	181	ECSIPVCGQEGRTTVKMTPRSRGSKENLSPPLGECLELGRGLYQGNLAVTTLGSPCLAWD	240
Людина	180	ECSIPVCGQ+ + TV MTPRS GS NLSPL +C+ +RG+ YQG LAVTT G PCLAW	238
Щур	241	SLPTKTL SKYQNFDPVKLVQNFRCRNPDRE EEG AWCFVAQQPG-FEYCSLNYCDEAVGEE	299
Людина	239	S K LSK+Q+F+ V+LV+NFCRNPD DEEG WC+VA +PG F YC LNYC+EAV EE	298
Щур	300	NHDG-----DESIAGRTTDA EEF HHTFFDERTFGLGEADCGLRPLFEKKS LDKTEKELLS	354
Людина	299	DG D +I GRT +E+ TFF+ RTFG GEADCGLRPLFEKKS LDKTE+ELL+S	358
Щур	355	YIDGRIVEGWDAEKGIAPQVMLFRKSPQELLCGASLISDRWVLTAAHCILYPPWDKNFT	414
Людина	359	YIDGRIVEG DAE G++PWQVMLFRKSPQELLCGASLISDRWVLTAAHC+LYPPWDKNFT	418
Щур	415	ENDLLVRIGKHSRTRYERNVEKISMLEKIYIHPRYNWRENLD RDIAL LK LK KPV FSDYI	474
Людина	419	ENDLLVRIGKHSRTRYERN+EKISMLEKIYIHPRYNWRENLD RDIAL +KLK KPV FSDYI	478
Щур	475	HPVCLPKQTVTSLQAGYKGRVTGWGNLRETWTNINEIQPSVLQVVNLPIVERPVCKA	534
Людина	479	HPVCLPD++T SLLQAGYKGRVTGWGNL+ETWT N+ + QPSVLQVVNLPIVERPVCK	538
Щур	535	STRIRITDNMFCAGFKVNDTKRGDACEGDSGGPFV MKSPYNHRWYQMGIVSWGEGCDRNG	594
Людина	539	STRIRITDNMFCAG+K ++ KRGDACEGDSGGPFV MKSP+N+RWYQMGIVSWGEGCDR+G	598
Щур	595	KYGFYTHVFR LKRW MQVIDQ	615
Людина	599	KYGFYTHVFR LK+W+QKVIDQ	619

Рис. 6.3. Пошук гомології послідовностей протромбіну людини та щура, здійснений за допомогою сервера Standard Protein BLAST. Жирним шрифтом позначено амінокислотні залишки, які знаходяться у S1, S2 та S3 центрах протромбіну, залучених під час його активації до тромбіну фізіологічним активатором. Сірим кольором додатково позначено амінокислотні залишки, які знаходяться у S1, S2 та S3 центрах протромбіну, залучені у процесі активації протромбіну ензимним активатором.

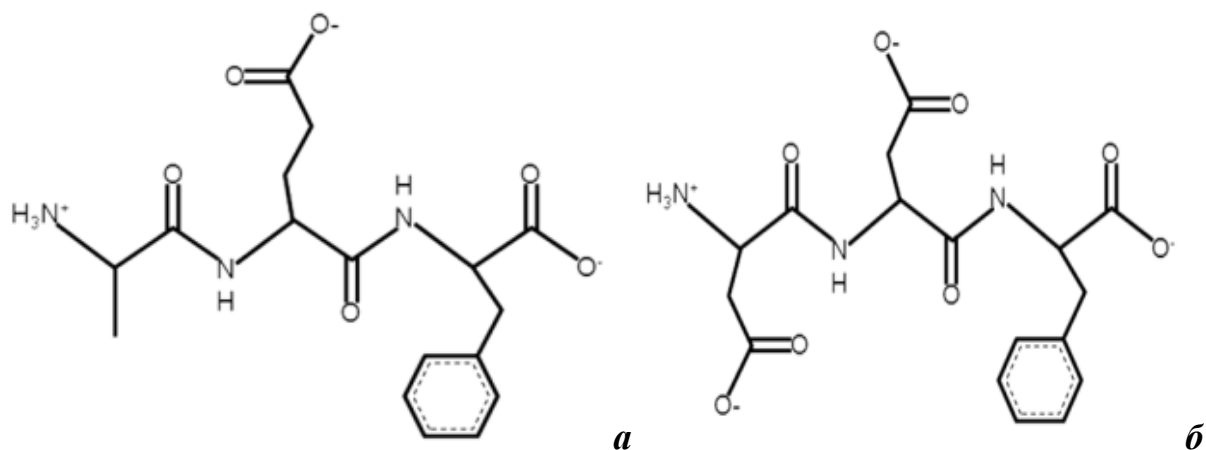


Рис. 6.4. Структурні формули амінокислот, які знаходяться у S1, S2 та S3 центрах протромбіну щура (*a* - **Asp-Glu-Phe**) та людини (*б* - **Ser-Glu-Tyr**).

Таким чином, можна зробити висновок, що протромбін людини більш гомологічний протромбіну щура, аніж протромбіну свині.

Аналогічним чином було проведено біоінформатичний аналіз протромбіну людини, собаки та вівці. Було показано, що амінокислотні залишки, розміщені у S1, S2 та S3 центрах протромбіну людини, а саме Ser-Glu-Tyr – у протромбіні вівці замінені на Asp-His-Phe (рис. 6.5). Як бачимо, знову спостерігаємо заміну у центрі S2 (негативно заряджений залишок аспарагінової кислоти, присутній у S2-центрі протромбіну людини, замінено на позитивно заряджений гістидин.

Вівця	24	FLEELRKGNLERECLEEEPCSRREEAFEALSPSATDVFWAKYTACESARNPREKLNCELEG	83
Людина	4	FLEE+RKGNLEREC+EE CS EEAFEALES +ATDVFWAKYTACE+AR PR+KL CLEG	63
Вівця	84	NCAEGVGMNYRGNMSVTRSGIQCQLWRSRYPHKPEINFTHPGADLRENFCRNPDGSTG	143
Людина	64	NCAEG+G NYRG++++TRSGIQCQLWRSRYPHKPEIN THPGADL+ENFCRNP D S TG	123
Вівця	144	PWCYTTSPTLRREACSVPCGQDRVTVEVIPRSGGSTTSQSPGLEMCVPDRGRGYQGRLA	203
Людина	124	PWCYTTPTRRR+ CS+PVCQD+VTV + PRS GS+ + SP LE CVPDRG+ YQGRLA	183
Вівця	204	VTTRGSPCLAWSSEQAKALSKQDFNPAVPLVENFCRNPDGDEEGARCYVAGQPGDFEYC	263
Людина	184	VTT G PCLAW+S QAKALSK QDFN AV LVENFCRNPDGDEEG CYVAG+PGDF YC	243
Вівця	264	DLDYCGEPVDGDLGDLGEDPDAIEGRTSE DHF QPFNEKTFGAGEADCGLRPLFEKKK	323
Людина	244	DLNYCEEAVEEETGDGLDEDSRAIEGRTAT SEY QTFNPRTFGSGEADCGLRPLFEKKS	303
Вівця	324	LQDKTEAELEFESYIEGRIVEGQDAEVGLAPWQVMLFRKSPQELLCGASLISDRWVLTAAH	383
Людина	304	L+DKTE EL ESYI+GRIVEG DAE+G++PWQVMLFRKSPQELLCGASLISDRWVLTAAH	363
Вівця	384	CLLYPPWDKSFTEADLLVRIGKHSRTRYERKVEKISMLDKIYIHPRYNWKENLDRDIAL	443
Людина	364	CLLYPPWDK+FTE DLLVRIGKHSRTRYER +EKISML+KIYIHPRYNW+ENLDRDIAL+	423
Вівця	444	KLKRPIEFSEYIHPVCLPDKETAAKLLRVGFKGRVTGWGNRRETWTTSVAEVQPSVLQVV	503
Людина	424	KLK+P+ FS+YIHPVCLPD+ETAA LL+ G+KGRVTGWN +ETWT +V + QPSVLQVV	483
Вівця	504	NLPLVERPVCKDSTRIRITENMFCAGYKPGEGKRGDACEGDSGGPFVMSPSNNRWYQMG	563
Людина	484	NLP+VERPVCKDSTRIRIT+NMFCAGYKPGEGKRGDACEGDSGGPFVMSKSP NNRWYQMG	543
Вівця	564	IVSWGEGCDRDGKYGFYTHVFRLLKRWIQKVIDRFG	598
Людина	544	IVSWGEGCDRDGKYGFYTHVFRLLKRWIQKVID+FG	578

Рис. 6.5. Пошук гомології послідовностей протромбіну людини та вівці, здійснений за допомогою сервера Standard Protein BLAST. Жирним шрифтом позначено амінокислотні залишки, які знаходяться у S1, S2 та S3 центрах протромбіну, залучених під час його активації до тромбіну фізіологічним активатором. Сірим кольором додатково позначено амінокислотні залишки, які знаходяться у S1, S2 та S3 центрах протромбіну, залучені у процесі активації протромбіну ензимним активатором.

Натомість, амінокислотні залишки, розміщені у S1, S2 та S3 центрах протромбіну собаки більш гомологічні таким у протромбіні людини - Glu-Glu-Phe (рис. 6.6). Так само, як і у протромбіні людини, у центрі S1 протромбіну собаки розташовано амінокислотний залишок з ароматичним кільцем (фенілаланін), а у

S2-центрі – негативно заряджений амінокислотний залишок (глутамінову кислоту).

Собака	24	FLEELRKG [!] NLERECV [!] EEQCNYEEAFEAL [!] ESSTATDVFW [!] SKYTACEPVRKPREKLVE [!] CLEG 83
Людина	4	FLEE+RKG [!] NLERECV [!] EE C+YEEAFEAL [!] ESSTATDVFW+KYTACE R PR+KL CLEG 63
Собака	84	SCA [!] EGLGMNYRGNV [!] SFTRSGIECOLWRSRYPHKPEINSTTHPGADLQENFCRNPDG [!] STTG 143
Людина	64	+CAEGLG NYRG+V+ TRSGIECOLWRSRYPHKPEINSTTHPGADLQENFCRNPD STTG 123
Собака	144	PWCYTIDPTVRR [!] ECSISL [!] CGQGGVTVPLTPRSGGPTVNLSP [!] PSEHCIPERGRYYQ [!] GRL 203
Людина	124	PWCYT DPTVRR+ECSI +CGQ VTV +TPRS G +VNLSP E C+P+RG+ YQGRL 182
Собака	204	AVTTHGSPCLAWASRQAKALSKDQDFNPAVPLVENFCRNPDGDEEGAWCYVSEEPGGFEY 263
Людина	183	AVTTHG PCLAWAS QAKALSK QDFN AV LVENFCRNPDGDEEG WCYV+ +PG F Y 242
Собака	264	CDLDYCEEPVEE-VGDGLAEDQDTAIEGR [!] TTA EEF QPFNEKTFGAGEADCGLRPLFEKR 322
Людина	243	CDL+YCEE VEE GDGL ED D AIEGR E+Q FFN +TFG+GEADCGLRPLFEK+ 302
Собака	323	SVKDKTEGELLESYIDGRIVEGWDAEIGLAPWQVMLFRKSPQELLCGASLISDRWVLTAA 382
Людина	303	SLEDKTERELLESYIDGRIVEGSDAIEIGMSPWQVMLFRKSPQELLCGASLISDRWVLTAA 362
Собака	383	HCLLYPPWDKNFTENDLLVRIGKHSRTRYERSIEKISMLEKIYIHPRYNWRENLRDIAL 442
Людина	363	HCLLYPPWDKNFTENDLLVRIGKHSRTRYER+IEKISMLEKIYIHPRYNWRENLRDIAL 422
Собака	443	LKLK [!] KPVNFSNYIHPVCLPDRDTATRLLQAGYKGRVTGWGNLRETWTSSIGEVQPRVLQV 502
Людина	423	+KLK [!] KPV FS+YIHPVCLPDR+TA LLQAGYKGRVTGWGNL+ETWT+++G+ QP VLQV 482
Собака	503	VNLPIVDRQVCKASTRIRITDNMFCAGYKPN [!] EGKRGDACEGDSGGPFVMKSPFN [!] NRWYQM 562
Людина	483	VNLPIV+R VCK STRIRITDNMFCAGYKPE [!] GKRGDACEGDSGGPFVMKSPFN [!] NRWYQM 542
Собака	563	GIVSWGEGCDRDGKYGFYTHVFR [!] LKKWIKVIEKSG 598
Людина	543	GIVSWGEGCDRDGKYGFYTHVFR [!] LKKWIKVI++ G 578

Рис. 6.6. Пошук гомології послідовностей протромбіну людини та собаки, здійснений за допомогою сервера Standard Protein BLAST. Жирним шрифтом позначено амінокислотні залишки, які знаходяться у S1, S2 та S3 центрах протромбіну, залучених під час його активації до тромбіну фізіологічним активатором. Сірим кольором додатково позначено амінокислотні залишки, які знаходяться у S1, S2 та S3 центрах протромбіну, залучені у процесі активації протромбіну ензимним активатором.

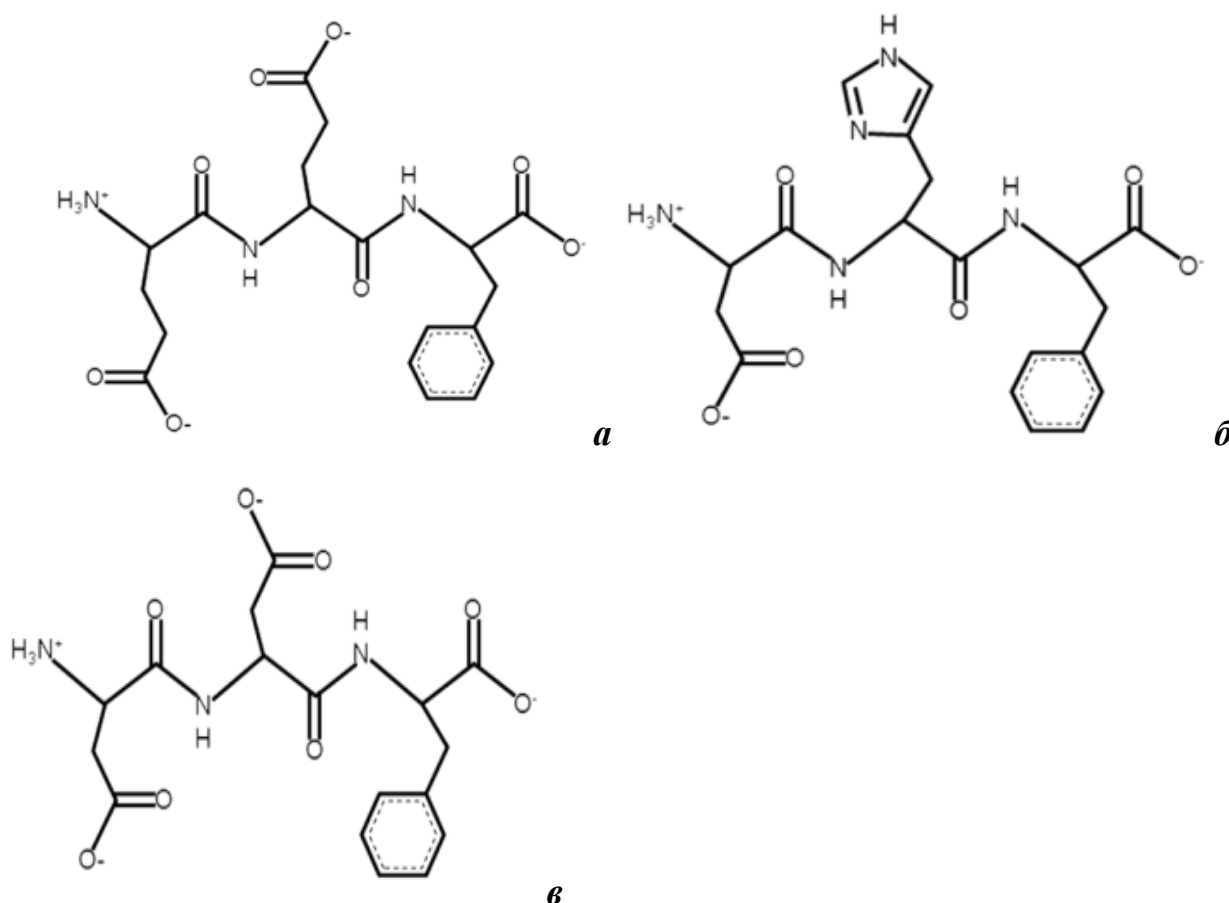


Рис.6.7. Структурні формули амінокислот, які знаходяться у S1, S2 та S3 центрах протромбіну собаки (*a* - **Glu-Glu-Phe**), вівці (*б* - **Asp-His-Phe**) та людини (*в* - **Ser-Glu-Tyr**).

На рис. 6.7. показано, наскільки така амінокислотна заміна впливає на структуру трипептиду. Можна зробити висновок про те, що ензимний активатор зсідання крові буде з меншою спорідненістю розщеплювати протромбін свині та вівці, аніж протромбін собаки чи людини.

Таким чином, аналіз гомології амінокислотних послідовностей протромбіну людини та ряду тварин дозволив припустити, що активація протромбіну плазми крові людини, щура і собаки ензимом, що використовується, буде відбуватися ефективніше, ніж протромбіну свині та вівці.

Особливістю ензимного активатора системи зсідання крові є безпосередня дія на заключний етап каскаду ензимативних реакцій направлених на утворення тромбіну.

Такий процес перетворення протромбіну в тромбін не потребує активації всіх факторів каскаду ензимативних реакцій системи зсідання крові, а лише останніх з них (перетворення протромбіну на тромбін з наступним утворенням ковалентно стабілізованого фібринового згустку), що забезпечує швидку зупинку масивної кровотечі.

Для перевірки цих висновків було використано прямий експеримент із застосуванням плазми крові різних видів тварин. У експеримент брали плазму крові людини, свині, собаки, щура та вівці та ініціювали зсідання внесенням 0,006 мг/мл ензимного активатора.

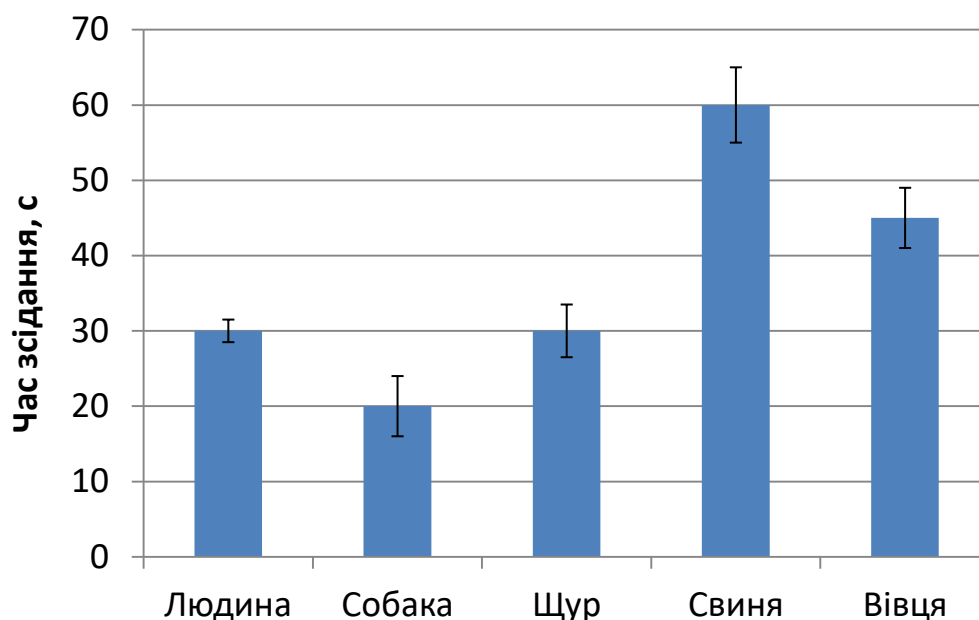


Рис. 6.8. Час зсідання плазми крові людини, собаки, щура, свині, вівці, ініційований 0,006 мг/мл ензимним активатором у стандартних умовах.

Як видно з рис. 6.8, час зсідання плазми крові свині є вдвічі довшим порівняно з плазмою крові людини. При цьому утворений згусток є менш щільним порівняно з таким, утвореним у плазмі крові людини чи собаки.

Таке вповільнення часу зсідання плазми крові свині, порівняно із часом зсідання крові людини чи щура, пов'язано саме відсутністю гомології в S2-центрі протромбіну. Цей факт було підтверджено дослідом з порівняння часу зсідання плазми крові людини та свині під дією реагенту АЧТЧ, який активує калікреїн-

кінінову систему, тобто діє на ранніх етапах каскаду і менш специфічно, порівняно з використаним нами ензимним активатором (рис. 6.9).

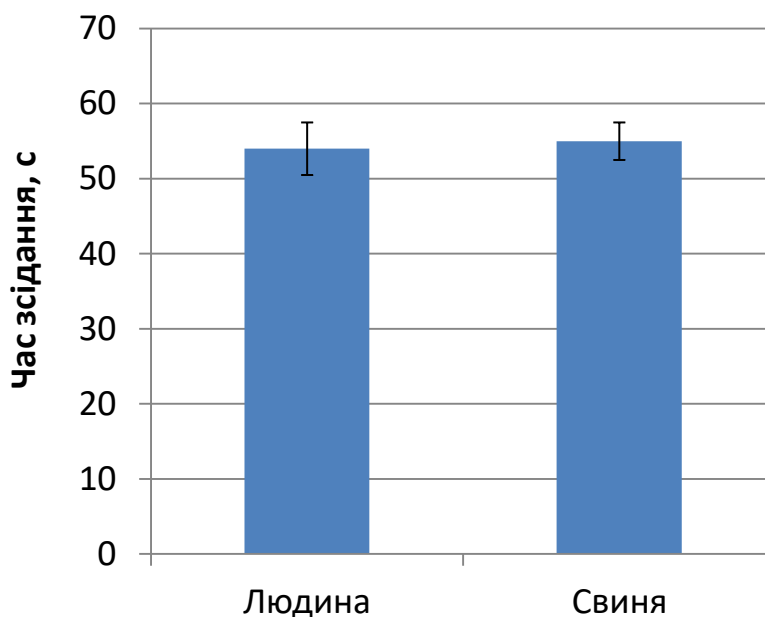


Рис. 6.9. Час зсідання плазми крові людини та свині, ініційований реагентом АЧТЧ у стандартних умовах.

Отже, ензимний активатор системи зсідання крові здатен ініціювати зсідання плазми крові свині, однак значно менш ефективно, порівняно з плазмою крові людини чи щура. Для того, щоб апробувати створений гемостатичний сорбційний засіб у стандартизованій моделі гострої артеріальної кровотечі свині, необхідно підвищувати кількість використаного ензимного активатора. Відтак слід мати на увазі, що будь-який гемостатичний ефект матеріалу, продемонстрований на моделі з використанням свиней, апріорі буде меншим, ніж гемостатичний ефект, який очікується у людини. Тому зроблено висновок, що кількість ензимного активатора зсідання крові на 1 см^2 гемостатичного перев'язувального засобу повинна бути вищою при експериментах на свині, ніж на щурах.

6.3. ХАРАКТЕРИСТИКА ДІЇ ЕНЗИМНОГО АКТИВАТОРА ЗСІДАННЯ КРОВІ НА ФІБРИНОГЕН ТА КЛІТИНИ КРОВІ

Фібриногенолітичну активність ензимного активатора системи зсідання крові визначали таким чином: фібриноген у концентрації 2,5 мг/мл інкубували із 1,5мкг ензимного активатора системи зсідання крові в 0,05 М трис-НСІ буфері, рН 7,4 з 0,13 М NaCl (загальний об'єм проби 150 мкл) впродовж 60 та 120 хв при температурі 37°C у скляній конічній пробірці. Після цього викликали згортання фібриногену, додаючи тромбін із розрахунку 0,6 NIH на 1 мг фібриногену, що є значним надлишком відносно кількості фібриногену, й визначали час утворення фібринового згустку, помірно струшуючи пробірку у водяній бані за температури 37°C. Час полімеризації фібрину, інкубованого з ензимом, відповідав контрольному (таблиця 6.1).

Таблиця 6.1.

Полімеризація фібрину в системі фібриноген-тромбін за присутності ензимного активатора зсідання крові

Час інкубації фібриногену з ензимним активатором системи зсідання крові, хв.	Час зсідання фібриногену, с
60	13±1
120	12±2
контроль	12±1

Отриманий нами препарат ензимного активатора зсідання крові не має фібриногенолітичної активності. Нездатність активатора зсідання крові розщеплювати фібриноген робить його придатним в подальшому для розробки гемокоагулюючих засобів. Попередні дослідження показали, що ензимний активатор зсідання крові не потребує іонів Ca^{2+} для розщеплення хромогенного субстрату калікреїну. Однак гідроліз протромбіну ензимом проходить з більшою швидкістю за присутності іонів Ca^{2+} . Присутність іонів Ca^{2+} також стимулює активацію XIII фактора зсідання крові та стабілізації згустку.

Визначення ступеню гемолізу еритроцитів за присутності ензимного активатора системи зсідання крові проводили в 0,05 М трис-НСІ буфері, рН 7,4 з 0,13 М NaCl, використовуючи суспензію відмитих еритроцитів, розведену буферним розчином 10 мМ НЕРЕС (рН 7,4) з 0,15 М NaCl, 5 мМ КСІ, 1 мМ MgSO₄, 10 мМ сахарози, у співвідношенні 1:8. До 50 мкл суспензії еритроцитів додавали ензимний активатор системи зсідання крові (загальний об'єм – 1 мл), перемішують та інкубують 30 хв за температури 37°C. Після інкубації еритроцити осаджували шляхом центрифугування протягом 10 хв при 1000 g і визначали поглинання надосадової рідини за довжини хвилі 543 нм проти робочого буферу. За 100 % приймали гемоліз, викликаний 50 мкл 1 % Triton-X100.

В проведеному есперименті за присутності ензимного активатора системи зсідання крові практично не виявлено гемолізу еритроцитів (таблиця 6.2).

Таблиця 6.2.

Вплив ензимного активатора системи зсідання крові на гемоліз еритроцитів

Час інкубації еритроцитів із ензимним активатором системи зсідання крові, хв.	Світлопоглинання за довжини хвилі 543 нм.	Гемоліз, %.
60 хв	0,02±0,006	2,5
120 хв	0,02±0,004	2,5
контроль	0,78±0,050	100

Оцінка процесу активації тромбоцитів за дії ензимного активатора системи зсідання крові. Вплив ензимного активатора системи зсідання крові на тромбоцити визначали методом цитометрії на протоковому цитофлуориметрі COULTER® EPICS™ XL™ Flow Cytometer (Beckman Coulter, USA). У ході експерименту використовували два типи світлорозсіювання: пряме (SS), яке характеризує розмір клітин, та бічне (FS), яке характеризує щільність цитоплазми клітини, тобто, гранулярність тромбоцитів.

Тромбоцити з ензимним активатором системи зсідання крові інкубували за температури 25°C впродовж різних інтервалів часу – 5, 10, 20, 30, 60, 90, 120 хв.

Параметри активації тромбоцитів, зміну розміру та гранулярності тромбоцитів фіксували за зміною прямого та бічного світлорозсіювання. За одержаними даними ензимний активатор системи зсідання крові не викликав активації тромбоцитів, тобто, розмір і гранулярність клітин залишалися незмінними (рис. 6.10).

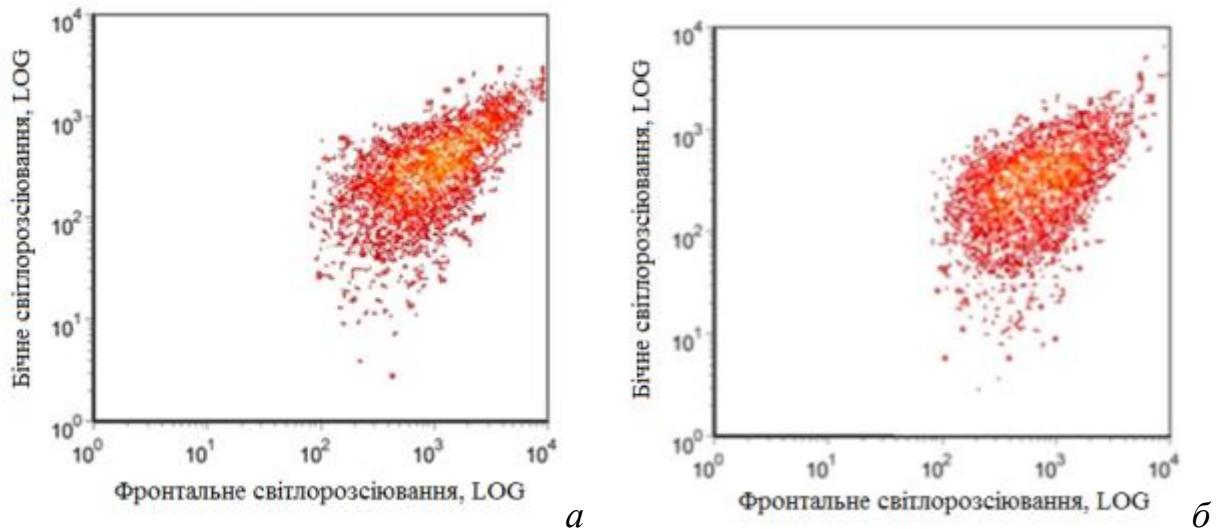


Рис. 6.10. *а.* Контроль – розподіл тромбоцитів людини у стані спокою за гранулярністю (бічне світлорозсіювання) та формою (фронтальне світлорозсіювання). *б.* Вплив ензимного активатора системи зсідання крові на розподіл тромбоцитів людини за гранулярністю (бічне світлорозсіювання) та формою (фронтальне світлорозсіювання).

Таким чином, на відмитих еритроцитах і тромбоцитах очищений препарат активатора системи зсідання крові не викликав гемолізу та активації тромбоцитів, тобто, ензимний активатор системи зсідання крові не впливав на клітинні компоненти крові.

6.4. ЕФЕКТИВНІСТЬ ДІЇ ЕНЗИМНОГО АКТИВАТОРА ЗСІДАННЯ КРОВІ ЗА ПРИСУТНОСТІ ГЕПАРИНУ *IN VITRO*

У медичній практиці широко використовуються препарати гепарину для лікування та профілактики тромбофілії ВЗК-синдрому. Гепарин рекомендовано вводити впродовж перших днів лікування антикоагулянтами непрямої дії. Відомо,

що наявність гепарину у плазмі крові збільшує час зсідання плазми крові у таких діагностичних тестах як тромбіновий час, АЧТЧ, протромбіновий час.

Визначення коагуляційних властивостей підібраного ензимного активатора зсідання крові за присутності інгібіторів зсідання крові. Нефракціонований високомолекулярний гепарин та низькомолекулярний гепарин є важливими антикоагулянтними агентами, які застосовуються при низці важких патологій, пов'язаних з внутрішньосудинним тромбоемболією, таких як інфаркт міокарду, інсульт чи тромбоемболія легеневої артерії. Активно запобігаючи тромбоемболію, вони однак можуть стати причиною внутрішніх кровотеч або ж кровотеч під час хірургічних втручань.

Було перевірено здатність активатора зсідання крові, запропонованого в якості головного компонента універсального гемостатичного засобу, коагулювати плазму крові за присутності екзогенного гепарину.

Для цього в плазму крові донорів вносили високомолекулярний гепарин у кінцевій концентрації 2 тис од/л та визначали час зсідання плазми крові під дією тромбoplastину та активатора. Для коректного порівняння підбирали кількість активатора таким чином, щоб контрольний час зсідання у обох випадках становив 20 с.

Встановлено, що час зсідання крові як під дією тромбoplastину, так і під дією активатора зсідання крові подовжувався в півтора рази за присутності 2 тис МО/л гепарину (рис. 6.11).

Показано також, що час зсідання плазми крові людини під дією ензимного активатора протромбіну не подовжувався за присутності значних доз нефракціонованого гепарину.

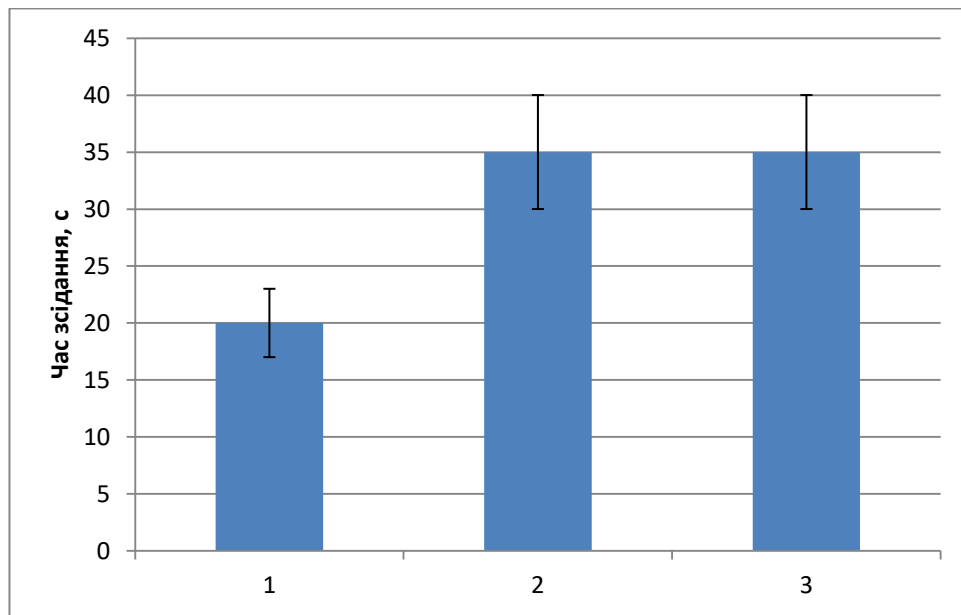


Рис. 6.11. Час зсідання плазми крові людини за присутності 2000 МО/л гепарину під дією тромбoplastину (2) та активатора (3). 1 – час зсідання плазми крові за присутності тромбoplastину або активатора зсідання крові.

6.5. ВИЗНАЧЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ДІЇ ЕНЗИМНОГО АКТИВАТОРА ЗСІДАННЯ КРОВІ НА ЗСІДАННЯ ПЛАЗМИ КРОВІ, ДЕФІЦИТНОЇ НА КОАГУЛЯЦІЙНІ ФАКТОРИ VIII ТА IX

Гемофілія – невиліковне генетичне захворювання, пов'язане із вродженою відсутністю факторів зсідання крові VIII або IX. Захворювання характеризується порушенням зсідання крові та супроводжується небезпекою загибелі від крововиливу в мозок та інші життєво важливі органи навіть при незначній травмі. При активації реагентом АЧТЧ, каоліном та іншими поширеними активаторами не відбувається бажаного результату зсідання крові.

Визначення здатності ензимного активатора зсідання крові ініціювати процес згортання дефіцитної на коагуляційний фактор IX плазми крові. Для перевірки дії ензимного активатора системи зсідання крові на час зсідання плазми крові, яка була позбавлена фактору IX і тому моделювала умови за гемофілії, використовували хронометричні тести: 1) визначення часу зсідання плазми крові в тесті АЧТЧ проводили наступним чином: до 100 мкл плазми крові, дефіцитної на фактор IX системи зсідання крові, при температурі 37° С додавали 100 мкл реагенту АЧТЧ, інкубували протягом 3 хв і додавали 100 мкл 0,025 М CaCl₂; 2)

визначення часу зсідання плазми крові під дією ензимного активатора системи зсідання крові проводили наступним чином: до 100 мкл плазми крові за температури 37° С додавали 100 мкл 0,025М CaCl₂ і 100 мкл ензимного активатора системи зсідання крові та визначали час зсідання плазми крові.

Таблиця 6.3.

Зсідання плазми крові у тестах АЧТЧ та під дією ензимного активатора системи зсідання крові

Назва тесту	Плазма крові донора (контроль)	Плазма крові, дефіцитна на фактор ІХ
АЧТЧ, с.	35±2	115±3
Час зсідання плазми крові під дією ензимного активатора системи зсідання крові, с.	82±3	82±3

За дії ензимного активатора системи зсідання крові час зсідання плазми крові, дефіцитної на фактор ІХ, був таким самим, як і в контролі. Натомість у тесті АЧТЧ час зсідання плазми крові, дефіцитної на фактор ІХ, подовжувався порівняно з контролем у 3,3 рази (таблиця 6.3). Тобто, під дією ензимного активатора зсідання дефіцитної на фактор ІХ плазми крові відбувалося аналогічно зсіданню плазми крові донорів.

Визначення здатності ензимного активатора зсідання крові ініціювати процес згортання дефіцитної на коагуляційний фактор VIII плазми крові. Для характеристики процесу полімеризації фібрину в плазмі крові, дефіцитної на фактор VIII системи зсідання крові, було використано турбидиметрію.

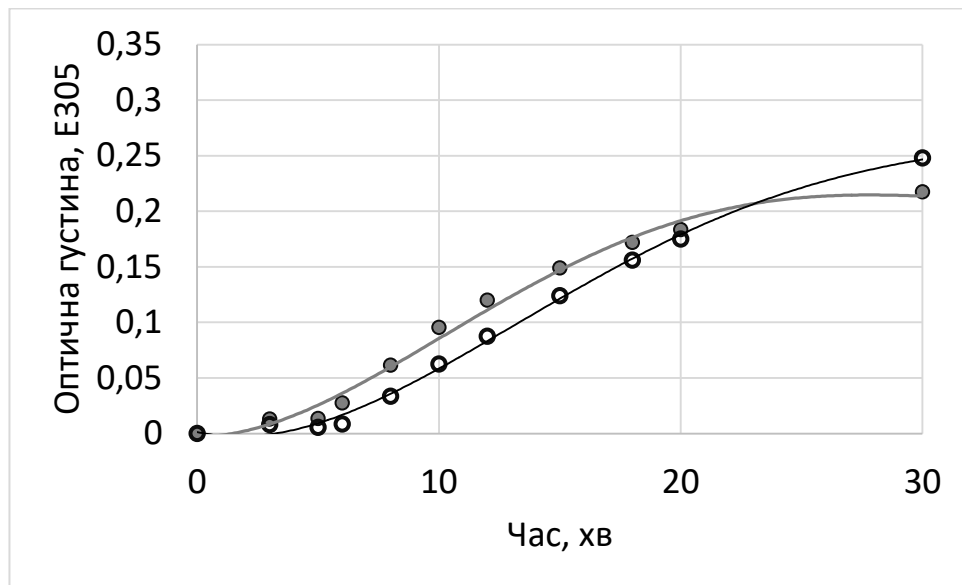


Рис. 6.12. Зміна мутності нормальної плазми крові людини (сіра крива) та дефіцитної плазми крові людини (чорна крива), що активовані 0,035 мкг/мл ензимного активатора.

Турбидиметричні дослідження (рис. 6.12) дозволили нам підтвердити ефективну прокоагулянтну дію ензимного активатора як у контрольній, так і в дефіцитній на VIII фактор плазмі крові.

Отже, присутність ензимного активатора системи зсідання крові дає можливість запобігти значній крововтраті не тільки при пораненнях і хірургічних втручаннях без порушень системи зсідання крові, але й у хворих на гемофілію, що є додатковим неочікуваним позитивним результатом.

6.6. АКТИВНІСТЬ ЕНЗИМНОГО АКТИВАТОРА СИСТЕМИ ЗСІДАННЯ КРОВІ У МОДЕЛІ ZEBRAFISH

Для адекватного тестування активатора на моделі Zebrafish важливо було продемонструвати його активність у буфері Zebrafish. Активатор був набагато ефективнішим у зразку з буфером Zebrafish. Це можна пояснити великою кількістю іонів кальцію, представлених у цьому буфері. Тож модель Zebrafish цілком підходить для дослідження дії ензимного активатора .

Застосування ензимного активатора в моделі Zebrafish викликало мінімальні тромботичні події (рис. 6.13) порівняно з контролем. Це можна пояснити

ускладненою доступністю ензимного активатора до кровотоку риб, викликаною переважно високою молекулярною масою.

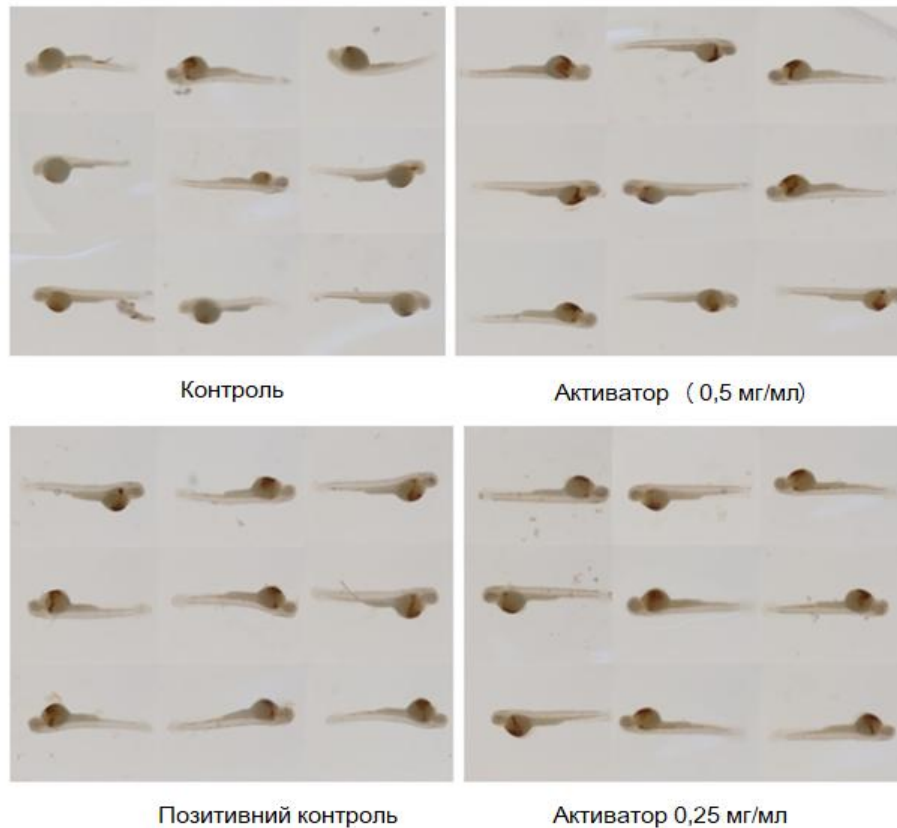


Рис. 6.13. Результати застосування 0,25 та 0,5 мг/мл активатора на Zebrafish – накопичення тромбу в досліджуваному зразку, спорадичний тромбоз у контролях. Позитивний контроль – вплив арахідонової кислоти.

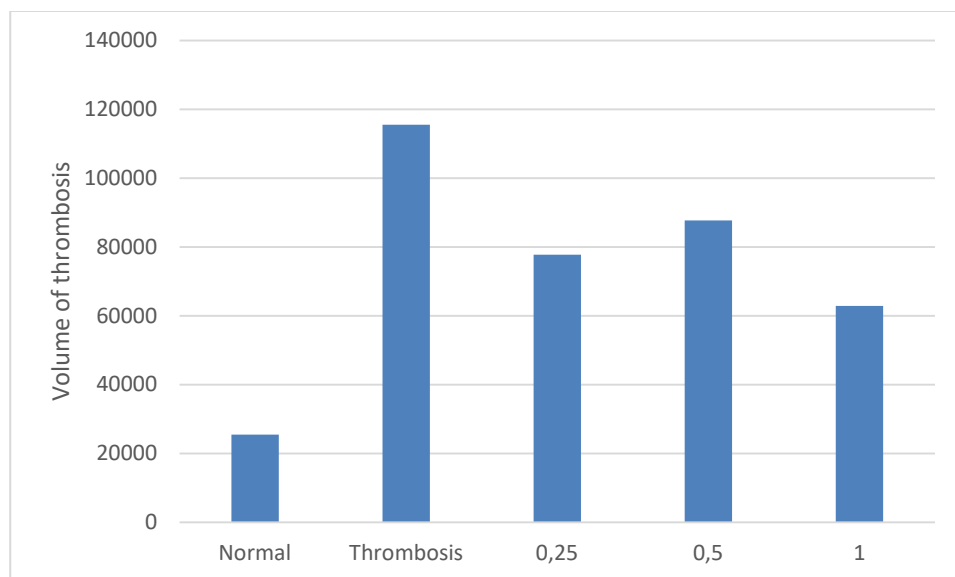


Рис. 6.14. Стандартизований об'єм зон тромбозу в моделі Zebrafish в контролі після застосування арахідонової кислоти (позитивний контроль) та за наявності різної кількості активатора.

Розрахунок середнього обсягу зон тромбозу в моделі Zebrafish (рис. 6.14) дозволив зробити висновок, що активатор надає помірний протромботичний ефект. Відсутність дозозалежності може вказувати на те, що постійна кількість активатора здатна засвоюватися в тканинах риб незалежно від використовуваної концентрації.

6.7. ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОЦЕСУ АКТИВАЦІЇ ПРОТРОМБІНУ ЕНЗИМНИМ АКТИВАТОРОМ СИСТЕМИ ЗСІДАННЯ КРОВІ

Останнім етапом каскаду зсідання крові є утворення фібринового згустку, яке забезпечується тромбіном. Для порівняння дії гемостатиків фіксували появу тромбіну в плазмі крові за допомогою тромбін-специфічного хромогенного субстрату S2238 (HD-Phe-Pip-Arg-pNA).

Як показано на рис. 6.15, активність тромбіну, індукована ЕА (40 мкг/мл), була настільки високою, що після 15 хв інкубації тромбін розщеплював усі наявні S2238 і виводив реакційну криву на плато. Також спостерігали помірну тромбінову активність у препаратів порівняння: Celox (600 мкг/мл) та Yunann Baiyao (600 мкг/мл). Однак її виявляли лише під час тривалої інкубації (до 60 хв).

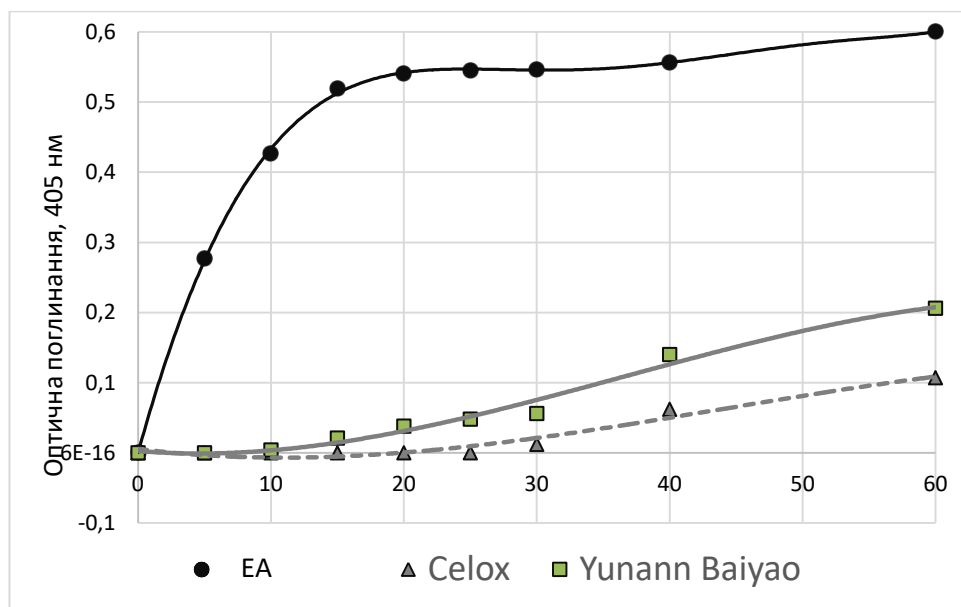


Рис. 6.15. Розщеплення тромбін-специфічного субстрату в плазмі крові людини в присутності ензимного активатора (ЕА), Celox та Yunann Baiyao.

За тих же умов було визначено активність тромбіну в плазмі крові, дефіцитну на фактор VIII (рис. 6.16). Ефект гемостатиків був дуже подібний до тих, які отримували для нормальної плазми крові. Початкова швидкість реакції розщеплення субстрату S2238 тромбіном, який з'явився в плазмі крові під дією ензимного активатора, становила 0,045 о.о./хв, порівняно з 0,05 о.о./хв в нормальній плазмі крові. Це вказує на те, що ензимний активатор був ефективним як у нормальній плазмі крові, так і у плазмі крові, дефіцитній за фактором VIII (рис. 6.16).

Також виявлено помірну тромбіноутворюючу активність Celox та Yunann Baiyao. Швидше за все, обидва гемостатики мають неспецифічні активуючі властивості.

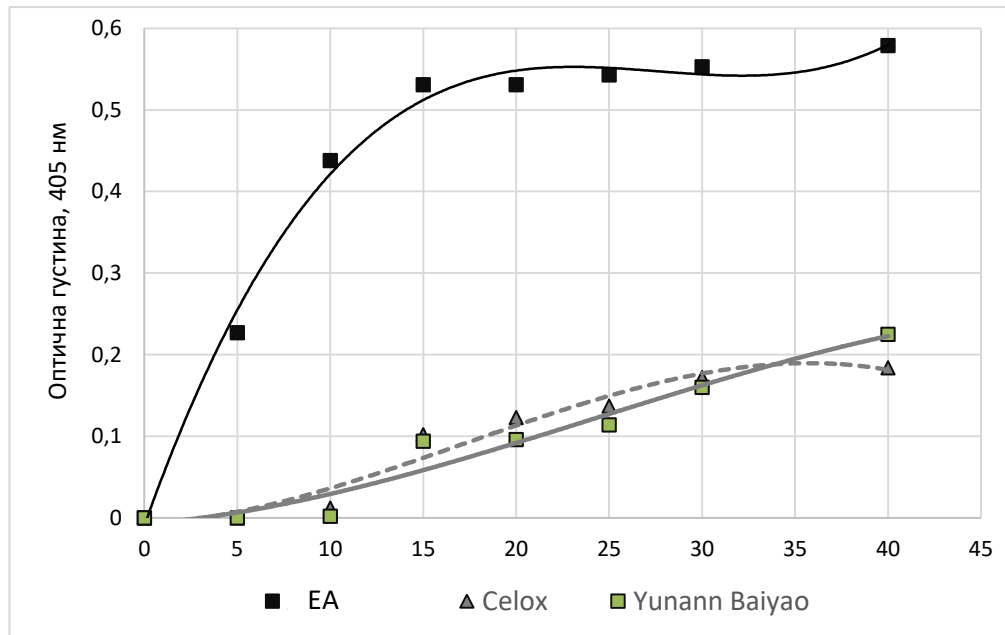


Рис. 6.16. Утворення тромбіну в плазмі крові людини, дефіцитній на фактор VIII, за дії 40 мкг/мл активатора (EA), 600 мкг/мл Целокса (Celox) або 600 мкг/мл Юньнана Байяо (Yunann Baiyao).

6.8. ІММОБІЛІЗАЦІЯ ЕНЗИМНОГО АКТИВАТОРА ЗСІДАННЯ КРОВІ НА МАТРИЦЯХ

На першому етапі створення композиту адсорбційного гемостатичного аплікаційного на основі ензимного активатора зсідання крові необхідно було підібрати носій, який утримував би достатню кількість ензиму і не знижував його активності.

6.8.1. Тканинні матриці для іммобілізації ензимного активатора

В якості такого носія для іммобілізації ензимного активатора було використано спанлейс, що є целюлозною тканиною, та активований вуглецевий волокнистий матеріал (АУВМ), утворений з волокон нановуглецю.

Активований волокнистий вуглецевий матеріал марки "Днепр"-МН (далі по тексту – АУВМ) з сорбційною поверхнею не менш, ніж 1500 см²/г, виконує дві функції, а саме: матриці для міцної нековалентної іммобілізації ензимного активатора системи зсідання крові та адсорбційного компонента, який забезпечує ефективне поглинання з поверхні рани вмісту токсичних речовин різної молекулярної маси, включаючи продукти протеолізу і термічної денатурації протеїнів, біогенні аміни і медіатори запалення, бактеріальні токсини і, як наслідок, покращення місцевого гемостазу, купування травматичного набряку, зниження інтенсивності місцевої та загальної запальної реакції, попередження розвитку ускладнень, прискорення регенеративних процесів та скорочення терміну загоювання ран.

Було встановлено, що обидва носії добре адсорбують рідину (таблиця 6.4).

Таблиця 6.4.

Параметри поглинання рідини носіями

Носій	Питоме поглинання в розрахунку на площу поверхні, мкл/см ²	Питоме поглинання в розрахунку на масу, мкл/мг
Спанлейс	20	4,2
АУВМ	40	1,7

На наступному етапі було досліджено вплив носіїв на плазму крові *in vitro*. Носії попередньо змочували 0,05 М трис-НСІ буфером рН 7,4 та інкубували з плазмою крові впродовж 30 хв у розрахунку 200 мкл плазми на 1 см² носія. В якості контролю плазму крові інкубували з таким самим об'ємом буфера. Після інкубації плазму крові відбирали та досліджували процес активації системи

зсідання крові. Було показано, що сам носій не викликає зсідання плазми крові та не підвищує спонтанної активності факторів системи зсідання крові (таблиця 6.5). В той же час важливо зазначити, що взаємодія носіїв із плазмою крові не пригнічує каскад зсідання крові, а отже не сорбує фактори зсідання крові у кількості, що могло б вплинути на функціонування каскаду ензимів системи зсідання крові.

Таблиця 6.5.

Швидкість утворення тромбіну в плазмі крові, преінкубованої з носіями

Носій	Без носія	спанлейс	АУВМ
Спонтанна швидкість утворення тромбіну в плазмі крові о.о./хв	0,001	0,001	0,002
Швидкість тромбопластин-стимульованого утворення тромбіну в плазмі крові о.о./хв	0,009	0,011	0,006

На наступному етапі ензимний активатор зсідання крові було сорбовано на обох носіях (з розрахунку 2 мкг ензиму на 1 см² носія) і ліофілізовано. В якості контролю використовували носії, змочені перед сушкою відповідною кількістю буферного розчину. Виготовлені таким чином носії з ензимом занурювали в плазму крові і спостерігали за утворенням згустку. В експериментах *in vitro* спанлейс з ліофілізованим на ньому активатор зсідання крові забезпечував утворення міцного згустку вже на четвертій хвилині. Після інкубації з АУВМ, на якому сорбований ліофілізований ензимний активатор, протягом 5 хв інкубації можна було спостерігати скупчення фібринових згустків.

Проведено експерименти з визначення функціональної активності ензиму, що ліофілізовано на поверхні спанлейс-тканини: до 1мл розчину протромбіну вносили спанлейс (1x1 см), що містить 2 мкг ензиму, відбирали аліквоти у часі та вимірювали амідолітичну активність (рис. 6.17).

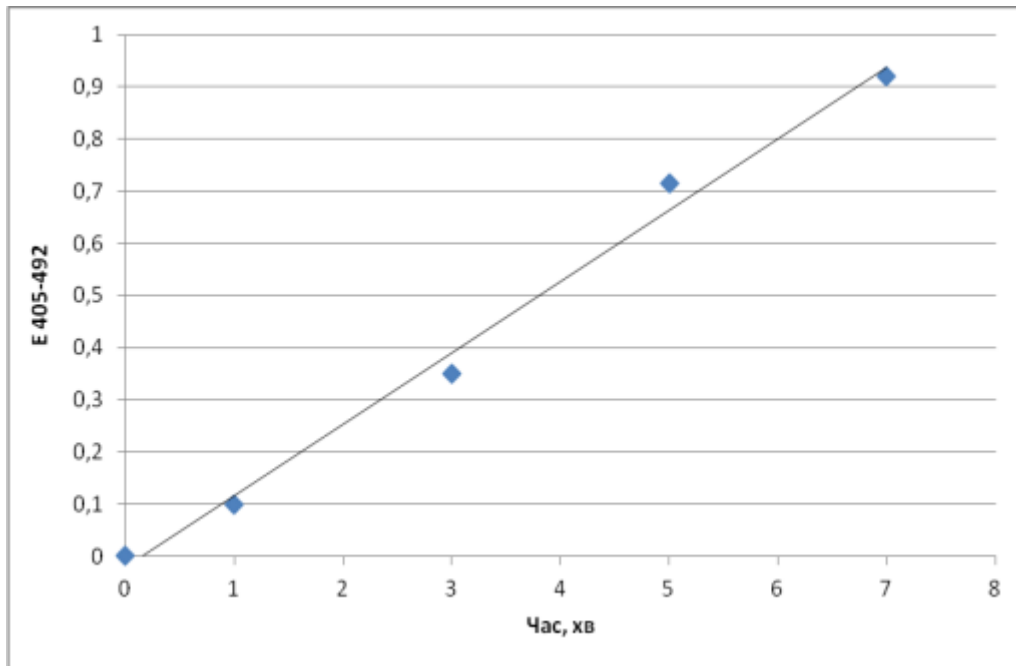


Рис. 6.17. Амідолітична активність тромбіну, утвореного за присутності активатора зсідання крові, ліофілізованого на поверхні спанлейс-тканини

Отримані дані підтверджують, що ліофілізований на поверхні спанлейс-тканини ензим ний активатор не втрачає функціональної активності.

Ензимний активатор зсідання крові є високоактивним ензимом, що не інгібується природніми інгібіторами системи зсідання крові. З одного боку, це забезпечує його безумовну роботу в місці ураження, з іншого боку, у разі його потрапляння в кровоток створює небезпеку виникнення активації системи зсідання крові. Тому наступним етапом досліджень стала перевірка фіксації активатора на тканині та імовірності вимивання ензиму із згустку.

Для цього: **(А)** ліофілізований спанлейс з сорбованим активатором зсідання крові (2 мкг) інкубували з цитратною плазмою крові (200 мкл) до утворення щільного згустку (час утворення згустку – 4 хв). Після цього утворений на тканині згусток промивали 0,05 М трис-НСІ буфером рН 7,4, до отриманого розчину додавали калікреїн-специфічний хромогенний субстрат S2302; **(Б)** ліофілізований спанлейс з сорбованим активатором зсідання крові (2 мкг) інкубували з 0,05 М трис-НСІ буфером рН 7,4 впродовж 30 хв додавали до інкубаційного середовища калікреїн-специфічний хромогенний субстрат; **(В)** контролем слугував згусток, утворений шляхом рекальцифікації (час утворення

згустку – 21 хвилина). Згусток інкубували в 50 мкл 0,05 М трис-НСІ буферу рН 7,4 впродовж 20 хв, що відповідає часу притиснення гемостатика до раневої поверхні в досліджах *in vivo*.

Після інкубації відбирали аліквоти розчинів та оцінювали активність активатора зсідання крові за розщепленням хромогенного субстрату S2302 (рис. 6.18).

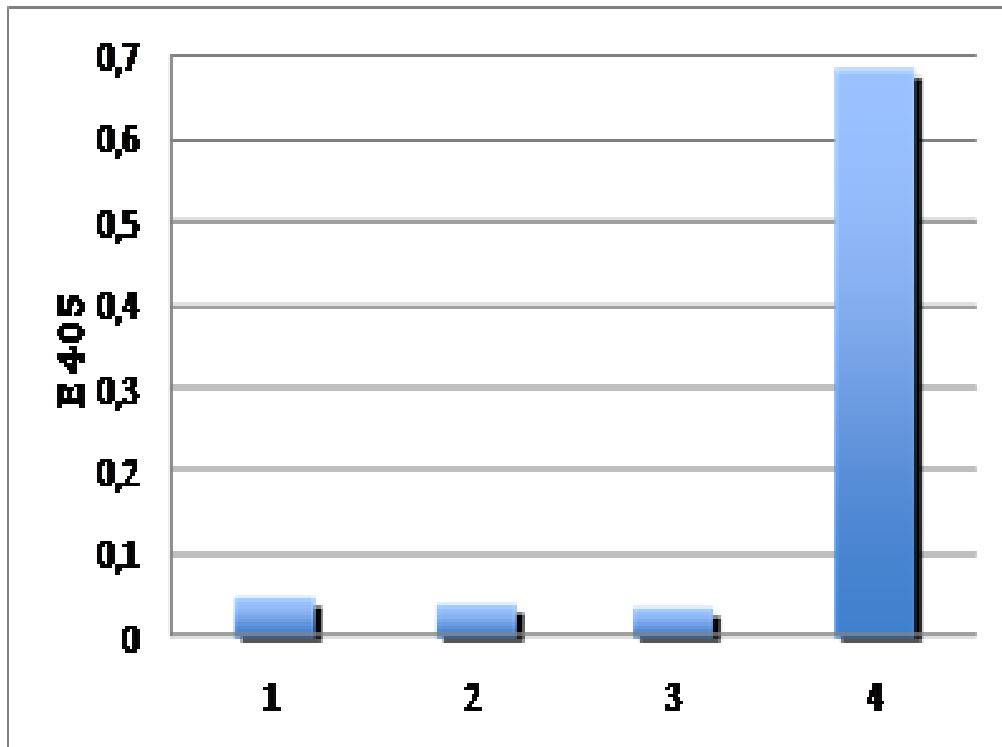


Рис. 6.18. Розщеплення хромогенного субстрату S2302: 1 – розчин із інкубаційного середовища (А), 2 – розчин із інкубаційного середовища (Б), 3 – рекальцифікація (В) як контроль та 4 – розщеплення хромогенного субстрату за дії ензиму – активатору зсідання крові (контроль).

Таким чином, продемонстровано, що вимивання ензимного активатора зсідання крові зі згустку не спостерігалось (підтвердженням цього є рекальцифікація розчину) і тому використання його в якості гемостатика є безпечним.

6.8.2. Модифікація діоксиду силіцію ензимним активатором

Одним із можливих носіїв ензимного активатора є діоксид кремнію, що має сорбційні властивості, корисні для загоювання раневих поверхонь.

Нами було сорбовано ензимний активатор на діоксиді силіцію (Атоксил™). В таблиці 6.6 представлено параметри змивання активатора з носія. Змивання контролювали за оптичним поглинанням середовища при $E_{280\text{нм}}$ та за розщепленням хромогенного субстрату S2302. З діоксидом силіцію зв'язалося 32 мкг активатора, чи 9,4 одиниці активності, в розрахунку на 1 мг діоксиду силіцію (64 % від доданого в середовище ензимного активатора). Активатор, що зв'язався з діоксидом силіцію, не змивався тріс-НСІ буфером з рН 7,4 та 0,13 М NaCl.

Таблиця 6.6

Параметри змивання ензимного активатора зсідання крові з діоксиду силіцію

Параметр	E 280, о.о.	Активність е.о./мл
Вихідний розчин ЕА	0,700	146
Ензим, що не зв'язався	0,249	52
I промивка	0,050	19
II промивка	0,020	10

З використанням плазми крові та тромбін-специфічного субстрату S2238 було показано, що ензимний активатор, сорбований на діоксиді силіцію, здатен спричиняти активацію системи зсідання крові (рис. 6.19).

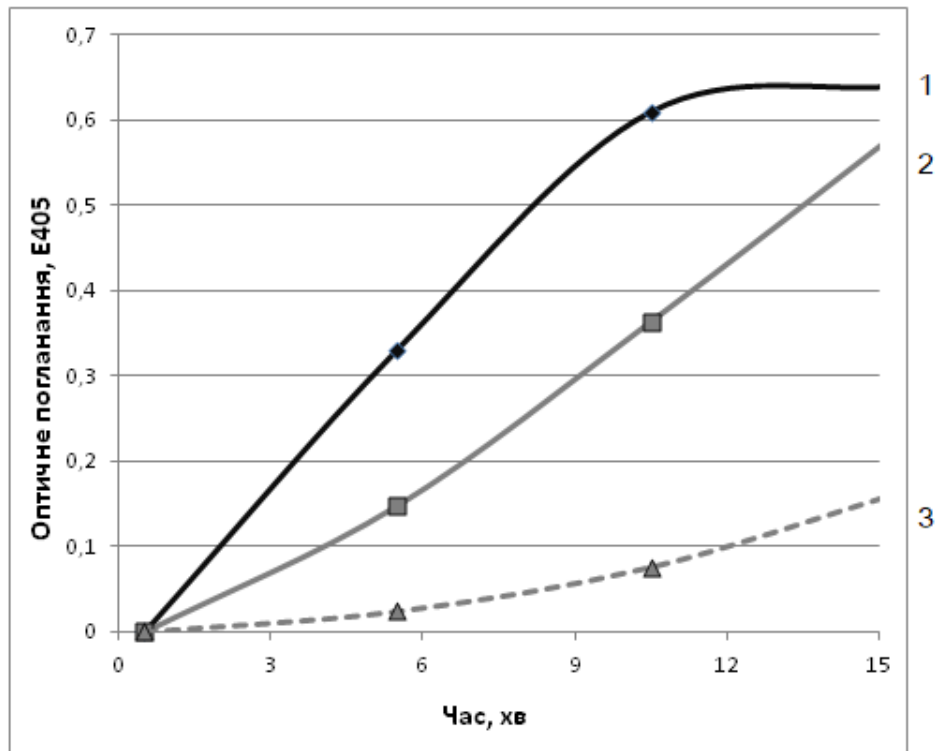


Рис. 6.19. Розщеплення тромбін-специфічного субстрату S2238 в плазмі крові за присутності ензимного активатора (1), діоксиду силіцію (3) та ензимного активатора, сорбованого на діоксиді силіцію (2).

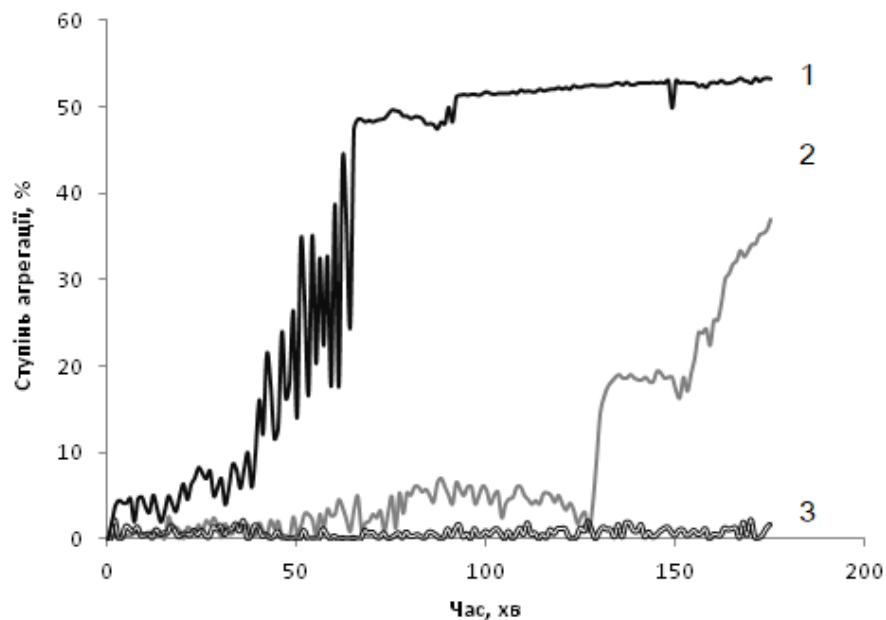


Рис. 6.20. Агрегатограма збагаченої тромбоцитами плазмі крові за присутності ензимного активатора (1), діоксиду силіцію (3) та ензимного активатора, сорбованого на діоксиді силіцію (2).

На збагаченій тромбоцитами плазмі крові було показано, що ензимний активатор, сорбований на діоксиді силіцію, здатен викликати агрегацію тромбоцитів (рис. 6.20).

В обох випадках активність ензимного активатора дещо менша після сорбції, але достатня для забезпечення процесу коагуляції в раневій поверхні

6.9. РОЗРОБКА УМОВ ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВАЦІЙНОЇ ЗДАТНОСТІ КОМПОЗИТУ АДСОРБЦІЙНОГО ГЕМОСТАТИЧНОГО АПЛІКАЦІЙНОГО КАРБОГЕМОСТАТ

Карбогемостат було створено на основі ензимного активатора зсідання крові та вуглецевих волокнистих матеріалів АУВМ. Для визначення активності ензимного активатора як складової Карбогемостату розроблено наступні умови.

Кількість ензимного активатора зсідання крові в зразках Карбогемостату визначали спектрофотометрично за розщепленням хромогенного субстрату S2238 внаслідок активації коагуляційних факторів плазми крові за присутності Карбогемостату.

Визначення проводили за наступною методикою:

Зразок Карбогемостату розміром 1 см² поміщали в пластикову пробірку, додавали 1 мл референтної плазми крові і витримували за температури 25 °С.

Проби для аналізу відбирали через 10, 20, 30, 40, 50, 60 хв. 80 мкл плазми крові, яка контактувала з Карбогемостатом, переносили у кварцеву кювету, яка містила фізіологічний розчин (1720 мкл) та 200 мкл розчину хромогенного субстрату S2238 (3,0 мМ) та ретельно перемішували піпетуванням (дослідна проба).

Для врахування спонтанної активності плазми крові паралельно у кварцевій кюветі складали суміш, що містить 80 мкл референтної плазми крові, яка не контактувала з Карбогемостатом, (1720 мкл) та 200 мкл розчину хромогенного субстрату S2238 (3,0 мМ) та ретельно перемішували піпетуванням (контрольна проба).

Обидві суміші витримували 5 хв за температури 37 °С та вимірювали оптичне поглинання на спектрофотометрі при довжині хвилі 405 нм та 492 нм.

Кількість розщепленого за 5 хв хромогенного субстрату визначали за формулою:

$$[C], \mu\text{M} = ((D_{\text{д}} - D_{\text{к}}) / \varepsilon \cdot l) \cdot 10^6,$$

$$\text{де: } \varepsilon = 1060 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}; l = 1 \text{ см};$$

$D_{\text{д}} = D_{405} - D_{492}$, різниця значень оптичного поглинання дослідної проби за довжини хвилі 405 нм (D_{405}) та за довжини хвилі 492 нм (D_{492});

$D_{\text{к}} = D_{405} - D_{492}$, значення оптичного поглинання контрольної проби за довжини хвилі 405 нм (D_{405}) та за довжини хвилі 492 нм (D_{492}).

За результат аналізу приймали середнє арифметичне значення трьох паралельних визначень.

Показано, що 30 хв достатньо для максимальної активації в плазмі крові компонентів системи зсідання крові. За результатами проведених досліджень встановлено, що за 5 хв інкубації попередньо активованої плазми крові інкубованої з Карбогемостатом розщеплюється $45 \pm 10 \mu\text{M}$ хромогенного субстрату, що рівнозначно кількості ензимного активатора зсідання крові $8 \pm 0,5$ мкг.

6.10. Визначення міцності іммобілізації ензимного активатора зсідання крові

Визначення міцності іммобілізації ензимного активатора зсідання крові проводили наступним чином: зразок Карбогемостату розміром 1 см^2 з іммобілізованим на ньому ензимним активатором поміщали в бюкс, додавали 1 мл фізіологічного розчину і струшували на шутелі протягом 30-60 хв за температури $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Через вказаний проміжок часу 700 мкл фізіологічного розчину, що контактував з Карбогемостатом, переносять у кварцову кювету, яка містить 1100 мкл фізіологічного розчину та 200 мкл розчину хромогенного субстрату ($3,0 \text{ мМ}$) та ретельно перемішували піпетуванням. Суміш інкубували 10 хв за температури 25°C та вимірювали оптичне поглинання на спектрофотометрі при довжинах хвилі $\lambda 405 \text{ нм}$ та $\lambda 492 \text{ нм}$ (рис. 6.21).

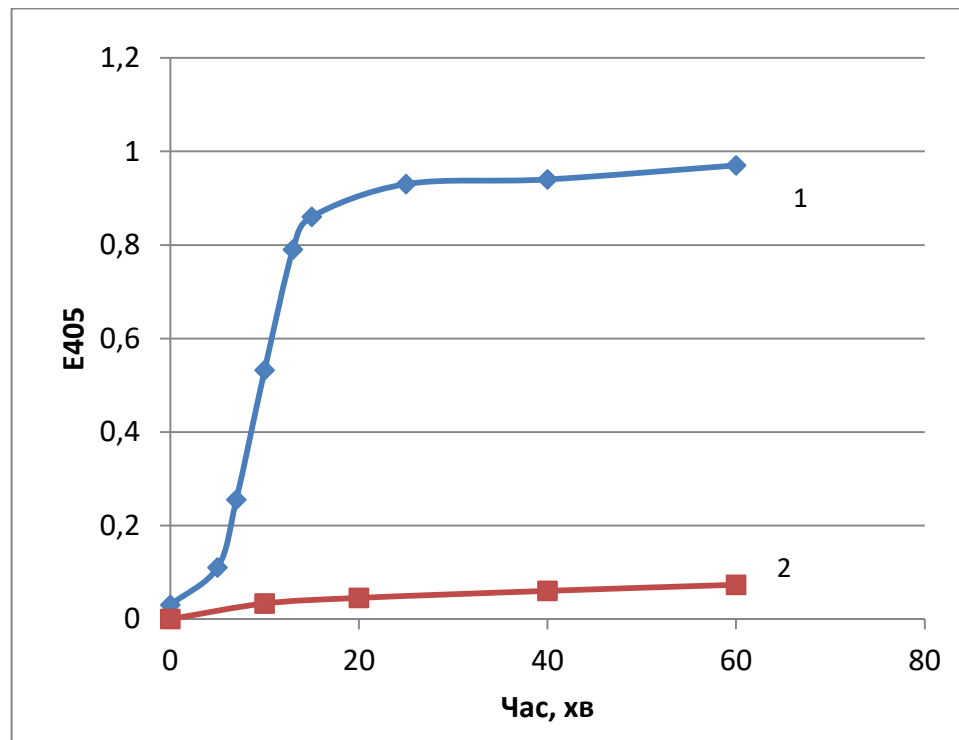


Рис. 6.21. Розщеплення хромогенного субстрату S2302 розчином, що контактував з 1 cm^2 Карбогемостату (2) та вільним ензимом, у кількості, еквівалентній тій, яку біло іммобілізовано на поверхні (1).

За результат аналізу приймали середнє арифметичне значення трьох паралельних визначень. Результати випробувань вважали задовільними, якщо оптична густина суміші через 10 хв від початку вимірювань не перевищувала 0,03 о.о., що свідчить про відсутність ензимного активатора з'єднання крові у розчині.

6.11. ДОСЛІДЖЕННЯ КОАГУЛЯЦІЙНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ГЕМОСТАТИКА, ЯКИЙ РОЗРОБЛЕНО З ВИКОРИСТАННЯМ ЕНЗИМНОГО АКТИВАТОРА ЗСІДАННЯ КРОВІ, В МОДЕЛЯХ *IN VIVO*.

6.11.1. Порівняння кровоспинних властивостей Карбогемостату, Yunann Baiyao та Celox на моделі паренхіматозної кровотечі у щурів.

Для створення моделі травматичної геморагії у щурів було використано метод гострої механічної травми. В експериментах було використано білих безпородних щурів (самці, 210-280 г) було розділено на 4 групи по 8 щурів кожна.

Лапаротомію проводили з розрізом середньої лінії живота, а суспензійні зв'язки печінки вивільняли на чашку Петрі. Неанатомічну хірургічну резекцію проводили до лівої частки печінки та вимірювали вагу резецированного 1 см печінкової тканини.

Карбогемостат, Celox або Yunann Baiyao (YB) наносили на травмовану поверхню печінки відразу після перерізу. Марлю наносили на печінку щурів контролої групи. Масу тканини і крові, що проливали на чашку Петрі, контролювали через 3 хвилини від початку поперечного перерізу.

У таблицях 6.7-6.10 представлені узагальнені дані вимірювань. Вага - маса тіла щурів, взятих в експеримент; Pd - маса чашки Петрі; Pdr - маса нанесеної тканини (марля в контрольних групах, зразки Celox та YB); bl - кровотеча (загальна маса чашки Петрі, нанесена тканина і кров, зібрані з печінки протягом 3 хвилин); d - крововтрата (обчислюється як колонка 4 мінус стовпці 3 та 2)

Кілька тварин контрольної групи не піддавали наркозу та були активними під час операції. Це значно вплинуло на результати, оскільки стрес призвів до звуження судин, а адреналін, можливо, сприяв агрегації тромбоцитів. Результати їх кровотечі відмічені #.

Таблиця 6.7.

Узагальнена інформація про крововтрату у моделі паренхіматозної кровотечі у щурів із застосуванням марлі в якості контрольного зразка.

	1	2	3	4	5
No	Вага, г	Pd, g	Pdr., g	Pd.+Pdr+bl	d
1	252.0	7.57	0.29	8.49	0.63
2	219.0	7.57	0.39	10.54	2.67
3	212.0	7.57	0.21	8.53	0.75 [#]
4	270.0	7.57	0.25	9.92	2.10
5	278.0	7.57	0.26	9.64	1.81
6	240.0	7.57	0.28	9.05	1.20
7	244.0	7.57	0.24	8.83	1.02
8	230.0	7.57	0.22	8.30	0.51
9	238.0	7.57	0.25	12.14	4.32
1	243.0	7.57	0.24	8.29	0.48 [#]

на результат впливав стрес через недостатню анестезію.

І Celox, і YB наносили у вигляді порошоків на поверхню марлі, змочену 1 мл PBS для досягнення адгезії порошоків до марлі. Вага застосованого PBS був включена у колонку 3 у випадку Celox та YB.

Celox та YB також наносили на суху марлю. Не спостерігалось чітких відмінностей між програмами «сухий» та «змочений», тому результати обох типів застосування були обчислені разом (Таблиця 6.7).

Таблиця 6.8.

Узагальнена інформація про крововтрату у моделі паренхіматозної кровотечі у щурів із застосуванням Celox

	1	2	3	4	5
No	Вага, г	Pd, g	Pdr., g	Pd.+Pdr+bl	d
1	280.0	7.57	0.29 +1.0 + 0.30	11.23	2.07
2	210.0	8.12	0.29 +1.0 + 0.30	11.26	1.55
3	290.0	7.57	0.23 +1.0 + 0.30	9.72	0.62
4	232.0	7.57	0.28 +1.0 + 0.30	9.62	0.47
5	240.0	7.57	0.22 +1.0 + 0.31	10.29	1.19
6	227.0	7.57	0.26 +1.0 + 0.31	10.02	0.88
7	233.0	7.57	0.24 +1.0 + 0.31	12.02	2.90
8*	245.0	7.57	0.22 + 0.31	8.39	0.29
9*	222.0	7.57	0.21 + 0.30	9.98	1.90

Таблиця 6.9.

Узагальнена інформація про крововтрату у моделі паренхіматозної кровотечі у щурів із застосуванням Yunann Baiyao

	1	2	3	4	5
No	Вага, г	Pd, g	Pdr., g	Pd.+Pdr+bl	d
1	220.0	8.12	0.20 +1.0 + 0.34	10.28	0.62
2	223.0	7.57	0.19 +1.0 + 0.32	9.23	0.15
3	225.0	7.57	0.19 +1.0 + 0.31	10.31	1.24
4	280.0	7.57	0.24 +1.0 + 0.30	9.88	0.77
5	230.0	7.57	0.21 +1.0 + 0.30	10.60	1.52
6	240.0	7.57	0.27 +1.0 + 0.31	10.35	1.20
7	230.0	7.57	0.31 +1.0 + 0.31	11.49	2.30
8	250.0	7.57	0.31 +1.0 + 0.24	10.22	1.10
9 *	246.0	7.57	0.26 + 0.31	10.79	2.65
10 *	242.0	7.57	0.20 + 0.30	10.45	2.38

Таблиця 6.10.

Узагальнена інформація про крововтрату у моделі паренхіматозної кровотечі у щурів із застосуванням Карбогемостату

	1	2	3	4	5
No	Вага, г	Pd, g	Pdr., g	Pd.+Pdr+bl	d
1	266.0	8.12	0.31	8.89	0.46
2	274.0	8.12	0.31	8.55	0.12
3	230.0	8.12	0.32	9.11	0.67
4	223.0	7.57	0.31	8.22	0.34
5	232.0	7.57	0.31	8.27	0.39
6	245.0	7.57	0.30	8.02	0.15
7	250.0	7.57	0.30	8.12	0.25
8	231.0	7.57	0.32	8.06	0.17
9	237.0	7.57	0.29	8.21	0.35

На рис. 6.22 наведено узагальнені дані про кровотечу щурів контрольної групи (зупинка кровотечі медичною марлею) та груп, яким зупиняли кровотечу застосуванням Карбогемостату, Celox, і YB. Кожна точка являє собою кровотечу однієї тварини, демонструючи дуже індивідуальні значення для щурів у групах. Крововтрата щурів групі, для якої використовували Карбогемостат не перевищувало 1 мг, проте Celox, і YB були менш ефективнішими, ніж марля.

Звичайно, експериментальна модель з фіксацією 3-хвилинної кровотечі була дуже особливою і, можливо, більш тривала експозиція дозволила б виявити деякі ефекти Celox, і YB, які були показані *in vitro*. Однак, у прямому порівнянні Карбогемостат показав найвищі прокоагулянтні властивості.

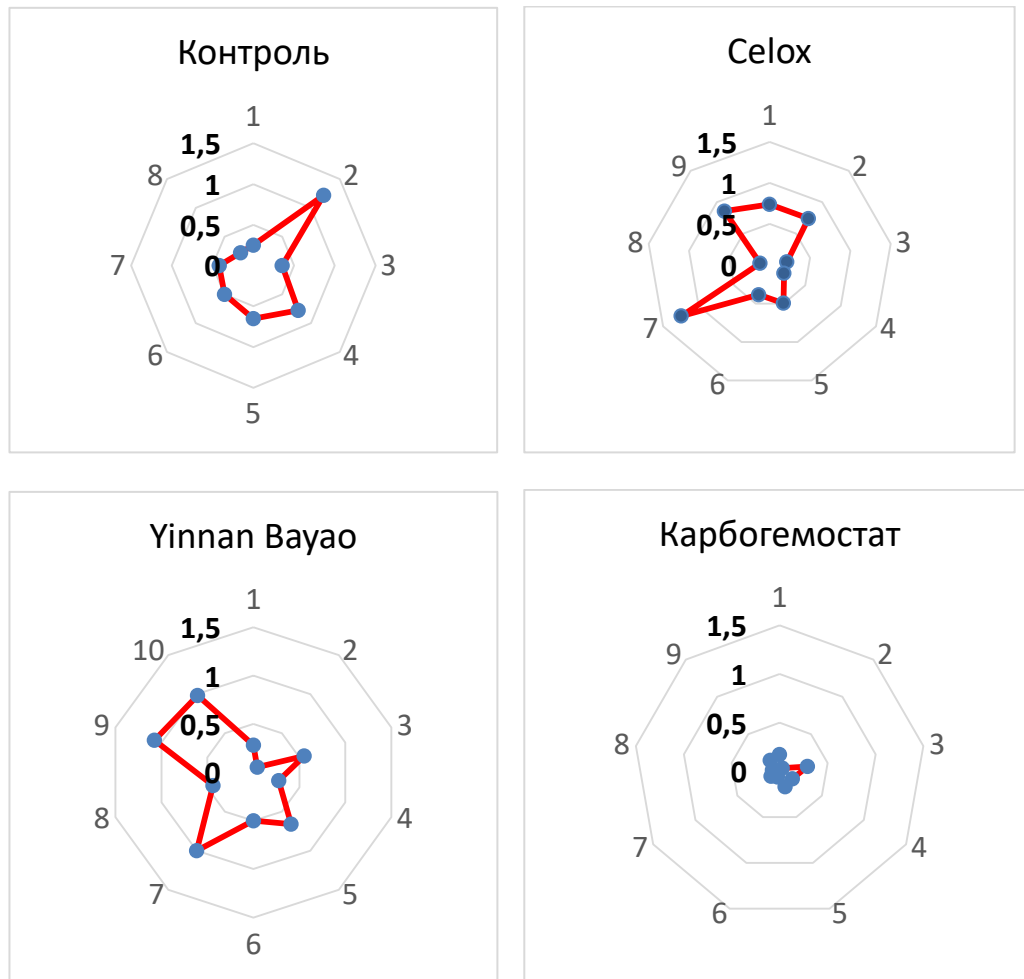


Рис. 6.22. Розподіл величини кровотеч у контрольних щурів та щурів, яким для зупинки кровотечі застосовували Celox, YB та Карбогемостат.

На рис. 6.23. представлені типові фотографії експериментів з використанням контрольної марлі, Карбогемостату та Yunnan Baiyao.

Контрольні зразки та зразки з YB були просочені кров'ю, тоді як Карбогемостат повністю припинив кровотечу. Цей факт можна пояснити специфічністю дії Карбогемостату, а також унікальною сорбційною здатністю активованого вуглецевого матеріалу, який використовували в як основу для створення цього гемостатичного виробу.

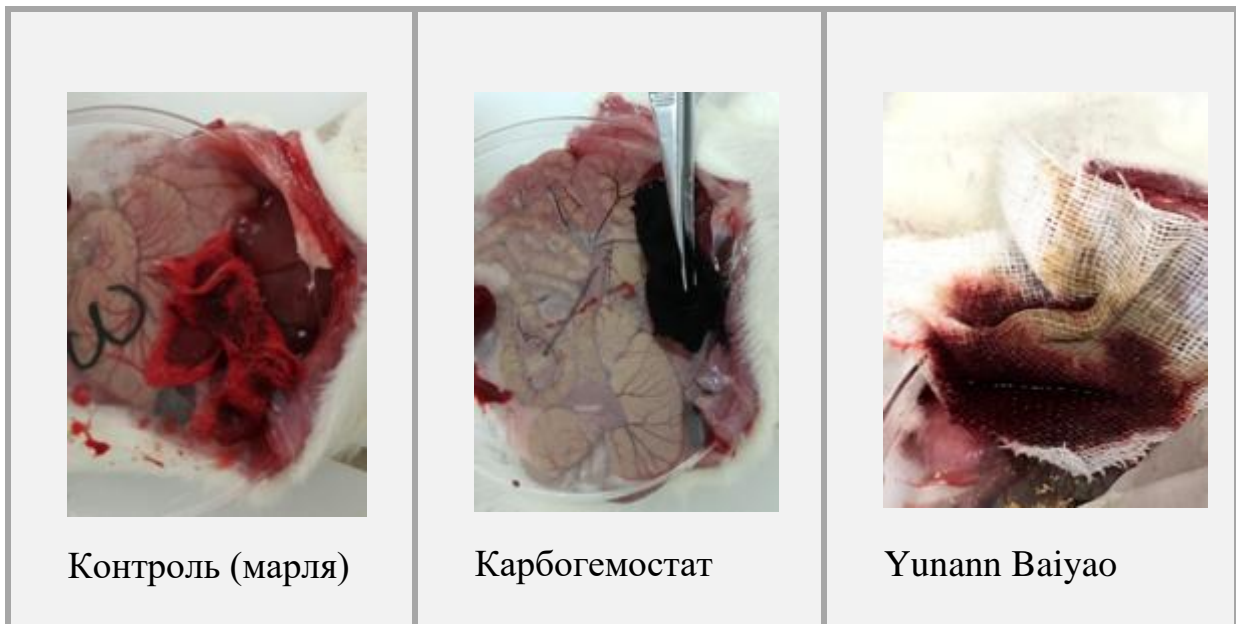


Рис. 6.23. Типові експерименти з лапаротомією та хірургічною резекцією печінки щурів: застосування контрольної марлі, Карбогемостату та Yunann Baiyao.

У більшості випадків ми не спостерігали повторної кровотечі при використанні карбогемостату. Застосування УВ також було достатньо ефективним, і повторної кровотечі не було після видалення пов'язки. У контрольній групі (використання марлі) після зняття пов'язки печінка здебільшого кровоточила (рис. 6.24).

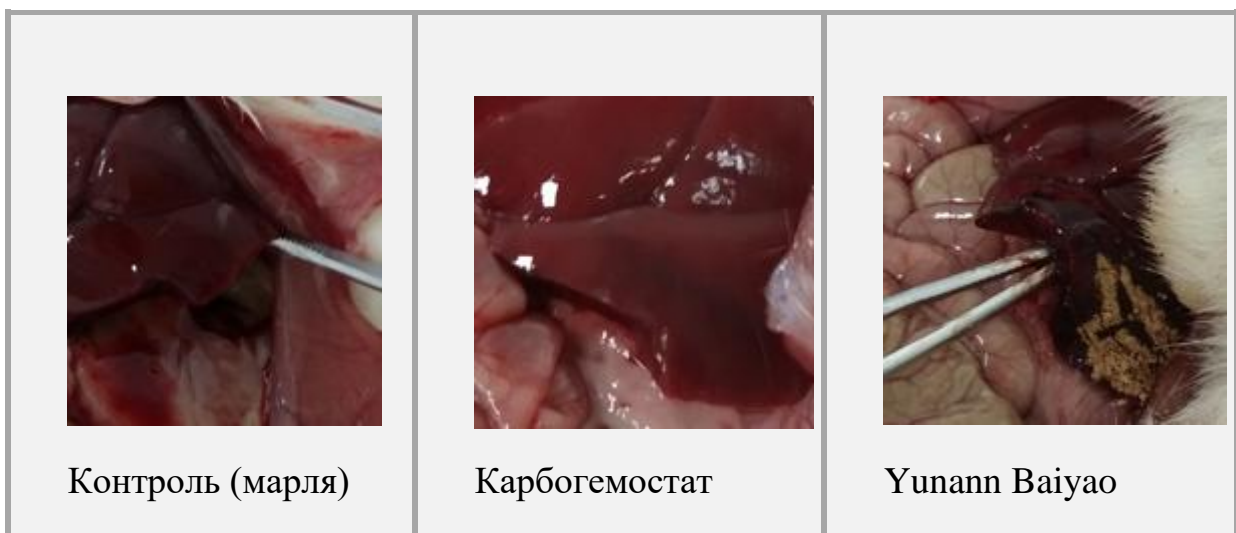


Рис. 6.24. Типові експерименти з лапаротомією та хірургічною резекцією печінки щурів після видалення контрольної марлі, карбогемостату та Yunann Baiyao наприкінці експерименту.

Результати статистичної обробки (згідно з тестом Манна-Вітні) отриманих результатів показали, що лише використання Карбогемостату значно зменшує кровотечу (порівняно з контролем значення p становить 0,0007. Результат значущий при $p < 0.05$).

Ні Celox, ні Yunnan Baiyao не показали достовірної відмінності від контролю (рис. 6.25), проте в деяких випадках обидва гемостатичні препарати були ефективними, що свідчить про індивідуальні особливості організму в ефективності зупинки кровотечі.

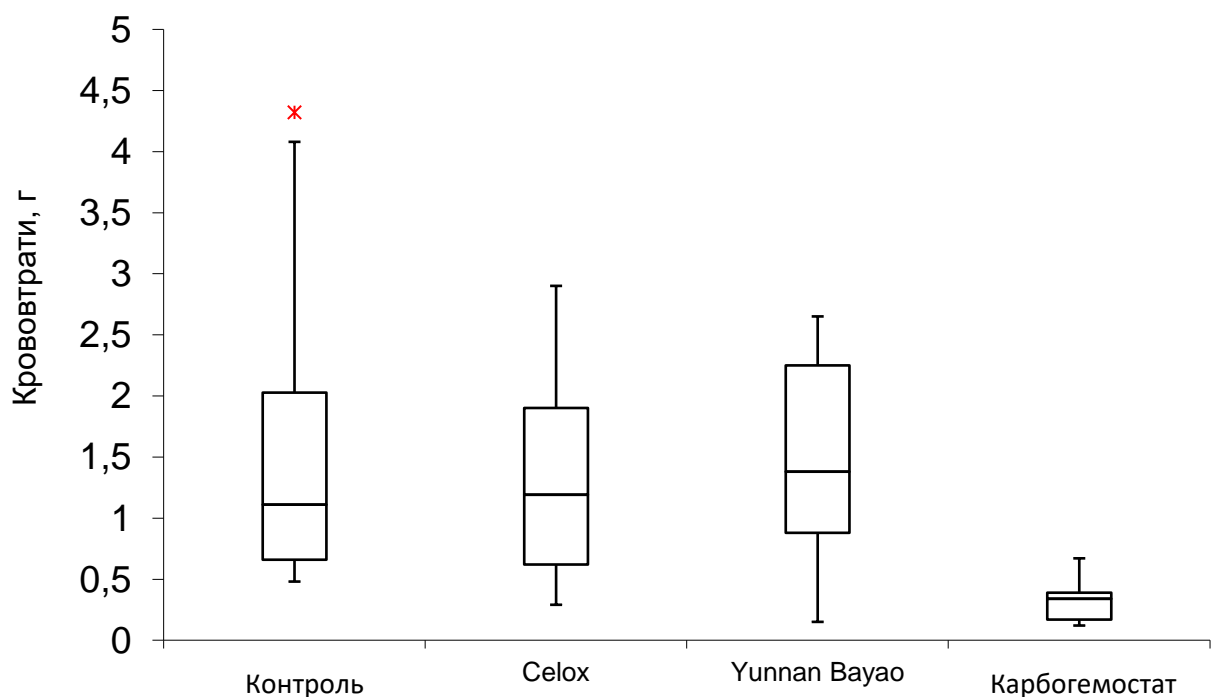


Рис. 6.25. Крововтрата у щурів контрольної групи, групах Celox, Yunnan Baiyao та Карбогемостат.

6.11.2. Оцінка кровоспинної дії Карбогемостату на моделі масивної кровотечі при травмі стегнової артерії свині

Тестування будь-якого гемостатичного засобу, призначеного для зупинки масивної кровотечі з магістральних судин передбачає випробування на стандартизованих моделях *in vivo*. Зокрема, було успішно проведено випробування дослідних зразків Карбогемостату (комбінованого перев'язувального засобу) для зупинки кровотечі з каротидної артерії щурів та за паренхіматозної кровотечі у щурів. Водночас, для масштабування способу

застосування комбінованого перев'язувального засобу для зупинки кровотечі та для завершення стадії доклінічних випробувань засобу зупинки кровотечі, призначеного для використання в медичній практиці, було необхідно провести його випробування на моделі гострої кровотечі у крупних тварин. Для цього було обрано модель гострої кровотечі зі стегнової артерії свині, яка є загальноприйнятою для тестування гемостатиків, призначених для застосування у польових умовах. В ході експерименту проводили порівняння ефективності дії Карбогемостату з дією Celox.

В експерименті використано 21 тварину одного віку і однакової ваги. Досліди проводили за стандартною схемою. Було сформовано три групи тварин по 7 тварин у кожній. У першій групі (контрольній) відтворювали кровотечу зі стегнової артерії та накладали тканину, яка не має гемостатичних властивостей. У другій групі за аналогічного ушкодження застосовували АУВМ, модифікований ензимним активатором зсідання крові (Карбогемостат). У третій групі за аналогічного ушкодження застосовували Celox.

Проводили стандартне ушкодження стегнової артерії свині і через 45 секунд спонтанної кровотечі притискали гемостатичний комбінований засіб до рани та утримували протягом 3-х хвилин, після чого тиск припиняли. Ретельно збирали всю кров, що витікає з рани. Зібрану кров зважували і визначали крововтрату, яку виражали у відсотках відносно маси тіла кожної тварини.

При використанні описаної вище моделі ушкодження стегнової артерії об'єм первинної крововтрати, нормалізований за масою тіла, в другій і третій групах тварин був однаковим, що свідчить про відтворюваність (дані не наведено).

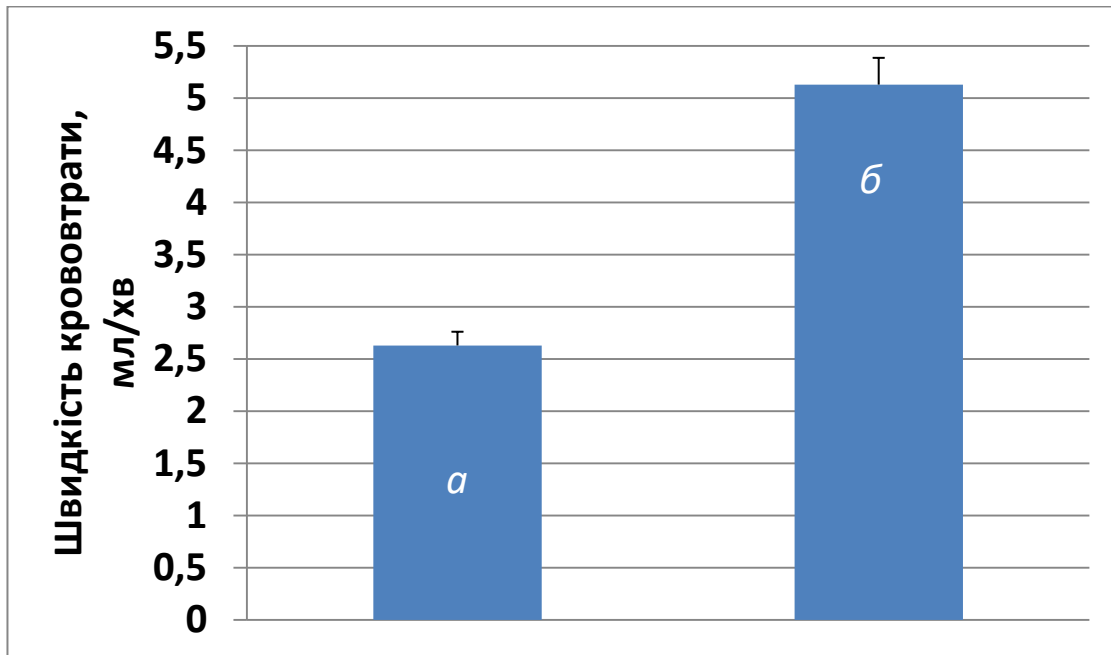


Рис. 6.26. Ефективність дії Карбогемостату (а) і Celox (б) у моделі масивної кровотечі зі стегнової артерії свині

За аналогічного пошкодження стегнової артерії свині рівень крововтрати протягом 60 хв та швидкість крововтрати при застосуванні комбінованого гемостатичного засобу менші, ніж у випадку застосування Celox (рис. 6.26).

Таким чином, Карбогемостат завдяки високій сорбційній здатності компоненту – перев'язувального матеріалу АУВМ, ефективно поглинає вміст токсичних речовин різної молекулярної маси, включаючи продукти протеолізу і термічної денатурації протеїнів, біогенні аміни і медіатори запалення, бактеріальні токсини, сприяючи покращенню місцевого гемостазу, купуванню травматичного набряку, зниженню інтенсивності місцевої та загальної запальної реакції, попередженню розвитку ускладнень, сприяючи зупинці кровотечі без подразнення рани.

Таким чином, створений гемостатичний комбінований виріб – Карбогемостат – є ефективним засобом для негайної зупинки масивної кровотечі за хірургічних втручань і поранень, включаючи масивні кровотечі за гемофілії. Його може бути рекомендовано для використання як гемостатичний комбінований засіб у цивільних і військових медичних закладах і в польових умовах під час надання первинної медичної допомоги.

6.11.3. Оцінка ефективності дії Карбогемостату на моделі масивної кровотечі з каротидної артерії щурів

Було показано, що використання Карбогемостату зменшувало крововтрату в групі та частоту повторних кровотеч порівняно з QuikClot Combat Gauze (рис. 6.27, а, б).

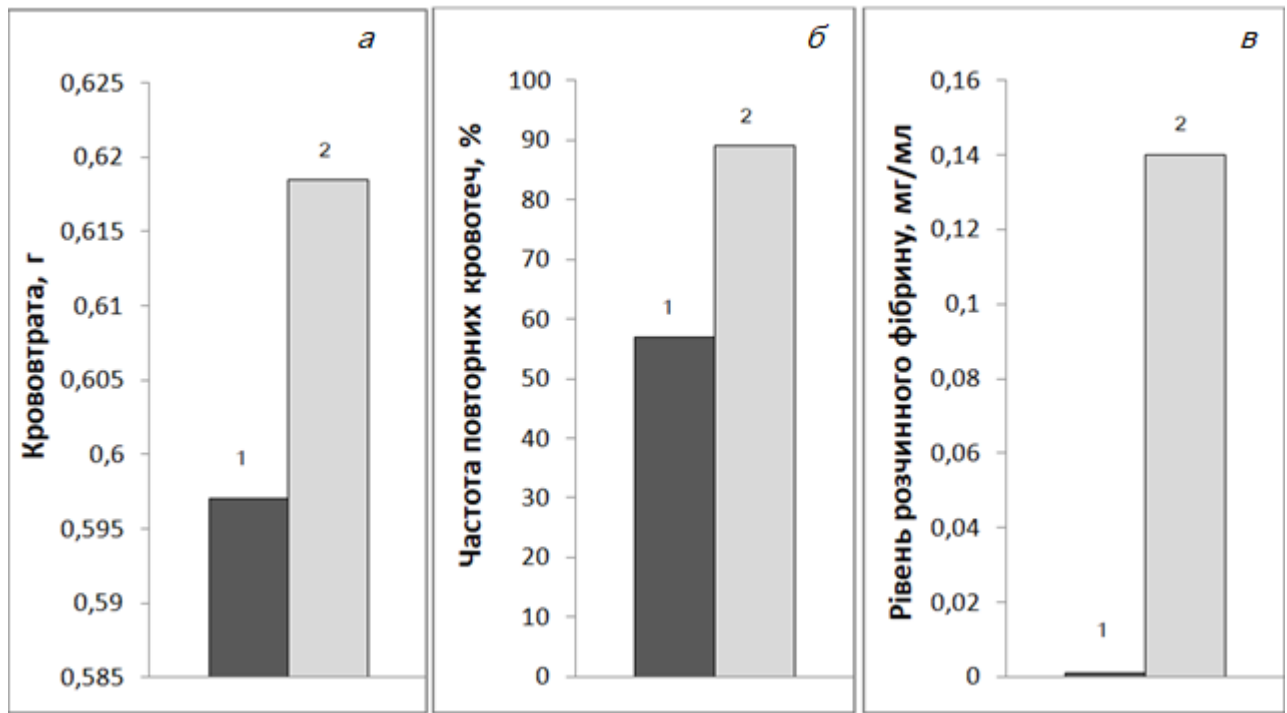


Рис. 6.27. Крововтрата (а), частота повторних кровотеч (б) та рівень розчинного фібрину в плазмі крові (в) щурів, кровотечу яким зупиняли за використання Карбогемостату (1) та QuikClot Combat Gauze (2).

Активним компонентом Карбогемостату є ензимний активатор зсідання крові, дія якого призводить до утворення тромбіну. Утворений в раневій зоні тромбін потенційно може мігрувати в загальний кровотік та спричиняти внутрішньосудинне зсідання крові. Тому на наступному етапі ми контролювали появу тромбіну в плазмі крові дослідних щурів.

Для виявлення тромбіну в плазмі крові було використано тромбін-специфічний хромогенний субстрат S2238. Показано, що за використання Карбогемостату рівень розщеплення S2238 в плазмі крові не перевищував такий в контрольній плазмі крові. За використання препарату порівняння QuikClot Combat

Gauze в 43 % випадках рівень розщеплення S2238 в плазмі крові перевищував контрольне значення.

Загальний рівень протромбіну в плазмі крові за використання Карбогемостату та QuikClot Combat Gauze було зменшено порівняно з контрольним до 79 та 77 % відповідно, що пов'язано з виснаженням факторів зсідання крові за масивних кровотеч.

Одним із маркерів активації системи зсідання крові є поява розчинних фібрин-мономерних комплексів (РФМК) в плазмі крові. На рис. 6.27 в видно, що за використання QuikClot Combat Gauze вміст РФМК в плазмі крові відповідає 0,14 мкг/мл, що свідчить про надзвичайно потужну активацію гемостазу в периферійному кровотоці щурів, тоді як за використання Карбогемостату РФМК в плазмі крові практично відсутні.

Таким чином, системна активація зсідання за використання Карбогемостату відсутня, і цей препарат викликає потужне зсідання крові локально в місці притискання.

6.11.4. Гістологічне дослідження структури судин та прилеглих тканин в моделі масивної кровотечі з каротидної артерії щура за умов застосування гемостатичного засобу

Прогноз при відкритих і закритих пошкодженнях артерій і вен значною мірою залежить від вирішення першочергової задачі, а саме вчасної зупинки кровотечі, що в подальшому вплине на загальний стан людини, яка постраждала. Засоби, які при цьому застосовуються, повинні забезпечити збереження життєздатності пошкодженої судини та тканин, які її оточують та бути запорукою можливості подальшого відновлення кровообігу, а також сприяти скороченню реабілітаційного періоду.

З метою вивчення впливу гемостатичного засобу на структурні зміни судин та тканин, що їх оточують, у щурів при травмуванні каротидної артерії були проведені морфологічні дослідження.

В експеримент були включені три групи тварин. В першій групі для зупинки кровотечі застосовували Карбогемостат, в другій групі застосовували QuikClot Combat Gauze (QC) – ліцензований засіб, який застосовується у військовій медицині. Третя група була удавано оперованою і слугувала контрольною.

При вивченні отриманої серії зрізів судин щурів характерною для усіх груп, включаючи контрольну, була наявність мас формених елементів крові в просвіті та переорієнтація гладеньком'язових клітин перпендикулярно по відношенню до вісі артерій, що ймовірно було обумовлено методом забору матеріалу, зокрема необхідністю прижиттєвого накладання лігатури на судину для її вилучення (рис. 6.28).

Аплікація кровоспинних засобів (як Карбогемостату, так і QC) призводила до наступних структурних змін в стінці судин щурів: сегментальний набряк в субендотеліальному шарі з деендотелізацією на значних ділянках інтими, ендотеліальні клітини в локусах, де вони збереглися мали веретеноподібну форму та виступали у просвіт судини, що свідчило про їхню активацію. Необхідно відмітити, що через дві години після травмування судини в обох експериментальних групах вдалося виявити лише прояви процесу формування тромбу. В безпосередній близькості до місця перфорації в таких судинах спостерігали утворення фібрину, які були щільно зафіксовані до інтими, іноді з аглютинованими еритроцитами (рис. 6.31), проте, ні в одному з випадків не було виявлено сформованих згустків на дистальних або проксимальних кінцях травмованої судини.

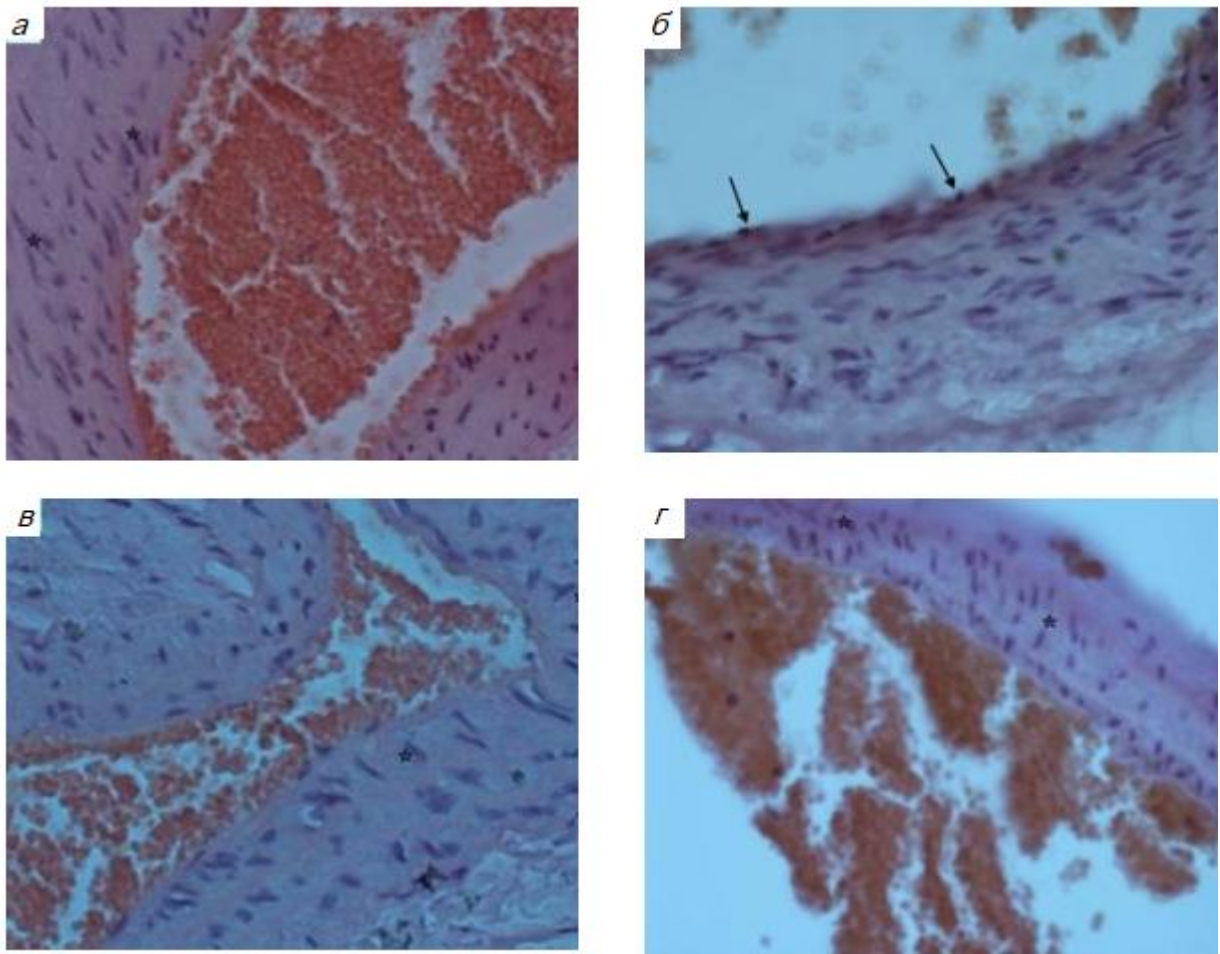


Рис. 6.28. Поперечний зріз каротидної артерії щура через 2 години після зупинки кровотоку. *а* – контрольна група – зупинка кровотоку медичною марлею; *б* – зупинка кровотоку Карбогемостатом; *в, г* – зупинка кровотоку QuikClot. (*) – гладеньком'язові клітини, зорієнтовані перпендикулярно осі судини. Просвіт судин (*а, в, г* заповнений форменими елементами крові).

На рис. 6.29 позначено скорочені каротидні артерії, в просвіті яких формується тромб (*) та окремі збережені ендотеліоцити, що виступають у просвіт судини (↑). З рисунка видно, що за двох годинної аплікації Карбогемостату (*а, б, в, г*) та QC (*д, е, є, ж*) в однаковій мірі скорочені артерії фібринові маси з аглютинованими еритроцитами щільно закріплені до інтими. Десквамований ендотелій зустрічається практично по всій площині люмінальної поверхні судини. Спостерігаються адвентиція, волокнисті структури сполучної тканини в стані деструкції.

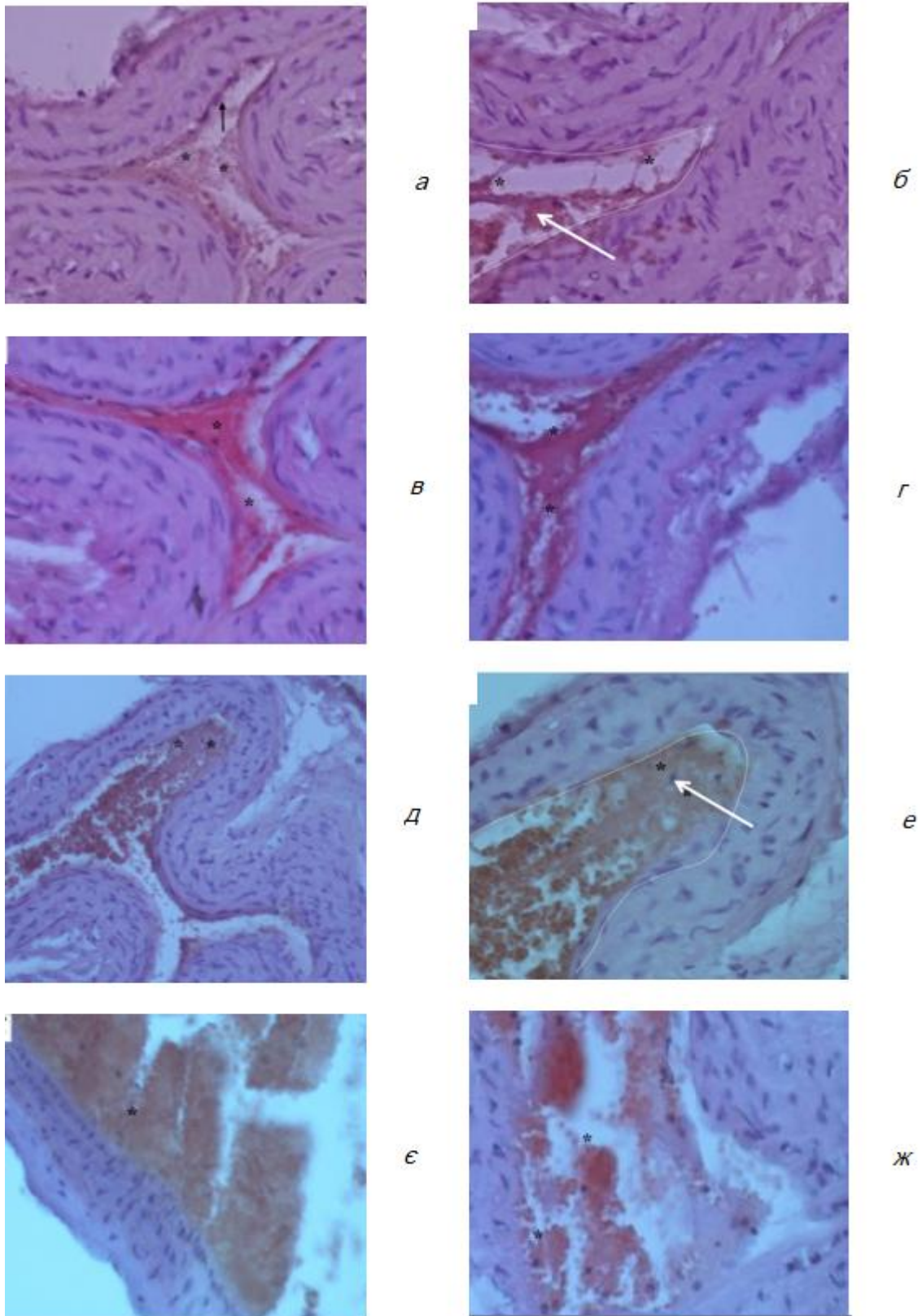


Рис. 6.29. Поперечний зріз каротидної артерії щура через 2 години після зупинки кровотечі. *а, б, в, г* – зупинка кровотечі Карбогемостатом; *д, е, е, ж* – зупинка кровотечі QuikClot. (*) – тромб. ↑ – ендотеліоцити у просвіт судини.

В просвіті артерії окремих експериментальних тварин як 1-ї, так і 2-ї групи виявлено значні лейкоцитарні скупчення, основну частину з яких склали нейтрофіли, проте вони не проникали в середню оболонку, що свідчило про збереження в більшості зразків цілісності внутрішньої еластичної мембрани та відсутність запальних процесів в медії (рис. 6.30).

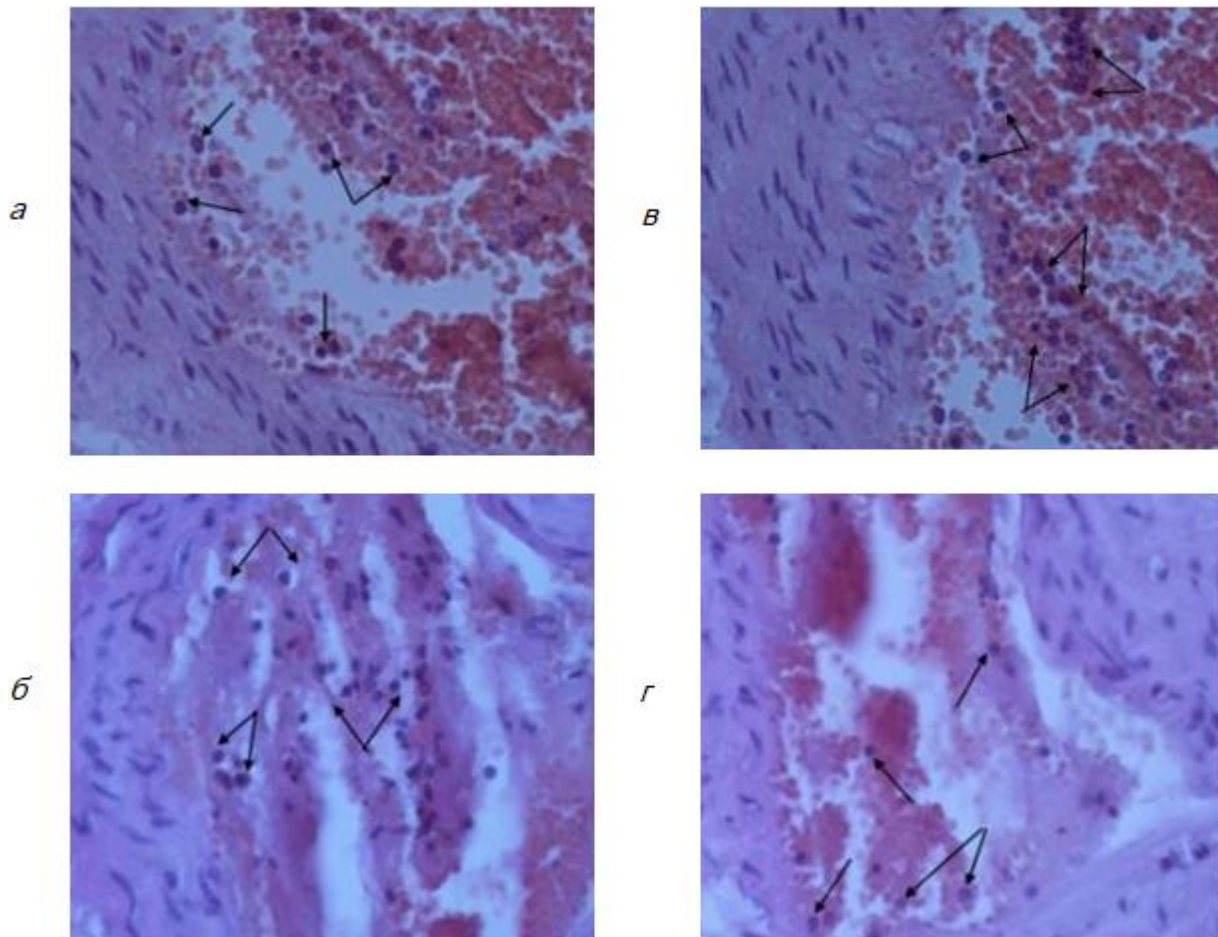


Рис. 6.30. Поперечний зріз каротидної артерії щура через 2 години після зупинки кровотечі. *а, б* – зупинка кровотечі Карбогемостатом; *в, г* – зупинка кровотечі QuikClot. ↑ – скупчення лейкоцитарних мас

В обох досліджуваних групах в середній оболонці артерій вогнещево був присутній набряк та ознаки деструкції гладеньком'язових клітин та міжклітинного матриксу (рис. 6.31). Також необхідно відмітити часткову деструкцію сполучної тканини та локальні геморагії в адвентиції багатьох артерій після перфорації та накладання обох кровоспинних засобів, що можливо було

викликано механічними впливами. Інфільтрацію нейтрофілами в зовнішній оболонці судин не виявлено.

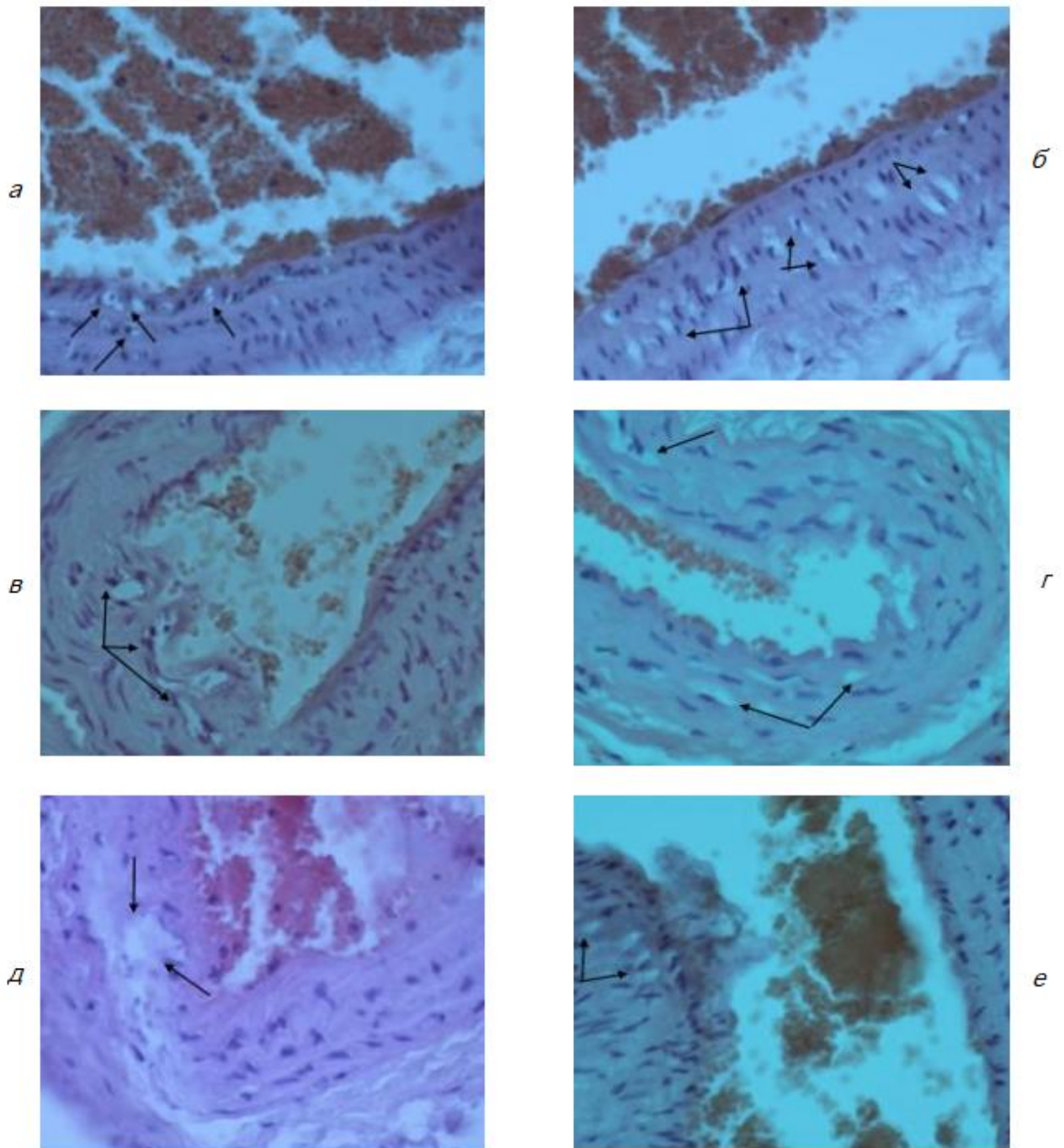


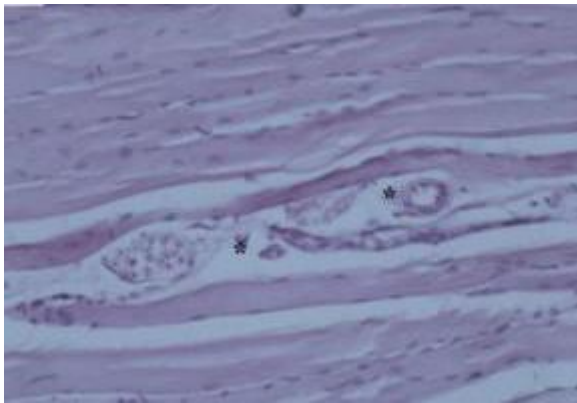
Рис. 6.31. Поперечний зріз каротидної артерії щура через 2 години після зупинки кровотечі. *а, б, в, г* – зупинка кровотечі Карбогемостатом; *д, е* – зупинка кровотечі QuikClot. ↑ – вакуолі.

З рис. 6.31 видно, що при використанні обох гемостатичних засобів субендотеліальний простір розширений, а середній шар містить численні валуолі,

частина з яких є результатом руйнування гладеньком'язових клітин та деструкції міжклітинного матриксу, вогнищево внутрішня еластична мембрана має розриви, що призводить до оголення субінтимальних структур.

В м'язевій тканині щурів, яка оточувала травмовану артерію після накладання обох кровоспинних засобів, що досліджувались, також не відмічено значних структурних відхилень від норми (зразки м'язової тканини в умовах удаваної операції представлені на рис. 6.32 і 6.33). Характерними були високе кровонаповнення капілярів без ознак тромбоутворення, виражений периваскулярний та міжклітинний набряк, що свідчить про підвищення проникності судинної стінки мікроциркуляторного русла, вогнищева деструкція міоцитів, можливо, викликана механічними впливами. Геморагію в тканинах спостерігали у одного із семи щурів у випадку застосування Карбогемостату, та в м'язах більшості експериментальних тварин у випадку застосування QS. Нейтрофільну інфільтрацію виявлено тільки у одного щура при накладанні QS.

а



б

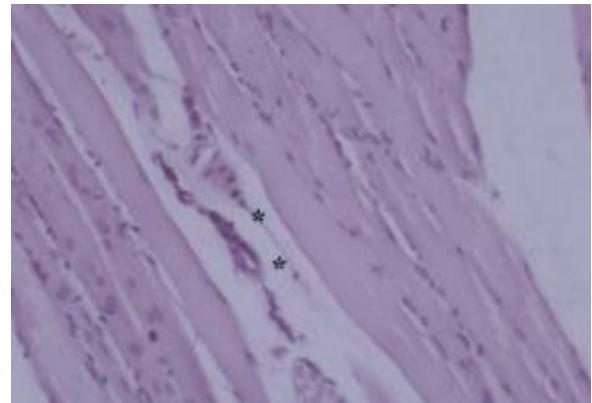


Рис. 6.32. Поперечний зріз м'язової тканини довкола каротидної артерії щура через 2 години після удаваної операції без розтину артерії. (*) – периваскулярний простір.

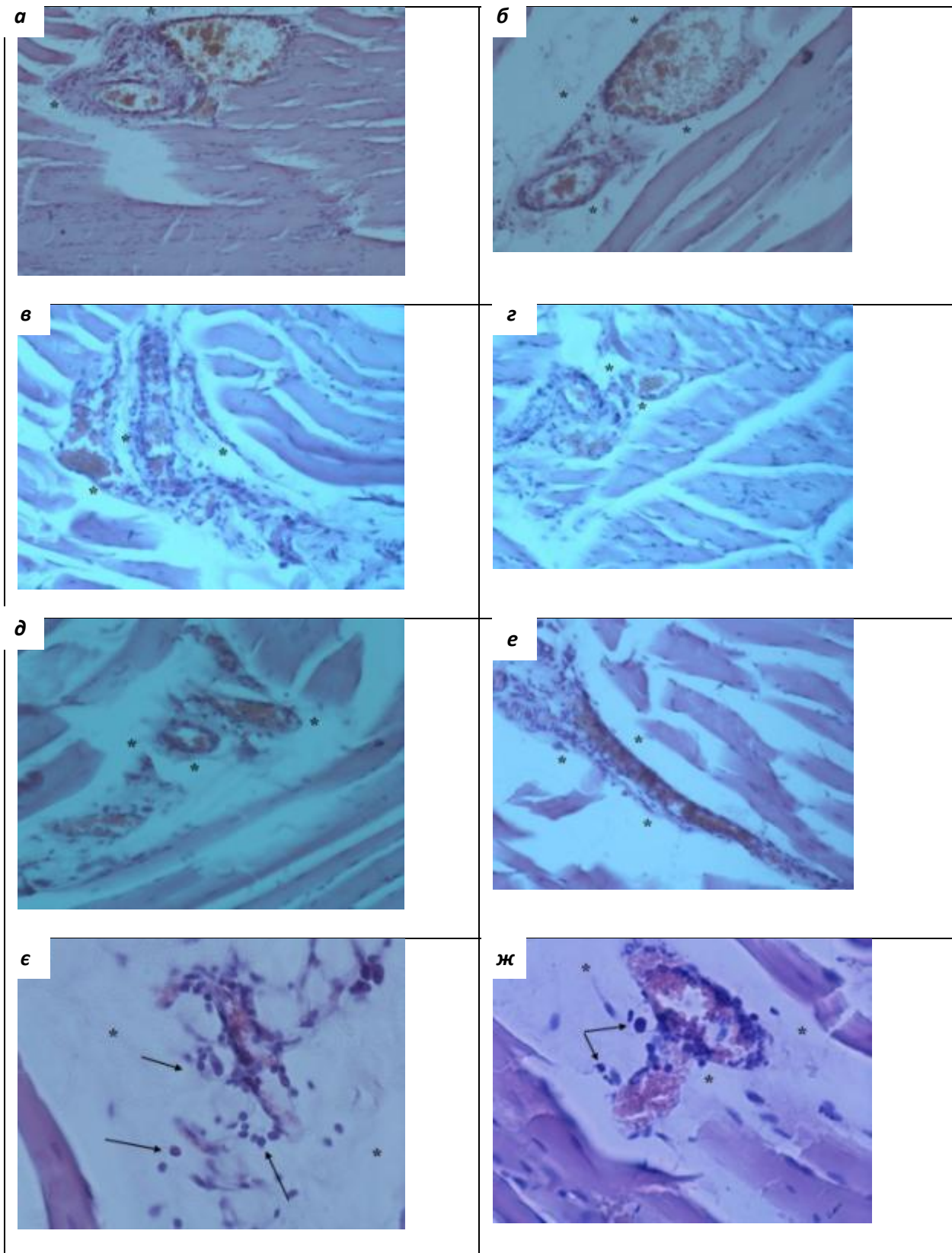


Рис. 6.33. Поперечний зріз м'язової тканини довкола каротидної артерії щура через 2 години після розтину артерії та зупинки кровотечі. *а, б, в, г* – зупинка кровотечі Карбогемостатом. *д, е, е, ж* – зупинка кровотечі QuikClot. (*) – периваскулярний та міжклітинний набряки. ↑ – велика кількість лейкоцитів поза межами судини.

Таким чином, основні гістологічні зміни в обох експериментальних групах (Карбогемостат та QC) полягали в помірних вогнещевих порушеннях медії без виражених ознак запалення, а також пошкодженні ендотеліальних шарів травмованих артерій у віддалених зонах від перфорації та деендотелізації в зонах наближених до травми, що є закономірним для ділянок формування тромбу. Результатом посиленого відшарування ендотелію було обширне оголення субендотеліального шару, а отже, експонування його тромбогенних субстанцій, зокрема колагену IV типу, в просвіт судини, що призводило до ослаблення його антикоагулянтних і посилення прокоагулянтних властивостей, а саме – до включення каскадного механізму зсідання крові. Зміни в структурі м'язів, що оточували травмовані артерії в експериментальних групах тварин носили зворотній характер та, в основному, полягали в периваскулярному та інтерстиціальному набряку, що було результатом підвищення проникності стінок судин мікроциркуляторного русла, не виявлялись нейтрофільна інфільтрація та практично були відсутні ознаки некрозу.

Описані структурні порушення при застосуванні Карбогемостату як в судинах, так і в оточуючих артерії тканинах, практично не відрізнялись від таких при застосуванні QC та не були достатньо значними, щоб можна було розглядати можливість подальшого розвитку запалення або інших віддалених негативних наслідків.

Таким чином, було створено вітчизняний засіб для зупинки масивних кровотеч. До створення цього засобу було залучено Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.С. Кавецького НАН України та Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України. Основою кровозупинного засобу є ензимний активатор зсідання крові, поєднаний з вітчизняним волокнистим вуглецевим матеріалом медичного призначення «АУВМ». Було показано, що на відміну від існуючих гемостатиків, які ініціюють зсідання крові неспецифічно, запропонований універсальний гемостатичний засіб безпосередньо призводить до утворення ендогенного тромбіну, який у свою чергу ініціює формування полімерного фібрину – каркасу тромбу. Показано принципову можливість застосування активатора зсідання крові за присутності антикоагулянтів прямої дії

(гепарину) та за умов адміністрації антагоніста вітаміну К – варфарину. Ці дослідження дозволяють значно розширити спектр використання створеного нами кровозупинного засобу, зокрема за умов антикоагулянтної терапії гепарином, за варфаринотерапії та за вроджених порушень коагуляційного каскаду, зокрема при гемофілії.

На розроблений гемостатичний комбінований засіб для зупинки масивних кровотеч у тому числі за гемофілії створено корисну модель.

Проведено біохімічну характеристику препарату колагену, визначено відсотковий вміст негідролізованого колагену у зразках та створено методичні рекомендації щодо модифікації технології, яка дозволила отримати колаген, придатний для біотехнологічних потреб, а саме – для створення колагенової гемостатичної губки, яку планується використовувати для потреб медицини та ветеринарії.

Дослідні зразки колагенової губки, створені фахівцями Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, було успішно апробовано при оперуванні печінки кролів, показано відсутність небажаних віддалених ефектів його застосування.

Таким чином, було створено, охарактеризовано та апробовано *in vitro* та *in vivo* колагенову матрицю з посиленням гемостатичним ефектом, яка за ефективністю ранозагоюючої дії не поступається існуючим аналогам, а за здатністю зупиняти кровотечу з паренхіматозних органів – значно переважає їх.

РОЗДІЛ 7. ОДЕРЖАННЯ АУТОЛОГІЧНОГО ФІБРИНОВОГО КОМПОЗИТУ

7.1. РОЗРОБКА СПОСОБУ ОДЕРЖАННЯ ФІБРИНОВОГО ГЕЛЮ

Після хірургічного втручання або порушення цілісності тканин внаслідок травми постають пріоритетні задачі – зупинити кровотечу, запобігти інфекції, призупинити запалення та відновити порушену цілісність та функції тканин. Застосування традиційних методик не завжди дає достатню надійність. Одним з методів, спрямованих на вирішення проблеми, є створення та розробка біологічних композитів та клеєвих сумішей. В медичній практиці використовують біологічні композитів двох типів: 1) хімічно синтезовані фармакологічні препарати (цианакрилатні та поліуретанові клеї), які мають гемостатичні, та репараційні властивості і 2) клеї створені на основі біополімерів – колагену, фібрину, желатину.

Недоліками синтетичних композитів є гідрофобність, значне зниження здатності до склеювання в середовищі черевної порожнини, цитотоксичність, надто швидке затвердіння плівки та можливість її відторгнення, довгий термін деградації та складність технології виготовлення.

З огляду на зазначене, великий інтерес викликає використання біологічних полімерів, зокрема, фібринових композитів для застосування в різних галузях хірургії. На початку досліджень намагались використати основні переваги біоматеріалів, а саме: повне розсмоктування, стимуляцію загоєння рани і біосумісність. Композит на основі фібринового згустку має високу адгезію, призводить до герметизації поверхні рани та прискорює репаративні процеси при хірургічних втручаннях. На відміну від синтетичних, такий гель не ушкоджує поверхню тканин і розсмоктується у досить короткий час.

Показано також, що регенерація кісток при захворюванні та переломах кісток відбувається ефективніше за присутності біологічно активних низькомолекулярних протеїнових компонентів плазми крові, які вводять в зону пошкодженої кісткової тканини при хірургічному втручанні у вигляді розчину попередньо ліофілізованої низькомолекулярної фракції протеїнів плазми крові.

Недоліком цього способу є те, що приготування низькомолекулярної фракції протеїнів плазми крові є багатоетапним процесом, що потребує довготривалої попередньої підготовки препарату та виключає використання плазми крові самого пацієнта, що може бути причиною інфікування та алергічних реакцій.

Одним з способів одержання фібринового герметика у вигляді гелю, отриманого з аутологічної крові, виготовлення якого проводять шляхом отримання концентрату фібриногену з плазми крові пацієнта або карантинізованої плазми крові одного донора. В подальшому до отриманого концентрату додають необхідні компоненти (тромбін або тромбіноподібний ензим, хлористий кальцій, апротинін) та отримують фібриновий герметик. Основними недоліками цього способу є використання великих об'ємів крові (100 мл), що обмежує використання герметика у дітей та хворих із порушеннями системи гемостазу, складність виготовлення, можливість передачі гематогенних вірусних інфекцій з препаратом тромбіну (гепатит В, С та ВІЛ-інфекція), складність визначення виходу фібриногену, що пов'язано зі збереженням умов стерильності.

Основними недоліками цих способів є складність виконання та багатостадійність процесу одержання фібринового композиту, необхідність враховувати час полімеризації в залежності від концентрації тромбіну, можливість спонтанної полімеризації фібриногену у флаконі. Крім того, оскільки основним компонентом такої суміші є фібриноген, отриманий з плазми крові донорів, а також тромбін, то не виключено потенційну можливість передачі інфекції гепатиту, СНІДУ та інших захворювань, а також можливі імунологічні реакції.

Інфекція може бути передана фібриновим герметиком не тільки за допомогою фібриногену, але також за допомогою бичачого апротинину і компонентом бичачого тромбіну. Відомо, що бичачий тромбін є носієм інфекційного фактора бичачого губчастого енцефаліту (В Е) і інших вірусів, властивих ссавцям. Більш того, бичачий тромбін є сильно діючим антигеном, який може викликати реакції імунної характеру у людини. Отже, застосування бичачого тромбіну може надати шкідливу дію на одержувача.

Таким чином, метою роботи було створення аутологічного фібринового композиту з плазми крові людини з високими адгезивними та антисептичними властивостями, який здатен до стимуляції регенерації тканин і зниження інтенсивності запальних процесів, для використання його в хірургічній практиці, ортопедії, травматології та комбустіології. Даний фібриновий композит виключатиме небезпеку інфікування та відторгнення.

Роботу було спрямовано на створення фібринового композиту з використанням аутологічної плазми крові і ензимного активатора зсідання крові. До складу такого клеєвого композиту входять компоненти, які мають сорбційні та адгезивні властивості, зупиняють кровотечу, і тим самим впливають на різні стадії процесу зсідання крові.

Поставлену задачу вирішували шляхом взаємодії аутологічної плазми крові пацієнта та ензимного активатора зсідання крові в присутності йонів кальцію, що забезпечує утворення тромбіну в плазмі крові. Це призводить до перетворення фібриногену на фібрин з утворенням фібринового гелю, який має адгезивні властивості. Такий аутологічний фібриновий гель сприяє зупиненню кровотечі, регенерації пошкоджених тканин і знижує запальні процеси. Фібриновий гель з власної плазми крові пацієнта виключає небезпеку вірусного гематогенного інфікування від донорів, відторгнення та загрозу алергічних реакцій. Процес утворення фібринового гелю триває 70 ± 5 с.

Для приготування фібринового гелю спочатку одержували аутологічну плазму крові пацієнта, до якої додавали розчин ензимного активатора зсідання крові та розчин хлористого кальцію; суміш обережно перемішували та через 60 ± 5 с використовували безпосередньо на ушкоджених тканинах живого організму, де в місці контакту через 10 ± 5 с утворюється фібриновий гель у вигляді желеподібної плівки. Фібриновий гель має адгезивні властивості до вологої поверхні, що сприяє щільному покриттю та моделюванню пошкодженої поверхні в місці застосування.

Спосіб приготування фібринового гелю. Безпосередньо перед застосуванням фібринового гелю для отримання аутологічної плазми крові проводили забір крові пацієнта з вени вакутайнером у кількості 5-20 мл в

залежності від розмірів операційного поля. Для одержання плазми кров центрифугували протягом 10 хв із прискоренням 1200-1400 g, плазму крові (супернатант) переносили у пластикову пробірку.

Для одержання фібринового гелю до пластикової пробірки, що містить 1 мл плазми крові, при температурі 20 ± 5 °C додавали 1 мл розчину ензимного активатора протромбіну з концентрацією 0,05 мг/мл та 0,1 мл розчину хлористого кальцію з концентрацією 5 %. Через 60 ± 5 с від моменту додавання ензимного активатору зсідання крові суміш переносили на пошкоджені тканини живого організму, де в місці контакту через 10 ± 5 с відбувалося утворення фібринового гелю. За необхідності час утворення фібринового гелю може бути подовжений шляхом додавання до плазми крові меншої кількості ензимного активатору зсідання крові. Вихід фібринового гелю кількісний: з 10 мл плазми крові утворювалося 11 мл фібринового гелю.

7.2. СТИМУЛЯЦІЯ РЕПАРАТИВНОГО ОСТЕОГЕНЕЗУ ТА ЗНИЖЕННЯ ІНТЕНСИВНОСТІ ЗАПАЛЬНИХ ПРОЦЕСІВ ПРИ ЗАСТОСУВАННІ ФІБРИНОВОГО ГЕЛЮ.

Відомо, що регенерація кісток при захворюванні та переломах кісток відбувається ефективніше за присутності біологічно активних низькомолекулярних протеїнових компонентів плазми крові. Це пов'язано з тим, що згусток є остовом для формування грануляційної тканини і є не менш важливим фактором для регенерації кісткової тканини при пошкодженні.

Відомо, що введення розчину попередньо ліофілізованої низькомолекулярної фракції протеїнів плазми крові в зону пошкодженої кісткової тканини стимулює остеосинтез та зниження інтенсивності прояву запальних процесів. Однак приготування низькомолекулярної фракції протеїнів плазми крові є багатоетапним процесом, що потребує довготривалої попередньої підготовки протеїнового препарату та виключає використання плазми крові самого пацієнта, що може бути причиною інфікування та алергічних реакцій.

Для стимуляції репаративного остеогенезу було запропоновано фібриновий гель з аутологічної плазми крові. При застосуванні фібринового гелю на уражених

тканинах живого організму відмічали його неалерго- та неантигенність, нетоксичність, відсутність подразнювальної дії на прилеглі тканини, адгезію до вологої поверхні тканин, високий ступінь моделювання ураженої поверхні, простоту аплікації, швидке утворення водо- та повітронепроникного фібринового гелю у вигляді желеподібної плівки.

Досліди проводили на моделі перелому променевої кістки кролів (віком 7 місяців та вагою 2 кг) – остеотомії діафіза променевої кістки. Всіх експериментальних тварин після моделювання перелому поділяли на дві групи: дослідну та контрольну. Тваринам дослідної групи після проведення остеосинтезу перед накладанням швів на м'які тканини у зону перелому наносили активовану аутологічну плазму крові на початкових етапах полімеризації фібрину. При нанесенні фібринового гелю на місце перелому відмічали його високу адгезивність та щільність прилягання до ураженої поверхні. Тварин контрольної групи залишали без нанесення фібринового гелю на область перелому.

Згідно клінічних та рентгенологічних даних на 3-ю добу після остеотомії у всіх тварин спостерігали виражені ознаки запальної реакції операційних ран, зокрема набряк, почервоніння та болючість травмованих тканин. Тварини не опиралися на травмовані кінцівки. Рентгенологічно констатували поперечні переломи з добре вираженою лінією фрактури. Лізису країв кісткових уламків не спостерігали.

На 7-у добу після остеотомії у дослідних тварин відмічали зниження інтенсивності прояву запалення: суттєво зменшувався набряк та болючість м'яких тканин, була відсутня еритема, тварини злегка опиралися на хвору кінцівку. Натомість у контрольних кролів спостерігали добре виражений набряк, болючість тканин, ознаки еритеми. Контрольні тварини злегка опиралися на хвору кінцівку.

На 18-у добу після остеотомії у тварин дослідної групи були відсутні ознаки запалення, рентгенологічно спостерігали помірну періостальну реакцію зони перелому, формування сполучнотканинного мозоля з добре вираженими процесами мінералізації. Тварини повністю опиралися на кінцівку (рис. 7.1). Натомість у тварин контрольної групи на цей термін після остеотомії відмічали виражену набряклість м'яких тканин та помірну їх болючість при пальпації.

Рентгенологічно відмічали масивну, нерівномірну періостальну реакцію, локалізовану поза зоною дефекту. Крім того, тканинно-специфічні структури в ділянці дефекту були на початкових етапах мінералізації.



Рис. 7.1. Рентгенограма кінцівок кроля дослідної (*a*) та контрольної (*б*) груп.

Таким чином, показано, що застосування фібринового гелю з плазми крові пацієнта для стимуляції репаративного остеогенезу та зниження інтенсивності запальних процесів є високоефективним підходом. Застосування фібринового гелю локалізує регенеративні процеси в межах перелому стимулює репарацію тканин та сприяє зниженню больового синдрому та прискоренню одужання.

7.3. ПРОВЕДЕННЯ АПРОБАЦІЇ РОЗРОБЛЕНОГО ФІБРИНОВОГО КОМПОЗИТУ ЗА ХІРУРГІЧНИХ ВТРУЧАНЬ ДЛЯ ПЕРЕВІРКИ ЕФЕКТИВНОСТІ ЗАГОЄННЯ РАНИ НА ПЕЧІНЦІ.

Доцільність використання аутологічного фібринового гелю в хірургії, ортопедії, травматології, комбустіології обумовлено наступним:

- тригером процесу утворення аутогенного фібринового гелю є ензими отрути змій, отримані в стерильних умовах, що виключає небезпеку інфікування;
- простота приготування фібринового гелю з плазми крові пацієнта безпосередньо перед застосуванням;
- не є токсичним і антигенним, не впливає на гемостаз в загальному кровотоці, не містить патогенних домішок;
- відсутність імуногенності та подразнюючої дії аутологічного фібринового гелю на прилеглі тканини;
- адгезія до вологої поверхні тканин, високий ступінь моделювання ураженої поверхні та висока щільність прилягання до уражених тканин;
- простота аплікації завдяки швидкому керованому утворенню водо- та повітронепроникного гелю;
- стимуляція регенерації тканин та зниження інтенсивності запального процесу.

На наступному етапі апробації аутологічного фібринового композиту проводили дослідження його впливу на швидкість загоєння рани печінки, Операцію проводили методом лапаротомії. На латеральній стороні правої долі печінки робили розріз довжиною 4 см та глибиною 0,8-1 см. Після зупинки кровотечі накладали вузлові шви з кетгуту. Дослідній собаці, перед закриттям черевної порожнини, на рану печінки наносили аутологічний фібриновий композит, який полімеризувався протягом 30-40 сек.

За тваринами вели спостереження та проводили релапаротомію на 6-у добу для аналізу стану швів (рис. 7.2).

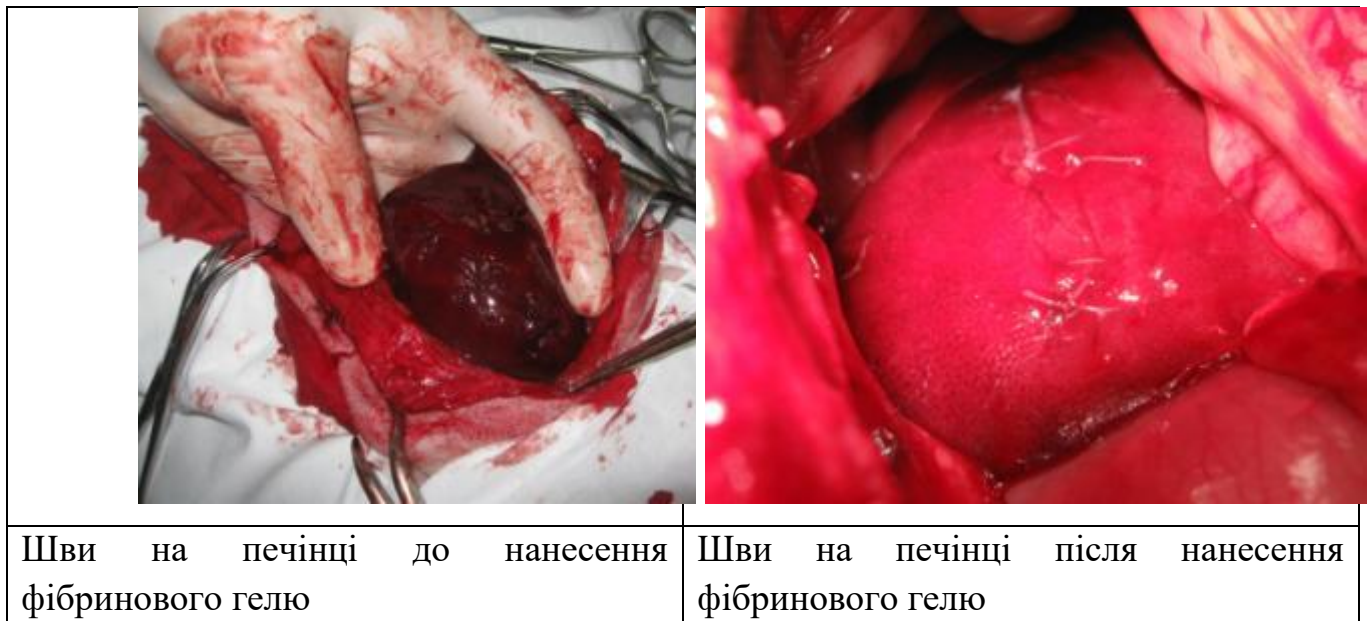


Рис. 7.2. Шви на печінці собаки в день проведення операції.

Головною відмінною ознакою рани печінки дослідної та контрольної собак на 6-у добу після операції була адгезія сальники до раневої поверхні у випадку застосування фібринового гелю. Сальник зростався з капсулою печінки тонкою смужкою і лише в ділянці розрізу легко відпрепаровувався, залишаючи незначні ерозивні дефекти капсули печінки та капілярну кровотечу, яка зупинялася самостійно. Візуально паренхіма печінки у зоні поверхні рани суттєво не відрізнялася від здорової. У даній ділянці на поверхні вже починав проглядатися типовий органний малюнок, а сама вона була темно-червоного кольору. Лише по лінії розрізу під самою капсулою можна було розгледіти тоненьку (близько 1 мм) світлу смужку, що свідчить про помірний розвиток сполучної тканин. Шви були слабо візуалізовані, їх можна помітити лише по «втисненнях» на капсулі печінки (рис. 7.3).

У контрольної собаки адгезивних явищ з боку очеревини чи сальника не спостерігали. Проте відмічали більш потужну сполучнотканинну реакцію, яка була яскраво вираженою з боку капсули печінки. Так, остання була суттєво потовщеною не тільки по місцю розрізу, а й виходила за межі накладених швів та повністю покривала їх зверху, у зв'язку з чим мала випинання над поверхнею в місцях зав'язаних вузлів. Поряд з цим паренхіма печінки навколо травмованої

ділянки мала світліший колір, що свідчить про суттєвий розвиток післяопераційного запального процесу та пов'язаними з ним дегенеративно-дистрофічними змінами гепатоцитів. Органний малюнок у цій ділянці не проглядався. Поряд з цим добре було візуалізовано і власне шви, які в цей період були лише на початковій стадії їх резорбції. При цьому навколо них відмічали потужну сполучнотканинну реакцію (рис. 7.3).

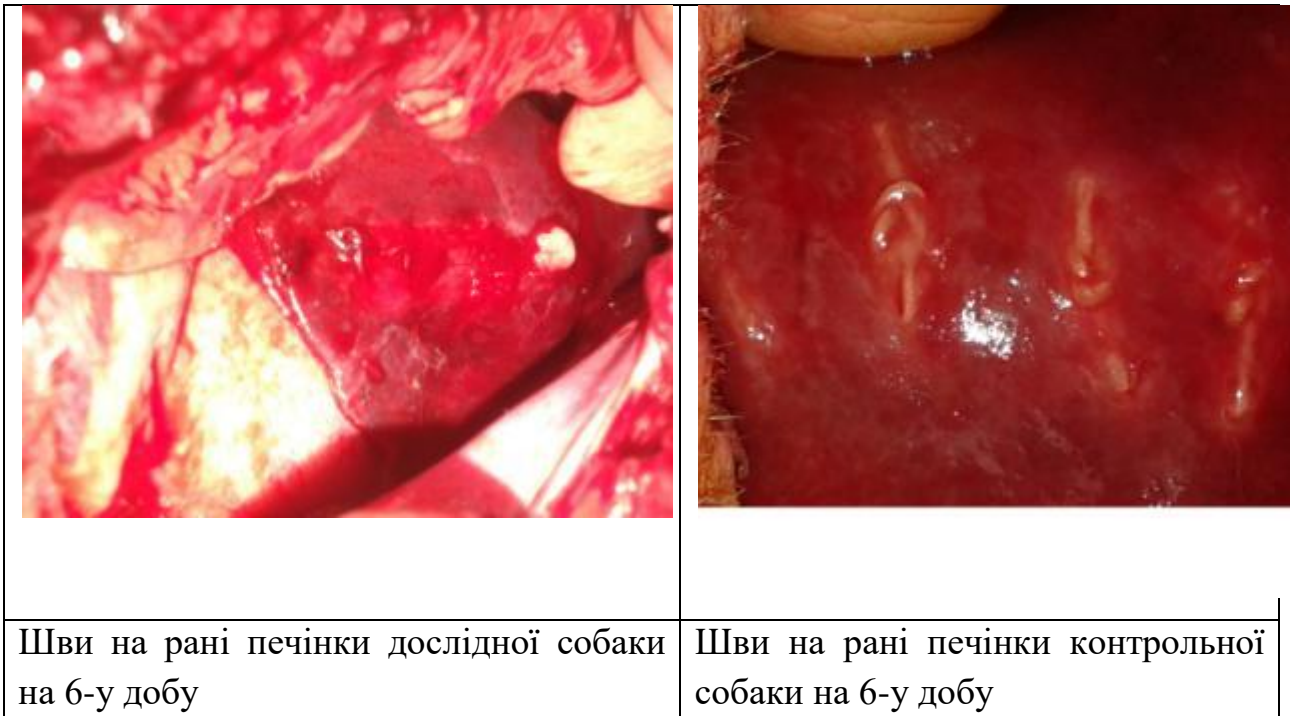


Рис. 7.3. Контроль швів на рані печінки на 6 добу після операції.

Таким чином, застосування аутологічного фібринового композиту сприяло швидкому загоєнню рани печінки, очевидно, головним чином за рахунок активації паренхіматозного регенеративного потенціалу та у меншій мірі – сполучнотканинного, про що свідчить макро-морфологічна характеристика процесу загоєння. При цьому аутологічний фібриновий композит обмежував та помірно знижував розвиток пост-травматичної запальної реакції, про що свідчить значно менша візуально зона дистрофічних пошкоджень.

РОЗДІЛ 8. СТВОРЕННЯ ГЕМОСТАТИЧНИХ ГУБОК НА ОСНОВІ КОЛАГЕНОВОЇ МАТРИЦІ І АКТИВАТОРА ЗСІДАННЯ КРОВІ

8.1. КОЛАГЕНОВІ ГУБКИ ЯК ГЕМОСТАТИЧНІ АГЕНТИ

Місцеві гемостатичні засоби на основі полімерів широко використовуються як в хірургічній практиці, так і в побуті для зупинки незначних кровотеч з саден, порізів, ран і т.д. Для зупинки місцевих кровотеч найбільш зручними є тверді лікарські форми і вироби: порошки, плівки, губки, волокна та ін., ефективність яких залежить від природи і структури вихідної матриці та її здатності впливати на різні стадії процесів зсідання крові. Особливе місце серед природних полімерів з кровоспинними властивостями займає колаген – один з основних структурних протеїнів організму. Відомо, що колагенові волокна викликають активну адгезію і агрегацію тромбоцитів. *In vivo* після локального пошкодження судин тромбоцити починають приклеюватися до виступаючих в місці пошкодження колагенових волокон. При їх контакті з колагеном вивільняються ADP, серотонін та інші тромбоцитарні фактори зсідання крові, відбувається подальша агрегація тромбоцитів, яка призводить до утворення згустку і закриття місця пошкодження. Передбачається, що екзогенний колаген, поміщений на рану, буде діяти аналогічним способом.

На сьогодні в Україні відсутнє власне виробництво губок на основі колагенової матриці. Розробка та запровадження виробництва вітчизняної гемостатичної губки є актуальним біотехнологічним завданням для науки та виробництва, оскільки європейські та американські вироби відзначаються високою вартістю та практично недоступні на ринку лікарських препаратів України, продукція, вироблена в Росії, характеризується низьким ступенем чистоти та не рекомендується до застосування у хірургії.

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.

Таким чином, метою роботи було створення вітчизняної колагенової губки з підвищеними гемостатичними властивостями. Відповідно до мети було поставлено такі завдання:

- Аналіз зразків сировини, призначеної для отримання колагенової губки.
- Електрофоретичний аналіз отриманого колагену.
- Приготування експериментальних зразків колагенової матриці.
- Створення матеріалів з високою гемостатичною дією на основі колагенової матриці та адсорбованого активатора зсідання крові.
- Випробування отриманих гемостатичних зразків на моделях *in vivo* (паренхіматозна кровотеча).

Таким чином, об'єктом дослідження була колагенова матриця та створені на її основі гемостатичні губки. Метою дослідження було створення на основі колагену та активатора зсідання крові виробу медичного призначення з високими гемостатичними властивостями для використання у хірургічній та ветеринарній практиці.

Дослідження проводили з використанням біохімічних методів очистки та характеристики протеїнів, у тому числі екстракції, висолювання, електрофорезу, амінокислотного аналізу; визначали також фізичні характеристики колагенових матриць, зокрема ступінь поглинання рідину. Зразки колагенових матриць виготовляли за розробленою технологією з використанням ліофільної сушки. Визначали дію створених колагенових матриць на зсідання плазми крові та агрегацію тромбоцитів *in vitro*. Проводили хірургічні операції та випробування створених колагенових матриць за умов паренхіматозної кровотечі у кролів. У плазмі крові піддослідних тварин визначали вміст фібриногену, протромбіну, розчинного фібрину з використанням базових лабораторних методів.

Існує два основні типи біологічних матриць з підвищеними кровоспинними властивостями, які застосовуються у хірургічній практиці. Перша група здійснює локальний хімічний гемостаз. Медичні засоби другої групи виконують роль механічних чи фізичних агентів запуску агрегації тромбоцитів.

Мікрофібрилярний колаген запускає процес зсідання крові в момент першого контакту фібрил з тромбоцитами. На мембранах тромбоцитів знаходяться рецептори, які забезпечують адгезію до стінок судин, колагену та інших тромбоцитів. При агрегації тромбоцитів на фібрилах колагену відбувається їх дегрануляція, вивільняються тромбоксан, який у свою чергу сприяє формуванню фібриново-тромбоцитарного кров'яного згустку. Дослідження *in vitro* показали, що у цей час тромбоцити підлягають нормальним фізіологічним змінам [228].

Колаген, як гемостатичний агент, уперше було запропоновано у 1970-х рр. Було показано його ефективність для регулювання крововтрати на паренхіматозних тканинах. Вважається, що колаген здійснює гемостатичну дію завдяки здатності активувати тромбоцити [229]. Колагенові гемостатики володіють значною сорбційною здатністю та вбирають у себе кількість рідини, яка багатократно перевищує їхню власну масу. Однак при цьому вони практично не збільшуються в розмірах, що вигідно відрізняє їх від желатинових агентів. Вони дозволяють досягти зупинки кровотечі за 2-5 хв та можуть бути легко видалені з рани або ж підлягати біологічній деградації за умов операцій на внутрішніх органах. Термін повної резорбції колагенових матриць сягає 4 тижнів [230]. Гемостатики на основі колагену ефективні також і за умов гепаринізації [231].

Вважається, що колагенові матриці є гіпоалергенами, однак у багатьох випадках, а надто в разі повторного застосування, можуть викликати алергічні реакції. Цей факт, однак, пов'язаний радше з протеїновими домішками та свідчить про недостатню очистку використовуваних колагенових матриць. Здатність колагенових губок до біодеградації та заміщення аутологічними тканинами організму дозволяє розглядати його навіть як засіб для біоінженерії тканини [232].

Для застосування колагену в складі кровоспинних засобів його отримують зі шкіри та сухожиль тварин і використовують у формі розчину, порошку, волокнистої маси (повсть), колаген-фібринової пасти, губок. До них відносяться гемостатична абсорбуюча желатинова губка "Cutanplast" (РФ та Індія),

гемостатичні губки Hemostatic-Felt і Superstat (Польща), желатинова губка "Спонгостан" (Данія) і "Жельфоум" (США), «Губка колагенова кровозупинна» (РФ). Перший відомий гемостатичний препарат «Авіта» був отриманий в формі мікрокристалічного волокнистого порошку, нетканого матеріалу (Superstat), колагенової губки коластат (Collastat). Колагенова повсть колластіпт (Collastipt) і губка «Ліостіпт» (Liostipt) були створені в Німеччині з диспергованого колагену шкіри великої рогатої худоби. Гемостатична пов'язка «Тахотоп» (Tachotop), виготовлена зі шкіри коней, колагенова повсть (Vlies) – з дерми свиней, «Берістіпт» (Beristipt) – з колагену плаценти. В даний час найбільш відомим є ефективний гемостатичний засіб – «Тахокомб» (Nucomed, Австрія), створений на основі колагену і фібринового клею.

Однак, у випадку хірургічних втручань, пов'язаних із ризиком інтенсивних кровотеч, головним критерієм ефективності біологічних матриць є час зупинки кровотечі. Не зважаючи на те, що багато матеріалів природного походження, у тому числі і колаген, знайшли застосування у клінічній практиці саме як гемостатичні агенти, переважно вони діють надто повільно та неефективно. Тому тривають розробки, спрямовані на застосування одночасно з гемостатиками специфічних коагуляційних агентів. Застосування таких агентів дозволяє досягнути швидкої зупинки кровотечі та, як наслідок, зменшення негативного ефекту крововтрати та ексудацією з рани.

Зокрема, було запропоновано модифікацію колагенових та хітозан-вмісних губок тромбіноподібним ензимом батроксобіном для підвищення їхніх прокоагулянтних властивостей [233].

Раніше батроксобін було також запропоновано для модифікації гідрогелів, що дозволило забезпечити швидку та ефективну зупинку паренхіматозної кровотечі. Головною його перевагою порівняно з іншими гемостатиками була здатність діяти навіть за присутності антикоагулянтного агенту – гепарину. До недоліків слід віднести слабку опірність гідрогелю механічній дії потоку крові та натягу тканини, що вимагає використання додаткових засобів для фіксації рани при його застосуванні.

Триває пошук адекватних протеїнових полімерних носіїв для застосування у складі гемостатичних агентів [234]. Однак колаген і досі вважаються найефективнішими і найпростішими у використанні.

Таким чином, незважаючи на значний прогрес у вирішенні проблеми контролювання масивної кровотечі, якого вдалося досягнути завдяки появі нового покоління сучасних гемостатиків, розробка нових, безпечних, здатних до біодеградації матриць, які б володіли вираженими кровозупинними властивостями, залишається нагальним питанням біотехнології та медичної біохімії.

8.2. ХАРАКТЕРИСТИКА ЗРАЗКІВ КОЛАГЕНУ

8.2.1. Амінокислотний склад

Широкому медичному і біотехнологічному застосуванню колагену сприяють його унікальний і майже однаковий для всіх організмів амінокислотний склад та неімуногенність [235]. При підшкірному введенні колаген практично не викликає імунної відповіді [236], однак наявність домішок неколагенових протеїнів може провокувати імуногенність препаратів [237].

Для технологічних і медичних цілей колаген одержують, зазвичай, зі шкіри або сухожилів тварин. Найбільш поширеними є три засоби екстракції – кислотна (після попереднього видалення домішок), ензиматична та лужно-сольова.

Кислотна екстракція зберігає нативність молекул (триспиральну структуру з неущкодженими телопептидами), що формують міцні гелі високої щільності.

Ензиматичну екстракцію проводять за присутності протеїназ – пепсину, трипсину, пронази, дія яких руйнує не потрібну спіраль, а лише неколагенові домени і протеїни. Така екстракція дає можливість зберегти нативність молекули колагену, але при цьому втрачаються телопептиди (неспіралізовані N- та C-кінцеві ділянки), що призводить до утворення гелей низької щільності.

Лужно-сольова екстракція – обробка колагену лугами за присутності насиченого розчину сірчаноокислого натрію з подальшою екстракцією кислотою.

Метод забезпечує високий вихід розчинного колагену, але з дезамідуванням аспарагінових та глутамінових залишків до відповідних кислот, внаслідок чого розподіл зарядів вздовж поліпептидного ланцюга порушується, і колаген втрачає здатність до утворення гелю.

На початковому етапі роботи необхідно було визначити характеристики зразків колагену, наданих співвиконавцями проекту (ТОВ «Дарен-інвест»). Визначали склад, ступінь очистки та цілісності молекул колагену. Вміст колагену оцінювали за відсотковим вмістом у складі протеїнового препарату проліну та оксіпроліну (О-Про), який є маркером колагенової спіралі та складає 20 % від загальної кількості амінокислотних залишків [238]. Оцінювали кількість залишків проліну на один поліпептидний ланцюг молекули (за 100 % приймають 118 залишків проліну на 1000 амінокислотних залишків). У випадку оцінки відносно оксіпроліну, за 100% приймають 92 його залишки на 1000 амінокислотних залишків.

Таблиця 8.1.

Визначення амінокислотного складу колагену (зразки I, II і III)

	стандарт	Зразки колагену					Кислотна екстракція						
		I	II	III	III	III	Оцтова кислота		Мурашина кислота		цитрат Na		
Лізин	2,60	3,3	3,35	3,5	3,24	3,29	3,49	3,37	3,61	3,41	3,59	3,63	
Гістидин	0,42	0,5	0,73	0,66	0,70	0,66	0,66	0,48	0,58	0,62	0,80	0,73	
Аргінін	4,45	5,52	5,40	5,24	5,16	5,38	5,43	5,43	5,54	5,82	6,23	6,15	
Аспарагінова кислота	4,90	5,72	5,87	5,52	5,09	5,45	6,10	5,90	5,72	6,13	5,78	6,05	
Треонін	1,87	1,77	1,84	1,97	2,05	2,23	1,62	1,80	2,06	1,86	1,64	1,48	
Серин	3,87	2,38	3,72	3,21	3,89	4,07	3,24	3,28	2,91	3,30	1,97	2,05	
Глутамінова кислота	7,19	9,3	8,98	8,64	8,68	5,71	9,19	8,87	8,67	8,98	9,19	9,45	
Пролін	11,82	13,26	12,42	13,37	11,65	12,32	8,86	8,83	12,06	10,64	12,93	12,75	
Гліцин	33,50	25,06	29,31	28,5	27,13	29,69	33,85	34,92	29,82	31,73	28,94	29,94	
Аланін	10,93	14,26	11,66	11,71	11,29	11,57	11,73	11,52	12,63	11,55	12,55	12,79	
Валін	2,02	2,46	2,56	2,40	2,37	2,54	2,26	2,12	2,77	2,28	2,34	2,40	
Метіонин	0,61	0,65	0,44	0,48	1,08	0,60	0,44	0,16	0,68	0,42	0,74	0,49	
Ізолейцин	1,36	1,57	1,65	1,86	1,50	1,43	1,74	1,73	1,74	1,49	1,72	1,80	

Лейцин	2,66	3,06	3,86	3,16	3,07	3,16	3,42	3,18	3,42	3,23	3,39	3,35
Тирозин	0,52	0,30	0,48	0,34	0,63	0,50	0,48	0,70	0,42	0,81	0,44	0,38
Фенілаланін	1,31	1,71	1,56	1,64	1,68	1,69	1,42	1,59	1,8	1,54	1,57	1,55
Гідроксипролін	9,21	8,25	3,78	5,80	9,50	7,91	4,56	4,26	3,90	4,77	3,83	3,21
Гідроксилізін	0,76	0,6	0,62	0,61	0,70	0,87	0,62	0,55	0,68	0,59	0,60	0,54
Цистеїн	нема	0,31	1,76	1,39	0,59	0,94	0,89	1,30	0,98	0,84	1,74	1,26
Триптофан	нема	нема	нема	нема	нема	нема	нема	нема	нема	нема	нема	нема
ВСЬОГО %	100	99,98	99,99	100	97,63	100	100	99,99	99,99	100	99,99	100
% чистоти відносно гліцину	100	74,8	87,5	85,0	80,98	88,62	101,0	104,2	89,0	94,7	86,4	89,4

Таблиця 8.2.

Амінокислотний склад поліпептидного α -1 ланцюга молекули колагену (зразки I II та III)

	стандарт	Зразки колагену					Кислотна екстракція					
		I	II	III	III	III	Оцтова кислота		Мурашина кислота		цитрат Na	
Лізин	26,0	33,0	33,5	35,0	32,4	32,9	34,9	33,7	36,1	34,1	35,9	36,3
Гістидин	4,2	5,0	7,3	6,6	7,0	6,6	6,6	4,8	5,8	6,2	8,00	7,3
Аргінін	44,5	55,2	54,0	52,4	51,6	53,8	54,3	54,3	55,4	58,2	62,3	61,5

Аспарагінова кислота	49,0	57,2	58,7	55,2	50,9	54,5	61,0	59,0	57,2	61,3	57,8	60,5
Треонін	18,7	17,7	18,4	19,7	20,5	22,3	16,2	18,0	20,6	18,6	16,4	14,8
Серин	38,7	23,8	37,2	32,1	38,9	40,7	32,4	32,8	29,1	33,0	19,7	20,5
Глутамінова кислота	71,9	93,0	89,8	86,4	86,8	57,1	91,9	88,7	86,7	89,8	91,9	94,5
Пролін	118,2	132,6	124,2	133,7	116,5	123,2	88,6	88,3	120,6	106,4	129,3	127,5
Гліцин	335,0	250,6	293,1	285,0	271,3	296,9	338,5	349,2	298,2	317,3	289,4	299,4
Аланін	109,3	142,6	116,6	117,1	112,9	115,7	117,3	115,2	126,3	115,5	125,5	127,9
Валін	20, 2	24, 6	25,6	24,0	23,7	25,4	22,6	21,2	27,7	22,8	23,4	24,0
Метіонін	6,1	6,5	4,4	4,8	10,8	6,0	4,4	1,6	6,8	4,2	7,4	4,9
Ізолейцин	13,6	15,7	16,5	18,6	15,0	14,3	17,4	17,3	17,4	14,9	17,2	18,0
Лейцин	26,6	30,6	38,6	31,6	30,7	31,6	34,2	31,8	34,2	32,3	33,9	33,5
Тирозин	5,2	3,0	4,8	3,4	6,3	5,0	4,8	7,0	4,2	8,1	4,4	3,8
Фенілаланін	13,1	17,1	15,6	16,4	16,8	16,9	14,2	15,9	18,0	15,4	15,7	15,5
Гідроксипролін	92,1	82,5	37,8	58,0	95,0	79,1	45,6	42,6	39,0	47,7	38,3	32,1
Гідроксилізін	7,6	6,0	6,2	6,1	7,0	8,7	6,2	5,5	6,8	5,9	6,0	5,4
Цистеїн	відсутній	3,1	17,6	13,9	5,9	9,4	8,9	13,0	9,8	8,4	17,4	12,6
Триптофан	Н.в.	Н.в.	Н.в.	Н.в.	Н.в.	Н.в.	Н.в.	Н.в.	Н.в.	Н.в.	Н.в.	Н.в.
ВСЬОГО %	1000	999,8	999,9	1000	976,3	1000	1000	999,9	999,9	1000	999,9	1000
% чистоти відносно гліцину	100	74,8	87,5	85,0	80,98	88,62	101,0	104,2	89,0	94,7	86,4	89,4

Метод визначення вмісту колагену за оксіпроліном є досить точним, оскільки на результати аналізу не впливає триптофан, який за присутності соляної кислоти руйнується. Між тим, занижені відносно стандарту дані по О-Про можуть свідчити про присутність у матеріалі домішок неколагенової природи.

Амінокислотний склад колагену визначали на аналізаторі ААА-339 після гідролізу зразків в 6 N HCl при 120 °C протягом 24 год. Визначений амінокислотний склад колагену порівнювали з даними літератури, що відтворюють кількість кожної з амінокислот поліпептидного ланцюга молекули (таблиці 8.1 і 8.2).

При визначенні чистоти зразків колагену за гліцином, за 100 % вважали 335 його залишків в поліпептидному ланцюзі довжиною в 1000 залишків. Отримані дані свідчать, що найбільший відсоток домішок містив зразок I (вміст гліцину складає 250 залишків замість 335 за стандартом). У зв'язку з цим було перевірено можливість додаткової очистки зразків колагену кислотною екстракцією. Показано, що найбільш ефективною для підвищення ступеню чистоти препарату колагену була екстракція оцтовою кислотою (таблиці 8.1 і 8.2).

Цілісність молекули протеїну, субодиничний склад та ступінь деградації оцінювали електрофоретично.

Таким чином, визначено, що вміст колагену у зразках, наданих співвиконавцями проекту ТОВ «Дарен-інвест», складає 75-88%. Молекула колагену є частково деградованою, однак це не впливає на властивості протеїну. З огляду на визначені характеристики колагену для виконання роботи використовували зразок колагену 86-88% чистоти (зразок III, рис. 8.2).

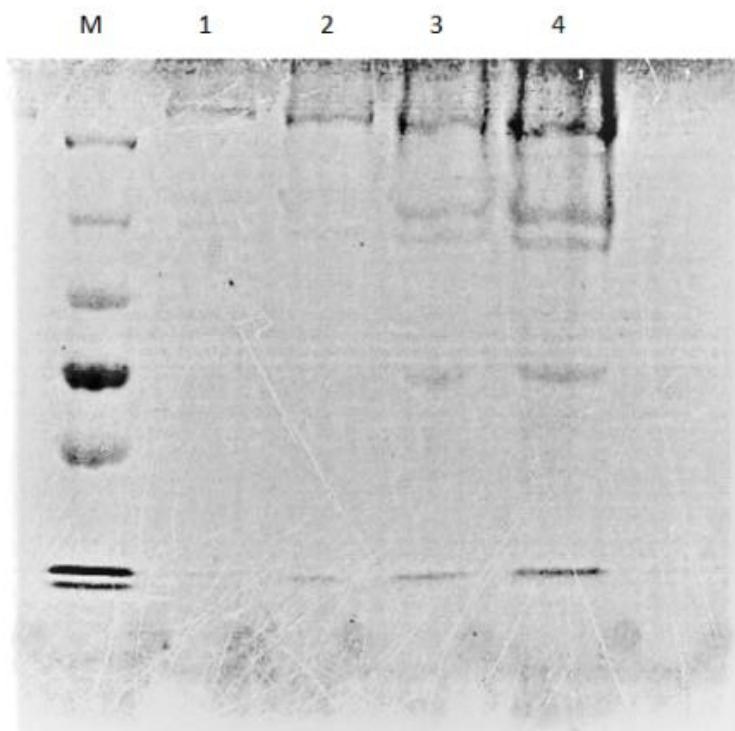


Рис. 8.2. Електрофореграма зразків колагену, який було використано для створення лабораторного зразка колагенової матриці (зразок III). 1-4 нанесення у діапазоні концентрацій від 2 до 12 мкг на лунку. М – маркери молекулярної маси. М – 250, 130, 100, 72, 55 кДа.

8.2.2. Розщеплення колагену ензимами: хімотрипсином, трипсином та плазміном.

Нативний колаген стійкий до дії протеолітичних ензимів. Єдиним ензимом, який активно впливає на цей протеїн, є колагеназа. Однак, вважається, що деякі протеолітичні ензими в тій чи іншій мірі гідролізують колаген. Для використання колагенової губки в хірургічній практиці як гемостатичного засобу необхідно було визначити чутливість колагену до дії фізіологічних протеолітичних ензимів та можливість його біодеградації цими ензимами у віддалені строки після хірургічного втручання.

Для визначення дії ензимів на препарат колагену, який розглядається як основа гемостатичної губки, були використані серинові протеїнази – хімотрипсин, трипсин та плазмін. Розроблено наступну модельну систему: 15 мг колагену перенесено в 3 мл 0,025 М трис-НСl буфер рН 7,5, що містив 0,13

М NaCl, 2 мМ CaCl₂ та ензим. Співвідношення ензим:колаген=1:100. Для активації плазміногену використовували стрептокіназу. Інкубацію колагену з ензимом проводили протягом 1,5 години та 3,5 години. Ступінь розщеплення колагену ензимами перевірили електрофоретично (рис. 8.3).

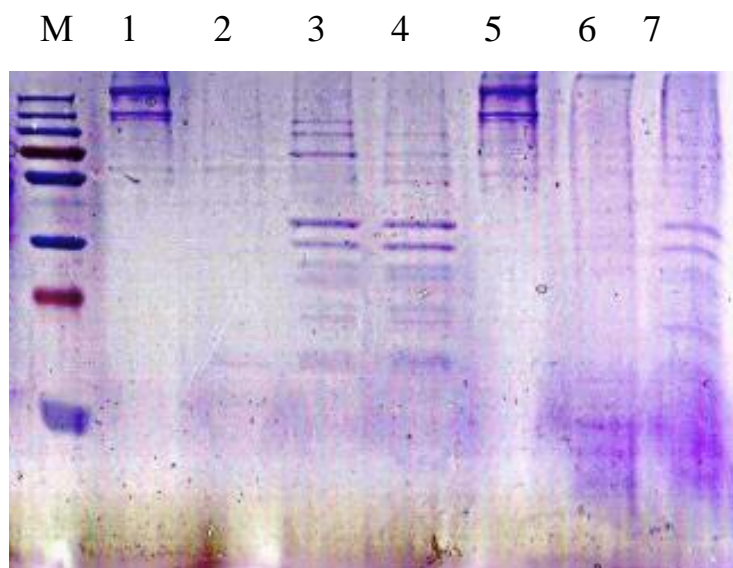


Рис. 8.3. Електрофореграма гідролізатів колагену. М – маркери; 1 – контроль; 2 – гідроліз трипсином (1,5 години); 3 – гідроліз хімотрипсином (1,5 годин); 4 – гідроліз хімотрипсином (3,5 години); 5 – гідроліз плазміном; 6 – осад, який утворився у гідролізаті з трипсином; 7 – осад, який утворився у гідролізаті з хімотрипсином. М – 250, 130, 100, 70, 55, 35, 25, 15, 10 кДа.

Отримані результати свідчать, що тільки трипсин ефективно розщеплює колаген до низькомолекулярних похідних. Хімотрипсин в деякій мірі гідролізує колаген, однак дія його не є критичною при застосуванні губки. Плазмін не гідролізує колаген. Тому при застосуванні колагенової губки, можливо, потрібні інгібітори трипсину.

8.3. СТВОРЕННЯ ТА ВИПРОБУВАННЯ ЛАБОРАТОРНИХ ЗРАЗКІВ КОЛАГЕНОВОЇ МАТРИЦІ *IN VITRO*

8.3.1. Спосіб виробництва колагенової матриці

Терапевтична ефективність губок на основі колагену визначається як дією лікарських препаратів, що входять до їх складу, так і дією колагену, який є

активним учасником процесів тканинної репарації за рахунок посилення синтезу власного колагену і стимуляції гемостазу. Колаген, який складає основу таких лікарських виробів, характеризується здатністю до біодеградації, не є імуногенним та може виступати носієм для іммобілізації лікарських засобів у площині рани.

Технологія створення гемостатичної колагенової губки ґрунтується на методі сублимаційної (ліофільної) сушки тонкого шару колагену. В процесі ліофілізації кристалів замороженої води в глибокому вакуумі можна отримати губку, яка має велику кількість пор.

Для цього промислово вироблений препарат колагену прогрівали до +40 °С на водяній бані протягом 20 хв при постійному перемішуванні. Таким чином, робили розведення отриманого колагену в 0,7 раз фізіологічним розчином для досягнення оптимальної плинності, необхідної для утворення рівномірного шару. Розчин колагену наносили на рівну поверхню з розрахунку 0,1 г/см².

Підготовані таким чином зразки заморожували при температурі -20°C від 2 до 12 годин. Ліофілізацію проводили під вакуумом з використанням ліофільної сушки LyoQuest (Іспанія) протягом 6-8 годин. Висушені зразки колагенової матриці легко відділялися від поверхні та зберігалися у герметичних пакетах при кімнатній температурі.

Отримані колагенові губки не розчиняються у спирті та воді, вони здатні поглинати 6,0-8,0 г фізіологічного розчину на 1г ліофілізованого препарату колагену.

Гемостатична активність колагенової губки пояснюється тим, що велика кількість пор дає можливість швидко поглинати кров з одночасною адгезією та агрегацією тромбоцитів з наступним процесом зсідання крові.

Всі зазначені гемостатичні засоби на основі колагену проявляють високу кровоспинну активність за рахунок природи і пористої структури колагену. Однак, місцева гемостатична активність матеріалів на основі диспергованого або розчиненого колагену є недостатньою для зупинки капілярних кровотеч з

паренхіматозних органів. Для підвищення адгезії і прискорення тромбоутворення до складу колагену додатково вводять речовини, що впливають на окремі стадії зсідання крові: солі кальцію, тромбін, фібриноген, епсилон-амінокапронову кислоту, гідроксиапатит та ін.

Для отримання колагенової матриці з посиленими гемостатичними властивостями на етапі приготування розчину колагену до нього вносили ензимний активатор зсідання крові. Наступні процедури проводили аналогічно до тих, які описано вище. В наступних експериментах досліджено вплив колагенової матриці на процес активації та агрегації тромбоцитів.

8.3.2. Визначення дії дослідних зразків колагенової матриці на тромбоцити людини у збагаченій тромбоцитами плазмі крові

Тромбоцити — це найменші з трьох основних типів кров'яних клітин. Їх діаметр становить лише 20% від діаметру червоних кров'яних клітин, найбільш численних клітин крові. Тромбоцити беруть активну участь в процесі зсідання крові, а також містять біологічно активні сполуки, які можуть вивільнятися при активації тромбоцитів.

За фізіологічних умов тромбоцити не агрегують між собою і не прикріплюються до судинних стінок. При ушкодженні ендотелію або при генерації тромбіну тромбоцити скупчуються і утворюють пухкий тромбоцитарний корок, проникний для плазми крові. Це так звана зворотня (первинна) фаза агрегації тромбоцитів.

Слідом за нею настає вторинна агрегація тромбоцитів, яка має незворотній характер і яка відбувається завдяки активації тромбоцитарних рецепторів GPIIb/IIIa та їхній кластеризації. Численні взаємодії кластерів GPIIb/IIIa-рецепторів з фібриногеном та утвореним під час активації зсідання крові полімерним фібрином призводять до утворення фібриново-тромбоцитарного тромбу, непроникного для плазми крові [239]. Таким чином відбувається припинення кровотечі, ізоляція ушкоджень ендотелію або ж патологічне внутрішньосудинне тромбоутворення [240].

До початкового контакту тромбоцитів з пошкодженою стінкою судини (адгезія) залучено багато адгезивних субстратів (фактор фон Вілебранда, колаген) і тромбоцитарних рецепторів (GPIb-V-IX, GPIIb/IIIa або α IIb β 3, α 2 β 1). Взаємодія між зв'язаним з матриксом фактором фон Вілебранда і GPIb α , в першу чергу, слугує для скупчення тромбоцитів на площі пошкодження.

Під час першої фази агрегації тромбоцити активуються колагеном міжклітинного матриксу і першими порціями тромбіну, що утворюється в місцях пошкодження стінки судини. Продукти цих реакцій активують протеїнкіназу C, а також підвищують концентрацію кальцію в цитозолі тромбоцитів. Окрім тромбіну та колагену активацію тромбоцитів викликають фактор агрегації тромбоцитів (PAF), ADP, що виділяються з клітини при їх пошкодженні, а також катехоламіни, серотонін та ін. Всі ці агенти мають специфічні рецептори на тромбоцитарній плазматичній мембрані [241].

Рецептори колагену α 2 β 1 і GPVI беруть участь в адгезії і, зв'язуючись з колагеном, викликають активацію тромбоцитів, внаслідок чого з щільних гранул вивільнюється ADP, а з α -гранул – фібриноген, фактор V і P-селектин. Компоненти гранул стимулюють коагуляційну відповідь в результаті експонування на поверхні тромбоцитів P-селектину. Вивільнюються також компоненти щільних гранул, що підтримують подальшу активацію тромбоцитів і сприяють їх залученню до місця пошкодженої судини. Тромбоцити, що взаємодіють з цими посередниками, підлягають реорганізації актинового цитоскелета, внаслідок чого змінюють форму. З'являються псевдоподії, які формують комірчасту сітку тромбоцитів в тромбоцитарному короку [242].

Таким чином, активація тромбоцитів є продуктом багатьох сигналів, що надходять від різних рецепторів, кожний з яких вносить вклад в формування тромбоцитарного тромба. Одне з провідних місць у цьому процесі займає колаген, взаємодії з яким є пусковим механізмом активації тромбоцитів за умов ушкодження судини. Відтак не дивно, що губки, створені на основі колагену, за визначенням вважають гемостатичними. Передбачається, що колагенова матриця завдяки здатності активувати тромбоцити повинна мати не лише

механічний гемостатичний ефект, але і специфічно активувати зсідання крові шляхом активації тромбоцитів.

Для визначення здатності створених лабораторних зразків колагенових матриць ініціювати агрегацію тромбоцитів та коагуляцію збагаченої тромбоцитами плазми крові використовували метод агрегатометрії.

У кювету агрегометра вносили 250 мкл збагаченої тромбоцитами плазми крові людини з концентрацією клітин 300 тис в 1 мкл. Досліджуваний зразок збагаченої тромбоцитами плазми крові знаходився при постійному перемішуванні і за температури 37°C.

Через 2,5 хв у плазму крові вносили 0,025 М розчин CaCl₂. Кінцева концентрація CaCl₂ у кюветі таким чином складала 2·10⁻³ М. Через 2,5 хв після внесення CaCl₂ у кювету вносили ADP (кінцева концентрація – 2,5 μМ) та детектували агрегацію тромбоцитів протягом 5 хв (рис. 8.4).

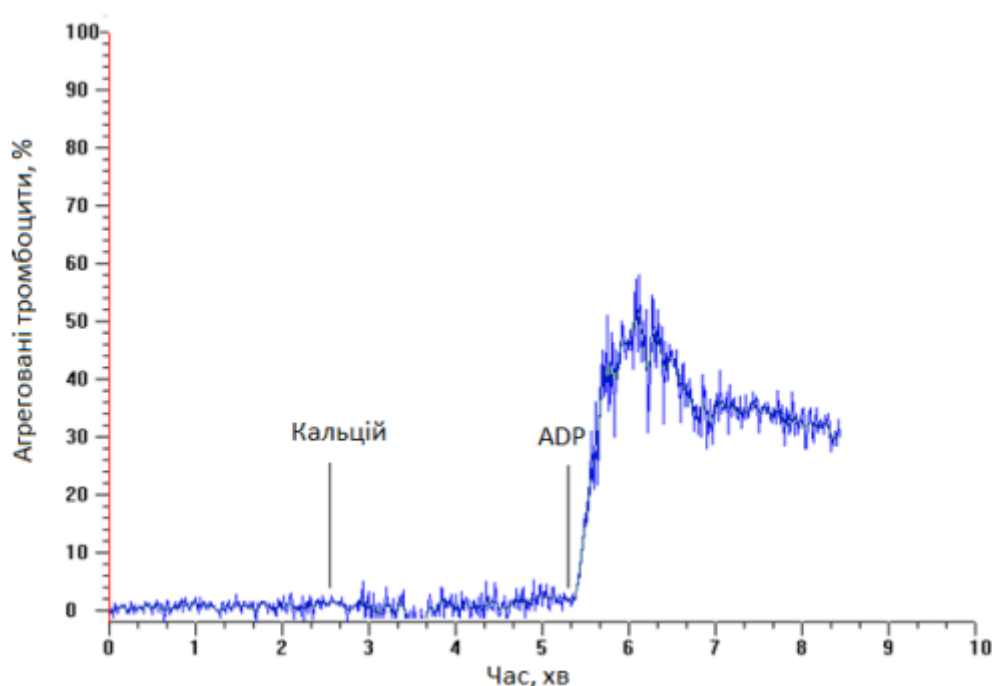


Рис. 8.4. Агрегація тромбоцитів людини у збагаченій тромбоцитами плазмі крові. 2,5 хв – внесення CaCl₂ (2·10⁻³ М), 5 хв – внесення ADP (2,5 μМ).

Як видно з рис. 8.4, рекальцифікації плазми крові за досліджуваної концентрації CaCl₂ протягом часу спостереження не було виявлено. ADP натомість викликав агрегацію тромбоцитів, яку фіксували за допомогою агрегометра.

Аналогічним чином вивчали ефект на збагачену тромбоцитами плазму крові досліджуваних зразків колагенової матриці. У плазму крові в точці початку вимірювання вносили 0,03 мг подрібненої колагенової матриці різного походження та складу:

- промислово виробленої та сертифікованої колагенової тканини, наданої співвиконавцем проекту ТОВ «Дарен-інвест» (рис. 8.5);
- дослідного зразка колагенової матриці, створеного у відділі структури та функцій білку (рис. 8.6);
- дослідного зразка колагенової матриці з підвищеними кровоспинними властивостями (рис. 8.7).

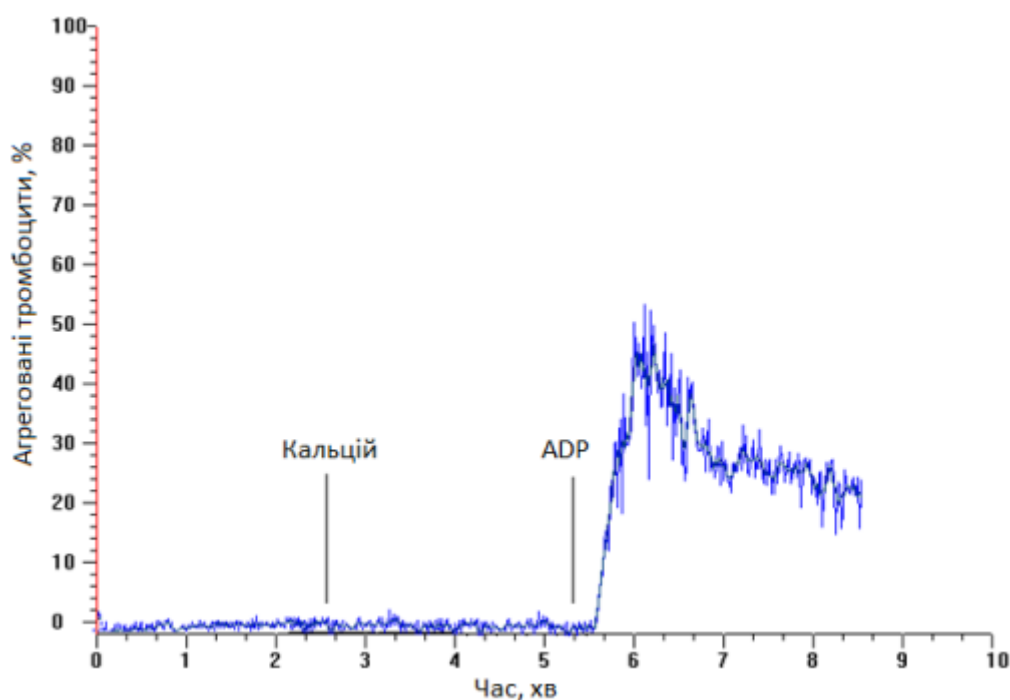


Рис. 8.5. Агрегація тромбоцитів людини у збагаченій тромбоцитами плазмі крові за присутності промислово виробленої та сертифікованої колагенової тканини, наданої співвиконавцем проекту ТОВ «Дарен-інвест». 2,5 хв – внесення CaCl_2 ($2 \cdot 10^{-3}$ М), 5 хв – внесення ADP ($2,5 \mu\text{M}$).

Як видно з рис. 8.5, комерційно доступний зразок колагенової тканини не ініціював агрегації тромбоцитів людини у збагаченій тромбоцитами плазмі крові навіть за присутності CaCl_2 ($2 \cdot 10^{-3}$ М). Досліджуваний препарат не змінював швидкість ADP-індукованої агрегації тромбоцитів, однак знижував ступінь агрегації тромбоцитів до 45 % (порівняно з 50 % у контролі). Останній

факт імовірно пов'язаний з механічними перешкодами, створеними часточками нерозчинного колагену, і не свідчить про жоден антиагрегантний ефект.

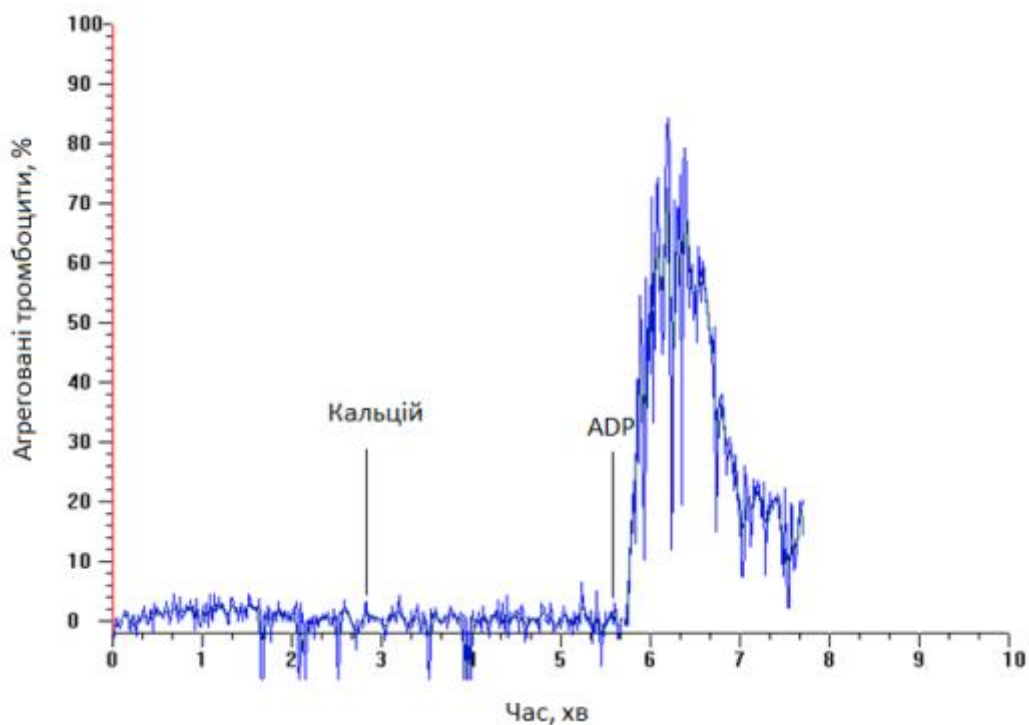


Рис. 8.6. Агрегація тромбоцитів людини у збагаченій тромбоцитами плазмі крові за присутності зразка колагенової матриці, виробленого у лабораторних умовах з промислово отриманої сировини. 2,5 хв – внесення CaCl_2 ($2 \cdot 10^{-3}$ М), 5 хв – внесення ADP ($2,5 \mu\text{M}$).

Зразок колагенової матриці, вироблений у лабораторних умовах з промислово отриманої сировини, так само не мав здатності викликати активацію тромбоцитів (рис. 8.6).

Можна відзначити лише вкрай незначну агрегацію тромбоцитів (до 3-4%), яку спостерігали у першу хвилину після внесення подрібнених часточок колагену в збагачену тромбоцитами плазму крові. Внесення CaCl_2 ($2 \cdot 10^{-3}$ М) не стимулювало агрегацію тромбоцитів, а ось агрегація тромбоцитів, індукована ADP, набувала інтенсивності: ступінь агрегації тромбоцитів за присутності часточок створеної колагенової матриці зростав до 60% (порівняно з контрольними 50 %).

Можна припустити, що такий ефект пов'язано з підвищеною сорбційною здатністю створеної матриці – в окремих випадках 1 г матриці сорбує до 4,5 г

водно-сольового розчину. Таким чином, колаген, який є основою матриці, експонує в розчин більше функціонально активних груп, здатних взаємодіяти з рецепторами тромбоцитів.

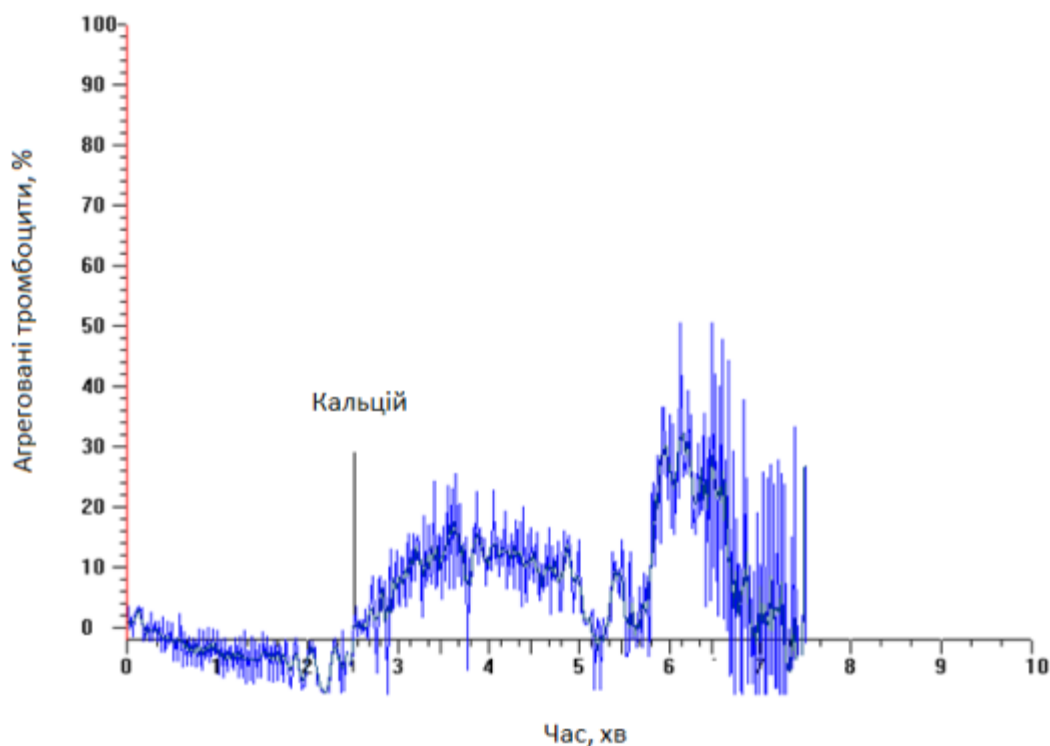


Рис. 8.7 Агрегація тромбоцитів людини у збагаченій тромбоцитами плазмі крові за присутності зразка колагенової матриці, виробленого у лабораторних умовах з промислово отриманої сировини та вдосконаленої ензимним активатором зсідання крові. 2,5 хв – внесення CaCl₂ ($2 \cdot 10^{-3}$ М), 5 хв – внесення ADP (2,5 μ М).

Внесення у збагачену тромбоцитами плазму крові лабораторного зразка колагенової матриці, вдосконаленої активатором зсідання крові, призвело до утворення поодиноких агрегатів тромбоцитів ще на етапі до внесення розчину CaCl₂. Внесення CaCl₂ ($2 \cdot 10^{-3}$ М) викликало негайну агрегацію тромбоцитів (рис. 8.7). Спостерігали дві хвили агрегації, що нагадують профіль агрегатограми, характерний для тромбін-індукованої активації тромбоцитів.

Після незначної дезагрегації тромбоцитів спостерігали значну інтенсифікацію процесу утворення агрегатів, яка завершилася формуванням фібрину та фібриново-тромбоцитарного згустку.

У випадку експерименту зі зразком колагенової матриці, виробленого у лабораторних умовах з промислово отриманої сировини та вдосконаленої ензимним активатором зсідання крові, ADP у пробу не вносили.

Картина, яку спостерігали, і яку продемонстровано на рис. 8.7, свідчить про те, що сорбований на поверхні колагенової матриці активатор зсідання крові призводив до активації протромбіну та генерації тромбіну. Оскільки використаний ензим є кальцій-залежною протеїназою, до внесення екзогенного кальцію та нівелювання дії цитрату натрію його ефект або не було виявлено, або він був недостатнім для ініціації повномасштабного процесу агрегації.

Утворений під дією активатора тромбін, у свою чергу, активував тромбоцити, а згодом – ініціював фібриноутворення. При цьому тромбоцити, які є найчутливішою ланкою системи гемостазу, реагували на появу навіть слідових початкових кількостей тромбіну майже миттєво. Друга хвиля агрегації тромбоцитів збігалася в часі з фібриноутворенням.

Таким чином, отримано підстави очікувати, що і агрегаційна дія на тромбоцити, і коагулююча дія на фібриноген в однаковій мірі забезпечуватимуть ефективну гемостатичну дію створеної колагенової матриці, вдосконаленої ензимним активатором зсідання крові.

8.4. ВИПРОБУВАННЯ ОТРИМАНИХ ЗРАЗКІВ КОЛАГЕНОВОЇ МАТРИЦІ НА МОДЕЛЯХ *IN VIVO*

8.4.1. Оцінка ефективності гемостатичних засобів на моделі паренхіматозної кровотечі, оцінка крововтрати при застосуванні різних зразків колагенової матриці.

Кровотеча під час оперативного втручання або безпосередньо після нього є одним з найбільш небезпечних ускладнень в хірургічній практиці, яке в короткі терміни може призвести до летального результату. Особливо гострою проблема гемостазу є у хірургії паренхіматозних органів внаслідок високої частоти ушкоджень і кількості оперативних втручань на них. В цілому, проблема зупинки паренхіматозних кровотеч містить багато невирішених питань, що спонукає до пошуку ефективних і мало травматичних способів досягнення гемостазу.

Гемостатичні засоби на основі колагену проявляють високу кровоспинну активність за рахунок хімічної природи і пористої структури колагену. Однак, місцева гемостатична дія матеріалів на основі диспергованого або розчиненого колагену є недостатньою для зупинки паренхіматозних кровотеч. Тому для підвищення адгезії і прискорення тромбоутворення до складу колагену вводять додатково речовини, що впливають на окремі стадії згортання крові: солі кальцію, тромбін, фібриноген, епсилон-амінокапронову кислоту, гідроксиапатит та ін.

Тестування будь-якого гемостатичного засобу, призначеного для зупинки кровотечі, передбачає випробування на стандартизованих тваринних моделях. Гемостатичну активність отриманих гемостатиків на основі колагену вивчили в експериментах на кролях масою $2,5 \pm 0,5$ кг. За ацепромазин-тіопенталової загальної анестезії виконували серединну лапаротомію, використовуючи поздовжній розріз по білій лінії живота. В рану виводили поверхню середньої долі печінки і, за допомогою стерильного марлевого шаблону наносили тангенціально поверхневу рану печінки площею $1,0 \text{ см}^2$ і глибиною 0,2 см.

Зупинку капілярно-паренхіматозної кровотечі виконували шляхом закриття всієї площі рани гемостатиком.



Рис. 8.8. Просочування колагенової матриці, вдосконаленої активатором зсідання крові, під час операції. Відмічено швидку зупинку кровотечі та відсутність помітного просочування.



Рис. 8.9. Просочування лабораторного зразку колагенової матриці, під час операції. Відмічено високу сорбційну здатність і ефективне поглинання крові.



Рис. 8.10. Просочування комерційно доступного колагену, наданого співвиконавцями проекту ТОВ «Дарен-інвест», під час операції. Відмічено високу сорбційну здатність і ефективне поглинання крові.

Операції проводили у трьох групах кролів: в першій групі в якості гемостатика використовували колаген, модифікований активатором зсідання крові (рис. 8.8); в другій групі – лабораторний зразок колагенової матриці (Рис. 8.9); в третій групі – комерційно доступний колаген, наданий співвиконавцями проекту ТОВ «Дарен-інвест» (рис. 8.10).

В момент накладання колагенової матриці відзначали швидку зупинку кровотечі при застосуванні колагенової матриці, вдосконаленої активатором зсідання крові (рис. 8.8). Комерційно доступний зразок колагенової матриці просочувався ефективно та швидко, ефективної зупинки кровотечі не спостерігали (рис. 8.10). Схожу картину спостерігали і при застосуванні створеного зразка колагенової матриці. Можна відзначити його більшу сорбційну ємність, порівняно з комерційно доступним зразком, що було також підтверджено у прямих експериментах.

Для кількісної оцінки кровоспинної дії колагенової матриці визначали об'єм крововтрати гравіметричним методом та час зупинки кровотечі хронометрично (рис. 8.11). Після хірургічного втручання у тварин контрольної групи при застосуванні комерційного препарату колагенової матриці спостерігали наступне: крововтрата складала у середньому, 0,85 г, час зупинки кровотечі – 1,6 хв, час просочування – 1,2 хв (рис. 8.11).

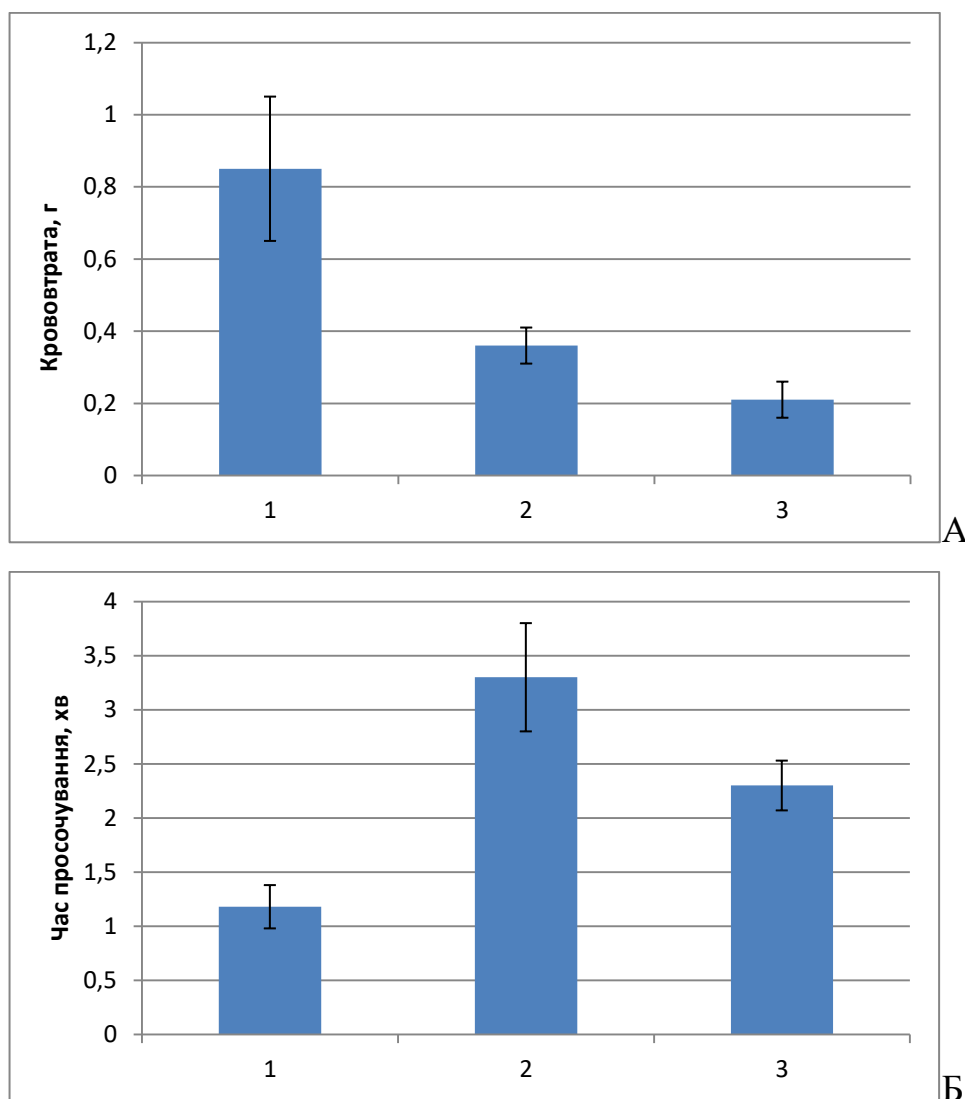


Рис. 8.11. Крововтрата у кролів при моделюванні паренхіматозної кровотечі (А) та час просочування колагенової матриці під час операції (Б).

1 – лабораторний зразок колагенової матриці; 2 – лабораторний зразок колагенової матриці, удосконалений активатором зсідання крові; 3 – комерційно доступний зразок колагенової матриці.

* – результати достовірні для $p \leq 0,05$.

При застосуванні лабораторного зразка колагенової матриці, втрата крові складала у середньому 0,36 г, час зупинки кровотечі – 2,0 хв, час просочування – 3,3 хв; в групі із застосуванням колагенової матриці, модифікованої активатором зсідання крові, крововтрата складала 0,21 г, час зупинки кровотечі – 1,1 хв, час просочування – 2,3 хв (рис. 8.11).

Таким чином, експериментальні дані, представлені на рис. 3.8, свідчать про ефективну зупинку кровотечі колагеном за присутності активатора. Значно більша крововтрата спостерігалася при застосуванні комерційно доступного гемостатика. Час просочування у дослідних зразках колагену подовжено за рахунок меншої крововтрати.

8.4.2. Макроморфологічна характеристика загоєння ран печінки при застосуванні отриманих зразків колагенової матриці

Оцінювали ефективність загоєння рани та можливі наслідки застосування колагенових матриць через 14 діб після експерименту макроморфологічно (рис. 8.12).

Було показано, що як при застосуванні створеної матриці, так і при використанні комерційно доступних зразків, у деяких випадках відмічено процес утворення спайок. Морфологію печінки та поверхні загоєних ран продемонстровано на рис. 8.12-8.14.



Рис. 8.12. Лапароскопічна картина печінки кроля через 14 діб після операції із застосуванням колагенової матриці, вдосконаленої активатором зсідання крові. Відмічено спайкоутворення. Запальний процес та набряк відсутні.



Рис. 8.13. Лапароскопічна картина печінки кроля через 14 діб після операції із застосуванням створеного зразка колагенової матриці без за відсутності активатора зсідання крові. Спайкоутворення не відмічено. Запальний процес та набряк відсутні.

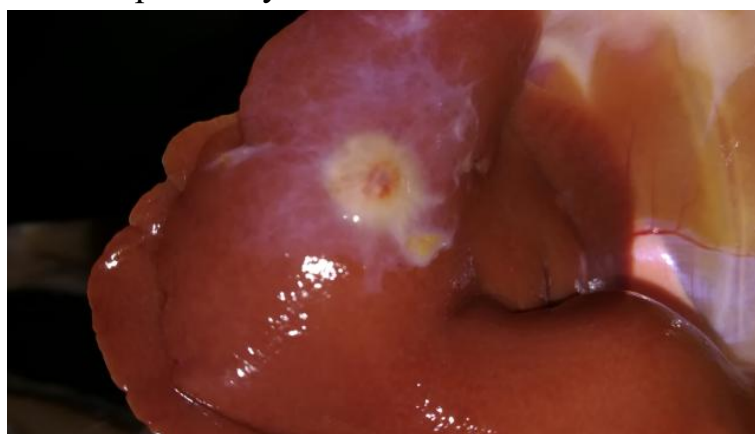


Рис. 8.14. Лапароскопічна картина печінки кроля через 14 діб після операції із застосуванням комерційного зразка колагенової матриці. Спайкоутворення не відмічено. Запальний процес та набряк відсутні.

При застосуванні створеного лабораторного зразка колагенової матриці на 14 добу після операції спостерігали ефективно загоєння рани, відсутність набряків чи запалення. У окремих випадках спостерігали утворення тяжових вісцero-вісцeralьних спайок (рис. 8.12). Там, де спайки були відсутні, спостерігали чітко окреслену загоєну ранову поверхню. При застосуванні створеної колагенової матриці без модифікації активатором у жодному випадку не спостерігали спайкоутворення (рис. 8.13).

Застосування комерційно доступної колагенової матриці у частині випадків призводило до появи вісцero-паріетальних спайок (рис. 8.14).

8.4.3. Гістологічний аналіз зразків уражених тканин печінки

Через 14 діб після оперативного втручання проводили евтаназію тварин подвійною дозою тіопенату та готували гістологічні зразки поверхні загоєної колагеном рани. Зрізи фіксованих парафіном тканин виготовляли на ротаційному мікроскопі, товщина зрізу 5 μM . Зріз робили перпендикулярно рановій поверхні, таким чином на зрізі було представлено край поверхні рани, загоєної з використанням препаратів колагену. Профарбовували зрізи гематоксиліном та еозином за стандартною методикою та досліджували з використанням оптичного мікроскопа при збільшенні $\times 150$ та $\times 300$.

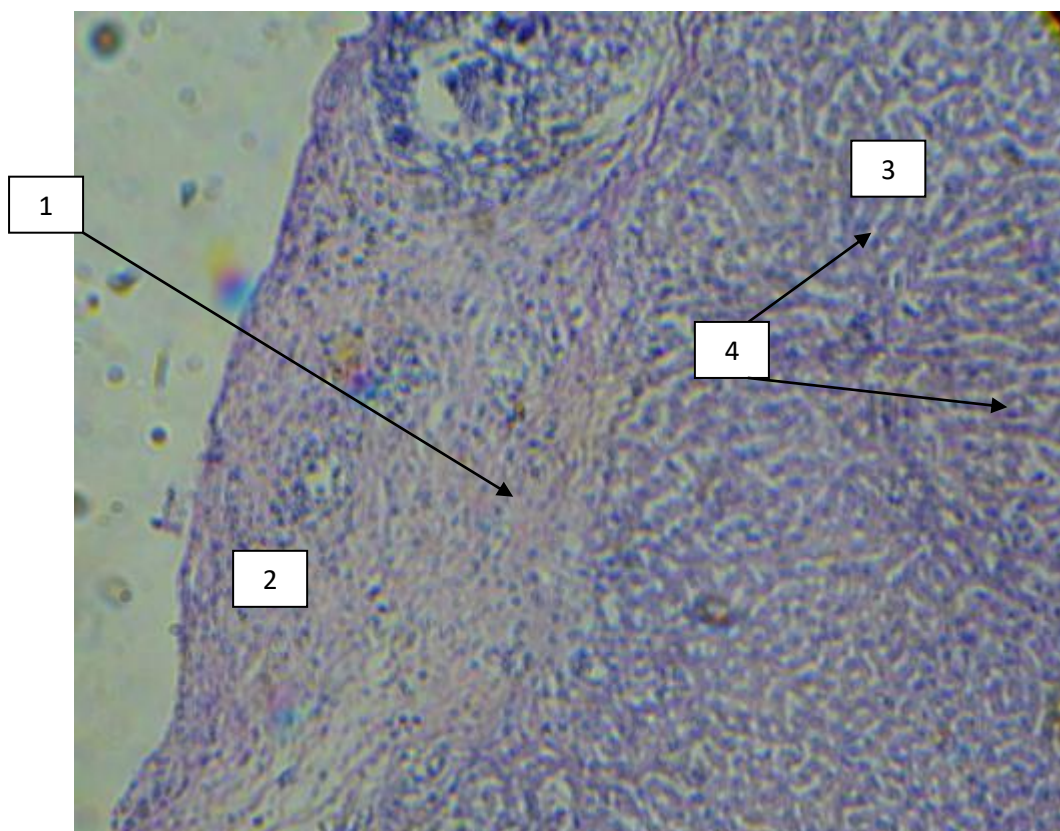


Рис. 8.15. Репарація печінки на 14 добу після застосування колагенової матриці, модифікованої активатором зсідання крові. Фарбування гематоксиліном-еозином. Збільшення 1:150. 1 – межа між печінковою тканиною та регенератом; 2 – тканина, що формується на місці колагенової матриці; 3 – тканина печінки; 4 – синусоїди печінки.

Порівнювали ефективність відновлення ушкодженої тканини печінки, яке спостерігали при застосуванні комерційно доступного зразка колагенової тканини, створеного лабораторного зразка колагенової матриці та колагенової матриці, модифікованої активатором зсідання крові.

Було виявлено, що колагенова матриця, модифікована активатором зсідання крові, на 14 добу після операції ідентифікується як окрема гістологічна одиниця (рис. 8.15). Чітко помітно межу між печінковою тканиною, та регенератом. Однак, спостерігається також і проникнення ретикулярних та ендотеліальних клітин у об'єм рани, загоєної колагеновою матрицею, та формування синусоїди печінки, що особливо помітно на рис. 8.16.

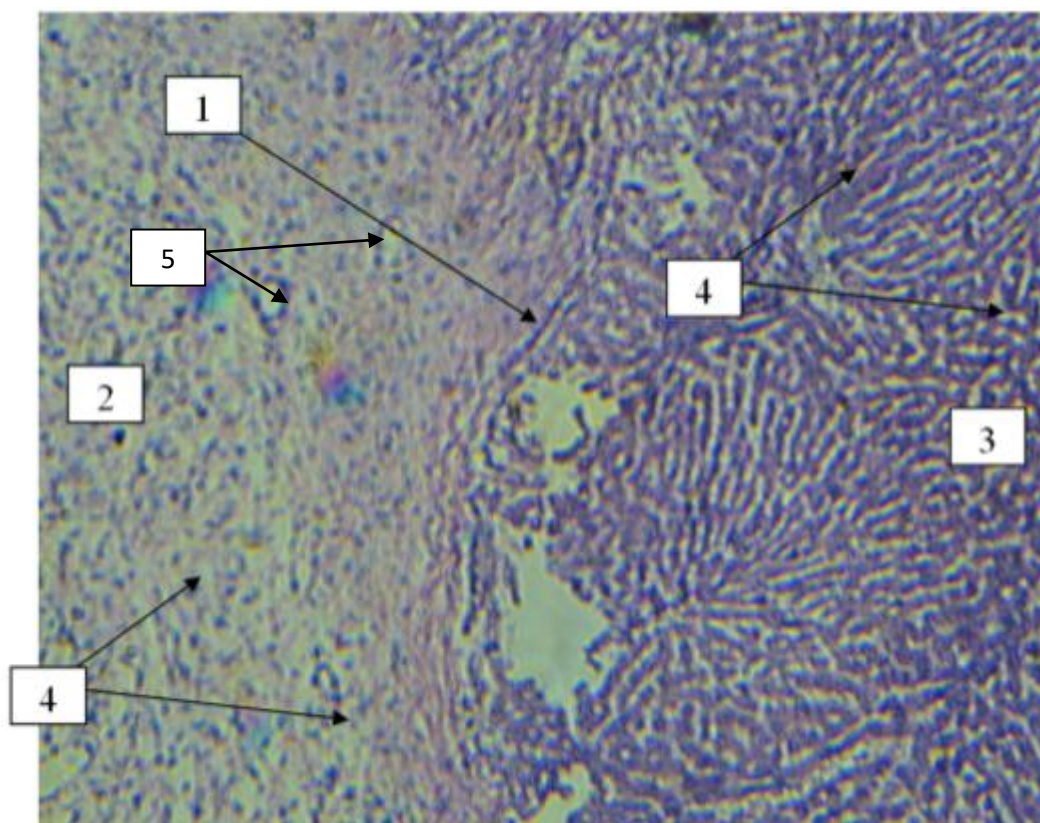


Рис. 8.16. Репарація печінки на 14 добу після застосування колагенової матриці, модифікованої активатором зсідання крові. Фарбування гематоксиліном-еозином. Збільшення 1:300. 1 – межа між печінковою тканиною та регенератом; 2 – тканина, що формується на місці колагенової матриці; 3 – тканина печінки; 4 – синусоїди печінки, 5 – кровоносні судини.

У випадку застосування немодифікованої колагенової матриці, спостерігали схожу картину (рис. 8.17). Новоутворена тканина відрізнялася від

печінкової морфологічно, однак було чітко помітно зростаючий градієнт кількості клітин від краю рани до неушкодженої тканини печінки. У заміщеній за допомогою колагену тканині ідентифікували вистелені ендотелієм округлі кровоносні судини (рис. 8.17).

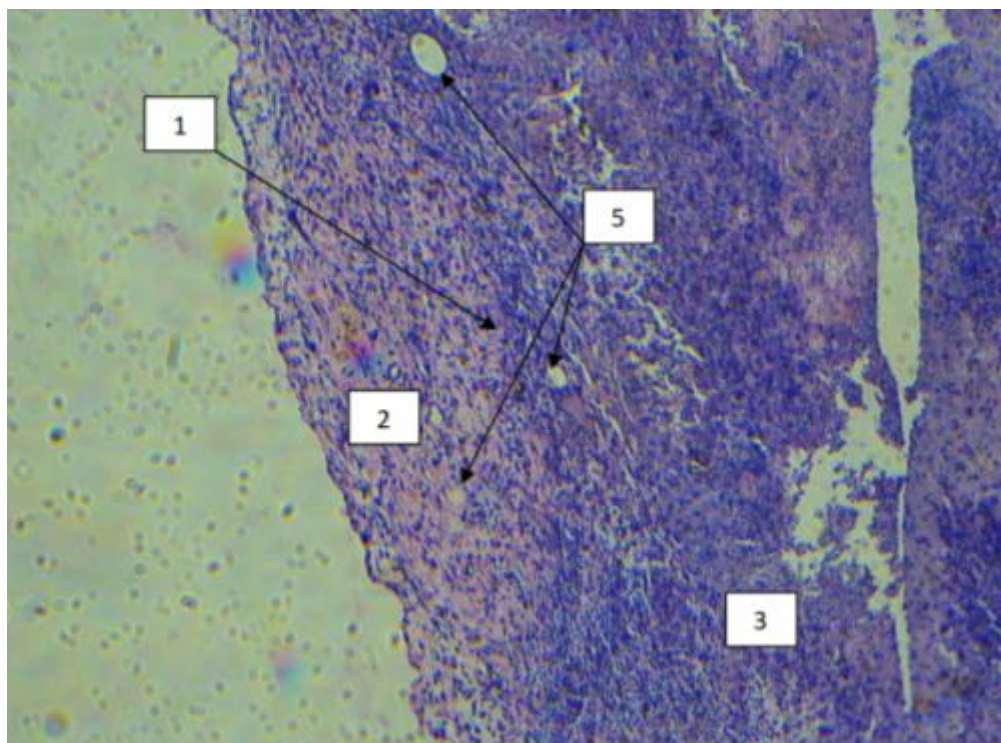


Рис. 8.17. Репарація печінки на 14 добу після застосування колагенової матриці. Фарбування гематоксиліном-еозином. Збільшення 1:150. 1 – межа між печінковою тканиною та новоутворенням; 2 – тканина, що формується на місці колагенової матриці; 3 – тканина печінки; 4 – синусоїди печінки; 5 – кровоносні судини.

Такі ж структури, але меншого діаметру, було виявлено і у випадку застосування колагену з активатором зсідання крові (рис. 8.16). Ознак запального процесу чи набряку на досліджуваних зрізах у обох випадках виявлено не було.

Можна зробити висновок, що повної репарації печінки на 14 добу після операції не спостерігали, однак цей процес триває і є досить успішним. Підтвердити або спростувати це можуть функціональні тести, які визначають потенціал системи зсідання крові, що залежить від синтезу та карбоксилювання коагуляційних факторів.

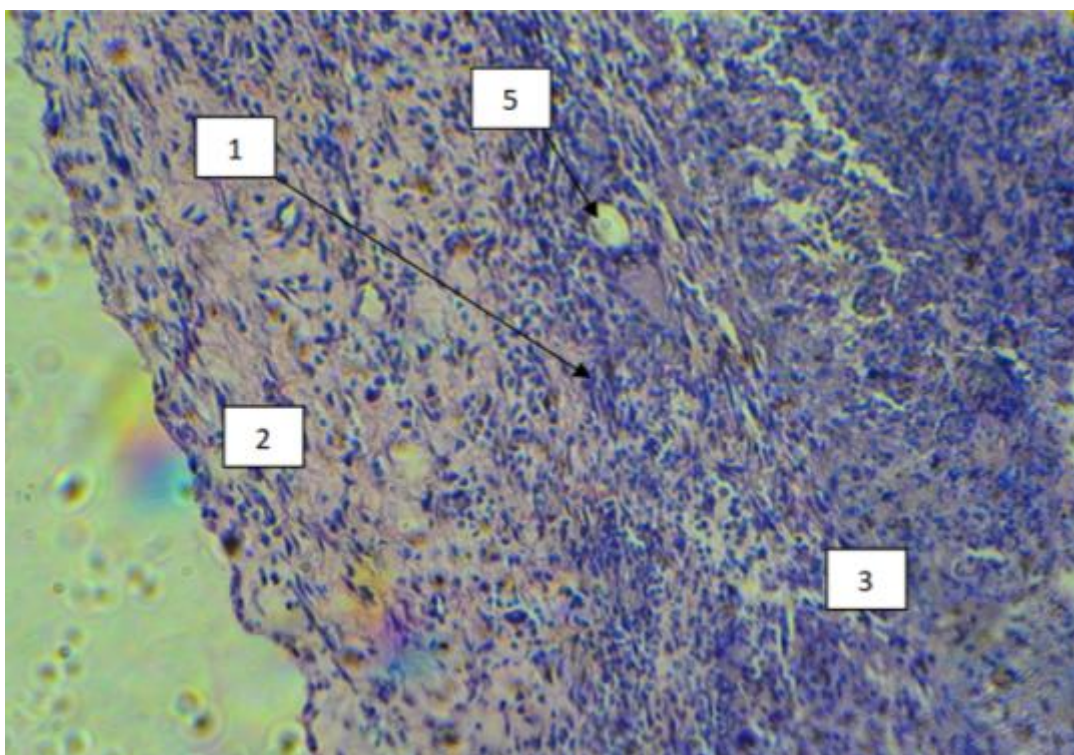


Рис. 8.18. Репарація печінки на 14 добу після застосування колагенової матриці. Фарбування гематоксиліном-еозином. Збільшення 1:300. 1 – межа між печінковою тканиною та новоутворенням; 2 – тканина, що формується на місці колагенової матриці; 3 – тканина печінки; 4 – синусоїди печінки, 5 – кровоносні судини.

Співмірну репаративну здатність мав також і комерційно доступний препарат колагену, який було надано співвиконавцями ТОВ «Дарен-інвест» (рис. 8.18). У цих зразках можна відзначити зменшення кількості клітин у новоутвореній тканині, порівняно зі зразками, отриманими після застосування створеної нами колагенової матриці.

Однак, помітна і регенерація тканини, і формування печінкових синусоїд (рис. 8.19) в новоутвореній тканині.

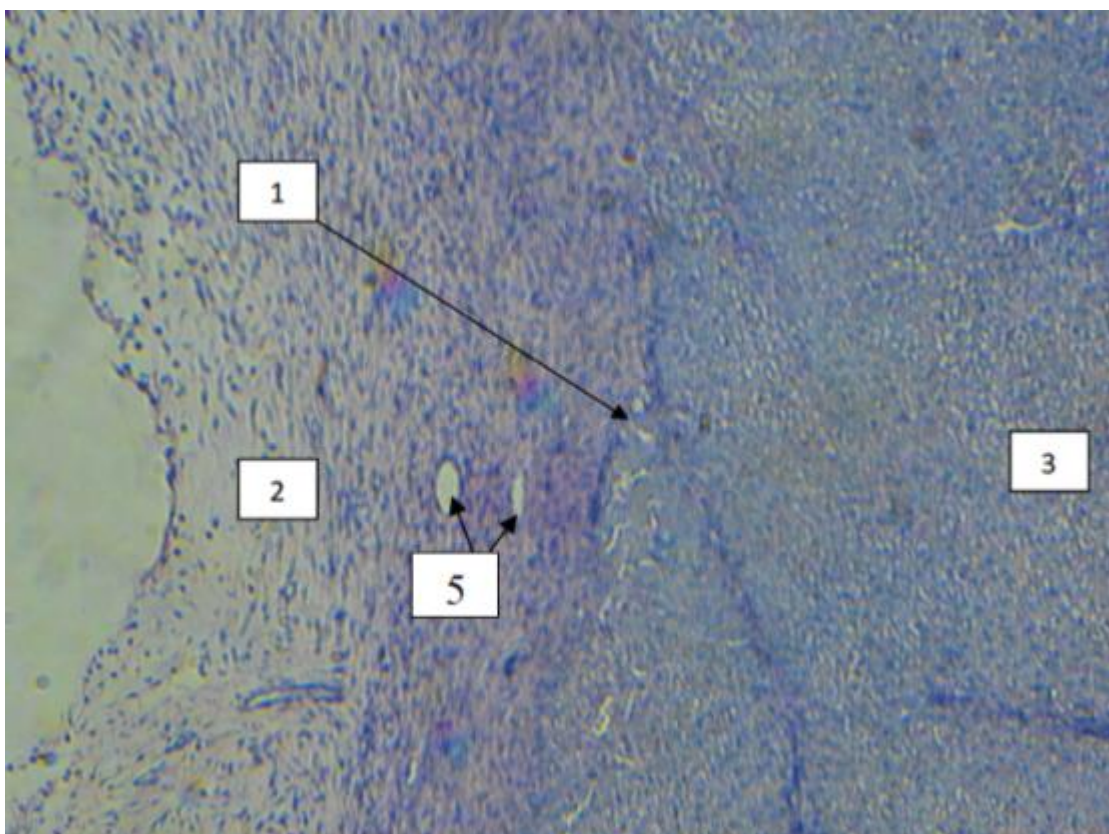


Рис. 8.19. Репарація печінки на 14 добу після застосування комерційно доступний препарат колагену, який було надано співвиконавцями ТОВ «Дарен-інвест». Фарбування гематоксиліном-еозином. Збільшення 1:150. 1 – межа між печінковою тканиною та новоутворенням; 2 – тканина, що формується на місці колагенової матриці; 3 – тканина печінки; 4 – синусоїди печінки; 5 – кровоносні судини.

Можна відзначити також васкуляризацію новоутвореної тканини (рис. 8.20). Попередня порівняльна оцінка кількості виявлених кровоносних судин у новоутвореній тканині демонструє тенденцію до найкращої васкуляризації регенованої тканини за застосування комерційно доступного препарату (рис. 8.20) та створеної немодифікованої колагенової матриці.

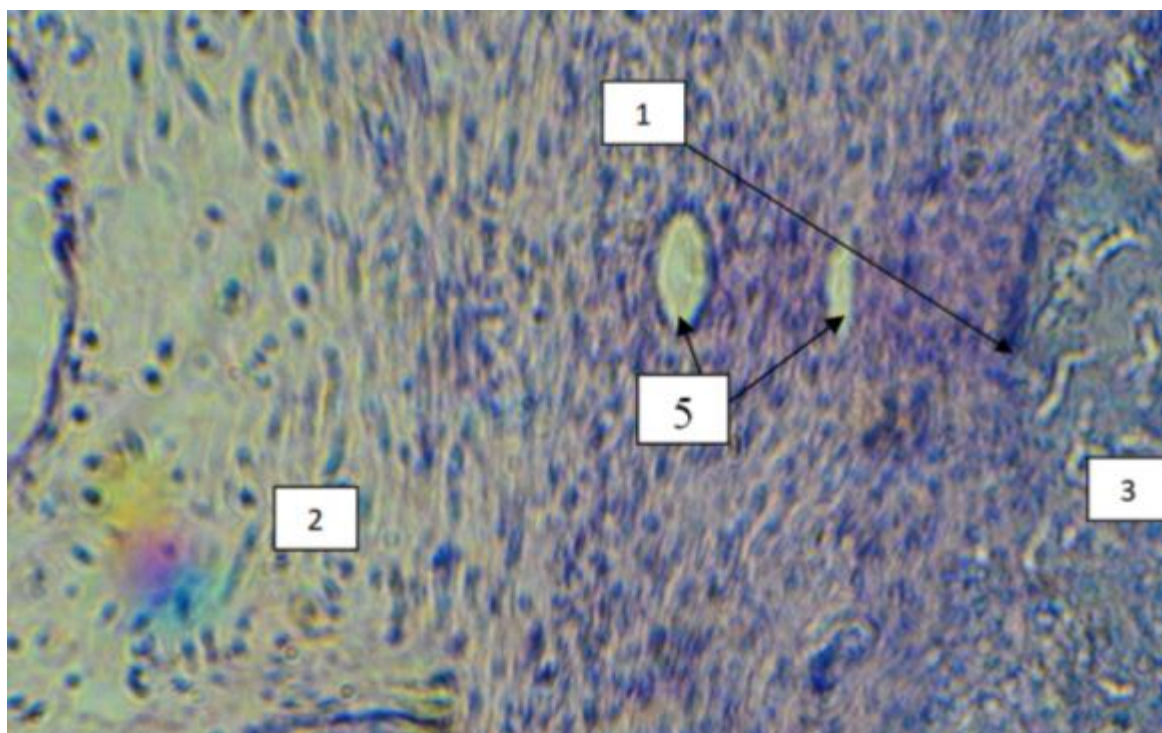


Рис. 8.20. Репарація печінки на 14 добу після застосування комерційно доступний препарат колагену, який було надано співвиконавцями ТОВ «Дарен-інвест». Фарбування гематоксиліном-еозином. Збільшення 1:300. 1 – межа між печінковою тканиною та новоутворенням; 2 – тканина, що формується на місці колагенової матриці; 3 – тканина печінки; 4 – синусоїди печінки; 5 – кровоносні судини.

Васкуляризація регенованої тканини при застосуванні створеної колагенової матриці, модифікованої активатором, була менш інтенсивна. Висунуто припущення, що це пов'язано з тим, що модифіковану активатором колагенову матрицю створювали, насамперед, для максимально ефективної та швидкої зупинки кровотечі. Результати досліджень *in vivo* показали можливість модифікації композиції колагенової гемостатичної матриці, зменшуючи кількість активатора.

8.4.4. Характеристика стану системи зсідання крові експериментальних тварин на 1-у та 14-ту добу після операції

Гепатоцити є основним місцем синтезу протеїнів системи зсідання крові та плазміногену – основного проензиму системи фібринолізу. При захворюваннях печінки знижується інтенсивність синтезу вітамін К-залежних протеїнів і порушується посттрансляційне карбоксилювання залишків глутамінової кислоти Гла-домену факторів зсідання крові II, VII, IX, X, протеїнів C, S і Z. Такі декарбоксильовані форми вітамін К-залежних протеїнів називаються PIVKA-протеїнами (утворюються за дефіциту вітаміну К). Вони не утворюють ензимні комплекси на поверхні ліпідного бішару мембран клітин за наявності іонів кальцію та втрачають здатність виконувати відповідні функції в системі зсідання крові. Водночас накопичення функціонально неактивних форм вітамін К-залежних протеїнів за розвитку патології печінки призводить до зниження прокоагулянтного потенціалу системи зсідання крові.

Для загальної характеристики основних компонентів коагуляційного гемостазу виконували скринінговий тест ‘протромбіновий час’ (ПЧ) та визначали загальний рівень протромбіну. Порівняння результатів цих тестів дає змогу виявити появу в кровотоці функціонально неактивних форм протромбіну.

Для визначення вмісту загального протромбіну та наявності його функціонально неактивної (декарбоксильованої) форми активацію протромбіну проводили тромбoplastином та екамуліном, отриманим з отрути ефі багатолускової (*Echis multisquamatus*). Екамулін на відміну від тромбoplastину здатен активувати і функціонально неактивні форми протромбіну. За різницею показників екамуліновий час (ЕЧ) і ПЧ оцінювали вміст функціонально неактивного протромбіну. Отримані дані свідчать про відсутність зниження вмісту функціонального протромбіну після операції в плазмі крові кролів всіх трьох груп: протромбіновий та екамуліновий індекси склали 96-107 % (норма – 100 ± 10).

Вміст фібриногену визначали, використовуючи тромбіноподібний ензим анцистрон-Н, виділений з отрути щитомордника звичайного (*Agkistrodon halys*

halys). Виявлено значне підвищення (від 5,5 до 6,7 г/л) вмісту фібриногену в плазмі кролів після хірургічного втручання, що пов'язано з розвитком запальних процесів. На 14 добу спостерігали зниження вмісту фібриногену до 4-5 г/л (норма $3,5 \pm 0,5$ г/л).

Вміст розчинних фібрин-мономерних комплексів в плазмі крові кролів визначали на 1 і 14 добу після операції. Результати представлено на рис. 8.21.

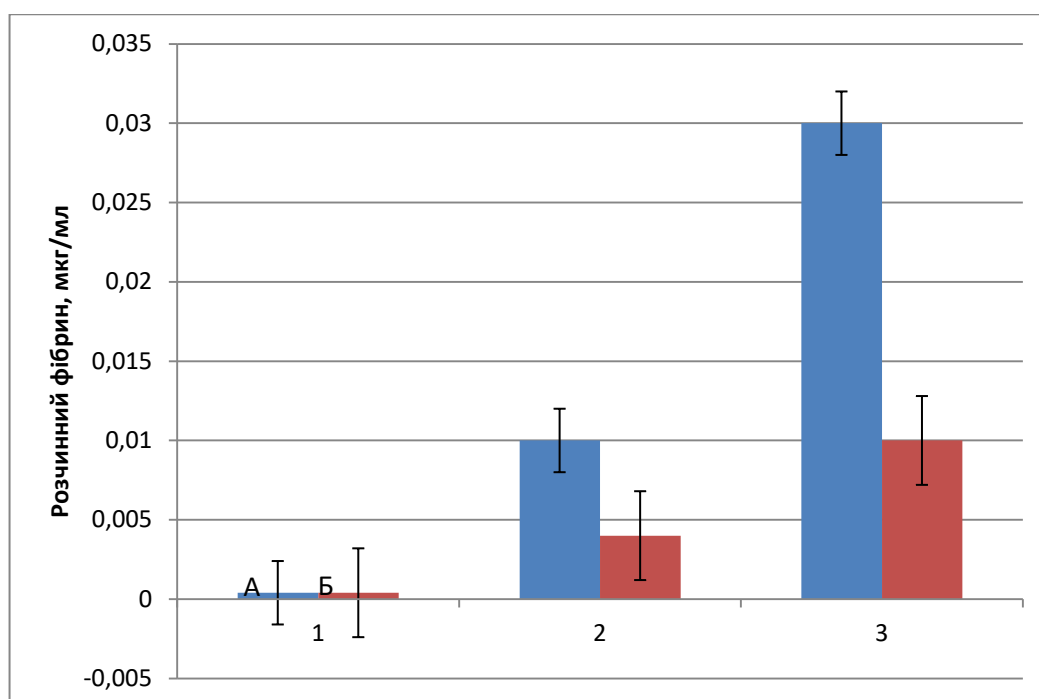


Рис. 8.21. Вміст розчинного фібрину в плазмі крові кролів на 1 і 14 добу після операції. 1 – колаген +активатор зсідання крові, 2 – колаген, 3 – фірмовий колаген, наданий співвиконавцями проекту ТОВ «Дарен-інвест»; а – перша доба після операції, б – 14 доба після операції. *– результати достовірні для $p \leq 0,05$.

Отримані дані свідчать про відсутність активації системи зсідання крові кролів в разі застосування колагенової матриці з додаванням активатора зсідання крові. Виявлено незначну активацію системи зсідання крові кролів в разі застосування однієї колагенової матриці. При використанні фірмового колагену спостерігається розвиток активаційного процесу.

Таким чином, було проведено біохімічну характеристику промислово вироблених препаратів колагену, та на їх основі створено лабораторні зразки колагенової матриці, а також лабораторні зразки колагенової матриці з сорбованим активатором зсідання крові. Показано, що лише колагенова матриця, модифікована активатором зсідання крові, здатна викликати прискорене зсідання плазми крові та агрегацію тромбоцитів *in vitro*. Немодифікована колагенова матриця та комерційно доступний зразок колагенової тканини не мали здатності активувати тромбоцити та викликати зсідання плазми крові *in vitro*. Показано швидку зупинку кровотечі, ефективне загоєння рани, відсутність набряків чи запалення при застосуванні колагенової матриці з сорбованим активатором зсідання крові. Створена немодифікована колагенова матриця не поступалася комерційно доступному препарату за швидкістю зупинки кровотечі та ефективністю загоєння ран.

Таким чином, було створено, охарактеризовано та апробовано *in vitro* та *in vivo* колагенову матрицю з посиленням гемостатичним ефектом, яка за ефективністю ранозагоюючої дії не поступається існуючим аналогам, а за здатністю зупинити кровотечу з паренхіматозних органів – значно переважає їх.

РОЗДІЛ 9. РОЗРОБКА УМОВ ОТРИМАННЯ СТАБІЛЬНОГО ПРЕПАРАТУ ТРОМБІНУ

Процес зсідання крові – це каскад послідовних реакцій, що направлені на утворення фібринового згустку. Ключовим етапом коагуляційного каскаду є активація протромбіну в тромбін, який перетворює фібриноген на фібрин. Останній разом з активованими тромбоцитами складають основу тромбу, що здатний закривати пошкоджену поверхню судини, та перешкоджати кровотечі.

Тромбін – серинова протеїназа з молекулярною масою 35-37 кДа. Активація протромбіну *in vivo* відбувається під дією протромбіназного комплексу, до складу якого входять фактори системи зсідання крові Ха, Va, фосфоліпіди та іони кальцію.

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 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.

На першому етапі роботи отримували протромбін з концентрату вітамін К-залежних протеїнів плазми крові по Фентону з власною модифікацією, для чого спочатку одержували концентрат вітамін К-залежних протеїнів плазми крові, змішували плазму крові з барієм сірчаноокислим (60 г BaSO₄ на 1 л плазми крові) та проводили сорбцію вітамін К-залежних протеїнів на BaSO₄ при температурі +6 °С з наступним центрифугуванням при 1200–1400 g. Потім елюювали вітамін К-залежні протеїни з отриманого осаду 0,05 М трис-НСІ

буферним розчином, рН 7,4, що містив 0,2 М NaCl і 0,02 М ЕДТА, після чого видаляли барій сірчаноокислий центрифугуванням при 1200–1400 g. Протромбін виділяли із отриманого концентрату вітамін К-залежних протеїнів плазми крові шляхом розділення на Q-Sepharose (Sigma). Концентрат вітамін К-залежних протеїнів наносили в 0,02 М трис-НСІ буферному розчині, рН 7,4 та проводили елюцію протромбіну 0,02 М трис-НСІ буферним розчином, рН 7,4, що містив 0,4 М NaCl.

9.1. ОТРИМАННЯ ТРОМБІНУ АКТИВАЦІЄЮ ПРОТРОМБІНУ ЗА ПРИСУТНОСТІ 25-40% ЦИТРАТУ НАТРІЮ

Активність одержаного тромбіну визначали за часом згортання 0,2 % фібриногену під дією тромбіну в 0,05 М трис-НСІ буфері рН 7,4, що містить 0,13 М NaCl, використовуючи калібрувальну криву. Для побудови калібрувальної кривої використовували стандартизований тромбін (рис. 9.1). За одиницю активності тромбіну (1 NIH – міжнародна одиниця активності тромбіну) приймали таку кількість тромбіну, яка призводить до згортання 1 мл 0,1 %-го фібриногену при температурі 29 °С за 15 сек.

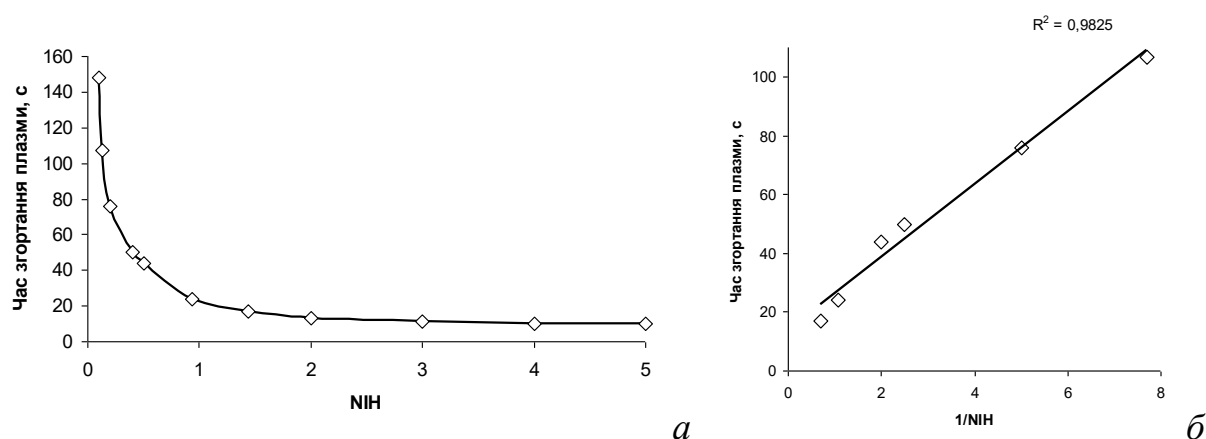


Рис. 9.1. Калібрувальна крива для визначення активності препарату тромбіну.

а – визначення часу зсідання фібриногену під дією тромбіну.

б – лінеріалізація залежності часу зсідання фібриногену від активності тромбіну (по осі абсцис – відношення 1/NIH).

Таблиця 9.1.

Активність тромбіну отриманого активацією протромбіну цитратом натрію.

Концентрація цитрату натрію	Активність тромбіну, NIH/мг		
	Інкубація 24 год	Інкубація 48 год	Інкубація 72 год
25%	202±45	255±60	234±70
35%	298±28	330±33	300±47

Недоліком цього способу є тривалість процесу: активація протромбіну проходить протягом 24-48 год, з подальшим довготривалим діалізом для видалення надлишку цитрату натрію. Крім того, довготривалі процедури призводять до часткової або значної втрати активності препарату в результаті автокаталізу (таблиця 9.1).

9.2. ОТРИМАННЯ ТРОМБІНУ ШЛЯХОМ АКТИВАЦІЇ ПРОТРОМБІНУ ТРОМБОПЛАСТИНОМ ЗА ПРИСУТНОСТІ ЙОНІВ КАЛЬЦІУ

Активували протромбін тромбопластином («Ренам», Москва), який готували до роботи відповідно інструкції «Ренампластин». Активацію протромбіну проводили в суміші, що складалася з 5 мг протромбіну в 0,05 М трис-НСІ буфері, рН 7,4, що містив 0,13 М NaCl та 0,05, 0,08, 0,1 та 0,150 мл тромбопластину). Інкубували при температурі 37 °С протягом 1, 1,5 та 2 години.

Ступінь активації протромбіну під дією активатора визначали за калібрувальним графіком (таблиця 9.2).

Отриманий тромбін додатково очищали від тромбопластину з використанням афінної хроматографії на гепарин-Sepharose. Висока ступінь чистоти отриманого тромбіну підтверджена даними електрофорезу в ПААГ.

Слід відмітити, що при використанні тромбопластину як активатору існують додаткові незручності, що пов'язані з процесом стандартизації препаратів тромбопластину.

Таблиця 9.2.

Активність тромбіну, одержаного при активації протромбіну тромбопластином

Час інкубації, год	Активність тромбіну, НН/мг		
	кількість тромбопластину 0,05 мл	кількість тромбопластину 0,08 мл	кількість тромбопластину 0,1 мл
1	78±15	330±60	417±30
1,5	238±30	503±68	500±70
2	312±30	510±20	504±40

9.3. ОТРИМАННЯ ТРОМБІНУ ШЛЯХОМ АКТИВАЦІЇ ПРОТРОМБІНУ ЕНЗИМНИМ АКТИВАТОРОМ ЗСІДАННЯ КРОВІ, ІММОБІЛІЗОВАНИМ НА BrCN-SEPHAROSE

Розроблений метод отримання тромбіну полягає в безпосередній активації протромбіну плазми крові до тромбіну ензимним активатором протромбіну, іммобілізованим на BrCN-Sepharose (A-Sepharose).

Стандартизацію сорбенту A-Sepharose проводили, інкубуючи хромогенний субстрат калікреїну S2302 при температурі 37 °С впродовж 5 хв в 0,05 М трис-НСl буфері, рН 7,4, який містив 0,13 М NaCl, використовуючи на 0,5 мл A-Sepharose – 0,2 мл 0,5 мМ хромогенного субстрату калікреїну S2302; реєстрували розщеплення хромогенного субстрату калікреїну S2302 по екстинції при 405 нм та 492 нм на рідері («Titertek Multiskan MC»), приймаючи за стандартну одиницю активності одержаного сорбенту A-Sepharose такий його об'єм, який за даних умов розщеплював хромогенний субстрат калікреїну S2302 з вивільненням п-нітроаніліну у кількості, що забезпечує екстинцію 0,15±0,01.

Отримували тромбін, змішуючи протромбін з сорбентом A-Sepharose з розрахунку 1 мг протромбіну на 1, 2 та 3 одиниці активності сорбенту A-Sepharose та інкубували протягом 1, 1,5 та 2,5 год при температурі 37 °С (таблиця 9.3).

Таблиця 9.3.

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

Час інкубації, год	Активність тромбіну, НН/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

Таким чином, розроблений спосіб активації протромбіну ензимним активатором протромбіну дозволяє отримувати тромбін високої активності, який не потребує проведення діалізу та додаткової очистки від активатору протромбіну. Іммобілізований ензимний активатор протромбіну (A-Sepharose) багаторазового використання є стабільним та стандартизованим.

РОЗДІЛ 10. ЗАКЛЮЧЕННЯ

У основі роботи лежить концепція загальної регуляції внутрішньосудинного та екstrasудинного тромбоутворення. Відповідно до неї, фізіологічне тромбоутворення (екstrasудинне) відбувається за порушення цілісності стінки судини для запобігання крововтраті і є свідченням нормального функціонування системи гемостазу, а патологічне тромбоутворення (внутрішньосудинне) є наслідком порушення рівноваги у системі гемостазу. У основі обох цих процесів лежать одні й ті ж самі молекулярні механізми: ензиматичний коагуляційний каскад, клітинний сигналінг тромбоцитів, фібринолітична та антикоагулянтна ланки. Відповідно до основоположної концепції, діючи прицільно на ту чи іншу ланку системи дослідник може, відповідно до потреби, стимулювати чи заінгібувати тромбоутворення.

Детальний огляд джерел літератури та результати багаторічної роботи відділу структури та функції білку Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України дозволили обрати саме ті вузлові точки, дія на які дозволяє керувати і селективно інгібувати внутрішньосудинне тромбоутворення. Зокрема такими ланками було визначено стадію фібриноутворення та агрегацію тромбоцитів. Обидва ці процеси призводять до формування фібриново-тромбоцитарного тромбу, а отже, інгібуючи їх можна перешкодити його формуванню (рис. 10.1).

Для інгібування полімеризації фібрину було запропоновано калікс[4]арен С-145, що має шанс стати найпершим комерціалізованим прямим інгібітором полімеризації фібрину. Маючи спрямовану анти полімеризаційну, антиагрегантну та проангіогенну дію, ця сполука є перспективною основою антитромботичного препарату.

У роботі також окреслено низку сполук, які здатні інгібувати активацію та агрегацію тромбоцитів, зокрема антагоністи інтегринових рецепторів та інгібітори сигнальних каскадів тромбоцитів.

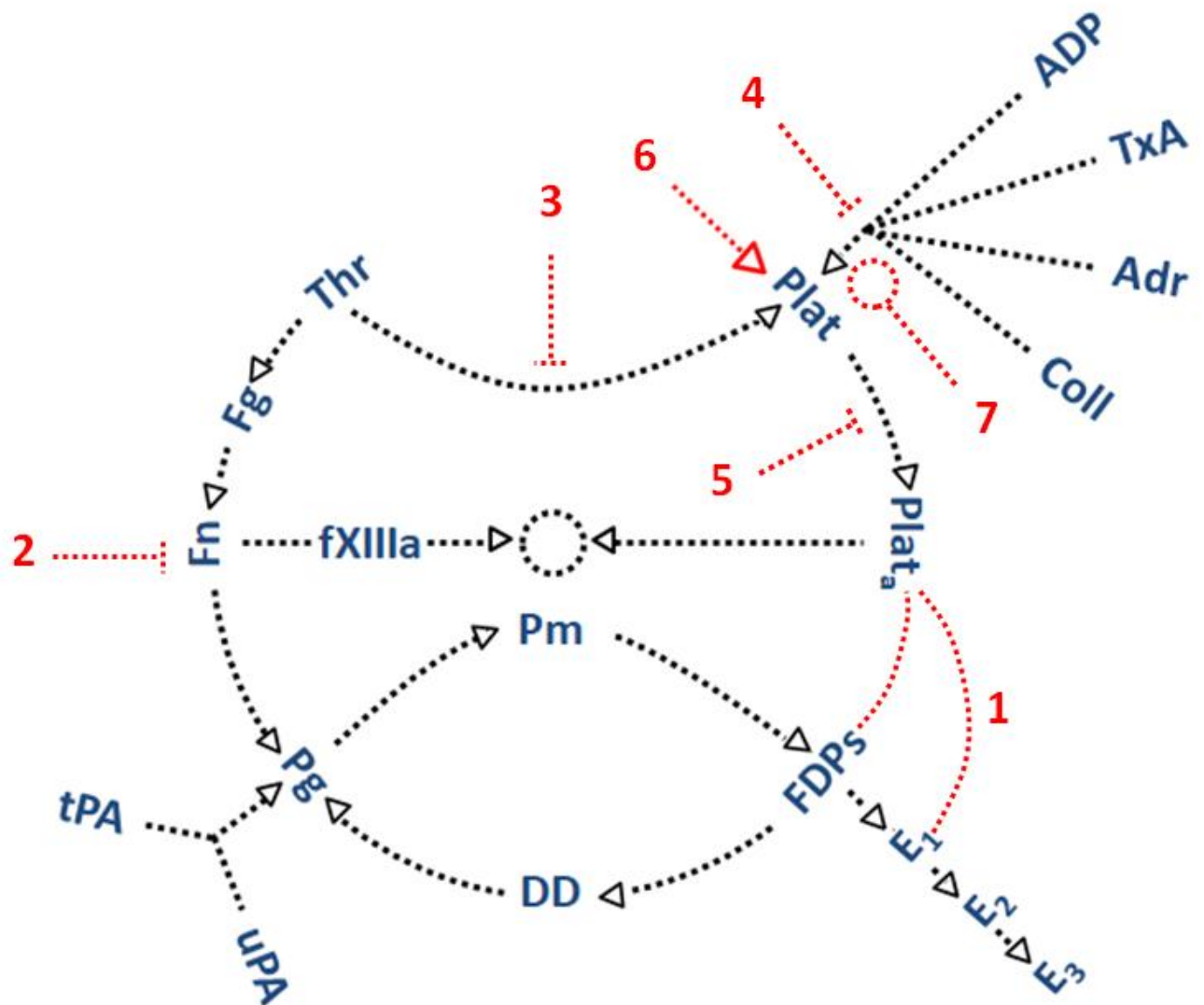


Рис. 10.1. Узагальнена схема системи гемостазу із позначеними вузловими точками, до яких знайдено ефектори. Стимулюють агрегацію тромбоцитів: 1 – фрагменти фібрину; 6 – наночастинки діоксиду силіцію. Інгібують активацію та агрегацію тромбоцитів: 3 – аргатробан-модифіковані біоматеріали; 4 – інгібітори сигнальних каскадів (NSE, EGCG, ED, EL, тощо); 5 – антагоністи GPIIb/IIIa-рецепторів. Не діють на тромбоцити: 7 – фулерени, нанодіаманти. Інгібують полімеризацію фібрину: 2 – калікс[4]арен C-145.

Fg – фібриноген; Fn – фібрин; fXIIIa – активований фактор XIII; Plat – тромбоцити; Plat_a – активовані тромбоцити; Coll – колаген; Adr – адреналін; TxA – тромбоксан α; ADP – аденозиндифосфат; Pz – 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.

Запропоновано підходи до їхнього застосування, показано обмеження та переваги кожної з описаних сполук – лігнанів, галлату епігалокатехіну, NSE, тощо. На окрему увагу заслуговують виявлені біоінертні щодо системи кровообігу сполуки (фулерени, нанодіаманти) та сполуки, здатні активувати зсідання крові (діоксид силіцію).

Ті ж самі механізми лежать у основі й прокоагулянтної дії, тому було визначено ланки системи гемостазу, діючи на які можливо стимулювати екstrasудинне тромбоутворення (рис. 10.2).

Найефективнішим способом стимулювання екstrasудинного тромбоутворення було визначено етап активації протромбіну. Застосування ензимного активатора зсідання крові для модифікації поверхонь дозволило створити кілька перспективних біоматеріалів, придатних для впровадження у клінічну практику для запобігання гострим судинним та капілярним кровотечам.

Зокрема було створено інноваційний кровоспинний засіб Карбогемостат, колагенову матрицю з посиленням кровоспинним ефектом, спосіб одержання фібринового гелю для прискорення загоєння ран, тощо. Всі запропоновані кровоспинні матеріали було протестовано як *in vitro*, так і *in vivo*.

На окрему увагу заслуговує спосіб отримання висококонцентрованої суспензії тромбоцитів, який добре зарекомендував себе на етапі клінічних досліджень та знайшов застосування у клінічній практиці.

Проведені дослідження засвідчили правильність сформованої концепції взаємовиключної регуляції внутрішньосудинного та екstrasудинного тромбоутворення та мали наслідком створення прототипів інноваційних біотехнологічних продуктів, які знаходяться на різних стадіях комерціалізації та впровадження. Їхнє застосування у клінічній практиці дозволить забезпечити потребу медицини у способах швидкого та керованого зсуву потенціалу системи гемостазу, залежно від потреб, у бік коагуляції чи навпаки.

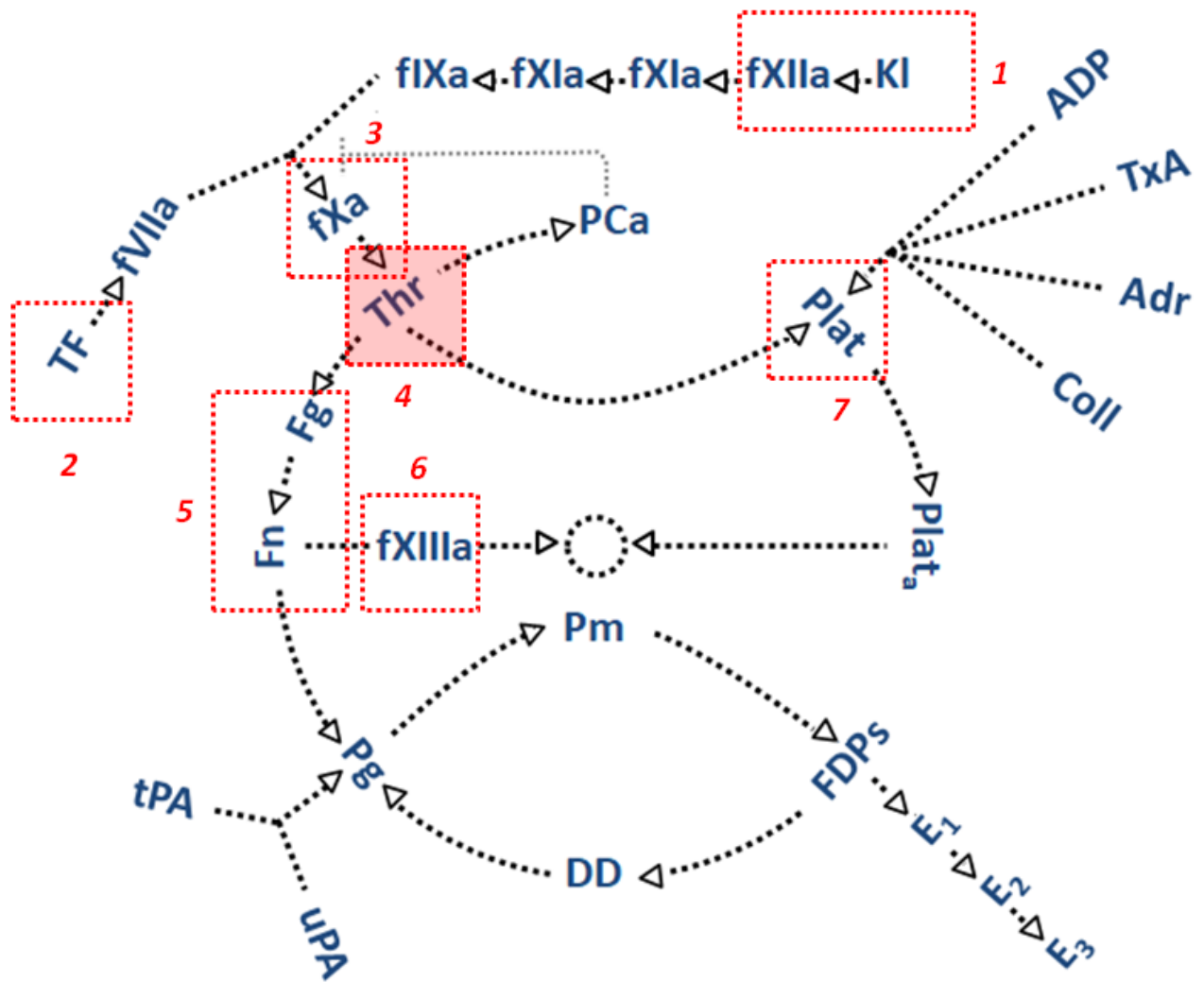


Рис. 10.2. Узагальнена схема системи гемостазу із позначеними вузловими точками, діючи на які можна стимулювати екstrasудинне тромбоутворення. 1 – каолін; 2 – тканинний фактор; 3 – активатори фактора X; 4 – активатори протромбіну; 5 – тромбін-подібні ензими; 6 – трансглутаминази; 7 – активатори тромбоцитів. 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 кровтечі.

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; Pgs – 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 $V\beta N$ -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 арготрабаном, 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 С-145. Оптимальну дозу калікс[4]арену С-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.

ЛІТЕРАТУРА

-
1. Davie EW, Fujikawa K, Kisiel W. The Coagulation Cascade: Initiation, Maintenance, and Regulation. *Biochemistry*. 1991; 30(43): 10363-10370.
 2. Волков ГЛ, Платонова ТН, Савчук АН. Современные представления о системе гемостаза. Київ: Наукова Думка; 2005. 256 с.
 3. Зубаиров МД. Молекулярные основы свертывания крови и тромбообразования. Казань: ФОН; 2000. 321 с.
 4. Яровая ГА, Блохина ТБ, Нешкова ЕА. Контактная система. Новые представления о механизмах активации и биорегулирующих функциях. *Биохимия*. 2002; 64(1): 16-29.
 5. Hoffman R., Benz EJ, Shattil SJ, Sanford J, Furie B., Cohen HJ, Silberstein LE, McGlave P. *Hematology. Basic Principles and Practice*. New York: Churchill Livingstone; 1995. 2568 с.
 6. Colman RW, Schmaier AH. Contact System: A Vascular Biology Modulator With Anticoagulant, Profibrinolytic, Antiadhesive, and Proinflammatory Attributes. *Blood*. 1997; 90(10): 3819-3843.
 7. Spronk HMH, Govers-Reimslag JWP, ten Cate H. The Blood Coagulation System as a Molecular Machine. *Bio Essays*. 2003; 25: 1220-1228.
 8. Kalafatis M, Egan JO, van 't Veer C, Cawthern KM, Mann KG. The Regulation of Clotting Factors. *Critical Reviews in Eucariotic Gene Expression*. 1997; 7(3): 241-280.
 9. Belitser VA., Varetska TV., Manjakov VPh. On the Model of the Fibrinogen Molecule. Conclusive Stages of Fibrin Polymerization. *Thromb Research*. 1973; 2: 567-578.
 10. Doolittle RF. Structural basis of the fibrinogen-fibrin transformation: contributions from X-ray crystallography. *Blood Rev*. 2003; 1: 33-41.
 11. Medved L., Weisel JW. Recommendations for nomenclature on fibrinogen and fibrin. *J Thromb Haemost*. 2009; 7(2): 355-359.

-
12. Lugovskoi EV, Makogonenko EM, Komisarenko SV. Molecular mechanisms of formation and degradation of fibrin. Kyiv: Naukova Dumka; 2013: 232 p.
 13. Lugovskoy EV, Gritsenko PG, Kapustianenko LG, Kolesnikova IN, Chernishov VI, Komisarenko SV. Functional role of B β -chain N-terminal fragment in the fibrin polymerization process. *FEBS Journal*. 2007; 274: 4540-4549.
 14. Fuss C, Palmaz JC, Sprague EA. Fibrinogen: Structure, Function, and Surface Interactions. *J Vasc Interv Radiol*. 2001; 12: 677-682.
 15. Mosesson MW. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost*. 2005; 3: 1894-904.
 16. Shatzel JJ, O'Donnell M, Olson SR, Kearney MR, Daughety MM, Hum J, Nguyen KP, DeLoughery TG. Venous thrombosis in unusual sites: A practical review for the hematologist. *Eur J Haematol*. 2019; 102(1): 53-62.
 17. O'Donnell M, Shatzel JJ, Olson SR, Daughety MM, Nguyen KP, Hum J, DeLoughery TG. Arterial thrombosis in unusual sites: A practical review. *Eur J Haematol*. 2018; 101(6): 728-736.
 18. Kaye JB, Schultz LE, Steiner HE, Kittles RA, Cavallari LH, Karnes JH. Warfarin Pharmacogenomics in Diverse Populations. *Pharmacotherapy*. 2017; 37(9): 1150-1163.
 19. Onundarson PT, Arnar DO, Lund SH, Gudmundsdottir BR, Francis CW, Indridason OS. FIIx-prothrombin time monitoring improves warfarin anticoagulation outcome in atrial fibrillation: a systematic review of randomized trials comparing FiiX-warfarin or direct oral anticoagulants to standard PT-warfarin. *Int J Lab Hematol*. 2016; 38(1): 78-90.
 20. Gumulec J, Kessler P, Penka M, Klodová D, Králová S, Brejcha M, et al. Hemorrhagic complications during warfarin treatment. *Vnitr Lek*. 2006; 52(1): 79-91.
 21. Tønnesen KH, Sager P, Gormsen J. Treatment of severe foot ischaemia by defibrination with ancrod: a randomized blind study. *Scand J Clin Lab Invest*. 197; 38(5): 431-435.

-
22. Jahnke H. Experimental ancrod (Arvin) for acute ischemic stroke: nursing implications. *J Neurosci Nurs*. 1991; 23(6): 386-389.
 23. Dempfle CE, Argiriou S, Kucher K, Müller-Peltzer H, Rübsamen K, Heene DL. Analysis of fibrin formation and proteolysis during intravenous administration of ancrod. *Blood*. 2000; 96(8): 2793-802.
 24. Castro HC, Zingali RB, Albuquerque MG, Pujol-Luz M, Rodrigues CR. Snake venom thrombin-like enzymes: from reptilase to now. *CMLS*. 2004; 61(7-8): 843-856.
 25. Prentice CR, Hampton KK, Grant PJ. Prentice CR. The fibrinolytic response to ancrod therapy: characterization of fibrinogen and fibrin degradation products. *Br J Haematol*. 1993; 83(2): 276-281.
 26. Ahmed NK, Tennant KD, Markland FS, Lacz JP, Ahmed NK. Biochemical characteristics of fibrolase, a fibrinolytic protease from snake venom. *Haemostasis*. 2000; 20: 147-154.
 27. Wang R, Cai J, Huang Y, Xu D, Sang H, Yan G. Novel recombinant fibrinogenase of *Agkistrodon acutus* venom protects against LPS-induced DIC. *Thromb Res*. 2009; 123(6): 919-924.
 28. He J, Chen S, Gu J. Identification and characterization of Harobin, a novel fibrino(geno)lytic serine protease from a sea snake (*Lapemis hardwickii*). *FEBS Lett*. 2007; 581(16): 2965-2973.
 29. Gardiner EE, Andrews RK. The cut of the clot(h): snake venom fibrinogenases as therapeutic agents. *J Thromb Haemost*. 2008; 6(8):1360-1362.
 30. Mohamed Abd El-Aziz T, Garcia Soares A, Stockand JD. Snake Venoms in Drug Discovery: Valuable Therapeutic Tools for Life Saving. *Toxins (Basel)*. 2019; 11(10): 564.
 31. Weisel JW, Litvinov RI. Mechanisms of fibrin polymerization and clinical implications. *Blood*. 2013; 121(10): 1712-1719.
 32. Chernysh IN, Nagaswami Ch, Purohit PK, Weisel JW. Fibrin clots are equilibrium polymers that can be remodeled without proteolytic digestion. *Scientific Reports*. 2012; 2: 1-6.

-
33. Shrivastava S, Singh SK, Mukhopadhyay A, Sinha AS, Mandal RK, Dash D. Negative regulation of fibrin polymerization and clot formation by nanoparticles of silver. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2011; 82(1): 241-246.
34. Watson JW, Doolittle RF. Peptide-derivatized albumins that inhibit fibrin polymerization. *Biochemistry*. 2011; 50(45): 9923-9927.
35. Lugovskoy EV, Gritsenko PG, Koshel TA. Calix[4]arene methylenebisphosphonic acids as inhibitors of fibrin polymerization. *FEBS Journal*. 2011; 278: 1244-1251.
36. Alquwaizani M, Buckley L, Adams C, Fanikos J. Anticoagulants: A Review of the Pharmacology, Dosing, and Complications. *Curr Emerg Hosp Med Rep*. 2013; 1(2): 83-97.
37. Xiao Z, Zhao W, Yang B, Zhang Z, Guan H, Linhardt RJ. Heparinase 1 selectivity for the 3,6-di-O-sulfo-2-deoxy-2-sulfamido-alpha-D-glucopyranose (1,4) 2-O-sulfo-alpha-L-idopyranosyluronic acid (GlcNS3S6S-IdoA2S) linkages. *Glycobiology*. 2011; 21(1): 13-22.
38. Петч Б, Мадленер К, Сушко Е. Гемостазиология: рациональная диагностика и терапия. Київ: Здоров'я; 2006: 287 с.
39. Shanberge JN, Fukui H Studies on the anticoagulant action of heparin, protamine, and Polybrene in the activation of factor IX. *J Lab Clin Med*. 1967; 69(6): 927-937.
40. Barrowcliffe TW. History of heparin. *Handb Exp Pharmacol*. 2012; 207: 3-22.
41. Бокарев ИН, Щепоткин БМ, Ена ИН. Внутрисосудистое свёртывание крови. Киев: Здоровья; 1989. 246 с.
42. Сенчук АЯ, Венцковский БМ. Тромбоэмболические осложнения в акушерстве и гинекологии: монография. Киев: Макком; 2003. 270-272 с.
43. Hirsh J, Warkentin TE, Shaughnessy SG, Anand SS, Halperin JL, Raschke R, et al. Heparin and low-molecular-weight heparin: mechanisms of action, pharmacokinetics, dosing, monitoring, efficacy, and safety. *Chest*. 2001; 119(1): 64S-94S.

44. Nicolaes GA, Sørensen KW, Friedrich U, Tans G, Rosing J, Autin L, Dahlbäck B, Villoutreix BO. Altered inactivation pathway of factor Va by activated protein C in the presence of heparin. *Eur J Biochem.* 2004; 271(13): 2724-2736.

45. Hogwood J, Mulloy B, Gray E. Precipitation and Neutralization of Heparin from Different Sources by Protamine Sulfate. *Pharmaceuticals (Basel).* 2017; 10(3): 59.

46. Lovecchio F. Heparin-induced thrombocytopenia. *Clin Toxicol (Phila).* 201; 52(6): 579-583.

47. Krauel K, Hackbarth C, Fürll B, Greinacher A. Heparin-induced thrombocytopenia: in vitro studies on the interaction of dabigatran, rivaroxaban, and low-sulfated heparin, with platelet factor 4 and anti-PF4/heparin antibodies. *Blood.* 2012; 119(5): 1248-1255.

48. Bara L, Samama M. Pharmacokinetics of low molecular weight heparins. *Acta Chir Scand Suppl.* 1988; 543: 65-72.

49. Padmanabhan A, Jones CG, Bougie DW, Curtis BR, McFarland JG, Wang D, Aster RH. Heparin-independent, PF4-dependent binding of HIT antibodies to platelets: implications for HIT pathogenesis. *Blood.* 2015; 125(1): 155-161.

50. Вавилова ТВ. Антитромботическая терапия и методы ее лабораторного контроля (лекция). *Клиническая лабораторная диагностика.* 2004; 12: 21-33.

51. Legnani C, Preda L, Palareti G, Lunghi B, Rossi E, Coccheri S. Reduced inhibition of activated prothrombin by heparin and venous thromboembolism: heparin resistance revisited. *Am J Clin Pathol.* 1999; 112(5): 705-711.

52. Samuelson IE, Cuker A. Measurement and reversal of the direct oral anticoagulants. *Blood Reviews.* 2017; 31(1): 77-84.

53. DeAnglis AP, Nur I, Gorman AJ, Meidler R. A method to measure thrombin activity in a mixture of fibrinogen and thrombin powders. *Blood Coagul Fibrinolys.* 2017; 28: 134-138.

54. Stangier J. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of the oral direct thrombin inhibitor dabigatran etexilate. *Clin Pharmacokinet.* 2008; 47(5): 285-95.

-
55. Liesenfeld KH, Lehr T, Dansirikul C, Reilly PA, Connolly SJ, Ezekowitz MD, Yusuf S, Wallentin L, Haertter S, Staab A. Population pharmacokinetic analysis of the oral thrombin inhibitor dabigatran etexilate in patients with non-valvular atrial fibrillation from the RE-LY trial. *J Thromb Haemost.* 2011; 9(11): 2168-2175.
56. Graff J, Harder S. Anticoagulant therapy with the oral direct factor Xa inhibitors rivaroxaban, apixaban and edoxaban and the thrombin inhibitor dabigatran etexilate in patients with hepatic impairment. *Clin Pharmacokinet.* 2013; 52(4): 243-54.
57. Yegneswaran S, Banerjee Y, Fernández JA, Deguchi H, Griffin JH. Lyso-Sulfatide Binds Factor Xa and Inhibits Thrombin Generation by the Prothrombinase Complex. *PLoS One.* 2015; 10(8): e0135025
58. Koklic T, Chattopadhyay R, Majumder R, Lentz BR. Factor Xa dimerization competes with prothrombinase complex formation on platelet-like membrane surfaces. *Biochem J.* 2015; 467(1): 37-46
59. Turpie AG, Bauer KA, Eriksson BI, Lassen MR. Fondaparinux vs enoxaparin for the prevention of venous thromboembolism in major orthopedic surgery: a meta-analysis of 4 randomized double-blind studies. *Arch Intern Med.* 2002; 162(16), P. 1833-40.
60. Marcy TR, Truong T, Rai A. Comparing Direct Oral Anticoagulants and Warfarin for Atrial Fibrillation, Venous Thromboembolism, and Mechanical Heart Valves. *Consult Pharm.* 2015, 30(11): 644-656
61. Pollack CV Jr, Reilly PA, van Ryn J, Eikelboom JW, Glund S, Bernstein RA, et al. Idarucizumab for Dabigatran Reversal - Full Cohort Analysis. *N Engl J Med.* 2017; 377(5): 431-441.
62. Haas S, Bode C, Norrving B, Turpie AG. Practical guidance for using rivaroxaban in patients with atrial fibrillation: balancing benefit and risk. *Vasc Health Risk Manag.* 2014; 10: 101-141
63. Milling TJ Jr, Kaatz S. Preclinical and clinical data for factor Xa and “universal” reversal agent. *Am J Emerg Med.* 2016; 34(11): 39-45.

-
64. de Pont AC, Schultz MJ. Anticoagulant properties of drotrecogin alfa (activated) during hemofiltration in patients with severe sepsis. *Crit Care*. 2009; 13(1): 113.
65. Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, et al. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. Recombinant human protein C. Worldwide Evaluation in Severe Sepsis (PROWESS) study group. *N Engl J Med*. 2001; 344(10): 699-709.
66. Vincent JL. Drotrecogin alpha (activated): the treatment for severe sepsis? *Expert Opin Biol Ther*. 2007; 7(11): 1763-77.
67. Prevost N, Wolfe D, Tognolini M, Brass LF. Contact-dependent signaling during the late events of platelet activation. *J Thromb Haemost*. 2003; 1(7): 1613-1627.
68. Cattaneo M. Inherited platelet-based bleeding disorders. *J Thromb Haemost*. 1996; 88(5): 1525-1541.
69. Savage B, Almus-Jacobs F, Ruggeri ZM. Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow. *Cell*. 1998; 94(5): 657-66.
70. Gawaz MP. Blood platelets: physiology, pathophysiology, membrane receptors, antiplatelet principles and therapy for atherothrombotic disease. New York: Thieme; 2001. 190 p.
71. Falati S, Gross P, Merrill-Skoloff G, Furie BC, Furie B. Real-time in vivo imaging of platelets, tissue factor and fibrin during arterial thrombus formation in the mouse. *Nat Med*. 2002; 8(10): 1175-1181.
72. Davies PF, Tripathi SC. Mechanical stress mechanisms and the cell: An endothelial paradigm. *Circ Res*. 1993; 72(2): 239-245.
73. Sambrano GR, Weiss EJ, Zheng YW, Coughlin SR. Role of thrombin signalling in platelets in haemostasis and thrombosis. *Nature*. 2001. 413(6851): 26-27.
74. Rubenstein DA, Yin W. Platelet-Activation Mechanisms and Vascular Remodeling. *Compr Physiol*. 2018; 8(3): 1117-1156.

-
75. Lisman T, Weeterings C, de Groot PG. Platelet aggregation: involvement of thrombin and fibrin(ogen). *Front Biosci.* 2005; 10: 2504-25017.
76. Estevez B, Du X. New Concepts and Mechanisms of Platelet Activation Signaling. *Physiology (Bethesda).* 2017; 32(2): 162-177.
77. Alphonsus CS, Rodseth RN. The endothelial glycocalyx: a review of the vascular barrier. *Anaesthesia.* 2014; 69(7): 777-84.
78. Sieve I, Münster-Kühnel AK, Hilfiker-Kleiner D. Regulation and function of endothelial glycocalyx layer in vascular diseases. *Vascul Pharmacol.* 2018; 100: 26-33.
79. Chistiakov DA, Orekhov AN, Bobryshev YV. Endothelial Barrier and Its Abnormalities in Cardiovascular Disease. *Front Physiol.* 2015; 6: 365.
80. Rendu F, Brohard-Bohn B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets.* 2001; 12(5): 261-73.
81. André P. P-selectin in haemostasis. *Br J Haematol.* 2004; 126(3): 298-306.
82. Fender AC, Rauch BH, Geisler T, Schrör K. Protease-Activated Receptor PAR-4: An Inducible Switch between Thrombosis and Vascular Inflammation? *Thromb Haemost.* 2017; 117(11): 2013-2025.
83. Stefanini L, Bergmeier W. RAP GTPases and platelet integrin signaling. *Platelets.* 2019; 30(1): 41-47.
84. Budnik I, Shenkman B, Hauschner H, Zilinsky I, Savion N. Role of heterotrimeric G proteins in platelet activation and clot formation in platelets treated with integrin α IIb β 3 inhibitor. *Platelets.* 2018; 29(3): 265-269.
85. Agnihotri A, Soman P, Siedlecki CA. AFM measurements of interactions between the platelet integrin receptor GPIIb/IIIa and fibrinogen. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2009; 71(1): 138-147.
86. Clemetson KJ, Clemetson JM. Platelet GPIb-V-IX complex. Structure, function, physiology, and pathology. *Semin Thromb Hemost.* 1995; 21(2): 130-136.
87. Grotti S, Bolognese L. P2Y₁₂ inhibitors in acute coronary syndrome: when to give them and when to prolong their use. *J Cardiovasc Med (Hagerstown).* 2018; 19(1): e9-e12.

88. Wang D, Yang XH, Zhang JD, Li RB, Jia M, Cui XR. Compared efficacy of clopidogrel and ticagrelor in treating acute coronary syndrome: a meta-analysis. *BMC Cardiovasc Disord.* 2018; 18(1): 217.

89. Schrör K. Aspirin and platelets: the antiplatelet action of aspirin and its role in thrombosis treatment and prophylaxis. *Semin Thromb Hemost.* 1997; 23(4): 349-356.

90. Ornelas A, Zacharias-Millward N, Menter DG, Davis JS, Lichtenberger L, Hawke D, Hawk E, Vilar E, Bhattacharya P, Millward S. Beyond COX-1: the effects of aspirin on platelet biology and potential mechanisms of chemoprevention. *Cancer Metastasis Rev.* 2017; 36(2): 289-303.

91. Schrör K. Aspirin and platelets: the antiplatelet action of aspirin and its role in thrombosis treatment and prophylaxis. *Semin Thromb Hemost.* 1997; 23(4): 349-56.

92. Floyd CN, Ferro A. Mechanisms of aspirin resistance. *Pharmacol Ther.* 2014; 141(1): 69-78.

93. Noma K, Higashi Y. Cilostazol for treatment of cerebral infarction. *Expert Opin Pharmacother.* 2018; 19(15): 1719-1726.

94. Eisert WG. Dipyridamole in antithrombotic treatment. *Adv Cardiol.* 2012; 47: 78-86.

95. Varga-Szabo D., Pleines I., Nieswandt B. Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008; 3: 403-412.

96. O'Toole TE, Mandelman D, Forsyth J, Shattil SJ, Plow EF, Ginsberg MH. Modulation of the affinity of integrin alpha IIb beta 3 (GPIIb-IIIa) by the cytoplasmic domain of alpha IIb. *Science.* 1991; 254(5033): 845-847.

97. De Cristofaro R, Landolfi R, De Candia E, Castagnola M, Di Cera E, Wyman J. Allosteric equilibria in the binding of fibrinogen to platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988; 85(22): 8473-8476.

98. Litvinov RI, Bennett JS, Weisel JW, Shuman H. Multi-step fibrinogen binding to the integrin (alpha)IIb(beta)3 detected using force spectroscopy. *Biophys J.* 2005; 89(4): 2824-2834.

-
99. Fradera X, De La Cruz X, Silva CH, Gelpí JL, Luque FJ, Orozco M. Ligand-induced changes in the binding sites of proteins. *Bioinformatics*. 2002; 18(7): 939-48.
100. Hantgan RR, Rocco M, Nagaswami C, Weisel JW. Binding of a fibrinogen mimetic stabilizes integrin α IIb β 3's open conformation. *Protein Sci*. 2001; 10(8): 1614-1626.
101. Buensuceso C, de Virgilio M, Shattil SJ. Detection of integrin α IIb β 3 clustering in living cells. *J Biol Chem*. 2003; 278(17): 15217-24.
102. Rooney MM, Farrell DH, van Hemel BM, de Groot PG, Lord ST. The contribution of the three hypothesized integrin-binding sites in fibrinogen to platelet-mediated clot retraction. *Blood*. 1998; 92(7): 2374-2381.
103. Lazarovici P, Marcinkiewicz C, Lelkes PI. From Snake Venom's Disintegrins and C-Type Lectins to Anti-Platelet Drugs. *Toxins (Basel)*. 2019; 11(5): 303.
104. Zhao M, Wang C, Jiang X, Pen S. Synthesis of RGD containing peptides and their bioactivities. *Prep Biochem Biotechnol*. 2002; 32(4): 363-80.
105. Swenson S, Ramu S, Markland FS. Anti-angiogenesis and RGD-containing snake venom disintegrins. *Curr Pharm Des*. 2007; 13(28): 2860-2871.
106. Blankenship JC, Balog C, Sapp SK, Califf RM, Lincoff AM, Tchong JE, Topol EJ. Reduction in vascular access site bleeding in sequential abciximab coronary intervention trials. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2002; 57(4): 476-83.
107. Laine L, Jensen DM. Management of patients with ulcer bleeding. *Am J Gastroenterol*. 2012; 107(3): 345-60.
108. Johnstone C, Rich SE. Bleeding in cancer patients and its treatment: a review. *Ann Palliat Med*. 2018; 7(2): 265-273.
109. Rowe AS, Dietrich SK, Phillips JW, Foster KE, Canter JR. Activated Prothrombin Complex Concentrate Versus 4-Factor Prothrombin Complex Concentrate for Vitamin K-Antagonist Reversal. *Crit Care Med*. 2018; 46(6): 943-948.
110. Mehringer SL, Klick Z, Bain J, McNeely EB, Subramanian S, Pass LJ, Drinkwater D, Reddy VS. Activated Factor 7 Versus 4-Factor Prothrombin Complex

Concentrate for Critical Bleeding Post-Cardiac Surgery. *Ann Pharmacother.* 2018; 52(6): 533-537.

111. Kalafatis M, Egan JO, van 't Veer C, Cawthern KM, Mann KG. The regulation of clotting factors. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 1997; 7(3): 241-80.

112. Колмен РУ. Нарушения реакций образования тромбина. Москва: Медицина; 1988. 240 с.

113. Steffel J, Lüscher TF, Tanner FC. Tissue factor in cardiovascular diseases: molecular mechanisms and clinical implications. *Circulation.* 2006;113(5): 722-731.

114. Zhu S, Diamond SL. Contact activation of blood coagulation on a defined kaolin/collagen surface in a microfluidic assay. *Thromb Res.* 2014; 134(6): 1335-1343.

115. He S, Eelde A, Petrini P, Wallen H, Gabrielsson L, Svensson J, Blombäck M, Holmström M. A ROTEM method using APTT reagent and tissue factor as the clotting activators may better define bleeding heterogeneity in moderate or severe haemophilia A (part I: Study in plasma samples). *Thromb Res.* 2018; 171: 7-13.

116. Naudin C, Burillo E, Blankenberg S, Butler L, Renné T. Factor XII Contact Activation. *Semin Thromb Hemost.* 2017; 43(8): 814-826.

117. Didiasova M, Wujak L, Schaefer L, Wygrecka M. Factor XII in coagulation, inflammation and beyond. *Cell Signal.* 2018; 51:257-265.

118. Khanin MA, Rakov DV, Kogan AE. Mathematical Model for the Blood Coagulation Prothrombin Time Test. *Thrombosis Research.* 1998; 89: 227-232.

119. Tans G, Rosing J. Snake venom activators of factor X: an overview. *Haemostasis.* 2001; 31(3-6): 225-33.

120. Kisiel W, Hermodson MA, Davie EW. Factor X activating enzyme from Russell's viper venom: isolation and characterization. *Biochemistry.* 1976; 15(22): 4901-4906.

121. Takeya H, Nishida S, Miyata T, Kawada S, Saisaka Y, Morita T, Iwanaga S. Coagulation factor X activating enzyme from Russell's viper venom (RVV-X). A novel metalloproteinase with disintegrin (platelet aggregation inhibitor)-like and C-type lectin-like domains. *J Biol Chem.* 1992; 267(20): 14109-14117.

-
122. Khan SU, Al-Saleh SS. Biochemical characterization of a factor X activator protein purified from *Walterinnesia aegyptia* venom. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2015; 26(7): 772-777.
123. Yamada D, Sekiya F, Morita T. Prothrombin and factor X activator activities in the venoms of Viperidae snakes. *Toxicon*. 1997; 35(11): 1581-1589.
124. Siigur E, Tõnismägi K, Trummal K, Samel M, Vija H, Subbi J, Siigur J. Factor X activator from *Vipera lebetina* snake venom, molecular characterization and substrate specificity. *Biochim Biophys Acta*. 2001; 1568(1): 90-8.
125. D. Yamada, F. Sekiya, T. Morita. Prothrombin and fX Activator Activities in the Venomes of Viperidae Snakes. *Toxicon*. 1997; 35(11): 1581-1589.
126. Kornalik F, Blombäck B. Prothrombin activation induced by Ecarin - a prothrombin converting enzyme from *Echis carinatus* venom. *Thromb Res*. 1975; 6(1): 57-63.
127. Nishida S, Fujita T, Kohno N, Atoda H, Morita T, Takeya H, Kido I, Paine MJ, Kawabata S, Iwanaga S. cDNA cloning and deduced amino acid sequence of prothrombin activator (ecarin) from Kenyan *Echis carinatus* venom. *Biochemistry*. 1995; 34(5): 1771-1778.
128. Угарова ТП, Платонова ТН, Соловьев ДА. Активатор протромбина из яда эфы песчаной (*Echis multisquamatis*). Доклады АН УССР. 1989; 6: 75-79.
129. Горницкая ОВ, Платонова ТН, Волков ГЛ. Ензимы змеиных ядов. Укр биохим журн. 2003; 75(3): С.45-55.
130. Korolova DS, Chernyshenko TM, Gornytska OV, Chernyshenko VO, Platonova TN. Meizothrombin preparation and its role in fibrin formation and platelet aggregation. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 2014; 5(7): 588-595.
131. Tans G, Govers-Riemslog JW, van Rijn JL, Rosing J. Purification and properties of a prothrombin activator from the venom of *Notechis scutatus scutatus*. *J Biol Chem*. 1985; 260(16): 9366-9372.
132. Ullah A, Masood R, Ali I, Ullah K, Ali H, Akbar H, Betzel C. Thrombin-like enzymes from snake venom: Structural characterization and mechanism of action. *Int J Biol Macromol*. 2018; 114: 788-811.

133. Gusev EI, Skvortsova VI, Suslina ZA, Avakian GN, Martynov MIu, Temirbaeva SL, Tanashian MA, Kamchtnov PR, Stakhovskaia LV, Efremova NM. Batroxobin in patients with ischemic stroke in the carotid system (the multicenter study). *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova*. 2006; 106(8): 31-34.

134. Koh DC, Armugam A, Jeyaseelan K. Snake venom components and their applications in biomedicine. *Cell Mol Life Sci*. 2006; 63(24): 3030-3041.

135 Joshi SA, Gadre KS, Halli R, Shandilya R. Topical use of Hemocoagulase (Reptilase): A simple and effective way of managing post-extraction bleeding. *Ann Maxillofac Surg*. 2014; 4(1): 119.

136. Aslam S, Francis PG, Rao BH, Umamar M, Issac JK, Nair RB. A double blind study on the efficacy of local application of hemocoagulase solution in wound healing. *J Contemp Dent Pract*. 2013; 14(3): 394-400.

137. Qiu M, Zhang X, Cai H, Xu Z, Lin H. The impact of hemocoagulase for improvement of coagulation and reduction of bleeding in fracture-related hip hemiarthroplasty geriatric patients: A prospective, single-blinded, randomized, controlled study. *Injury*. 2017; 48(4): 914-919.

138. Lerner A, Ramesh A, Matthias T. The temperature and pH repertoire of the transglutaminase family is expanding. *FEBS Open Bio*. 2020; 10(4): 492-494.

139. Mitchell JL, Mutch NJ. Let's cross-link: diverse functions of the promiscuous cellular transglutaminase factor XIII-A. *J Thromb Haemost*. 2019; 17(1): 19-30.

140. Козинец ГИ, Макаров ВА. Исследование системы свертывания крови в клинической практике. Москва: Триада-Х; 1997. 396 с.

141. Belitser NV, Anischuk MG, Veklich YuI, Pozdnyakova TM, Gorkun OV, Medved LV. Fibrinogen-containing membrane-associated structures arising at the surfaces of ADP-stimulated blood platelets. *Thromb Res*. 1990 ;59(2):327-38.

142. Korol'ova DS, Chernyshenko VO, Hornyts'ka OV, Platonova TM. Influence of prothrombin cleavage products on platelet activation and aggregation. *Ukr Biokhim Zh*. 2009; 81(5): 58-65.

143. Selliah N, Eck S, Green C, Oldaker T, Stewart J, Vitaliti A, Litwin V. Flow Cytometry Method Validation Protocols. *Curr Protoc Cytom.* 2019; 87(1): e53.

144. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие). Москва: Наука; 1981. 288 с.

145. Webster J, Oxley D. Protein identification by MALDI-TOF mass spectrometry. *Methods Mol Biol.* 2012; 800: 227-40.

146. Долгов ВВ, Свиринов ПВ. Лабораторная диагностика нарушений гемостаза. Тверь: “Триада”; 2005. 227 с.

147. Корольова ДС, Виноградова РП, Чернищенко ТМ, Платонова ТМ., Волков Г.Л. Використання екамуліну – активатору протромбіну із отрути ефі багато лускової в клінічній лабораторній діагностиці. *Лаб. діагностика.* 2006; 37(3): 18-22.

148. Nicoletti I, Migliorati G., Pagliacci M.C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods.* 1991; 139(2): 271-280.

149. Chernyshenko VO. Limited proteolysis of fibrinogen by fibrinogenase from *Echis multisquamatis* venom. *Protein J.* 2015; 34(2): 130-134.

150. Frelinger AL, Du XP, Plow EF, Ginsberg MH. Monoclonal antibodies to ligand-occupied conformers of integrin alpha IIb beta 3 (glycoprotein IIb-IIIa) alter receptor affinity, specificity, and function. *JBC.* 1991; 266(26): 17106-17111.

151. Bennett JS, Hoxie JA, Leitman SF, Vilaire G, Cines DB. Inhibition of fibrinogen binding to stimulated human platelets by a monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983; 80(9): 2417-2421.

152. Hantgan RR, Rocco M, Nagaswami C, Weisel JW. Binding of a fibrinogen mimetic stabilizes integrin alphaIIbbeta3's open conformation. *Protein Sci.* 2001; 10(8): 1614-1626.

153 Buensuceso C, de Virgilio M, Shattil SJ, Buensuceso C. Detection of integrin alpha IIbbeta 3 clustering in living cells. *JBC.* 2003; 278(17): 15217-15224.

154. Hantgan RR, Gibbs W, Stahle MC, Aster RH, Peterson JA. Integrin clustering mechanisms explored with a soluble alphaIIbeta3 ectodomain construct. *Biochim Biophys Acta*. 2004; 1700(1): 19-25.

155. Ginsberg M.H. Integrin regulation / Ginsberg M.H., Partridge A., Shattil S.J. *Curr Opin Cell Biol*. 2005; 5; 509-516.

156. Lugovskoy EV, Gritsenko PG, Kapustianenko LG, Kolesnikova IN, Chernishov VI, Komisarenko SV. Functional role of Bbeta-chain N-terminal fragment in the fibrin polymerization process. *FEBS J*. 2007; 274(17): 4540-4549.

157. Stohniy EM, Chernyshenko VO, Nidialkova NA, Rebriev AV, Varbanets LD, Hadzhynova VE, et al. Mapping of residues of fibrinogen cleaved by protease II of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* IMV B-7465. *Ukr Biochem J*. 2016; 88: 79-86.

158. Hawiger J, Kloczewiak M, Bednarek MA, Timmons S. Platelet receptor recognition domains on the alpha chain of human fibrinogen: structure-function analysis. *Biochemistry*. 1989; 28(7): 2909-2914.

159. Yakovlev S, Medved L. Interaction of fibrin(ogen) with endothelial cell receptor VE-Cadherin: localization of the fibrin-binding site within the third extracellular VE-cadherin domain. *Biochemistry*. 2009; 48: 5171-5179.

160. Sporn LA, Bunce LA, Francis CW. Cell proliferation on fibrin: modulation by fibrinopeptide cleavage. *Blood*. 1995. 86(5): 1802-1810.

161. Jenab M, Thompson LU. The influence of flaxseed and lignans on colon carcinogenesis and beta-glucuronidase activity. *Carcinogenesis*. 1996; 17(6): 1343-1348.

162. Sung MK, Lautens M, Thompson LU. Mammalian lignans inhibit the growth of estrogen-independent human colon tumor cells. *Anticancer Res*. 1998; 18(3): 1405-1408.

163. Pattanaik U, Prasad K. Oxygen Free Radicals and Endotoxic Shock: Effect of Flaxseed. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 1998; 4: 305-318.

164 Prasad K. Reduction of serum cholesterol and hypercholesterolemic atherosclerosis in rabbits by secoisolariciresinol diglucoside isolated from flaxseed // *Circulation*. – 1999. – Vol.99, N 10. – P.1355-62.

165. Corsini E, Dell'Agli M, Facchi A, De Fabiani E, Lucchi L, Boraso MS, Marinovich M, Galli CL. Enterodiol and enterolactone modulate the immune response by acting on nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) signaling. *J Agric Food Chem*. 2010; 58(11): 6678-6684.

166. Kingsnorth AN. Platelet-activating factor. *Scand J Gastroenterol Suppl*. 1996; 219: 28-31.

167. Chignard M, Couedic JPL. Platelet-Activating Factor (PAF-Acether) Secretion from Platelets: Effect of Aggregating Agents. *British Journal of Haematology*. 1980; 46(3): 455-464.

168. Satoh K, Kawakami A, Shirabe S, Tamai M, Sato A, Tsujihata M, et al. Anti-cyclic citrullinated peptide antibody (anti-CCP antibody) is present in the sera of patients with dementia of Alzheimer's type in Asian. *Acta Neurol Scand*. 2010; 121(5): 338-41.

169. Serhan CN, Chiang N, Dalli J, Levy BD. Lipid mediators in the resolution of inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014; 7(2): a016311.

170. Tsironis LD, Mitsios JV, Milionis HJ, Elisaf M, Tselepis AD. Effect of lipoprotein (a) on platelet activation induced by platelet-activating factor: role of apolipoprotein (a) and endogenous PAF-acetylhydrolase. *Cardiovasc Res*. 2004; 63(1): 130-8.

171. Lill G, Voit S, Schrör K, Weber AA. Complex effects of different green tea catechins on human platelets. *FEBS Lett*. 2003; 546(2-3): 265-270.

172. Jin YR, Im JH, Park ES, Cho MR, Han XH, Lee JJ, et al. Antiplatelet activity of epigallocatechin gallate is mediated by the inhibition of PLCgamma2 phosphorylation, elevation of PGD2 production, and maintaining calcium-ATPase activity. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2008; 51(1): 45-54.

173. Matsumura K, Takayama H, Bae JY, Kurihara M, Tsutsumi S, Hyon SH. Preservation of platelets by adding epigallocatechin-3-o-gallate to platelet concentrates. *Cell Transplant*. 2009; 18(5): 521-528.

174. Derliz Mereles, and Werner Hunstein Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) for Clinical Trials: More Pitfalls than Promises? *Int J Mol Sci*. 2011; 12(9): 5592-5603.

175. Wolfram S. Effects of green tea and EGCG on cardiovascular and metabolic health. *J Am Coll Nutr*. 2007; 26(4): 373S-388S.

176. Deka A, Vita JA. Tea and cardiovascular disease. *Pharmacol Res*. 2011 Aug;64(2):136-45.

177. Yang CS, Chen L, Lee MJ, Balentine D, Kuo MC, Schantz SP. Blood and urine levels of tea catechins after ingestion of different amounts of green tea by human volunteers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1998; 7(4): 351-354.

178. Lee MJ, Maliakal P, Chen L, Meng X, Bondoc FY, Prabhu S, et al. Pharmacokinetics of tea catechins after ingestion of green tea and (-)-epigallocatechin-3-gallate by humans: formation of different metabolites and individual variability. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2002; 11(10): 1025-1032.

179. Kim S, Lee MJ, Hong J, Li C, Smith TJ, Yang GY, Seril DN, Yang CS. Plasma and tissue levels of tea catechins in rats and mice during chronic consumption of green tea polyphenols. *Nutr Cancer*. 2000; 37(1): 41-48.

180. Ullmann U, Haller J, Decourt JD, Girault J, Spitzer V, Weber P. Pharmacokinetic characteristics of purified and isolated green tea catechin epigallocatechin gallate (EGCG) after 10 days repeated dosing in healthy volunteers. *Int J Vitam Nutr Res*. 2004; 74(4): 269-278.

181. Palmer BF. Effectiveness of hemodialysis in the extracorporeal therapy of phenobarbital overdose. *Am J Kidney Dis*. 2000; 36(3): 640-643.

182. Twal M, Kiefer P, Salameh A, Schnabel J, Ossmann S, von Salisch S, Krämer K, Sobiraj A, Kostelka M, Mohr FW, Dhein S. Reno-protective effects of epigallocatechingallate in a small piglet model of extracorporeal circulation. *Pharmacol Res*. 2013; 67(1): 68-78.

183. Kim HS, Quon MJ, Kim JA. New insights into the mechanisms of polyphenols beyond antioxidant properties; lessons from the green tea polyphenol, epigallocatechin 3-gallate. *Redox Biol.* 2014; 2: 187-195.

184. Deana R, Turetta L, Donella-Deana A, Donà M, Brunati AM, De Michiel L, Garbisa S. Green tea epigallocatechin-3-gallate inhibits platelet signalling pathways triggered by both proteolytic and non-proteolytic agonists. *Thromb Haemost.* 2003; 89(5): 866-874.

185. Sugisawa A, Umegaki K. Physiological concentrations of (-)-epigallocatechin-3-O-gallate (EGCg) prevent chromosomal damage induced by reactive oxygen species in WIL2-NS cells. *J Nutr.* 2002; 132(7): 1836-1839.

186. Tadano N, Du CK, Yumoto F, Morimoto S, Ohta M, Xie MF, et al. Biological actions of green tea catechins on cardiac troponin C. *Br J Pharmacol.* 2010; 161(5): 1034-1043.

187. Hughes RD, Lane DA, Cella G, Kakkar VV, Langley PG, Williams R. Platelet function during haemoperfusion in acute liver failure. *Int J Artif Organs.* 1980; 3(1): 30-34.

188. Gimson AE, Langley PG, Hughes RD, Canalese J, Mellon PJ, Williams R, et al. Prostacyclin to prevent platelet activation during charcoal haemoperfusion in fulminant hepatic failure. *Lancet.* 1980; 1(8161): 173-175.

189. Stockmann HB, Hiemstra CA, Marquet RL, IJzermans JN. Extracorporeal perfusion for the treatment of acute liver failure. *Ann Surg.* 2000; 231(4): 460-470.

190. Isik Y, Soyoral L, Karadas S, Emre H, Cegin MB, Goktas U. Effectivity of one session charcoal hemoperfusion treatment in severe carbamazepine poisoning. *Iran Red Crescent Med J.* 2013 Aug;15(8):749-51..

191. Li Bassi G, Marti JD, Xiol EA, Comaru T, De Rosa F, Rigol M, et al. The effects of direct hemoperfusion using a polymyxin B-immobilized column in a pig model of severe *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Ann Intensive Care.* 2016 Dec; 6(1): 58.

192. Gil HW, Kim SJ, Yang JO, Lee EY, Hong SY. Clinical outcome of hemoperfusion in poisoned patients. *Blood Purif.* 2010; 30(2): 84-88.

-
193. Pacher P, Steffens S. The emerging role of the endocannabinoid system in cardiovascular disease. *Semin. Immunopathol.* 2009; 31: 63-77.
194. Chen W, Crawford RB, Kaplan BL, Kaminski NE. Modulation of HIVGP120 antigen-specific immune responses *in vivo* by delta9-tetrahydrocannabinol. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2015; 10: 344-355.
195. Mukhopadhyay P, Batkai S, Rajesh M, Czifra N, Harvey-White J, Hasko G, et al. Pharmacological inhibition of CB1 cannabinoid receptor protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *J Am Coll Cardiol.* 2007; 50: 528-536.
196. Pacher P, Kunos G. Modulating the endocannabinoid system in human health and disease-successes and failures. *FEBS J.* 2013; 280: 1918-1943.
197. Andersen H, Nielsen T, Vesterlund T, Grande P, Abildgaard U, Thyssen P, et al. Danish multicenter randomized study on fibrinolytic therapy versus acute coronary angioplasty in acute myocardial infarction: rationale and design of the DANish trial in Acute Myocardial Infarction-2 (DANAMI-2). *Am Heart J.* 2003; 146(2): 234-241.
198. Гулая НМ, Чумак АА, Бердышев АГ, Мегедь ОФ, Горидько ТН, Киндрук НЛ, и др. Влияние N-стеароилэтаноламина на содержание свободных аминокислот в крови и печени крыс при экспериментальном ожоге. *Укр биохим журн.* 2009; 81(2): 29-31.
199. Бердышев АГ, Косякова ГГ, Гулая НМ. N-стеароилэтаноламин модулирует ЛПС-индуцированную продукцию активных форм кислорода и транслокацию NF-κB в макрофагах. *Укр биохим журн.* 2017. 89(5): 62-69.
200. Spinelli SL, O'Brien JJ, Bancos S, Lehmann GM, Springer DL, Blumberg N, Francis CW, Taubman MB, Phipps RP. The PPAR-Platelet Connection: Modulators of Inflammation and Potential Cardiovascular Effects. *PPAR Res.* 2008; 2008: 328172.
201. Maccarrone M, Bari M, Del Principe D, Finazzi-Agrò A. Activation of human platelets by 2-arachidonoylglycerol is enhanced by serotonin. *Thromb Haemost.* 2003; 89(2): 340-347.

202. Górska P. Principles in laboratory animal research for experimental purposes. *Med Sci Monit.* 2000; 6(1): 171-180.

203. Chernyshenko VO, Korolova DS, Nikolaienko TV, Dosenko VE, Pashevin DO, Kalchenko VI, et al. Calix[4]arene C-145 effects on cellular haemostasis. *Biotechnologia Acta.* 2016; 9(3): 37-43.

204 Broos K, Feys HB, De Meyer SF, Vanhoorelbeke K, Deckmyn H. Platelets at work in primary hemostasis. *Blood Reviews.* 2011; 25: 155-167.

205 Markland FS, Swenson S. Fibrolase: Trials and Tribulations. *Toxins (Basel).* 2010; 2(4): 808.

206. Ringwala SM, Dibattiste PM, Schneider DJ. Effects on platelet function of a direct acting antagonist of coagulation factor Xa. *J Thromb Thrombolysis.* 2012; 34(3): 291-296.

207. Sinzinger H, Fitscha P, Peskar BA. Platelet half-life, plasma thromboxane B2 and circulating endothelial-cells in peripheral vascular disease. *Angiology.* 1986; 37(2): 112-118.

208. Antovic A. Screening haemostasis--looking for global assays: the Overall Haemostasis Potential (OHP) method – a possible tool for laboratory investigation of global haemostasis in both hypo- and hypercoagulable conditions. *Curr Vasc Pharmacol.* 2008; 6(3): 173-85.

209. He S, Antovic A, Blombäck M. A simple and rapid laboratory method for determination of haemostasis potential in plasma. II. Modifications for use in routine laboratories and research work. *Thromb Res.* 2001; 103(5): 355-361.

210. He S, Bremme K, Blombäck M. A laboratory method for determination of overall haemostatic potential in plasma. I. Method design and preliminary results. *Thromb Res.* 1999; 96(2): 145-156.

211. Белозерская ГГ, Макаров ВА, Жидков ЕА, Малыгина ЛС, Сергеева ОА, Тер-Арутюнянц АА, Макарова ЛВ. Гемостатические средства местного действия (обзор). *Химико-фармацевтический журнал.* 2006; 40(7): 9-15.

212. Gegel B, Burgert J, Gasko J, Campbell C, Martens M, Keck J, Reynolds H, Loughren M, Johnson D. The effects of QuikClot Combat Gauze and movement on hemorrhage control in a porcine model. *Mil Med.* 2012; 177(12): 1543-1547.

213. Makuuchi M, Sano K. The surgical approach to HCC: our progress and results in Japan. *Liver Transpl.* 2004; 10(2): 46-52.

214. Kauvar DS, Lefering R, Wade CE. Impact of hemorrhage on trauma outcome: an overview of epidemiology, clinical presentations, and therapeutic considerations. *J Trauma.* 2006; 60: 3-11.

215. Acheson EM, Kheirabadi BS, Deguzman R, Dick EJ, Holcomb JB. Comparison of hemorrhage control agents applied to lethal extremity arterial hemorrhages in swine. *J Trauma.* 2005; 59: 865-874.

216. Arnaud F, Parreño-Sadalan D, Tomori T, Delima MG, Teranishi K, Carr W, et al. Comparison of 10 hemostatic dressings in a groin transection model in swine. *J Trauma.* 2009; 67(4): 848-855.

217. Schonauer C, Tessitore E, Barbagallo G, Albanese V, Moraci A. The use of local agents: bone wax, gelatin, collagen, oxidized cellulose. *Eur Spine J.* 2004; 6: 36-40.

218. Pusateri AE, McCarthy SJ, Gregory KW, Harris RA, Cardenas L, McManus AT, Goodwin CJ. Effect of a chitosan-based hemostatic dressing on blood loss and survival in a model of severe venous hemorrhage and hepatic injury in swine. *J Trauma.* 2003; 54: 177-182.

219. Kheirabadi BS, Edens JW, Terrazas IB, Estep JS, Klemcke HG, Dubick MA, Holcomb JB. Comparison of new hemostatic granules/powders with currently deployed hemostatic products in a lethal model of extremity arterial hemorrhage in swine. *J Trauma.* 2009; 66: 316-326.

220. Fox C.J., Patel B., Clouse W.D. Trauma Issue. Update on wartime vascular injury. *Perspect Vase Surg Endovasc Ther.* 2011; 23: 7-12.

221. Clay JG, Grayson JK, Zierold D. Comparative testing of new hemostatic agents in a swine model of extremity arterial and venous hemorrhage. *Mil Med.* 2010; 175: 280-284.

222. Kozen BG, Kircher SJ, Henao J, Godinez FS, Johnson AS. An alternative hemostatic dressing: comparison of CELOX, HemCon, and QuikClot. *Acad Emerg Med.* 2008; 15: 74-81.

223. Holcomb J, Caruso J, McMullin N, Wade CE, Pearse L, Oetjen-Gerdes L, Champion HR, Lawnick M, Farr W, Rodriguez S, Butler F. Causes of death in US Special Operations Forces in the global war on terrorism: 2001-2004. *US Army Med Dep J.* 2007: 24-37.

224. Белозерская ГГ, Макаров ВА, Абоянц РК, Истранов ЛЛ, Малыгина ЛС, Жидков ЕА. Аппликационное средство гемостаза при капиллярном и паренхиматозном кровотечении. *Хирургия.* 2004; 9: 55-59.

225. Северцев АН, Брехов ЕИ, Миронов НП. Использование местных фармакологических средств для достижения окончательного гемостаза при резекциях печени. *Хирургия.* 2001; 1; 86-90.

226. Rhee P, Brown C, Martin M, Salim A, Plurad D, Green D, Chambers L, Demetriades D, Velmahos G, Alam H. QuikClot use in trauma for hemorrhage control: case series of 103 documented uses. *J Trauma.* 2008; 64(4): 1093-1099.

227. Kumar VA, Wickremasinghe NC, Shi S, Hartgerink JD. Nanofibrous Snake Venom Hemostat. *ACS Biomater Sci Eng.* 2015; 1(12): 1300-1305.

228. Broos K, Feys HB, De Meyer SF, Vanhoorelbeke K, Deckmyn H. Platelets at work in primary hemostasis. *Blood Rev.* 2011; 25(4): 155-167.

229. Zucker WH, Mason RG. Ultrastructural aspects of interactions of platelets with microcrystalline collagen. *Am J Pathol.* 1976; 82(1): 129-142.

230. Mizuno K., Ikeda T., Ikoma K., Ishibashi H., Tonomura H., Nagae M., et al. Evaluation of resorption and biocompatibility of collagen hemostats in the spinal epidural space. *Spine J.* 2014; 14(9): 2141-2149.

231. Hait MR, Robb CA, Baxter CR, Borgmann AR, Tippet LO. Comparative evaluation of Avitene microcrystalline collagen hemostat in experimental animal wounds. *Am J Surg.* 1973; 125(3): 284-287.

232. Pina S, Ribeiro VP, Marques CF, Maia FR, Silva TH, Reis RL, et al. Scaffolding Strategies for Tissue Engineering and Regenerative Medicine Applications. *Materials (Basel)*. 2019; 12(11): 1824.

233. Seon GM, Lee MH, Kwon BJ, Kim MS, Koo MA, Kim D, et al. Functional improvement of hemostatic dressing by addition of recombinant batroxobin. *Acta Biomater*. 2017; 48: 175-185.

234. Moore AN, Hartgerink JD Self-Assembling Multidomain Peptide Nanofibers for Delivery of Bioactive Molecules and Tissue Regeneration. *Acc Chem Res*. 2017; 50(4): 714-722.

235. Chvapil M, Kronenthal L, Van Winkle W Jr. Medical and surgical applications of collagen. *Int Rev Connect Tissue Res*. 1973; 6: 1-61.

236. DeLustro F, Smith ST, Sundsmo J, Salem G, Kincaid S, Ellingsworth L. Reaction to injectable collagen: results in animal models and clinical use. *Plast Reconstr Surg*. 1987; 79(4): 581-594.

237. Timpl R. Antibodies to collagen and procollagen. *Meth Enzymol*. 1982; 82: 482-498.

238. Reddy GK, Enwemeka CS. A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissues. *Clin Biochem*. 1996; 29(3): 225-229.

239. Prevost N, Wolfe D, Tognolini M, Brass LF. Contact-dependent signaling during the late events of platelet activation. *J Thromb And Haemost*. 2003; 1(7): 1613-1627.

240. Savage B, Almus-Jacobs F, Ruggeri ZM. Specific synergy of multiple substrate-receptors interaction in platelet thrombus formation under flow. *Cell*. 1998; 94(4): 657-666.

241. Falati S, Gross P, Merrill-Skoloff G, Furie BC, Furie B. Real-time in vivo imaging of platelets, tissue factor and fibrin during arterial thrombus formation in the mouse. *Nat Med*. 2002; 8(10): 1175-81.

242. Davies PF, Tripathi SC. Mechanical stress mechanisms and the cell. An endothelial paradigm. *Circ Res*. 1993; 72(2): 239-245.