

Міністерство освіти і науки України
Національний університет «Києво-Могилянська академія»
Факультет природничих наук
Кафедра лабораторної діагностики біологічних систем

Магістерська робота

на тему **«РЕГУЛЯЦІЯ ПРОЦЕСУ УТВОРЕННЯ ТА НАСТУПНОГО
ЛІЗИСУ ФІБРИНУ ЗА УЧАСТІ ТРОМБОЦИТІВ»**

Виконала: студентка 2-го року
навчання

Галузь знань: 09 Біологія

Спеціальність: 091 Біологія

Освітньо-наукова програма:
Лабораторна діагностика біологічних систем

Дудник Катерина Василівна

Керівники:

Паталах І.І.,

ст.н.с. відділу хімії та біохімії ферментів
Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна НАНУ,
к.б.н.

Антонюк Н.Г.,

кандидат хімічних наук, доцент кафедри
хімії НаУКМА

Рецензент:

Кваліфікаційну роботу захищено
з оцінкою _____

Секретар ЕК

Пахаренко М. В.

«9» червня 2020 року

Київ – 2020

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	4
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	7
1.1 Система утворення та лізису полімерного фібрину.....	7
1.1.1. Структура фібриногену.....	7
1.1.2. Полімеризація фібрину	8
1.1.3. Механізм фібринолізу	11
1.2 Вплив тромбоцитів на механізм фібринолізу.	13
1.2.1. Зв'язування плазміногену з тромбоцитами.....	14
1.2.2. Субпопуляції тромбоцитів.....	14
1.3 Вплив XIII фактору на систему фібринолізу	16
1.3.1. Структура фактору XIII та його активація.	16
1.3.2. Механізм впливу FXIII на фібриноген.	17
1.4 Протеїн С, його структура та функції	19
1.4.1. Ендотелій – залежна активація протеїну С	20
1.4.2. Ендотелій-незалежні шляхи активації протеїну С	21
РОЗДІЛ 2 ОБ'ЄКТ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	24
2.1 Об'єкти дослідження	24
2.2 Матеріали, реактиви та обладнання, використані в роботі.....	24
2.3 Методи дослідження.....	24
2.3.1. Отримання зразків крові, плазми збагаченої на тромбоцити та нативних тромбоцитів	24
2.3.2. Мічення Pg FITC для визначення ступеню зв'язування Pg з	

клітинами	26
2.3.3. Визначення рівня FITC- плазміногену, асоційованого з поверхнею неактивованих та тромбін-активованих тромбоцитів.....	27
2.3.4. Продукування тромбіну та згортання та лізис в PRP та PFP при участі APC.....	28
2.3.5. Підготовка проб до конфокальної мікроскопії.....	29
2.3.6. Статистична обробка даних.....	30
РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	31
3.1 Моделювання процесів згортання та наступного лізису в PRP та PFP в системі in vitro	31
3.1.1. Вплив тромбоцитів на процес згортання та лізису	31
3.1.2. Вплив тромбоцитів на продукцію тромбіну в процесі згортання та лізису	36
3.1.3. Вплив тромбоцитів на структуру згустків	39
3.2 Участь APC в регуляції фібриноутворення та тромбіноутворення, опосередкованій тромбоцитами.....	41
3.3 Визначення рівня FITC-плазміногену, асоційованого з поверхнею неактивованих та тромбін-активованих тромбоцитів	46
УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	53
ВИСНОВКИ.....	58
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	59
ДОДАТКИ.....	67

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

FXII, FXI, FIX, FX, FVII, FXIII, FV, FVIII – фактори згортання крові.

FpA та FpB – Фібринопетид А та Фібринопептид В (Fibrinopeptide A та B, FpA та FpB)

NTP – N-термінальний домен (N-Terminal Domain, NTP)

LBS – сайти зв'язування лізину (Lysine Binding Site, LBS)

t-PA – Тканинний активатор плазміногену (Tissue Plasminogen Activator, t-PA)

EGF (-like domain) – мотив, схожий на епітеліальний фактор росту

GPIIb/IIIa (α IIb β 3) – та глікопротеїн IIb/IIIa

PS – Фосфатидилсерин (Phosphatidylserine, PS)

FXIII-A2B2 – неактивований Протеїн С

FXIII-A2* – Активований Протеїн С

PAI-2 – інгібітор активатора плазміногену 2 (Plasminogen activator inhibitor-2, PAI-2)

TAFI – інгібітор фібринолізу, що активується тромбіном (Thrombin activable fibrinolysis inhibitor, TAFI)

APC – активований протеїн С (Activated Protein C, APC)

PC – Протеїн С (Protein C, PC)

EPSCR – рецептор PC ендотеліальних клітин (Endothelial cell protein C receptor, EPSR)

TM – Тромбіномодулін (Thrombomodulin, TM)

ПТК (PPSB) – протромбіновий комплекс (Prothrombin-Proconvertin-Stuart Factor-Antihemophilic Factor B, PPSB)

PFP – плазма, збіднена на тромбоцити (Platelet-Free Plasma, PFP)

PRP – плазма, збагачена на тромбоцити (Platelet-Rich Plasma, PRP)

FITC-Pg – плазміноген, асоційований з флюоресцентним барвником FITC (Fluorescein isothiocyanate - Plasminogen)

ВСТУП

Загальновідомо, що система гемостазу призначена для підтримки постійної рівноваги між коагуляцією та фібринолізом, яка регулюється багатьма факторами, залученими до цих процесів. Згортання крові забезпечується функціонуванням цілого каскаду факторів, які в нормі знаходяться в неактивованому стані, з клітинами крові та пошкодженим ендотелієм. Добре вивчені молекулярні механізми роботи каскаду згортання крові, тоді як деякі функції тромбоцитів, як регуляторів гемостазу, залишаються невивченими. Традиційно, тромбоцити вважають регуляторами системи згортання крові і ця їх функція полягає в двох ключових властивостях, а саме: здатності до адгезії та агрегації в місцях пошкодження судин, а також спроможності до підтримки згортання крові шляхом контролю генерування тромбіну та регуляції фібриноутворення.

Поряд з цими знаннями про функції та роль тромбоцитів, зараз починають формуватися нові уявлення про можливості тромбоцитів не лише стимулювати утворення тромбу для запобігання надмірної крововтрати, але і розчиняти його тоді, коли це потрібно для попередження блокування нормального кровотоку судин. Зокрема, вже встановлено, що тромбоцити мають здатність до зв'язування плазміногену на своїй поверхні [1]. Але багато альтернативних шляхів впливу тромбоцитів на процеси лізису та регуляції балансу в системі згортання-лізис залишаються невиявленими, що підтверджує актуальність досліджень в даному напрямку.

Таким чином, метою нашої роботи було дослідити регуляторний вплив тромбоцитів на процес згортання та наступного лізису фібринового згустку а також встановити можливі механізми цієї взаємодії.

Відповідно до мети було поставлено такі завдання:

1. Виявити вплив тромбоцитів на регуляцію фібриноутворення за участі

внутрішнього каскаду згортання та тромбін-залежної петлі позитивного зворотного зв'язку;

2. Дослідити медіаторну роль тромбоцитів у забезпеченні антикоагулянтної функції APC;
3. Дослідити зміни структури фібринового згустку, опосередковані тромбоцитами, інкорпорованими у фібриновий матрикс;
4. Порівняти ефективність зв'язування плазміногену з поверхнею тромбоцитів, нативних та активованих тромбіном;
5. Перевірити вплив білків ПТК на здатність тромбоцитів зв'язувати плазміноген, дослідити залежність цього процесу від CaCl_2 ;
6. Виявити механізм ПТК-залежної асоціації плазміногену з поверхнею нативних та активованих тромбоцитів.

Об'єктом наукового дослідження є процес згортання і наступного лізису фібринового згустку, а також прокоагулянтна та профібринолітична функції тромбоцитів.

Предметом наукового дослідження є властивості та характеристики процесу згортання крові та її лізису, а також вплив тромбоцитів та активованого протеїну С на ці процеси.

Матеріалом для дослідження була цільна кров донорів-волонтерів, які давали інформовану згоду. Всі дослідження були підтвердженні місцевим етичним комітетом Інституту біохімії ім. Палладіна НАН України.

РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Система утворення та лізису полімерного фібрину

У фізіологічних умовах як згортання, так і фібриноліз ретельно регулюються чітко визначеною кількістю субстратів, активаторів, інгібіторів, кофакторів та рецепторів. Молекулярні зв'язки між цими системами дозволяють локалізувати, своєчасно видалити постійні або гостро індуковані відкладення фібрину. Основною ланкою є сам фібрин, а також його протеаза плазмін, інгібітори та активатори фібринолізу[2].

1.1.1. Структура фібриногену. Функції фібрину та фібриногену регулюються інтерактивними сайтами на фібрині(огені), деякі з яких є замаскованими або інакше недоступними на фібриногені і зазвичай стають доступними внаслідок утворення фібрину або фібриноген-поверхневих взаємодій [2].

Молекули фібриногену являють собою гетерогексамерний глікопротеїн 45 нм, що складається з двох зовнішніх доменів, кожен з яких з'єднаний суперспіральною сегментом з центральним доменом Е (рис. 1.1).

Молекула складається з двох однакових субодиниць, кожна з яких утворена трьома ідентичними поліпептидними ланцюгами, що називаються А α , В β і γ [3]. І субодиниці, і ланцюги зв'язані між собою дисульфідними зв'язками і згруповані в декілька структурних доменів: центральний Е, два ідентичних кінцевих домени D та α C –домени (Рис. 1.1).

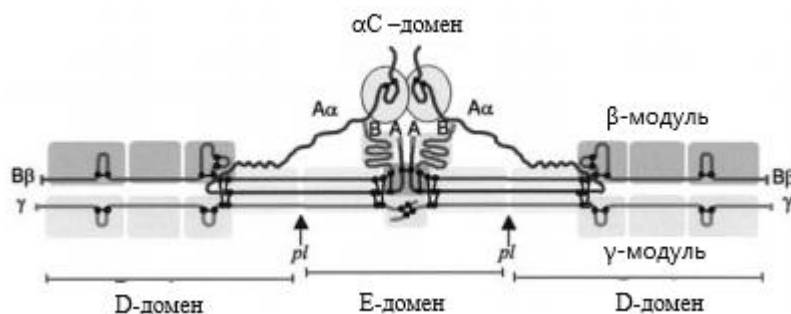


Рис.1.1. Структура фібриногену. Адаптовано з [4].

Центральний домен Е являє собою димер, який утворюється з NH₂-кінцевих частин всіх шести ланцюгів. Трохи потовщені амінотермінальні кінці Aα та Bβ ланцюгів представляють собою фібринопептиди А та В, які видаляються тромбіном при перетворенні фібриногену в фібрин.

Кожен D-домен утворений з COOH-термінальних кінців Bβ та γ-ланцюгів, а також частини Aα, а αC – домен складається з COOH-термінальних кінців Aα-ланцюгів. Bβ та γ-ланцюги приєднуються до центрального домену потрійними спіралями з нерегулярними структурами в середині (так звана суперспіральна ділянка), які чутливі до протеолізу, через що легко розщеплюються плазміном з утворенням продуктів деградації фібрину.

В центральних ділянках Е – домену є області полімеризації А та В, які включають NH₂-кінцеві послідовності Gly-Pro-Arg і Gly-His-Arg, відповідно. Взаємодія А і В областей з комплементарними ділянками а і б, що розміщені в дистальній області D-доменів сусідніх молекул є критичними для наступної полімеризації фібрину[4].

1.1.2. Полімеризація фібрину. Полімеризація фібрину ініціюється відщепленням фібринопептидів А та В та утворенням мономерів фібрину (αβγ). Фібринопептиди А (FrA) і В (FrB) відщеплюються від N-кінців Aα- и Bβ-ланцюгів фібриногену за участі тромбіну [3]. FrA відщеплюється раніше, ніж FrB, але по мірі полімеризації швидкість вивільнення FrB збільшується.

Видалення фібринопептидів призводить до самовільної полімеризації

мономерів в фібрин (Рис.1.2).

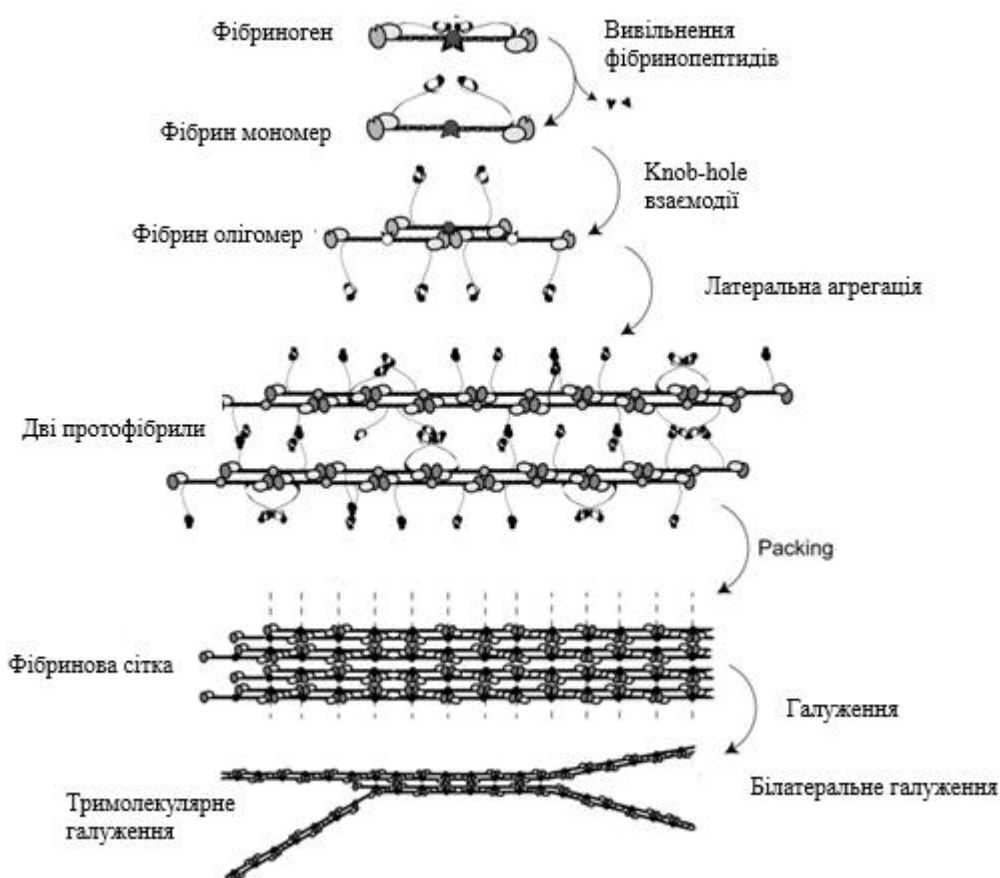


Рис.1.2. Полімеризація фібриногену. Адаптовано з [5].

Втрата фібринопептиду А залишає вільним сайт термінальної полімеризації з амінокислотною послідовністю Gly-Pro-Arg (GPA) та забезпечує взаємодію А-а з утворенням дволанцюгових протофібрил [5]. Відкриті сайти а на γ -ланцюзі дуже важливі для полімеризації: якщо вони заблоковані пептидом GPRP[6], або порушені точковою мутацією ключового залишку γ Asp364 [7], то полімеризація фібрину не відбувається. На протилежному боці, фібринопептид В залишає вільним N-кінцевий мотив β -ланцюга В і відбувається взаємодія В-в. Таким чином створюється димер фібрину, який може рости в боковому напрямку шляхом додавання мономерів і таким чином утворюючи протофібрилу [5].

Відщеплення FrA без відщеплення FrB призводить до утворення

згустків, що містять більш тонкі фібрили, чим ті, що ініціюються відщепленням обох фібринопептидів. Це говорить про те, що взаємодії B:b беруть участь в латеральній агрегації протофібрил [5]. Окремо слід сказати про роль α C-домену в полімеризації фібрину. Після утворення desAB-мономеру фібрину α C-домени дисоціюють від кожного мономеру та забезпечують формування протофібрил та латеральної агрегації через інтермолекулярні взаємодії [8].

По мірі того, як волокна фібрину збираються внаслідок латеральної асоціації і ростуть в довжину, вони також розгалужуються, утворюючи трьохвимірну сітку. Електронна мікроскопія показала, що існує як мінімум два механізми, за якими можуть утворюватись точки галуження [9]. Один із них відомий як «двохстороннє сполучення» [10] та походить від двох протофібрил, які підлягають неповній бічній агрегації, але розходяться в дві різні протофібрили, кожна з яких дає нове волокно. Інший механізм, який називається «рівностороннім з'єднанням», утворюється, коли фібриновий мономер приєднується до кінця протофібрил тільки одним зв'язком А-а так, що і мономерна молекула, і протофібрила можуть рости незалежно одна від одної, утворюючи два різних волокна [11].

Зшивання протофібрил починається з індукування тромбіном конверсії фактора XIII в трансглютаміназу (XIIIa), що здатний зв'язувати бокові ланцюги лізину та глутаміну ізопептидними ланцюгами [12]. Таким чином можуть формуватися шість таких зшивок між сусідніми мономерами фібрину. Початкове зшивання включає в себе γ -ланцюги з двох молекул фібрину в антипаралельному напрямку. Після цього, повільніше залучається α ланцюг, створюючи більш запутану сітку для формування товстих волокон з високою міцністю. Цьому допомагає фібронектин, адгезивний білок, який під впливом Фактора XIII підвищує еластичність грубого згустку шляхом поперечної зшивки протофібрил [13]. Отже, утворюються γ - γ -прошивки, що з'єднують протофібрили в горизонтальному напрямку. Крім того, за участі фактору XIIIa

формуються зв'язки між α C-доменами, що забезпечують латеральну асоціацію протофібрил.

1.1.3. Механізм фібринолізу. Утворення фібрину являється проміжною стадією гемостазу з наступним розчиненням фібрину після утворення згустку. Для того, щоб передбачити блокування просвіту судин і припинення непереривності кровотоку і існує фібринолітична система. Фібриноліз складається власне з двох стадій – стадії перетворення плазміногену в плазмін тканинним активатором плазміногену та стадії деградації фібрину.

Важливим для цієї функції є активація плазміну з плазміногену і спорідненість останнього до фібрину. Існує 2 форми плазміногену: нативний Glu-плазміноген та Lys-плазміноген (Рис. 1.3).

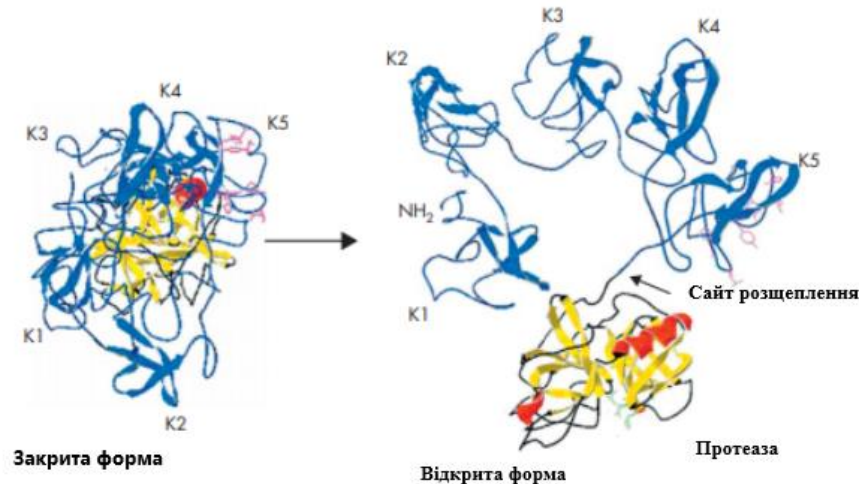


Рис.1.3. Структура та конформації плазміногену. Адаптовано з [14].

Glu-плазміноген являється білком, що складається з семи доменів, N-термінального домену (NTP), кринглів 1-5 та серин-протеазного домену, які поєднано міждоменними зв'язками, особливо важливими є зв'язки між Lys50, Arg 69 и Arg70 в NTP та кринглами 4 і 5, що допомагають підтримувати замкнуту структуру [15]. Крингли 1 та 4 містять сайти зв'язування лізину (LBS, lysine-binding site), за участі яких плазміноген зв'язується з фібрином [15,16].

Зокрема, крингл-домен 5 плазміногену містить LBS слабкої афінності,

які взаємодіють з аміно-кінцевим пептидом Glu-плазміногену і сприяють переважанню закритої конформації. Стабільну, відкриту форму, нездатну перейти в компакту дає протеолітичне видалення амінокінцевого пептиду плазміном (розщеплення по Lys 62, Arg 68 чи Lys 77) [17].

Тканинний активатор плазміногену, t-PA (tissue plasminogen activator), зустрічається в вигляді одно- або дво-ланцюгового білка, який складається з пальцеподібного, EGF-подібного та двох крингл-подібних модулів і модуля серінової протеази. На відміну від плазміногену, він проявляє свою активність як в одно- так і в дволанцюговій формі [18,19]. Декілька кринглів плазміногену та 2-й крингл t-PA містять Lys-зв'язуючі сайти, які відіграють вирішальну роль в їх взаємодії з фібрином [4]. На сьогодні локалізовані сайти зв'язування на фібрині A α 148-160 (який є крингл-залежним сайтом зв'язування плазміногену) та γ 312- 324 (як сайт для зв'язування t-PA через крингловий домен). Загалом існує 8 С-кінцевих лізинів в фібрині, видалення кожного з яких може значно знизити стимуляцію активації плазміногену t-PA [20]. Крім того, t-PA зв'язується з фібрином лізин-незалежним способом через його пальцеподібний домен, на такі взаємодії приходить близько 80% взаємодій t-PA з фібрином [21]. Взаємодія з фібрином забезпечує ефективну активацію плазміногену за допомогою t-PA, що призводить до генерації активного плазміну, який розщеплює нерозчинний фібрин до розчинних продуктів його деградації [4].

Фізіологічно, фібриноген розщеплюється поступово, з утворенням фрагментів X, Y, D і E, відповідно. Розщеплення фібриногену починається з С-кінця ланцюга, після цього від'єднання короткого пептиду від N-кінця ланцюга B β – тоді молекула перетворюється в X-фрагмент. Після асиметричного розщеплення утворюються два фрагменти, D і Y, а фрагмент Y в свою чергу розщеплюється на фрагменти E і D [22].

Після зшивання фібрин розщеплюється повільніше та дає різні похідні в результаті солюбілізації. Це нековалентно зв'язані комплекси, відомі як

продукти розщеплення фібрину(Рис. 1.4).

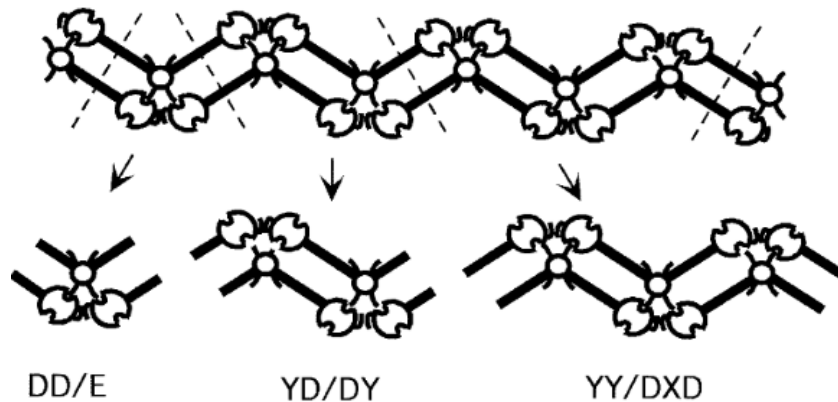


Рис1.4. Продукти деградації фібрину [13].

Найменшими продуктами розщеплення фібрину є D-димер та DD/E-фрагмент, який є результатом розщеплення ланцюга в середині протофібрил зі збереженням нековалентних зв'язків між центральним та кінцевим доменами [9,13]. Різні проміжні продукти (оліпептиди та олігомери) відомі як XL-DFP (перехреснозв'язані продукти деградації фібрину) також можуть утворюватися в результаті протеолітичної деградації [13].

Оскільки єдиним джерелом D-димеру є прошитий фібрин, високий рівень D-димеровмісних продуктів в крові широко використовується в якості лабораторного маркера внутрішньосудинних відкладень фібрину при локальних тромбозах [23]. Продукти розпаду фібрину містять фрагменти фібрин(оген)у з неповними наборами сайтів зв'язування, які конкурентно інгібують полімеризацію фібрину. Це може призвести до утворення великих олігомерних структур, що містять неполімеризовані молекули фібрину, які називаються "розчинними фібриновими комплексами" [9].

1.2. Вплив тромбоцитів на механізм фібринолізу

Зв'язування фібринолітичних білків з клітинними поверхнями є фундаментальною подією для локалізації фібринолітичної активності. Тромбоцити мають вирішальне значення для гомеостатичної відповіді. Їх роль в

коагуляції добре відома проте, протягом певного часу залишались нез'ясованими механізми їх впливу на систему фібринолізу.

1.2.1. Зв'язування плазміногену з тромбоцитами. Всі клітини, окрім еритроцитів, мають здатність зв'язувати плазміноген. Як правило, рецептори плазміногену мають низьку спорідненість, високу щільність та розповсюдженість. Зокрема, тромбоцити мають високу здатність до зв'язування плазміногену: приблизно 40000 молекул на клітину. Стимуляція тромбіном збільшує цю здатність в 3-9 разів [24]. Загалом, було декілька кандидатів на зв'язування плазміногену з тромбоцитами, наприклад α -антиплазмін та багатий гістидином глікопротеїн [1]. З білків поверхні мембрани тромбоцитів GPIIb та глікопротеїн IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) були потенційними кандидатами на роль зв'язуючих молекул. Внаслідок серії дослідів [1] було показано, що існує два механізми зв'язування плазміногену з поверхнею мембран тромбоцитів: тромбін залежний та тромбін незалежний. Останнє включає в себе взаємодію плазміногену з мембрано-асоційованими білками, такими як актин, тромбоспондин, білки з С-кінцевими залишками лізину [25].

Комплекс GPIIb/IIIa (інтегрин α IIb β 3) може брати участь в зв'язуванні плазміногену з тромбоцитами, стимульованими тромбіном. Його основна функція – взаємодія фібриногену з тромбоцитами для забезпечення агрегації тромбоцитів. Фібриноген зв'язується з α IIb β 3 через 3 різних сайти: два сайти Arg-GlyAsp (RGD), які знаходяться в ланцюзі A α та карбокситермінальна послідовність AGDV в γ -ланцюзі [26]. Але окрім основної функції цей білок має ще одну – зв'язування плазміногену, чим забезпечує прискорення фібринолізу. Вважається, що зв'язування плазміногену відбувається за рахунок фібриногену [24].

1.2.2. Субпопуляції тромбоцитів. Дослідження ролі тромбоцитів в підтриманні гомеостазу ускладнюється утворенням різних популяцій

активованих тромбоцитів, кожна з яких має власні особливості та, відповідно, функції.

PS-експонуючі тромбоцити. Це окрема субпопуляція тромбоцитів, які при активації експонують PS на поверхню, мають високий рівень цитозольного Ca^{2+} , округлу форму та здатність зв'язуватись з факторами згортання, такими як FV та FX. Також, вони є джерелом тромбіну [27]. Досліди з ізольованими факторами згортання крові показали, що PS-експонуючі тромбоцити посилюють роботу теназного-протромбіназного комплексу майже в 1000 разів [28,29]. Дослідження *ex vivo* також показали, що тромбоцити під довготривалим впливом високого рівня Ca^{2+} також каталізують утворення фібринової сітки [30].

Тромбоцити, що здатні до агрегації та ретракції згустків. Агреговані тромбоцити в тромбі характеризуються сферичною формою, присутністю активного $\alpha\text{IIb}\beta 3$ на їх поверхнях та здатністю зв'язувати фібриноген [27,31]. Цікаво відмітити, що агреговані тромбоцити з інтегринами відіграють вирішальну роль в ретракції фібринового згустку. Цей процес, що залежить від зв'язування фібриногену тромбоцитами і передачі сигналів інтегринами, забезпечує передачу сигналів актин-міозинового цитоскелету тромбоцитів в сполучення фібринових волокон навколо тромбоцитів. Таким чином дифузна фібринова сітка перетворюється в невеликий щільний згусток. Оскільки PS-експонуючі тромбоцити не агрегують, мають неактивні інтегрини та порушений актиновий цитоскелет, дуже малоймовірно, що вони беруть участь в ретракції. Це вказує на значну різницю між агрегованими та PS-експонуючими тромбоцитами – в той час, як другі продукують FXa та тромбін, перші зменшують згусток шляхом його стискання [27,32].

«Укутані (coated)» тромбоцити. Альберіо і співавтори в 2001 році [33] описали популяцію тромбоцитів, що експонує поверхнево-зв'язаний Va фактор з α -гранул, та назвали її укутаними тромбоцитами, тому що вони з'являються

при одночасній стимуляції колагеном та тромбіном. Ця субпопуляція складає приблизно 30% всіх тромбоцитів, має здатність експонувати PS на поверхню при активації [34] та, як було показано, використовує 5-гідрокситриптамін (5-HT) для утримання прокоагулянтних білків, вивільнених з α -гранул (таких, як тромбоспондин та фібриноген) на поверхні тромбоцитів. Також вони можуть містити фактори VIII, IX и X [35,36]. Відомо, що укутані тромбоцити підтримують прокоагулянтну відповідь, прискорюючи напрацювання тромбіну протромбіназним та теназним комплексами, але в той же час, є докази, що укутані тромбоцити також мають і антикоагулянтні властивості [37].

Апоптотичні та некротичні тромбоцити. Schoenwaelder та співавт. в своїй роботі [38] повідомили, що протипухлинні препарати ABT-737 і ABT-263 викликають експонування PS на поверхню у відповідь на незначну дію цитозольного кальцію. Ці сполуки інгібують антиапоптичні білки Bcl-2 і Bcl-x та викликають активацію Bax-Bak для початку мітохондріально-залежного шляху апоптозу і наступної появи PS, залежної від каспази, а не як завжди, від дії агоністів. Цікаво, що подібний ефект спричинює старіння тромбоцитів [39]. Хоча тести *in vitro* показали, що старіючі та апоптичні тромбоцити мають прокоагулянтний потенціал та підтримують утворення тромбіну, але сумнівно чи грають ці тромбоцити подібну роль в фізіологічних умовах, оскільки вони будуть поглинатися апоптосомами [27].

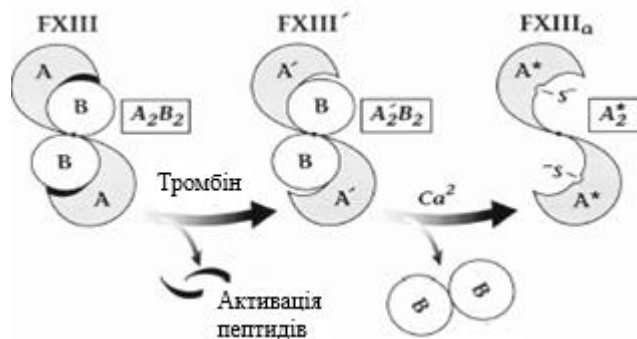
1.3. Вплив XIII фактору на систему фібринолізу

Хоча FXIII має більше ніж 140 потенційних субстратів в плазмі [40], він фактично проявляє високу специфічність до фібрину при утворенні згустку і краще всього характеризується його роллю в зшиванні фібрину.

1.3.1. Структура фактору XIII та його активація. Фактор згортання XIII – це профермент плазмової трансглютамінази, який складається з двох ферментативних субодиниць, та двох некаталітичних субодиниць і грає

вирішальну роль в утворенні стабільного згустку. Таким чином, фактор XIII часто називають фібрин-стабілізуючим фактором, який зшиває фібринові мономери, утворюючи ϵ -(γ -глутаміл)лізил-зв'язки, а також приєднує до них α -антиплазмін та фібронектин [41]. Загалом, FXIII існує як в плазмі, так і в цитозолі мегакаріоцитів, тромбоцитів та моноцитів [42].

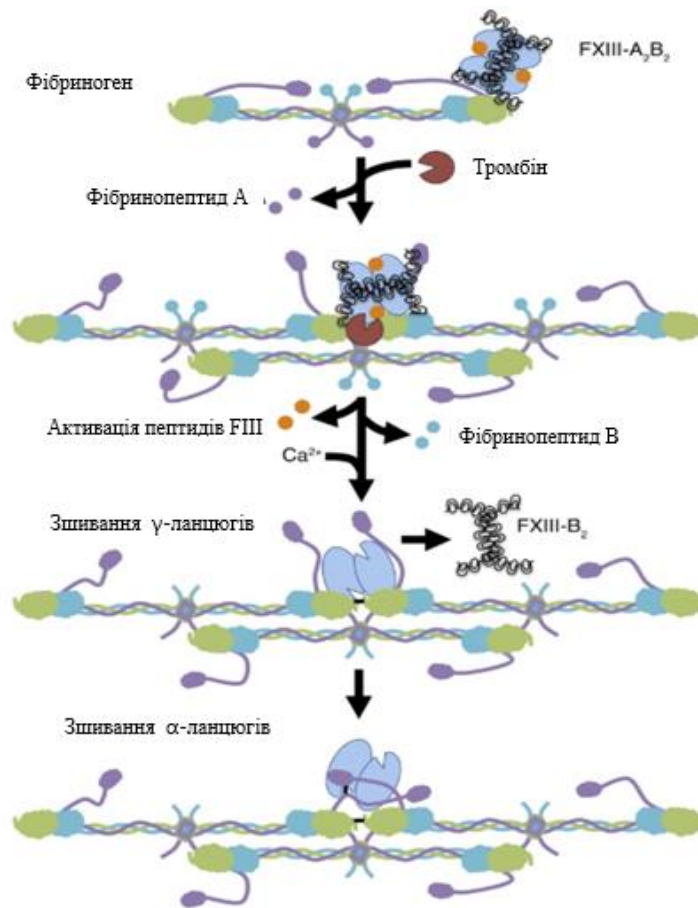
Для перетворення проферменту FXIII в його активну форму потрібно декілька подій (Рис. 1.5).



1.5. Активація XIII Фактору. Адаптовано з [43].

Спочатку тромбін ініціює перетворення зимогену шляхом гідролізу пептидного зв'язку між Arg 37 и Gly 38 в А субодиниці. Тромбін взаємодіє з центральним Е-доменом одного фібриногену, що зближений з FXIII-А, який зв'язаний поруч з полімеризаційною кишенею «а» іншого фібриногену FXIII-В, що приводить до ефективного розщеплення в А-субодиниці [44]. За допомогою Ca^{2+} залежної дисоціації активний центр звільняється від цистеїнових тіолів, таким чином вважали, що В-субодиниці діють в якості гальма в конверсії FXIII [43,45]. Але в 2015 році показали [46], що В-субодиниця прискорює зшивання з фібрином, а саме плазмовий FXIII взаємодіє з фібриногеном через FXIII-В.

1.3.2. Механізм впливу FXIII на фібриноген. FXIII- A_2B_2 циркулює у комплексі з фібриногеном, імовірно зв'язуючись із ним через сайт αC (Рис.1.6) [47].



1.6. Вплив FXIII-A₂B₂ на фібриноген/фібрин. Адаптовано з [48].

Під час коагуляції фібриноген транспортує FXIII-A₂B₂ в згусток, що формується шляхом взаємодії з FXIII-B. По мірі полімеризації FXIII, зв'язаний з D-доменом 1 фібринового мономеру, зв'язується з тромбіном, що зв'язаний з E-доменом іншого мономеру. Після цього відбувається формування активної форми FXIII- A₂*, який першим чином локалізує FXIIIa біля сайтів зшивання γ-ланцюга. Отже, на першому етапі зшивання фібрину утворюються γ-γ-зшивки, орієнтовані вздовж протофібрили. Наступна взаємодія фактору FXIII-A₂* з залишком αC полегшує переміщення його активного сайту в α-ланцюг фібрину, де він каталізує утворення поперечних зв'язків між α-ланцюгами фібрину [48]. Таке зшивання значно посилює жорсткість як окремих волокон [49,50], так і тривимірної фібринової мережі в цілому [51], що забезпечує захист від передчасної руйнації і розчинення.

Також, FXIIIa має важливі антифібринолітичні функції під час коагуляції, які опосередковуються його здатністю зшивати з фібрином антифібринолітичні білки, включаючи α -антиплазмін [52], а також інгібітор фібринолізу, що активується тромбіном (TAFI) та інгібітор активатора плазміногену 2 (PAI-2). Ця активність опосередкована в основному плазменною формою FXIII-A₂*. Але в ситуаціях, коли його концентрація низька ($\leq 10\%$), тромбоцитарний фактор FXIII-A₂*, що експонується на поверхні тромбоцитів, також сприяє стабільності фібрину шляхом зшивання α -антиплазміну з фібрином [51].

1.4. Протеїн С, його структура та функції

Протеїн С (РС) – попередник (зимоген) вітамін К–залежної серинової протеази, активованого протеїну С (APC), що регулює згортання крові шляхом інактивації кофакторів Va та VIIIa у присутності йонів кальцію на фосфоліпідній поверхні [53].

Протеїн синтезується переважно в клітинах печінки та ендотелію судин у вигляді одноланцюгового прекурсору, що складається з 461 амінокислотного залишку, та під час секреції розщеплюється на легкий (155 амінокислотних залишків) та важкий (262 амінокислотних залишків) ланцюги, які поєднані дисульфідним зв'язком (Рис. 1.7). Перетворення проензиму РС в серинову протеїназу APC відбувається внаслідок розщеплення тромбіном одного пептидного зв'язку Arg169 - Leu170 у важкому ланцюзі і вивільнення зарядженого 12-членного пептиду активації (Lys158-Arg169) [53].

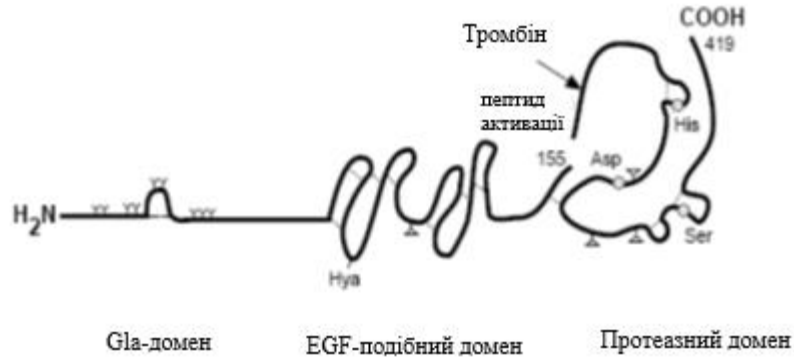


Рис. 1.7. Доменна структура РС: Y – Гла-залишки, Нya – еритро-β-гідроксіаспарагінова кислота, О-каталітичні залишки, Δ – сайти глікозилювання. Адаптовано з [53].

Потужні антикоагулянтні властивості APC полягають, зокрема, в трьох розщепленнях фактора Va на Arg306, Arg506 і Arg679 [54]. APC взаємодіє як з вільним фактором V, так і зі зв'язаним (коли той перебуває у протромбіназному комплексі). Інактивація фактору VIIIa відбувається в аналогічних позиціях А-домену, 336 та 562. Афінність APC є більшою до фактора Va, аніж до фактора VIIIa.

Окрім антикоагулянтної функції, APC має цитопротекторну активність, зумовлену його впливом на експресію генів, а також антиапоптичну та протизапальну активність, що забезпечує стабілізацію та захист ендотеліального бар'єру [54–56].

1.4.1. Ендотелій – залежна активація протеїну С. Нормальне генерування АПС залежить від правильного збирання тромбіну, тромбомодуліну, РС та рецептора РС ендотеліальних клітин (EPCR) [57]. На поверхні ендотелію судин тромбін, що утворюється на стадії ініціації згортання крові в низькій (нМ) концентрації, зв'язується зі своїм високоафінним рецептором тромбомодуліном (ТМ). Тромбін в комплексі з ТМ активує розщеплення РС, зв'язаного зі своїм специфічним рецептором – EPCR (ендотеліальним рецептором протеїну С), здійснюючи його конверсію до APC

[58] (Рис. 1.8)

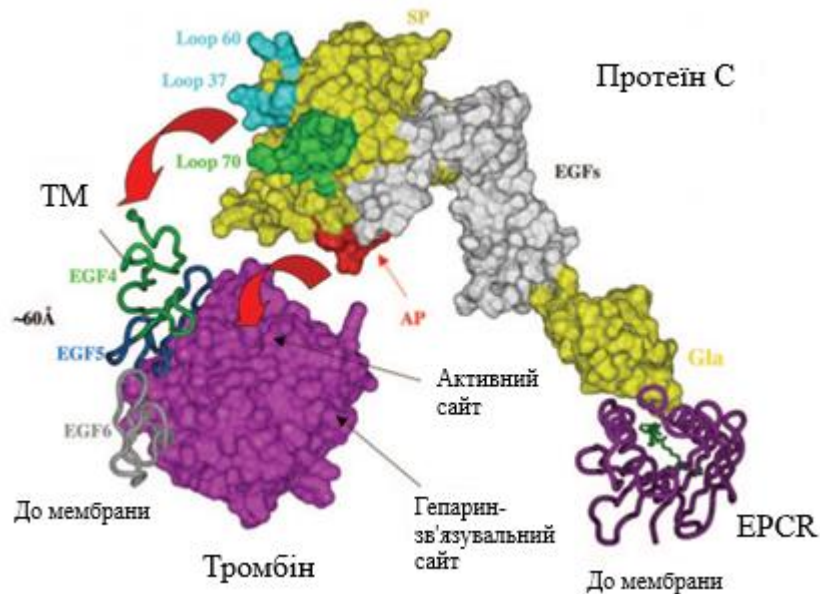


Рис. 1.8. Активація Протеїну С. Адаптовано з [58].

Тромбомодулін є першою мішенню для тромбіну на ендотелії. При зв'язуванні з ТМ в присутності іонів Кальцію змінюється конформація тромбіну і підвищується спорідненість ферменту до субстрату – протеїну С. ТМ містять всі ендотеліальні клітини судин, його висока концентрація гарантує ефективність зв'язування з тромбіном. Власне прокоагулянтні властивості тромбіну при зв'язуванні з ТМ блокуються, оскільки ТМ окупує функціонально важливі сайти тромбіну, що блокує його взаємодії з іншими прокоагулянтними білками [59,60].

За зв'язування та активацію РС тромбіном відповідає четвертий EGF домен ТМ. При активації позитивно заряджені ділянки РС взаємодіють з тромбіном і ТМ [61]. Активація РС підвищується приблизно в 20 разів *in vivo*, коли він зв'язаний з EPCR [62]. Таким чином, ТМ має декілька важливих антикоагулянтних функцій: перетворення тромбіну в активатор протеїну С, а також прискорення інгібування тромбіну.

1.4.2. Ендотелій-незалежні шляхи активації протеїну С.

Тромбомодулін (ТМ) вважається в основному ендотеліальним протеїном, що

відіграє роль у шляху активації PC. Проте, його було знайдено й на поверхнях інших клітин, в зв'язку з чим припускають, що тромбомодулін може також брати участь в ендотелій-незалежній активації PC.

Ще у досліджах Suzuki зі співавт. [63] було встановлено, що тромбоцити вміщують функціонально активний тромбомодулін у кількості $0,78 \pm 0,24$ нг/ 10^8 клітин, що складає 11-19% від рівня TM в плазмі. Як рецептор для тромбіну, TM експонований на плазматичній поверхні тромбоцитів у кількості 60 ± 18 молекул на 1 клітину.

За допомогою методів імуногістохімії та протокової цитофлуориметрії було показано, що високий рівень синтезу TM властивий також периферійним моноцитам та нейтрофілам крові, натомість лімфоцити не синтезують цей білок. Доведено, що TM моноцитів здатен повноцінно активувати протеїн C, тоді як у нейтрофілів він виявився функціонально неактивним [64,65].

Недавно дослідженнями співробітників відділу хімії та біохімії ферментів ІБХ НАН України було доведено здатність клітин крові активувати PC в процесі тромбоутворення без участі ендотелію судин [66].

Існує також розчинна форма TM у концентрації $21,9 \pm 8,8$ нг/мл плазми, локалізованого на мікрочастках. На відміну від клітинної форми, розчинний TM має меншу молекулярну масу $M_r = 63,000$ and $54,000$ (проти $M_r = 78,000$ для клітинного TM) та більшу у 3-4 рази Kd.

Комплекс тромбін-TM не лише активує PC, але і може активувати TAFI, інгібітор фібринолізу, що присутній в плазмі. TAFI циркулює як профермент, який після його активації комплексом тромбін-TM видаляє C-кінцеві залишки лізину з фібрину. Це призводить до інгібування фібринолізу, оскільки ці кінцеві лізини є сайтами зв'язування плазміногену [59,67]. Вважають, що APC, стримуючи продукцію тромбіну, знижує кількість TAFIa, завдяки чому прискорює фібриноліз. Встановлено, що TM стимулює активацію TAFI у низьких концентраціях та, навпаки, загальмовує – при високих [68].

Ще один механізм профібринолітичної дії АРС – це його можлива взаємодія з РАІ-1. Вважається, що РАІ-1 є не лише інгібітором t-РА, а і ефективним інгібітором АРС. Таким чином, високий рівень АПС може виснажувати РАІ-1 і, таким чином, діяти в якості профібринолітичного агента. Однак, при високих локальних концентраціях РАІ-1 буде переважати його прокоагулянтна дія через інгібування впливу АРС на тромбін [69].

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Об'єкти дослідження

Об'єктом дослідження в нашій роботі є тромбоцити та їх вплив на процеси лізису, а також вплив інших компонентів крові: XIII фактору та протеїну С.

2.2. Матеріали, реактиви та обладнання, використані в роботі

Протоковий цитофлуориметр COULTER EPICS XL (Beckman Coulter, США), мікропланшетний рідер-спектрофотометр “Мультискан”, УФ-спектрофотометр СФ-2000 (Росія), планшетний спектрофлуориметр FL-800 (США), конфокальний мікроскоп Zeiss Axio Examiner Z.1 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Німеччина).

Тромбін людини (Sigma), протеїн С людини (Sigma), плазміноген людини, очищений із плазми донорів, комерційний препарат PPSB human (Німеччина), Бичачий сироватковий альбумін (Sigma), препарат t-РА, мічений Alexa Fluor 488 фібрин (Thermo Fisher Scientific), Tyrode's buffer без Ca, Tyrode buffer з Ca, TBS-буфер, Tris-буфер, HEPES буфери (6,8 та 7,35 pH), 0,15M NaCl, 0,125% CH₃COOH, FITC, DMSO, 0,05M NaPBS, е-АМК, пХМБ та інші реактиви відповідної чистоти та якості: чда.

Лабораторна центрифуга (Eppendorf), pH-метр-мілівольтметр pH-150МА, одноканальні та багатоканальні пипет-дозатори (Eppendorf), термостат, та інше допоміжне обладнання.

2.3. Методи дослідження

2.3.1. Отримання зразків крові, плазми збагаченої на тромбоцити та нативних тромбоцитів. Венозну кров донора відбирали у антикоагулянтний розчин цитрат-декстрази (85 ммоль/л 3-зам. Натрію цитрату, 65 ммол/л

Лимонної кислоти та 100 ммоль/л D-глюкози) у співвідношенні 6 част. крові та 1 част. антикоагулянта. Плазму, збіднену на тромбоцити (PFP), плазму збагачену на тромбоцити (PRP), кількість клітин в якій - $300 \times 10^6/\text{мл}$, отримували за стандартною схемою з цитратної крові (Рис.2.1) [70]. Перше центрифугування (30хв 1100 об/хв) спрямоване на відділення еритроцитів. Після нього надосадову рідину відбирали та центрифугували повторно для концентрування тромбоцитів в найменшому об'ємі плазми (15 хв 2100об/хв), відбирали верхній шар надосадової рідини, отримуючи плазму, збагачену на тромбоцити (PRP).

Отриману плазму, збіднену на тромбоцити повторно центрифугували в центрифугі протягом 10 хв за 10g для подальшого використання в дослідях.

Після отримання тромбоцитів заміряли їх кількість та величину агрегації на агрегометрі для перевірки функціональної активності.



Рис.2.1. Стандартна схема отримання плазми збагаченої на тромбоцити (PRP). Адаптовано з [70].

Для отримання тромбоцитів використовувались два буфери з різними рН – HEPES-буфер з рН 6.8 для попередження активації тромбоцитів, та буфер з рН 7.35, що наближений до нормального рН для відновлення функціональних особливостей клітин. Після другого центрифугування відбирали плазму та додавали стільки ж буферу з рН 6.8 та знову центрифугували 20 хвилин на 1300об/хв. Потім знову відбирали буфер, додавали буфер з рН 7.35 та заміряли кількість тромбоцитів та величину їх агрегації на агрегометрі для перевірки функціональної активності.

2.3.2. Мічення Pg FITC для визначення ступеню зв'язування Pg з клітинами. FITC є одним з найпростіших і часто використовуваних реагентів для флуоресцентного маркування білка. Це комплекс флуоресцеїну з ізотіоціанатом, який буде зв'язуватись з аміногрупою, сульфгідрильною, імідазоїльною, тирозильною або карбонільною групами білків. Реакції кон'югації найбільш ефективні при рН 8-9, і повинні проводити в буфері без амінів, такому це зазвичай карбонатний чи бікарбонатний буфери [71].

Для зв'язування з FITC білок не повинен містити будь-яких домішок, а також кон'югація не повинна проходити в буферах, що не містять азид натрія та аміни (такі як гліцин чи трис), оскільки це може негативно вплинути на процес кон'югації. Оскільки плазміноген зберігається саме в TBS-буфері, що містить Трис.

Плазміноген, що зберігався в аліквотах по 50мкл з $C=5.58$ мг/мл перебуферювали з TBS-буферу в бікарбонатний буфер. Для цього об'єднували аліквоти (6 штук) в одну (0.3мкл) та вносили в 1200мкл бікарбонатного буфера. Переносили 1.5мл розчину Pg в діалізний мішок та проводимо діаліз 4 рази по 250мл бікарбонатного буферу по 30-40хв. Оскільки діалізний мішок зберігався в 20% етиловому спирті важливо відмити його в дистильованій воді, оскільки залишки спирту можуть денатурувати білок. Після цього вимірювали

концентрацію плазміногену спектрофотометрично проти бікарбонатного буферу (280нм).

Після цього, готували стоковий розчин FITC розчинений в DMSO (1.5мг FITC в 150мкл DMSO). Змішували 1.37 мг/мл Pg з 0.14мг/мл FITC та кон'югували в темному місці протягом години. Треба зважати, що FITC не можна тримати під впливом прямих сонячних променів, тому всі маніпуляції необхідно проводити в затемненому місці. Потім проводили діаліз проти Трис-буфера для відмивання FITC, що не зв'язався з білком.

2.3.3. Визначення рівня FITC-плазміногену, асоційованого з поверхнею неактивованих та тромбін-активованих тромбоцитів. Тромбоцити (50×10^6 /мл) активували тромбіном (1 NIH од/мл) протягом 5 хв, за вказаних умов кількість активованих клітин складало ~90%. зупиняли активацію внесенням гірудину (3 ATU/мл) та додавали препарат PPSB в концентрації 1 мкМ, 0,5 мкМ та 0,1 мкМ (по фактору II). Після 20 хв інкубації вносили FITC-Pg(0,125 мкМ) , час інкубації – 30 хв. Відмивали незв'язаний плазміноген центрифугуванням та ресуспендували осад тромбоцитів у Tyrod's буфері, який не містив CaCl_2 . Для аналізу взаємодії міченого плазміногену використано по 10 тис клітин кожного зразка. Довжина хвилі збудження флуорофору – 488 нм. Інтенсивність флуоресценції клітин реєстрували за каналом FL1 (515–535 нм). Рівень флуоресценції контрольної групи клітин (нативні тромбоцити, не інкубовані з FITC-міченим плазміногеном) був обраний за 100%.

Окремо готували контролі: тромбоцити (негативний контроль) та тромбоцити + FITC-Pg (позитивний контроль). Взаємодію FITC-кон'югованого Glu-плазміногену з тромбоцитами визначали на протоковому цитофлуориметрі COULTER EPICS XL (Beckman Coulter, США).

В окремій серії дослідів вивчали вплив протеїнів ПТК на асоціацію FITC-

Pg з тромбоцитами в Tyrod's буфері, що містив CaCl_2 . Тромбоцити ($40 \times 10^6/\text{мл}$) активували тромбіном у двох концентраціях, 1 NIH од./мл та 5 NIH од./мл протягом 5 хв, зупиняли активацію внесенням гірудину (3 АТУ/мл) та додавали препарат PPSB в концентрації 1 мкМ, 0,5 мкМ та 0,1 мкМ (по фактору II). Після 20 хв інкубації вносили FITC-Pg (0,125 мкМ), час інкубації – 30 хв. Відмивали незв'язаний плазміноген центрифугуванням та ресуспендували осад тромбоцитів у Tyrod's буфері. Окремо готували контролю: тромбоцити (негативний контроль) та тромбоцити+ FITC-Pg (позитивний контроль).

Обробку результатів проводили з використанням пакету програм “FCS Express V3” (De Novo Software, США).

2.3.4. Продукування тромбіну та згортання та лізис в PRP та PFP при участі APC. Для дослідження впливу тромбоцитів на процеси згортання та лізису використовували метод спектрометрії та спектрофлюориметрії. Для цього брали плазму донорів та отримували з неї плазму, збагачену на тромбоцити (PRP), а також безклітинну плазму (PFP) за стандартною методикою. Перевірка життєздатності тромбоцитів проводилася через 3 години після забору крові за їх агрегаційною здатністю при додаванні 1 NIH од./мл тромбіну; зразки, що демонстрували слабку відповідь та підвищену спонтанну агрегацію, виключалися з експерименту.

Згортання плазми ініціювалося хлоридом кальцію (кінцева концентрація 8 мМ) у системі з рівним співвідношенням трис- HCl буферу (0.05 М, рН 7,4) плазми, збагаченої тромбоцитами (в якості джерела клітин), та хлориду кальцію. У контрольних зразках, відповідно, використовувалась безтромбоцитна плазма.

Лізис було стимульовано попереднім додаванням в складі буфера рекомбінантного тканинного активатора плазміногену у кінцевих концентраціях 15 та 40 од./мл. Концентрація t-РА, яка б забезпечувала повний лізис згустку

протягом не довше 3 годин, розраховувалась виходячи із середнього вмісту PAI-1 у безтромбоцитній плазмі та плазмі, збагаченій тромбоцитами.

Процес згортання та лізису у плазмі оцінювався за змінами оптичної густини плазми на довжині хвилі 405 нм з використанням мікропланшетного рідера Multiscan 2000 (Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finland) до повного лізису згустку (або не більше ніж протягом 3 годин).

В серії дослідів з вивчення впливу APC на згортання та лізис згустку ініціаторами згортання виступав лише Ca^{2+} , що дозволило додатково дослідити механізми ендogenous синтезу тромбіну. До дослідних проб перед згортанням та згортанням/лізисом додатково додавали APC в концентрації 30 мкл/мл. Аналогічно до попередньої серії дослідів, готували декілька контролів: PFP, PFP+APC, PFP+t-PA, PFP+t-PA+APC для виявлення впливу APC, а також впливу тромбоцитів на процеси згортання та лізису. Зміни мутності плазми в процесі полімеризації фібрину і утворення фібринового згустку, а також наступного його розчинення, реєстрували за допомогою мікропланшетного рідера-спектрофотометра “Мультискан”.

Одночасно з цим, досліджували кількість тромбіну, що генерується в модельній системі протягом згортання чи згортання/ лізису. Для цього в плазму безпосередньо перед внесенням ініціатора згортання додавали тромбін-специфічний флуорогенний субстрат. Внаслідок розщеплення субстрату тромбіном в дослідній плазмі накопичується флуорофор, AFC (7-amido-4-trifluoromethylcoumarin) у кількості, пропорційній до кількості утвореного тромбіну. Вимірювання флуоресцентного сигналу здійснювали за допомогою планшетного спектрофлуориметра FL-800 (USA) в режимі довжин хвиль для збудження/емісії -380 nm/500 nm.

2.3.5. Підготовка проб до конфокальної мікроскопії. Готували окремо проби з плазмою, збідненою на тромбоцити та плазмою, збагаченою на

тромбоцити за стандартною методикою. Кількість тромбоцитів в PRP перевіряли за допомогою агрегометра для відповідності фізіологічній концентрації тромбоцитів. Для візуалізації утворення полімерного фібрину на фібрин-тромбоцитарних агрегатах використовували мічений фібриноген Alexa Fluor 488 (16 мкг/мл).

Дослідження участі тромбоцитів в утворенні фібринового згустку у статичних умовах проводили з використанням камери Ibidi μ -Slide VI, в яку у рівних співвідношеннях вносили: трис-HCl буфер (0.05 M, pH 7,4), плазму, збагачену тромбоцитами (до якої попередньо було додано мічений Alexa Fluor 488 фібриноген (16 мкг/мл)), та суміш хлориду кальцію (8 mM) і тромбіну (0,17 нМ), якою ініціювали згортання. У контрольних зразках, відповідно, використовувалась безтромбоцитна плазма. Конфокальні зображення структури згустку отримували через 15 та через 60 хвилин після ініціації згортання.

2.3.6. Статистична обробка даних. Нормальність вибірок, кількість яких становила до 30 перевірялась методом Шапіро-Уїлка, після чого наявність різниці між вибірками перевірялась за допомогою методів Стюдента (для нормальних) та Манна-Уїтні (для ненормальних вибірок).

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Моделювання процесів згортання та наступного лізису в PRP та PFP в системі *in vitro*

Як відомо, за продукцію тромбіну і тромбін-залежне фібриноутворення відповідає система коагуляції крові, яка складається із внутрішнього та зовнішнього каскадів згортання крові. Робота каскадів завершується утворенням тромбіну, а термінальним етапом процесу коагуляції є залучення тромбіну до формування фібринового згустку.

Внутрішній каскад згортання ініціюється негативно зарядженими фосфоліпідами та іонами кальцію; зовнішній каскад згортання – тканинним фактором в присутності негативно заряджених фосфоліпідів та іонів кальцію. Існує також так звана тромбін-залежна петля позитивного зворотного зв'язку, яку ініціює тромбін у високій концентрації.

В попередніх дослідженнях відділу хімії та біохімії ферментів було показано, що тромбоцити здатні прискорювати процес фібриноутворення, ініційований CaCl_2 або сумішшю тромбіну з CaCl_2 [72,73].

Втім, чи впливають тромбоцити на тромбіноутворення і який із відомих механізмів при цьому може залучатись, наразі залишається невідомим. Тому на цьому етапі досліджень ми повторили досліди з моделюванням процесів згортання та згортання/лізису, одночасно вимірюючи кількість тромбіну та час його перебування в системі за цих умов.

3.1.1. Вплив тромбоцитів на процес згортання та лізису. Отже, ми зосередились на моделюванні роботи двох шляхів: внутрішнього коагуляційного каскаду, ініціюючи його активність додаванням в дослідну

плазму CaCl_2 у кінцевій концентрації 8мМ; та тромбін-залежної петлі позитивного зворотного зв'язку, яку стимулювали внесенням в плазму суміші тромбіну (0,02 NIH од/мл) й CaCl_2 (8 мМ).

Було підтверджено, що Са-залежне утворення фібринового згустку прискорюється тромбоцитами, головним чином, за рахунок скорочення лаг-періоду з 20 хв в PFP до 12 хв в PRP. В присутності тромбоцитів відбувалось також прискорення полімеризації фібрину на кінцевих етапах перед виходом на максимум (Рис. 3.1).

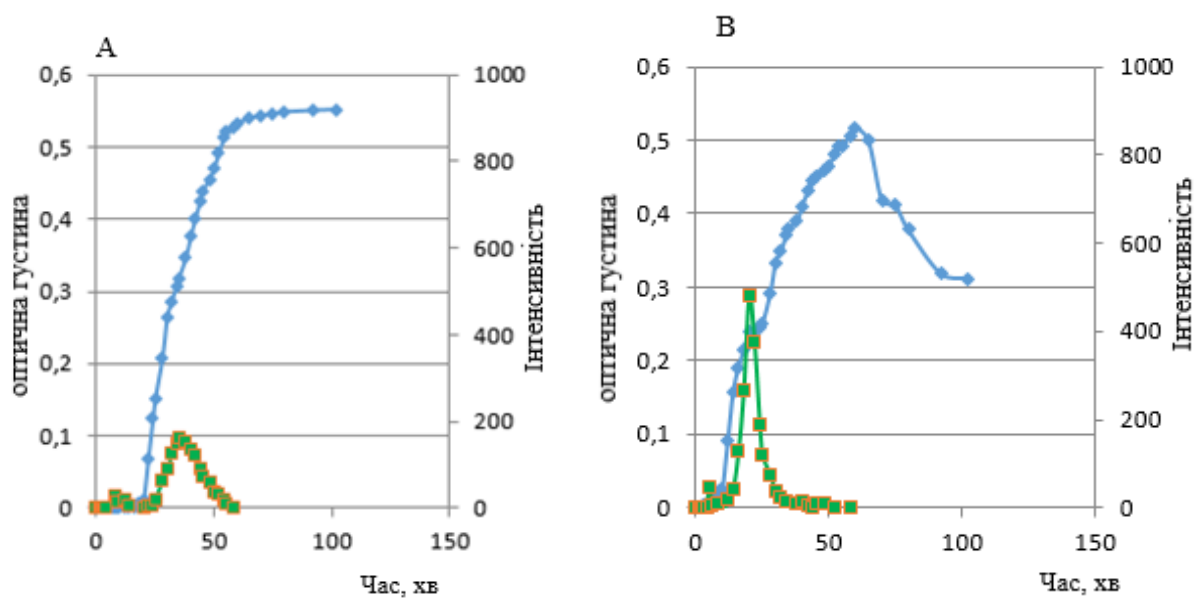


Рис. 3.1. Крива згортання, ініційованого CaCl_2 (синя крива) та продукування тромбіну (зелена крива) в PFP(A) та PRP(B).

Аналогічно вивчали вплив тромбоцитів на процеси лізису в системі, де наступний лізис ініціювали додаванням t-PA. Як показано на Рис. 3.2, в цій модельній системі за умов ініціації згортання плазми додаванням CaCl_2 вплив тромбоцитів на лаг-період був до попередньої системи, що моделювала лише процес згортання: він скорочувався на 11 хвилин.

Крім того, тромбоцити прискорювали час виходу на максимум, що свідчить про закінчення формування згустку (44 та 30 хвилини для PFP+Ca+tPA та PRP+Ca+tPA, відповідно). Дуже цікавою є наявність плато на кривій

згортання/лізису між точкою повного формування згустку та початком його лізису в плазмі, збідненій на тромбоцити. Наявність плато відображує першу стадію процесу фібринолізу, під час якої відбувається активація плазміногену за участі t-PA, тобто утворюється та накопичується плазмін у кількості, необхідній для здійснення другої стадії – деградації фібрину. В PFP ця стадія тривала протягом 6 хвилин, тоді як в PRP була зовсім відсутня, що свідчить про потужну стимуляцію тромбоцитами саме першої стадії ініціації лізису, перебіг якої, вочевидь, запускався ще на стадії завершення утворення фібрину. Отже, коли процес згортання плазми досягав максимуму, в системі за присутності тромбоцитів вже було достатньо плазміну для негайної ініціації лізису.

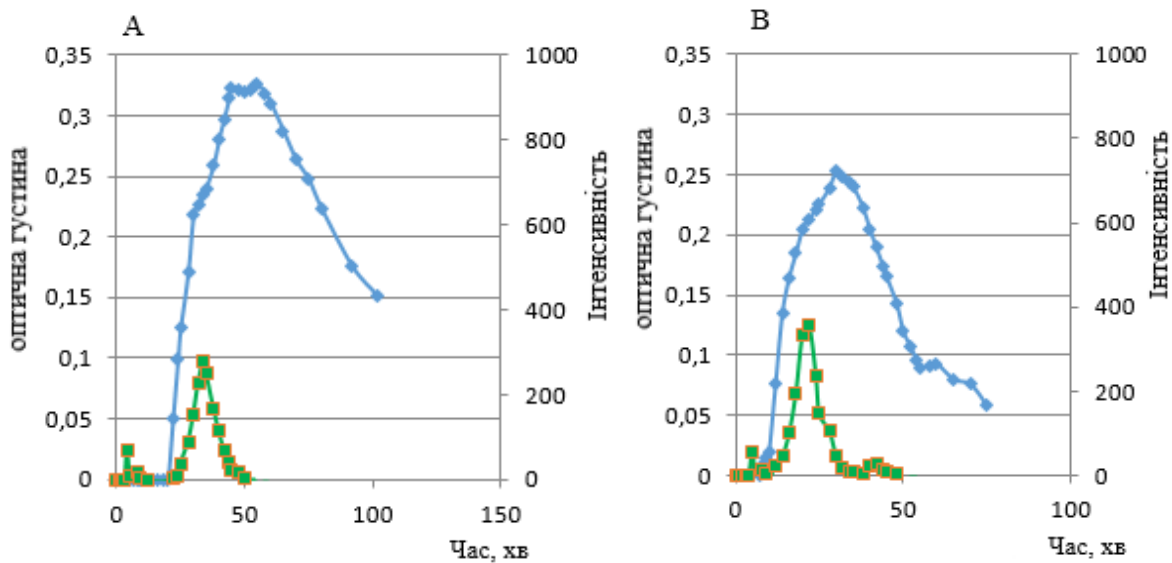


Рис.3.2. Крива згортання (ініційованого CaCl_2) і наступного лізису (синя крива) та продукування тромбіну (зелена крива) в PFP(A) та PRP(B).

Поряд з цим, тромбоцити значно прискорювали наступний лізис: час, потрібний на лізис 30% згустку зменшився з 63 хвилин до 25, а час загального життя згустку зменшився більше ніж на половину у порівнянні з безклітинним згустком (Табл.3.1).

Таблиця 3.1.

Порівняння параметрів згортання, тромбіноутворення та лізису в PFP та PRP при ініціації згортання CaCl_2

	PFP	PRP
Параметри процесу згортання n=9		
Ляг-період фібриноутворення, хв	20±2	12 ±1
час виходу на перший максимум, хв		20 ±1
час виходу на другий максимум, хв	58±4	58±5
Параметри процесу тромбіноутворення n=3		
Ляг- період тромбіноутворення, хв	24 ±2	13 ±1
Час існування тромбіну, хв	34 ±3	12 ±2
максимальна інтенсивність флюоресцентного сигналу, умов. од.	153±15	480±40
Параметри процесу згортання/лізису n=9		
Час початку лізису, хв	52±4	30±3
Ляг-період фібриноутворення, хв	18±1	7 ±0,2
час виходу на максимум, хв	44 ±4	30 ±3
макс значення поглинання на 405, од.опт.густ	0,314 ±0,03	0,2525±0,02
час лізису 30% згустку, хв	63±5	25±2
час загального життя згустку, хв	Більше 115 ±10	65 ±4
Параметри процесу тромбіноутворення n=3		
Ляг-період тромбіноутворення, хв	14 ±1	10 ±1
Час існування тромбіну, хв	26 ±2	28 ±2
максимальна інтенсивність флюоресцентного сигналу, умов. од.	250±21	357±30

В наступній серії дослідів згортання ініціювали додаванням суміші $\text{Thr}+\text{Ca}^{2+}$. Порівнювали динаміку полімеризації фібрину в процесі згортання PFP і PRP, а також в процесі їх згортання/лізису (після додавання t-PA).

Як показано на Рис.3.3, під впливом суміші тромбіну та CaCl_2 фібриновий згусток формується поступово, в декілька етапів, що на кривих згортання проявляється як утворення двох максимумів. І, що важливо, час для стабільного формування першого максимуму в безтромбоцитарній (Рис.3.3, А) та плазмі з

тромбоцитами (Рис.3.3, В) був різним. Так, в PFP він формувався протягом 8 хвилин, а в присутності тромбоцитів набагато довше – протягом 20 хвилин.

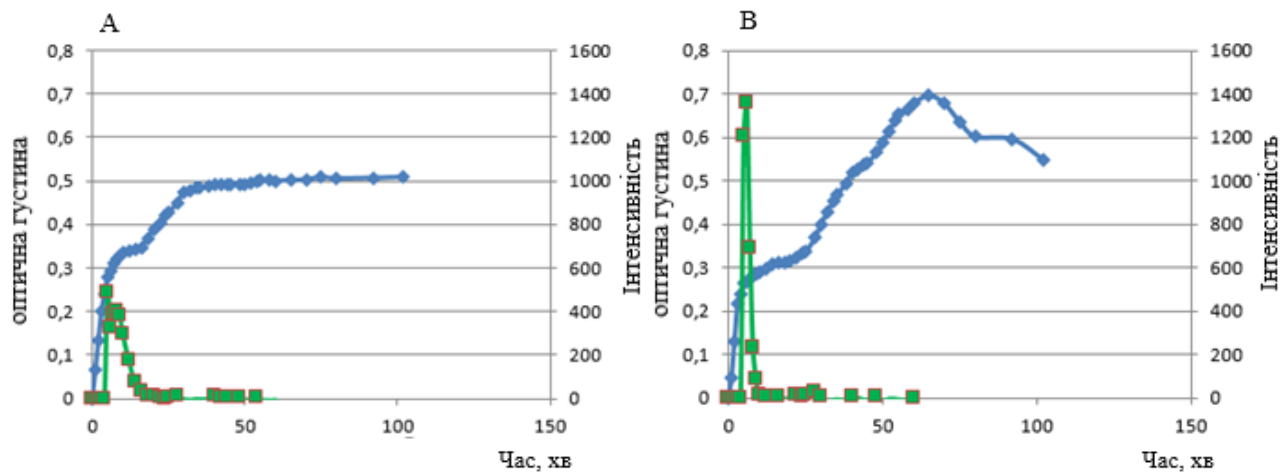


Рис. 3.3. Крива згортання, ініційованого $\text{Thr}+\text{CaCl}_2$ (синя крива) та продукування тромбіну (зелена крива) в PFP(A) та PRP(B).

Час виходу на другий максимум також змінювався: 30 хвилин в PFP та 65 хвилин в PRP, тобто під впливом тромбоцитів відбувалось відтермінування часу виходу на другий максимум і, власне, повне формування згустку затримувалось на 35 хвилин.

Важливо відмітити, що в PRP після виходу на другий максимум відбувалось поступове зниження оптичної густини. Це свідчить про ретракцію фібринового згустку, обумовлену присутністю тромбоцитів, оскільки в контролі (Рис.3.3, А) подібне зниження не спостерігалось, а відбувався вихід на плато після досягнення другого максимуму.

Аналогічним чином вивчали вплив тромбоцитів на лізис фібринового згустку. В цих варіантах досліді перед внесенням тромбін-кальцієвої суміші до PFP і PRP додавали t-PA. На відміну від кривих згортання, на кривих згортання/лізису перший максимум був відсутнім, як в контрольній (PFP), так і в дослідній (PRP) плазмах, а час виходу на максимум в присутності тромбоцитів майже не змінювався (Рис 3.4).

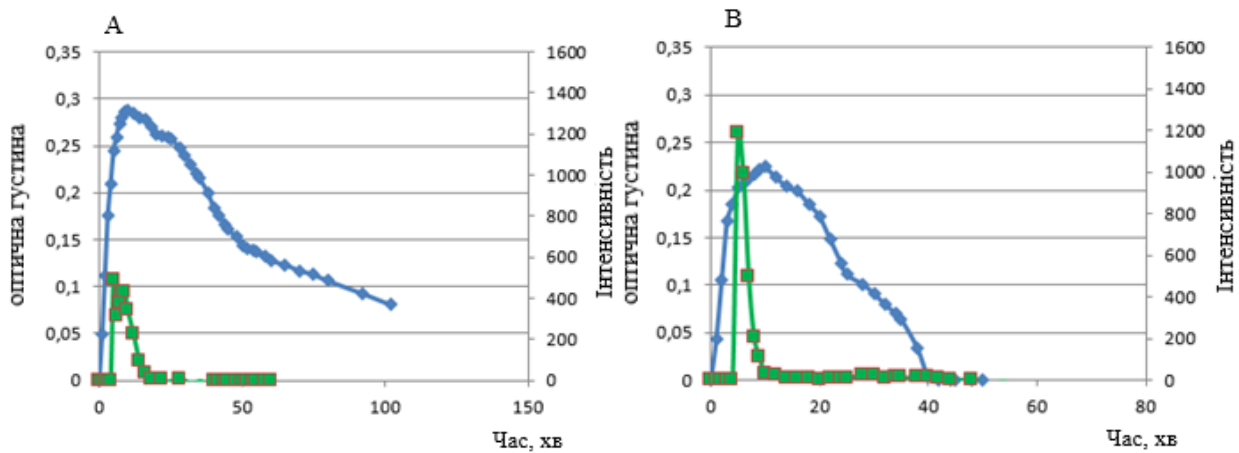


Рис.3.4. Крива згортання (ініційованого Thr+CaCl₂) і наступного лізису (синя крива) та продукування тромбіну (зелена крива) в PFP(A) та PRP(B).

Для виявлення впливу тромбоцитів на лізис фібринового згустку визначали час руйнації 30% згустку. У контролі згусток зруйнувався на 30% на 91-й хвилині, тоді як в тромбоцитарній плазмі - на 24-й хвилині. Також, на значне прискорення лізису згустку вказує і загальний час життя згустку: якщо в PRP згусток повністю розчинився вже на 40 хвилині, то в PFP він зберігався більше 100 хвилин. Такі відмінності вказують на значне прискорення лізису за участі тромбоцитів.

Отже, порівнюючи два шляхи, залучені до фібриноутворення, можна стверджувати, що тромбоцити більш суттєво впливають на утворення фібрину за участі тромбін-залежної петлі позитивного зворотного зв'язку. Про це свідчить, зокрема, відтермінування часу виходу на другий максимум на 25 хвилин та зростання часу, потрібного для виходу на перший максимум. Також, в згустках, сформованих екзогенним тромбіном, більш суттєво проявлявся вплив тромбоцитів на лізис: час лізису 30% згустку пришвидшився на 42.4%, а час існування згустку скоротився на 17% в порівнянні з системами, в яких функціонував лише внутрішній коагуляційний каскад.

3.1.2. Вплив тромбоцитів на продукцію тромбіну в процесі згортання та лізису. Наступні важливі питання, на які ми шукали відповідь, - це

з'ясування впливу тромбоцитів на послідовність подій, пов'язаних з утворенням тромбіну та фібрину, а також особливості їх узгодження у часі.

Метод спектрофотометрії дозволяє реєструвати закінчення процесу утворення протофібрил, початок їх латеральної асоціації та формування фібринових волокон, а також завершення цього процесу з утворенням прошитого фібрину. Відомо, що ці процеси прямо чи опосередковано обумовлені дією тромбіну, втім метод спектрофотометрії не дозволяє виявити динаміку накопичення тромбіну в системі і її зв'язок з процесом фібриноутворення. Тому, у наступній серії дослідів досліджували продукцію тромбіну за допомогою флюоресцентної спектрофотометрії та порівнювали її динаміку з динамікою утворення та лізису фібрину.

Окремо слід зазначити, що продукцію тромбіну досліджували в умовах, ідентичних тим, що описано в п.3.2.1. Тобто після закінчення реєстрації процесу згортання чи згортання/лізису дослід повторювали, але в ідентичний зразок PFP чи PRP додатково вносили флюорогенний субстрат-AFC. Результати цього дослідів представлені на рис. 3.3 та 3.4 кривими зеленого кольору для співставлення з кривими згортання фібрину та згортання/лізису, відповідно. Для зручності, всі параметри були винесені в Табл. 3.2.

Таблиця 3.2

Порівняння параметрів згортання, тромбіноутворення та лізису в PFP та PRP при ініціації згортання тромбіном

	PFP	PRP
Параметри процесу згортання n=6		
Час виходу на перший максимум, хв	8±0,6	20 ±2
Час виходу на другий максимум, хв	30±3	65 ±7
Параметри процесу тромбіноутворення n=3		
Лаг- період тромбіноутворення, хв	4 ±0,3	4 ±0,2
Час існування тромбіну, хв	20±1,5	8 ±0,7
Максимальна інтенсивність флюоресцентного сигналу, умов. од.	485,5±39	1361,5±14

Продовження таблиці 3.2

Параметри процесу згортання/лізису n=6		
Час початку лізису, хв	9 ±0,8	10 ±1
Макс значення поглинання на 405, од.опт.густ	0,2798±0,018	0,2165±0,02
Час лізису 30% згустку, хв	100±8	34±3
Час загального життя згустку, хв	Більше 100	40 ±4
Параметри процесу тромбіноутворення n=3		
Лаг-період тромбіноутворення, хв	4 ±0,3	4 ±0,4
Час існування тромбіну, хв	16 ±1	10 ± 1
Максимальна інтенсивність флюоресцентного сигналу, умов. од.	429±36	1186,5±62

Аналіз даних таблиці 3.2 свідчить про те, що тромбоцити суттєво впливали на тромбіноутворення в дослідній плазмі. Цікаво, що тромбін-залежний флуоресцентний сигнал виникає в зразках плазми завжди на 4-ї хвилині від ініціації згортання, незалежно від умов досліду. Присутність тромбоцитів не змінювала цей лаг-період. Проте, тромбоцити суттєво (на 16 хв) скорочують час існування тромбіну в порівнянні з контролем, про що свідчить різниця між шириною піка тромбіну в PFP і PRP (Табл.3.2). Як можна побачити на графіках (Рис 3.3 та Рис 3.4), полімеризація фібрину починається вже при невеликих концентраціях тромбіну, тобто вже незначної кількості тромбіну достатньо для запуску цього процесу, після чого фібриноутворення розвивається самостійно, без прив'язки до концентрації тромбіну.

Тому виникає питання: чи викликає полімеризацію екзогенний тромбін, який ми вносимо в систему, чи він дійсно починає впливати на петлю позитивного зворотного зв'язку для підсилення власної продукції.

Виявилось, що в контрольній плазмі (PFP) після додавання Thr+ CaCl₂ максимальна інтенсивність флюоресцентного сигналу становила 485.5 умовних одиниць, тоді як в тромбоцитарній плазмі – 1361.5 ум. од., тобто відбувалось 3-кратне підсилення сигналу. Аналогічна картина спостерігалась в дослідах зі

згортанням та лізисом (Рис. 3.2, зелена крива) – для контролю інтенсивність становила 429 ум. од., а для PRP – 1186.5 ум. од. Це має свідчити про наявність не лише екзогенного тромбіну, який ми вносили для ініціації згортання, а і ендогенного. ймовірно, утвореного за участі позитивної петлі зворотного зв'язку, стимульованої екзогенним тромбіном.

Слід зазначити, що в науковій літературі іноді зустрічаються свідчення про те, що при утворенні фібрину вільний тромбін в системі здатен утримуватись фібриновим каркасом тромбу, який слугує депо для тромбіну, таким чином вберігаючи його від інгібування антитромбіном та іншими інгібіторами. А після лізису згустку цей тромбін вивільняється у середовище і може викликати повторну оклюзію. Отримані нами дані свідчать про те, що в нашій модельній системі вивільнення тромбіну в процесі руйнації фібрину та повного завершення лізису не відбувалось.

3.1.3. Вплив тромбоцитів на структуру згустків. Наступним етапом нашого дослідження було вивчення впливу тромбоцитів на структуру згустку. Відомо, що в залежності від структури згустку, його компактності та впорядкованості упакування фібринових волокон лізис буде проходити з різною швидкістю, в залежності від доступності фібрину для фібринолітичних ферментів. Таким чином, впливаючи на структуру згустку, тромбоцити можуть також регулювати швидкість наступного лізису.

Ми порівняли, як змінюється структура згустків за відсутності та присутності тромбоцитів на 15 та на 60 хв від ініціації згортання. Візуалізацію фібринового каркасу згустку здійснювали методом конфокальної мікроскопії із застосуванням міченого фібриногена Alexa Fluor-488. Легко помітити різницю в будові фібринової сітки: без тромбоцитів (Див. Рис. 3.5) вона має неоднорідну ламелярну структуру, тромбоцити впорядковують її, збираючись у мікроагрегати, які стають своєрідними центрами організації фібринових

волокон. На 60 хв. ступінь впорядкованості структури зростає, вона стає більш однорідною за відсутності клітин і, навпаки, набуває додаткової неоднорідності за їх участі. Мікроагрегати формують своєрідні зіркоподібні структури, концентруючи на своїй поверхні основну масу фібрину, а на відстані від цих агрегатів концентрація фібрину значно зменшується. В цих регіонах (так само як і в безтромбоцитних згустках) також помітно зменшується товщина фибрил.

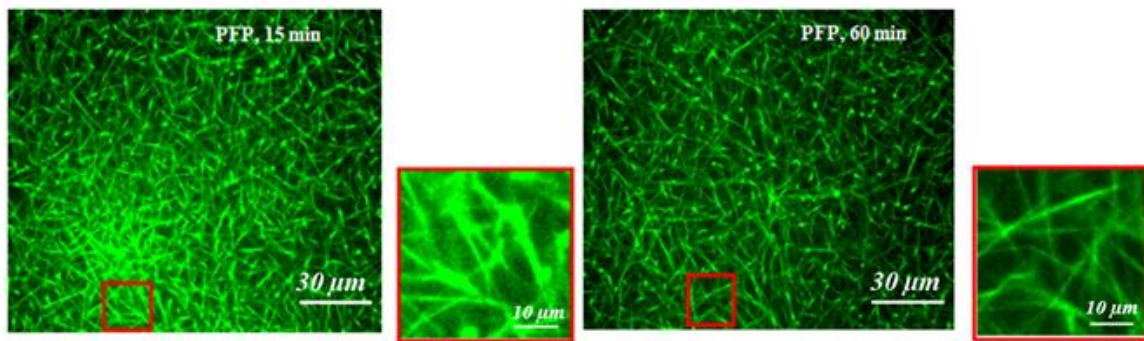


Рис. 3.5. Згусток PFP з додаванням міченого фібриногену на 15 хв (ліворуч) та на 60 хв (праворуч).

Додатковий аналіз зображень показав, що при дозріванні згустків (тобто на 60 хв у порівнянні з 15 хв) загальна кількість фибрил на одиницю площі суттєво не змінюється, як для незв'язаного фібрину, так і для тромбоцит-асоційованого. Це є підтвердженням того, що на 15 хв в основному завершується процес переходу фібриногену в фібрин. Подальші зміни пов'язані головним чином із перерозподілом фібрину, а саме його переходом із вільного в тромбоцит-асоційований стан. На 60 хв зростає кількість макроагрегатів, які є результатом консолідації слабо агрегованих і неагрегованих тромбоцитів. Відповідно, переважна кількість фібрину сконцентрована саме на цих вузлах у каркасі згустку. Вочевидь, друга хвиля зростання оптичної густини відображує саме ці процеси реорганізації фібрину і тромбоцитарних агрегатів.

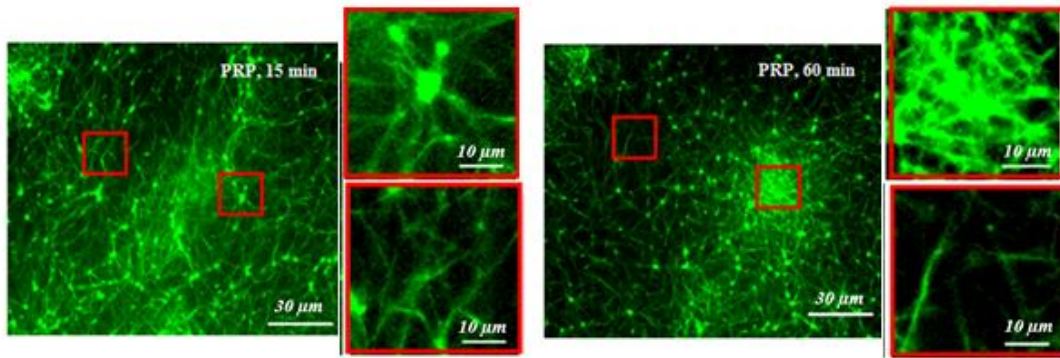


Рис. 3.6. Згусток PRP з додаванням міченого фібриногену на 15 та 60 хв.

Таким чином тромбоцити виявилися активними учасниками формування просторової структури тромбів, об'єднуючись у мікроагрегати, які стають своєрідними центрами ініціації та подальшого формування впорядкування та структуризації фібринової сітки.

3.2. Участь APC в регуляції фібриноутворення та тромбіноутворення, опосередкованій тромбоцитами

Як відомо, антикоагулянтна роль APC забезпечується завдяки здатності цього ензиму інактивувати два кофактори системи коагуляції, а саме кофактори Va та VIIIa. Ці кофактори входять до складу теназного ($\text{FIXa/VIIIa-Ca}^{2+}\text{-PL}^-$) та протромбіназного ($\text{FXa/Va-Ca}^{2+}\text{-PL}^-$) комплексів, відповідно. В свою чергу, теназний комплекс обслуговує внутрішній каскад згортання та тромбін-залежну петлю позитивного зворотного зв'язку. Протромбіназний комплекс як термінальний елемент також входить до компонентного складу цих двох шляхів, втім виконує й окрему роль, обслуговуючи зовнішній каскад згортання. Отже, найбільш потужно антикоагулянтна дія APC може проявитися там, де задіяні обидва комплекси, як теназний, так і протромбіназний.

Тому, в наступній серії дослідів для ініціації згортання в PFP та PRP застосовували CaCl_2 , щоб забезпечити продукцію ендogenous тромбіну як ініціатора згортання. Ця модель згортання дозволяє також дослідити механізми

впливу APC на процеси згортання та лізису, а також з'ясувати участь тромбоцитів в регуляції функціональної активності APC.

Аналогічно до попередніх дослідів, моделювали процеси згортання та згортання/лізису, в якості контролю застосовували варіанти з PFP без додавання та з додаванням APC (Рис.3.7 та 3.8).

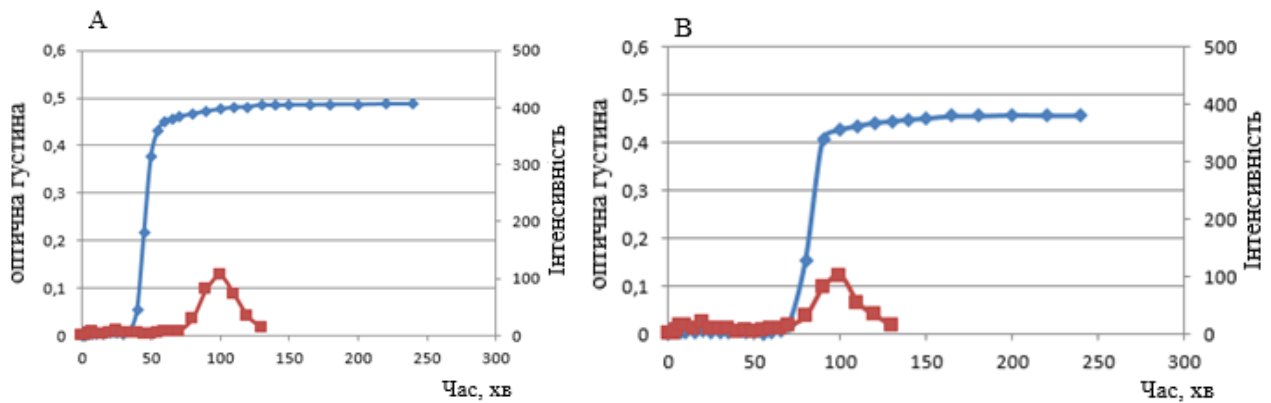


Рис.3.7. Крива згортання (синя крива) та продукування тромбіну (червона крива) в PFP(A) та PFP +APC(B).

З'ясували, що при додаванні APC значно подовжується лаг-період на кривій згортання (на 20 хвилин). За рахунок цього на 25 хвилин зростає і час виходу на максимум. Лаг-період на кривій продукції тромбіну був значно довшим у порівнянні з лаг-періодом згортання, а саме 70 та 65 хвилин для PFP та PFP+APC, відповідно. Додавання APC збільшило лаг-період для тромбіноутворення лише на 5 хв та не вплинуло на час досягнення пікових значень флюоресцентного сигналу.

Аналіз контрольних кривих згортання/лізису (Рис.3.8.) показав, що додавання APC не вплинуло на параметри кривої, лише загальний час життя згустку скоротився на 15 хв (210 та 195 хвилин). Присутність APC майже не змінювала швидкість лізису 30% згустку (95 та 85 хвилин для PFP та PFP+APC, відповідно) та час існування тромбіну в системі (80 хвилин). Це свідчить про відсутність впливу APC на процес згортання/лізису плазми, збідненої на тромбоцити.

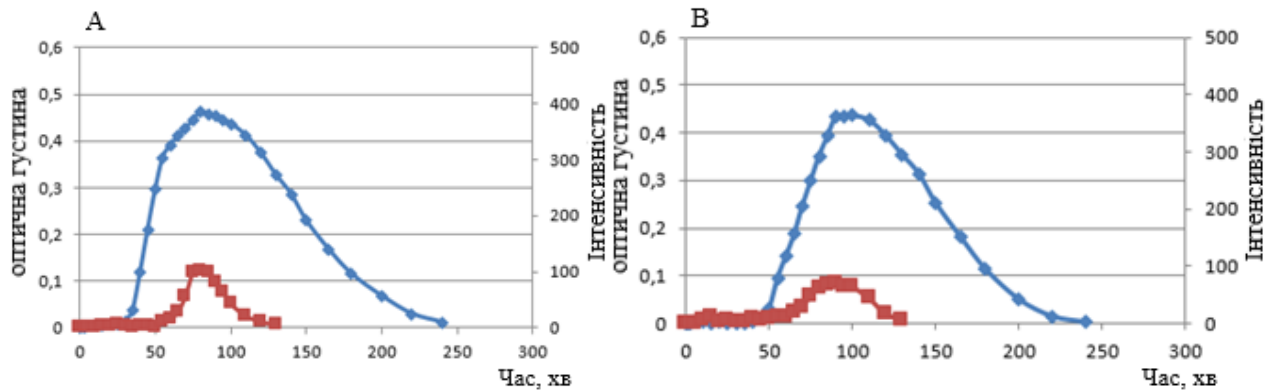


Рис.3.8. Крива згортання і наступного лізису (синя крива) та продукування тромбіну (червона крива) в PFP(A) та PFP +APC (B).

Але цікавим є поява плато після повного формування згустку при додавання APC до PFP. Подібну картину ми спостерігали в серії дослідів, що описані в п.3.1.1. Таким чином, додавання APC спричинило пролонгування початку фібринолізу на 20 хвилин, тоді як в наступних аналогічних дослідях з PRP такого ефекту не спостерігалось (Рис 3.8).

Більш важливі зміни відбувались при спостереженні за плазмою, багатою на тромбоцити. Одразу можна помітити появу першого максимуму на кривих згортання, які ми спостерігали в попередніх дослідженнях (Рис 3.9).

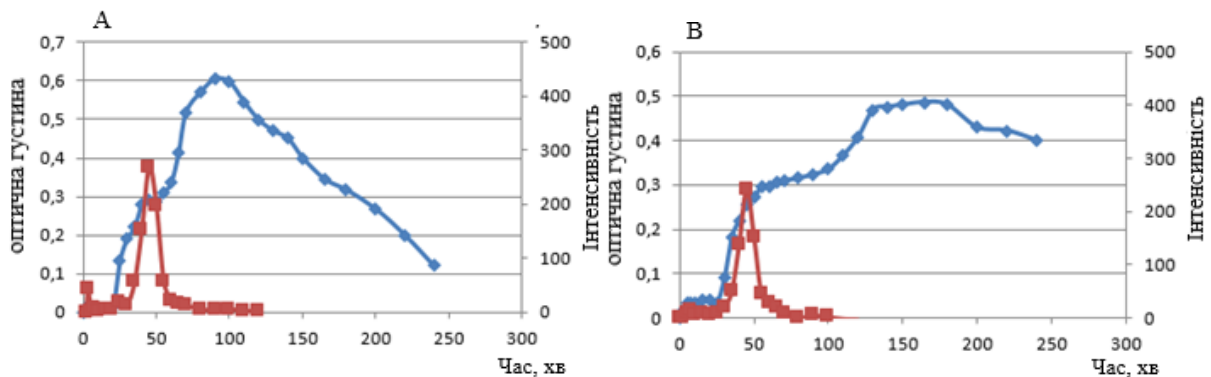


Рис. 3.9. Крива згортання (синя крива) та продукування тромбіну (червона крива) в PRP(A) та PRP +APC(B).

Також, лаг-період в PRP при додаванні APC скорочувався на 18 хвилин в порівнянні з PRP та на 33 хв в порівнянні з PFP без APC (Рис 3.8 та 3.9). Початок другої хвилі поглинання був значно відтермінованим, через що

відбувалось подовження часу виходу на другий максимум (з 90 хвилин для PRP до 130 хвилин при додаванні APC).

В цій серії дослідів повторювались особливості впливу тромбоцитів на генерування тромбіну, подібні до попередніх дослідів (п.3.1.2.), адже в порівнянні з контрольними зразками, максимум тромбіну досягав 268.1 ум. од. для PRP, що на 162 одиниці більше, ніж в PFP. Після додавання APC максимальна кількість тромбіну знижувалась, як в контрольних пробах – на 4,8%, так і в пробах з PRP - на 10,0% (Таблиця 3.3). Ці результати підтверджують гальмівний вплив APC на процес утворення тромбіну в нашій системі. Ці дані також свідчать про важливу кофакторну роль тромбоцитів, які підсилюють антикоагулянтну функцію APC.

Фібринові згустки, що містили тромбоцити, як і в попередній серії дослідів, проходили стадію ретракції, втім додавання APC суттєво її гальмувало (Рис 3.9.)

На процес лізису згустків, утворених в PRP, додавання APC не мало значного впливу, про що свідчать відповідні криві (Рис.3.10). Як і очікувалось, перший максимум на кривих лізису був відсутнім, але натомість в цей час спостерігалось повільне зростання кількості полімеризованого фібрину.

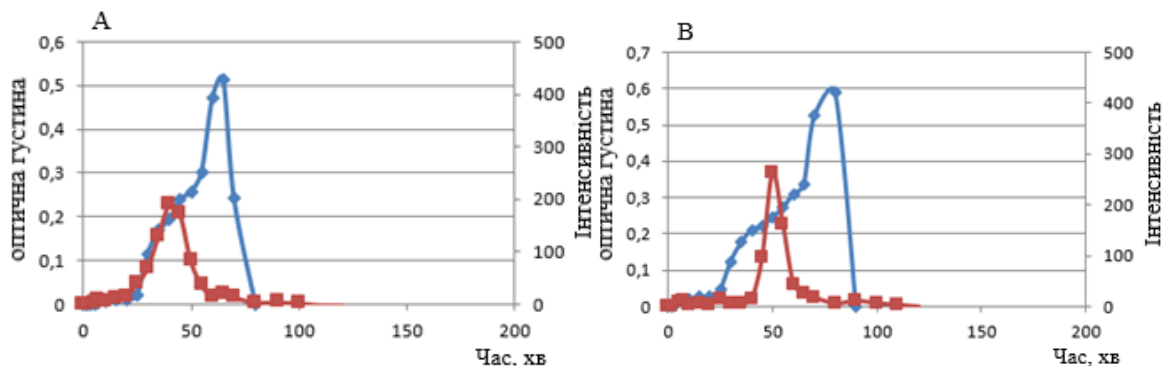


Рис.3.10. Крива згортання і наступного лізису (синя крива) та продукування тромбіну (червона крива) в PRP (A) та PRP +APC (B).

В присутності APC час існування згустку збільшився з 80 до 90 хвилин,

тоді як швидкість лізису при додаванні APC підвищилась, адже 30% згустку розчинилось на 5 хвилин раніше, ніж без додавання APC. Втім, більш суттєво на швидкість лізису вплинули тромбоцити, присутні у фізіологічній концентрації, – 30% згустку розчинилось на 80 хвилин раніше, ніж в PRP без додавання APC.

Як можна побачити, вплив APC на генерацію тромбіну в системі згортання/лізис проявлявся через подовження лаг-періоду на 20 хвилин (20 та 40 хв для PRP та PRP +APC, відповідно), підвищення максимальної концентрації тромбіну на 38% (190 та 262,2 для PRP та PRP +APC, відповідно) та зменшення часу існування тромбіну в системі на 20 хвилин (60 хвилин проти 40 хвилин для PRP та PRP +APC, відповідно).

Для зручності, всі параметри, що порівнювались були зведені в Додаток А.

Таким чином, APC впливає на процес зсідання та лізису декількома шляхами. За відсутності тромбоцитів APC інгібує ініціацію фібриноутворення, що проявляється у подовженні лаг-періоду, а також дещо загальмовує стадію активації фібринолізу, про що свідчить наявність плато на кривих згортання/лізису. Разом ці ефекти призводять до скорочення часу життя фібринового згустку на 15 хв. Вплив APC на тромбіноутворення в присутності тромбоцитів головним чином відбувався через подовження лаг-періоду, підвищення максимальної інтенсивності флюоресцентного сигналу та зменшенні часу існування тромбіну в системі.

В PRP більш потужно проявлялись антикоагулянтні властивості APC, при цьому тромбоцити виступали як кофактори APC: а саме, подовжувався лаг-період утворення тромбіну, відтерміновувались події, пов'язані з дозріванням фібринового згустку (що відображені другою хвилею поглинання на кривих), відбувалось сповільнення ретракції згустку. При цьому, прямий вплив APC на параметри лізису фібринового згустку не був виявлений.

3.3. Визначення рівня FITC-плазміногену, асоційованого з поверхнею неактивованих та тромбін-активованих тромбоцитів

У координатах FS проти SS (бокове розсіювання світла проти прямого розсіювання) перевіряли ефективність активації тромбоцитів 1 НІН од/мл тромбіном. Підтвердили, що в безкальцієвому середовищі 24,8% тромбоцитів змінили розмір та/або гранулярність, тобто перейшли в активований стан (Рис. 3.11).

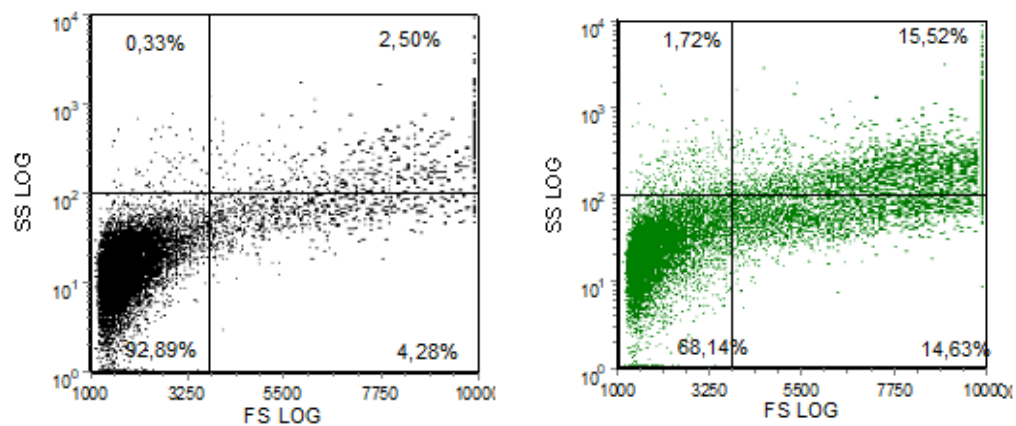


Рис. 3.11. Діаграма розподілу тромбоцитів за розміром та гранулярністю до активації (зліва) та після активації тромбіном (справа) у безкальцієвому середовищі.

При цьому відбувається певне зв'язування FITC-Pg навіть нативними клітинами (Рис. 3.12, контроль), як слабе (субпопуляція M1), так і більш інтенсивне (субпопуляція M2 з другим піком флюоресценції). Додавання ПТК у мінімальній концентрації 0,1 мкМ не змінювало кількість клітин цієї популяції, втім приблизно на 10% збільшувало інтенсивність флюоресценції (Рис. 3.12, А та С). В концентраціях 0,5 мкМ та 1 мкМ ПТК дещо пригнічував інтенсивність другого піку зв'язування (на 20 % та 18 %, відповідно) (Рис. 3.12, В та С) та приблизно в 2 рази зменшував кількість клітин, задіяних у цьому процесі.

Після активації тромбіном на тромбоцитах з'являються нові, більш афінні сайти зв'язування для FITC-Pg, про що свідчить поява третього,

найбільш інтенсивного піку флюоресценції у 25% клітин (Рис.3.13, А та С).

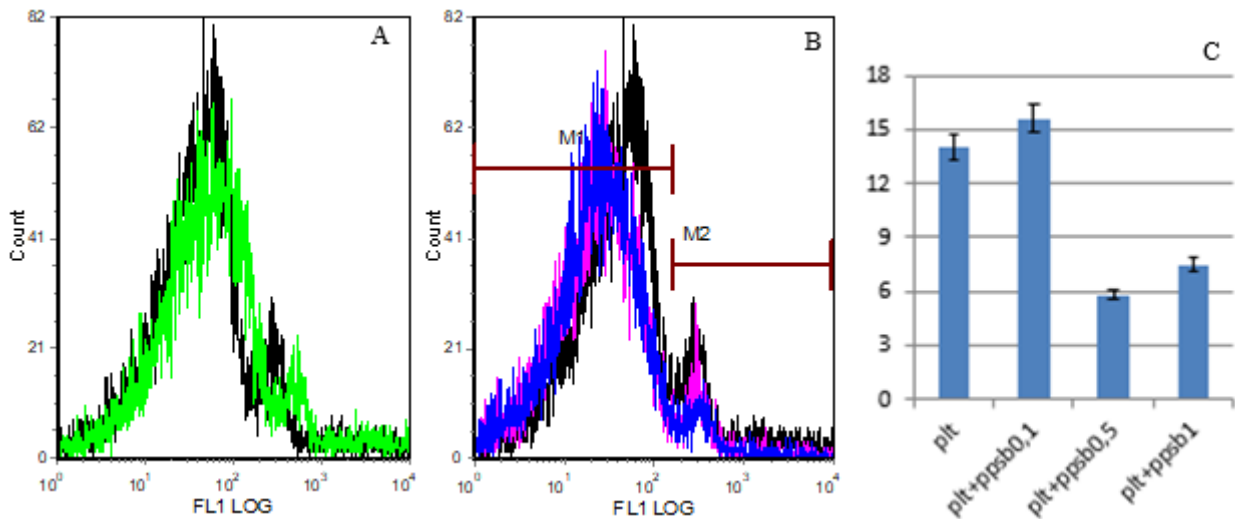


Рис. 3.12. Спектри флюоресценції FITC-Pg при впливі протеїнів ПТК на неактивовані тромбоцити. А – контрольні (чорний колір) клітини без додавання ПТК та клітини, передінкубовані з 0,1 мкМ (зелений); В – той самий контроль (чорний) і клітини, передінкубовані з 1 мкМ (бузковий) та 0,5 мкМ (блакитний) ПТК; С – загальна кількість клітин (у %), що формують пік М2. $n=3$, $p=0.05$

Протеїни ПТК за відсутності Ca^{2+} інгібують це зв'язування на 18% та 20,5% (концентрація 0,1 та 0,5 мкМ, відповідно) (Рис.3.13, В) та зменшують кількість клітин, задіяних в ньому на 9% та 15% (Рис. 3.13, В).

В окремій серії дослідів, де вивчали вплив протеїнів ПТК на асоціацію FITC-Pg з тромбоцитами в Tyrod's буфері, що містив CaCl_2 з'ясували, що 31,3 % та 76,5% тромбоцитів перешли в активований стан під дією тромбіну в концентрації 1 НІН од/мл та 5 НІН од/мл, відповідно (Рис. 3.14).

Як і в попередньому досліді, нативні тромбоцити були здатні більш ефективно зв'язувати FITC-Pg після коінкубації з протеїнами ПТК (Рис.3.15). Про це свідчить поява піку флюоресценції М2 в діапазоні 10^2 - 10^3 , що був відсутній у контролі (тромбоцити + FITC-Pg). Отже, за присутності Ca^{2+} значно зростала кількість тромбоцитів, на яких відбувається колокалізація протеїнів ПТК та плазміногену (Рис. 3.15, С).

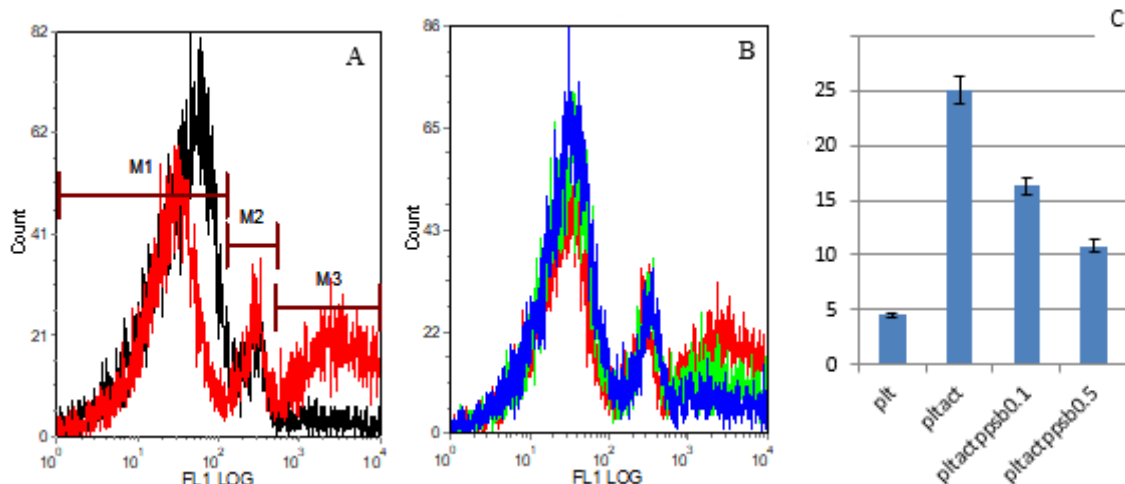


Рисунок 3.13. Спектри флюоресценції FITC-Pg при впливі протеїнів ПТК на активовані тромбіном (1 НН од/мл) тромбоцити у безкальцієвому середовищі. А - неактивовані клітини (чорний колір) та активовані клітини (червоний колір) без додавання ПТК; В – клітини, передінкубовані з 0,5 мкМ (блакитний) та 0,1 мкМ (зелений) ПТК; С – загальна кількість клітин (у %) з максимальною інтенсивністю флуоресценції, що формують пік М3. $n=3$, $p=0.05$

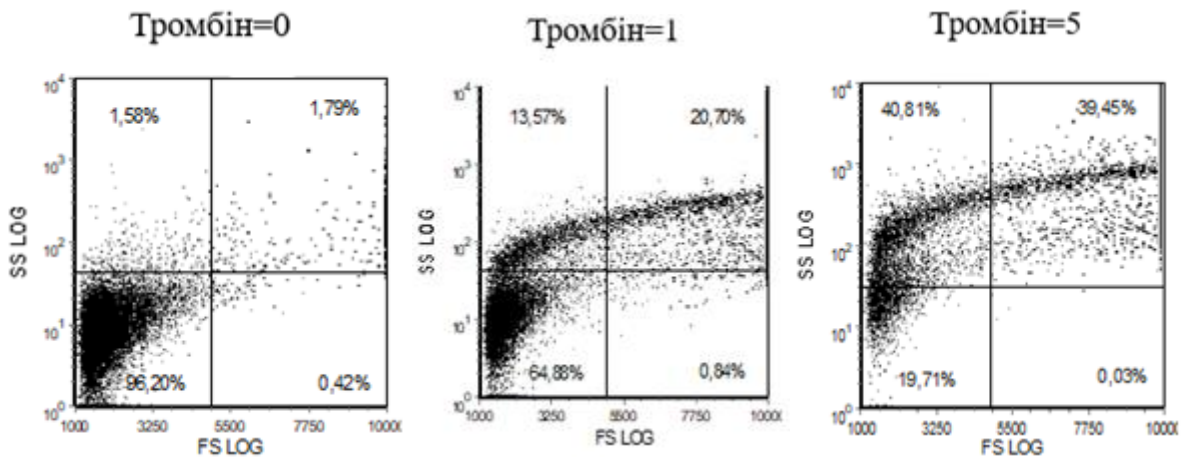


Рис. 3.14. Діаграма розподілу тромбоцитів ($50 \times 10^6/\text{мл}$) за розміром та гранулярністю до активації (зліва) та після активації тромбіном у концентрації 1 НН од/мл та 5 НН од/мл у присутності іонів кальцію.

Вона складала 50-65% у порівнянні з 5-15% за відсутності кальцію (Рис. 3.12., С), що узгоджується з відомими уявленнями про кальцій-залежний характер взаємодії протеїнів ПТК з мембранами клітин, а отже свідчить про

наявність кальцій-залежних сайтів зв'язування для плазміногену.

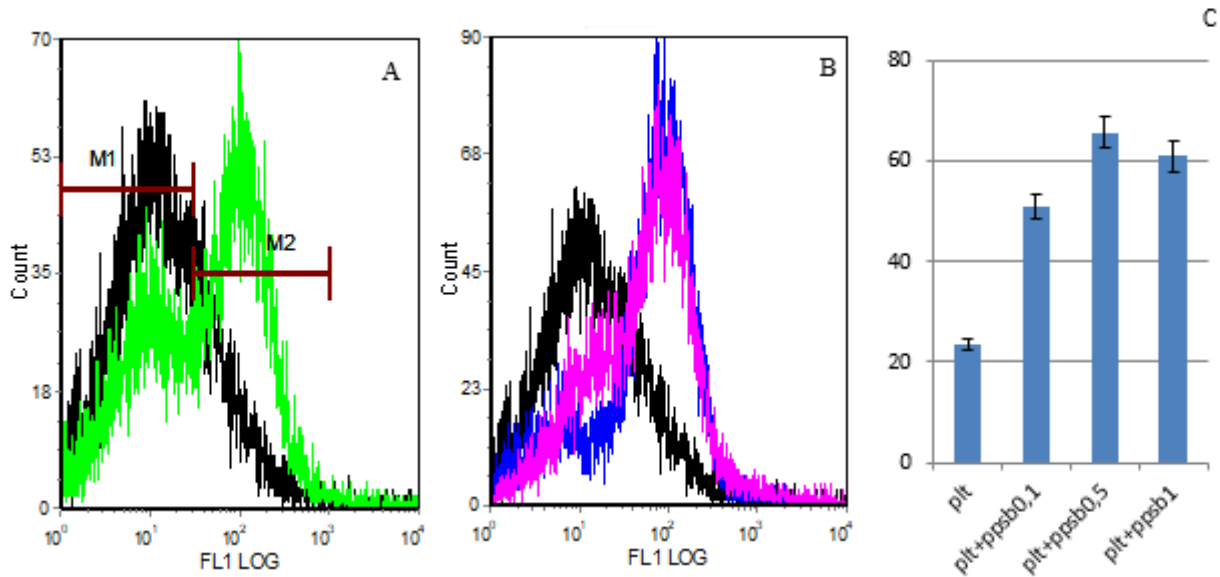


Рис. 3.15. Спектри флюоресценції FITC-Pg з нативними тромбоцитами після інкубації з протеїнами ПТК в присутності іонів кальцію. А – контрольні (чорний колір) клітини без додавання ПТК та клітини, передінкубовані з 0,1 мкМ (зелений); В – той самий контроль (чорний) і клітини, передінкубовані з 1 мкМ (бузковий) та 0,5 мкМ (блакитний) ПТК; С – інтенсивність флюоресценції FITC-Pg. $n=3$, $p=0.05$

Активація тромбоцитів супроводжувалась появою піка високоінтенсивної флюоресценції в діапазоні 10^3 - 10^4 (Рис. 3.16, А, маркер М3), який перевищував флюоресценцію неактивованих клітин в середньому в 4,7 та 3,2 рази для клітин, активованих 1 та 5 од/мл тромбіну, відповідно (Рис. 3.17, А, gate 3). Передінкубація з протеїнами ПТК призводила до зменшення цього ефекту: загальна інтенсивність флюоресценції в гейті 3 зростала лише в 3,5 та 1,5 рази після активації тромбоцитів 1 та 5 од/мл тромбіну, коінкубованих з 1 мкМ ПТК (Рис. 3.16, В). Проте, загальна кількість клітин, що сформували цю субпопуляцію після активації 1 та 5 од/мл тромбіну, зросла в 9,3 та 16 разів без протеїнів ПТК і в 10,8 та 19,5 рази після інкубації з 1 мкМ ПТК (Рис. 3.17, С, gate 3).

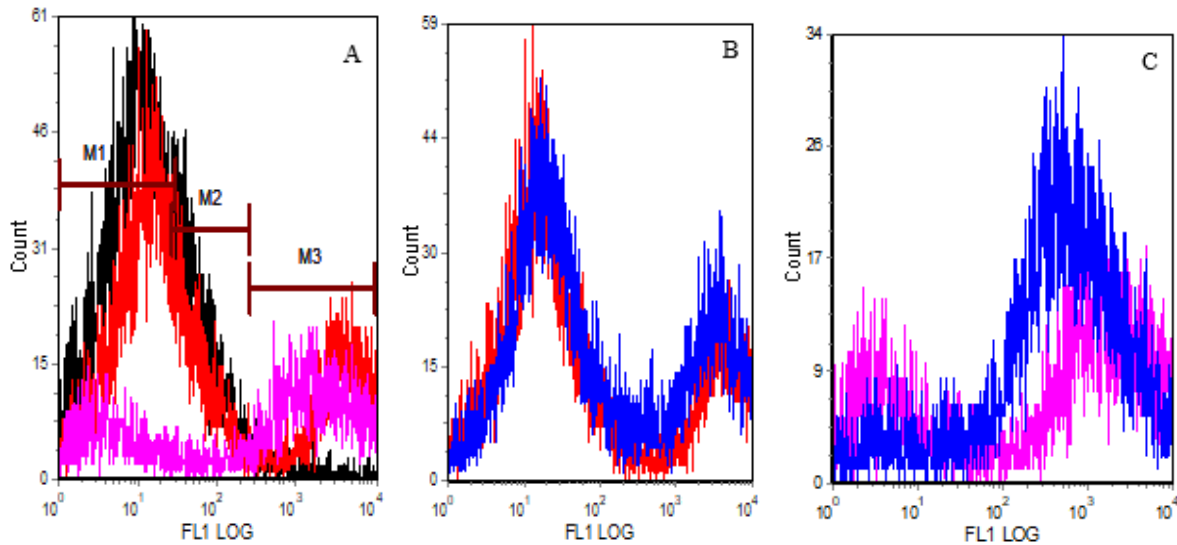


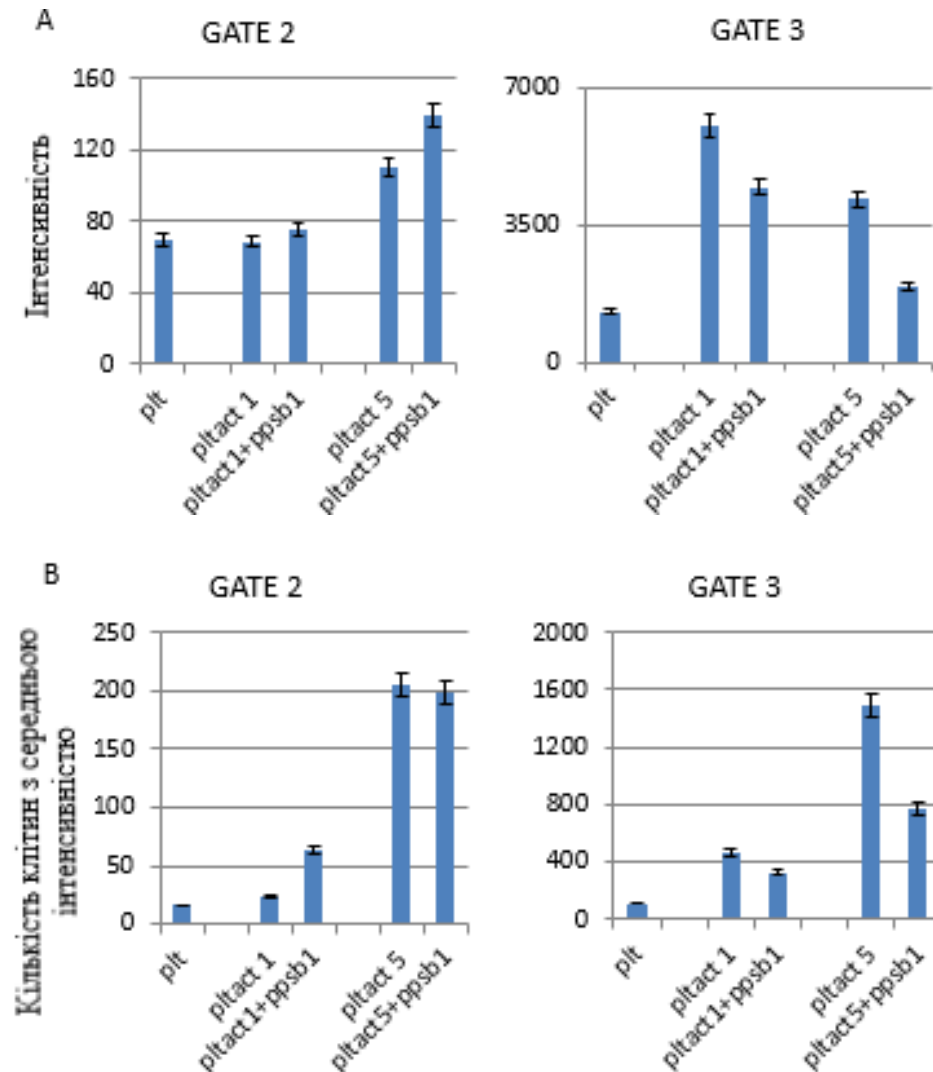
Рис. 3.16. Спектри флюоресценції FITC-Pg з тромбоцитами після активації тромбіном (А) та інкубації з протеїнами ПТК (В і С). А – контроль - неактивовані клітини (чорний) vs. клітини, активовані 1 NIH од/мл тромбіну (червоний) та 5 NIH од/мл (бузковий); В – контроль - клітини, активовані 1 NIH од/мл тромбіну (червоний) vs аналогічні клітини, інкубовані з 1 мкМ ПТК (синій); С - контроль - клітини, активовані 5 NIH од/мл тромбіну (бузковий) vs аналогічні клітини, інкубовані з 1 мкМ ПТК (синій).

При цьому, інтенсивність другого піку флюоресценції, діапазон 10^2 - 10^3 , не змінювалась після активації клітин 1 од/мл тромбіну (Рис. 3.17, А, gate 2) та зростала в 1,5 рази після активації 5 од/мл тромбіну. Протеїни ПТК стимулювали флюоресценцію в цьому діапазоні.

Важливо, що після активації тромбіном відбувалось «загострення» піків в субпопуляціях тромбоцитів з неспецифічним (гейт 1) та високоспецифічним (гейт 3) зв'язуванням плазміногену, тобто збільшилась кількість тромбоцитів із середнім значенням флюоресценції FITC-Pg в кожному з діапазонів флюоресценції (Рис.3.17, В, gate 2 та 3). При цьому кількість тромбоцитів у гейті 2 (зі слабоспецифічним зв'язуванням плазміногену) зменшувалась, особливо внаслідок активації 5 од/мл тромбіну (в 3,8 разів відносно неактивованих клітин), але протеїни ПТК сприяли збільшенню субпопуляції

цих тромбоцитів (Рис.3.17, С, gate 2).

Разом, ці дані свідчать про те, що в процесі активації тромбоцитів відбувається їх перехід з субпопуляції гейту 2 в субпопуляцію гейту 3, тоді як протеїни ПТК збільшують кількість клітин в кожній із двох субпопуляцій, вочевидь, за рахунок рекрутування тромбоцитів з гейту 1 (з неспецифічним зв'язуванням плазміногену).



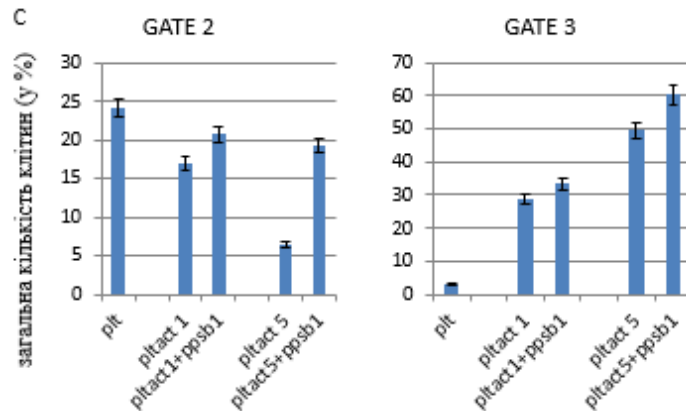


Рисунок 3.17. Статистичні параметри зв'язування FITC-Pg на поверхні тромбоцитів, не стимульованих (plt) та стимульованих тромбіном в концентрації 1 НН од/мл (pltact1) та 5 НН од/мл (pltact5), передінкубованих з протеїнами ПТК в концентрації 0,5 мкМ (pltact + ppsb0,5) та 1 мкМ (pltact + ppsb1). $n=3$, $p=0.05$

Отже, взаємодія тромбоцитів з протеїнами ПТК спричинила розширення та «розмивання» діапазону флюоресценції тромбоцит-асоційованого плазміногену в межах від 10^2 до 10^4 умовних одиниць (Рис. 3.16, А). Вочевидь, це відбувається за рахунок підсилення слабоспецифічного зв'язування плазміногену (Рис.3.17, В, gate 2) та певного пригнічення високоспецифічного зв'язування (Рис.3.17, В, gate 3).

Отримані дані дозволяють припустити існування двох механізмів взаємодії між протеїнами системи плазміноген/плазміну та протромбінового комплексу. За одним механізмом, протеїни ПТК здатні взаємодіяти з мембраною тромбоцитів та забезпечувати низькоафінні сайти зв'язування для Glu-плазміногену, за другим механізмом (який діє лише після активації тромбоцитів) протеїни ПТК конкурують із Glu-плазміногеном за новоутворені, більш ефективні сайти зв'язування. Виявлені особливості взаємного впливу компонентів систем фібринолізу і коагуляції на межі між розчином і поверхнею клітинної мембрани можуть допомогти розкрити тонкі механізми координування взаємодії цих систем за участі тромбоцитів.

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Робота була присвячена вивченню впливу тромбоцитів на процеси формування згустку та його наступного лізису та дослідження молекулярних механізмів, за якими вони можуть опосередковувати цей вплив.

Перший етап роботи полягав у вивченні механізмів, які обумовлюють здатність тромбоцитів прискорювати лізис, що раніше було доведено в попередніх роботах відділу. Важливим питанням, на яке ми також шукали відповідь в цій частині роботи - це з'ясування впливу тромбоцитів на послідовність подій, пов'язаних з утворенням тромбіну та фібрину, а також особливості їх узгодження у часі. Відомо, що процеси утворення протофібрил, початок їх латеральної асоціації та формування фібринових волокон, а потім завершення цього процесу з утворенням прошитого фібрину, прямо чи опосередковано обумовлені дією тромбіну. Тому, є важливим виявити динаміку накопичення тромбіну в системі та його зв'язок з процесом фібриноутворення.

Продукція тромбіну здійснюється внутрішнім та зовнішнім каскадами згортання, та може підсилюватись тромбін-залежною петлею позитивного зворотного зв'язку. Першим чином, ми зосередились на моделюванні роботи двох шляхів: внутрішнього коагуляційного каскаду, ініціюючи його активність додаванням в дослідну плазму CaCl_2 ; та тромбін-залежної петлі позитивного зворотного зв'язку, яку стимулювали внесенням в плазму суміші тромбіну з CaCl_2 . Було підтверджено, що за присутності тромбоцитів відбувається прискорення полімеризації фібрину на кінцевих етапах перед виходом на максимум, але більш цікавим був вплив тромбоцитів на наступний лізис. В контрольних зразках ми могли спостерігати суттєву затримку початку лізису після закінчення формування фібринового згустку. Це свідчить про уповільнення стадії активації плазміногену, протягом якої накопичується потрібна концентрація плазміну для подальшого розщеплення фібрину. За

фізіологічної концентрації тромбоцитів ця затримка повністю зникала, тобто лізис наставав одразу після формування фібринового згустку. При цьому, тромбоцити значно прискорювали лізис: так, час, потрібний на лізис 30% згустку зменшився з 63 хвилин до 25, а час загального життя згустку зменшився більше, ніж на половину.

Моделювання допоміжного шляху, тобто тромбін-залежної петлі позитивного зворотного зв'язку, дозволило виявити декілька етапів у формуванні згустку за даних умов. Зокрема, за присутності тромбоцитів в складі фібринового згустку спостерігали його ретракцію після виходу на максимум, чого не відбувалось для згустків, що не містили клітин. В цій моделі системи згортання/лізису було також зафіксовано більш суттєвий вплив на показники фібринолізу. Так, час лізису 30% згустку пришвидшився на 42.4%, а час існування згустку знизився на 17% в порівнянні з модельною системою, де фібриноутворення забезпечував внутрішній каскад коагуляції. Це свідчить про більш помітний вплив тромбоцитів на реакції автопідсилення тромбіном власної продукції, ніж на внутрішній каскад коагуляції.

Поряд з фібриноутворенням вивчали вплив тромбоцитів на тромбіноутворення. Було виявлено, що залежно від умов дослідження зростає інтенсивність флюоресцентного сигналу тромбіну та знижується час життя тромбіну в системі. При цьому, лише в умовах додавання CaCl_2 спостерігалось зменшення лаг-періоду тромбіноутворення при додаванні тромбоцитів, тоді як при внесенні в систему екзогенного тромбіну лаг-період залишався сталим незалежно від наявності тромбоцитів в зразках. Слід зазначити, що подібно до впливу на фібриноутворення та лізис, тромбоцити діяли на тромбіноутворення переважно через тромбін/ Ca^{2+} -залежні, ніж власне Ca^{2+} -залежні шляхи.

При дослідженні впливу тромбоцитів на структуру згустку було показано, що тромбоцити також суттєво змінюють ступінь впорядкування та структуризацію фібринової сітки. При порівнянні зображень, отриманих за

допомогою конфокальної мікроскопії можна легко помітити різницю в будові фібринової сітки без тромбоцитів та за їх присутності: без тромбоцитів вона має неоднорідну ламелярну структуру, тромбоцити впорядковують її, збираючись у мікроагрегати, які стають своєрідними центрами організації фібринових волокон.

При цьому, при дозріванні згустків загальна кількість фібрил на одиницю площі не змінюється, що підтверджує нашу гіпотезу про те, що процес переходу фібриногену в фібрин в основному завершується на ранніх стадіях утворення фібринового згустку (що потребує приблизно 15 хвилин). Подальші зміни зосереджені на перерозподілі фібрину між вільною та тромбоцит-асоційованою формами. На 60 хв основною подією є зростання кількості мікроагрегатів, що стають центрами організації фібрину.

В окремій серії дослідів досліджували вплив APC на процеси згортання та лізису, а також роль тромбоцитів в регуляції функціональної активності APC. Для цього ініціювали згортання в PFP та PRP за допомогою CaCl_2 , щоб забезпечити продукцію ендogenous тромбіну шляхом, який піддається регуляції APC (внутрішній каскад коагуляції). На кривих, що були отримані при дослідженні контрольних проб, значних змін при додаванні APC не спостерігалось, розтягувався лише лаг-період фібриноутворення. Але при цьому, додавання APC до PFP обумовило пролонгування на 20 хвилин стадії активації плазміногену для ініціації лізису.

Більш важливі зміни відбувались при спостереженні за згортанням/лізисом плазми, багатої на тромбоцити. В цій серії дослідів повторювались особливості впливу тромбоцитів на генерування тромбіну, подібні до попередніх дослідів, тобто максимум продукування тромбіну значно зростав в присутності тромбоцитів. Після додавання APC максимальна кількість тромбіну знижувалась, як в контрольних пробах, так і в пробах з PRP. Ці дані узгоджуються з загальноприйнятими уявленнями про антикоагулянтну функцію

АРС, що проявлялась в більш сильному інгібуванні тромбін-продукувального каскаду в цій модельній системі відносно контрольних зразків без додавання АРС. Ці дані також свідчать про кофакторну роль тромбоцитів, які підсилюють антикоагулянтну функцію АРС. При цьому, безпосереднього впливу АРС на показники лізису виявлено не було.

Друга частина нашої роботи була зосереджена на можливості взаємодії профібринолітичних та антикоагулянтних білків з тромбоцитами. Тромбоцити мають ділянки зв'язування для профібринолітичних білків, в тому числі плазміногену, який може зв'язуватись за допомогою двох механізмів: залежного та незалежного від $\alpha\text{IIb}\beta_3$ і фібрину. Також, на поверхні тромбоцитів можуть асоціюватись (за участі катіонів кальцію) і білки-кофактори процесу згортання, наприклад білки протромбінового комплексу, ПТК. Тому, було важливим дослідити комплексну взаємодію плазміногену з білками ПТК та CaCl_2 в процесі його зв'язування на тромбоцитах.

На початкових етапах дослідження порівнювали ефективність двох механізмів зв'язування плазміногену, кальцій-незалежного та кальцій-залежного. Зокрема, було показано, що за відсутності Ca^{2+} навіть неактивовані тромбоцити в невеликій кількості зв'язують плазміноген, тоді як після активації плазміноген-зв'язувальна здатність тромбоцитів зростає. Після активації тромбіном на тромбоцитах з'являються нові, високоафінні сайти зв'язування для FITC-Pg, про що свідчить поява додаткового, найбільш інтенсивного піку флуоресценції у 25% клітин. При цьому, додавання протеїнів ПТК у безкальцієве середовище зменшує кількість клітин, що зв'язують плазміноген, на 9% та 15%.

В серії дослідів за присутності Ca^{2+} з'ясували, що нативні тромбоцити після додавання ПТК набагато ефективніше зв'язують плазміноген (поява піку флуоресценції M2 в діапазоні 10^2 - 10^3). Це свідчить про те, що Ca-залежне формування сайтів зв'язування плазміногену відбувається за участі ПТК.

При активації тромбоцитів тромбіном спостерігалась поява найбільш інтенсивного піку флюоресценції в діапазоні 10^3 - 10^4 , який перевищував флюоресценцію нативних клітин в 4,7 та 3,2 рази для клітин, активованих 1 та 5 од/мл тромбіну, відповідно. Передінкубація з ПТК зменшувала цей ефект. Також важливо, що після активації тромбіном відбувалось збільшення кількості тромбоцитів в субпопуляціях зі слабоспецифічним (M2) та високоспецифічним (M3) зв'язуванням плазміногену. Разом, всі отримані дані свідчать про те, що в процесі активації тромбоцити переходять з субпопуляції зі слабоспецифічним зв'язуванням плазміногену в субпопуляцію з високоспецифічним зв'язуванням, тоді як протеїни ПТК збільшують кількість клітин в кожній із двох субпопуляцій, вочевидь, за рахунок рекрутування тромбоцитів з субпопуляції з неспецифічним зв'язуванням плазміногену.

Таким чином, можна запропонувати декілька механізмів взаємодії білків протромбінового комплексу з системою плазміноген/плазмін. Спочатку, у випадку нативних тромбоцитів, протеїни ПТК здатні взаємодіяти з мембраною тромбоцитів та забезпечувати низькоафінні сайти зв'язування для Glu-плазміногену, тоді як після активації тромбоцитів тромбіном додається ще один механізм, за яким протеїни ПТК конкурують із Glu-плазміногеном, послаблюючи ефективність його високоспецифічного зв'язування. В цілому, вплив ПТК призводить до збільшення пулу клітин, здатних зв'язувати плазміноген з одночасним зменшенням середньої концентрації плазміногену на поверхні окремої клітини.

Підсумовуючи можна зробити висновок про те, що роль тромбоцитів в гомеостазі багатогранна: їхнє залучення до тромбогенезу починається від ініціації згортання, продовжується на стадії формування фібринового згустку та завершується регуляторним впливом на лізис утвореного згустку.

ВИСНОВКИ

1. Підтверджено здатність тромбоцитів прискорювати полімеризацію фібриногену плазми з формуванням фібрину. Показано, що при цьому зростає кількість ендogenous тромбіну та зменшується час його існування в системі у порівнянні з безклітинною плазмою. Також, показано, що тромбоцити прискорюють лізис згустку (на 38 хвилин) та зменшують час його життя;

2. Підтверджена пряма інгібіторна дія APC на процес утворення ендogenous тромбіну. Встановлено, що тромбоцити діють як кофактори, які підсилюють антикоагулянтну функцію APC. Відмічено, що в умовах здійсненого моделювання APC не впливав на процес фібринолізу;

3. Показано, що тромбоцити виступають центрами організації мережевої структури згустку, створюючи вузли у його каркасі, де концентрується переважна кількість фібрину;

4. Виявлено прямий зв'язок між функціональним станом тромбоцитів та їх здатністю утримувати на поверхні Glu-плазміноген: неактивовані тромбоцити зв'язують плазміноген у невеликій кількості, тоді як при активації плазміноген-зв'язувальна здатність тромбоцитів суттєво зростає, що обумовлено появою високоафінних сайтів зв'язування для FITC-Pg;

5. Встановлено, що вплив протеїнів ПТК полягає у збільшенні кількості тромбоцитів, здатних зв'язувати Glu-плазміноген та зменшенні середньої концентрації плазміногену на поверхні окремої клітини;

6. Передбачається, що існують два механізми ПТК-залежної асоціації плазміногену з поверхнею тромбоцитів: 1 - протеїни ПТК за участі Ca^{2+} утворюють комплекси на поверхні тромбоцитів, які діють як низькоафінні сайти зв'язування плазміногену; 2 - продукуючи тромбін, ці комплекси підсилюють активацію тромбоцитів та одночасно здійснюють перехід до іншого механізму, за яким окремі протеїни ПТК конкурують із Glu-плазміногеном за новоутворені, більш ефективні сайти зв'язування.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Miles LA, Ginsberg MH, White JG, Plow EF. Plasminogen interacts with human platelets through two distinct mechanisms. *J Clin Invest.* 1986;77(6):2001–9.
2. Cesarman-Maus G, Hajjar KA. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Br J Haematol.* 2005;129(3):307–21.
3. Cappelletti RM. Fibrinogen and fibrin: Structure and functional aspects. *Thrombin Funct Pathophysiol.* 2012;263–91.
4. Medved L, Nieuwenhuizen W. Molecular mechanisms of initiation of fibrinolysis by fibrin. *Thromb Haemost.* 2003;89(3):409–19.
5. Weisel JW, Litvinov RI. Mechanisms of fibrin polymerization and clinical implications. *Blood.* 2013;121(10):1712–9.
6. Kostelansky MS, Betts L, Gorkun O V., Lord ST. A crystal structures of recombinant fibrinogen fragment D with and without two peptide ligands: GHRP binding to the “b” site disrupts its nearby calcium-binding site. *Biochemistry.* 2002;41(40):12124–32.
7. Okumura N, Gorkun O V., Lord ST. Severely impaired polymerization of recombinant fibrinogen γ -364 Asp $\rightarrow$ His, the substitution discovered in a heterozygous individual. *J Biol Chem.* 1997;272(47):29596–601.
8. Weisel J, Medved L. The Structure and Function of the α C Domains of Fibrinogen. *Annals of the New York Academy of Sciences*,.pdf. *Ann New York Acedemy Sci.* 2001;936:312–27.
9. Parry D, Squire J. Fibrin Formation, Structure and Properties John. Vol. 82, *Subcellular Biochemistry.* 2017. 405–456 p.
10. Mosesson MW, DiOrio JP, Siebenlist KR, Wall JS, Hainfeld JF. Evidence for a second type of fibril branch point in fibrin polymer networks, the trimolecular junction. *Blood.* 1993;82(5):1517–21.
11. Fogelson AL, Keener JP. Toward an understanding of fibrin branching

- structure. *Phys Rev E - Stat Nonlinear, Soft Matter Phys.* 2010;81(5).
12. Lecover R, Orfeo T, Brummel-Ziedins K, Bravo M, Pusateri A, Varner J. Kinetic Modeling of Coagulation and Fibrinolysis. *IFAC-PapersOnLine* [Internet]. 2019;52(26):94–100. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ifacol.2019.12.242>
 13. Fuss C, Palmaz JC, Sprague EA. Fibrinogen: Structure, function, and surface interactions. *J Vasc Interv Radiol.* 2001;12(6):677–82.
 14. Plawinski L, Dejouvencel T, Anglés-Cano E. Fibrinolyse, nouveaux concepts: Vésicules et cross-talk fibrinolytiques. *Hematologie.* 2011;17(6):423–34.
 15. Law RHP, Caradoc-Davies T, Cowieson N, Horvath AJ, Quek AJ, Encarnacao JA, et al. The X-ray Crystal Structure of Full-Length Human Plasminogen. *Cell Rep* [Internet]. 2012;1(3):185–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2012.02.012>
 16. Fine KM, Ashbrook PC, Brigden LP, Maldonado JE, Didishelm P. Gel filtered human platelets. Ultrastructure, function, and role of proteins in inhibition of aggregation by aspirin. *Am J Pathol.* 1976;84(1):11–24.
 17. Dejouvencel T, Doeuvre L, Lacroix R, Plawinski L, Dignat-George F, Lijnen HR, et al. Fibrinolytic cross-talk: A new mechanism for plasmin formation. *Blood.* 2010;115(10):2048–56.
 18. Bertrand T, Lesept F, Chevilley A, Lenoir S, Aimable M, Briens A, et al. Conformations of tissue plasminogen activator (tPA) orchestrate neuronal survival by a crosstalk between EGFR and NMDAR. *Cell Death Dis* [Internet]. 2015;6(10):1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2015.296>
 19. Nienaber VL, Berliner LJ, Young SL, Higgins DL, Birktoft JJ. Conformational Similarities between One-Chain and Two-Chain Tissue Plasminogen Activator (t-PA): Implications to the Activation Mechanism on One-Chain t-PA. *Biochemistry.* 1992;31(15):3852–61.
 20. Longstaff C, Kolev K. Basic mechanisms and regulation of fibrinolysis. *J*

- Thromb Haemost. 2015;13(S1):S98–105.
21. Silva M., Thelwell C, Williams SC, Longstaff C. Regulation of fibrinolysis by C-terminal lysines operates through plasminogen and plasmin but not tissue-type plasminogen activator. *J Thromb Haemost.* 2012;10(11):2354–60.
 22. Kołodziejczyk J, Ponczek MB. The role of fibrinogen, fibrin and fibrin(ogen) degradation products (FDPs) in tumor progression. *Wspolczesna Onkol.* 2013;17(2):113–9.
 23. Bates S. D-dimer assays in diagnosis and management of thrombotic and bleeding disorders. *Semin Thromb Hemost.* 2012;38(7):673–82.
 24. Michelson A. Platelets. *Platelets.* 2007.
 25. Т. В. Гриненко, О. І. Юсова, Ревка ОВ, Паталах. ІІ, Яценко ТА. Регуляція фібринолізу тромбоцитами, що містять на своїй поверхні плазміноген та тканинний активатор. *Український біохімічний журнал.* 2019;91(6):38–48.
 26. Bennett JS. Platelet-Fibrinogen Interactions. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;936(1):340–54.
 27. Heemskerk JWM, Mattheij NJA, Cosemans JMEM. Platelet-based coagulation: Different populations, different functions. *J Thromb Haemost.* 2013;11(1):2–16.
 28. Heemskerk JWM, Bevers EM, Lindhout T. Platelet activation and blood coagulation. *Thromb Haemost.* 2002;88(2):186–93.
 29. Bevers EM, Comfurius P, Zwaal RFA. Platelet procoagulant activity: physiological significance and mechanisms of exposure. *Blood Rev.* 1991;5(3):146–54.
 30. Cosemans JMEM, Schols SEM, Stefanini L, De Witt S, Feijge MAH, Hamulyák K, et al. Key role of glycoprotein Ib/V/IX and von Willebrand factor in platelet activation-dependent fibrin formation at low shear flow. *Blood.* 2011;117(2):651–60.
 31. Whyte CS, Swieringa F, Mastenbroek TG, Lionikiene AS, Lancé MD, Van Der Meijden PEJ, et al. Plasminogen associates with phosphatidylserine-exposing

- platelets and contributes to thrombus lysis under flow. *Blood*. 2015;125(16):2568–78.
32. Topalov NN, Yakimenko AO, Canault M, Artemenko EO, Zakharova N V., Abaeva AA, et al. Two types of procoagulant platelets are formed upon physiological activation and are controlled by integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32:2475–83.
 33. Alberio L, Safa O, Clemetson KJ, Esmon CT, Dale GL. Surface expression and functional characterization of α -granule factor V in human platelets: Effects of ionophore A23187, thrombin, collagen, and convulxin. *Blood*. 2000;95(5):1694–702.
 34. Handtke S, Steil L, Greinacher A, Thiele T. Toward the relevance of platelet subpopulations for transfusion medicine. *Front Med*. 2018;5(FEB):1–9.
 35. Lesyk G, Jurasz P. Advances in Platelet Subpopulation Research. *Front Cardiovasc Med*. 2019;6(September):1–8.
 36. Kempton CL, Hoffman M, Roberts HR, Monroe DM. Platelet heterogeneity: Variation in coagulation complexes on platelet subpopulations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(4):861–6.
 37. Yakimenko AO, Verholomova FY, Kotova YN, Ataullakhanov FI, Panteleev MA. Identification of different proaggregatory abilities of activated platelet subpopulations. *Biophys J* [Internet]. 2012;102(10):2261–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2012.04.004>
 38. Schoenwaelder SM, Yuan Y, Josefsson EC, White MJ, Yao Y, Mason KD, et al. Two distinct pathways regulate platelet phosphatidylserine exposure and procoagulant function. *Blood*. 2009;114(3):663–6.
 39. Södergren AL, Ramström S. Platelet subpopulations remain despite strong dual agonist stimulation and can be characterised using a novel six-colour flow cytometry protocol. *Sci Rep*. 2018;8(1):1–12.
 40. Nikolajsen CL, Dyrlund TF, Poulsen ET, Enghild JJ, Scavenius C. Coagulation

- factor XIIIa substrates in human plasma: Identification and incorporation into the clot. *J Biol Chem*. 2014;289(10):6526–34.
41. Muszbek L, Ádány R, Mikkola H. Novel aspects of blood coagulation factor XIII. I. Structure, distribution, activation, and function. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 1996;33(5):357–421.
 42. Sun H, Kaartinen MT. Transglutaminases in Monocytes and Macrophages. *Med Sci*. 2018;6(4):115.
 43. Lorand L. Factor XIII: Structure, Activation, and Interactions with Fibrinogen and Fibrin. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;936(1):291–311.
 44. Pechik I, Madrazo J, Mosesson MW, Hernandez I, Gilliland GL, Medved L. Crystal structure of the complex between thrombin and the central “E” region of fibrin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(9):2718–23.
 45. Curtis BCG, Lorand L. Fibrin-Stabilizing Factor (Factor XIII). 1976;177–91.
 46. Souri M, Osaki T, Ichinose A. The non-catalytic B subunit of coagulation factor XIII accelerates fibrin cross-linking. *J Biol Chem*. 2015;290(19):12027–39.
 47. Smith KA, Adamson PJ, Pease RJ, Brown JM, Balmforth AJ, Cordell PA, et al. Interactions between factor XIII and the α C region of fibrinogen. *Blood*. 2011;117(12):3460–8.
 48. Byrnes JR, Wilson C, Boutelle AM, Brandner CB, Flick MJ, Philippou H, et al. The interaction between fibrinogen and zymogen FXIII-A2B2 is mediated by fibrinogen residues γ 390-396 and the FXIII-B subunits. *Blood*. 2016;128(15):1969–78.
 49. Collet JP, Shuman H, Ledger RE, Lee S, Weisel JW. The elasticity of an individual fibrin fiber in a clot. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(26):9133–7.
 50. Liu W, Jawerth LM, Sparks EA, Falvo MR, Hantgan RR, Superfine R, et al. Fibrin fibers have extraordinary extensibility and elasticity. *Science* (80-). 2006;313(5787):634.

51. Byrnes JR, Wolberg AS. Newly-Recognized Roles of Factor XIII in Thrombosis. *Semin Thromb Hemost*. 2016;42(4):445–54.
52. Fraser SR, Booth NA, Mutch NJ. Brief report The antifibrinolytic function of factor XIII is exclusively expressed through. *Thromb Haemost*. 2011;117(23):6371–4.
53. Perera L, Foley C, Darden TA, Stafford D, Mather T, Esmon CT, et al. Modeling zymogen protein C. *Biophys J*. 2000;79(6):2925–43.
54. Mosnier LO, Griffin JH. Department of Molecular and Experimental Medicine, The Scripps Research Institute, 10550 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037, USA. *North*. 2006;2381–99.
55. Mosnier LO, Zlokovic B V., Griffin JH. The cytoprotective protein C pathway. *Blood*. 2007;109(8):3161–72.
56. Danese S, Vetrano S, Li Z, Poplis VA, Castellino FJ. The protein C pathway in tissue inflammation and injury: Pathogenic role and therapeutic implications. *Blood*. 2010;115(6):1121–31.
57. Oto J, Fernández-Pardo Á, Miralles M, Plana E, España F, Navarro S, et al. Activated protein C assays: A review. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2020;502:227–32. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.11.005>
58. Angelidis G, Dafopoulos K, Messini CI, Valotassiou V, Georgoulas P, Messinis IE. Ghrelin: New Insights into Female Reproductive System – Associated Disorders and Pregnancy. *Reprod Sci* [Internet]. 2012;00(0). Available from: <http://rsx.sagepub.com/content/early/2012/04/27/1933719112443880>
59. Weiler H, Isermann BH. Thrombomodulin. *J Thromb Haemost*. 2003;1(7):1515–24.
60. Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S, Mollica JS, Ferrell GL, Esmon CT. The endothelial cell protein C receptor augments protein C activation by the thrombin-thrombomodulin complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*.

1996;93(19):10212–6.

61. Gale AJ, Griffin JH. Characterization of a Thrombomodulin Binding Site on Protein C and Its Comparison to an Activated Protein C Binding Site for Factor Va. *Proteins Struct Funct Genet*. 2004;54(3):433–41.
62. Esmon CT. The Protein C Pathway. *Chest* [Internet]. 2003;124(3 SUPPL.):18S–25S. Available from: http://dx.doi.org/10.1378/chest.124.3_suppl.18S
63. Suzuki K, Nishioka J, Hayashi T, Kosaka Y. Functionally active thrombomodulin is present in human platelets. *J Biochem*. 1988;104(4):628–32.
64. Grey ST, Hancock WW. A physiologic anti-inflammatory pathway based on thrombomodulin expression and generation of activated protein C by human mononuclear phagocytes. *J Immunol* [Internet]. 1996 Mar 15;156(6):2256 LP – 2263. Available from: <http://www.jimmunol.org/content/156/6/2256.abstract>
65. Galligan L, Livingstone W, Volkov Y, Hokamp K, Murphy C, Lawler M, et al. Characterization of protein C receptor expression in monocytes. *Br J Haematol*. 2001;115(2):408–14.
66. Patalakh II, Revka O V., Drobotko TF. Endothelium-independent Activation of Protein C in whole blood. *Int J Physiol Pathophysiol*. 2016;7(3):1–9.
67. Bouma BN, Meijers JCM. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI, plasma procarboxypeptidase B, procarboxypeptidase R, procarboxypeptidase U). *J Thromb Haemost*. 2003;1(7):1566–74.
68. Mosnier LO, Meijers JCM, Bouma BN. Regulation of fibrinolysis in plasma by TAFI and protein C is dependent on the concentration of thrombomodulin. *Thromb Haemost*. 2001;85(1):5–11.
69. Horrevoets AJG. Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1): In vitro activities and clinical relevance. *Br J Haematol*. 2004;125(1):12–23.
70. Rachita Dhurat MS. Principles and Methods of Preparation of Platelet-Rich Plasma: A Review and Author's Perspective. *J Cutan Aesthet Surg*. 2014;7(4):189–97.

71. Required M. Instruction FITC and TRITC. 2013;0747(46424):1–3.
72. Revka O. Patalakh I. GT. Platelets in coordination of coagulation and fibrinolysis. Ukr Biochem J. 2018;90(Special Issue):159.
73. Revka O. Biochemical mechanisms of fibrin clot formation and subsequent lysis regulation by platelets. Ukr Biochem J. 2018;90(3):130.

ДОДАТКИ

Додаток А

Порівняння показників згортання та лізису в PFP та PFP при додаванні
APC

	Згортання				Згортання/лізис			
	PFP	PFP + APC	PRP	PRP + APC	PFP	PFP + APC	PRP	PRP + APC
Параметри процесу згортання (n=3)								
Ляг-період фібриноутворенн я, хв	35±3	65±6	20±2	2±0,1	30±3	45±4	25±2	5±0,4
Час виходу на перший максимум, хв	-	-	40±4	50±5	-	-	35-55 хв пов. Зроста ння	40-65 хв пов. Зроста ння
Час виходу на максимум згортання, хв	55±5	100±9	90±8	130±10	80±7	90±8	65±6	80±7
Макс значення поглинання на 405, од.опт.густ	0,45 5±0, 03	0,427±0 ,04	0,604±0 ,05	0,469±0 ,04	0,4625±	0,4335± 0,02	0,514±0 ,04	0,591±0 ,06
Параметри процесу тромбіноутворення (n=3)								
Час виходу на максимум тромбіну	100± 10	100± 10	45±4	45±4	80±7	90±8	40±3	50±3
Ляг-період тромбіноутворенн я, хв	70±7	65±6	20±2	25±2	50±4	50±4	20±2	40±4
максимальна інтенсивність флюоресцентного сигналу, умов. од.	105, 5±10	100,8±1 0	268,1±2 8	240,8±2 3	100,6±1 0	69,8±7	190±20	262,5±2 7
Час існування тромбіну, хв	60±5	65±7	60±5	45±4	80±7	80±8	60±6	40±4
Параметри процесу згортання/лізису (n=3)								
Час лізису 30% згустку, хв	-	-	-	-	95 ±8	85 ± 8	15 ± 1	10±1
Час загального життя згустку, хв	-	-	255 ± 26	240 і більше	210 ± 20	195 ± 20	80 ±7	90±8