



**ЧЕРНИШЕНКО**

**Володимир Олександрович** – кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник відділу структури та функції білка Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України  
<https://orcid.org/0000-0002-6564-8823>

## МЕХАНІЗМИ ЕКСТРАСУДИННОГО ТА ВНУТРІШНЬОСУДИННОГО ТРОМБОУТВОРЕННЯ: ФУНДАМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ДЛЯ ПОТРЕБ КЛІНІЧНОЇ ПРАКТИКИ

За матеріалами наукового повідомлення  
на засіданні Президії НАН України  
27 лютого 2019 року

*Вивчення тонких механізмів молекулярних перетворень фібриногену під час полімеризації дозволило виявити, що сполуки імунoglobulinovoi природи, поліпептиди та низькомолекулярний калікс[4]арен здатні специфічно інгібувати формування фібринового каркасу тромбу. Такі сполуки можна розглядати як перспективні молекулярні платформи для створення антитромботичних засобів, покликаних запобігати внутрішньосудинному тромбоютворенню, яке є причиною таких небезпечних патологій, як інфаркт міокарда, ішемічний інсульт головного мозку тощо. На основі розробок відділу структури та функції білка було створено також універсальний гемостатичний засіб «Карбогемостат», здатний ефективно стимулювати екстрасудинне тромбоютворення з метою запобігання кровотраті при ушкодженнях кровоносних судин внаслідок різного роду травм та під час хірургічних втручань.*

**Ключові слова:** кровообіг, тромбоз, кровотеча, антитіла, пептиди, калікс-[4]арени, гемостатики.

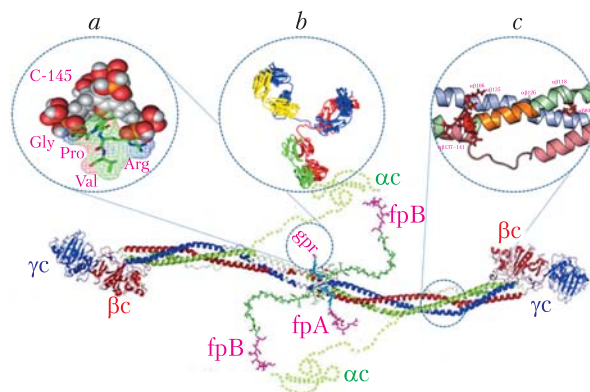
Кровообіг є унікальною системою організму людини, яка забезпечує інтеграцію тканин і органів у єдине ціле. Омиваючи органи і тканини тіла, кров постачає до них поживні речовини та кисень, забезпечує елімінацію метаболітів, транспортує гуморальні регулятори та компоненти імунної системи. Порухення функцій кровообігу призводить до тяжких наслідків для всього організму. При цьому такі порушення можуть бути викликані як масивною кровотечею, так і локальним припиненням кровотоку, спричиненим переважно внутрішньосудинним тромбоютворенням.

До найвідоміших (і найнебезпечніших) захворювань, викликаних тромбоемболіями, належить припинення кровопостачання окремих органів (ішемічний інсульт) або серця (тромбоз коронарної артерії), емболізація судин легенів (тромбоемболія легеневої артерії), а також атеросклероз та атеротромбоз судин.

Підтримання циркулювання крові в судинах та швидке припинення кровотеч забезпечує система гемостазу, що включає клітинний компонент (тромбоцити і ендотелій судин) та ензимні комплекси, кожен з яких виконує свою, чітко детерміновану функцію: протромбіназа, теназа, антикоагулянтна і фібринолітична системи тощо. Каскади ензимів перебувають у постійній динамічній рівновазі, порушення якої і спричинює розлади у кровообігу.

Дію всіх ензиматичних каскадів гемостазу в кінцевому підсумку спрямовано на єдину молекулу – фібриноген (рис. 1). Фібриноген – це великий глікопротеїн з молекулярною масою 340 kDa. Його сформовано з двох субодниць, кожна з яких у свою чергу складається з трьох ланцюгів, сполучених між собою дисульфідними зв'язками:  $A\alpha$  ( $A\alpha 1-610$ ),  $B\beta$  ( $B\beta 1-461$ ) та  $\gamma$  ( $\gamma 1-411$ ) [1]. N-кінцеві ділянки трьох пар ланцюгів розташовано у центральному E-регіоні молекули, C-кінцеві ділянки кожного з пари ланцюгів  $B\beta$  та  $\gamma$  формують  $\beta$ C- та  $\gamma$ C-домени, структурно і функціонально об'єднані у два дистальні D-регіони [2]. C-кінцеві ділянки  $A\alpha$ -ланцюга молекули фібриногену є лабільними і просторово невпорядкованими. Вони сполучаються завдяки електростатичним зв'язкам з центральним E-регіоном молекули та між собою, формуючи  $\alpha$ C-регіон [3].

Саме фібриноген, за умови активації системи гемостазу, зазнає обмеженого протеолізу тромбіном. Втрачаючи послідовно відщеплювані тромбіном фібринопептиди A і B (термінальні N-кінцеві ділянки ланцюгів  $A\alpha 1-16$  та  $B\beta 1-14$ ), фібриноген перетворюється на фібринономер, здатний до спонтанної полімеризації з формуванням тривимірної сітки полімерного фібрину, що і є каркасом тромбу [4]. Полімеризація фібрину забезпечується електростатичними взаємодіями, водневими зв'язками

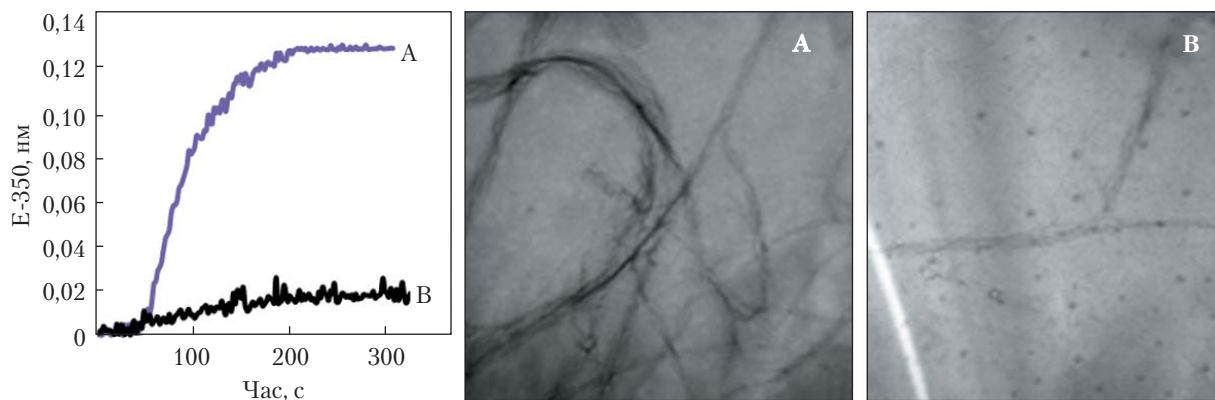


**Рис. 1.** Структура молекули фібриногену (модифіковано за Springer et al. [6]):  $\beta$ C –  $\beta$ C-домен, C-кінцеві ділянки  $B\beta$ -ланцюгів молекули;  $\gamma$ C –  $\gamma$ C-домен, C-кінцеві ділянки  $\gamma$ -ланцюгів молекули;  $\alpha$ C – C-кінцеві ділянки  $A\alpha$ -ланцюгів молекули, складові  $\alpha$ C-регіону; fpA, fpB – фібринопептиди A і B; grg – центр полімеризації «A», що експонується після відщеплення фібринопептидів «A». A – зв'язування калікс[4]арену C-145 з центром полімеризації «A»; B – взаємодія антитіла I-5A зі своїм епітопом у  $\alpha$ C-регіоні; C – суперспіральна ділянка молекули фібриногену

і гідрофобними контактами амінокислотних залишків, що входять у центри полімеризації молекул фібрину. До центрів полімеризації історично відносять центри «A» і «B» у E-регіоні молекули та комплементарні до них центри полімеризації «a» і «b» у D-регіонах. У 2007 р. під керівництвом члена-кореспондента НАН України Е.В. Луговського було відкрито додаткову пару центрів полімеризації «C» і «c» [5].

Для дослідження структури та функцій фібриногену ми застосовуємо широкий арсенал молекулярних інструментів, серед яких: моноклональні антитіла, пептиди, що імітують окремі послідовності молекули фібриногену, низькомолекулярні сполуки та високоспецифічні протеїнази.

**Моноклональні антитіла.** Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України є піонером у застосуванні антитіл для вивчення структури та молекулярних перетворень фібриногену. Близько 30 років тому такі роботи було розпочато у відділі молекулярної імунології під керівництвом академіка НАН



**Рис. 2.** Турбидиметричний аналіз полімеризації фібрину за присутності моноклонального антитіла I-5A та електронно-мікроскопічні фотографії фібрил фібрину: А – контроль; В – за присутності моноклонального антитіла I-5A у співвідношенні антитіло : фібрин 1:2

України С.В. Комісаренка; продовжуються вони й нині у відділі структури та функції білка [7]. За цей час було отримано понад сотню гібридом-продуцентів моноклональних антитіл, з-поміж яких було обрано ті, що мали унікальні властивості та специфічність. Зокрема, на основі отриманих моноклональних антитіл 2d-2a (епітоп у ділянці В $\beta$ 12-17), П-4D ( $\gamma$ 89-240) та I-3С (В $\beta$ 126-134) було розроблено унікальні методи кількісного визначення у плазмі крові маркерів загрози внутрішньосудинного тромбоутворення: фібриногену, D-димеру та розчинного фібрину відповідно. Ці методи потребують якомога скорішого впровадження у широку клінічну практику [8].

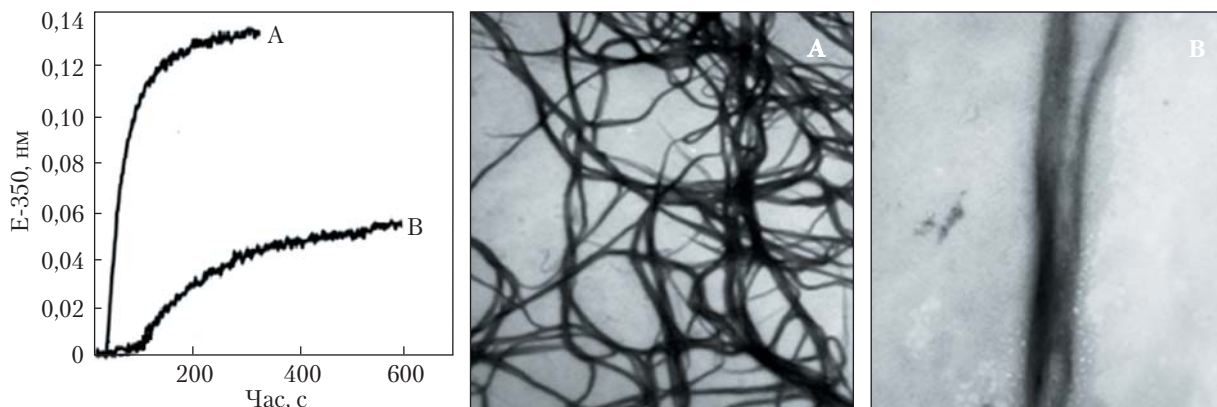
Інші отримані нами антитіла заслуговують на увагу, оскільки мають здатність інгібувати полімеризацію фібрину. Так, антитіло I-5A, що має епітоп у периферичних  $\alpha$ С-регіонах (A $\alpha$ 509-610), виявилось специфічним інгібітором полімеризації фібрину. За співвідношення антитіло : фібрин 1:2 це антитіло повністю пригнічувало формування полімерного фібрину в системі фібриноген–тромбін (рис. 2). Аналіз мікрофотографій фібринових ниток, отриманих за присутності антитіла I-5A, засвідчив ефективне інгібування саме латеральної асоціації, але не формування, протофібрил. Цей факт є першим експериментальним доказом того, що в С-кінцевій ділянці  $\alpha$ С-регіону

знаходиться сайт латеральної асоціації протофібрил [9]. Водночас антиполімеризаційна дія антитіла I-5A дозволяє розглядати його як потенційну основу для створення антитромботичного засобу.

Використання антитіл як терапевтичних агентів гальмується насамперед їхнім розміром (150 kDa), оскільки такі великі молекули можуть бути імуногенними. У зв'язку з цим привертає увагу створення рекомбінантних одноланцюгових антитіл (scFv), які імітують активний центр моноклонального антитіла. Створення scFv-антитіл на основі отриманих моноклональних антитіл з інгібіторними властивостями є перспективним напрямом, який дозволить розробити ефективні антитромботичні агенти імуноглобулінової природи.

**Пептиди-міметики.** Іншим важливим інструментом вивчення ролі окремих сайтів молекули фібриногену в полімеризації фібрину є пептиди, що імітують ті чи інші функціонально важливі фрагменти молекули. В останні роки дослідження було зосереджено на суперспіральних (або шарнірних) ділянках молекули фібриногену, які тривалий час вважалися функціонально інертними.

Було синтезовано три пептиди A $\alpha$ -91-103, В $\beta$ -125-135 та  $\gamma$ -69-77, які імітують амінокислотну послідовність фрагментів шарнірної ділянки суперспірального регіону молекули фі-



**Рис. 3.** Турбідиметричний аналіз полімеризації фібрину за присутності різних концентрацій пептиду А 91-103 (1 мМ). Електронна мікроскопія фібрил фібрину за відсутності (А) і за присутності 1 мМ пептиду А 91-103 (В)

брину. Кожне з них інгібує лише другу стадію полімеризації фібрину — латеральну асоціацію протофібрил [10]. Виявлено, що суміші пептидів ( $A\alpha$ -,  $B\beta$ - та  $\gamma$ -) та ( $B\beta$ - +  $\gamma$ -) і ( $A\alpha$ - +  $\gamma$ -) проявляють синергічну інгібувальну дію щодо першої стадії полімеризації — формування протофібрил. Отже, вперше отримано експериментальний доказ участі шарнірної ділянки молекули фібрину в первинній стадії полімеризації.

Максимальний інгібіторний ефект пептиду  $A\alpha$ 91-103 (рис. 3) дозволяє розглядати його окремо або у суміші з іншими пептидами як основу для створення антитромботичного засобу.

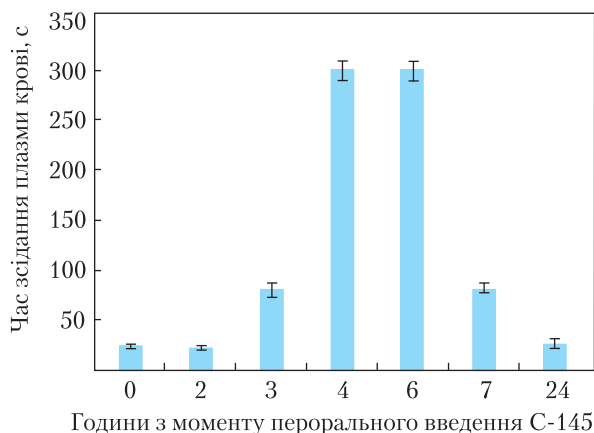
**Калікс[4]арени.** Попри всю складність механізму полімеризації фібрину, ефективного інгібування його полімеризації можна досягти не лише шляхом застосування великих молекул, таких як імуноглобуліни чи поліпептиди, а й використовуючи низькомолекулярні сполуки. В Інституті органічної хімії НАН України під керівництвом академіка НАН України В.І. Кальченка було синтезовано низку сполук калікс[4]аренового ряду. Скринінг отриманої бібліотеки калікс[4]аренів дав змогу обрати унікальну сполуку, здатну специфічно інгібувати полімеризацію фібрину — калікс[4]арен С-145.

Ми показали, що калікс[4]арен С-145 інгібує формування протофібрил фібрину ( $IC_{50} =$

$= 2,5 \cdot 10^{-6}$ ). Завдяки безпосередній взаємодії гідрофобної часті молекули з центром полімеризації фібрину «А» С-145 запобігає утворенню полімерного фібрину — каркасу тромбу [11]. Експериментальні дані засвідчили, що калікс[4]арен С-145 забезпечує стійку антитромботичну дію за умов перорального введення лабораторним тваринам у дозі 12 мг/кг. Виявлено, що через 3 години після перорального введення С-145 мишам час зсідання плазми крові в тесті АЧТЧ (активованій частковий тромбопластиновий час) збільшується втричі порівняно з контрольним. Від 7-ї години починається поступова нормалізація часу зсідання плазми крові, показники тесту АЧТЧ досягають контрольних значень на 24-ту годину після перорального введення С-145 (рис. 4).

Отже, фундаментальні дослідження, спрямовані на вивчення тонких молекулярних механізмів полімеризації фібрину, дозволили охарактеризувати молекулу, яка має всі шанси стати молекулярною платформою для створення антитромботичного препарату нового типу — прямого інгібітора фібриноутворення.

**«Карбогемостат».** Досі ми говорили про дослідження, спрямовані на досягнення антиполімеризаційного ефекту. Водночас існують умови, за яких ефективно зсідання крові є не просто бажаним, а життєво необхідним. Йдеться про поранення і травми, пов'язані з крово-



**Рис. 4.** Час зсідання плазми крові мишей у тесті АЧТЧ (активованій частковий тромбопластиновий час) до та після перорального введення калікс[4]арену С-145

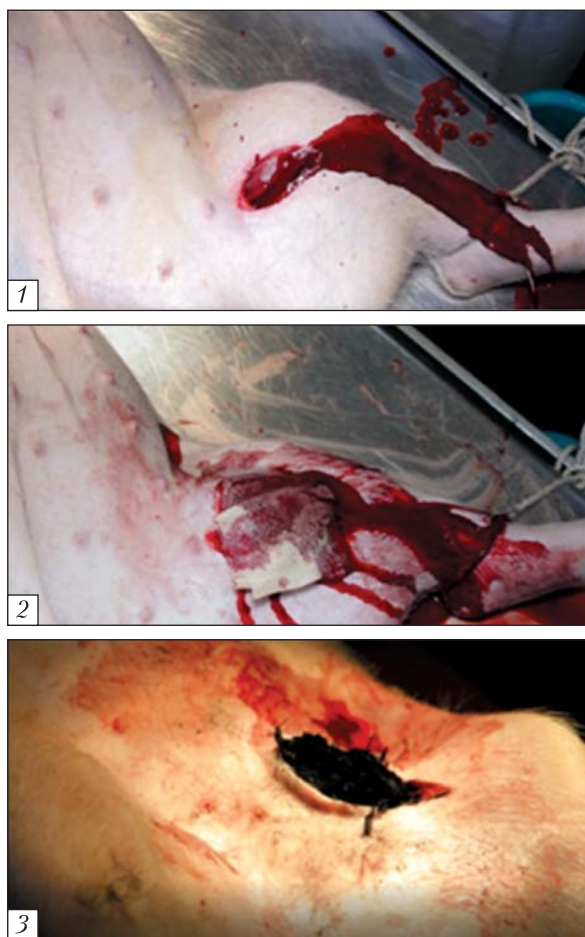
течами, адже саме кровотеча є головною причиною смертності при різного роду травмах, у військово-польовій та цивільній хірургії. Однією з найновіших розробок відділу структури та функції білка є композит адсорбційний гемостатичний аплікаційний «Карбогемостат» [12].

Основою «Карбогемостату» є активатор зсідання крові, отриманий в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, поєднаний з вітчизняним волокнистим вуглецевим матеріалом медичного призначення «АУВМ», що є розробкою Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Є. Кавецького. На відміну від відомих гемостатиків, які ініціюють зсідання крові неспецифічно, запропонований агент приводить безпосередньо до формування ендогенного тромбіну, який у свою чергу ініціює формування фібрину — каркасу тромбу.

У моделі дослідження гемостатика, розробленій та апробованій фахівцями Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, було показано, що за стандартного пошкодження стегнової артерії свині комбінований перев'язувальний засіб забезпечує ефективне зупинення кровотечі нарівні з відомими світовими аналогами. Рівень крововтрати при застосуванні комбінованого гемостатика мен-

ший, ніж у випадку комерційно доступного гемостатика Celox (Велика Британія) (рис. 5). Очікується, що створений гемостатичний засіб буде ефективним як у польових умовах, так і в клініці за умов антикоагулянтної терапії або патологічних станів, зокрема при гемофілії. Наразі ключовим завданням досліджень є виконання всіх необхідних умов та проведення власне клінічних випробувань.

**Висновки.** Наведені у статті результати досліджень дозволили отримати вагому наукову інформацію щодо тонких механізмів поліме-



**Рис. 5.** Випробування «Карбогемостату» на моделі масивної кровотечі зі стегнової артерії свині: 1 — індукція кровотечі зі стегнової артерії свині (модель); 2 — зупинення кровотечі комерційно доступним гемостатиком Celox, UK (контроль); 3 — зупинення кровотечі за допомогою «Карбогемостату»

ризації фібрину, яка стала також основою для розроблення нових підходів до запобігання внутрішньосудинному тромбоутворенню, а також до стимуляції екстраваданного тромбоутворення.

Зокрема, охарактеризовано моноклональне антитіло, що має виражену інгібіторну дію на полімеризацію фібрину і може стати основою для створення одноланцюгового антитіла як прототипу антитромботичного засобу. Знайдено послідовності фібриногену, що можуть бути мішенями для антиполімеризаційної дії пептидів-міметиків. Відкрито антиполімеризаційну дію калікс[4]арену C-145, який виявився ефективним інгібітором тромбоутворення *in vitro* та *in vivo*. Уперше створено специфічний гемостатичний агент, придатний для негайного зупинення масивної артеріальної кровотечі. Завершено його доклінічні дослідження.

*Автор висловлює щире подяку науковому керівнику академіку НАН України С.В. Комісаренку, керівнику відділу структури та функції білка Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України (2009–2019 рр.) члену-кореспонденту НАН України Е.В. Луговському, співробітникам відділу, які брали участь в експериментальній частині роботи: професору Т.М. Платоновій, І.М. Колесніковій, Л.П. Урвант, Д.С. Корольовій, Т.М. Чернищенко, Т.А. Позняк, а також керівникам наукових груп інших установ НАН України – співавторам розробок: академіку НАН України В.І. Кальченку (Інститут органічної хімії НАН України), члену-кореспонденту НАН України В.Г. Николаєву (Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України), професору В.Є. Досенку (Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України).*

## REFERENCES

## [СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ]

- Belitser V.A., Varetska T.V., Manjakov V.Ph. On the Model of the Fibrinogen Molecule. Conclusive Stages of Fibrin Polymerization. *Thromb. Research*. 1973. **2**: 567. [https://doi.org/10.1016/0049-3848\(73\)90008-X](https://doi.org/10.1016/0049-3848(73)90008-X)
- Doolittle R.F. Structural basis of the fibrinogen-fibrin transformation: contributions from X-ray crystallography. *Blood Rev.* 2003. **1**: 33. [https://doi.org/10.1016/S0268-960X\(02\)00060-7](https://doi.org/10.1016/S0268-960X(02)00060-7)
- Medved L., Weisel J.W. Recommendations for nomenclature on fibrinogen and fibrin. *J. Thromb. Haemost.* 2009. **7**(2): 355. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2008.03242.x>
- Lugovskoi E.V., Makogonenko E.M., Komisarenko S.V. *Molecular mechanisms of formation and degradation of fibrin*. (Kyiv: Naukova Dumka, 2013).  
[Луговской Э.В., Макогоненко Е.М., Комисаренко С.В. *Молекулярные механизмы образования и разрушения фибрина. Физико-химический и иммунохимический анализ*. К.: Наукова думка, 2013.]
- Lugovskoy E.V., Gritsenko P.G., Kapustianenko L.G. et al. Functional role of B $\beta$ -chain N-terminal fragment in the fibrin polymerization process. *FEBS J.* 2007. **274**: 4540. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05983.x>
- Springer T.A., Zhu J., Xiao T. Structural basis for distinctive recognition of fibrinogen gammaC peptide by the platelet integrin alphaIIb beta3. *J. Cell Biol.* 2008. **182**(4): 791. <https://doi.org/10.1083/jcb.200801146>
- Lugovskoi E.V., Makogonenko E.M., Chudnovets S.G. et al. The study of fibrin polymerization with monoclonal antibodies. *Biomed. Sci.* 1991. **2**(3): 249.
- Lugovskoi E.V., Kolesnikova I.N., Platonova T.N. et al. Simultaneous quantification of soluble fibrin and D-dimer in blood plasma for the assessment of the threat of thrombosis. *Klin. Med. (Mosk.)*. 2013. **91**(11): 38.  
[Луговской Э.В., Колесникова И.Н., Платонова Т.Н. Одновременное количественное определение растворимого фибрина и D-димера в плазме крови для оценки угрозы тромбообразования. *Клиническая медицина*. 2013. Т. 91, № 11. С. 38–44.]
- Urvant L., Makogonenko Y., Pozniak T. et al. On the role of ac-regions of fibrin in the self-assembly and lateral association of protofibrils. *FEBS J.* 2013. **280**(s1): 489. <https://doi.org/10.1111/febs.12340>
- Pozniak T.A., Urvant L.P., Gritsenko P.G. et al. Inhibition of fibrin polymerization by synthetic peptides corresponding to A $\alpha$ 195-205 and  $\gamma$ 69-77 sites of fibrin molecule. *Ukr. Biochem. J.* 2014. **86**(4): 119. <http://doi.org/10.15407/ubj86.04.119>

11. Lugovskoy E.V., Gritsenko P.G., Koshel T.A. et al. Calix[4]arene methylenebisphosphonic acids as inhibitors of fibrin polymerization. *FEBS J.* 2011. **278**(8): 1244. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08045.x>
12. Komisarenko S.V., Lugovskoi E.V., Nikolaev V.G. et al. Combined haemostatic agent for the prevention of blood loss in particular at hemophilia. Inventory patent. 2017. 19. 114356.  
[Комісаренко С.В., Луговської Е.В., Ніколаєв В.Г. та ін. Гемостатичний комбінований засіб для зупинки масивних кровотеч, у тому числі за гемофілії. Патент на корисну модель. № 114356. Опубл. 10.03.2017.]

*V.O. Chernyshenko*

Palladin Institute of Biochemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine (Kyiv)

#### MECHANISMS OF INTRAVASCULAR AND EXTRAVASCULAR BLOOD CLOTTING: FUNDAMENTAL STUDIES FOR CLINICAL PRACTICE

According to the materials of scientific report at the meeting of the Presidium of NAS of Ukraine, February 27, 2019

Haemostasis is the unique system of human organism that support blood flow in vessels and the termination of blood loss after injury. The dynamic balance of haemostasis is provided by the interplay of several enzymatic systems that all are targeted directly or indirectly on fibrinogen. Fibrinogen is soluble protein of blood that when activated by thrombin converts to fibrin that is able to form polymeric fibrin which is the core of thrombus. To study the structure and functions of fibrin several molecular instruments are used, among them are monoclonal antibodies, synthetic peptides, low-molecular weight compounds and specific proteases.

Monoclonal antibody I-5A specific to fibrinogen fragment A $\alpha$ 509-610 is shown to be an effective inhibitor of lateral association of protofibrils during fibrin polymerization. Thus we assume the presence of some previously unknown site of lateral association of protofibrils within the  $\alpha$ C-region of molecule. Also inhibitory antibody I-5A or its recombinant single chain analogue (scFv) can be assumed as the prospective agent for the inhibition of thrombus formation in vivo.

We also found the residues of fibrinogen molecule that participate in both stages of fibrin polymerization process: A $\alpha$ -91-103, B $\beta$ -125-135 and  $\gamma$ -69-77. The synthetic peptides that mimic these residues together or separately can be used for prevention of thrombus formation.

Finally, unique calix[4]arene C-145 with strong antithrombotic activity is found. We demonstrate that C-145 directly blocked A:a knob-hole interactions during fibrin polymerization thus preventing the formation of three-dimensional fibrin network that is the core of thrombus. Such unique properties allow assuming the possible use of C-145 in antithrombotic therapy. In vivo studies demonstrated that C-145 being introduced to laboratory mice per orally acts as effective anticoagulant agent.

Apart of the prevention of intravascular coagulation we also focus on the initiation of extravascular clotting that is one of the crucial points for the prevention of blood loss after traumas or in surgery. Direct comparison in the model of massive blood loss demonstrated that developed haemostatic agent was more effective for blood loss prevention than commercially available Celox (UK).

**Keywords:** blood circulation, thrombosis, bleeding, antibodies, peptides, calix[4]arenes, haemostatics.