КОМІСАРЕНКО
Сергій Васильович —
академік НАН України,
академік-секретар Відділення
біохімії, фізіології і молекулярної
біології НАН України,
директор Інституту біохімії
ім. О.В. Палладіна НАН України

ДОСЛІДЖЕННЯ МОЛЕКУЛЯРНИХ МЕХАНІЗМІВ ТРОМБОУТВОРЕННЯ ТА СТВОРЕННЯ КРОВОСПИННИХ ЗАСОБІВ

Стенограма наукової доповіді на засіданні Президії НАН України 25 січня 2017 року

У доповіді розглянуто важливі питання, пов'язані з вивченням системи зсідання крові людини та молекулярних механізмів тромбоутворення. На основі результатів власних фундаментальних досліджень зусиллями співробітників трьох інститутів НАН України — Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна, Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького та Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця створено новий комбінований специфічний кровоспинний засіб, який за своєю ефективністю принаймні не поступається широко відомим зарубіжним аналогам.

Шановні члени Президії! Шановні колеги!
Дозвольте мені ознайомити вас з основними результатами досліджень, які впродовж багатьох років проводяться в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України і пов'язані з вивченням механізмів зсідання крові й тромбоутворення. Роботи з цього напряму були започатковані понад 60 років тому видатним українським біохіміком академіком Володимиром Олександровичем Бєліцером. Відтоді вже протягом багатьох років Інститут біохімії є беззаперечним лідером у галузі вивчення системи зсідання крові й утворення тромбу.

Кожен із вас добре розуміє, наскільки важливим є вивчення системи зсідання крові, адже процес тромбоутворення може бути як нашим другом, так і ворогом. Тромбоз — це захисна реакція організму, його відповідь на ушкодження судин, яка дозволяє мінімізувати наслідки кровотечі та сприяє загоєнню ран. Однак при патологічній активації системи зсідання крові чи в місцях звуження судин при спазмах, а також на атеросклеротичних бляшках може утворитися тромб, що спричинює порушення кровопостачання життєво важливих органів і часто призводить до інфарктів чи інсультів.

Основою тромбу (згустка крові) є тривимірна сітка фібрил, що складаються з молекул полімерного фібрину, з включеними в неї клітинами крові (рис. 1).

Полімерний фібрин — це високомолекулярний білок, який утворюється з фібриногену, що є центральним білком системи зсідання крові й розчинним попередником полімерного фібрину. Молекула фібриногену має масу близько 345 кДа і є димером, кожна субодиниця якого складається з трьох поліпептидних ланцюгів Aα, Bβ та γ. Субодиниці з'єднані між собою своїми амінокінцевими частинами за допомогою дисульфідних зв'язків. Перетворення молекул фібриногену спочатку на розчинний фібрин, а потім на полімерний фібрин відбувається у кілька стадій. На першій стадії полімеризації тромбін, який утворюється на останній стадії каскадної системи зсідання крові, відщеплює від водорозчинного фібриногену спочатку два амінокінцевих фібринопептиди А, перетворюючи фібриноген на мономерний фібрин desA, в якому експонуються центри полімеризації «А». Фібрин desA розпочинає процес спонтанної полімеризації за рахунок міжмолекулярної взаємодії комплементарних сайтів «А» і «а» з утворенням спочатку дво- і тривимірних комплексів фібрину з фібриногеном, а потім і двонитчатих протофібрил. Усі ці молекулярні утворення входять до складу розчинного фібрину. Протофібрили здатні до поєднання «кінець у кінець» і «бік у бік», що приводить до їх латеральної асоціації і розгалуження з утворенням тривимірної сітки, яка є каркасом тромбу. В процесі латеральної асоціації протофібрил від фібрину desA відщеплюються два інших амінокінцевих фібринопептиди В, перетворюючи фібрин desA на фібрин desAB з експозицією центрів полімеризації «В». Центри «В» молекул, які належать одній протофібрилі, взаємодіють з комплементарними центрами «b» молекул, які належать іншій протофібрилі, що сприяє їх латеральній асоціації. Далі відбувається «поперечна прошивка» фібрил за рахунок XIIIa фактора, яка зміцнює фібриновий каркас тромбу.

З літератури були відомі дві пари центрів полімеризації фібрину — це сайти «А»—«а» і

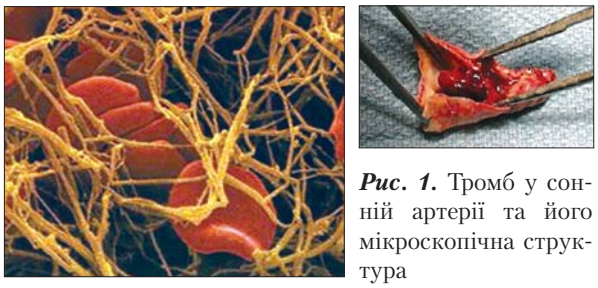

Рис. 1. Тромб у сонній артерії та його мікроскопічна структура

«В»—«b», але і за результатами наших досліджень, і за непрямими експериментальними даними інших дослідників ми припустили, що повинні існувати й інші центри. Для перевірки нашої гіпотези ми синтезували кілька сотень різних моноклональних антитіл. В першу чергу ми шукали моноклональні антитіла (або їхні Fab-фрагменти), які інгібували різні стадії полімеризації фібрину. До речі, цикл наукових праць «Моноклональні та рекомбінантні антитіла для експериментальної біології, медицини і ветеринарії» співробітників Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України та Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України (Е.В. Луговської, Д.В. Колибо, І.М. Колеснікова, О.С. Олійник, О.П. Костюченко, Д.Ф. Глузман, С.П. Сидоренко, Л.М. Скляренко, Л.М. Шлапацька) 2015 року було відзначено Державною премією України в галузі науки і техніки.

У результаті нам вдалося знайти невідому раніше пару комплементарних сайтів полімеризації фібрину, яку ми назвали «С»—«с» і яка на першій стадії полімеризації фібрину бере участь у формуванні протофібрил одночасно з уже відомою парою сайтів «А»—«а» ще до відщеплення фібринопептиду В (рис. 2).

Крім того, ми зосередили свої зусилля на пошуку сайтів, що відповідають за латеральну асоціацію протофібрил при полімеризації фібрину. Цей механізм і досі є майже невідомим, порівняно зі стадією формування протофібрил. Ми отримали моноклональні антитіла монАТ FnI-3c (та їх Fab-фрагмент), які специфічно інгібують латеральну асоціацію протофібрил. Епітоп для монАТ FnI-3c було

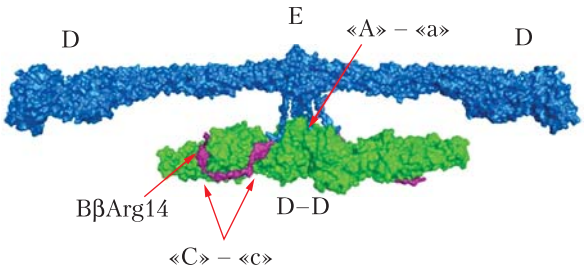

Рис. 2. Знайдено раніше невідомі центри полімеризації фібрину «C»—«c». Сайт «C» знаходиться у фрагменті Bβ18—53 E-домену, а комплементарний сайт «c» — у N-кінцевій частині γ-ланцюга D-домену фібрину

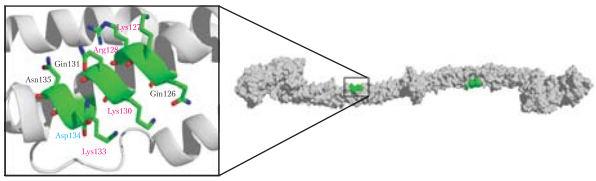

Рис. 3. Схема локалізації епітопу mAb FnI-3c у Bβ125—135 фрагменті молекули фібрину

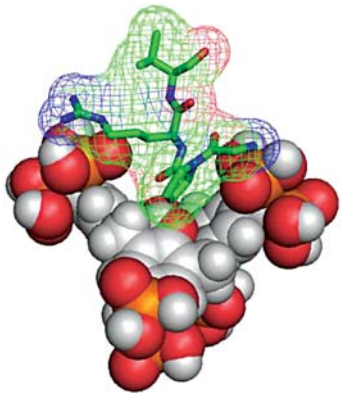

Рис. 4. Модель взаємодії каліксарену C-192 з сайтом полімеризації «A»

локалізовано у фрагменті Bβ125—135, який разом з комплементарними ділянками α- і γ-ланцюгів знаходиться у так званій шарнірній (hinge) зоні суперспірального конектора молекули фібрину. Ця зона цікава тим, що в ній молекула має підвищену рухливість і гнучкість, що є суттєвим при формуванні протофібрил з мономерних молекул. Інгібування латеральної асоціації протофібрил монАТ FnI-3c і його Fab-фрагментом відбувається за рахунок блокування його епітопу в Bβ125—135, який, вочевидь, збігається із сайтом латеральної асоціації протофібрил. Це підтвердилося тим, що синтетичний пептид також інгібував латеральну асоціацію протофібрил (рис. 3).

Було синтезовано ще два пептиди, які імітують амінокислотні послідовності Aα91—103 і γ69—77, що разом із Bβ125—135 належать шарнірній ділянці суперспірального конектора фібрину. Встановлено, що ці пептиди специфічно інгібують процес латеральної асоціації протофібрил фібрину. Найефективнішим інгібітором є пептид γ69—77, який у подальшому може бути використаний для створення на його основі ефективних ліків проти утворення тромбів.

Крім пептидів, які можуть бути використані як лікарські препарати, можна використовувати і фрагменти антитіл, які зберігають свою специфічність і взаємодіють з сайтами полімеризації фібрину, гальмуючи цей процес. Насамперед це або Fab-фрагменти моноклональних антитіл, або рекомбінантні одноланцюгові антитіла, які також синтезовано в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна.

Разом з тим ми продовжували пошуки й інших речовин, які можуть інгібувати латеральну асоціацію протофібрил. Серед класу каліксаренів ми зупинилися на каліксарені C-192, який блокує сайт «A» (Aα17—20) та інгібує полімеризацію фібрину (рис. 4). Це також шлях до створення нових прогресивних ліків, що запобігають утворенню тромбів.

На основі отриманих моноклональних антитіл ми розробили три імунодіагностичні тест-системи для кількісного визначення в плазмі крові людини розчинного фібрину, фібриногену і D-димеру (великий кінцевий фрагмент, що утворюється при плазміновому гідролізі полімерного фібрину, стабілізованого фактором XIIIa). Концентрації вказаних молекул у плазмі крові людини є основними маркерами активації системи зсідання крові та фібринолізу, а їх комбінація в часі є вкрай важливим показником для клінічного діагностування загро-

зи тромбоутворення. Саме тому ми створили діагностикум для трикомпонентного аналізу, який дозволяє проводити одночасне кількісне визначення фібриногену, розчинного фібрину та D-димеру. Відповідні тест-системи було виготовлено на підприємстві «ДіаПрофМед» і випробувано в Інституті кардіології ім. академіка М.Д. Стражеска, Національному інституті хірургії та трансплантології ім. О.О. Шалімова, Національному інституті серцево-судинної хірургії ім. М.М. Амосова, Інституті ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка та в деяких інших клінічних закладах. Було отримано позитивні відгуки, і вчені-медики цих установ готові використовувати наші діагностикуми в медичній практиці. Але... Хто ж візьметься за масове виробництво наших діагностичних наборів? Фахівці МОЗ України поки що не виявили інтересу, хоча розробки готові до впровадження в клінічну практику з метою моніторингу стану системи зсідання крові у пацієнтів.

Загалом у підсумку проведених в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна багаторічних досліджень з вивчення процесів зсідання крові було досягнуто таких результатів:

• визначено структурну організацію молекули фібриногену/фібрину;

• знайдено і локалізовано нові центри полімеризації фібрину;

• отримано моноклональні антитіла (та Fab-фрагменти), епітопи до яких розташовані в різних ділянках молекули фібрин(оген)у і які є специфічними блокаторами різних етапів полімеризації фібрину;

• запропоновано інгібітори (моноклональні та рекомбінантні антитіла, пептиди, каліксарени) для різних стадій тромбоутворення;

• знайдено, очищено та охарактеризовано низку ензимів бактеріального і тваринного походження, що дозволяють отримати унікальні фрагменти молекули фібрину, які зберігають активні сайти полімеризації фібрину;

• досліджено молекулярні механізми регуляції фібринолізу (руйнування фібринового каркасу тромбу плазміноген/плазміновою системою);

• отримано два моноклональних антитіла проти протеїну С, зниження концентрації якого в плазмі крові свідчить про загрозу тромбоутворення. На їх основі розробляється імунодіагностична тест-система;

• отримано гемостатичний ензим тваринного походження, який може стати основою розроблення гемостатичних засобів при гемофілії та використанні антитромботичних препаратів;

• створено методи діагностування загрози тромбоутворення, моніторингу стану системи зсідання крові та фібринолізу у людини;

• розроблено вірус- та пріонбезпечну технологію отримання очищених протеїнів крові (фактори VIII і IX).

Ці дослідження і надалі розвивалися б систематично і планомірно, якби не війна на Сході України. У 1945 р. знаменитий британський бактеріолог і імунолог сер Олександр Флемінг у своїй промові під час вручення йому медалі нобелівського лауреата за відкриття пеніциліну зауважив, що він не знає напевно, як склалася б доля його відкриття, якби Друга світова війна не загострила проблему масового лікування інфекційних хвороб. Так вийшло і у нас — бойові дії в зоні проведення АТО значно прискорили втілення досягнутих нами теоретичних результатів у практичну сферу. Йдеться про створення нового комбінованого перев'язувального засобу для припинення кровотечі та пришвидшення загоювання ран. З цією метою в рамках виконання відповідного проекту (керівник — академік НАН України С.В. Комісаренко) цільової науково-технічної програми НАН України «Дослідження і розробки з проблем підвищення обороноздатності і безпеки держави» ми поєднали зусилля трьох інститутів НАН України, оскільки в цих установах були наукові групи, які вивчали споріднені проблеми.

Так, в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна проводили дослідження молекулярних механізмів системи зсідання крові, а також дослідження з пошуку, виділення, очищення та вивчення властивостей кровоспинних біологічних речовин (керівник — член-кореспондент

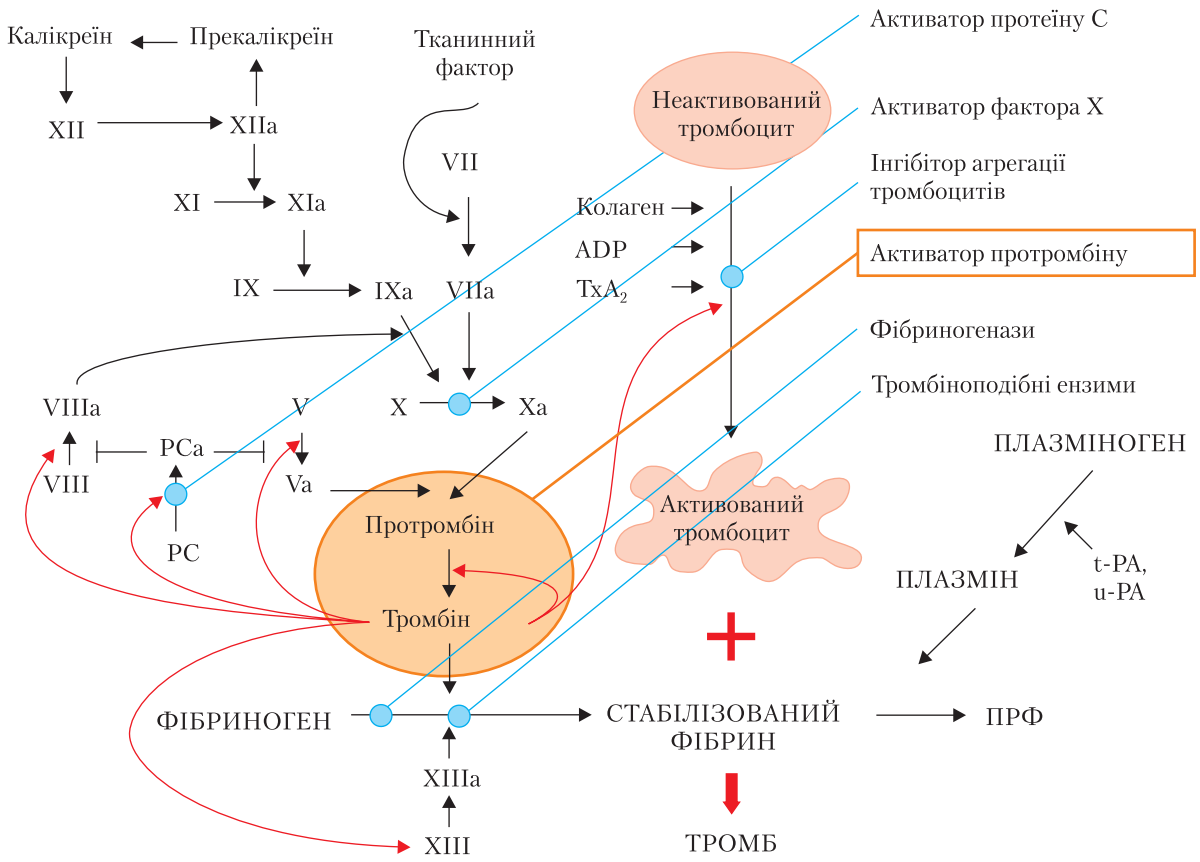

Рис. 5. Спрощена схема системи зсідання крові

НАН України Е.В. Луговської); в Інституті експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького працювали над створенням і вивченням властивостей активованих вуглецевих волокнистих матеріалів (керівник — член-кореспондент НАН України В.Г. Ніколаєв); в Інституті фізіології ім. О.О. Богомольця розроблялися сучасні й ефективні експериментальні моделі для оцінювання дії кровоспинних матеріалів (керівник — доктор біологічних наук В.Є. Досенко).

Насамперед ми ретельно вивчили основні вимоги, що висуваються до гемостатиків місцевої дії, і дійшли висновку, що гемостатичні засоби повинні:

• припиняти кровотечу за мінімально короткий час;

• запобігати поновленню кровотечі;

• не впливати на гемостаз у загальному кровообігу (не викликати внутрішньосудинного тромбоутворення в організмі);

• не мати токсичної, подразливої, іншої побічної дії;

• характеризуватися високою адгезивністю та щільно прилягати до рани;

• бути зручними у застосуванні;

• мати тривалий термін збереження активності;

• бути «технологічними», доступними за ціною, їх виробництво має бути заснованим на вітчизняних технологіях.

Ми ознайомилися з найвідомішими і найефективнішими на сьогодні гемостатиками контактної дії, які використовуються в усьому світі. Найбільш поширеними в Україні є препарати Celox (Велика Британія) та ChitoGauze

(США). Обидва ці гемостатики основані на похідних хітозану. На ринку пропонуються кровоспинні засоби, створені на основі цеоліту та каоліну, — QuikClot (США), фібриновмісні гемостатичні засоби — Fibrin Sealing Dressing, а також препарати на основі колагену і желатину — адсорбуюча губка Cutanplast. Однак усі ці кровоспинні засоби діють неспецифічно на відміну від гемостатичного ензиму, який ми використали при розробленні нашої пов'язки.

На рис. 5 наведено спрощену схему каскадної системи зсідання крові, яка є однією з найскладніших систем в організмі людини. В Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна ми виділили, очистили та вивчили біологічні властивості ензиму, що активує протромбін і запускає процес полімеризації фібрину. Переконалися в тому, що виділений електрофоретично чистий ензимний активатор протромбіну не впливає на фібриноген і тромбоцитарну ланку гемостазу, не спричиняє гемолізу еритроцитів, тобто не є шкідливим для організму. В експериментах *in vitro* було показано, що цей активатор діє значно активніше, ніж відомі неспецифічні активатори системи зсідання крові, наприклад каолін. Крім того, цей активатор діє й у присутності антикоагулянтів (гепаринів) та за наявності аномального фактора VIII. Останнє дуже важливе з огляду на те, що пацієнти, які страждають на гемофілію, навіть у разі незначних хірургічних втручань (наприклад, видалення зуба) мають вживати спеціальні, досить високовартісні препарати. Водночас створений нами кровоспинний ензим активує систему зсідання крові на рівні протромбіну, який знаходиться в каскадній системі зсідання крові після фактора VIII і не залежить від нативності останнього.

Далі цей ензим ми нанесли на вуглецеві пов'язки, розроблені в Інституті експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького. Активований вуглецевий волокнистий матеріал пов'язки сам по собі має антисептичну і гомеостатичну дію завдяки високій сорбційній ємності та швидкій кінетиці адсорбції, що забезпечує поглинання з ранового вмісту токсичних продуктів протеолізу і термічної денатурації білків — медіаторів запалення, бактеріальних токсинів та мікробних клітин, а також добре захищає від вторинної інфекції.

У серії досліджень ми показали, що ензимний активатор зсідання крові, який був нековалентно іммобілізований на поверхні цього вуглецевого матеріалу, не втрачає прокоагулянтної активності, зберігає свою здатність щодо зсідання плазми крові, безпосередньо активуючи протромбін. Причому дифузії активатора зі згустка в плазму крові виявлено не було. Більше того, активатор у висушеному (сорбованому) вигляді впродовж кількох років зберігає свою активність, а також не втрачає її після радіаційної стерилізації пов'язки.

На базі Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького та Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця були проведені дослідження створеного комбінованого специфічного кровоспинного засобу на експериментальних тваринах, використовуючи різні моделі кровотечі. Передусім змоделювали паренхіматозну кровотечу, яка становить досить складну проблему у воєнно-польовій хірургії, оскільки виникає внаслідок ушкодження внутрішніх органів, і практично неможливо перев'язати відповідну судину, а кров при цьому не виділяється назовні. Модель паренхіматозної кровотечі вивчали на щурах. Після серединної лапаротомії, яку виконували під загальною анестезією, проводили крайову резекцію лівої латеральної долі печінки розміром 1,5×0,5 см. Інтенсивність кровотечі оцінювали за часом та масою втраченої крові. В результаті було переконливо показано, що наш комбінований засіб діє набагато краще, ніж відомі аналоги, а також краще, ніж вихідна вуглецева пов'язка без ензимного активатора. Потім була використана модель летальної кровотечі із сонної артерії щурів та масивної (летальної) кровотечі зі стегнової артерії свиней, порівнюючи у стандартизованих умовах дію новоствореного кровоспинного засобу і поширеного у використанні в Україні закордонного аналогу — Celox. Було показано, що наш комбінований засіб припиняє кровотечу не гір-

ше або навіть краще за аналогічні закордонні зразки.

За результатами проведених досліджень можна дійти висновку, що розроблений комбінований перев'язувальний засіб для припинення кровотечі відповідає всім вимогам, які висуваються до гемостатиків місцевої дії. У серії експериментів було показано, що:

1) модельні летальні кровотечі (зі стегнової та сонної артерій) припинялися за короткий час, і поновлення їх не спостерігалося; гемостатична дія була кращою за сучасні іноземні аналоги (Celox);

2) активатор не впливав на гемостаз у загальному кровообігу (не мав фібриногенолітичної активності і не спричинював лізису еритроцитів чи активації та агрегації тромбоцитів);

3) активований вуглецевий волокнистий матеріал пов'язки мав високу адгезивність та щільно прилягав до рани, забезпечував потужну протинабрякову, протизапальну та бактеріостатичну дію і не мав токсичної, подразливої та іншої побічної дії;

4) пов'язки з ензимним активатором, сорбованим на поверхні активованого вуглецевого волокнистого матеріалу, мають тривалий термін збереження активності; при радіаційній стерилізації активність активатора зберігається;

5) створений гемостатичний засіб може бути ефективним як у польових умовах, так і в клінічній практиці; важливо, що цей засіб залишається дієвим навіть при використанні антикоагулянтів і буде повністю унікальним у випадку гемофілії;

6) комбінований кровоспинний перев'язувальний засіб розроблено на основі результатів оригінальних вітчизняних наукових досліджень та з використанням вітчизняних технологій.

Отже, на основі ензимного активатора зсідання крові та сорбційної активованої вуглецевої пов'язки створено новий вітчизняний комбінований перев'язувальний матеріал, який, як було показано в експериментах на великих тваринах, ефективно зупиняє масивну (летальну) кровотечу на рівні широко вживаних закордонних аналогів або навіть ефективніше. Однак надалі для впровадження нового кровоспинного засобу в клінічну практику потрібно:

- прийняти низку відповідних конструктивних рішень;
- знайти інвестора;
- провести маркетингові дослідження, вивчити соціальне замовлення, розробити документацію (технологічні регламенти, технічні умови, контроль якості тощо);
- забезпечити виробництво ензимного активатора і вуглецевого сорбуючого матеріалу в достатній кількості та прийнятної якості;
- провести токсикологічні випробування;
- продовжити проведення доклінічних та клінічних випробувань;
- провести санітарно-епідеміологічні експертизи;
- забезпечити сертифікацію засобу відповідно до вимог стандартів;
- розробити дизайн засобу;
- налагодити виробництво нового кровоспинного засобу.

Дякую за увагу!

За матеріалами засідання
підготувала О.О. МЕЛЕЖИК