

УДК: 612.128; 612.115

## ВПЛИВ АКТИВАТОРА ПРОТЕЇНУ С НА ЗАГАЛЬНИЙ ГЕМОСТАТИЧНИЙ ПОТЕНЦІАЛ ПЛАЗМИ КРОВІ ЗА ЕНДОПРОТЕЗУВАННЯ ТАЗОСТЕГНОВОГО СУГЛОБА

А. М. РУБЛЕНКО<sup>2</sup>, Л. П. УРВАНТ<sup>1</sup>, Є. М. МАКОГОНЕНКО<sup>1</sup>,  
Т. М. ПЛАТОНОВА<sup>1</sup>, П. Ю. ЦАП<sup>1</sup>, Т. М. ЧЕРНИШЕНКО<sup>1</sup>, І. М. КОЛЕСНИКОВА<sup>1</sup>,  
В. О. ФІЩЕНКО<sup>2</sup>, Е. В. ЛУГОВСЬКОЇ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;  
e-mail: takogonenko@biochem.kiev.ua;

<sup>2</sup>Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова, Україна

У роботі представлено метод визначення загального гемостатичного потенціалу (ЗГП) (*overall haemostasis potential*) плазми крові, що дозволяє швидко і кількісно охарактеризувати баланс між системами зсідання крові і фібринолізу. Метод базується на аналізі кривої залежності величини поглинання світла згустком при 350 нм від часу, яка реєструє утворення і руйнування згустку в плазмі крові у присутності тромбoplastину і t-PA. Метод дозволяє визначити три параметри системи згортання (час, швидкість утворення і максимальну мутність згустку), і три параметри системи фібринолізу (час напів- і повного руйнування згустку, його максимальну швидкість), а також інтегральну характеристику – площу під кривою, що характеризує розмір і час існування згустку, – і виражає ЗГП плазми крові. Показано, що величина ЗГП плазми хворих більша за таку у донорів у 3,8 раза, що погоджується з підвищеним рівнем фібриногену (4,25 мг/мл), розчинного фібрину (50 мкг/мл), D-димеру (630 нг/мл) і незначним зниженням активності активованого протеїну С (APC) (93%) у хворих. Активатор PC (AcPC) зменшує величину ЗГП плазми крові донорів і хворих відповідно у 1,6 і 3,7 раза. Додавання AcPC у плазму донорів збільшує амідазну активність тромбіну і APC і не впливає на таку плазміну. Припускається, що дія AcPC на ЗГП опосередкована утворенням APC, який сприяє зменшенню рівня інгібіторів TAFI і PAI-1 у досліджуваній плазмі.

*Ключові слова:* гемостатичний потенціал, активатор протеїну С, протеїн С, ендопротезування тазостегнового суглоба.

Простий і швидкий метод аналізу загального гемостатичного потенціалу (ЗГП) (*overall haemostasis potential*) у плазмі крові є оновленим підходом для визначення тонкого балансу між системами зсідання крові і фібринолізу [1–6]. Метод базується на аналізі кривої залежності величини поглинання світла згустком при 350 нм від часу, яка реєструє утворення і руйнування згустку в плазмі крові у присутності тромбoplastину (тромбіну) і тканинного активатора плазміногену. Процеси, що призводять до утворення і руйнування фібринового згустку, можна схематично охарактеризувати наступним чином. Тканинний фактор (ТФ), наявний у тромбoplastині, утворює комплекс із присутнім у плазмі крові фактором (Ф) VIIa [7]. Комплекс ТФ-ФVIIa активує фактори: X, IX і VII [8]. ФХа безпосередньо активує перехід протромбіну в тромбін [9]. Останній утворюється в пікомолярних концентраціях і, в свою чергу, активує фактори V, VIII і XI, що супроводжується утворенням

теназного (ФIXa–ФVIIIa) і протромбіназного (ФХа–ФVa) комплексів на фосфоліпідній поверхні тромбoplastину, які «вибухово» прискорюють, відповідно, активацію ФХ у ФХа і протромбіну в тромбін та утворення тромбіну в наномолярних концентраціях [10]. Слід зазначити, що у разі використання тромбіну як ініціатора процесу зсідання плазми, описані вище процеси не реєструються кривою утворення–руйнування згустку. Утворений внаслідок активації зовнішнього шляху зсідання крові тромбін активує фібриноген у фібрин, останній спонтанно полімеризується з формуванням фібринового згустку і підвищенням поглинання середовища реакції. Полімерний фібрин спричинює сорбцію плазміногену (Пг) і тканинного активатора плазміногену (t-PA) на своїй поверхні, стимулює активацію плазміногену в плазмі, який і руйнує фібриновий згусток [11]. Тому площа під кривою поглинання варіює в залежності від концентрації про-, антикоа-

гулянтних чи фібринолітичних компонентів плазми крові: ТФ, фібриногену, факторів VIIa, X, II, V, VIII, IX, XI, XIII, антитромбіну III, плазміногену або PAI-1 та інших компонентів [4–6]. Вважається, що площа під кривою поглинання дає не тільки загальну інформацію про баланс зсідання і фібринолізу *in vitro*, але також відображає кінцевий баланс тромбоцитарної активності, систем зсідання, антизсідання і фібринолізу в плазмі крові *in vivo* [4–6]. Тромбін у капілярах зв'язується із тромбомодуліном і активує антизсідальну систему плазми крові, основним протеїном якої є протеїн С (РС). Активованій РС (АРС) відіграє провідну роль у регуляції рівня тромбіну в мікроциркуляції і, як вважається, значною мірою запобігає тромбозам [12, 13]. В умовах визначення ЗГП тромбін за відсутності тромбомодуліну не здатен ефективно активувати РС [14]. У зв'язку з цим метою роботи було дослідження впливу АРС на величину ЗГП у плазмі крові донорів і хворих із післяопераційними порушеннями в системі гемостазу. Як активований РС ми використали ендогенний РС, який в умовах експерименту повністю активували в АРС за допомогою активатора РС (АсРС) із отрути *Agkistrodon halys halys* [15].

### Матеріали і методи

У досліджах використовували тромбопластин фірми Sigma (США), рекомбінантний t-РА фірми Boehringer Ingelheim (Німеччина), хромогенні субстрати S-2238, S-2251 (Chromogenix, Швеція) і S-2366 (diaPharma, США) для тромбіну, плазміну і АРС відповідно; АсРС очищений із отрути *Agkistrodon halys halys* [15], Protac фірми American Diagnostica (США).

Гемостатичний потенціал плазми крові визначали спектрофотометричним методом шляхом реєстрації абсорбції світла при 350 нм фібриновим згустком, що утворювався в спектрофотометричній кюветі, в яку послідовно додавали до 0,05 М НЕРЕС буфера, рН 7,4, що містив 0,15 М NaCl і 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, 12 мкл плазми крові, t-РА до кінцевої концентрації 75 IU/мл. Процес зсідання плазми ініціювали додаванням тромбопластину. Кінцевий об'єм реакційної суміші становив 400 мкл. АсРС додавали в концентрації, що активувала весь присутній в плазмі крові РС. Одержану в експерименті криву і принцип її аналізу представлено на рис. 1.

Амідазну активність тромбіну, плазміну і АРС у плазмі крові у присутності тромбопластину, t-РА та АРС визначали в тих самих умовах, що і гемостатичний потенціал

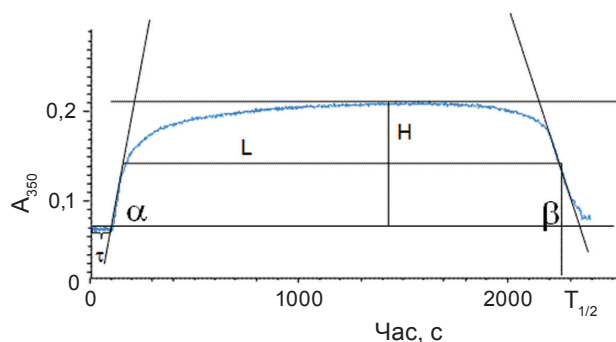


Рис. 1. Типова крива утворення і руйнування згустку плазми крові в координатах  $A_{350}$  — час, яку отримували для визначення ЗГП плазми крові, і принципи графічного аналізу параметрів зсідальної і фібринолітичної складових ЗГП плазми крові (див. текст)

плазми крові. Хромогенні субстрати взяті в кінцевій концентрації 0,3 мМ. Реакцію утворення ензимів у плазмі крові ініціювали додаванням тромбопластину (або тромбопластину і АсРС) і активність ензимів оцінювали за вивільненням через 10 хв р-нітроаніліну, який реєстрували при 405 нм. За контролі правили: реакційна суміш без тромбопластину та реакційна суміш без хромогенного субстрату. Величину поглинання при 405 нм в обох контролях додавали і їхню суму віднімали від значень поглинання в досліді.

Активність РС у плазмі крові визначали за допомогою тест-системи фірми Ренам (Росія). Концентрацію фібриногену — за методом Т. В. Варецької [16], концентрацію розчинного фібрину та D-димеру — за імуноензиматичними методами [17].

### Результати та обговорення

*Характеристика кривої для визначення ЗГП і його параметрів.* На рис. 2 представлено типові криві, що характеризують процес утворення і руйнування фібринового згустку в плазмі крові донорів і хворих із порушеннями в системі гемостазу у присутності та за відсутності АсРС. Ці криві було використано для визначення ЗГП. Вони характеризуються трьома ділянками (рис. 1). Перша ділянка складається з лаг-періоду ( $\tau$ ), що відповідає часу утворення протофібрил фібрину [18] і пов'язана із протромбіновим часом, і із швидкості зростання поглинання  $tga$ , що відповідає швидкості латеральної асоціації протофібрил у ході формування фібринових фібрил [18] та корелює з концентрацією фібриногену і тромбіну. Друга ділянка кривої — плато. Вона характеризується

максимальним поглинанням згустку, яке залежить від концентрації фібриногену і діаметра фібрил полімерного фібрину в плазмі крові [19]. Третя ділянка відображає процес руйнування фібринового згустку і характеризується: а) часом напівруйнування згустку ( $T_{1/2}$ ), який залежить від концентрації плазміногену і t-PA [19]; б)  $tg\beta$  – швидкістю руйнування фібринового згустку, яка визначається концентрацією плазміну в згустку і інгібіторів плазміну ( $\alpha 2$ -антиплазміну) в плазмі крові; в) часом повного руйнування згустку. Наведена детальна характеристика окремих ділянок кривої утворення і руйнування згустку в плазмі крові свідчить, що перша і друга ділянки кривої відображають зсідальну здатність плазми крові, тобто – потенціал зовнішнього шляху системи зсідання, концентрацію Фг і наявність у плазмі крові інгібіторів системи зсідання. Третя ділянка кривої характеризує фібринолітичну складову системи гемостазу, а саме: швидкість активації Пг t-PA, швидкість руйнування структури згустку плазміном, наявність і концентрацію інгібіторів фібринолізу [6]. Таким чином, результуюча крива містить інформацію про хід та підсумок взаємодії складових системи гемостазу, що відображається в розмірі і часі існування фібринового згустку [1, 6, 20, 21]. Основним інтегральним параметром кривої, що кількісно виражає цей баланс між процесами утворення і руйнування згустку є площа поверхні, яку крива охоплює і для зручності визначається як площа трапеції, в яку вписана крива ЗГП, і розмірність якої виражена в одиницях оптичної щільності за секунду (рис. 1).

*Кількісна оцінка ЗГП та його окремих параметрів.* Аналіз кривих для визначення ЗГП і його параметрів у плазмі крові донорів і хворих із захворюваннями тазостегнового суглоба показує, що: по-перше, площа під кривою утворення–руйнування згустку в плазмі крові хворого (ЗГП) значно більша за таку в плазмі крові донора; по-друге, у присутності АсРС значення ЗГП у плазмі крові донорів і хворих істотно зменшується (табл. 1 і 2). Кількісна оцінка величин ЗГП у плазмі хворих до операції ( $300 \pm 147$  о.о.хс) і донорів ( $87 \pm 15$  о.о.хс) свідчить про те, що ЗГП плазми крові хворих в 3,4 раза перевищує такий у донорів. У присутності АсРС величина ЗГП у плазмі крові хворих зменшується в 3,8 раза до  $81 \pm 53$  о.о.хс і наближається до такої в нормі, в той час як у плазмі донорів зменшується лише в 1,6 раза і становить  $55 \pm 32$  о.о.хс. Порівняння величин окремих параметрів кривої утворення–руйнування згустку в плазмі крові

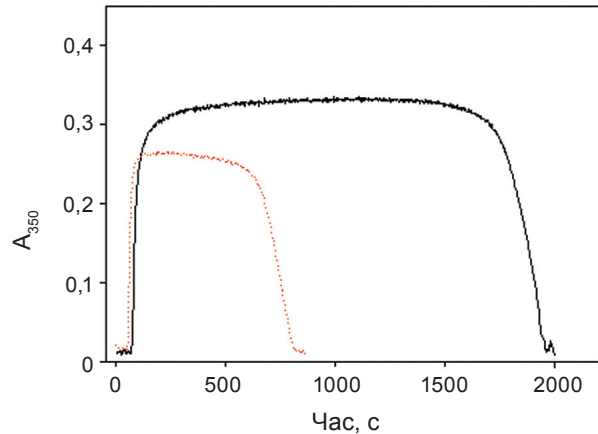


Рис. 2. Експериментальні криві для визначення величини ЗГП у плазмі крові хворих із захворюваннями тазостегнового суглоба. Червоним кольором позначена крива, одержана з плазмою у присутності АсРС

донорів у присутності та за відсутності АсРС вказує на зміну їхніх величин у ділянці, що характеризує фібринолітичну складову системи гемостазу, а саме: в 1,28 раза зменшується час напів- та повного руйнування фібринового згустку в плазмі крові донорів. Параметри потенціалу зсідання плазми крові донорів під впливом АсРС суттєво не змінюються. В той самий час додавання АсРС у плазму крові хворих спричинює істотні зміни у величинах параметрів як системи зсідання, так і фібринолітичної системи, прискорюючи утворення і руйнування фібринового згустку та приводячи до значного зменшення величини ЗГП (табл. 1, 2). Так, лаг-період скорочується в 1,33 раза, швидкість полімеризації зростає в 1,21 раза, що веде до зменшення товщини фібрил і відповідно зменшення абсорбції при 350 нм в 1,48 раза. Ще істотніші зміни відбуваються у фібринолітичній системі плазми: швидкість руйнування структури згустку зростає в 1,3 раза, час напів- і повного руйнування згустку скорочується в 3,34 раза, а величина ЗГП зменшується в 3,75 раза. Таким чином, одержані результати для плазми крові хворих, у стані гострої фази, свідчать про прискорення всіх ензиматичних процесів у системі гемостазу у присутності АРС. Це прискорення може бути зумовлене декількома причинами, а саме: а) зі збільшенням концентрації ключових протеїнів системи гемостазу (фібриногену) і фібринолізу (плазміногену) в плазмі крові в стані гострої фази [22]; б) наявністю в плазмі АРС, який, з одного боку, зв'язує PAI-1 [23] – інгібітор t-PA – і зменшує його концентрацію

Таблиця 1. ЗГП і параметри системи з'єднання та фібринолітичної системи плазми крові донорів і хворих із порушеннями системи гемостазу за відсутності АсРС (n = 13)

Плазма	Ляг-фаза $\tau$ , с	Швидкість полімеризації плазми $V_1 = \text{tg}\alpha$ , о.о./с	Максимальне поглинання при 350 нм $\Delta A$ , о.о.	Швидкість руйнування, $V_2 = \text{tg}\beta$ , о.о./с	$T_{1/2}$ , с	$T_{\text{руйнування}}$ , с	ЗГП, о.о.хс
Донорів	75 ± 17	(2,2 ± 0,6)·10 <sup>-3</sup>	0,090 ± 0,014	(1,40 ± 0,04)·10 <sup>-3</sup>	973 ± 225	1015 ± 228	87 ± 15
Хворих	108 ± 38	(3,6 ± 1,6)·10 <sup>-3</sup>	0,170 ± 0,02	(2,2 ± 1,6)·10 <sup>-3</sup>	1820 ± 514	1899 ± 525	300 ± 147

Таблиця 2. ЗГП і параметри системи з'єднання та фібринолітичної системи плазми крові донорів і хворих із порушеннями системи гемостазу у присутності АсРС (n = 12)

Плазма	Ляг-фаза $\tau$ , с	Швидкість полімеризації плазми $V_1 = \text{tg}\alpha$ , о.о./с	Максимальне поглинання при 350 нм $\Delta A$ , о.о.	Швидкість руйнування, $V_2 = \text{tg}\beta$ , о.о./с	$T_{1/2}$ , с	$T_{\text{руйнування}}$ , с	ЗГП, о.о.хс
Донорів	72 ± 11	(2,10 ± 0,06)·10 <sup>-3</sup>	0,078 ± 0,020	(1,53 ± 0,05)·10 <sup>-3</sup>	757 ± 291	790 ± 301	55 ± 32
Хворих	82 ± 17	(4,3 ± 1,5)·10 <sup>-3</sup>	0,117 ± 0,033	(2,89 ± 2,23)·10 <sup>-3</sup>	776 ± 312	809 ± 315	81 ± 53

в плазмі, що веде до прискорення активації плазміногену, утворення плазміну і стимуляції фібринолізу. З іншого боку, можна припустити, що у присутності APC, прискорюється інактивація TFPI (інгібітора комплексу ТФ – ФVІІа – ФХа) плазміном [24, 25]. Це, у свою чергу, прискорює активацію зовнішнього шляху зсідання плазми крові. Є і третій аспект дії APC на систему гемостазу, який в умовах *in vivo* розглядається як основний – це утворення комплексу APC із протеїном S, який шляхом протеолізу інактивує ФVa і ФVІІІа і, тим самим, гальмує швидкість утворення згустку в плазмі крові [26]. Проте, як свідчать дані табл. 1 і 2, в наших умовах ця дія APC не виявлялася ні в плазмі крові донорів, ні в плазмі крові хворих. Тому головним напрямом дії АсРС, що призводить до зменшення ЗГП плазми крові хворих і донорів, можна припустити, є інактивація інгібіторів системи гемостазу, в першу чергу TFPI і PAI-1.

*Порівняння концентрації маркерів системи гемостазу і величини ЗГП у плазмі крові донорів і хворих у ході операційної заміни тазостегнового суглоба.* На сьогодні стан системи гемостазу в плазмі крові донорів і хворих за різних патологій і можливий напрям його зміни в процесі лікування хворого оцінюється за концентрацією основних маркерів – Фг, розчинного фібрину, D-димеру, активністю APC та деякими іншими [27]. При ендопротезуванні тазостегнового суглоба, як і у разі травм та великих оперативних втручань, в плазмі крові виникає стан гострої фази. Наведені в табл. 3 дані показують, що в плазмі крові хворих концентрація Фг зростає майже в 2 рази, розчинного фібрину – в 19 разів, D-димеру – в 6,6 рази, ЗГП – в 3,4 рази порівняно із плазмою донорів. Ці дані свідчать про значне зростання потенціалу зсідання плазми крові і подовження часу існування фібринового згустку в плазмі крові хворих, що є важливим для процесу загоювання після травми, а в нашому разі – після операції із заміни тазостегнового суглоба. Було простежено динаміку зміни концентрацій маркерів системи гемостазу у хворих у післяопераційний період протягом двох тижнів на фоні застосування низькомолекулярного гепарину (НМГ) надропарину кальцію (фраксипарин, GlaxoSmithKline, Велика Британія) в дозі 0,3 мл на день (табл. 3). Якщо концентрація розчинного фібрину і D-димеру після значного зниження внаслідок введення НМВ гепарину на 3-й день почала зростати, що вказує на зростання концентрації тромбогенних факторів у плазмі крові на 7- і

14-й дні після операції, то зменшення величини ЗГП на 7- і 14-й день разом зі зростанням активності APC вказує на відновлення балансу між фібринолітичним і потенціалом зсідання в системі гемостазу плазми крові хворих, що підтверджується відсутністю тромбів у системі нижньої порожнистої вени під час ультразвукового дослідження судин нижніх кінцівок хворого. Таким чином, ЗГП є раннім і найчутливішим показником відновлення рівноваги в системі гемостазу хворого в післяопераційний період.

*Для дослідження механізму зменшення величини ЗГП* визначали амідазну активність основних ензимів системи зсідання крові, фібринолізу і системи антизсідання плазми крові у присутності та за відсутності АсРС. АсРС із отрути *Agkistrodon halys halys*, який було використано нами в дослідах, не виявляв амідазної активності щодо хромогенних субстратів тромбіну, плазміну і APC. Також АсРС не виявляв прямої фібринолітичної активності по відношенню до фібрину і фібриногену, активаторної активності по відношенню до плазміногену чи протромбіну [15]. Ці дані свідчать про те, що дія АсРС направлена тільки на активацію ендогенного PC плазми крові. Тому з великою долею вірогідності можна вважати, що дія АсРС на ЗГП опосередкована виключно APC. Хоча в літературі існують дані, які вказують на наявність ширшої субстратної специфічності у АсРС із отрути змій, що, можливо, пов'язане з недостатньою очисткою препарату ензиму [28].

В табл. 4 подано величини активності ензимів в умовах визначення ЗГП за відсутності та у присутності АсРС. Слід відмітити, що присутність АсРС майже не впливає на швидкість активації Пг t-РА, але в той самий час спричинює значне зростання амідазної активності тромбіну і APC. Це зростання можна пояснити наявністю APC, який значно підсилює гідроліз свого субстрату (який є чутливим також до тромбіну і плазміну) і лише частково неспецифічно руйнує субстрат тромбіну. Тому збільшення амідазної активності тромбіну можна віднести за рахунок зростання концентрації тромбіну, зумовленої, як можна припустити, додатковою активацією протромбіну в зовнішньому шляху або зменшенням концентрації TFPI у присутності APC. Зростання концентрації тромбіну призводить до збільшення потенціалу компоненти зсідання ЗГП плазми крові хворих (табл. 2). З іншого боку, наявність плазміну і висока концентрація t-РА у присутності APC, можливо, є факторами, що зменшують

Таблиця 3. Концентрація маркерів системи гемостазу в плазмі крові донорів і хворих із переломами в тазостегновому суглобі. Динаміка зміни концентрації маркерів у плазмі крові хворого №9 і величини ЗГП у ході лікування після ендопротезування тазостегнового суглоба

Плазма крові	Фібриноген, мг/мл	Фібрин, мкг/мл	D-димер, нг/мл	АРС, %	ЗГП, о.о.хс
Донорів	2,20 ± 0,36	2,60 ± 0,67	95 ± 32	100 ± 10	87 ± 15
Хворих	4,35 ± 3,20	50,0 ± 4,7	626 ± 60	93 ± 25	300 ± 147
№ 9 1-й день	3,5	103	173	100	361
№ 9 3-й день	4,5	11	172	93	567
№ 9 7-й день	5,3	19	410	88	470
№ 9 14-й день	5,1	63	494	115	329

Таблиця 4. Амідазна активність тромбіну, плазміну і АРС у плазмі крові донорів за відсутності та у присутності АсРС (n = 3)

Амідазна активність ензимів	Тромбіну	Плазміну	АРС
ТП + t-PA - АсАР	0,43 ± 0,12	0,072 ± 0,023	0,74 ± 0,17
ТП + t-PA + АсАР	0,72 ± 0,20	0,077 ± 0,019	1,27 ± 0,29

Амідазну активність виражено в оптичних одиницях поглинання світла при 405 нм за 10 хв

концентрацію інгібіторів – в першу чергу TFPI і PAI-1 у плазмі крові [23, 25] – і таким чином є основним внеском у збільшення потенціалу зсідання і фібринолітичної компоненти ЗГП. Це приводить до зменшення величини ЗГП плазми крові, що, в цілому, для плазми крові з ознаками гіперкоагуляції можна розглядати як позитивний вплив. Слід відмітити, що питання про механізм впливу АсРС (АРС) на прискорення утворення і руйнування фібринового згустку в плазмі крові залишається відкритим.

Таким чином, запропонований кількісний метод визначення ЗГП та параметрів його зсідальної і фібринолітичної складових для плазми крові донорів і хворих із порушеннями системи гемостазу дозволив встановити, що у присутності АсРС у плазмі крові величина ЗГП істотно зменшується, що вказує на посилення здатності плазми утворювати і руйнувати згусток за заданих умов. Одержані результати дозволяють зробити припущення, що прискорення активації фібринолітичної системи і зменшення інгібіторного потенціалу плазми крові у присутності АсРС відповідають за зменшення ЗГП у плазмі крові донорів і хворих. З'ясування механізму прискорюючого впливу АсРС на ензимні системи, що визначають величину ЗГП у плазмі крові, потребує подальшого дослідження.

#### ВЛИЯНИЕ АКТИВАТОРА ПРОТЕИНА С НА ОБЩИЙ ГЕМОСТАТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ПЛАЗМЫ КРОВИ ПРИ ЭНДОПРОТЕЗИРОВАНИИ ТАЗОБЕДРЕННОГО СУСТАВА

А. М. Рубленко<sup>2</sup>, Л. П. Урвант<sup>1</sup>,  
Е. М. Макогоненко<sup>1</sup>, Т. Н. Платонова<sup>1</sup>,  
П. Ю. Цап<sup>1</sup>, Т. М. Чернишенко<sup>1</sup>,  
И. Н. Колесникова<sup>1</sup>, В. О. Фищенко<sup>2</sup>,  
Э. В. Луговской<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии им. А. В. Палладина  
НАН Украины, Киев;  
e-mail: makogonenko@biochem.kiev.ua;

<sup>2</sup>Винницкий национальный медицинский  
университет им. Н. И. Пирогова, Украина

В работе описан метод определения общего гемостатического потенциала (ОГП) (overall hemostasis potential) плазмы крови, позволяющий быстро и количественно охарактеризовать баланс между системами свертывания и фибринолиза. Метод базируется на анализе кривой зависимости величины поглощения света сгустком при 350 нм от времени, которая регистрирует образование и разрушение сгустка в плазме крови в присутствии тромбопластина и t-PA. Метод позволяет определить три параметра системы свертывания: время, ско-

рость образования и максимальную мутность сгустка, и три параметра системы фибринолиза: время полу- и полного разрушения сгустка и его максимальную скорость, а также интегральную характеристику – площадь под кривой, которая характеризует размер и время существования сгустка и отражает ОГП плазмы крови. Показано, что величина ОГП плазмы больных, больше таковой у доноров в 3,8 раза, что согласуется с повышенным уровнем фибриногена (4,25 мг/мл), растворимого фибрина (50 мкг/мл), D-димера (630 нг/мл) и незначительным понижением активности APC (93%). AcPC уменьшает величину ОГП плазмы крови доноров и больных соответственно в 1,6 и 3,7 раза. Прибавление AcPC в плазму доноров увеличивает амидазную активность тромбина и APC и не влияет на такую плазмина. Предполагается, что действие AcPC на ОГП опосредовано образованием APC, который способствует уменьшению уровня ингибиторов TAFI и PAI-1 в исследуемой плазме.

**Ключевые слова:** гемостатический потенциал, активатор протеина C, протеин C, эндопротезирование тазобедренного сустава.

**EFFECT OF PROTEIN C ACTIVATOR ON OVERALL HAEMOSTASIS POTENTIAL IN DONOR AND HIP ARTHROPLASTY PATIENT PLASMA**

A. M. Rublenko<sup>2</sup>, L. P. Urvant<sup>1</sup>,  
E. M. Makogonenko<sup>1</sup>, T. N. Platonova<sup>1</sup>,  
P. U. Tsap<sup>1</sup>, T. M. Chernyshenko<sup>1</sup>,  
I. M. Kolesnikova<sup>1</sup>, V. O. Fishchenko<sup>2</sup>,  
E. V. Lugovskoi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;  
e-mail: makogonenko@biochem.kiev.ua;

<sup>2</sup>Pirogov Vinnytsya National Medical University

**S u m m a r y**

A method of overall haemostasis potential (OHP) determination for quantitative and rapid estimation of coagulation-fibrinolysis balance in plasma has been presented. The method is based on the analysis of the absorbance at 350 nm vs. time curve, which records the clot formation and dissolution in plasma in the presence of thromboplastin and t-PA. Three parameters of coagulation system – time, rate of formation and maximal turbidity of the clot, and three parameters of fibrinolytic system – half-, full-time and maximal rate of the clot dissolution, and main integral parameter – the area under the curve that characterizes

the size and time of the clot existence and expresses OHP of plasma, can be determined by this method. It was shown that OHP value of patients plasma was 3.8 times more than that of the donor plasma. It is in concordance with elevated level of Fg (4.25 mg/ml), soluble fibrin (50 µg/ml), D dimer (630 ng/ml) and insufficient decrease of APC activity (93%) in patients. AcPC, added to donor and patient plasma, reduced OHP value 1.6 and 3.7 times, correspondingly. AcPC increased amidase activity of thrombin and APC in the donor plasma, and did not change that of plasmin. These data indicated that the effect of AcPC on OHP is mediated by formation of APC that helps to reduce the level of inhibitors in the investigated plasma.

**Key words:** overall hemostasis potential, activator of protein C, protein C, hip arthroplasty.

1. He S., Bremme K., Blombäck M. // *Thromb. Res.* – 1999. – **96**, N 2. – P. 145–156.
2. He S., Antovic A., Blombäck M. // *Ibid.* – 2001. – **103**, N 5. – P. 355–361.
3. Antovic A., Blombäck M., Bremme K., He S. // *Blood Coagul. Fibrinolysis.* – 2002. – **13**, N 3. – P. 181–186.
4. Antovic J. P., Antovic A., He S. et al. // *Haemophilia* – 2002. – **8**, N 6. – P. 781–786.
5. He S., Zhu K., Skeppholm M. et al. // *Thromb. Haemost.* – 2007. – **98**, N 4. – P. 871–882.
6. Goldenberg N. A., Hathaway W. E., Jacobson L., Manco-Johnson M. J. // *Thromb. Res.* – 2005. – **116**, N 4. – P. 345–356.
7. Mackman N., Taubman M. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2009. – **29**, N 12. – P. 1986–1988.
8. McVey J. H. // *Baillieres Clin. Haematol.* – 1994. – **7**, N 3. – P. 469–484.
9. Hedner U. // *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* – 2002. – **32**, N 1. – P. 33–36.
10. Roberts H. R., Monroe D. M., Oliver J. A. et al. // *Haemophilia.* – 1998. – **4**, N 4. – P. 331–334.
11. Collen D. // *Thromb. Haemost.* – 1980. – **43**, N 2. – P. 77–89.
12. Castellino F. J., Ploplis V. A. // *J. Thromb. Haemost.* – 2009. – **7**, N 1. – P. 140–145.
13. Fukudome K., Esmon C. D. // *J. Biol. Chem.* – 1994. – **269**, N 42. – P. 26486–26491.
14. Kisiel W., Canfield W. M., Ericsson L. H., Davie E. W. // *Biochemistry.* – 1977. – **16**, N 26. – P. 5824–5831.
15. Платонова Т. Н., Горницкая О. В. // *Укр. біохім. журн.* – 2004. – **76**, N 3. – С. 62–67.
16. Варецька Т. В. // *Укр. біохім. журн.* – 1960. – **32**, N 1. – С. 13–24.

17. *Lugovskoi E. V., Kolesnikova I. N., Lugovskaia N. E. et al.* // Укр. біохім. журн. – 2004. – **76**, № 6. – С. 136–141.
18. *Hantgan R. R., Hermans J.* // J. Biol. Chem. – 1979. – **254**, N 22. – P. 11272–11281.
19. *Carr M. E. Jr., Hermans J.* // Macromolecules. – 1978. – **11**, N 1. – P. 46–50.
20. *Макогоненко Е. М., Курпа С. А., Луговскої Э. В. и др.* // Биохимия. – 1987. – **52**, № 10. – С. 1546–1552.
21. *Lezhen T. I., Makogonenko E. M., Sushko O. O. et al.* // Фізіол. журн. – 1993. – **39**, № 1. – С. 24–28.
22. *Heinrich P. C., Castell J. V., Andus T.* // Biochem. J. – 1990. – **265**, N 3. – P. 621–636.
23. *Sakata Y., Curriden S., Lawrence D. et al.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1982. – **82**, N 4. – P. 1121–1125.
24. *Li Y., Spencer F. A., Becker R. C.* // J. Thromb. Thrombolysis. – 2003. – **15**, N 1. – P. 19–23.
25. *Hoover-Plow J.* // Vasc. Health Risk Manag. – 2010. – **6**. – P. 199–205.
26. *Dahlbäck B., Villoutreix B. O.* // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. – 2005. – **25**, N 7. – P. 1311–1320.
27. *Bauer K. A., Rosenberg R. D.* // Blood. – 1987. – **70**, N 2. – P. 343–350.
28. *Kisiel W., Kondo S., Smith K. J. et al.* // J. Biol. Chem. – 1987. – **262**, N 26. – P. 12607–12613.

Отримано 13.09.2011