

**Національна академія наук України
Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна**

ПИРОГОВА Людмила Віталіївна



УДК 577.112.7:612.115

**Формування і гідроліз фібринового згустку в плазмі крові людини за
патологічних станів та за дії екзогенних факторів**

03.00.20 – біотехнологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2020

Дисертацією є рукопис.

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

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор
Макогоненко Євген Митрофанович,
Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна
НАН України, головний науковий
співробітник відділу структури і
функції білка.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Верьовка Сергій Вікторович,
ДУ «Інститут отоларингології ім. О.С. Коломійченка»
НАМН України, завідувач лабораторії біохімії.

кандидат біологічних наук
Компанець Ірина Володимирівна,
ННЦ «Інститут біології і медицини», Національний
університет імені Тараса Шевченка,
доцент кафедри біомедицини.

Захист відбудеться 14 грудня 2020 р. на засіданні спеціалізованої вченої ради Д26.240.01 в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна за адресою: м. Київ, вул. Леонтовича, 9.

Поштова адреса: 01054, м. Київ, вул. Леонтовича, 9, Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна, спеціалізована вчена рада Д26.240.01.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна за адресою: м. Київ, вул. Леонтовича, 9.

Автореферат розіслано «__»_____ 2020 року.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

кандидат біологічних наук



Н.П. Карлова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Система гемостазу є однією з основних систем крові, яка забезпечує цілісність і прохідність судин системи кровообігу, попереджає або зупиняє кровотечу, а також підтримує кров у рідкому стані. В основі функціонування системи гемостазу лежить збалансована взаємодія між її коагуляційною, антикоагуляційною та фібринолітичною ланками. Порушення цього балансу спричинює внутрішньосудинне тромбоутворення або кровотечу, що призводять до патологічних наслідків різного ступеня складності. В зв'язку з цим вивчення процесів утворення та лізису тромбів, механізму їх взаємозалежності, регуляції та ролі в патогенезі захворювань разом з розробкою та удосконаленням методів дослідження цих процесів в нормі, при патологіях та за дії антитромботичних препаратів залишається актуальним напрямком досліджень сучасної гемостазіології, біотехнології та клінічної біохімії.

Одним з методів загальної оцінки стану системи гемостазу в плазмі крові людини є метод визначення загального гемостатичного потенціалу (ЗГП), запропонований М. Blomback у 1999 році. Він дозволяє охарактеризувати загальну функціональну активність системи гемостазу, її коагуляційної та фібринолітичної ланок, зокрема зв'язок між ними. Цей метод було використано для вивчення впливу різних концентрацій фактору VIIa на загальний гемостаз і TAFI-залежний фібриноліз у плазмі крові пацієнтів з дефіцитом факторів II, V, VII, VIII, IX, XI і XII, а також для діагностики стану системи гемостазу у хворих на тромбоз глибоких вен, пов'язаний зі стійкістю до дії активованого протеїну С [Antovic A., et al., 2003]. Дослідження впливу прямих інгібіторів тромбіну – дабігатрану і аргатробану на зсідання плазми крові методом ЗГП показало, що ці сполуки пригнічують потенціал зсідання і збільшують фібринолітичний потенціал плазми крові [He S, et al., 2013]. Метод ЗГП було також застосовано для дослідження плазми крові пацієнтів з захворюваннями, які супроводжуються порушеннями системи гемостазу, зокрема за умов артеріальної та венозної тромбоемболії, захворювань коронарної артерії, ішемічної хвороби серця, аутоімунними захворюваннями, тощо [Antovic A., et al., 2010; Curnow J.L., et al., 2007; Чернуха Л.М., et al., 2014, Amiral J. et al., 2018].

Проте не всі стадії турбідиметричної кривої, на оцінці якої базується метод М. Blomback, і які всебічно вивчені, застосовуються в методі. Водночас, використання цих стадій турбідиметричної кривої, может дати важливу інформацію при аналізі процесів утворення і лізису фібринового згустку в плазмі крові пацієнтів [Collen D., 1999, Rijken D. et al., 2009, Litvinov R., Weisel J., 2016]. Тому ми доповнили параметри, які визначають за методом ЗГП, аналізом параметрів стадій турбідиметричної кривої утворення і гідролізу фібринового згустку, що разом з концентрацією молекулярних маркерів дозволило більш детально описати стан системи гемостазу донорів і пацієнтів при різних захворюваннях.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційну роботу виконано відповідно до плану науково-дослідних робіт відділу структури і функції білка Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України: «Вивчення механізму формування фібринового каркасу тромбу та розробка діагностиків стану системи гемостазу при запальних процесах, серцево-судинних захворюваннях та хірургічних втручаннях» (2014-2018 рр., д.р. № 0114U003217), «Молекулярно-генетичні і біохімічні механізми регуляції клітинних та системних взаємодій за фізіологічних та патологічних станів», розділ: «Протеїн-протеїнові та протеїн-клітинні взаємодії в системі гемостазу за норми та патології: механізми, діагностика та корекція порушень» (2017-2021 рр., д.р. № 0117U002624).

Мета і завдання дослідження. Метою роботи є розробка методу аналізу стану системи гемостазу, який дозволяє визначити рівень активації, взаємодії і зв'язку компонентів системи гемостазу в процесі формування та гідролізу фібринового згустку в плазмі крові людини за деяких патологій, пов'язаних з порушенням системи гемостазу, та за дії антитромботичних агентів.

Відповідно до мети роботи поставлено такі завдання:

- доповнити параметри загального гемостатичного потенціалу параметрами турбідиметричної кривої, які кількісно характеризують стадії процесу утворення і руйнування фібринового згустку;
- за допомогою удосконаленого методу загального гемостатичного потенціалу визначити стан системи гемостазу в плазмі крові донорів та пацієнтів, хворих на хронічну хворобу нирок, інфаркт міокарду, інсульт, стенокардію, стеноз аорти та запалення тазостегнового суглобу;
- визначити концентрації молекулярних маркерів стану системи гемостазу – розчинного фібрину, D-димеру, протеїну С та фібриногену у плазмі крові донорів та пацієнтів за даних захворювань;
- на основі аналізу кореляційного і функціонального зв'язку між параметрами загального гемостатичного потенціалу і концентраціями молекулярних маркерів з'ясувати наявність і силу зв'язку між компонентами та напрямок змін у системі гемостазу у плазмі крові пацієнтів при хронічній хворобі нирок;
- дослідити вплив антитромботичних препаратів гепарину та калікс[4]арену С-145 на формування і гідроліз фібринового згустку у плазмі крові донорів із застосуванням удосконаленого методу загального гемостатичного потенціалу.

Об'єкт дослідження. Система гемостазу людини.

Предмет дослідження. Молекулярний механізм процесу формування та гідролізу фібринового згустку в плазмі крові людини за деяких патологій та за дії екзогенних факторів.

Методи дослідження. Турбідиметрія, імуноензимний аналіз, аналіз активності ензимів, хроматографія, електрофорез у ПААГ за присутності SDS, денситометрія, спектрофотометрія.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше показано, що кількісні параметри загального гемостатичного потенціалу та турбідиметричної кривої, яка описує процес формування та гідролізу фібринового згустку, корелюють з концентраціями молекулярних маркерів системи гемостазу, які визначають у діагностичних тестах (фібриноген, розчинний фібрин, D-димер, протеїн С). Розроблено підходи для аналізу зв'язку між концентраціями молекулярних маркерів та параметрами загального гемостатичного потенціалу. Встановлено, що у хворих на хронічну хворобу нирок з підвищенням концентрації розчинного фібрину (понад 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) зростає сила кореляційного зв'язку до сильного та дуже сильного між концентрацією протеїну С та концентрацією фібриногену (-0,73), потенціалом зсідання (-0,81) та фібринолітичним потенціалом (-0,93), що свідчить про існування чітких кореляційних зв'язків між системами зсідання крові, фібринолізу і антикоагулянтною системою протеїну С і є перспективним для розробки методів прогнозування стану системи гемостазу. Показано, що сила кореляційного зв'язку між концентрацією розчинного фібрину і D-димеру в усіх досліджуваних хворих відповідає рівню слабкої. Запропоновано гіпотезу про утворення фібринових мікрозгустків у плазмі крові як необхідного проміжного ланцюга для активації фібринолітичної системи і утворення D-димеру.

Практичне значення. Проведені дослідження дозволили запропонувати придатний до використання у клінічній практиці спосіб оцінки динамічної рівноваги у системі гемостазу – метод визначення загального гемостатичного потенціалу плазми крові. Апробація методу за низки патологій, пов'язаних з загрозою внутрішньосудинного тромбоутворення, засвідчила його інформативність та дозволила виявити рівень кореляції між величинами параметрів загального гемостатичного потенціалу і рівнем основних молекулярних маркерів активації системи гемостазу (фібриноген, розчинний фібрин, D-димер, протеїн С). На сьогодні в Україні відсутній універсальний інформативний метод, який дозволяє оцінити загальний ризик утворення тромбів чи кровотечі. У світовій клінічній практиці застосовують метод тромбоеластографії, який через високу вартість обладнання та витратних матеріалів в Україні не використовують. Запропонований нами підхід не потребує дорогих реактивів та виконується за допомогою стандартної автоматичної системи вимірів у мікропланшетах, яка входить у перелік базового лабораторного обладнання більшості діагностичних лабораторій.

Особистий внесок здобувача. Дисертанткою самостійно проведено аналіз даних літератури, виконано основний обсяг експериментальних досліджень та проведено статистичну обробку отриманих результатів. Здобувачем самостійно проведено електрофоретичні, імуноферментні, турбідиметричні та хроматографічні дослідження. Сформульовано мету, завдання, план роботи та інтерпретовано результати досліджень разом з науковим керівником гол. н. с. Макогоненком Є.М. Препарати фібриногену отримано разом з пров. інженером Гоголинською Г.К. Визначення у плазмі крові концентрації розчинного фібрину і D-димеру із застосуванням імунодіагностичних методів на основі моноклональних антитіл, отриманих в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, проводили спільно з с.н.с. Колесніковою І.М. Вміст фібриногену та протеїну С у плазмі крові хворих визначали спільно з м.н.с. Чернишенко Т.М.

Апробація результатів дисертації. Результати дисертації було повідомлено та обговорено на вітчизняних і міжнародних конференціях: VI Міжнародна науково-практична конференція “Біотехнологія: звершення та надії”. Київ, 2017; XI Український біохімічний конгрес, Київ, 2014; RECOOP 14-th bridges in life sciences and 2nd RECOOP – KFSD International student conference, Bratislava, Slovak republic, 2019; XI Український біохімічний конгрес, Тернопіль, 2019.

Публікації. Всього за матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 6 статей у фахових виданнях та 7 тез доповідей на міжнародних і вітчизняних наукових конференціях, конгресах, з’їздах.

Структура та обсяг роботи. Дисертація складається з анотації, вступу; огляду літератури; експериментальної частини, що включає опис матеріалів та методів досліджень, результати досліджень та їх обговорення; заключення; висновків та списку літератури, що містить 177 джерел. Дисертація містить 20 таблиць і 37 рисунків. Загальний обсяг дисертації становить 125 сторінок.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури.

В огляді літератури представлено сучасні дані про систему гемостазу і її ланки: систему зсідання крові, фібриноліз, систему протеїну С, пояснено механізми активації та взаємодію цих ланок в процесі утворення і гідролізу фібринового згустку в плазмі крові. Описано сучасні методи дослідження системи гемостазу.

Матеріали і методи досліджень.

Вінницьким національним медичним університетом ім. М.І. Пирогова було надано 25 зразків плазми крові хворих на інфаркт міокарду, 10 зразків плазми крові хворих на інсульт, 8 зразків плазми крові пацієнтів з захворюванням тазостегнового суглобу, 88 зразків плазми крові пацієнтів з хронічним захворюванням нирок, 52 зразки плазми крові пацієнтів зі стенозом аорти та 36 зразків плазми крові хворих на стенокардію. Зразки крові донорів і пацієнтів відбирали у 3,8% цитрат натрію (1 частина цитрату натрію і 9 частин крові). Плазму відділяли від клітин крові в межах 1 години після забору крові центрифугуванням останньої при 1000 г протягом 20 хв. Аліквоти плазми крові зберігали при -20 °С.

На проведення досліджень з кров’ю людей було отримано дозвіл Комісії по етиці Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова та інформовану згоду від кожного пацієнта.

Антитромбін III отримували з плазми крові донорів шляхом афінної хроматографії з застосуванням гепарин-сефарози. Фібриноген виділяли з плазми крові людини, отриманої в Центрі крові Головного військового клінічного госпіталю Міністерства оборони України м. Києва, шляхом фракційного висолювання сульфатом натрію [Варецька Т.В., 1960]. Рекомбінантний тканинний активатор плазміногену (t-PA) фірми Boehringer Ingelheim (Німеччина), тромбін – фірми Sigma (США) В досліджах використовували реагент АЧТЧ (активований частковий тромбопластиновий час) фірми Ренам (РФ).

Гемостатичний потенціал плазми крові визначали спектрофотометричним методом шляхом реєстрації поглинання світла фібриновим згустком при 405 нм на мікрорідері Multiscan EX (Thermo Fisher Scientific, Фінляндія). Згусток формували в лунках мікропланшети, в які послідовно додавали 0,05 М HEPES буфер, рН 7,4, що містив 0,15 М NaCl, 70 μ л плазми крові, t-PA до кінцевої концентрації 75 IU/мл (3 μ л) і АЧТЧ-реагент (70 μ л). Процес зсідання плазми крові ініціювали додаванням 100 μ л 25 мМ CaCl₂. Кінцевий об'єм реакційної суміші становив 300 μ л.

Полімеризацію фібрину в системі фібриноген-тромбін досліджували методом турбідиметрії шляхом реєстрації при 350 нм мутності фібринового згустку, що утворювався в спектрофотометричній кюветі, в яку послідовно додавали до 0,02 М HEPES буфера, рН 7,4, що містив 0,15 М NaCl, 0,1 мМ CaCl₂, антитромбін III і фібриноген в кінцевих концентраціях відповідно 0,02 та 0,25 мг/мл та гепарин в досліджуваних концентраціях. Процес полімеризації фібрину ініціювали додаванням тромбіну до кінцевої концентрації 0,5 NIH/мл. Для руйнування згустку у суміш додавали плазміноген і t-PA до кінцевої концентрації 5 μ г/мл і 15 IU/мл відповідно. Кінцевий об'єм реакційної суміші становив 400 μ л.

Концентрацію розчинного фібрину і D-димеру в плазмі крові визначали з використанням імуноензимних тест-систем, розроблених у відділі молекулярної імунології Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України [Луговської Е.В., Колеснікова І.М., Комісаренко С.В., 2003].

Загальний вміст фібриногену в плазмі крові визначали за методом [Платонова Т. М. та ін., 1993]. У скляну пробірку додавали 0,2 мл плазми крові та 1,7 мл 0,1 М фосфатного буферу, рН 7,0. Зсідання плазми крові ініціювали додаванням 0,1 мл тромбінподібного ензиму анциструну-Н (2 NIH/мл). Після інкубації протягом 30 хв при 37 °С згусток фібрину викручували на скляну паличку та розчиняли у 5 мл 1,5 % оцтової кислоти. Концентрацію протеїну визначали, вимірюючи поглинання розчину при довжині хвилі 280 та 320 нм ($\epsilon_{280, 0,1\%} = 1,504$), розраховували як $C = 5 * (E_{280} - E_{320}) / 1,504$, та виражали у мг на мл плазми крові.

Рівень протеїну С визначали з використанням хромогенного субстрату S2236 («GE-Healthcare», США). Для цього змішували 0,03 мл досліджуваної плазми крові, 0,035 мл 3 мМ розчину S2236 з 0,05 мл активатора протеїну С («Ренам», Росія) в 0,05 М трис-НСІ буфері, рН 7,4. Загальний об'єм реакційної суміші складав 0,25 мл. Швидкість розщеплення субстрату визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 405 нм на рідері Multiscan EX (Фінляндія) і виражали у відсотках відносно контрольної донорської плазми крові, активність якої приймали за 100 %.

Чистоту протеїнів перевіряли за допомогою електрофорезу у поліакриламідному гелі (6 та 10 %), що містив SDS, за методом [Laemmli, 1970] в якому використовували трис-гліцинову систему.

Математичну обробку та аналіз отриманих експериментальних даних проводили за допомогою пакету програм Excel 2003. Представлені на рисунках дані є типовими для серії повторюваних дослідів (не менше трьох у кожній серії). Визначали середнє значення величин параметрів і їх стандартне відхилення, проводили парний кореляційний аналіз, визначаючи лінійний коефіцієнт кореляції Пірсона та достовірність різниці між середніми значеннями двох груп за тестом Ст'юдента.

Результати досліджень та їх обговорення.

Характеристика методу визначення загального гемостатичного потенціалу та параметрів турбідиметричної кривої утворення і гідролізу згустку плазми крові. В нормі система гемостазу відповідає за цілісність судин і організму в цілому, активуючись короткочасно для закриття їх пошкоджень шляхом утворення тромбів. При патологічних станах, коли в кров потрапляють прокоагулянтні агенти зовнішнього або внутрішнього походження, відбувається довгострокова активація системи зсідання крові. Тривала активація

коагуляції не має певної фізіологічної спрямованості, ініціює функціонально пов'язані з нею системи, споживає фактори системи гемостазу, створюючи загрозу тромбозу, ДВЗ-синдрому чи кровотечі [Tanaka, K.A., 2009].

Для оцінки стану системи гемостазу плазми крові пацієнтів і прогнозування напрямку його змін було вибрано метод гемостатичного потенціалу (Blomback M., 2011), який дає загальну характеристику здатності плазми крові пацієнтів утворювати і розчиняти фібриновий згусток. Під гемостатичним потенціалом розуміють розмір фібринового згустку, який утворюється в досліджуваній плазмі крові після активації її з'єднання тканинним фактором. Потенціал визначається як площа, що охоплюється турбідиметричними кривими за присутності (ЗГП) та за відсутності (ЗП) тканинного активатора плазміногену (t-РА), який активує систему фібринолізу (Рис. 1).

Оскільки метод базується на 2-х турбідиметричних кривих з'єднання плазми крові, які описують усі стадії утворення і лізису фібринового згустку, ми доповнили аналіз турбідиметричних кривих кількісними параметрами, що характеризують молекулярні процеси на окремих стадіях з'єднання і лізису фібринового згустку і дозволяють повніше оцінити взаємодію, зв'язок і рівень активності ланок системи гемостазу.

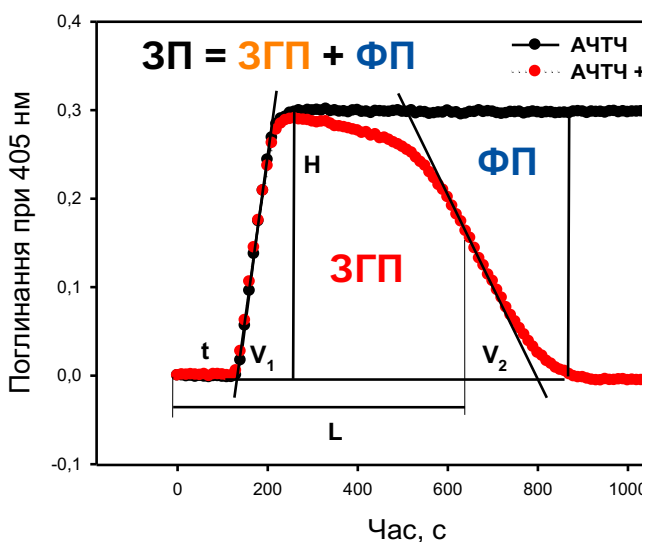


Рис. 1. Параметри турбідиметричних кривих з'єднання плазми крові донорів, що ініціюється АЧТЧ-реагентом за відсутності і присутності t-РА, які дають загальну характеристику потенціалу з'єднання і кількісну характеристику їх окремим стадіям. ЗП – потенціал з'єднання, ЗГП – загальний гемостатичний потенціал, ФП – фібринолітичний потенціал, τ – лаг-період, V_1 – швидкість латеральної асоціації протофібрил, H – максимальна мутність згустку, L – час напівлізису згустку, V_2 – швидкість гідролізу фібринового згустку.

Гемостатичний потенціал має три складові: потенціал з'єднання (ЗП), який визначає здатність внутрішнього шляху коагуляційного каскаду, що ініціюється АЧТЧ-реагентом, формувати фібриновий згусток; загальний гемостатичний потенціал (ЗГП), що характеризує здатність системи гемостазу до підтримання балансу між процесами з'єднання і фібринолізу в плазмі крові; фібринолітичний потенціал (ФП), що показує здатність фібринолітичної компоненти системи руйнувати згусток. Величини потенціалу є інтегральними характеристиками процесів і виражаються в одиницях площі під турбідиметричною кривою з розмірністю о.о. \times с (оптичні одиниці помножені на час у секундах).

Окремі стадії процесу формування і гідролізу згустку були охарактеризовані за такими параметрами: τ – лаг-період, що показує швидкість активації внутрішнього шляху коагуляційного каскаду, утворення тромбіну, активації фібриногену у фібрин і формування протофібрил; V_1 – tg кута нахилу максимальної швидкості зростання мутності згустку, яка показує швидкість латеральної асоціації протофібрил і утворення фібрил; H – величина кінцевої мутності згустку, що визначається товщиною фібрил згустку; L – час напівлізису згустку, який залежить від концентрації плазміногену, t-РА і структури згустку; V_2 – tg кута нахилу максимальної швидкості падіння мутності згустку, яка залежить від концентрації плазміну і інгібіторів плазміну (α_2 -антиплазміну, PAI-1) в плазмі крові. Таким чином, результуюча крива містить інформацію про хід та підсумок взаємодії складових системи гемостазу. Основним інтегральним параметром кривої, що кількісно характеризує баланс між процесами

утворення і руйнування згустку є ЗГП – площа поверхні, яку охоплює турбідиметрична крива і розмірність якої виражено в одиницях оптичного поглинання за секунду.

Дослідження проводили в плазмі крові, яку аналізували у двох експериментальних системах: в першій процес формування і гідролізу фібринового згустку ініціювали АЧТЧ-реагентом, що активує внутрішній шлях зсідання крові, і характеризували за параметрами гемостатичного потенціалу та окремих ділянок турбідиметричної кривої; у другій – стан системи гемостазу в плазмі крові визначали за концентраціями молекулярних маркерів – фібриногену, розчинного фібрину (sf), протеїну С, D-димеру на момент її забору у пацієнтів.

Параметри процесу формування та гідролізу фібринового згустку та гемостатичного потенціалу в плазмі крові донорів та пацієнтів, хворих на інфаркт міокарду, інсульт, стеноз аорти, стенокардію, хронічну хворобу нирок та пацієнтів зі захворюваннями тазостегнового суглобу (ЗТСС). Було досліджено 239 зразків плазми крові донорів (n=10), і пацієнтів з порушенням системи гемостазу: серед них хворих на інфаркт міокарду (n=25), інсульт (n=10, ЗТСС (n=8), стеноз аорти (n=51), стенокардію (n=47), хронічну хворобу нирок (n=88).

Для характеристики системи гемостазу пацієнтів для кожного з них було отримано турбідиметричні криві зсідання плазми крові, ініційованого АЧТЧ-реагентом, за відсутності і за присутності t-PA (Рис. 2). На основі кривих зсідання плазми крові кожного пацієнта було визначено параметри: лаг-період, швидкість латеральної асоціації протофібрил, максимальну мутність згустку, час його напівлізису, середні значення цих параметрів та їхнє стандартне відхилення (Табл. 1).

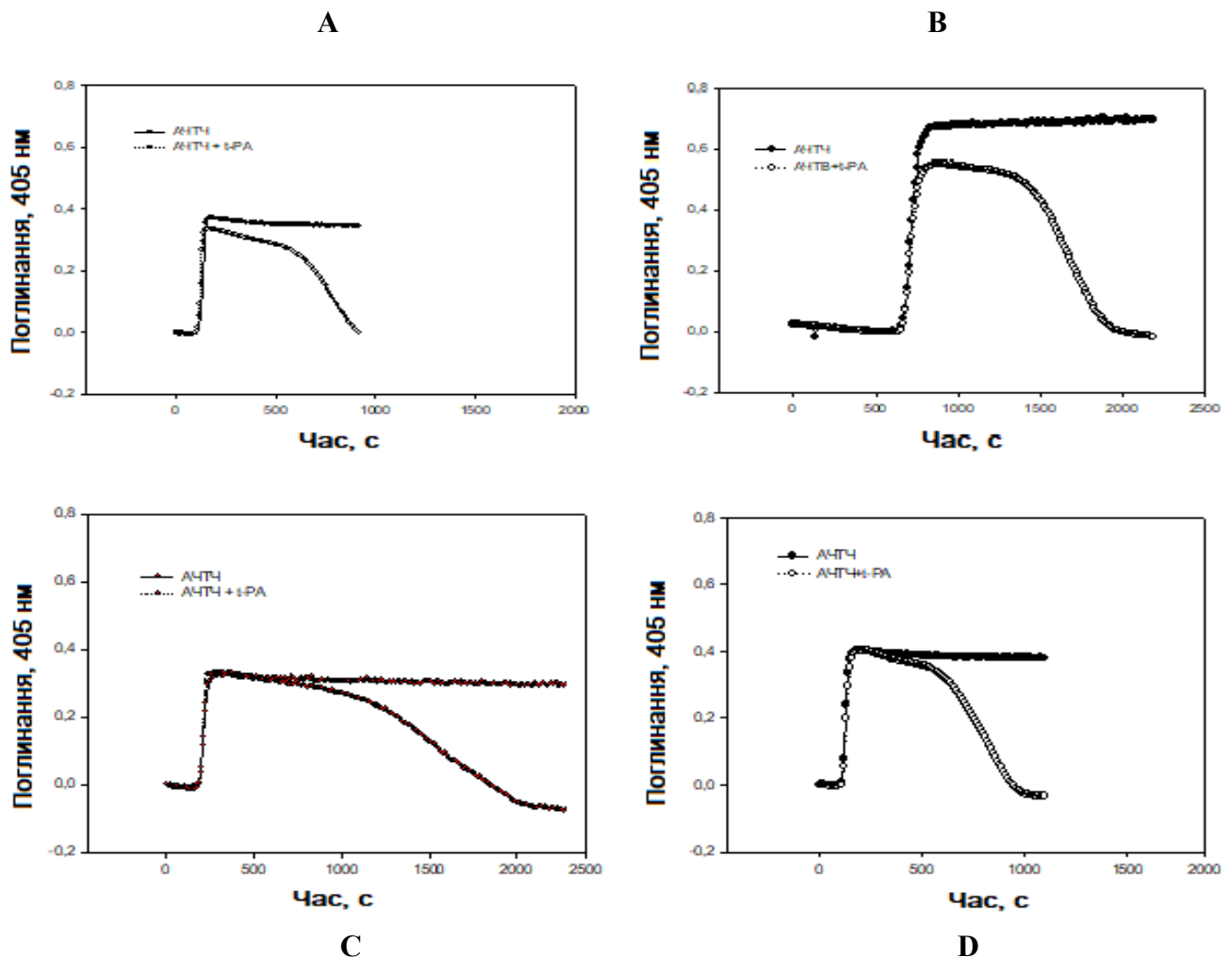


Рис. 2. Типові турбідиметричні криві, що описують процес зсідання плазми крові, ініційований АЧТЧ-реагентом за присутності і за відсутності t-PA, у пацієнтів, хворих на інфаркт міокарду (А), інсульт (В), ЗТСС (С) та у донорів (D).

Таблиця 1. Параметри процесу формування та гідролізу фібринового згустку в плазмі крові донорів та пацієнтів, хворих на інфаркт міокарду, інсульт, ЗТСС, стеноз аорти, стенокардію та хронічну хворобу нирок.

Плазма крові	За відсутності t-PA			За присутності t-PA			
	τ , с	V_1 , о.о./с	H, о.о.	τ , с	V_1 , о.о./с	H, о.о.	L, с
Донори	140±23	0,0081±0,00038	0,39±0,02	145±20	0,0038±0,0011	0,385±17	954 ± 45
Інфаркт міокарду	256±36*	0,0069±0,00046	0,34±0,04	238±127*	0,0055±0,00044	0,256±0,08*	1004±54
Інсульт	793±81*	0,0061±0,00036	0,58±0,08*	724±171*	0,0051±0,0026	0,526±0,08*	1709±170*
ЗТСС	162±24	0,0057±0,00033*	0,26±0,03	186±87	0,0065±0,0028*	0,314±0,03	1433± 81*
Стеноз	167±31	0,009±0,0022	0,378±0,05	168±31	0,0089±0,00019	0,471±0,11	798±253
Стенокардія	184±18*	0,0078±0,0027	0,347±0,12	194±39*	0,0075±0,0002	0,534±0,12	891±248
Хронічна хвороба нирок	153±25	0,0088±0,0027	0,386±0,07	157±28	0,0086±0,0019	0,365±0,14	941±107

* $P \leq 0,05$ відносно донорів. τ – лаг-період процесу зсідання плазми крові (с – секунди); V_1 – швидкість латеральної асоціації протофібрил, H – максимальне поглинання фібринового згустку (о.о. – оптичні одиниці поглинання світла при 405 нм); L – час напівлізису згустку.

Виявлено подовження лаг-періоду утворення фібринового згустку хворих із патологіями тазостегнового суглобу, інфарктом міокарду та інсультом в 1,5, 2,3 та 7,2 рази відповідно, що вказувало на гальмування швидкості утворення тромбіну на внутрішньому шляху зсідання в умовах *in vitro* (Рис. 3).

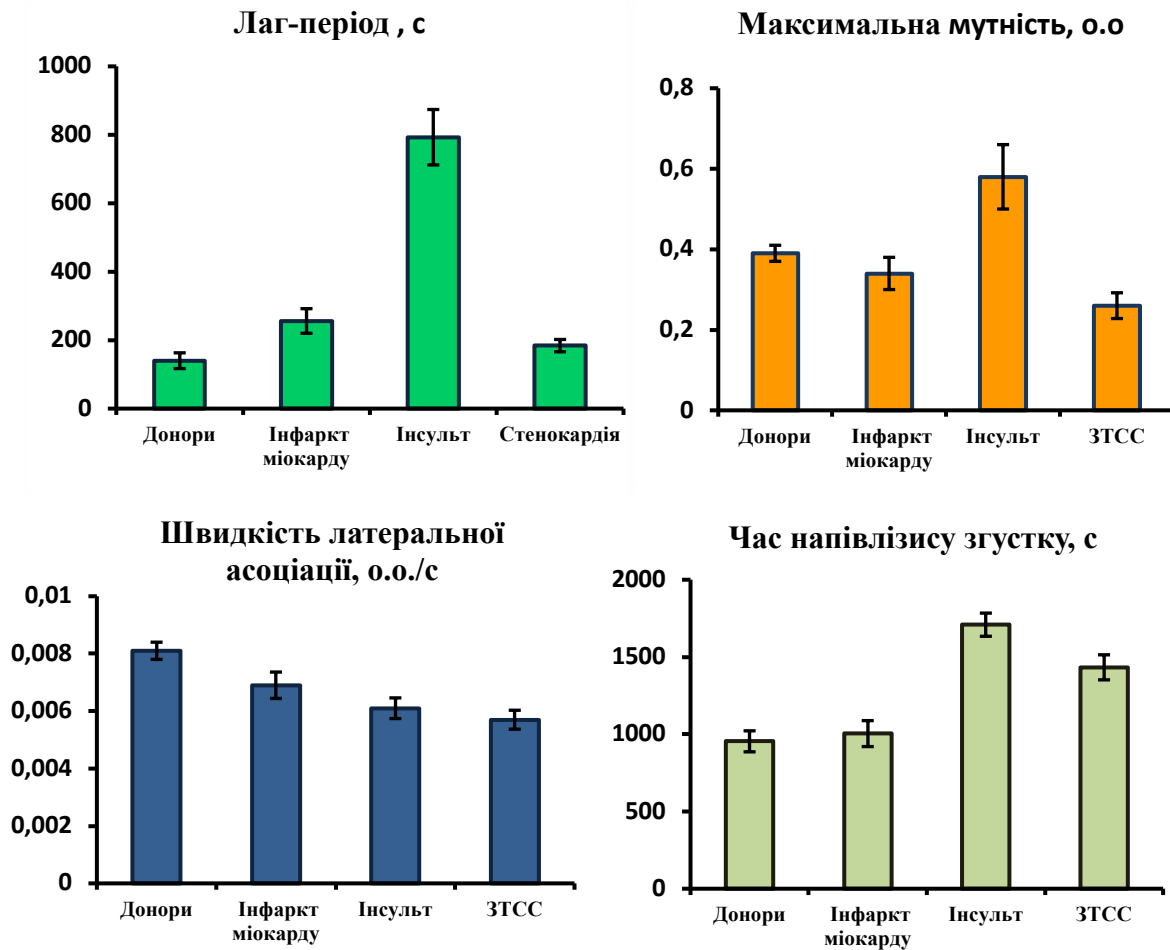


Рис. 3. Лаг-період формування згустку, максимальна мутність згустку, швидкість латеральної асоціації протофібрил та час напівлізису згустку в плазмі крові донорів (n=10) і хворих на інфаркт міокарду (n=25), інсульт (n=10) та за захворювань тазостегнового суглобу (n=8), * $P \leq 0,05$ відносно донорів.

За інших патологій значного подовження лаг-періоду не виявлено. Також при інсульті у 1,5 рази зростала максимальна мутність згустку. Зростання мутності згустку пов'язано, очевидно, з включенням до згустку таких протеїнів плазми крові як фібронектин, фактор фон Віллебранда, альбумін. При інфаркті міокарду максимальна мутність згустку у присутності t-PA в середньому на 25% менша такої у його відсутності і менша за таку донорської плазми. Мутність згустків у плазмі крові пацієнтів з ЗТСС менша за норму. Швидкість латеральної асоціації протофібрил при ЗТСС знижено, а час напівлізису згустків у цих пацієнтів подовжено, що вказувало на збільшення концентрації інгібіторів фібринолітичної системи в плазмі крові.

Визначення складових гемостатичного потенціалу (ЗП, ЗГП і ФП) та їх співвідношення (Табл. 2) показало, що у хворих на інсульт величина ЗП і ЗГП відповідно на 57 і на 55% більша таких показників у донорів, а ФП зростав на 63%. З іншого боку, аналіз відношення ЗП до ФП вказував на те, що у пацієнтів баланс між системою зсідання крові та фібринолізу наближається до фізіологічної норми (Рис. 4), відповідно 4,08 і 4,13. У плазмі крові хворих на ЗТСС величина ЗП і ЗГП на 28 і 31% перевищувала норму, а ФП зростав на 24%. Проте відношення ЗП/ФП залишалося в межах норми (Табл.2).

Таблиця 2. Параметри гемостатичного потенціалу в плазмі крові донорів (n=10) та пацієнтів, хворих на інфаркт міокарду, (n=25), інсульт (n=10), ЗТСС (n=8), стеноз аорти (n=51), стенокардію (n=47), хронічну хворобу нирок (n=88).

Плазма крові	ЗП, о.о.*с	ЗГП, о.о.*с	ФП, о.о.*с	ЗП/ ЗГП	ЗП/ ФП	ЗГП/ ФП
Донори	376±13	285±19	91±7	1,32±0,12	4,13±0,28	3,13±0,11
Інфаркт міокарду	281±168	170±65	112±42	1,65±0,23	2,51±0,22*	1,52±0,24
Інсульт	590±93*	443±77*	148±90*	1,33±0,19	4,0 ±0,33	3,0±0,23
ЗТСС	482±53*	374±35*	113±42*	1,28± 0,17	4,26±0,25	3,3±0,19
Стеноз	423±85	320±54	104±61	1,33±0,13	4,71±0,26*	3,7±0,15*
Стенокардія	384±68	307±42	95±59	1,19±0,8	4,95±0,65 *	3,82±0,71*
Хронічна хвороба нирок	303±59	208±41	98,9±38,9	2,33±0,12*	3,1±0,15*	1,46±0,07*

*P≤0,05 відносно донорів.

Знайдено, що баланс між системою зсідання крові та фібринолізу підтримувався у плазмі крові хворих на ЗТСС в межах норми. За інфаркту міокарда та хронічної хвороби нирок (2,5±1,3 та 3,1±0,5 відповідно) має місце зміщення рівноваги у бік фібринолізу. У пацієнтів зі стенокардією та стенозом виявлено групу ризику, в якій спостерігалось зміщення балансу у бік тромбоутворення (ЗП/ФП ≥5,1).

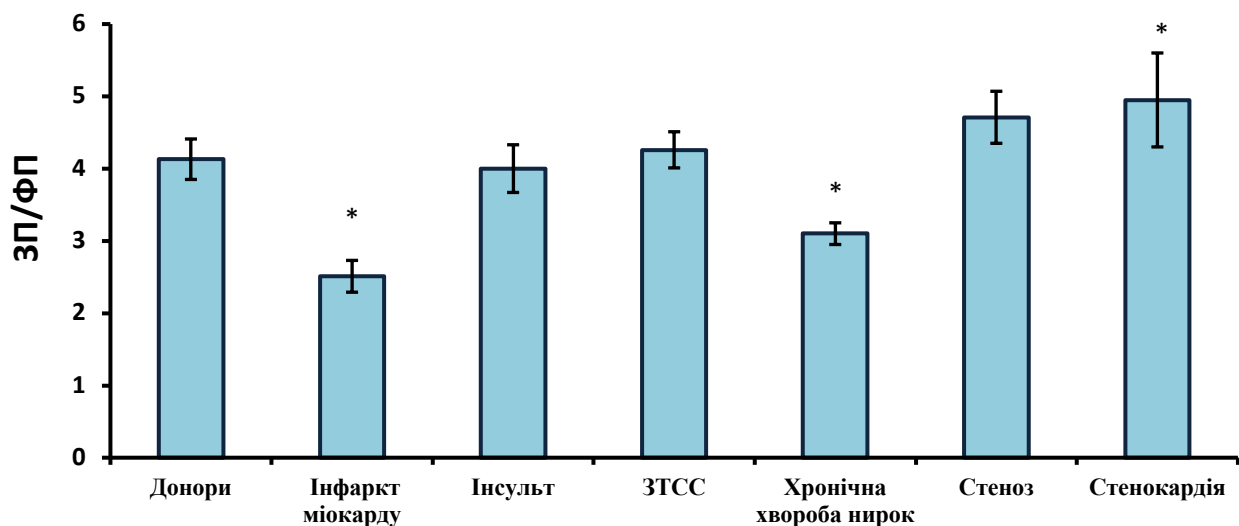


Рис. 4. Відношення потенціалу зсідання (ЗП) та фібринолітичного потенціалу (ФП) в плазмі крові донорів (n=10) та пацієнтів, хворих на інфаркт міокарду, (n=25), інсульт (n=10), ЗТСС (n=8), стеноз аорти (n=51), стенокардію (n=47), хронічну хворобу нирок (n=88).

*P≤0,05 відносно донорів.

Визначення рівня молекулярних маркерів стану системи гемостазу в плазмі крові донорів та пацієнтів, хворих на інфаркт міокарду, інсульт, стеноз аорти, стенокардію, хронічну хворобу нирок та ЗТСС.

Визначення концентрації розчинного фібрину, D-димеру, протеїну С та фібриногену в плазмі крові донорів та пацієнтів, хворих на інфаркт міокарду, інсульт, ЗТСС, стеноз аорти, стенокардію і хронічну хворобу нирок дозволило встановити, що за інфаркту міокарду рівень фібриногену залишався в межах норми, а концентрації розчинного фібрину і D-димеру зростали відповідно на 57 і 72% (Табл. 3).

У плазмі крові хворих на інсульт рівень розчинного фібрину на 42%, а рівень D- димеру на 274% перевищували норму, що вказувало на високу активність фібринолітичної системи плазми крові *in vivo*.

У плазмі хворих на ЗТСС рівень фібриногену не перевищував норму. Проте рівень розчинного фібрину дещо (на 27%) перевищував норму, а D-димеру – на 85%, що вказувало на достатню активність фібринолітичної системи для підтримки балансу цих систем.

В плазмі хворих на стеноз, стенокардію і хронічну хворобу нирок виявлено підвищений рівень фібриногену і розчинного фібрину, що свідчило про наявність запалення і високий рівень активації системи зсідання крові. У хворих на інфаркт міокарду, інсульт та хронічну хворобу нирок була активована антикоагуляційна система протеїну С (Табл. 3).

Таблиця 3. Рівень молекулярних маркерів стану системи гемостазу в плазмі крові донорів та пацієнтів, хворих на інфаркт міокарду (n=25), інсульт (n=10), ЗТСС (n=8), стеноз аорти (n=51), стенокардію (n=47), хронічну хворобу нирок (n=88).

Плазма крові	Фібриноген, мг/мл	Розчинний фібрин, μг/мл	D-димер, нг/мл	Протеїн С, %
Донори	2,8 ±0,36	2,6±0,67	62 ±16	100
Інфаркт міокарду	3,0±0,83	4,0± 2.3	107±77	81,4±19,1
Інсульт	н/в	3.7± 0.7	171±157	85,7±20,4
ЗТТС	3,5±1.1	4,1± 2,8	179±135	н.в
Стеноз	4,26±1,46	13,0±31,5*	49,0±51,0	93,9±18,5
Стенокардія	4,4±1,37	7,0±13,8*	60,5±130,0	93,3±16,1
Хронічна хвороба нирок	4,15±0,17*	3,7±1,8	75,3±68,6	81,7±1,7*

*P≤0,05 (відносно донорів).

При запальному процесі в плазмі крові хворих в першу чергу активується система зсідання крові завдяки появі в ній мікроезигул, що містять тканинний фактор – ініціатор зовнішнього шляху зсідання крові [Tanaka, K.A., et al, 2009]. Відомо, що основним молекулярним маркером її активації і продуктом є розчинний фібрин. Розчинний фібрин знаходиться в плазмі крові у вигляді коротких олігомерів, в яких молекули desA фібрину і його X-фрагментів ковалентно прошиті між собою по γ-ланцюгах [Луговской Е.В. і ін., 2006]. Олігомери desA-фібрину не здатні стимулювати активацію плазміногену t-РА. Вважається, що D-фрагменти утворюються в капілярах, де швидкість крові на два-три порядки падає, і олігомери фібрину асоціюють в мікрозгустки, на поверхні яких формується активаторний комплекс плазміноген-t-РА з утворенням плазміну, що руйнує мікрозгустки з вивільненням D-димеру. Тому D-димер є маркером активації як системи зсідання крові, так і системи фібринолізу. Слід відмітити, що відношення концентрацій розчинного фібрину та D-димеру розглядається як важливий показник загрози тромбоутворення при хірургічних втручаннях.

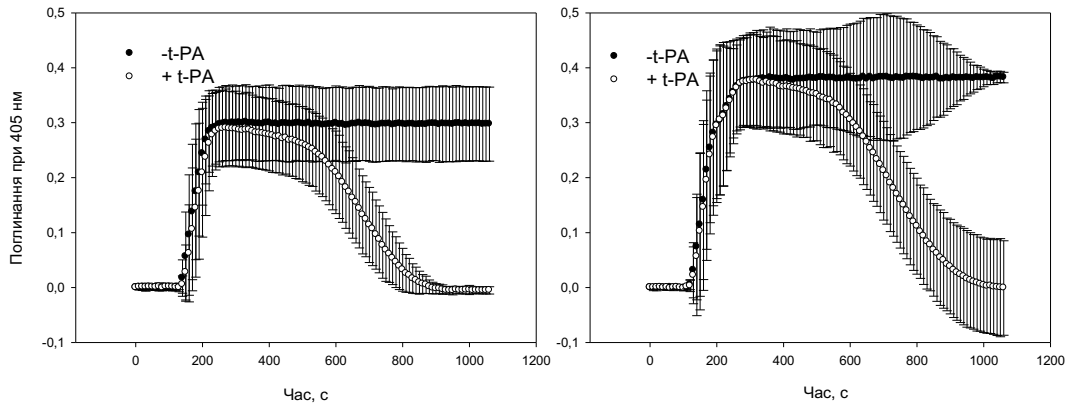


Рис. 5. Турбідиметричні криві зсідання плазми крові чоловіків (ліворуч) та жінок (праворуч), активованої АЧТЧ-реагентом, з рівнем $sf < 3$ $\mu\text{г}/\text{мл}$ за відсутності та за присутності t-PA (15 чоловіків та 13 жінок).

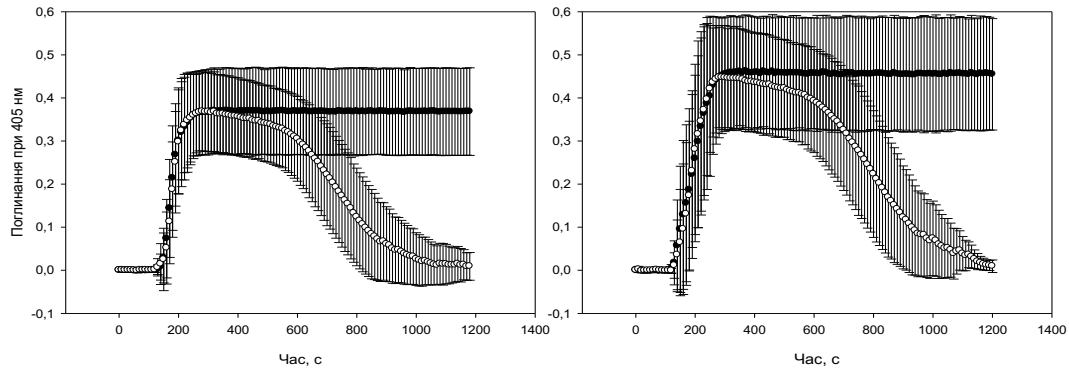


Рис. 6. Турбідиметричні криві зсідання плазми крові чоловіків (ліворуч) та жінок (праворуч) з рівнем $3 < sf < 4$ $\mu\text{г}/\text{мл}$, активованої АЧТЧ-реагентом, за відсутності та за присутності t-PA (25 чоловіків та 13 жінок).

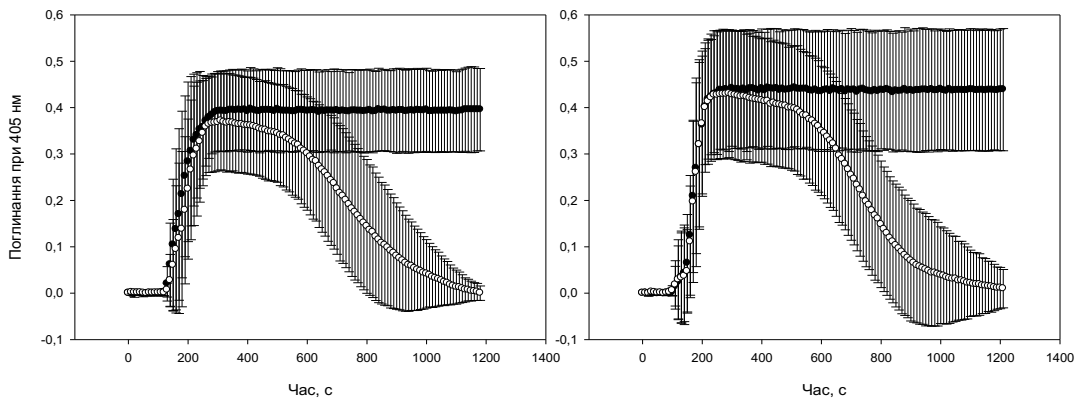


Рис. 7. Турбідиметричні криві зсідання плазми крові чоловіків (ліворуч) та жінок (праворуч), активованої АЧТЧ-реагентом, з рівнем $sf > 4$ $\mu\text{г}/\text{мл}$ за відсутності та за присутності t-PA (12 чоловіків та 10 жінок).

Оскільки рівень розчинного фібрину у пацієнтів коливався в значних межах, ми додатково розподілили пацієнтів з хронічною хворобою нирок у три групи за його величиною, яка відповідала рівню активації системи зсідання крові хворого: а) пацієнтів з концентрацією розчинного фібрину рівною або меншою за норму $sf \leq 3$ $\mu\text{г/мл}$; б) з концентрацією, близькою до норми – $3 < sf < 4$ $\mu\text{г/мл}$, і з підвищеним рівнем концентрації – $sf > 4$ $\mu\text{г/мл}$ (Табл. 4, Рис. 5, 6, 7).

Таблиця 4. Параметри процесу формування та гідролізу фібринового згустку в плазмі крові донорів ($n=10$) та пацієнтів з хронічною хворобою нирок, які проходять процедуру гемодіалізу. Кожна група пацієнтів (чоловіки – $n=52$, жінки – $n=36$, та усі пацієнти – $n=88$) розділена на три підгрупи в залежності від концентрації розчинного фібрину в плазмі крові: 15 чоловіків та 13 жінок з концентрацією $sf < 3$ $\mu\text{г/мл}$; 25 чоловіків та 13 жінок з концентрацією $3 \mu\text{г/мл} < sf < 4 \mu\text{г/мл}$; 12 чоловіків та 10 жінок з концентрацією $sf > 4 \mu\text{г/мл}$ ($X \pm m$).

Вміст sf, $\mu\text{г/мл}$	За відсутності t-PA		За присутності t-PA			
	τ , с	H, о.о.	τ , с	H, о.о.	L, с	H ₀ , о.о.
Донори	140 \pm 23	0,381 \pm 0,052	145 \pm 23	0,375 \pm 0,043	748 \pm 37	0,332 \pm 0,153
чоловіки						
sf<3	150 \pm 25	0,339 \pm 0,088	155 \pm 27	0,333 \pm 0,09	699 \pm 68	0,374 \pm 0,144
3<sf<4	154 \pm 20	0,384 \pm 0,104	158 \pm 19	0,383 \pm 0,1	746 \pm 97	0,370 \pm 0,146
sf>4	157 \pm 37	0,397 \pm 0,090	162 \pm 37	0,367 \pm 0,11	758 \pm 138	0,362 \pm 0,099
жінки						
sf<3	153 \pm 21	0,302 \pm 0,070	160 \pm 25	0,291 \pm 0,070	763 \pm 60	0,304 \pm 0,169
3<sf<4	160 \pm 42	0,434 \pm 0,140	159 \pm 37	0,421 \pm 0,130	786 \pm 116	0,361 \pm 0,184
sf>4	148 \pm 23	0,440\pm0,035*	153 \pm 24	0,435\pm0,045*	776 \pm 144	0,339 \pm 0,158
	n.s.	P < 0,001	n.s.	P < 0,001	n.s.	n.s.

* $P \leq 0,05$ відносно донорів. τ – лаг-період процесу зсідання крові (с – секунди); H – максимальне поглинання фібринового згустку); L – час напівлізису згустку; H₀ – початкова мутність плазми; sf – розчинний фібрин.

Для системи визначення параметрів гемостатичного потенціалу плазми крові *in vitro* такий розподіл пацієнтів показав наступне: а) лаг-період формування згустку з ростом ступеня активації системи зсідання не змінився; б) величина згустку за мутністю у чоловіків не зростала за відсутності і присутності t-PA, а у жінок достовірно зростала відповідно у 1,46 та 1,49 разів, що можна пояснити більшою активацією FXIII у жінок, ковалентним включенням інших протеїнів у згусток і підвищеним рівнем розчинного фібрину; в) час напівлізису згустку за присутності t-PA у чоловіків не змінювався, в той час як у жінок час напівлізису згустку достовірно збільшувався в 1,19 разів, що вказувало на більшу концентрацію інгібіторів фібринолізу у згустку плазми крові жінок; д) величини ЗП та ФП у чоловіків не змінювалися, а ЗГП зростав відповідно у 1,57 рази, у жінок ЗП та ЗГП зростали відповідно у 1,76, 1,82 рази, що також вказувало на більшу товщину фібрил згустку у плазмі крові жінок, порівняно з чоловіками. ФП в обох групах не достовірно змінювався, однак відношення ЗП/ФП вказувало на зміщення балансу в напрямку підвищення активності фібринолізу в плазмі крові хворих.

Таблиця 5. Параметри гемостатичного потенціалу плазми крові донорів (n=10), та хворих на хронічну хворобу нирок. Кожна група пацієнтів (чоловіки – n=52, жінки – n=36, усі пацієнти – n=88) розділена на три підгрупи в залежності від концентрації розчинного фібрину в плазмі крові: 15 чоловіків та 13 жінок з концентрацією $sf < 3$ $\mu\text{г/мл}$; 25 чоловіків та 13 жінок з концентрацією $3 \mu\text{г/мл} < sf < 4 \mu\text{г/мл}$; 12 чоловіків та 10 жінок з концентрацією $sf > 4 \mu\text{г/мл}$ ($X \pm m$).

	ЗП, о.о.*с	ЗГП, о.о.*с	ФП, о.о.*с	ЗП/ЗГП	ЗП/ФП	ЗГП/ФП
Донори	345 \pm 17	257,5 \pm 15	88,5 \pm 11	1,34 \pm 0,02	4.12 \pm 0,08	3,13 \pm 0,05
чоловіки						
sf<3	243\pm45*	169\pm60*	79 \pm 39	1,44 \pm 0,14	3,1\pm0,25*	2,14 \pm 0,25
3<sf<4	305 \pm 81	213 \pm 78	97 \pm 62	1,43 \pm 0,17	3,14\pm0,34*	2,2\pm0,21*
sf>4	323 \pm 70	265 \pm 68	122 \pm 74	1,22 \pm 0,18	2,65\pm0,27*	2,17\pm0,2*
	n.s.	P<0,01	n.s.			
жінки						
sf<3	203 \pm 21	138 \pm 39	74 \pm 45	1,47 \pm 0,15	2,7 \pm 0,36	1,86 \pm 0,27
3<sf<4	367 \pm 72	251 \pm 76	116 \pm 72	1,46 \pm 0,22	3,15 \pm 0,5	2,2 \pm 0,35
sf>4	358 \pm 61	241 \pm 56	107 \pm 46	1,42 \pm 0,17	3,35 \pm 0,3	2,34 \pm 0,21
	P<0,01	P<0,01	n.s.			

*P \leq 0,05 відносно донорів. ЗП, ЗГП, ФП – потенціал зсідання плазми крові, загальний гемостатичний, фібринолітичний потенціал плазми крові.

Для молекулярних маркерів системи гемостазу плазми крові, що відповідає стану системи гемостазу на момент забору крові, встановлено, що: а) рівень розчинного фібрину і D-димеру у чоловіків зростав у 1,96 та 1,71 разів, а у жінок відповідно у 2,64 і 5 разів у групах з рівнем $sf > 4 \mu\text{г/мл}$, що свідчило про більшу активність коагуляційної і фібринолітичної ланок гемостазу у жінок порівняно з такими у чоловіків; б) відношення D-димер/sf у чоловіків дещо зменшувалося відповідно від 18 при $sf < 3 \mu\text{г/мл}$ до 15,7 $\mu\text{г/мл}$ при $sf > 4 \mu\text{г/мл}$, тоді як у жінок зростало від 15,2 до 28,8, що підтверджувало наше припущення про більшу ефективність і збалансованість систем зсідання і фібринолізу у жінок; в) рівень фібриногену у чоловіків у групах з $sf < 3 \mu\text{г/мл}$ та $sf > 4 \mu\text{г/мл}$ знаходиться у межах норми, а при $3 \mu\text{г/мл} < sf < 4 \mu\text{г/мл}$ дещо перевищував її, а при $sf > 4 \mu\text{г/мл}$ він знову дещо знижувався; враховуючи те, що фібриноген є протеїном гострої фази, можна припустити, що у чоловіків при $sf < 3 \mu\text{г/мл}$ запалення слабо виражене, при $3 < sf < 4 \mu\text{г/мл}$ має місце його початкова стадія, а при $sf > 4 \mu\text{г/мл}$ – більш активна стадія, оскільки виявлено ефект “споживання” протеїнів системи гемостазу на прикладі фібриногену; г) показники системи протеїну С у чоловіків і у жінок змінювалися випадково, але у обох групах можна відмітити підвищену активність системи протеїну С.

Наведені дані дозволяють припустити, що при $sf > 4 \mu\text{г/мл}$ у жінок зростання концентрації фібрину контролює переважно фібринолітична система (рівень D-димеру ~ 190 нг/мл, у чоловіків – 77 нг/мл), а у чоловіків – система протеїну С, на що вказує більш високий рівень споживання протеїну С у чоловіків у порівнянні з жінками (Табл. 6).

Таблиця 6. Рівень молекулярних маркерів стану системи гемостазу в плазмі крові донорів і хворих на хронічну хворобу нирок (n=88), (чоловіки – n=52, жінки – n=36, усі пацієнти – n=88) 15 чоловіків та 13 жінок з концентрацією $sf < 3$ $\mu\text{г/мл}$; 25 чоловіків та 13 жінок з концентрацією $3 \mu\text{г/мл} < sf < 4 \mu\text{г/мл}$; 12 чоловіків та 10 жінок з концентрацією $sf > 4 \mu\text{г/мл}$ ($X \pm m$).

	Розчинний фібрин, $\mu\text{г/мл}$	D-димер, нг/мл	Фібриноген, мг/мл	Протеїн С, %
Донори	2,6 \pm 0,67	62 \pm 16	2,8 \pm 0,36	100
чоловіки				
sf < 3	2,5 \pm 0,32	45 \pm 30	3,95 \pm 1,18	82,7 \pm 15
3 < sf < 4	3,5 \pm 0,28	69 \pm 27	4,50 \pm 1,0	83,2 \pm 15
sf > 4	4,9\pm1,2*	77\pm37*	3,86 \pm 0,83	77,0\pm12*
жінки				
sf < 3	2,5 \pm 0,36	38 \pm 24	3,9 \pm 1,3	78,4 \pm 15
3 < sf < 4	3,6 \pm 0,3	62 \pm 39	4,4 \pm 1,4	80,8 \pm 16
sf > 4	6,6\pm3,4*	190\pm137*	4,0 \pm 1,4	81,6 \pm 21

* $P \leq 0,05$ відносно донорів.

Таким чином, підвищення концентрації розчинного фібрину в плазмі крові хворих, яке є маркером активації системи зсідання і пов'язаних з нею системи фібринолізу і протеїну С, супроводжується також змінами величин параметрів у системі визначення гемостатичного потенціалу і в системі молекулярних маркерів гемостазу. Загалом ці зміни спрямовано на підвищення здатності системи гемостазу хворих формувати у плазмі крові більший за розміром і стабільністю фібриновий згусток. З іншого боку, більш тонка диференціація хворих за ступенем активації системи зсідання крові дозволяє отримати більше інформації для оцінки стану системи гемостазу і прогнозування напрямку його зміни у хворих.

Отримані дані також свідчили, що параметри стану системи гемостазу у хворих на хронічну хворобу нирок, знайдені шляхом визначення величини загального гемостатичного потенціалу в плазмі крові *in vitro* і концентрацій молекулярних маркерів, характерних для стану *in vivo* на момент забору крові, у жінок за величиною більші, ніж у чоловіків, і вказують на більшу активність системи гемостазу у жінок.

Аналіз кореляції між параметрами системи гемостазу і концентраціями маркерів стану системи гемостазу.

Розподіл пацієнтів по групах в залежності від ступеня активації системи зсідання крові показав, що з підвищенням концентрації розчинного фібрину в плазмі крові хворого зростають величини інших параметрів ЗГП і концентрацій молекулярних маркерів системи гемостазу. В зв'язку з цим постало питання про наявність і силу взаємозв'язку окремих параметрів цих систем між собою в межах кожної системи, між системами і в залежності від стажу гемодіалізу. З цією метою було проведено лінійний кореляційний аналіз за Пірсоном зв'язку між параметрами обох систем (Табл. 7).

Було встановлено, що стаж гемодіалізу не пов'язаний з величинами параметрів жодної із систем, оскільки значення отриманих коефіцієнтів кореляції є недостовірні, $p > 0,05$.

Аналіз зв'язку між параметрами системи ЗГП та системою молекулярних маркерів показав, що величини коефіцієнтів кореляції для всіх пар групи "усі пацієнти" (88 пацієнтів, із них 52 чоловіки і 36 жінок) показали наявність середнього, слабкого і дуже слабкого зв'язку (Табл. 7). Однак для тих пар параметрів у підгрупах чоловіків і жінок, де було виявлено кореляційний зв'язок, значення коефіцієнтів кореляції суттєво зростали зі зростанням

концентрацій розчинного фібрину від слабкого ($<0,5$) і середнього ($0,5-0,7$) до сильного ($>0,7$) і дуже сильного ($>0,9$) за винятком пар параметрів ЗГП – фібриноген, ФП – фібриноген, Н – фібриноген, для жінок. Другою важливою особливістю у групах чоловіків виявилася відсутність кореляції у парах параметрів ЗГП – протеїн С, ЗП – протеїн С, ФП – фібриноген, ФП – протеїн С і фібриноген – протеїн С. У цих парах у підгрупах жінок спостерігали середню, сильну і дуже сильну кореляцію. Важливим фактом була наявність сильної негативної кореляції у жінок між концентрацією протеїну С і такими параметрами, як ЗГП, ЗП, ФП та фібриноген. У чоловіків кореляцію спостерігали для пар параметрів Н – фібриноген, ЗП – фібриноген, ЗГП – фібриноген відповідно середнього, сильного і дуже сильного ступеня зв'язку. Слід звернути увагу на те, що у цих парах параметрів не виявлено кореляції у групах чоловіків при перших двох концентраціях розчинного фібрину, а саме $sf < 3$ та $3 < sf < 4$, коли запальний процес у хворих, ймовірно, знаходиться у стадії ремісії.

Таблиця 7. Коефіцієнти кореляції між величинами параметрів гемостатичного потенціалу, розчинного фібрину, D-димеру, фібриногену та протеїну С в плазмі крові пацієнтів з хронічними хворобами нирок (чоловіки – $n=52$, жінки – $n=36$, усі пацієнти – $n=88$).

Показники		Усі пацієнти	$sf < 3$	$3 < sf < 4$	$sf > 4$
ЗГП - фібриноген	Усі пацієнти	0,45	0,3	0,37	0,72
	Чоловіки	0,32	n.s.	n.s.	0,91*
	Жінки	0,63	0,5	0,54	0,64
ЗГП - протеїн С	Жінки	-0,51	n.s.	n.s.	-0,81*
ЗП - фібриноген	Чоловіки	n.s.	n.s.	0,49	0,78*
	Жінки	0,65	0,54	0,65	0,32
ЗП - протеїн С	Жінки	-0,25	-0,14	-0,70	-0,85*
ФП - фібриноген	Жінки	0,61	0,52	0,60	0,68
ФП - протеїн С	Жінки	-0,51	-0,3	n.s.	-0,93*
фібриноген - протеїн С	Жінки	-0,42	n.s.	n.s.	-0,73*
розчинний фібрин - D-димер	Чоловіки	0,51	n.s.	n.s.	0,62

* $P \leq 0,05$ відносно донорів; sf – розчинний фібрин.

Парний кореляційний аналіз за методом Пірсона між величинами параметрів гемостатичного потенціалу та концентраціями молекулярних маркерів у хворих на хронічну хворобу нирок, проведений у групах пацієнтів зі зростаючим рівнем розчинного фібрину ($sf \leq 3$, $3 \leq sf \leq 4$ і $sf \geq 4$ $\mu\text{г/мл}$), виявив зростання сили зв'язку до сильного та дуже сильного між вмістом протеїну С та фібринолітичним потенціалом (-0,93), потенціалом зсідання (-0,81) та фібриногеном (-0,73) у жінок.

В системі параметрів молекулярних маркерів виявлено сильний негативний кореляційний зв'язок тільки між концентраціями фібриногену і протеїну С. Важливо відмітити, що концентрація D-димеру не корелювала з іншими параметрами при всіх концентраціях розчинного фібрину. Очевидно, що рівень D-димеру регулюється іншими факторами, безпосередньо не пов'язаними з концентрацією розчинного фібрину. Ймовірно, що одним із цих факторів можуть бути мікрозгустки, які є стимулятором активації плазміногену t-РА і утворюються в системі мікроциркуляції. Фактори, що впливають на їх формування, не пов'язані з досліджуваними системами.

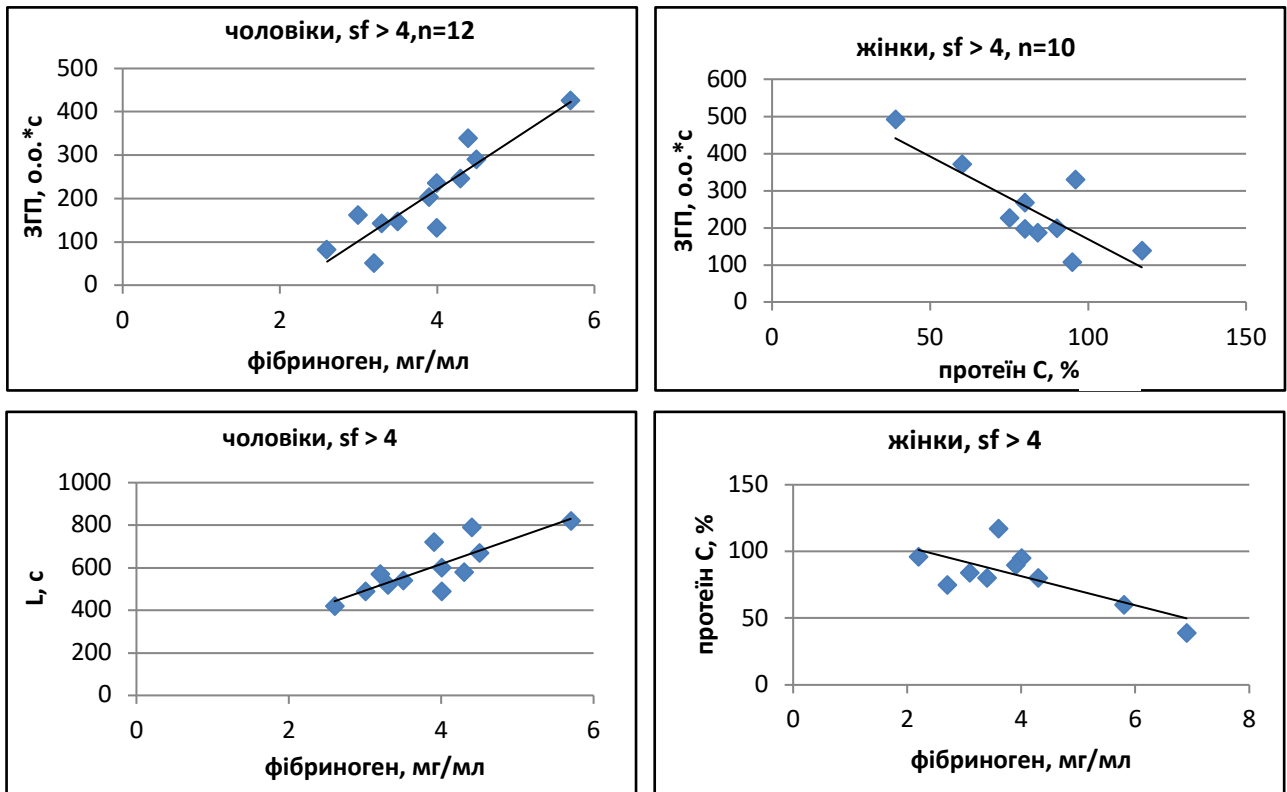


Рис. 8. Графіки кореляційної залежності між параметрами гемостатичного потенціалу і концентраціями молекулярних маркерів системи гемостазу плазми крові хворих на хронічну хворобу нирок: для чоловіків ЗП – фібриноген (А) та L-фібриноген (В) і для жінок ЗП – протеїн С (С) та протеїн С – фібриноген (D). L – час напівлізису згустку ЗП – загальний гемостатичний потенціал, sf – розчинний фібрин.

Таким чином, проведений парний кореляційний аналіз за методом Пірсона між величинами параметрів гемостатичного потенціалу та концентраціями молекулярних маркерів у хворих на хронічну хворобу нирок, у групах пацієнтів зі зростаючим рівнем розчинного фібрину ($sf \leq 3$, $3 \leq sf \leq 4$ і $sf \geq 4$ $\mu\text{г/мл}$) виявив зростання сили зв'язку до сильного та дуже сильного між вмістом протеїну С та ФП (-0,93), ЗП (-0,81) та фібриногеном (-0,73) у жінок, часом напівлізису згустку, ЗП та вмістом фібриногену (0,73 та 0,91) у чоловіків (Рис. 8). Зростання негативного кореляційного зв'язку пар за участю протеїну С і параметрів гемостатичного потенціалу і фібриногену у жінок, вказує на те, що і система протеїну С і система фібринолізу сильно активуються при рівні активації системи зсідання, що відповідає зростанню концентрації $sf > 4$ $\mu\text{г/мл}$. Проте у жінок виявлено середній за ступенем зв'язок між ЗП і фібриногеном, що вказує на слабку регуляцію протеїном С активації фібриногену у фібрин під дією тромбіну. Як відомо, розчинний фібрин є транспортером тромбіну в кровотоці, що дозволяє “slow” формі тромбіну дисоціювати в мікроциркуляції і зв'язуватися з тромбомодуліном, викликаючи активацію протеїну С, який в свою чергу зв'язаний з рецептором протеїну С. Наявність в плазмі крові жінок інгібітору протеїну Са, перешкоджає активації протеїну С тромбіном, що призводить до ще більшого зростання концентрації розчинного фібрину. При таких концентраціях розчинного фібрину зростає ймовірність утворення мікрозгустків, які стимулюють активацію системи фібринолізу і своє розчинення під дією плазміну з утворенням D-димеру фрагментів (Табл. 6). Загальна схема взаємодії системи зсідання, фібринолізу і протеїну С в системі гемостазу показана на схемі (Рис. 9).

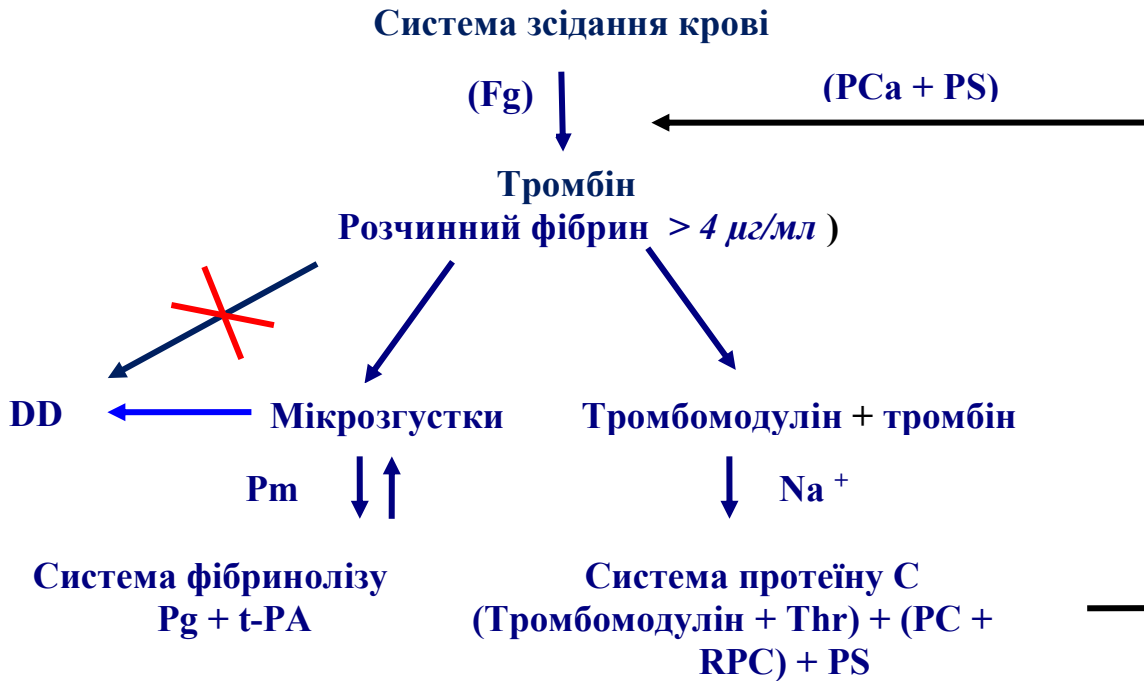
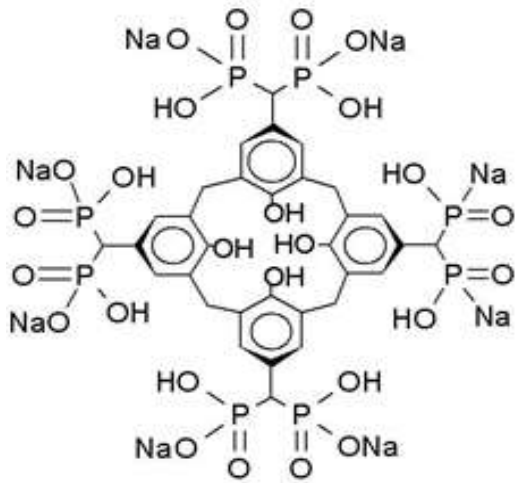


Рис. 9. Схема утворення і взаємозв'язків молекулярних маркерів складових гуморальної системи гемостазу плазми крові пацієнтів з хронічною хворобою нирок, Vd стадії, при концентрації розчинного фібрину > 4 μg/ml. Pg – плазміноген, Pm – плазмін, Thr – тромбін, PS – протеїн S, RPC – ендотеліальний рецептор протеїну С; PCa – протеїн С активований.

Дія калікс[4]арену С-145 на формування і гідроліз фібринового згустку в плазмі крові *in vitro*. Дослідження дії калікс[4]арен-метилен бісфосфонових кислот на полімеризацію фібрину дозволило визначити ряд сполук калікс[4]аренового ряду, які специфічно інгібували формування тривимірної сітки фібрину – каркасу тромбу. Виявлені антизсідальні властивості калікс[4]арену С-192 та його натрієвої солі С-145 дозволили розглядати їх як перспективні сполуки для дизайну нового класу антитромботичних засобів, здатних специфічно інгібувати утворення тромбів завдяки пригніченню полімеризації фібрину.

Оскільки метод визначення ЗГП є методом оцінки взаємодії між коагуляційною та фібринолітичною ланками гемостазу, його було обрано для оцінки ефектів С-145 на формування та гідроліз фібрину в плазмі крові.

Калікс[4]арен С-145 вносили до плазми крові у діапазоні концентрацій 1-100 μM, зсідання ініціювали АЧТЧ-реагентом і реєстрували турбідиметричні криві. Як показано на рис. 11, А, С-145 знижує оптичну густину згустку і подовжує лаг-період. Для оцінки ефекту С-145 на фібринолітичний потенціал плазми крові до реакційної суміші вносили додатково t-PA перед ініціацією зсідання. Формування та деградацію згустку оцінювали за турбідиметричною кривою (Рис. 11, В).



C-145

Рис. 10. Структурна формула натрієвої солі 5,11,17,23-біс(дигідроксифосфорил)-метилкалік[4]арену (калік[4]арену С-145).

Аналіз представлених на рисунках даних свідчить, що IC_{50} калікс[4]арену С-145 для часу напівлізису згустку відповідає $50 \mu\text{M}$, а для максимальної швидкості руйнування структури згустку в плазмі крові дорівнює $30 \mu\text{M}$. Ці концентрації калікс[4]арену С-145 одного порядку з IC_{50} для пригнічення процесу зсідання крові в тестах протромбіновий час (ПЧ) і АЧТЧ, що вказує на здатність калікс[4]арену С-145 одночасно інгібувати системи зсідання крові і фібринолізу.

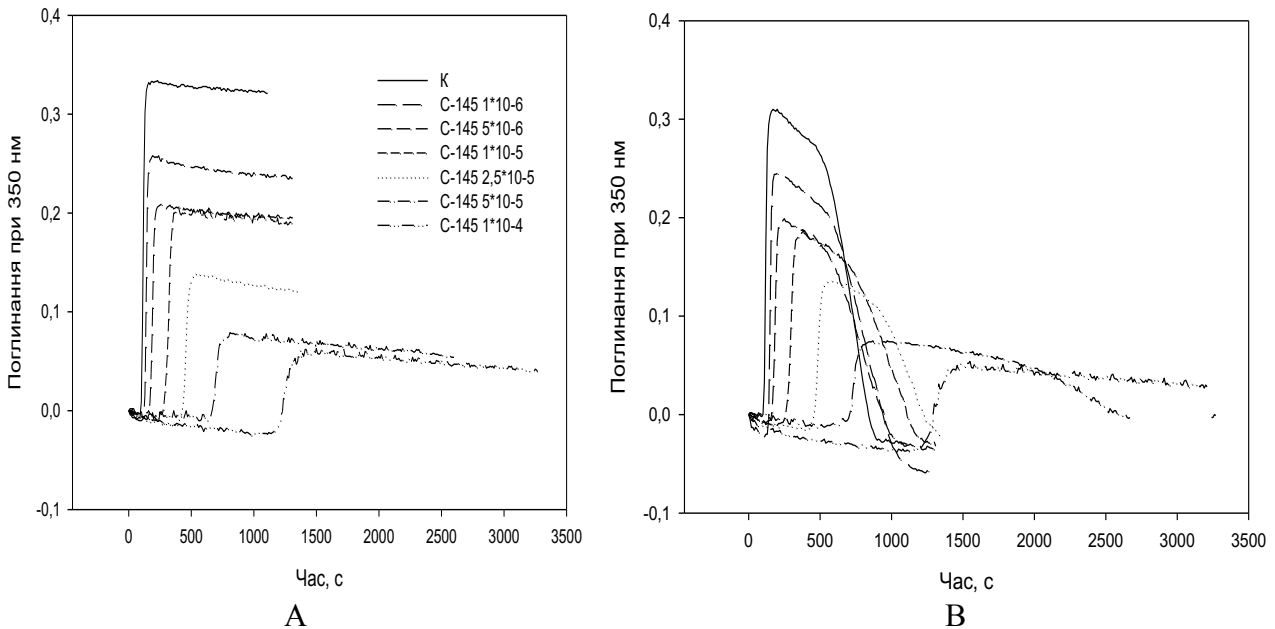


Рис. 11. Вплив зростаючих концентрацій калікс[4]арену С-145 ($1-100 \mu\text{M}$) на зсідання плазми крові, що активується АЧТЧ-реагентом за відсутності (А) та за присутності t-РА (В). Криві типового експерименту.

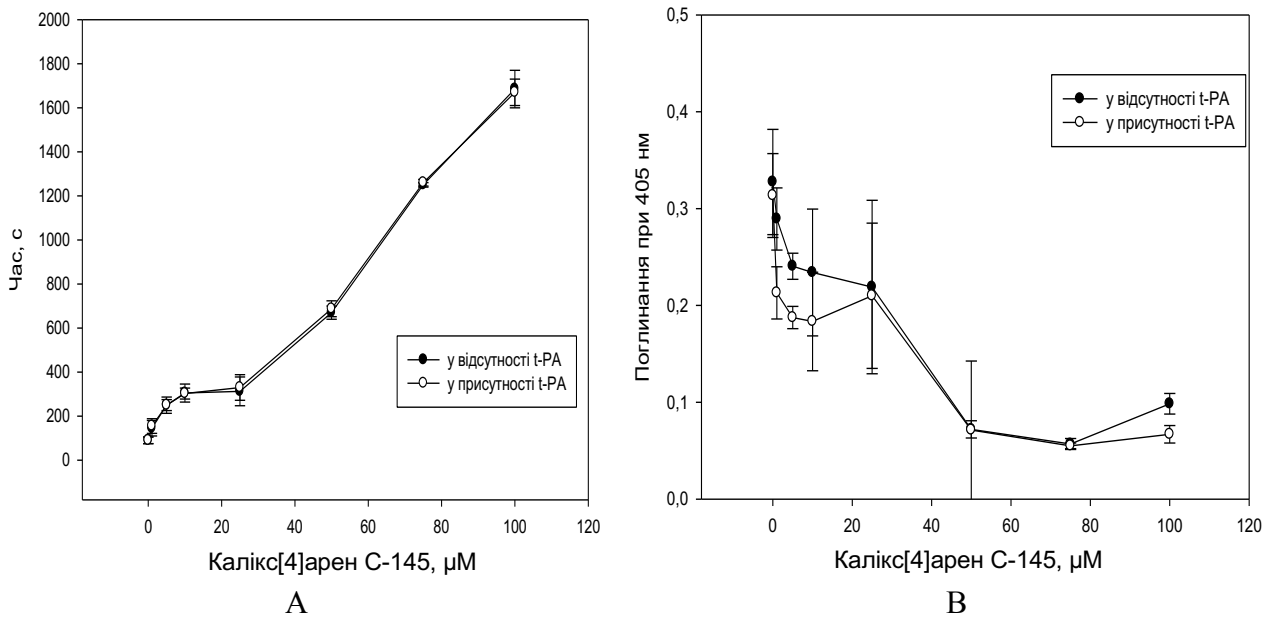


Рис. 12. Вплив зростаючих концентрацій калікс[4]арену С-145 від 1 до 100 µM на швидкість утворення і латеральної асоціації протофібрил у плазмі крові, що активується АЧТЧ-реагентом (А); вплив зростаючих концентрацій калікс[4]арену С-145 (1-100 µM) на максимальну мутність згустку плазми крові, що активується АЧТЧ-реагентом за присутності та за відсутності t-PA (В).

Показано, що ЗГП зменшувався за присутності 10 µM С-145 в 1,5 рази. Ми не спостерігали посилення інгібіторної дії С-145 зі збільшенням його концентрації. Це вказувало на те, що, незважаючи на сильну антикоагулянтну дію С-145, коагуляційна та фібринолітична ланки гемостазу зберігають за його присутності динамічну рівновагу.

Отже, аналіз даних, представлених на рис. 11 і 12, дозволяє зробити такі висновки: а) С-145 гальмує швидкість утворення протофібрил, зменшує товщину фібрил у присутності і у відсутності t-PA. Характер залежності інгібування латеральної асоціації протофібрил від концентрації С-145 вказує на наявність двох етапів процесу. Перший має $IC_{50} = 3,1 \pm 0,7 \mu M$. IC_{50} другого етапу потребує додаткового дослідження, оскільки при концентрації $>0,1 \mu M$ С-145 починає агрегувати; б) С-145 майже не впливає на швидкість латеральної асоціації протофібрил в обох системах, рис. 12 А і Б; в) С-145 зменшує величину ЗП, ЗГП і ФП плазми крові відповідно в 1,9, 1,6 і 4,1 рази, проте повністю не інгібує утворення полімерного фібрину в плазмі крові. Отримані дані вказують на інформативність методу гемостатичного потенціалу при дослідженні антикоагуляційних властивостей калікс[4]арену С-145.

Вплив гепаринів на процес зсідання крові і фібринолізу. Гепарин є природним антикоагулянтом, що синтезується в тучних клітинах організму. Хімічно він є полісахаридом глікозаміногліканом, який містить ділянки, утворені шістьма мономерами сульфатованих залишків N-ацетил-D-глюкозаміну і D-індуранонової кислоти, які повторюються. Механізм інгібуючої дії гепарину полягає в утворенні високоафінного комплексу з антитромбіном III, що змінює конформацію останнього і надає антитромбіну III здатності гальмувати дію майже усіх ензимів коагуляційного каскаду і в першу чергу – тромбіну і фактору Ха. Інгібування тромбіну гальмує утворення фібрину з фібриногену і тим самим блокує формування фібринового згустку – основи тромбу. Нашим завданням було з'ясувати вплив гепарину на процеси утворення і гідролізу згустку в плазмі крові, що утворюється під дією АЧТЧ-реагенту.

Вплив зростаючих від 0,025 до 0,1 IU/мл концентрацій гепарину на процес зсідання плазми крові представлено на Рис. 13, А. Гепарин значно подовжує час утворення

протофібрил, про що свідчить збільшення лаг-фази кривої утворення згустку. Повне інгібування процесу формування згустку має місце при концентрації гепарину більшої за 0,2 IU/мл, що відповідає концентрації 334 нМ, враховуючи $MW = 16000$ Da і притому активність – 187 IU/мг гепарину. Швидкість латеральної асоціації протофібрил також зменшується (Рис. 13, В).

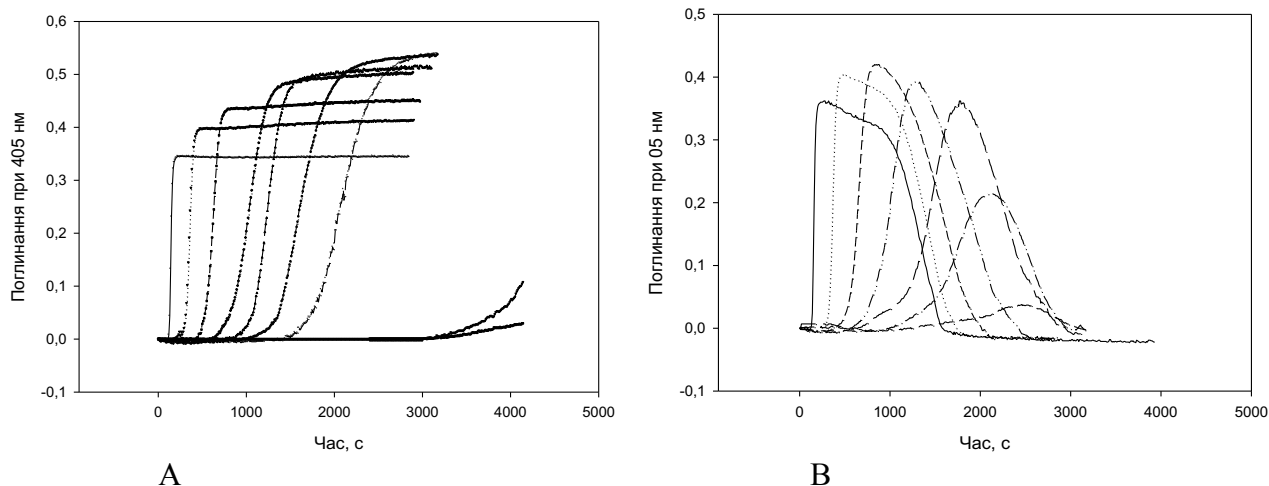


Рис. 13. Вплив зростаючих концентрацій гепарину від 0,025, 0,05, 0,075, 0,1, 0,125, 0,15, 0,175 до 0,2 IU/мл на формування згустку в плазмі крові, активованої АЧТЧ-реагентом за відсутності (А) та за присутності t-PA (В). Перша крива ліворуч на кожному рисунку є контрольною за відсутності гепарину.

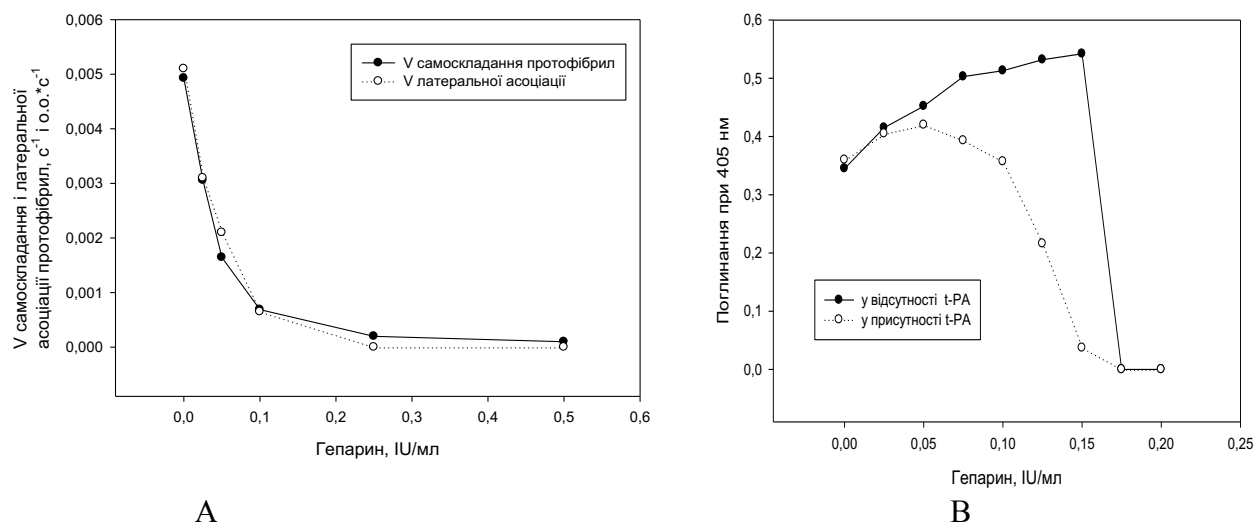


Рис. 14. Вплив зростаючих концентрацій гепарину на швидкість утворення і латеральної асоціації протофібрил у плазмі крові, що активується АЧТЧ-реагентом. IC_{50} для гепарину складає 6,2 нМ гепарину (А) для обох етапів формування згустку; вплив зростаючих концентрацій гепарину на максимальну мутність згустку плазми крові, що активується АЧТЧ-реагентом за присутності та за відсутності t-PA (В).

Слід звернути увагу на те, що криві інгібування швидкості утворення протофібрил і швидкості їх латеральної асоціації співпадають. Величина IC_{50} для обох стадій процесу зсідання плазми становить 6,2 нМ гепарину. Оскільки процеси утворення протофібрил і їх латеральної асоціації різняться між собою за механізмом, то можна припустити, що гепарин впливає на іншу стадію утворення згустку, якою є активація системи гемостазу, утворення тромбіну і його дія на фібриноген (Рис. 14, А). Величина мутності згустку в плазмі крові без доданого t-РА за присутності гепарину зростає паралельно зі зростанням його концентрації (Рис. 14, В). Цей факт разом з подовженням лаг-періоду вказує на збільшення товщини фібрил згустку, що сприяє підвищенню швидкості активації фібринолітичної системи та зростанню її ефективності при руйнування згустку.

Величини ЗП і ФП зростають з підвищенням концентрації гепарину до 0,1 IU/мл. Величина ЗГП в цьому діапазоні концентрацій не змінюється. При подальшому зростанні концентрації гепарину ЗГП зменшується майже до нуля, ЗП різко падає, а ФП не змінюється. Ці дані свідчать про те, що гепарин зменшує ЗП і збільшує ФП плазми крові.

Таким чином, отримані дані вказують, що інгібування процесу утворення фібринового згустку в плазмі крові відбувається як під дією гепарину, який у комплексі з антитромбіном III блокує активність ензимів каскаду зсідання крові у відсутності t-РА, так і завдяки впливу на структуру згустку, що сприяє зростанню ефективності дії фібринолітичної системи плазми крові у присутності t-РА. Дію останньої гепарин значно посилює.

ВИСНОВКИ

В роботі представлено результати використання моделі формування і гідролізу фібринового згустку, що лежить в основі методу визначення загального гемостатичного потенціалу, для характеристики стану системи гемостазу, балансу, активності і ступеня взаємозв'язку систем зсідання крові, фібринолізу і протеїну С в плазмі крові людини в нормі та за різних патологій, а також за дії лікарських та екзогенних агентів. Параметри гемостатичного потенціалу, що характеризують стан і баланс систем зсідання і фібринолізу, доповнені параметрами турбідиметричної кривої утворення і гідролізу фібринового згустку, що разом з концентрацією молекулярних маркерів – фібриногену, розчинного фібрину, D-димеру і протеїну С – дозволяють більш детально описати стан, процеси активації і рівень активності системи гемостазу плазми крові в цілому в умовах *in vitro* і прогнозувати їх перебіг в умовах *in vivo*.

1. Модифіковано метод визначення загального гемостатичного потенціалу, шляхом використання активації внутрішнього шляху системи зсідання крові стабільним АЧТЧ-реагентом за відсутності та за присутності t-РА, та включенням кількісних параметрів турбідиметричної кривої, які характеризують стадії процеси формування та лізису фібринового згустку на молекулярному рівні.

2. Знайдено, що відношення потенціалу зсідання до фібринолітичного потенціалу (ЗП/ФП) вказує на рівень балансу між про- та антикоагулянтною ланками гемостазу. Так, у донорів і хворих на інсульт воно становить $4,1 \pm 0,1$ та $4,0 \pm 0,9$ відповідно, що свідчить про збереження балансу між зсіданням плазми крові та фібринолізом за цієї патології. При гострому інфаркті міокарду та хронічній хворобі нирок рівновага зміщується у бік фібринолізу – $2,5 \pm 1,3$ та $3,1 \pm 0,5$ відповідно. У пацієнтів зі стенокардією та стенозом рівновага не порушується (ЗП/ФП $\sim 4,1$).

3. У хворих на хронічну хворобу нирок зі зростанням рівня розчинного фібрину зростає сила кореляційного зв'язку (за Пірсоном) до сильного та дуже сильного між вмістом протеїну С та фібринолітичним потенціалом (-0,93), потенціалом зсідання (-0,81) та вмістом фібриногену (-0,73), що вказує на залежність активності систем фібринолізу та протеїну С від рівня активації системи зсідання крові.

4. Виявлено слабкий кореляційний зв'язок між концентрацією розчинного фібрину і іншими параметрами системи гемостазу, включаючи і концентрацію D-димеру, у хворих на хронічну хворобу нирок. Припускається, що D-димер утворюється не з розчинного фібрину, а з мікрозгустків, які формуються із розчинного фібрину в системі мікроциркуляції.

5. Показано, що калікс[4]арен С-145 інгібує утворення фібринового згустку зі збереженням динамічної рівноваги між коагуляційною та фібринолітичною ланками системи гемостазу.

6. Показано, що гепарин змінює структуру фібринового згустку в плазмі крові, що прискорює дію системи фібринолізу.

СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Чернуха Л.М., Каширова Е.В., Луговской Э.В., Комисаренко С.В., Колесникова И.Н., Макогоненко Е.М., Платонова Т.Н., Пирогова Л.В., Горницкая О.В. Характеристика состояния системы гемостаза при артериовенозных формах врожденных сосудистых мальформаций. *Новости хирургии*. 2014;22(2):191-198. *(Дисертантка брала участь у виконанні експериментальної частини досліджень)*.
2. Chernyshenko V.O., Korolova D.S., Dosenko V.E., Pashevin D.O., Kalchenko V.I., Pirogova L.V., Chernyshenko T.M., Lugovska O.E., Kravchenko N.A., Makogonenko Y.M., Lugovskoy E.V. and Komisarenko S.V. Calix[4]arene-145. Effects on Plasma Haemostasis. *Pharmaceutica Analytica Acta*. 2015;6(8):1-5. *(Дисертантка брала участь у виконанні експериментальної частини досліджень)*.
3. Пирогова Л.В., Чернишенко Т.М., Колеснікова І.М., Платонова Т.М., Березницький Г.К., Макогоненко Є.М., Луговської Е.В. Рівень загального гемостатичного, згортаючого і фібринолітичного потенціалу у плазмі крові донорів і хворих при різних захворюваннях. *Укр. біох. журн.* 2016;88(2):56-65. *(Дисертантка брала участь у виконанні експериментальної частини досліджень, у аналізі результатів досліджень, написанні та оформленні статті)*.
4. Chernyshenko V.O., Pirogova L.V., Cherenok S.V., Dosenko V.E., Pashevin D.O., Kalchenko V.I., Makogonenko E.M., Lugovskoy E.V. Effects of Calix[4]arene C-145 on overall haemostatic potential of blood plasma *in vitro* and *in vivo*. *J. Int. Res. in Med. Pharm. Sci.* 2016;10(3):146-151. *(Дисертантка брала участь у виконанні експериментальної частини досліджень)*.
5. Чернишенко В.О., Савчук О.В., Черенок С.О., Силенко О.М., Негеля А.О., Касаткіна Л.О., Пирогова Л.В., Дідківський В.А., Юсова О.І., Кальченко В.І., Гарманчук Л.В., Гриненко Т.В., Луговської Е.В., Комісаренко С.В. Дія калікс[4]арен-метиленбісфосфонової кислоти С-145 та її сірковмісного аналога на гемостаз. *Укр. біох. журн.* 2018; 90(6):21-30. *(Дисертантка брала участь у виконанні експериментальної частини досліджень)*.
6. Сторожук Б.Г., Пирогова Л.В., Чернишенко Т.М., Костюченко О.П., Колеснікова І.М., Платонова Т.М., Сторожук О.Б., Сторожук Л.О., Березницький Г.К., Цап П.Ю., Масенко О.О., Макогоненко Є.М., Луговської Е.В. Загальний гемостатичний потенціал плазми крові і його зв'язок із деякими молекулярними маркерами системи гемостазу у хворих на хронічні захворювання нирок VD стадії. *Укр. біох. журн.* 2018;90(5):60-70. *(Дисертантка брала участь у виконанні експериментальної частини досліджень, взяла активну участь у аналізі результатів досліджень, написанні та оформленні статті)*.

ПАТЕНТИ

1. Спосіб визначення коагуляційного балансу плазми крові. Сторожук Н.В., Сторожук Б.Г., Макогоненко Є.М., Сторожук Л.О., Пирогова Л.В., Сторожук О.Б., Платонова Т.М., Луговской Е.В. Заявка № а201809400 від 17.09.2018. Позитивне рішення щодо патенту на винахід.
2. Спосіб інгібування полімеризації фібрину синтетичними пептидами, які імітують фрагментисуперспіральної ділянки фібрин(оген)у. Комісаренко С.В., Чернищенко В.О., Макогоненко Є.М., Пирогова Л.В., Луговська Н.Е., Горницька О.В., Грабовський О.О. Заявка № u202002124. Патент на корисну модель № 143853. від 10.08.2020, Бюл. №15.

АНОТАЦІЯ

Пирогова Л.В. Формування і гідроліз фібринового згустку в плазмі крові людини за патологічних станів та за дії екзогенних факторів. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія. - Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ, 2020.

Дисертаційна робота присвячена розробці методу аналізу стану системи гемостазу, який дозволяє визначити рівень активації, взаємодії і зв'язку компонентів системи гемостазу в процесі формування та гідролізу фібринового згустку в плазмі крові людини за деяких патологій, пов'язаних з порушенням системи гемостазу, та за дії антитромботичних агентів.

Дослідження проводили в плазмі крові донорів та пацієнтів, хворих на інфаркт міокарду, інсульт, стеноз аорти, стенокардію, хронічну хворобу нирок та пацієнтів зі захворюваннями тазостегнового суглобу (ЗТСС), яку аналізували у двох експериментальних системах: в першій – процес формування і гідролізу фібринового згустку ініціювали АЧТЧ-реагентом, що активує внутрішній шлях зсідання крові, і характеризували за параметрами гемостатичного потенціалу (ЗП – потенціал зсідання, ЗГП – загальний гемостатичний потенціал, ФП – фібринолітичний потенціал) та окремих ділянок турбідиметричної кривої (τ – лаг-період, V_1 – швидкість латеральної асоціації протофібрил, H – максимальна мутність згустку, L – час напівлізису згустку, V_2 – швидкість гідролізу фібринового згустку). У другій – стан системи гемостазу в плазмі крові визначали за концентраціями молекулярних маркерів – фібриногену, розчинного фібрину, протеїну С, D-димеру на момент її забору у пацієнтів.

Було знайдено, що відношення потенціалу зсідання до фібринолітичного потенціалу (ЗП/ФП) є важливим показником балансу між активністю коагуляційної та фібринолітичної ланок гемостазу та є важливим показником для оцінки напрямку зміни в стані системи гемостазу плазми крові пацієнта.

Порівняльний аналіз величин параметрів гемостатичного потенціалу, турбідиметричної кривої і концентрацій молекулярних маркерів показав, що активність системи гемостазу у жінок з хронічними захворюваннями нирок вища, ніж у чоловіків. Встановлено, що у хворих на хронічну хворобу нирок з підвищенням концентрації розчинного фібрину зростає сила кореляційного зв'язку до сильного та дуже сильного між концентрацією протеїну С та концентрацією фібриногену (-0,73), потенціалом зсідання (-0,81) та фібринолітичним потенціалом (-0,93), що свідчить про існування чітких кореляційних зв'язків між системами зсідання крові, фібринолізу і антикоагулянтною системою протеїну С і є перспективним для розробки методів прогнозування стану системи гемостазу.

Встановлено, що концентрація розчинного фібрину має слабкий рівень кореляційного зв'язку з такою D димеру і не є прямим попередником останнього. Запропоновано гіпотезу про утворення фібринових мікрозгустків у плазмі крові як необхідного проміжного ланцюга для активації фібринолітичної системи і утворення D-димеру.

Застосування удосконаленого нами методу гемостатичного потенціалу для аналізу дії антизгортаючих агентів на систему гемостазу плазми крові донорів дозволив встановити, що калікс[4]арен С-145 інгібує утворення фібринового згустку зі збереженням динамічної рівноваги між коагуляційною та фібринолітичною ланками системи гемостазу. Було також становлено, що гепарин змінює структуру фібринового згустку в плазмі крові, що прискорює дію системи фібринолізу.

Ключові слова: фібриноген, полімеризація фібрину, загальний гемостатичний потенціал, розчинний фібрин, D-димер, протеїн С.

ABSTRACT

Pyrogoва L. V. Formation and hydrolysis of the fibrin clot in blood plasma at pathological conditions and under the action of exogenous factors. – Manuscript.

Thesis for the PhD degree in the biological sciences for specialty 03.00.20 – biotechnology. - Palladin Institute of biochemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2020.

The research is dedicated to the development of a method of the haemostasis system analysis that would allow to determine the level of activation, interaction and interconnection of the system's components in the process of formation and hydrolysis of the fibrin clot in human blood plasma under certain pathologies associated with haemostasis disregulation and under the action of antithrombotic agents.

The study was performed in blood plasma of donors and patients which had myocardial infarction, stroke, aortic stenosis, stenocardia, chronic renal disease and hip replacement therapy, analyzed in two experimental setups. The first one targeted the process of formation and hydrolysis of the fibrin clot. The process was initiated by the APTT reagent which activates the intrinsic pathway of blood clotting cascade and is characterized by the parameters of the haemostatic potential (clotting potential (CP), fibrinolytic potential (FP) and overall hemostatic potential (OHP)) and certain segments of the turbidity curve (τ – lag-period, V_1 – speed of lateral protofibril association, H – maximum turbidity of clot, L – half-lysis time, V_2 – clot hydrolysis speed). The second setup included evaluating the haemostasis system by such molecular markers as fibrinogen, soluble fibrin, protein C and D-dimer at the time of blood collection.

The ratio of the clotting potential to fibrinolytic potential (CT/FP) was found to be an important marker of the balance between the coagulation and fibrinolysis and an important parameter of the overall direction of change in the patient's haemostasis.

Comparative analysis of the values of the haemostatic potential, turbidity curve and concentrations of molecular markers showed that the activity of the haemostasis system in women with chronic renal disease is higher than in men. In patients with chronic renal disease, protein C concentration became highly anti-correlated with fibrinogen (-0,73), clotting potential (-0,81) and fibrinolytic potential (-0,93). This suggests the existence of strong correlational links binding together the clotting cascade, fibrinolysis and the anticoagulant system of protein C and is a promising target of developing prognostic methods to evaluate haemostasis.

Soluble fibrin was found to be only weakly correlated with D-dimer and not its direct antecedent. We offer a hypothesis about the formation of fibrin microclots in blood plasma as a necessary intermediate chain for the activation of fibrinolytic system and the formation of D-dimer.

Application of the improved method of hemostatic potential to the analysis of anticlotting agents' effect on the donors' hemostatic system allowed us to establish that calix[4]arene C-145 inhibited the formation of the fibrin clot without unsettling the dynamic balance of the coagulational and fibrinolytic parts of the haemostasis. Also, heparine was shown to change the fibrin clot's structure in plasma, thus accelerating fibrinolysis

Key words: fibrinogen, fibrin polimerization, total haemostatic potential, soluble fibrin, D-dimer, protein C.