

THE HISTORY OF BIOCHEMISTRY

УДК 577.112:612.115:616.151.5:608

doi: <http://dx.doi.org/10.15407/ubj88.03.106>

ВИНАХІДНИЦЬКА ДІЯЛЬНІСТЬ ВІДДІЛІВ СТРУКТУРИ І ФУНКЦІЇ БІЛКА ТА МОЛЕКУЛЯРНОЇ ІМУНОЛОГІЇ ІНСТИТУТУ БІОХІМІЇ ІМ. О. В. ПАЛЛАДІНА НАН УКРАЇНИ. ЧАСТИНА II. ВІТЧИЗНЯНИЙ ПРОРИВ У ДОСЛІДЖЕННІ ТА ДІАГНОСТИЦІ СИСТЕМИ ГЕМОСТАЗУ ЛЮДИНИ

Н. Е. ЛУГОВСЬКА

*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: nlugovsk@mail.ru*

На початку 1950-х років видатний вчений-біохімік академік АН УРСР Володимир Олександрович Беліцер, керівник організованого ним відділу структури і функції білка в Інституті біохімії АН УРСР, розпочав глибоке вивчення системи гемостазу за трьома основними напрямками. Перший напрям стосувався вивчення механізмів зсідання крові, основою якого є утворення тривимірної сітки фібрину, що є каркасом тромбу [1, 2]. Цей напрям активно розвивали в різні роки д-ри біол. наук: Т. В. Варецька, Е. В. Луговської, Т. М. Платонова, Є. М. Макогоненко і Л. В. Медведь. Другий напрям полягав у дослідженні тромбіну. Ним займалися д-ри біол. наук: С. Б. Серебряний і В. К. Кібірев. Третій напрям – дослідження плазміну й механізмів фібринолізу – розвивали д-ри біол. наук: С. О. Кудінов і Т. В. Гриненко [3].

У 1970-х роках зав. лабораторії імунохімії, а зараз – зав. відділом молекулярної імунології, академік НАН України С. В. Комісаренко запропонував В. О. Беліцеру розпочати у співпраці сумісний імунохімічний аналіз механізмів перетворення фібриногену на фібрин і полімеризації останнього. Його ідея полягала в застосуванні моноклональних антитіл (монАТ) як молекулярних зондів для дослідження структури фібрин(оген)у, пошуку неоантигенних детермінант, що експонуються в процесі перетворення фібриногену на фібрин, виявлення невідомих центрів полімеризації фібрину та вивчення молекулярних механізмів його полімеризації.



*Сергій Васильович Комісаренко,
директор Інституту біохімії
ім. О. В. Палладіна НАН України,
завідувач відділу молекулярної імунології
(з 1982 р.), д.б.н., акад. НАН і НАМН України*

Для втілення цієї ідеї в 1985 році к.б.н., а зараз чл.-кор. НАН України Е. В. Луговської, маючи досвід у дослідженні фібриногену й фібрину, разом зі своєю групою (інженерами Г. К. Гоголінською та С. Г. Дерзською) перейшов із відділу структури і функції білка до відділу молекулярної імунології Інституту, де разом із «гібридною» групою канд. біол. наук І. М. Колеснікової розпочав вивчати процеси полімеризації фібрину із використанням монАТ [4] та в подальшому застосовува-



*Едуард Віталійович Луговської,
завідувач відділу структури
і функції білка (з 2008 р.),
член-кор. НАН України, д.б.н., проф.*

ти одержані специфічні монАТ для розробки імунодіагностичних методів кількісного визначення головних молекулярних маркерів гемостазу в плазмі крові людини. До складу об'єднаної групи в різні роки також входили канд-ти біол. наук В. С. Чудновець, Е. М. Золотарьова, П. Г. Гриценко, Н. Е. Луговська, Л. Г. Капустяненко, Т. М. Кошель і Л. П. Урвант та мол. наук. співр. К. Д. Ляшко, Л. М. Литвинова, О. П. Костюченко.

Дослідження механізмів зсідання крові має надзвичайне значення не тільки для фундаментальної біохімії, але й для медицини, оскільки захворювання, спричинені надмірною активацією системи зсідання крові й патологічним тромбоутворенням, є однією з основних причин смертності населення в усьому світі, зокрема в Україні. Детальне вивчення механізмів тромбоутворення, виявлення невідомих центрів полімеризації фібрину та одержання монАТ до неоантигенних детермінант, що експонуються в процесі його утворення та подальших перетворень, є надзвичайно важливим для розробки нових підходів для діагностики, попередження і лікування хвороб, спричинених порушеннями системи гемостазу.

Відомо, що під час активації системи зсідання крові в кров'яному руслі утворюється ензим тромбін, який перетворює основний

протеїн системи зсідання крові фібриноген на фібрин, здатний до спонтанної полімеризації [5]. Основою такої полімеризації, яка веде до утворення фібринової сітки, що слугує каркасом тромбу, є міжмолекулярна взаємодія D- та E-регіонів фібрину за рахунок зв'язування комплементарних центрів. Центр полімеризації являє собою групу амінокислотних залишків, розміщених послідовно в поліпептидному ланцюзі або зближених у просторі за рахунок третинної структури. Такі центри можуть не передіснувати в молекулі фібриногену, а бути неоантигенними детермінантами, формуючись на різних етапах перетворення фібриногену на фібрин. На сьогодні молекулярні механізми полімеризації фібрину повністю не з'ясовано. Невідомими залишаються кількість і точна локалізація всіх центрів полімеризації. Їх виявлення необхідне для глибшого розуміння механізмів утворення фібринового каркаса тромбів та для створення нових антитромботичних препаратів, дію яких буде спрямовано на блокування таких центрів їх синтетичними пептидними аналогами з метою зупинки полімеризації фібрину [6, 7].

Нині досить актуальними проблемами медицини є своєчасна діагностика порушень системи гемостазу людини та профілактика хвороб, які є наслідком аномальної активації системи зсідання крові. Це такі тяжкі хвороби, як інфаркт міокарда, ішемічний інсульт, ДВЗ-синдром, тромбоемболія легеневої артерії та інші. Для діагностики порушень системи гемостазу, а також для моніторингу ефективності їх лікування важливе значення має кількісне визначення в плазмі крові людини молекулярних маркерів, що характеризують стан цієї системи. Найважливішими такими маркерами є розчинний фібрин, концентрація якого зростає в разі активації системи зсідання крові та загрози тромбоутворення [8], фібриноген – протеїн гострої фази та D-димер – маркер утворення й руйнування тромбу. Найбільш точним методом визначення концентрації вказаних маркерів у плазмі крові може бути імуноензимний аналіз (ІЕА), заснований на використанні високоспецифічних та високоафінних до цих маркерів монАТ. В Україні не існувало жодної імуноензимної тест-системи для кількісного визначення таких маркерів у плазмі крові людини. Тому актуальним і необхідним було одержання монАТ, які

б із високою специфічністю та афінністю реагували з розчинним фібрином, фібриногеном і D-димером без перехресної реакції з іншими протеїнами плазми крові, та створення на їх основі вітчизняних імунодіагностичних тест-систем.

Об'єднаною групою дослідників під керівництвом С. В. Комісаренка та Е. В. Луговського було одержано низку монАТ до самостійно виділених антигенів: фібриногену, фібрину, D-димеру та їхніх фрагментів і досліджено їхні властивості. Проведені турбідиметричні та електронно-мікроскопічні дослідження цих монАТ та їхніх Fab-фрагментів дозволили виявити такі монАТ, що інгібують певні стадії полімеризації фібрину, а, отже, епітопи для них збігаються із центрами полімеризації, що беруть участь у забезпеченні відповідної стадії полімеризації або знаходяться поруч із ними. За допомогою імунохімічного аналізу одержаних монАТ було виявлено ті з них, які з високою специфічністю та афінністю реагують із фібриногеном, розчинним фібрином та D-димером, завдяки чому ці антитіла було використано для розробки точних імуноензимних тест-систем для визначення зазначених молекулярних маркерів у плазмі крові людини. Найважливішими серед одержаних монАТ є II-4d, 2d-2a, III-3b, Fn1-3c.

МонАТ II-4d було одержано після імунізації мишей виділеним у відділі D-димером людини [9]. За допомогою турбідиметричних досліджень було виявлено, що ці монАТ специфічно зупиняють процес полімеризації. Так, монАТ II-4d й їхні Fab-фрагменти інгібують процес полімеризації на 100% за молярного співвідношення до фібрин(оген)у, рівного 1 і менше. Таким чином, епітоп для цих антитіл у молекулі фібрину збігається із центром полімеризації або знаходиться поруч із ним. Електронно-мікроскопічні дослідження показали, що монАТ II-4d повністю інгібують першу стадію полімеризації фібрину – утворення протофібрил [10]. За допомогою пептиду Gly-Pro-Arg-Pro, який імітує центр полімеризації «А», що бере участь у забезпеченні першої стадії полімеризації фібрину, було показано, що виявлений центр не збігається з відомим на той час центром «а», що знаходиться в С-кінцевій частині γ -ланцюга D-домену фібрину. Імуноблотаналіз із використанням одержаних ланцюгів D-димеру,

продуктів хімотрипсинового гідролізу D-фрагмента та ланцюгів TSD-субфрагмента показав, що епітоп для цих антитіл, а, отже, і невідомий центр полімеризації «с», який вони здатні інгібувати, розташований в N-кінцевій частині γ -ланцюга D-димеру фібрину та D-фрагмента фібриногену людини, а саме – у ділянці 86-240. Вона експонована у фібрині, фібриногені та в D- і DD-фрагментах. Отже, епітоп для монАТ II-4d розташований в D-домені фібрин(оген)у та D-доменвмісних продуктах його деградації [11]. Константа дисоціації (K_d) зв'язування монАТ II-4d із фібриногеном становить $1,4 \cdot 10^{-9}$ М, а з D-димером – $2,8 \cdot 10^{-9}$ М. ІЕА монАТ II-4d підтвердив, що вони реагують із фібриногеном, фібрином, D-димером і D-фрагментом і не взаємодіють із N-кінцевим дисульфідним вузлом (NDSK) фібрин(оген)у. Всі ці дані вказували на те, що одержані монАТ є придатними як вторинні tag-антитіла для розробки специфічних імуноензимних тест-систем для визначення фібриногену, розчинного фібрину та D-димеру в плазмі крові людини [9, 12].

Для пошуку невідомих центрів полімеризації також було застосоване монАТ 2d-2a, одержане до виділеного у відділі NDSK фібриногену [13, 14]. За допомогою турбідиметричного аналізу було виявлено, що це монАТ уповільнює полімеризацію фібрину на 60% за еквімолярного співвідношення до фібриногену та фібрину desAA і не впливає на полімеризацію фібрину desAABB. Fab-фрагменти цих монАТ інгібують процес латеральної асоціації протофібрил на 100% за молярного співвідношення до фібрин(оген)у, рівного 2:1. Було встановлено, що епітоп для цих антитіл знаходиться справа та зліва від розщеплюваного тромбіном зв'язку $\text{V}\beta\text{Arg14-Gly15}$ [15–17], тобто в цій області молекули фібрин(оген)у знаходиться невідомий раніше центр полімеризації, який функціонує ще до відщеплення фібринопептидів В, що й підтвердилося пізніше [11]. Виявлене високе значення константи дисоціації (K_d) монАТ 2d-2a в реакції з фібриногеном ($1,04 \cdot 10^{-9}$ М) вказувало на їх високу придатність як зв'язувальних catch-антитіл для визначення нативного фібриногену в плазмі крові людини шляхом ІЕА [14]. Було показано, що в разі розведення плазми крові в 200 разів концентрації фібринопептиду $\text{V}\beta\text{1-42}$ та

фібрину desAA, з якими ці антитіла також здатні реагувати, знижуються настільки, що чутливість методу не дозволяє їх виявити, а, отже, вони не заважають визначенню рівня фібриногену [14]. Ці монАТ як зв'язувальні catch-антитіла було використано для розробки методу визначення концентрації нативного фібриногену в плазмі крові людини на основі бісайтового твердофазного імуноензимного аналізу (т-ІЕА) [14, 18]. Як вторинні tag-антитіла в цьому методі було використано біотинильовані монАТ II-4d [9]. Для проведення аналізу плазму крові розводили в 200 разів. Концентрацію фібриногену обчислювали, використовуючи калібрувальну криву, яку будували згідно з результатами, одержаними з використанням відомих концентрацій одержаного у відділі фібриногену. Чутливість методу становила 5 мкг фібриногену на 1 мл плазми, розведеної у двісті разів.

Таким чином, із використанням одержаних в Інституті біохімії монАТ 2d-2a та II-4d було розроблено метод кількісного визначення фібриногену в плазмі крові людини.

Також було одержано ще одне монАТ III-3b до виділеного у відділі D-димеру людини, яке надзвичайно цінне тим, що не має перехресної реакції з фібриногеном і фібрином [19]. K_d зв'язування цих монАТ із D-димером становить $1,43 \cdot 10^{-10}$ М, а з D-фрагментом фібриногену – $0,92 \cdot 10^{-9}$ М. Імуноблотаналіз із використанням одержаних ланцюгів D-димеру і бромціанового гідролізату D-фрагмента фібриногену виявив, що епітоп для монАТ III-3b знаходиться у фрагменті В β 134–190 D-димеру людини. За допомогою ІЕА було показано, що одержані монАТ специфічно реагують із D-димером, D-фрагментом людини, D-доменвмісними продуктами плазмінового гідролізу фібрину та не реагують ні з фібриногеном, ні з мономерним і полімерним фібрином desAA й desAABB. Виявлені властивості одержаних монАТ вказували на те, що вони є високопритатними для визначення D-димеру в плазмі крові людини. Перевагою над існуючими аналогами є відсутність зв'язування одержаних монАТ як із фібриногеном, так і з мономерним, і полімерним фібрином, та дуже висока константа зв'язування з антигеном, що дозволяє визначати D-димер за допомогою ІЕА з використанням цих антитіл у концентрації 10 нг/мл, на відміну від, наприклад, антитіл порівняння DD-3B6/22 [20], чутливість

визначення D-димеру за допомогою яких становить 200 нг/мл [11, 21]. Із використанням монАТ III-3b як зв'язувальних catch-антитіл та монАТ II-4d як детектуючих tag-антитіл було розроблено метод кількісного визначення концентрації D-димеру в плазмі крові людини на основі т-ІЕА [19]. Концентрацію D-димеру обчислювали за допомогою калібрувальної кривої, яку будували за результатами, одержаними з використанням відомих концентрацій одержаного у відділі D-димеру. Чутливість визначення D-димеру із застосуванням монАТ III-3b дорівнювала 10 нг/мл плазми, розведеної в десять разів.

Таким чином, із використанням одержаних монАТ III-3b та II-4d було розроблено метод кількісного визначення D-димеру в плазмі крові людини. Концентрацію D-димеру за допомогою цього методу можна визначати в діапазоні від 10 до 1000 нг/мл за розведення плазми крові в 10 разів. Цей діапазон повністю перекриває можливий діапазон концентрацій D-димеру в нормі та за різних патологічних станів. Оскільки концентрація D-фрагмента в нормі та за різних патологій значно менша, ніж D-димеру, а монАТ III-3b на порядок сильніше реагують із D-димером, ніж із D-фрагментом, можна стверджувати, що D-фрагмент не заважає визначенню концентрації D-димеру в плазмі крові за допомогою зазначеного методу [12].

Великим успіхом у цих дослідженнях було одержання унікальних монАТ FnI-3C, які реагують із фібрином людини без перехресної реакції з фібриногеном і D-димером [22]. Імуноблотаналіз виділених ланцюгів фібрину, NDSK фібрину і D-димеру з використанням цих монАТ дозволив виявити в суперспіральній області молекули фібрину в ділянці В β Met118-Val134 невідому раніше неоантигенну детермінанту, яка експонується в процесі перетворення фібриногену на фібрин і руйнується за дії плазміну. Локалізація виявленої неоантигенної детермінанти молекули фібрину підтвердилася результатами передбачення антигенності для ланцюга В β його молекули з використанням серверів DiskoTop, BEPro, EPCES і EPSVR. Ця ділянка молекули фібрину входить до зони гнучкого шарніра В β 100–150 [23, 24]. Було виявлено, що епітоп для цих антитіл експонується в процесі перетворення фібриногену на фібрин desAA та зникає після розщеплення фібрину плазміном [23].

За допомогою турбідиметричного та електронно-мікроскопічного аналізу було показано, що монАТ FnI-3C та їхні Fab-фрагменти специфічно інгібують стадію латеральної асоціації протофібрил фібрину. Ці дані дозволили зробити висновок про те, що епітоп для монАТ FnI-3C повністю або частково перекривається з невідомим раніше центром полімеризації фібрину, який бере участь у забезпеченні стадії латеральної асоціації протофібрил [23]. Таким чином, було виявлено, що перетворення фібриногену на фібрин супроводжується структурною перебудовою в області В β 118-134 суперспірального регіону його молекули, яка приводить до формування неоантигенної детермінанти та сайту латеральної асоціації протофібрил. За подальшої локалізації виявленого центру полімеризації фібрину за участю д.б.н. Є. М. Макогоненка було показано, що цей центр із великою ймовірністю розташовується у фрагменті В β 126-135 молекули фібрину, а невід'ємною його частиною є амінокислотні залишки Lys127, Lys130 та Lys133 [12]. Експонування неоантигенної детермінанти та виявленого центру відбувається внаслідок відщеплення від молекули фібриногену фібринопептидів А та утворення мономерного фібрину. Але, можливо, фрагмент В β 126-135 містить не сам центр полімеризації, а ділянку, в якій під час перетворення фібриногену на фібрин відбуваються конформаційні перебудови, необхідні для здійснення латеральної асоціації протофібрил [12].

За допомогою ІЕА було показано, що монАТ FnI-3C специфічно реагують із мономерним і олігомерним фібрином desAA та фібрином desAABB і не реагують із фібриногеном та з продуктами деградації фібрин(о)гену, крім X-фрагмента фібрину. Було також визначено константу дисоціації в реакції монАТ FnI-3C з фібрином ($9,76 \cdot 10^{-10}$ М), яка вказує на високу афінність цих монАТ до фібрину та на можливість їх використання для визначення будь-якої концентрації розчинного фібрину, що може спостерігатися в плазмі крові людини як у нормі, так і за різних патологічних станів (від 0,01 мкмоль/л до 1 мкмоль/л) [25].

МонАТ FnI-3C було використано як зв'язувальні catch-антитіла для розробки методу визначення концентрації розчинного фібрину в плазмі крові людини на основі бісайтового

t-ІЕА. Як вторинні tag-антитіла в цьому методі було також використано одержані раніше монАТ II-4d. Для проведення аналізу плазму крові розводили в 10 разів. Концентрацію фібрину обчислювали за калібрувальним графіком, який будували за результатами, одержаними з використанням відомих концентрацій одержаного у відділі фібрину. Чутливість визначення розчинного фібрину за допомогою цього методу становила 0,1 мкг/мл плазми, розведеної в 10 разів [22].

Таким чином, на основі одержаних монАТ FnI-3C та II-4d було розроблено метод кількісного визначення розчинного фібрину в плазмі крові людини. Крім того, ці монАТ можуть бути використані для детекції тромбу та для спрямованого транспортування лікувальних речовин до тромбів.

Одержані дані щодо виявлення невідомих раніше центрів полімеризації фібрину дають важливу інформацію для розуміння механізмів полімеризації фібрину та для створення нових антитромботичних препаратів на основі синтетичних пептидів, які імітують структуру цих центрів. Розроблені кількісні методи визначення фібриногену, D-димеру та розчинного фібрину в плазмі крові людини на основі бісайтового t-ІЕА було багаторазово апробовано в клініці [26–29] та взято за основу в процесі створення разом із ПрАТ «ДІАПРОФ-МЕД» комерційних імуноензимних тест-систем для кількісного визначення зазначених молекулярних маркерів у плазмі крові людини.

У 2008 р. об'єднані групи Е. В. Луговського та І. М. Колеснікової перейшли з відділу молекулярної імунології до відділу структури і функції білка, де було продовжено ці дослідження, результати яких привели до численних наукових публікацій, патентів на винаходи й корисні моделі та, нарешті, до створення вітчизняних імуноензимних тест-систем для діагностики стану системи гемостазу людини, виявлення передтромботичних станів, ДВЗ-синдрому, виявлення або виключення наявності тромбозів, а також для моніторингу антитромботичної й фібринолітичної терапії.

На основі розробленого в Інституті біохімії ім. О. В. Палладіна методу визначення фібриногену було розроблено тест-систему для визначення фібриногену в плазмі крові людини з діагностичною метою [30]. Фібриноген є одним

із важливих показників стану системи гемостазу. За дії тромбіну він перетворюється на мономерний фібрин, який далі спонтанно полімеризується з утворенням нерозчинної тривимірної сітки, що слугує каркасом тромбів [31]. У процесі агрегації тромбоцитів молекули фібриногену виконують роль містків, які зв'язують клітини між собою [32]. Фібриноген є протеїном гострої фази, чутливим маркером запалення та некрозу тканин [33]. В нормі його концентрація в плазмі крові людини становить 2–4 г/л [34, 35]. За запальних реакцій, травм, опіків, післяопераційних станів, інфекційних хвороб концентрація фібриногену зростає в 2–10 і більше разів [36]. Кількість фібриногену також може збільшуватись у разі інсультів, інфарктів міокарда, гіпотиреозу, амілоїдозу, пневмонії та злоякісних пухлин. Ріст концентрації фібриногену, навіть у межах референтних значень, корелює зі збільшенням ризику ускладнень серцево-судинних хвороб. Під час нормальної вагітності вміст фібриногену може збільшуватися до 6 г/л. Знижений вміст фібриногену в плазмі крові може спостерігатися за ДВС-синдрому, захворювань печінки, токсикозу вагітних, емболії навколоплідними водами (у новонароджених), хронічного мієлолейкозу, нестачі вітамінів С і В₁₂, поліцитемії, у разі застосування фібринолітичних препаратів та ін. [32].

У клінічній практиці фібриноген у плазмі крові визначають, головним чином, за допомогою тестів, заснованих на методах Клауса та Рутберга [37, 38]. Але ці тести є не досить точними, а, отже, не можуть виявляти невелике збільшення концентрації фібриногену в динаміці, що може бути одним із показників розвитку ускладнень, наприклад, за серцево-судинних захворювань. Найбільш точним методом визначення фібриногену в плазмі крові людини є ІЕА, заснований на використанні специфічних і високоафінних до фібриногену монАТ. Відома імуноензимна тест-система для визначення фібриногену в плазмі крові людини [39], в якій антитіла до фібриногену перехресно реагують із продуктами деградації фібрин(оген)у плазміном (ПДФ). Її недоліком є те, що, незважаючи на розведення плазми, вміст ПДФ за деяких патологій (ДВЗ-синдром) є настільки високим, що може впливати на одержані результати щодо кількісного визначення фібриногену.

Перевагами розробленої тест-системи для кількісного визначення фібриногену є те, що в ній

застосовуються монАТ власного виробництва, одержані в Інституті біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України. У складі імуносорбенту використовуються специфічні та високоафінні до фібриногену людини монАТ 2d-2a [14, 15], а в складі кон'югату – біотинильовані високоафінні до фібриногену монАТ П-4d [9], які не конкурують із монАТ 2d-2a за місце зв'язування на молекулі фібриногену. Принцип аналізу в тест-системі базується на бісайтовому т-ІЕА, а підвищення чутливості досягається шляхом посилення сигналу за рахунок створення комплексу біотин-стрептавідин-пероксидаза [9, 18].

Ця тест-система дозволяє проводити точне кількісне визначення нативного фібриногену в присутності інших протеїнів плазми крові людини, розведеної в 200 разів; вона є високочутливою, з автоматичним кількісним визначенням фібриногену, характеризується стабільністю імуносорбенту під час зберігання, швидким виконанням аналізу (близько 3 год) та простою й надійністю в роботі, що важливо у разі її використання в широкій клініко-лабораторній практиці для діагностики стану системи гемостазу та проведення своєчасної ефективної терапії пацієнтів із різними патологіями [30].

Розчинний фібрин є одним із головних маркерів активації системи зсідання крові та загрози тромбоутворення. За такої активації в кров'яному руслі утворюється тромбін, який перетворює центральний протеїн системи зсідання крові – фібриноген – на фібрин, здатний полімеризуватися з утворенням різних форм розчинного фібрину, який у подальшому може перейти в тверду фазу з утворенням тромбу. Кількісне визначення розчинного фібрину в плазмі крові надзвичайно важливе для своєчасної діагностики передтромботичних станів, ДВЗ-синдрому та для моніторингу антитромботичної терапії [8, 40]. У здорових донорів 18–22 років концентрація розчинного фібрину в плазмі крові варіює в діапазоні 0,01–3 мкг/мл і з віком може підвищуватися. Підвищений вміст розчинного фібрину може свідчити про передтромботичний стан і необхідність своєчасної антитромботичної терапії [31]. Патологічна активація системи зсідання крові та передтромботичні стани можуть спостерігатися за хірургічних втручань, опіків, ускладненої вагітності, ішемічної хвороби серця, цукрового діабету, онкологічних захворювань, за інших патологій [40].

У клінічній практиці розчинний фібрин у плазмі крові зазвичай визначають за допомогою тестів, заснованих на неточних напівкількісних методах [8, 41], що часто призводить до значних похибок під час вимірювань [42]. Крім того, за допомогою таких тестів неможливо виявити невелике зростання концентрації розчинного фібрину в динаміці, що є дуже важливим, особливо у разі серцево-судинних захворювань. Існуючі зарубіжні імунохімічні тест-системи для визначення розчинного фібрину є прийнятнішими, але деякі з них потребують попередньої обробки досліджуваної плазми крові додатковими хімічними агентами, що уповільнює та ускладнює процес аналізу [43]. Більше того, існує складність в інтерпретації результатів у зв'язку з різною специфічністю антитіл, що використовуються в складі імуносорбенту [44]. Обмежена кількість таких тест-систем зумовлена вкрай малою кількістю фібринспецифічних монАТ у світовій науковій практиці та ще меншою кількістю антитіл, придатних для використання в тест-системах, адаптованих для промислового виробництва. До того ж, закордонні імуноензимні тест-системи для визначення розчинного фібрину не використовуються в Україні через високу вартість. А в Україні та в країнах СНД не було жодної вітчизняної імуноензимної тест-системи для кількісного визначення розчинного фібрину в плазмі крові людини.

На основі розробленого в Інституті біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України методу визначення розчинного фібрину в плазмі крові людини було створено високочутливу та специфічну вітчизняну імуноензимну тест-систему для визначення цього молекулярного маркера з діагностичною метою [45]. В зазначеній тест-системі використовуються монАТ власного виробництва, які одержують в Інституті біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України. У складі імуносорбенту – високоспецифічні та високоафінні до розчинного фібрину монАТ FnI-3C, а в складі кон'югату – високоафінні до фібрину монАТ II-4d [9, 22]. МонАТ FnI-3C реагують із фібрином desAA і desAABB людини та не реагують із фібриногеном і продуктами гідролізу фібриногену й фібрину плазміном, за виключенням X-фрагмента фібрину, що забезпечує високу специфічність реакції [23]. Епітоп для монАТ II-4d знаходиться в D-доміні фібрин(оген)у. Принцип аналізу в тест-системі

базується на бісайтовому т-ІЕА з підсиленням сигналу за рахунок утворення комплексу біотин-стрептавідин-пероксидаза [45].

Перевагами цієї тест-системи є: використання високоспецифічних до розчинного фібрину монАТ FnI-3C власного виробництва; висока чутливість; автоматичне кількісне визначення розчинного фібрину; стабільність імуносорбенту під час зберігання. Тест-система забезпечує швидке визначення в плазмі крові людини наявності та кількості розчинного фібрину – одного з основних молекулярних маркерів активації системи зсідання крові та загрози тромбоутворення, що має важливе значення для своєчасної діагностики передтромботичних станів, ДВЗ-синдрому та моніторингу ефективності антитромботичної терапії. Вона проста та надійна в роботі, що важливо для її використання в широкій клініко-лабораторній практиці.

Для своєчасного виявлення процесу утворення або наявності тромбу в кров'яному руслі істотне значення належить визначенню в плазмі крові одного з основних молекулярних маркерів системи гемостазу – D-димеру [46, 31]. На основі розробленого в Інституті біохімії ім. О. В. Палладіна методу визначення D-димеру в плазмі крові людини було створено високочутливу та специфічну вітчизняну імуноензимну тест-систему для визначення D-димеру з метою діагностики стану системи гемостазу [47].

D-димер – найбільший кінцевий продукт плазмінового розщеплення фібрину, стабілізованого фактором XIIIa, включає два D-домени двох молекул фібрину, сполучених між собою ізопептидними зв'язками (A α 105-206, B β 134-461, γ 63-411)² [31]. У здорових дорослих 18–22 років концентрація D-димеру в плазмі крові варіює в діапазоні 0-100 нг/мл. З віком рівень D-димеру може підвищуватися. Головне діагностичне значення D-димеру полягає в тому, що коли концентрація D-димеру в плазмі крові людини не перевищує пороговий рівень 500 нг/мл, то це майже на 98–100% дозволяє виключити такі діагнози, як тромбоз глибоких вен і тромбоемболія легеневих артерій [48, 49]. Підвищена концентрація D-димеру може мати місце за наведених вище діагнозів, а також інфаркту міокарда, ішемічного інсульту головного мозку, ДВЗ-синдрому, цукрового діабету, післяопераційних станів, онкологічних за-

хворювань та інших патологій і вказувати на підвищену активність системи зсідання крові або на наявність чи утворення в кров'яному руслі твердофазного фібрину, який формує каркас тромбу.

D-димер у плазмі крові визначають за допомогою імунохімічних методів із використанням D-димерспецифічних монАТ [40]. В Україні та в країнах СНД не існувало жодної імунохімічної тест-системи вітчизняного виробництва для кількісного визначення D-димеру в плазмі крові людини. Відома тест-система для кількісного визначення D-димеру – «TECHNOZYM D-Dimer ELISA» (Technoclone GmbH, Austria) [50], що створена для експериментальних науководослідних робіт та має високу вартість.

У розробленій тест-системі також застосовуються монАТ, що одержують в Інституті біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України. У складі імуносорбенту використовують монАТ III-3В, які з високою специфічністю та афінністю реагують із D-димером [19] та не реагують із фібриногеном і фібрином людини. Епітоп для них знаходиться в N-кінцевій ділянці β -ланцюга D-димеру [47]. У складі кон'югату – монАТ II-4d [9], епітоп для яких знаходиться в іншому сайті D-домену фібрин(оген)у людини [10], отже, вони не конкурують із монАТ III-3В за місце зв'язування на антигені. Принцип аналізу у створеній тест-системі, базується на методі бісайтового т-ІЕА [18] з використанням комплексу біотин-стрептавідин-пероксидаза для підсилення сигналу, причому тест-система визначає D-димер як у вільному стані, так і в складі олігомерних продуктів розщеплення твердофазного фібрину плазміном.

Перевагами імуноензимної тест-системи для кількісного визначення D-димеру є: використання високоспецифічних до D-димеру монАТ III-3В власного виробництва, висока чутливість, автоматичне кількісне визначення D-димеру, стабільність імуносорбенту під час зберігання, швидкість виконання аналізу та простота й надійність у роботі.

Таким чином, тест-система для кількісного визначення D-димеру забезпечує швидке кількісне визначення в плазмі крові людини D-димеру – основного молекулярного маркера утворення та руйнування розчинного олігомерного фібрину та/або твердофазного фібринового каркаса тромбу, що має істотне зна-

чення для діагностики стану системи гемостазу, своєчасного виявлення передтромботичних та тромботичних станів і діагностики таких захворювань, як, наприклад, тромбоемболія легених артерій і тромбоз глибоких вен. Одночасне визначення концентрації D-димеру та розчинного фібрину в динаміці є одним із обов'язкових критеріїв моніторингу стану системи зсідання крові хворих на серцево-судинні захворювання, післяопераційних хворих, а також ефективності антитромботичної та фібринолітичної терапії [47].

З метою інтегральної діагностики стану системи гемостазу було розроблено тест-систему для одночасного кількісного визначення фібриногену, розчинного фібрину та D-димеру в плазмі крові людини. Інтегральна діагностика стану системи гемостазу необхідна для виявлення або виключення наявності чи ризику тромботворення за різних патологій на різних етапах захворювання, в тому числі в кардіологічній, хірургічній, акушерській, комбустіологічній, онкологічній та ендокринологічній практиці; діагностики ДВЗ-синдрому і проведення моніторингу антитромботичної і тромболітичної терапії з метою своєчасного виявлення та лікування тромботичних судинних і серцево-судинних хвороб – однієї з головних причин смертності населення як в Україні, так і в усьому світі.

Ця тест-система у світі не має аналогів. В ній використовуються зазначені вище монАТ власного виробництва: у складі імуносорбенту в різних лунках – монАТ 2d-2a, FnI-3C, III-3В, високоспецифічні до фібриногену, фібрину та D-димеру відповідно [14, 19, 22], а у складі кон'югату – монАТ II-4d, епітоп для яких знаходиться в D-доміні фібрин(оген)у, який присутній в усіх зазначених антигенах, завдяки чому вони придатні як вторинні tag-антитіла для визначення всіх наведених маркерів [9]. Принцип аналізу в цій тест-системі також базується на методі бісайтового т-ІЕА [18] з використанням комплексу біотин-стрептавідин-пероксидаза для підсилення сигналу.

Перевагами інтегральної імуноензимної тест-системи є одночасне визначення трьох головних маркерів системи гемостазу, використання власних високоспецифічних монАТ; висока чутливість ($0,5 \pm 0,1$ мкг/мл); специфічність (98%), швидкість виконання аналізу (3 годи-

ни); автоматичне кількісне визначення; тривалий час зберігання компонентів тест-системи, відсутність аналогів у світі.

Було виготовлено експериментальні серії кожної тест-системи й апробовано на плазмі крові хворих на діабет, серцево-судинні захворювання та за хірургічних втручань. Усі розроблені тест-системи пройшли позитивну апробацію в Інституті серцево-судинної хірургії ім. М. М. Амосова, ДУ «Національний інститут хірургії та трансплантології ім. О. О. Шалімова» НАМН України, Київській та Харківській обласних лікарнях і в діагностичному центрі Медичної академії м. Дніпропетровськ. Тест-системи отримали державну реєстрацію.

Поза тим було винайдено спосіб прогнозування післяопераційних тромботичних ускладнень [51]. Цей спосіб має велике значення для медицини, оскільки для діагностики тромботичних і тромбоемболічних післяопераційних ускладнень у сучасній лабораторній клінічній практиці, на жаль, використовують малоінформативні та малочутливі методи, які не відображають реальної загрози розвитку тромбозу [52–55]. Запропонований спосіб полягає в одночасному кількісному визначенні та зіставленні концентрації розчинного фібрину та D-димеру в плазмі крові хворих в різні часові періоди до і після операції та лікування, що дає можливість виявити порушення балансу між системами зсідання крові й фібринолізу [51]. Клінічну апробацію винайденого способу було також проведено на базі Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова. Встановлено, що він забезпечує високий ступінь вірогідності прогнозування розвитку післяопераційних тромботичних ускладнень шляхом зіставлення значень концентрацій розчинного фібрину та D-димеру в плазмі крові хворого з урахуванням важливості кожного з цих показників та їх кореляції. Крім того, цей спосіб забезпечує високу диференційованість прогнозування та контроль ефективності антитромботичної терапії на всіх етапах лікування та/або реабілітації.

Основними напрямками наукової роботи відділу структури і функції білка на сьогодні є дослідження механізмів полімеризації фібрину і побудови тривимірної сітки фібрину, яка є основою тромбу; пошук низькомолекулярних інгібіторів полімеризації фібрину та агрегації

тромбоцитів; впровадження в клінічну практику імунодіагностичних тест-систем для ранньої діагностики загрози тромбоутворення та контролю ефективності антитромботичної терапії; а також розробка високоефективних кровоспинних засобів.

За активною участю д.б.н. Т. М. Платонової зі співробітниками у відділі розроблено новий спосіб одержання високоочищеного препарату тромбіну. Спосіб полягає в безпосередній активації протромбіну плазми крові до тромбіну стабільним за багаторазового використання іммобілізованим на BrCN-Sepharose активатором протромбіну – екамуліном – ензимом отрути ефі багатолускової (*Echis multisquamatis*). Спосіб включає одержання фракції вітамін К-залежних протейнів плазми крові, хроматографічне виділення протромбіну та його активацію в тромбін екамуліном і дозволяє одержувати тромбін високої активності без додаткової очистки від активатора протромбіну [56].

У відділі за участю Т. М. Платонової та Т. М. Чернищенко розроблено також фібриновий композит на основі аутологічної плазми крові, який може бути застосований в ортопедії, травматології та комбустіології. Аутологічний фібриновий композит, що утворюється під час змішування плазми крові пацієнта з екамуліном, забезпечує регенерацію уражених кісткових і м'яких тканин та зниження інтенсивності запальних процесів. Застосування активатора протромбіну – екамуліну – замість тромбіну забезпечує відсутність імуногенності, подразнювального ефекту препарату на прилеглі тканини та запобігає гематогенним інфекціям, таким як гепатит та ВІЛ [57].

Колективом відділу структури і функції білка також було проведено пошук низькомолекулярних сполук непептидної природи з ряду калікс[4]аренів як ефективних інгібіторів полімеризації фібрину. Було виявлено, що 5,11,17,23-тетракіс[біс(дигідроксифосфорил)-метил] калікс[4]арен (С-192) та його натрієва сіль (С-145) є високоефективними низькомолекулярними інгібіторами полімеризації фібрину. Встановлено, що вони інгібують першу стадію полімеризації фібрину – побудову протофібрил, блокуючи центр полімеризації «А». Виявлено, що *in vivo* ці каліксарени інгібують процес зсідання плазми крові людини, збільшуючи протромбіновий час та част-

ково активований тромбопластиновий час. На сьогодні не описано жодну іншу низькомолекулярну сполуку непептидної природи з такою сильною інгібувальною активністю відносно полімеризації фібрину [58]. Завдяки виявленим властивостям досліджених калікс[4]аренів С-192 та С-145, вони можуть бути рекомендовані як субстанції для нових високоефективних антитромботичних препаратів [59].

Отже, науковцями Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України під керівництвом акад. НАН України С. В. Комісаренка та чл.-кор. НАН України Е. В. Луговського було здійснено справжній прорив в області дослідження системи гемостазу людини та створення вітчизняних діагностикумів, зокрема за допомогою моноклональних антитіл. Ці роботи в 2015 році були удостоєні Державної премії України в області науки і техніки.

References

1. Belitser VA, Khdorova EL. Nature of conversion of fibrinogen into fibrin. *Biokhimiia*. 1952; 17(6): 676-683.
2. Belitser VA, Varetskaya TV. Fibrinogen and fibrin: molecular structure, self-assembly of fibers. *Usp Sovrem Biol*. 1975; 80(4): 5-20.
3. Lugovskoy EV. About V. A. Belitser – a man of distinction. *Ukr Biokhim Zhurn*. 2006; 78(3): 70-72. (In Russian).
4. Lugovskoy EV, Komisarenko SV. Monoclonal antibodies as an instrument to study fibrin polymerization. *Bioorg Khim*. 2000; 26(12): 883-891. (In Russian).
5. Wolberg AS, Campbell RA. Thrombin generation, fibrin clot formation and hemostasis. *Transfus Apher Sci*. 2008; 38(1): 15-23.
6. Matsuda M, Sugo T. Hereditary disorders of fibrinogen. *Ann N Y Acad Sci*. 2001; 936: 65-88.
7. Hanss M, Biot F. A database for human fibrinogen variants. *Ann N Y Acad Sci*. 2001; 936: 89-90.
8. Dempfle CE. The use of soluble fibrin in evaluating the acute and chronic hypercoagulable state. *Thromb Haemost*. 1999; 82(2): 673-683.
9. Pat. 73232 UA, IPC⁷ C 12 N 5/18, C 12 P 21/08. The strain of the hybridoma animal cells of *Mus musculus* L. – the producer of monoclonal antibodies that specifically react with the epitope of N-terminal area of γ -chain of fibrin D-dimer and D-fragment of human fibrinogen / Komisarenko S.V., Kolesnikova I.M., Lugovskoi E.V., Lyashko K.D., Litvinova L.N., Kostyuchenko O.P., Gogolinska G.K., Gritsenko P.G.; patent owner the Palladin Institute of Biochemistry of the NAS of Ukraine. – No 2003077105 ; appl. 28.07.03 ; publ. 15.06.2005, Bul. N 6.
10. Lugovskoy EV, Gritsenko PG, Kolesnikova IN, Zolotarova EN, Chernishov VI, Nieuwenhuizen W, Komisarenko SV. Two monoclonal antibodies to D-dimer-specific inhibitors of fibrin polymerization. *Thromb Res*. 2004; 113(3-4): 251-259.
11. Lugovskoy EV, Kolesnikova IN, Gritsenko PG, Zolotareva EN, Gaffney P, Nieuwenhuizen W, Komisarenko SV. A neoantigenic determinant in the D-dimer fragment of fibrin. *Thromb Res*. 2002; 107(3-4): 151-156.
12. Lugovskoy EV, Makogonenko EM, Komisarenko SV. Molecular mechanisms of formation and destruction of fibrin. Kiev: Naukova Dumka, 2013. 230 p.
13. Chudnovets VS, Lugovskoy EV, Gogolinskaia GK, Derzskaya SG, Nazimov IV, Komissarenko SV. The isolation of the NH₂-terminal disulfide nodes of human fibrinogen and fibrin and of their constituent polypeptide chain fragments. *Dokl Akad Nauk SSSR*. 1991; 317(6): 1496-1499. (In Russian).
14. Pat. 73233 UA, IPC⁷ C 12 N 5/18, C 12 P 21/08. The strain of the hybridoma animal cells *Mus musculus* L. – the producer of monoclonal antibodies that specific to the epitope N-terminal area of B β -chain of human fibrinogen / Komisarenko S.V., Kolesnikova I.M., Lugovskoi E.V., Lyashko K.D., Litvinova L.N., Kostyuchenko O.P., Gogolinska G.K., Gritsenko P.G.; patent owner the Palladin Institute of Biochemistry of the NAS of Ukraine. – No 2003077106 ; appl. 28.07.03 ; publ. 15.06.2005, Bul. N 6.
15. Lugovskoi EV, Makogonenko EM, Chudnovets VS, Derzskaya SG, Gogolinskaya GK, Kolesnikova IN, Bukhanevich AM, Sitak IN, Lyashko ED, Komissarenko SV. The study of fibrin polymerization with monoclonal antibodies. *Biomed Sci*. 1991; 2(3): 249-256.
16. Hantgan R, Fowler W, Erickson H, Hermans J. Fibrin assembly: a comparison of electron microscopic and light scattering results. *Thromb Haemost*. 1980; 44(3): 119-124.
17. Lugovskoy EV, Chudnovets VS, Makogonenko EM, Derzskaya SG, Gogolinskaia GK,

- Kolesnikova IN, Mikhalovskaia LI, Komisarenko SV. Study of the polymerization of fibrin using monoclonal antibodies 2d-2a and their Fab-fragments. *Ukr Biokhim Zhurn.* 1995; 67(1): 64-70. (In Russian).
18. Ivanska NV, Kislyh OM, Maksimenok JV, Sergeeva TA, Raevska GE, Pilipenko VG. Practical guide to ELISA analysis. (Eds.) Gural AL, Spivak MJa. Kyiv: DMP Polimed. 2003, 51 p. (In Ukrainian).
 19. Pat. 73823 Ukraine, IPC⁷ C 12 N 5/12, C 12 N 5/18, C 12 N 5/20. The strain of animals hybridoma cells *Mus musculus* L. cultivated and produce monoclonal antibodies with specificity for human fibrin D-dimer / Komisarenko S.V., Kolesnikova I.M., Lugovskoi E.V., Lyashko K.D., Litvinova L.N., Kostyuchenko O.P., Gogolinska G.K., Gritsenko A.P.; patent owner Institute of Biochemistry. Palladin NAS of Ukraine. – No 2003076213; appl. 04.07.03; publ. 15.09.2005, Bul. N 9.
 20. Pat. 4,758,524 US, IPC C07K 16/18 (2006.01.01); G01N 33/86 (2006.01.01); G01N 033/53; C12N 015/00. Monoclonal antibodies with specificity for crosslinked fibrin derivatives and assay for said derivatives / Bundesen P.G., Rylatt D.B.; Patentees Fielder Gillespie David Limited (Sydney, AU) / – Nb 06/590,054; prior. date Mar 17, 1983; publ. date July 19, 1988.
 21. Wylie FG, Walsh TP. Partial identification of the epitope on D-dimer for monoclonal antibody, DD-3B6/22. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1997; 8(2): 87-96.
 22. Pat. 87375 UA, IPC (2009): C 12 N 5/20, C 07 K 16/36 (2009.01) The strain of animals hybridoma cells *Mus musculus* L., that are cultivated and produce monoclonal antibodies with specificity for human soluble fibrin / Komisarenko S.V., Kolesnikova I.M., Lugovskoi E.V., Lyashko K.D., Gritsenko P.G., Litvinova L.N., Kostyuchenko O.P., Lugovskaya N.E., Gogolynska G.K.; patent owner the Palladin Institute of Biochemistry of the NAS of Ukraine. – No a200712284; appl. 06.11.2007; publ. 10.07.2009, Bul. N 13.
 23. Lugovskoy EV, Gritsenko PG, Kolesnikova IN, Lugovskaya NE, Komisarenko SV. A neo-antigenic determinant in coiled coil region of human fibrin beta-chain. *Thromb Res.* 2009; 123(5): 765-770.
 24. Brown JH, Volkmann N, Jun G, Henschen-Edman AH, Cohen C. The crystal structure of modified bovine fibrinogen. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97(1): 85-90.
 25. Kolesnikova IM, Lugovs'ka NE, Lugovs'koi EV, Gritsenko PG, Lyashko ED, Gogolins'ka GK, Lytvynova LM, Kostyuchenko OP, Komisarenko SV. Monoclonal antibodies which are specific to human fibrin. *Dop NAN Ukraine.* 2006; (9): 181-185. (In Ukrainian).
 26. Lugovskoy EV, Kolesnikova IN, Lugovskaia NE, Litvinova LM, Gritsenko PG, Gogolinskaia GK, Liashko ED, Kostyuchenko EP, Remizovskiy GA, Pedchenko VN, Komisarenko SV. Quantification of D-dimer and soluble fibrin in blood plasma of people with ischemic heart disease and hypertension. *Ukr Biokhim Zhurn.* 2004; 76(6): 136-141. (In Russian).
 27. Lugovskoy EV, Kolesnikova IN, Lugovskaya NE, Gritsenko PG, Litvinova LM, Gogolinskaia GK, Liashko ED, Kostyuchenko EP, Golota VIa, Kurochka VV, Komisarenko SV. Soluble fibrin and D-dimer at normal pregnancy and pregnancy with risk of miscarriage. *Ukr Biokhim Zhurn.* 2006; 78(4): 120-129. (In Russian).
 28. Lugovskoy EV, Efimov DA, Gritsenko PG, Kolesnikova IN, Lugovskaya NE, Litvinova LM, Kostyuchenko EP, Efimov AS, Komisarenko SV. Soluble fibrin and D-dimer as molecular markers of blood vessels complications at diabetes mellitus. *Rep Nat Acad Sci Ukraine.* 2009; (12): 190-193. (In Russian).
 29. Kramareva VN, Gritsenko PG, Kolesnikova IN, Lugovskaya NE, Litvinova AL, Kostyuchenko EP, Lugovskoi EV. Levels of thrombinemia and thrombosis markers in patients with essential hypertension and cardiovascular risk. *Nauk Visnyk Med Univ Bogomolets.* 2009; (4): 177-181.
 30. Pat. 70456 UA, ICP (2011.01): A 61K 39/44. The immunoenzyme test-system for the quantitative determination of the fibrinogen in human blood plasma / Komisarenko S.V., Luhovskoi E.V., Kolesnikova I.M., Spivak M.Y., Gritsenko P.G., Hanova L.A., Lugovskaya N.E., Litvinova L.N., Lyashko K.D., Kostyuchenko O.P., Pozniak T.A., Gogolynska G.K., Kovtonyuk G.V., Tershchenko M.I.; patent owners the Palladin Institute of Biochemistry of the NAS of Ukraine, Zabolotny Institute of Microbiology and Virology

- of the NAS of Ukraine. – No u201114516 ; appl. 07.12.11 ; publ. 11.06.2012. Bul.N 11.
31. Lugovskoy EV. Molecular mechanisms of fibrin formation and fibrinolysis. Kyiv: Nauk. dumka, 2003. 220 p.
 32. Bennett JS. Platelet-fibrinogen interactions. *Ann N Y Acad Sci.* 2001; 936: 340-354.
 33. Zubairov DM. The molecular basis of blood clotting and thrombus formation. Kazan: FEN, 2000. 367 p.
 34. Blomback B, Hanson LA. Fibrinogen and fibrin formation. In: Plasma proteins. New York. Brisbane. Toronto: Jonh Wiley and Sons, 1979. P. 223-253.
 35. Pilgeram L. Control of fibrinogen biosynthesis: role of the FFA/albumin ratio. *Cardiovasc Eng.* 2010; 10(2): 78-83.
 36. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med.* 1999; 340(6): 448-454.
 37. PAT CN101221184, IPC C12Q1/56, G01N33/68, G01N33/86. External diagnostic reagent kit used for measuring blood plasma fibrinogen FIB content / Yonghua Xie , Meiping Zhu; Patentees SHANGHAI SUN BIO TECH CO LTDNb CN20071036411 on 2007-01-12 ; publ. 2008-07-16.
 38. Volkov GL, Platonova TN, Savchuk AN. Modern conceptions of the hemostatic system. Kyiv: Nauk dumka, 2005. 296 p.
 39. Determination of fibrinogen and FDP using the immunoenzyme test system. Thrombosis, hemostasis and rheology. Regime of access: <http://www.hemostas.ru/society/publications/m10.shtml#test>.
 40. Logovskoi EV, Gritsenko PG, Lugovskaya NE, Kolesnikova IN, Komisarenko SV. Molecular composition of soluble fibrin and fibrin degradation products. Methods of their assay. *Hematol Transfusiol.* 2006; 51(5): 39-43.
 41. Dolgov VV, Svirin PV. Laboratory diagnosis of disorders of hemostasis. M.Tver: LLC "Publishing "Triada", 2005. 227 p.
 42. Lugovskoi EV, Gritsenko PG, Lugovskaya NE, Kolesnikova IN, Komisarenko SV. The soluble fibrin. Molecular structure and quantitative detection. *Lab Diagnost.* 2006; 3(37): 11-17.
 43. Lill H, Spannagl M, Trauner A, Schramm W, Schuller D, Ofenloch-Haehnle B, Draeger B, Naser W, Dessauer A. A new immunoassay for soluble fibrin enables a more sensitive detection of the activation state of blood coagulation *in vivo*. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1993; 4(1): 97-102.
 44. Pat. 5,843,690 US, IPC A61K 39/395 (2006.01.01); A61K 47/48 (2006.01.01); C07K 16/18 (2006.01.01); G01N 33/86 (2006.01.01); G01N 33/573 (2006.01.01); A61K 38/00 (2006.01.01); C12Q 001/56. Immunoassay and kit for in vitro detection of soluble DesAABB fibrin polymers / Gargan P.E.; Patentees American Biogenetic Sciences, Inc. (Copiague, NY). – Nb 08/459,596 ; filed June 2, 1995.
 45. Pat. 69283 UA, IPC: A 61K 39/44 (2006.01). The immunoenzyme test-system for the quantitative determination of the soluble fibrin in human blood plasma / Komisarenko S.V., Luhovskoi E.V., Kolesnikova I.M., Spivak M.Y., Gritsenko P.G., Hanova L.A., Lugovskaya N.E., Litvinova L.N., Lyashko K.D., Kostyuchenko O.P., Pozniak T.A., Gogolynska G.K., Kovtonyuk G.V., Tereshchenko M.I.; patent owners the Palladin Institute of Biochemistry of the NAS of Ukraine, Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the NAS of Ukraine. – No u201111735 ; appl. 05.10.11 ; publ. 25.04.2012. Bul. N 8.
 46. Walker JB, Nesheim ME. The molecular weights, mass distribution, chain composition, and structure of soluble fibrin degradation products released from a fibrin clot perfused with plasmin. *J Biol Chem.* 1999; 274(8): 5201-5212.
 47. Pat. 69284 UA, IPC (2011.01): A 61K 39/44. The immunoenzyme test-system for the quantitative determination of the D-dimer in human blood plasma / Komisarenko S.V., Luhovskoi E.V., Kolesnikova I.M., Spivak M.Y., Gritsenko P.G., Hanova L.A., Lugovskaya N.E., Litvinova L.N., Lyashko K.D., Kostyuchenko O.P., Pozniak T.A., Gogolynska G.K., Kovtonyuk G.V., Tereshchenko M.I.; patent owners: the Palladin Institute of Biochemistry of the NAS of Ukraine, Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the NAS of Ukraine. – No u201111736 ; appl. 05.10.11 ; publ. 25.04.2012. Bul. N 8.
 48. Fowler WE, Hantgan RR, Hermans J, Erickson HP. Structure of the fibrin protofibril. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1981; 78(8): 4872-4876.
 49. Lippi G, Cervellin G, Franchini M, Favaloro EJ. Biochemical markers for the diagnosis of venous thromboembolism: the past, present and future. *J Thromb Thrombolysis.* 2010; 30(4): 459-471.

50. Instructions on the Application of the test system «TECHNOZYM D-Dimer ELISA» (Technoclone GmbH, Austria). 2006. 4 p.
51. Pat. 86279 UA, IPC (2013.01) A61B 10/00. The method of predicting postoperative thrombotic complications / Lugovskoi E.V., Kolesnikova I.M., Platonova T.N., Lugovskaya N.E., Litvinova L.N., Kostyuchenko O.P., Rublenko A.M., Fishchenko V.A., Chernyshenko T.M., Hornytska O.V., Komisarenko S.V.; patent owner the Palladin Institute of Biochemistry of the NAS of Ukraine. – No u201307461 ; appl. 12.06.2013 ; publ. 25.12.2013, Bul. N 24.
52. Pat. 2258459 RU, IPC7 A61B5/053. The method of early diagnosis of post-traumatic thrombosis of the lower extremities / Epanchintsev P.M., Tsukanov Y.T., Noskov V.K., Riabokon D.S.; patent owner Yepanchintsev Pavel. – No 2004108813/14 ; appl. 24.03.2004 ; publ. 20.08.2005, Bul. N 23.
53. Pat. 2423697 RU, IPC G01N33/48 (2006.01), G01N33/53 (2006.01). Method of detecting the thrombinemia at endoprosthesis of large joints / Antropova S.P., Varaksin A.N., Osipenko A.V., Raynaud E.V., Elfimov S.V.; patent owner The Federal State Institution "Ural Scientific Research Chaklin Institute of Traumatology and Orthopedics of the Federal high-tech medical aid agency" (RU). – No 2009136825/15 ; appl. 05.10.2009 ; publ. 10.07.2011, Bul. N 19.
54. Pat. 65877 A UA, IPC (2006) A61B 5/00, A61B 5/107 (2006.01). A method of predicting the postoperative deep venous thrombosis of lower extremities / Boyko V.V., Krivoruchko I.A., Skibo Y.M., Prasol V.A., Pyetkov O.V., Bitchuk O.D.; patent owner the Institute of General and Emergency Surgery of the NAS of Ukraine. – No 2003065612 ; appl. 18.06.2003 ; publ. 15.04.2004, Bul. N 4.
55. Pat. 52215 UA, IPC G01N 33/48 (2006.01), G01N 33/86 (2006.01). The method of predicting of thrombotic complications in the development of intravascular coagulation abnormalities. / Savchuk O.M., Krasnobryzha E.M., Chernyshenko T.M., Platonova T.N.; patent owner the Palladin Institute of Biochemistry of the NAS of Ukraine. – No 2002032146 ; appl. 18.03.2002 ; publ. 15.08.2005, Bul. N 8.
56. Pat. 90935 UA, IPC C 12 N 9/74 (2006.01). The method for producing a thrombin. / Platonova T.N., Koroleva D.S., Chernyshenko T.M., Hornytska O.V., Hryshuk V.I., Chernyshenko V.O., Lugovskoi E.V., Komisarenko S.V.; patent owner the Palladin Institute of Biochemistry of the NAS of Ukraine. – No u201401076 ; appl. 05.02.2014 ; publ. 10.06.2014, Bul. N 11.
57. Pat. 100467 UA, IPC (2015.01)A61P 19/00A61P 31/00A61K 35/14 (2015.01)A61K 35/16 (2015.01). The method for producing autologous fibrin gel to stimulate the regeneration of bone and soft tissue and reduce inflammation intensity / Komisarenko S.V., Lugovskoi E.V., Rublenko M.V., Andriets V.G., Koroleva D.S., Chernyshenko T.M., Hornytska O.V., Platonova T.M., Makogonenko E.M., Chernyshenko V.A.; patent owner the Palladin Institute of Biochemistry of the NAS of Ukraine. – No u201501208 ; appl. 13.02.2015 ; publ. 27.07.2015, Bul. N 14.
58. Gritsenko PG, Lugovskoy EV, Koshel TA, Cherenok SO, Yushchenko OA, Chernishov VI, Kalchenko VI, Komisarenko SV. The effect of calixarene-methylenbisphosphonic acids on fibrin polymerization. *Rep Nat Acad Sci Ukraine*. 2010; (1): 175-179.
59. Belenky ML. Elements of quantitative assessment of a pharmacological effect. State edition of the medical literature. Leningrad: Medgiz, 1963. 148 p.

Отримано 11.05.2016