

## КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ D-ДИМЕРА И РАСТВОРИМОГО ФИБРИНА В ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА И ГИПЕРТОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ

Э. В. ЛУГОВСКОЙ, И. Н. КОЛЕСНИКОВА, Н. Э. ЛУГОВСКАЯ,  
Л. М. ЛИТВИНОВА, П. Г. ГРИЦЕНКО, Г. К. ГОГОЛИНСКАЯ, Е. Д. ЛЯШКО,  
Е. П. КОСТЮЧЕНКО, Г. А. РЕМИЗОВСКИЙ, В. Н. ПЕДЧЕНКО, С. В. КОМИСАРЕНКО

Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Киев;  
e-mail: lougovsk@biochem.kiev.ua

Розроблено імуноферментний метод кількісного визначення D-димеру фібрину у плазмі крові людини на основі моноклональних антитіл III-3b та II-4d. Метод апробовано при визначенні концентрації D-димеру у плазмі крові хворих на ішемічну хворобу серця із стенокардією і без стенокардії та на гіпертонічну хворобу. Зроблено висновок, що за розвитку ішемічної хвороби серця із стенокардією та без такої, а також гіпертонічної хвороби вміст D-димеру звичайно не перевищує верхню межу норми – 500 нг/мл (у 64, 76 та 95% випадків відповідно). За проведення напівкількісного визначення вмісту розчинного фібрину у плазмі крові хворих на ішемічну хворобу серця та гіпертонічну хворобу показано, що за таких патологій виявляються значні коливання рівня розчинного фібрину: від < 0,03 до 0,15 мг/мл, але не спостерігається кореляція між вмістом D-димеру та розчинного фібрину. За допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію у складі розчинного фібрину виявлено лише продукти з молекулярною масою, яка відповідає такої фібрин(оген)у. Дійшли висновку, що в разі розвитку зазначених патологій у складі розчинного фібрину визначаються лише олигомери фібрину (можливо із включенням фібриногену), які не стабілізовані ковалентно фактором XIIIa.

**К л ю ч о в і с л о в а:** D-димер фібрину, розчинний фібрин, ішемічна хвороба серця, гіпертонічна хвороба.

**В** крові человека существуют две антагонистические системы – свертывания крови и фибринолиза. Первая приводит к образованию растворимого фибрина и/или формированию тромба, вторая – к их расщеплению. В результате активации системы свертывания крови образуется тромбин, который вначале отщепляет от фибриногена один фибринопептид А, в результате чего образуется так называемый профибрин (фибрин дезА) [1], а затем от профибрина отщепляется второй фибринопептид А и образуется фибрин дезАА. Профибрин, фибрин дезАА и фибриноген могут объединяться между собой в димерные или тримерные комплексы различного состава [2, 3]. Фибрин дезАА образует далее растворимые олигомеры различной длины [4, 5]. Такие комплексы и олигомеры являются компонентами растворимого фибрина, на которых тромбин активирует фактор XIII, превращая его в фактор XIIIa, а тканевой активатор пламиногена превращает пламиноген в плазмин. Фактор XIIIa стабилизирует фибрин, соединяя его молекулы изопептидными связями по  $\gamma$ -, а затем и  $\alpha$ -цепям. Образующийся плазмин отщепляет вначале от фибрина  $\alpha$ C-домены, а затем

NH<sub>2</sub>-концевые фрагменты В $\beta$ -цепей. В результате на первой стадии фибринолиза фибрин превращается в X-фрагменты, находящиеся в составе различных комплексов или олигомеров [6–8]. Поэтому понятие “растворимый фибрин” включает не только растворимые его комплексы и олигомеры, стабилизированные или нестабилизированные фактором XIIIa, но и все начальные продукты расщепления этих комплексов и олигомеров плазмином. Молекулярный состав растворимого фибрина *in vivo* зависит от концентрационных соотношений трех ферментов – тромбина, фактора XIIIa и пламина. В процессе образования тромбина растворимые олигомеры фибрина дезАА после достижения критической длины, составляющей 7–8 молекул в составе каждой из нитей, превращаются в протофибриллы, которые латерально ассоциируются с образованием фибрилл [9]. Уже на уровне протофибрилл резко ускоряется отщепление фибринопептидов В от фибрина дезАА тромбином, что приводит к усилению латеральной ассоциации протофибрилл [10, 11]. Фибриллы путем продолжающейся латеральной ассоциации и ветвления образуют трехмерную сеть фибрина, которая является каркасом

образующегося тромба. Плазмин расщепляет фибрин в составе тромбов с образованием различных растворимых фрагментов. Самым крупным конечным продуктом фибринолиза является E<sub>3</sub>-фрагмент, который представляет собой центральную часть молекулы фибрина (Aα 20-78, Bβ 54-120, γ 1-53)<sub>2</sub>, и D-димер, включающий два D-домена двух молекул фибрина, соединенных изопептидными связями (Aα 105-206, Bβ 134-461, γ 63-411)<sub>2</sub> [12–14].

Многие заболевания человека, такие как тромбоз глубоких вен, тромбоэмболия легочных артерий, ДВС-синдром, инфаркт миокарда, ишемический инсульт, онкозаболевания и др. сопровождаются аномальной активацией системы свертывания крови или являются ее следствием. Такая активация приводит как к образованию фибрина, так и к его расщеплению. Одними из самых важных молекулярных маркеров указанных процессов являются растворимый фибрин и D-димер [15–17]. Так, если в норме концентрация D-димера в плазме крови не превышает по данным разных авторов 300–500 нг/мл [18, 19], то, например, при ДВС-синдроме его концентрация может превышать норму в 50–70 раз [20].

В данной работе представлен метод количественного определения D-димера в плазме крови человека, основанный на бисайтовом иммуноферментном анализе с использованием полученных авторами моноклональных антител (монАТ) III-3b и II-4d к D-димеру человека. Антитела монАТ III-3b обладают высокой специфичностью к D-димеру и не реагируют перекрестно с фибриногеном [21], а монАТ II-4d перекрестно реагируют с фибриногеном и обладают ингибиторными свойствами в отношении полимеризации фибрина [22]. Применение этого метода показано на примере анализа плазмы крови больных ишемической болезнью сердца без стенокардии и со стенокардией, больных с острыми нарушениями мозгового кровообращения, а также больных гипертонической болезнью. В случае больных ишемической болезнью сердца и гипертонической болезнью параллельно с измерением концентрации D-димера мы проводили также полуколичественное определение содержания растворимого фибрина в плазме крови этих же больных и исследовали его молекулярный состав с помощью электрофореза. В статье обсуждаются взаимосвязь и диагностическая роль определения D-димера и растворимого фибрина в плазме крови.

### Материалы и методы

Изучали кровь больных, находящихся в стационаре Института кардиологии им. Н. Д. Стра-

жеско АМН Украины и в Больнице для ученых НАН Украины г. Киева. Кровь отбирали из локтевой вены с помощью S-Monovette («Sarstedt», США), содержащих 1/10 объема 3,8%-го раствора цитрата натрия, и центрифугировали при 1500 г 20 мин. К полученной таким образом плазме крови добавляли контрикал («Arzneimittelwerk Dresden GmbH», Германия) до конечной концентрации 20 ед/мл.

D-димер получали из плазминового гидролизата фибрина методом аффинной хроматографии на фибрин-сефарозе [23] с некоторыми модификациями. К раствору 1%-го фибриногена в 0,05 М трис-НСl-буфере, рН 7,6; 0,2 М NaCl; 2,5·10<sup>-2</sup> М CaCl<sub>2</sub>; 0,02% NaN<sub>3</sub> добавляли тромбин (0,5 НИН на 1 мг фибриногена). Инкубационную смесь выдерживали при 37 °С на протяжении 8 ч. Образование изопептидных связей между молекулами образующегося фибрина происходило при каталитическом действии эндогенного фактора XIIIa, присутствующего в препарате фибриногена. Затем в реакционную среду вносили раствор плазмينا (на 1 мг фибриногена 0,03 каз.ед.). Реакционную смесь выдерживали 24 часа при температуре +37 °С. Гидролиз останавливали добавлением контрикала из расчета 40 мкг/мл. Далее раствор гидролизата диализировали против буферного раствора, содержащего 0,05 М трис-фосфат с рН 6,9; 0,1 М NaCl; 0,025 М ε-аминокапроновую кислоту и 10<sup>-4</sup> М CaCl<sub>2</sub>. После диализа гидролизат наносили на колонку с фибрин-сефарозой, уравновешенной таким же буферным раствором. После элюции несвязавшегося материала (до значений E<sub>280</sub> = 0,020) элюирующий буфер заменяли 0,05 М трис-фосфатным буфером с рН 5,9 и 0,25 М NaCl, а также 0,025 М ε-аминокапроновой кислотой с 10<sup>-4</sup> М CaCl<sub>2</sub> и промывали колонку до значений E<sub>280</sub> = 0,020. Затем промывочный буфер заменяли 0,05 М трис-фосфатным буфером с рН 5,0 и 1,0 М NaCl; а также 0,025 М ε-аминокапроновой кислотой и 10<sup>-4</sup> М CaCl<sub>2</sub>, в котором элюировался D-димер. После этого раствор D-димера диализировали против 0,05 М аммоний-ацетатного буфера с рН 8,5 и лиофилизировали. Чистоту препарата D-димера определяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ).

Количественные определения D-димера в плазме крови больных проводили с помощью бисайтового иммуноферментного анализа. При этом монАТ III-3b, специфично реагирующие с D-димером, иммобилизовали на полистирольной плашке с повышенными сорбционными свойствами («NUNC», Дания). В лунки вносили по 110 мкл раствора монАТ III-3b с концентрацией 10 мкг/мл в 0,01 М K<sup>+</sup>-фосфатном буфере с

0,14 М NaCl и pH 7,4 (ФБ). Сорбция антител происходила в течение 18 час при 4 °С. После этого плашку промывали шесть раз водой, остатки влаги удаляли, в лунки плашки добавляли по 100 мкл раствора ФБ, содержащего 0,05% твин-20 (ТФБ) и затем выдерживали плашку 30 мин при комнатной температуре. ТФБ тщательно удаляли (без промывания) и в лунки плашки вносили по 100 мкл образцов плазмы, разведенной в 10 раз раствором ФБ, содержащим 0,1% твина-20, 5% сухого обезжиренного молока («Amersham pharmacia biotech», Швеция, RPN2195) и 0,38% цитрата натрия. Плашку выдерживали 1 час при 37 °С, промывали шесть раз водой и добавляли по 100 мкл раствора ТФБ. Через 3 мин из лунок плашки удаляли ТФБ и добавляли в них по 100 мкл раствора биотинилированных монАТ II-4d в ТФБ в концентрации 0,5 мкг/мл. Инкубацию проводили 1 час при 37 °С. Промывали плашку, как описано выше, и в лунки добавляли раствор конъюгата стрептавидина с пероксидазой из хрена («Amersham pharmacia biotech», Швеция) в разведении 1 : 1000. Плашку выдерживали 1 час при 37 °С, промывали описанным выше способом, и в лунки вносили по 100 мкл субстратной смеси (0,05 М К-фосфатный буфер с pH 6,0, содержащий H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и *o*-фенилендиамин в конечной концентрации 0,03% и 0,4 мг/мл соответственно). Реакцию останавливали добавлением в каждую лунку по 50 мкл 2 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Экстинкцию растворов в лунках измеряли при 490 нм на MicroELISA Reader. Концентрацию D-димера в плазме определяли по калибровочной кривой, для которой растворы D-димера с диапазоном концентраций 0,015–1,000 мкг/мл вносили в лунки плашки с сорбированными монАТ III-3b. Лунки с растворами D-димера, которые использовали для построения калибровочной кривой, и с образцами тестируемой плазмы обрабатывали одновременно.

Определение содержания растворимого фибрина в плазме крови больных проводили по методу В. А. Белицера и Т. В. Варецкой [24]. Для этого 0,25 мл плазмы вносили в пробирку, прибавляли к ней 0,25 мл 0,1 М фосфатного буфера с pH 7,5, содержащего 0,065 М NaCl, 0,2%  $\epsilon$ -аминокапроновой кислоты, 0,1% цитрата натрия, тщательно перемешивали и термостатировали при 20–22 °С. После этого к раствору прибавляли 0,4 мл 1,0 М К<sup>+</sup>-фосфатного буфера с pH 7,5 и выдерживали 30 мин при 20–22 °С. Наличие нерастворимых ассоциатов фибрина оценивали визуально. В специальных опытах авторами данного метода было показано, что легкое помутнение раствора соответствует диапазону концентраций растворимого фибрина в плазме

крови 0,03 мг/мл – 0,035 мг/мл, мутность с образованием пластинок – 0,06 мг/мл – 0,075 мг/мл, образование пластинок и нитей – 0,09 мг/мл – 0,1 мг/мл, гелеобразный сгусток – 0,14 мг/мл – 0,15 мг/мл.

Для исследования молекулярного состава растворимого фибрина растворы, в которых наблюдалось наличие твердофазного фибрина, центрифугировали при 2200 g 15 мин при комнатной температуре. Для промывания полученных осадков к ним добавляли по 1,5 мл смеси трех растворов: 1) 0,15 М NaCl, 2) 0,1 М фосфатного буфера (pH 7,5), 0,065 М NaCl, 0,2%  $\epsilon$ -аминокапроновой кислоты и 0,1 % цитрата натрия, 3) 0,4 мл 1,0 М К<sup>+</sup>-фосфатного буфера (pH 7,5) в соотношении 0,25 : 0,25 : 0,4. Далее твердофазный материал осаждали центрифугированием при 2200 g в течение 15 мин при комнатной температуре и повторяли процедуру промывания еще два раза. К полученным осадкам добавляли по 30 мкл раствора, содержащего 4 М мочевины и 2%-й додецилсульфат натрия (Ds-Na), прогревали растворенные осадки 5 мин при 90 °С и исследовали их с помощью электрофореза в ПААГ по описанной ранее методике [25].

### Результаты и обсуждение

В отделе молекулярной иммунологии Института биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины были получены 16 гибридом, продуцирующих монАТ к D-димеру фибрина человека различной специфичности. Только одна из гибридом продуцировала монАТ III-3b, высоко специфичные к D-димеру, которые перекрестно не реагировали с фибриногеном. Мы использовали эти монАТ III-3b в качестве связывающих (catch) антител для количественного определения D-димера в бисайтовом иммуноферментном анализе. В качестве вторых (tag) антител были использованы полученные нами монАТ II-4d к D-димеру, которые не конкурировали с первыми антителами III-3b. Апробация метода была проведена нами на плазме крови больных ишемической болезнью сердца без стенокардии и со стенокардией, с гипертонической болезнью, а также с острыми нарушениями мозгового кровообращения.

На рис. 1 представлены результаты количественного определения D-димера в плазме крови больных с указанными заболеваниями. В случае ишемической болезни сердца без стенокардии концентрация D-димера наблюдалась выше предельно допустимой нормы (500 нг/мл) в 5 случаях из 14 обследованных. В одном случае это превышение составляло 9 раз. Из группы, состоящей из 21 больного ишемической болезнью сердца со стенокардией, у 5 концентрация D-димера была

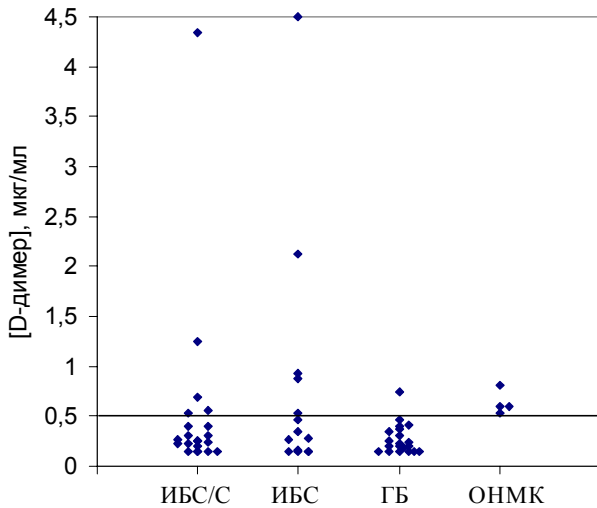


Рис. 1. Содержание D-димера в плазме крови больных ишемической болезнью сердца со стенокардией (ИБС/С), ишемической болезнью сердца без стенокардии (ИБС), гипертонической болезнью (ГБ) и с острыми нарушениями мозгового кровообращения (ОНМК).

выше предельно допустимой нормы, причем в одном случае это превышение было также примерно в 9 раз. В случае исследования больных гипертонической болезнью незначительное повышение концентрации D-димера наблюдалось лишь в одном случае из 20. При острых нарушениях мозгового кровообращения у всех 5 обследованных больных наблюдалось незначительное повышение концентрации D-димера.

Параллельные измерения содержания растворимого фибрина в плазме крови больных ишемической болезнью сердца показали, что при ишемической болезни сердца без стенокардии незначительное повышение содержания растворимого фибрина (0,03 мг/мл – 0,035 мг/мл) и значительное повышение растворимого фибрина (> 0,06 мг/мл) наблюдалось в 4 случаях из 14, а в 6 случаях растворимый фибрин отсутствовал (таблица); в случае ишемической болезни сердца со стенокардией незначительное повышение со-

держания растворимого фибрина наблюдалось в 7 случаях, значительное – в 9 случаях, а в 5 случаях – растворимый фибрин отсутствовал; при обследовании 20 больных с гипертонической болезнью незначительное повышение содержания растворимого фибрина наблюдалось в 7 случаях, значительное – в 10 случаях, а в 3 случаях растворимый фибрин отсутствовал. Корреляции между концентрациями D-димера и растворимого фибрина в плазме крови во всех трех группах больных мы не наблюдали (для больных ишемической болезнью сердца со стенокардией  $r = -0,233$ ; для больных ишемической болезнью сердца без стенокардии  $r = -0,020$ ; для больных гипертонической болезнью  $r = 0,051$ ).

Нами был также изучен молекулярный состав растворимого фибрина с помощью электрофореза в ПААГ в присутствии Ds-Na. Получены электрофоретические показатели, которые свидетельствуют о присутствии лишь продуктов с молекулярной массой, близкой к таковой фибриногена (рис. 2, линии 3, 4, 5). Поскольку при данной постановке эксперимента свободный фибриноген не высаливается, можно сделать вывод о том, что основным компонентом растворимого фибрина у исследованных больных является, очевидно, олигомерный фибрин, не стабилизированный фактором XIIIa. На электрофореграммах продукты деградации фибрина представлены в следовых количествах. Следует отметить, что в ранних опытах, когда в исследуемые образцы плазмы крови не добавляли ингибитор фибринолиза контрикал, получали другие электрофоретические показатели, которые свидетельствуют о значительных количествах конечных продуктов деградации фибрина (рис. 2, линия 2).

Таким образом, проведена апробация разработанного нами иммуоферментного метода количественного определения D-димера на плазме крови пациентов с разными заболеваниями. Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что данный метод отличается высокой точностью и хорошей воспроизводимостью. При ишемической болезни сердца со стенокардией и без стенокардии, а также гипертонической бо-

Процентное распределение больных ишемической болезнью сердца со стенокардией (ИБС/С,  $n=21$ ), ишемической болезнью сердца без стенокардии (ИБС,  $n=14$ ) и гипертонической болезнью (ГБ,  $n=20$ ) в зависимости от количества растворимого фибрина в плазме крови

Количество больных, %	Концентрация растворимого фибрина в плазме крови, мг/мл				
	< 0,03	0,03–0,035	0,06–0,075	0,09–0,1	0,14–0,15
ИБС/С ( $n=21$ )	23,8	33,3	23,8	14,3	4,7
ИБС ( $n=14$ )	42,9	28,6	14,3	7,1	7,1
ГБ ( $n=20$ )	15	35	35	15	0

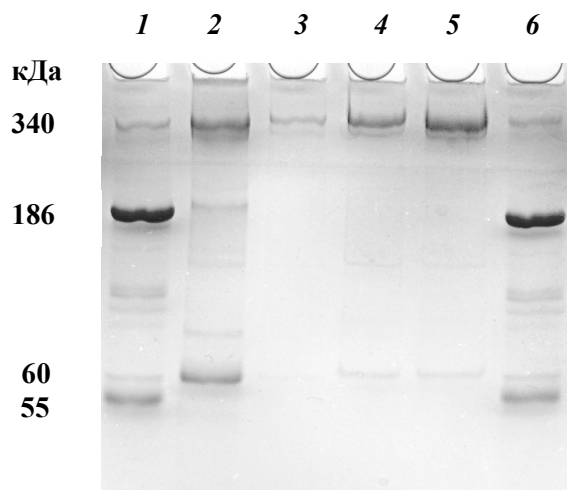


Рис. 2. Электрофорезграмма растворимого фибрина из плазмы крови больных ишемической болезнью сердца со стенокардией (7%-й ПААГ, 0,1%-й  $Ds-Na$ ). 1, 6 – маркеры молекулярной массы (фибриноген, D-димер,  $E_1$ - и  $E_2$ -фрагменты фибрина); 2 – образец растворимого фибрина из плазмы крови, к которой не был добавлен контрикал; 3, 4, 5 – образцы растворимого фибрина из плазмы крови, к которой был добавлен контрикал до конечной концентрации 20 ед/мл.

лезни содержание D-димера в крови больных, как правило, не превышает верхний предел нормы (64,3%, 76,2% и 95% случаев соответственно). Эти результаты, касающиеся прежде всего крови больных гипертонической болезнью, совпадают с данными литературы и объясняются, очевидно, отсутствием заметного внутрисосудистого тромбообразования при этих патологиях [26–28]. Случаи повышенного содержания D-димера в плазме крови больных связаны, по-видимому, с сопутствующими заболеваниями, которые сопровождаются образованием фибрина. Наряду с определением концентрации D-димера мы исследовали содержание растворимого фибрина в плазме крови больных с указанными патологиями. Мы не обнаружили корреляции между содержанием в плазме их крови D-димера и растворимого фибрина. Очевидно, это объясняется тем, что по данным электрофореза в составе растворимого фибрина присутствует лишь фибрин, нестабилизированный фактором XIIIa. Поэтому повышенное содержание растворимого фибрина может не сопровождаться увеличением концентрации D-димера. Напротив, повышенное содержание D-димера без увеличения концентрации растворимого фибрина может объясняться лизисом уже сформированного тромба при отсутствии или подавлении антикоагулянтами ак-

тивации системы свертывания крови. Имеются данные о том, что даже у здоровых доноров нередко наблюдается повышенный уровень растворимого фибрина, возможно связанный с различным состоянием организма человека [29]. Результаты, полученные при исследовании плазмы крови больных с острыми нарушениями мозгового кровообращения, требуют дополнительных исследований. Предварительно можно отметить небольшое, но выявленное во всех случаях повышенное содержание D-димера, которое может объясняться лизисом тромбов небольшого размера в сосудах головного мозга.

Таким образом, количественное определение концентрации D-димера в плазме крови в сочетании с определением в ней содержания растворимого фибрина дает полезную информацию о степени активации системы свертывания крови и фибринолиза у больных.

#### QUANTIFICATION OF D-DIMER AND SOLUBLE FIBRIN IN BLOOD PLASMA AT ISCHEMIC HEART DISEASE AND HYPERTENSION

*E. V. Lugovskoy, I. N. Kolesnikova, N. E. Lugovskaya, L. M. Litvinova, P. G. Gritsenko, G. K. Gogolinskaya, E. D. Lyashko, E. P. Kostyuchenko, G. A. Remisovsky, V. N. Pedchenko, S. V. Komisarenko*

Palladin Institute of Biochemistry,  
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;  
e-mail: lougovsk@biochem.kiev.ua

#### S u m m a r y

The method of D-dimer quantification in the human blood plasma has been developed using monoclonal antibodies III-3b and II-4d. The method has been verified on the blood plasma of the patients with ischemic heart disease with and without stenocardia and with hypertension. The results showed that at ischemic heart disease with and without stenocardia and at hypertension the quantities of D-dimer in the blood plasma were generally less than the highest normal level 500 ng/ml (64.3%, 76.2% and 95%, correspondingly). The semiquantitative measurements of soluble fibrin levels in blood plasmas of the patients with ischemic heart disease and hypertension have been performed. It has been shown that the quantity of soluble fibrin at these diseases range greatly from < 0.03 mg/ml to 0.15 mg/ml. There was no correlation between the quantities of D-dimer and soluble fibrin in blood plasmas of the patients. Electrophoresis in PAAG with SDS showed that the soluble fibrin at these diseases had the mo-

lecular mass of the fibrin (ogen). Thus the soluble fibrin in blood plasmas analysed consisted mainly of fibrin desAA oligomers (may be with fibrinogen incorporation) which are not stabilized by the factor XIIIa.

**К е у w o r d s:** fibrin D-dimer, soluble fibrin, ischemic heart disease, hypertension.

1. *Shainoff J. R., Smejkal G. B., DiBello P. M. et al.* // J. Biol. Chem. 1996. **271**, N 39. P. 24129–24137.
2. *Shainoff J. R., Page I. H.* // J. Exp. Med. 1962. **116**. P. 687–707.
3. *Луговской Э. В., Гоголинская Г. К., Дерзская С. Г.* // Укр. биохим. журн. 1983. **55**, № 3. С. 250–253.
4. *Smith G. F.* // Biochem. J. 1980. **185**. P. 1–11.
5. *Угарова Т. П., Луговской Э. В., Горкун О. В., Дерзская С. Г.* // Укр. биохим. журн. 1983. **55**, № 3. С. 254–260.
6. *Gaffney P. J.* // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1983. **408**. P. 407–423.
7. *Pfitzner S. A., Dempfle C. E., Matsuda M., Heene D. L.* // Thromb. Haemost. 1997. **78**, N 3. P. 1069–1078.
8. *Gron B., Filion-Myklebust C., Bennick A. et al.* // Blood Coagul. Fibrinolysis. 1992. **3**, N 6. P. 731–736.
9. *Weisel J. W.* // Biophys. J. 1986. **50**, N 6. P. 1079–1093.
10. *Mihalyi E.* // Biochemistry. 1988. **27**, N 3. P. 967–976.
11. *Wiltzius P., Dietler G., Kanzig W. et al.* // Biopolymers. 1982. **21**, N 11. P. 2205–2223.
12. *Walker J. B., Nesheim M. E.* // J. Biol. Chem. 1999. **274**, N 8. P. 5201–5212.
13. *Olexa S. A., Budzynski A. Z., Doolittle R. F. et al.* // Biochemistry. 1981. **20**, N 21. P. 6139–6145.
14. *Collen D., Kudryk B., Hessel B., Blomback B.* // J. Biol. Chem. 1975. **250**, N 15. P. 5808–5817.
15. *Prisco D., Antonucci E., Marcucci R., Pepe G.* // Ann. Ital. Med. Int. 2000. **15**, N 4. P. 267–72.
16. *Stein P. D., Hull R. D., Patel K. C. et al.* // Ann. Intern. Med. 2004. **140**, N 8. P. 589–602.
17. *Dempfle C. E.* // Thromb. Haemost. 1999. **82**, N 2. P. 673–683.
18. *Serra J., Tumanova I., Llop T.* // Clinical Hemostasis Review. 1998. N 12. P. 6–7.
19. *Durieux P., Dhote R., Meyniard O. et al.* // Thromb. Res. 2001. **101**, N 4. P. 261–266.
20. *Horan J. T., Francis C. W.* // Semin. Thromb. Hemost. 2001. **27**, N 6. P. 657–667.
21. *Lugovskoy E. V., Kolesnikova I. N., Gritsenko P. G. et al.* // Thromb. Res. 2002. **107**, N 3–4. P. 151–156.
22. *Lugovskoy E. V., Gritsenko P. G., Kolesnikova I. N. et al.* // Ibid. 2004. **113**, N 3–4. P. 251–259.
23. *Marder V. J., Budzynski A. Z., Barlow G. H.* // Biochim. Biophys. Acta. 1976. **427**. P. 1–14.
24. *Варецька Т. В., Михаловська Л. І., Світальська Л. О., Єна Я. М.* // Клін. лаб. діагностика. 1992. № 7–8. С. 10–14.
25. *Schagger H., Von Jagow G.* // Anal. Biochem. 1987. **166**. P. 368–379.
26. *Roldan Schilling V., Marin Ortuno F., Pineda Rocamora J. et al.* // Rev. Esp. Cardiol. 2001. **54**, N 10. P. 1155–1160.
27. *Sechi L. A., Zingaro L., Catena C. et al.* // Hypertension. 2000. **36**, N 6. P. 978–985.
28. *Trifiletti A., Barbera N., Pizzoleo M. A. et al.* // Haemostasis. 1995. **25**, N 5. P. 237–240.
29. *Gaffney P. J.* // Ann. N. Y. Acad. Sci. 2001. **936**. P. 594–610.

Получено 03.06.2004