

# THE HISTORY OF BIOCHEMISTRY

УДК 577.112:612.115

doi: <http://dx.doi.org/10.15407/ubj88.04.129>

## ВИНАХІДНИЦЬКА ДІЯЛЬНІСТЬ ВІДДІЛІВ ХІМІЇ І БІОХІМІЇ ФЕРМЕНТІВ ТА СТРУКТУРИ І ФУНКЦІЇ БІЛКА ІНСТИТУТУ БІОХІМІЇ ІМ. О.В. ПАЛЛАДІНА НАН УКРАЇНИ.

### ЧАСТИНА ІІІ. ДІАГНОСТИЧНІ ТЕСТ-СИСТЕМИ ДЛЯ АНАЛІЗУ ФІБРИНОЛІТИЧНОЇ СИСТЕМИ КРОВІ ТА НОВІ ПІДХОДИ ДО ЛІКУВАННЯ ТРОМБОЗІВ

В. М. ДАНИЛОВА, Р. П. ВІНОГРАДОВА, І. Ю. ЧЕРНИШ

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;  
e-mail: [valdan@biochem.kiev.ua](mailto:valdan@biochem.kiev.ua)

У цій статті ми продовжуємо аналізувати наукові розробки Інституту біохімії, присвячені дослідженню проблем, пов'язаних із системою гемостазу. Якщо в попередніх двох статтях більше йшлося про дослідження протеїнів зсідання крові і створення імуноензимних тест-систем для виявлення або виключення ризику тромбоутворення за різних патологій, то в цій роботі ми зупинимося на дослідженнях *фібринолітичної системи крові* та нових підходах до лікування тромбозів, розроблених співробітниками Інституту.

*Фібриноліз* – процес розчинення *тромбів*, невід'ємна частина *системи гемостазу* – завжди супроводжує процес *зсідання крові* і підтримується низкою факторів. Цей процес є важливою захисною реакцією організму, що попереджає закупорку *кровоносних судин* згустками *фібрину*. *Фібриноліз* сприяє реканалізації судин після зупинки *кровотечі*. Він розщеплює *фібрин* за дії *плазміну*, який присутній в *плазмі крові* у вигляді неактивного попередника (проензиму) – *плазміногену*. Останній активується одночасно з початком процесу зсідання крові.

Ключовим проензимом (зимогеном) системи *фібринолізу* є *плазміноген* – одноланцюговий глікопротеїн з мол. масою 92 кДа, який після активації ендогенними або екзогенними активаторами перетворюється на активний ензим – *плазмін*. Процес активації *плазміногену* полягає в ензиматичному гідролізі пептидного зв'язку Arg 561–Val 562. Внаслідок цьо-

го формується активний центр з утворенням *плазміну* – ензиму, який складається з важкого (А) і легкого (В) ланцюгів, що з'єднані між собою двома дисульфідними зв'язками. У вільному стані *плазмін* практично відразу взаємодіє з  $\alpha_2$ -антиплазміном. Для структури важкого ланцюга *плазміногену* характерна наявність п'яти ділянок гомологічної послідовності, які мають назву «*крингли*».

Функціонування *фібринолітичної системи* обумовлено збалансованою взаємодією активаторів та інгібіторів *плазміногену*. Відомо три типи фізіологічних активаторів *плазміногену*: *урокиназа*, яка забезпечує протеоліз на поверхні клітин активацією *плазміногену* з наступною деградацією клітинного матриксу; *фактор ХІІа* (*фактор Хагемана*), внесок якого в потенціал *фібринолітичної системи* незначний; *тканинний активатор плазміногену*, якому належить основна роль в деградації *фібрину* і *тромбів* у крові. До екзогенних активаторів *плазміногену* належить *стрептокіназа* (протеїн бактеріального походження), а також *рекомбінантні препарати тканинного активатора плазміногену і урокинази*, які вводять в організм з лікувальною метою.

В *плазмі крові* містяться інгібітори *фібринолізу*. Потужним інгібітором *плазміну* є  $\alpha_2$ -антиплазмін. *Фібриноліз* також гальмується  $\alpha_2$ -макроглобуліном, який утворює комплекси із *сериновими протеїназами*, знижуючи їхню активність. *Інгібітори активаторів*

плазміногену утворюються в ендотелії та депонуються в тромбоцитах.

Отже, *фібринолітична активність крові* визначається самостійними відношеннями активаторів та інгібіторів процесу фібринолізу. Існує також група модуляторів фібринолітичної системи, а механізм руйнування фібринового згустку спрощено можна описати таким чином. Плазміноген активується тканинним активатором на поверхні фібринового згустку, де і знаходяться всі компоненти, необхідні для цього процесу. Зв'язаний на поверхні фібрину плазмін значною мірою захищений від інгібувальної дії  $\alpha_2$ -антиплазміну, який є фізіологічним інгібітором плазміну. Це дає змогу забезпечити лізис фібринового згустку в присутності інгібітора. Після ензиматичного розщеплення фібрину на його фрагменти плазмін вивільняється в кров'яне русло, де швидко і незворотно інгібується  $\alpha_2$ -антиплазміном.

В останні десятиріччя розвиток технології інактивації генів, створення трансгенних тварин із дефіцитом певних протеїнів, а також великий експериментальний матеріал, одержаний під час роботи з різними лініями клітин, дали можливість встановити, що плазміноген/плазмінова система виконує в організмі багато різних функцій як за нормальних, так і патологічних умов, і бере участь в таких процесах, як *ремоделювання тканин, репродукція, ангиогенез, запалення, інвазії пухлинних клітин* тощо. Накопичується все більше експериментальних даних про участь плазміноген/плазміну у функціональній активності клітин, що реалізується через сигнальні внутрішньоклітинні шляхи. Тому у відділі хімії і біохімії ферментів на сучасному етапі розвитку дослідження спрямовані на вирішення проблем, пов'язаних із *тромбогенезом, онкогенезом і ангиопатіями* (Д. Д. Жерносеков, О. І. Юсова, Т. В. Гриненко) [1].

А починалося все це у 1966 р., коли на базі лабораторії хімії та біохімії ферментів, яку започаткував і очолював у 1963–1976 рр. д-р біол. наук, проф. **Олександр Соломонович Циперович**, було створено відділ хімії та біохімії ферментів. У цей період співробітниками відділу досліджувались гідролітичні ензими, зокрема і з мікроорганізмів, з метою використання їх у виробництві, про що детальніше йшлося у нашій попередній роботі [2].

У 1977–2009 рр. відділ очолював д-р біол. наук **Станіслав Олександрович Кудінов**. У 1980 р. він започаткував новий напрям роботи відділу – *дослідження механізмів функціонування і регуляції фібринолітичної системи крові*.

Впродовж багатьох років роботу відділу було спрямовано на дослідження *доменної структури плазміногену, механізму фібринолізу, створення афінно-хроматографічної системи для фракціонування протеїнів крові, конструювання афінних сорбентів* методом фотополімеризації, *створення тромболітичного лікарського препарату плазміногену*, розроблення концепції проведення тромболітичної терапії відповідно до механізму фібринолізу з використанням плазміногену як основного тромболітичного агента препарату.

На початку роботи під керівництвом С. О. Кудінова за цією тематикою у відділі було створено нові на той час *способи одержання плазміногену* [3–6], *іммобілізованого плазміногену* [7], *спосіб одержання плазміну* [8], а також *спосіб одержання активатора плазміногену із тваринної сировини* [9].

Внаслідок проведених фундаментальних досліджень [10] виявлено особливості структурної організації плазміногену, що полягає в тому, що крім *легкого ланцюга* в ньому міститься ще 5 *кринглів* із молекулярною масою близько 10 кДа, на яких розташовано ділянки взаємодії із протеїнами крові: *фібрином, продуктами деградації фібрину,  $\alpha_2$ -антиплазміном, гістидинзбагаченим глікопротеїном, із протеїнами, що секретиуються в кров за онкозахворювань*. Ці ділянки відіграють роль регуляторів у фібринолітичному процесі, що вже визначено структурою плазміногену та інших протеїнів, які беруть участь у цьому процесі.

Дослідження щодо з'ясування механізму функціонування та регуляції фібринолітичного процесу було розпочато у відділі зі створення афінних сорбентів для виділення *плазміногену* і всіх його *структурних фрагментів*. За допомогою гідролізу проензиму *еластазою* та іншими ензимами і використання синтезованих афінних сорбентів *структурні фрагменти плазміногену* було одержано у високоочищеному стані. Для їх очищення використовували синтезовані афінні сорбенти: *Lys-сефарозу, Arg-сефарозу, DH-*

фібриногенсефарозу, DL-фібриногенсефарозу, E-фібринсефарозу. А використання сорбенту *Lys-агарози* дало можливість розробити «Способ определения содержания плазминогена в биологической жидкости» [11]. Застосування останнього значно скоротило час аналізу (1 год порівняно з 24 год за способом-прототипом), при цьому точність методу зберігалась високою. Цей метод також дозволяє визначати вміст плазміногену в крові різних тварин незалежно від видової специфічності.

Розроблені афінні сорбенти було застосовано також для створення запатентованих способу інгібування серинових протеїназ у протеїновій суміші і способу очищення трипсину [12, 13].

З метою діагностики і лікування захворювань, пов'язаних із патологією системи гемостазу співробітниками відділу (С. О. Кудінов, Є. М. Макогоненко, Л.О. Колесник та ін.) було розроблено експрес-мікрометод визначення стану систем зсідання крові та фібринолізу, на який отримано авторське свідоцтво [14]. Метод дозволяє протягом кількох хвилин (до 10 хв) в 0,1 мл плазми крові одночасно встановити шість параметрів: швидкість і час активованого зсідання крові, концентрацію фібриногену, швидкість фібринолізу, час напівлізису і повного лізису фібринового згустка. Ці показники реєструють спектрофотометрично, вимірюючи світлорозсіювання за довжиною хвилі 350 нм. Наведені параметри і особливо візуальне сприйняття кривої активованих процесів зсідання крові і фібринолізу виявились високоінформативними завдяки тому, що давали можливість швидко й чітко визначити потенційний рівень рівноваги системи зсідання і фібринолізу крові. Цей метод може бути використано для з'ясування реакції крові хворого на введення того чи іншого лікарського препарату, в тому числі тромболітичного. За часом активованого напівлізису фібрину, що утворився в еуглобуліновій фракції крові, можна додатково визначити вміст плазміногену і  $\alpha_2$ -антиплазміну. Умови і схема проведення цього визначення дозволяє здійснити комп'ютеризацію процесу діагностичних досліджень плазми крові.

Багаторічні дослідження зі створення сорбентів для фракціонування протеїнів крові дозволили розробити ще один спосіб одержання афінного сорбенту для виділення плазміногену

із крові людини [15]. Він дав можливість одержати афінний сорбент методом фотоініційованої радикально-ланцюгової сополімеризації N-вінілпролідону з малеїновим ангідридом із наступним гранулюванням і приєднанням ліганду L-лізину. Результати біоспецифічної сорбції плазміногену із плазми крові людини афінними сорбентами, одержаними на основі фотосополімерів, показали, що виділений препарат *проензиму* є електрофоретично гомогенним і виявляє високу питому активність. *Важливим є те, що синтезовані сорбенти можуть бути використані протягом тривалого часу, тобто можливе неодноразове регенерування сорбентів, під час якого не втрачаються їхні хроматографічні властивості.*

Уявлення про поступове ускладнення регуляції в умовах гідролізу фібрину, про що йшлося вище, та накопичення продуктів його деградації, які зв'язують *плазміноген*, є винятково важливими у разі застосування останнього в тромболітичній терапії. Її ефективність, за даними С. О. Кудінова зі співавторами, має визначатися співвідношенням концентрацій плазміногену та його активатора, оскільки фізіологічний процес активації *плазміногену* потребує наявності лише трьох протеїнів: *фібрину*, *плазміногену* і *тканинного активатора плазміногену*. При цьому природа застосовуваних активаторів плазміногену, їхня фізіологічна активність, специфічність, їх комбінації і дози не є критичними.

Використання створених у відділі під керівництвом С. О. Кудінова афінних сорбентів дало можливість одержати *тромболітичний лікарський препарат плазміногену*. Після проведення доклінічних випробувань рішенням Фармакологічного комітету Міністерства охорони здоров'я Російської федерації (протокол № 15 від 26.08.1993 р.) підприємству «Діалек» (м. Мінськ, Білорусь) було дозволено провести клінічні випробування препарату «Плазміноген». У зв'язку з обмеженим обсягом його виробництва клінічні випробування було проведено тільки в Білорусі і в Росії і лише тільки для застосування в *офтальмології*. Міністерство охорони здоров'я республіки Білорусь зареєструвало лікарський препарат під назвою «Діарплазмін» (реєстраційне свідоцтво В-1-ЛС № 94/123/5 від 2 червня 1994 р.) та одержало дозвіл на його застосування. Згодом проведені

клінічні дослідження препарату *плазміногену* підтвердили його високу ефективність також для терапії інсультів, на основі чого було зроблено висновок: збільшення концентрації вільного *плазміногену* в крові супроводжується стійким зростанням *фібринолітичної активності*.

На жаль, з причини розпаду СРСР підприємство «Діалек» не надало цей препарат для апробації в Україні, *патент на нього у нас також не було одержано*.

Незалежно від обставин колектив співробітників відділу під керівництвом С. О. Кудінова продовжив спроби впровадження одержаного ними препарату «Плазміноген» в медичну практику вже на теренах України. Клінічні випробування його і комплексу «Плазміноген-стрептокіназа» було проведено в Українському НДІ очних хвороб і тканинної терапії імені акад. В. П. Філатова (м. Одеса) на 20 хворих на *гіфему* і *гемофтальм*. Спостереження показали, що за застосування препарату «Плазміноген» або його комплексу зі стрептокіназою в лікуванні *внутрішньоочних крововиливів* і *помутнінь скловидного тіла* дає позитивний ефект. Найефективнішим виявилось застосування препарату в ранні строки після крововиливів, що дозволило уникнути хірургічного втручання. Одержані клінічні результати дали можливість рекомендувати включення препарату «Плазміноген» як окремого, так і разом зі стрептокіназою в комплексну терапію хворих на *внутрішньоочні крововиливи* і *помутніння скловидного тіла*.

Таким чином, розробка і поетапне впровадження *афінно-хроматографічної системи* для фракціонування протеїнів крові, *конструювання афінних сорбентів* методом фотополімеризації дозволило *створити тромболітичний лікарський препарат* «Плазміноген» і рекомендувати його як основний тромболітичний агент для застосування в офтальмології, а також для лікування інфарктів, інсультів, тромбоемболії легень та інших тромбозів.

На жаль, всі наведені дуже важливі наукові і практичні розробки співробітників відділу під керівництвом С. О. Кудінова не було втілено ні в медичну практику, ні у фармацевтичну промисловість.

Механізми функціонування і регуляції *плазміноген/плазмінової системи* як складової гемостазу одночасно досліджувалися і у відділі

структури та функції білка Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України. Зокрема, під час вивчення активації ключових проензимів фібринолітичної системи за формування фібринового згустку було показано, що цей процес відбувається на стадії утворення надмолекулярних структур фібрину – *протофібрил* (Є. М. Макогоненко, Н. М. Дружина, 1997 р.) [16].

Співробітники відділу разом із науковцями лабораторії біологічних досліджень Оксфордського університету (Велика Британія) досліджували механізми неензимної активації *плазміногену стрептокіназою* і *моноклональним антитілами IV-1c Glu-плазміногену* людини. Внаслідок проведених експериментів було одержано нові дані щодо локалізації, функціональної ролі та комплементарності амінокислотних послідовностей молекул *плазміногену* і *стрептокінази*, які беруть участь у формуванні активного центру [17, 18].

Результати проведених досліджень дали можливість розробити *спосіб визначення концентрації антитіл проти стрептокінази в сироватці крові людини*, який ґрунтується на інгібуванні антитілами активації *плазміногену стрептокіназою* і визначенні амідазної та фібринолітичної активності новоутвореного *плазміну* [19]. Цей спосіб було запропоновано для використання в клінічній практиці під час тромболітичної терапії *стрептокіназою* (*на жаль, патента на нього немає*).

Одним із напрямів наукових досліджень відділу було також детальне вивчення ролі  $\alpha_2$ -антиплазміну на різних етапах фібринолітичного процесу. Серед інгібіторів фібринолітичної системи саме  $\alpha_2$ -антиплазмін відіграє важливу роль – він є основним високоспецифічним протеїновим *інгібітором плазміну швидкої дії*. У плазмі крові він утворює із плазміном ковалентний необоротний еквімолярний комплекс, запобігаючи неспецифічному протеолізу протеїнів плазми крові. Було досліджено *кінетику інгібування плазміну, міні- та мікроплазмінів*  $\alpha_2$ -антиплазміном і доведено, що наявність лізинзв'язувальних ділянок не є обов'язковим для процесу інгібування, хоча й впливає на його швидкість. Крім того  $\alpha_2$ -антиплазмін гальмує активацію *Glu-плазміногену* тканинним активатором на поверхні фібрину. Одержані дані дозволили припустити, що дія  $\alpha_2$ -антиплазміну відбувається

як на рівні інгібування активності плазміну, так і інгібування активності плазміногену тканинними активаторами [20, 21].

Виходячи з одержаних експериментальних даних, що свідчать про виключно важливу роль основного інгібітора плазміну в багатьох фізіологічних і патофізіологічних процесах в організмі людини, у відділі було розроблено метод виділення хроматографічно чистого, високоактивного  $\alpha_2$ -антиплазміну і отримано на нього патент на винахід [22]. Авторами запропоновано простий, високоспецифічний і швидкий спосіб одержання високоочищеного інгібітора плазміну із плазми крові людини. Цей спосіб дозволяє за один етап методом афінної хроматографії без застосування додаткових методів очистки (гель-фільтрації та іонообмінної хроматографії) одержати  $\alpha_2$ -антиплазмін без домішок фібриногену і гістидинзбагаченого протеїну з високою інгібіторною активністю. Високоочищений препарат  $\alpha_2$ -антиплазміну може бути використаний в біохімії – для дослідження механізмів регуляції фібринолізу і позаклітинного протеолізу, в медичній біохімії – для вивчення впливу на процеси інвазії та метастазування пухлинних клітин, а також у клінічній практиці – для кількісного визначення окремих компонентів протеїнів фібринолітичної системи. Його використання дозволило також одержати нові дані щодо механізму інгібування плазміну і взаємодії інгібітора з фібрином.

Від 2009 р. роботи з дослідження механізмів функціонування і регуляції системи плазміноген/плазмін було продовжено у відділі хімії та біохімії ферментів під керівництвом завідувача відділу, д-ра біол. наук, старшого наукового співробітника **Тетяни Вікторівни Гриненко**. Основним напрямом роботи відділу під її керівництвом стало дослідження механізмів функціонування та регуляції плазміноген/плазмінової системи як складової гемостазу; визначення структурних змін фібрину в процесі полімеризації, які необхідні для активації фібринолітичної системи; створення та апробація тест-систем для діагностики і попередження тромбогенних станів та ангіопатій.

Внаслідок проведених досліджень було встановлено, що продукти деградації фібрину, які утворюються під час гідролізу плазміном, забезпечують ініціацію реакції активації плазміногену тканинним активатором.

Одержані дані дозволили припустити, що накопичення продуктів деградації фібрину під час руйнування згустку може бути однією з причин їх резистентності до гідролізу.

В досліджах *in vitro* вперше показано, що протеїн С прискорює лізис згустків крові, ініційований тканинним активатором плазміногену, що вказує на існування ендотелійнезалежного шляху активації проензиму.

Доведено, що плазміноген/плазмінова система регулює функціональний стан тромбоцитів, обмежуючи їхню здатність до агрегації. Вперше було встановлено, що *Lys-плазміноген* (частково деградована форма проензиму), на відміну від *Glu-плазміногену* (нативної форми проензиму), селективно пригнічує агрегацію тромбоцитів людини, індуковану *ADP*, *тромбіном* і *колагеном*, але не впливає на ристоміцинзалежну аглютинацію тромбоцитів [23].

Одержані експериментальні результати дозволили припустити, що регуляція плазміноген/плазміновою системою функціонального стану тромбоцитів спрямована на обмеження як надмірного тромбоутворення в кровотоці, так і процесів ангіогенезу під час репарації тканин за участю тромбоцитів.

Слід зазначити, що фундаментальні високотеоретичні дослідження, які проводяться у відділі хімії та біохімії ферментів від початку його створення і дотепер, спрямовано на розв'язання найважливіших медико-біологічних проблем, зокрема тих, що стосуються серцево-судинних захворювань тромботичного генезу, які сьогодні займають перші позиції серед показників смертності населення у світі.

Як зазначалося на початку статті, за багатьох захворювань відбувається порушення балансу між системами зсідання і фібринолізу, що потребує контролю в плазмі крові кількості компонентів цих систем, зокрема плазміногену.

В медичній практиці для визначення плазміногену в крові використовуються методи, в основі яких лежать різні методичні підходи. Суттєвими недоліками цих методів є їхня трудомісткість, висока вартість, довготривалість аналізу, візуальна реєстрація результатів, одержання зовнішніх показників визначення концентрації проензиму, а не його функціональної активності.

Тому у відділі хімії та біохімії ферментів перед співробітниками було поставлено завдання розробити високочутливий, простий у виконанні, автоматичний і економічний спосіб визначення плазміногену в плазмі крові і на його основі створити тест-систему. *На спосіб визначення плазміногену в плазмі крові* автори отримали патент на корисну модель [24]. *Спосіб визначення концентрації плазміногену в крові полягає в визначенні часу лізису фібринового згустку, одержаного з використанням фібрин-мономера, за активації плазміногену стрептокіназою. За цим методом визначають напівлізис згустку фібрину, а концентрацію плазміногену – турбідиметричним методом за калібрувальним графіком.*

Запропонований авторами метод визначення вмісту плазміногену в плазмі крові людини є високоточним і відтворюваним за результатами. Пізніше було створено «*Тест-систему для визначення плазміногену в плазмі крові*» і одержано патент на винахід [25]. На основі одержаних моноспецифічних антитіл до певних крингловмісних фрагментів плазміногену запропоновано підходи для виявлення різних форм ангіостатинів у біологічному матеріалі.

Розроблені методи визначення функціонально активного тканинного активатора плазміногену та інгібітора активаторів плазміногену I-го типу (PAI-1) в плазмі крові [26, 27] із використанням фібрину як стимулятора реакції активації плазміногену, що забезпечує високу специфічність методу, *запропоновано для використання в клінічній лабораторній діагностиці.*

Гриненко Т. В. і Кондратюк А. С. розробили також швидкий, простий у виконанні, точний, кількісний *спосіб визначення фібриногену в плазмі крові*, оснований на реєстрації зміни оптичної густини розчину за утворення полімерного фібрину з фібриногену плазми за дії анцистрону-Н [28]. Цей спосіб придатний для використання у вітчизняній клініко-лабораторній практиці, що було успішно продемонстровано в клінічних умовах Національного Інституту хірургії та трансплантології ім. О.О. Шалімова [29]. Він також може бути застосований за гепаринотерапії.

З метою контролю якості фармацевтичної продукції співробітниками відділу розроблено і запропоновано низку способів виз-

начення активності низькомолекулярних і нефракціонованих гепаринів (Т. В. Гриненко, В. М. Рибачук, О. В. Левчук, Я. М. Рока-Мойя, Л. П. Рясенко, О. І. Юсова).

Препарати гепарину є сучасними ефективними лікарськими засобами для профілактики та терапії тромботичних станів. Антикоагулянтна дія гепарину є наслідком його зв'язування із протеїном плазми крові антитромбіном та наступного інгібування тромбіну і фактора зсідання крові Ха комплексом «антитромбін-гепарин».

Біологічна активність гепаринів залежить від довжини їхніх молекул: нефракціоновані гепарини (НГ), середня молекулярна маса яких становить 15 кДа, однаковою мірою гальмують активність фактора II-а і фактора Ха; низькомолекулярні гепарини (НМГ), молекулярна маса яких від 4,0 до 6,5 кДа, виявляють, практично, анти-Ха-факторну активність. Особливою властивістю НГ є їхня антикоагулянтна активність, а НМГ – анти-Ха-факторна активність.

У відділі було створено високочутливий, простий у виконанні автоматичний спосіб визначення антикоагулянтної активності НГ та анти-Ха-фактора НМГ як для субстанцій, так і готових лікарських форм гепаринів, а також для контролю очищення устаткування для їх виробництва.

Автори отримали *патент на спосіб визначення активності гепаринів для субстанцій і готових на їх основі лікарських форм* [30]. Цим способом активність гепаринів визначають із застосуванням каліброваного за стандартним розчином гепарину низькомолекулярного протеїну – протаміну сульфату. Відомо, що *протаміну сульфат* нейтралізує дію гепарину завдяки утворенню стабільних комплексів, через що гепарин втрачає здатність гальмувати зсідання крові.

У 2010 р. співробітники відділу (Т. М. Гриненко, В. М. Рибачук, Л. П. Рясенко, Я. М. Рока-Мойя, С. М. Харченко) запропонували *дві тест-системи для визначення анти-IIа-факторної активності низькомолекулярних гепаринів* (НМГ) і отримали **два патенти**: на корисну модель [31] і на винахід [32]. Основа методів – інгібування фактора IIа комплексом антитромбін III – НМГ під час утворення фібрину. При цьому субстратом фактора IIа

є фібриноген. Джерелом фізіологічного субстрату – фібриногену і антитромбіну III – є бідна на тромбоцити цитратна плазма крові. Запропоновані *тест-системи* високочутливі, прості у виконанні, економічні, автоматичні і дають можливість визначати анти-Па-факторну активність НМГ як у субстанціях, так і в готових лікарських формах.

У відділі також було розроблено *спосіб визначення активності гепаринів*, який зареєстровано Держпатентом України як корисна модель [33]. Запропонований авторами спосіб відрізняється від відомих тим, що він дає можливість визначати як антикоагулянтну активність нефракціонованого, так і анти-Ха-факторну активність низькомолекулярного гепарину. Його можна використовувати і для субстанцій, і для лікарських форм.

Таким чином, теоретичні (фундаментальні) знання функції окремих протеїнових молекул і механізмів регуляції процесів зсідання крові та фібринолізу, одержані в Інституті біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України під керівництвом д-рів наук С. О. Кудінова, Т. В. Гриненко, Є. М. Макогоненка, відкривають нові можливості для діагностики порушень системи гемостазу та контролю ефективності лікування серцево-судинних захворювань, а також сприяють розробленню технологій виділення нових протеїнів – потенційних терапевтичних агентів.

*Але, на жаль, всі наведені розробки поки що не знайшли втілення в медичну і фармацевтичну промисловість.*

*Автори висловлюють глибоку вдячність д-ру біол. наук Тетяні Вікторівні Гриненко за уважне прочитання цього рукопису, критичні і слушні зауваження, а також пров. інж. відділу науково-технічної інформації Світлані Павлівні Юрасовій за пошук і надання бібліографічної інформації щодо патентів на ці наукові розробки.*

## References

1. Zhernossekov DD, Yusova EI, Grinenko TV. Role of plasminogen/plasmin in functional activity of blood cells. *Ukr Biokhim Zhurn.* 2012; 84(4): 5-19.
2. Danilova VM, Vynogradova RP, Komisarlenko SV. Inventive activities of the Palladin Institute of Biochemistry of NAS of Ukraine in 1925-1990. *Ukr Biochem J.* 2015; 87(2): 163-175.
3. A.C. SU 677406, C 07 G 7/02 A 61 K 37/48. A method for obtaining plasminogen / Kudinov SO, Ieretskaya IeV, Terekhov NT, Labunets KA, Laricheva NI, Lopata AK; applicant: Palladin Institute of Biochemistry of the NAS of Ukraine – No 2543636/23-04; appl.17.11.77.
4. A.C. SU 1069222, A 61 K 35/16. A method for obtaining plasminogen / Kudinov SO, Matsui SP, Babenko IM, Lopato SV, Samoylova NA, Andreev SM, Rogozhin SV, Davidovich IuA, Terechov NT, Labunets KA, Lopata AK; applicants: Palladin Institute of Biochemistry of the NAS of Ukraine, Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds of RAS, Kiev Institute of Hematology and Blood Transfusion – No 2990994/28-13; appl. 10.10.80.
5. A.C. SU 1187826 A 61 K 37/47. A method for obtaining plasminogen / Kudinov SO, Voloshchenko IuV, Galich IP, Gavrish IN; applicants: Palladin Institute of Biochemistry of the NAS of Ukraine, Kiev Company for Bacterial Drugs Production – No 3681567/28-14; appl. 18.11.83; publ. 30.10.85, Bul. N 40.
6. A.C. SU 1341770 A 61 K 35/16. A method for obtaining plasminogen / Kudinov SO, Verevka SV; applicant: Palladin Institute of Biochemistry of the NAS of Ukraine – No 3960904/28-14; appl. 04.10.85.
7. A.C. SU 979508 C 12 No 11/06 C 12 R 1/80. A method for obtaining of immobilized plasminogen / Kudinov SO, Babenko IM, Matsui SP; applicant: Palladin Institute of Biochemistry of the NAS of Ukraine – No 2960037/20-13; appl. 23.07.80; publ. 07.12.82, Bul. N 45.
8. A.C. SU 854982 C 12 No 9/68 C 12 No 9/76 C 12No 11/00 A 61 K 37/48. A method for obtaining plasmin / Kudinov SO, Yeretskaya IeV, Terekhov NT, Semenyuga OS, Laricheva NI, Lopata AK; applicant: Palladin Institute of Biochemistry of the NAS of Ukraine – 3960904; appl. 04.10.85.
9. A.C. SU 1338151 A 61 K 37/47. A method for obtaining plasminogen activator from animal materials / Kudinov SA, Makohonenko IeM, Nazarenko NA; applicant: Palladin Institute of Biochemistry of the NAS of Ukraine – No 3892009/28-14; appl. 25.04.85.
10. Novokhatny VV, Kudinov SA, Privalov PL. Domains in human plasminogen. *J Mol Biol.* 1984; 179(2): 215-232.
11. A.C. SU 1681255 A 1, G 01 No 33/50. A method for determination of plasminogen content in

- biological fluids / Lezhen TI, Kudinov SA, Palienko IA, Nikula TD; applicants and patent owners: Palladin Institute of Biochemistry of the NAS of Ukraine, Bogomolets Kiev Medical Institute – No (21) 4680906/14; appl. 24.04.89; publ. 30.09.91, Bul. No 36.
12. A.C. SU 1760762 A 1, C 12 No 9/00, 11/06. A method for inhibition of serine proteinase in protein mixture / Verevka SV, Kudinov SO, Kolodzeiskaya MV, Lobova LB; applicant and patent owner: Palladin Institute of Biochemistry of the NAS of Ukraine – No 4802208/13; appl. 14.03.90.
  13. A.C. SU 1742329 A 1, C 12 No 9/76. A method for trypsin purification / Taran LD, Kudinov SO, Shevchenko AR, Epshtein LM; applicant and patent owner: Palladin Institute of Biochemistry of the NAS of Ukraine – 4692676/13; appl. 16.05.89; publ. 23.06.92, Bul. No 23.
  14. A.C. SU 1777089 A 1, G 01 No 33/86. A method for analysis of blood coagulation / Lezhen TI, Makohonenko IeM, Kolesnik LA, Kramarev SA, Martyniuk TV, Andrianov SI, Kudinov SO; ; applicants and patent owners: Palladin Institute of Biochemistry of the NAS of Ukraine, Bogomolets Kiev Medical Institute – No (21)4837619/14; appl. 08.06.90; publ. 23.11.92, Bul. No 43.
  15. Pat. 72227 UA C2 (51) 7 G 01 No 30/48. A method for obtaining affinity adsorbent to isolate plasminogen from human blood / Masliuk AF, Kudinov SO, Berznyi'skyi GK, Shykanova NO, Shakhnin DB, Kurcha SF, Sopina IM; applicant and patent owner: Palladin Institute of Biochemistry of the NAS of Ukraine - No 2001053642; appl. 29.05.2001; publ. 15.02.2005, Bul. N 2.
  16. Druzhyna NN, Makogonenko EM, Yakovlev SA. Studies of the t-PA-catalyzed Glu-plasminogen activation on different models of polymeric fibrin. *Thromb Res.* 1997; 87(1): 131-139.
  17. Makohonenko IeM, Iakovlev SO, Slomins'kyi OI, Korol'chuk VI, Hrynenko TV, Sokolov's'ka LA, Druzhyna NM, Kolesnykova IM, Chernyshov VI, Sederkhol'm-Vil'iams SA. Plasminogen activation by antiplasminogen monoclonal antibody IV-IC. Properties and mechanism of reaction. *Ukr Biokhim Zhurn.* 2000; 72(4-5): 99-108. (In Ukrainian).
  18. Hrynenko TV, Makohonenko IeM, Iusova OI, Cederholm-Williams SA. Degradation of streptokinase and the catalytic properties of the plasmin-streptokinase complex. *Ukr Biokhim Zhurn.* 2002; 74(3): 50-57. (In Ukrainian).
  19. Iusova OI, Hrynenko TV, Volkov GL. A method for determination of anti-streptokinase antibodies. *Hematol Blood Transfus.* 2002; (31): 345-349.
  20. Hrynenko TV. Alpha-2-antiplasmin inhibits plasminogen activation by tissue activator on fibrin. *Circ Haemostas.* 2004; (3): 49-50.
  21. Hrynenko TV, Zadorozhna MB, Iusova OI. Regulation with alpha-2-antiplasmin of Glu-plasminogen activation by tissue activator on fibrin. *Ukr Biokhim Zhurn.* 2006;78(3): 106-112. (In Ukrainian).
  22. Pat. 53146 UA 7 CO7K 14/81. A method for obtaining highly purified alpha-2-antiplasmin from human blood plasma / Hrynenko TV, Makohonenko IeM, Iusova OI, Zadorozhna MB, Volkov GL; applicants and patent owners: Palladin Institute of Biochemistry of the NAS of Ukraine, Company with limited liability "Kombio" – No 2002032305, appl. 22.03.2002; publ. 17.01.2005, Bul. N 1.
  23. Roka-Moya YM, Zhernossekov DD, Grinenko TV. Plasminogen/plasmin influence on platelet aggregation. *Biopolym Cell.* 2012; 28(5):352-356.
  24. Pat. 65219 UA, IPC G01 No 33/48 (2006.01) G01 No 33/68 (2006.01). A method for determination of plasminogen in blood plasma / Hrynenko TV, Iusova OI, Kondratiuk AS, Rybachuk VM; applicant and patent owner: Palladin Institute of Biochemistry of the NAS of Ukraine – No u 201106579; appl. 26.05.2011; publ. 25.11.2011, Bul. N 22.
  25. Pat. 104060 UA, IPC G01 No 33/49 (2006.01) G 12 No 9/50 (2006.01) G01 No 21/82 (2006.01). Test-system for determination of plasminogen in blood plasma / Hrynenko TV, Iusova OI, Kondratiuk AS, Rybachuk VM; applicant and patent owner: Palladin Institute of Biochemistry of the NAS of Ukraine – No u 201205949; appl. 16.05.2012; publ. 25.12.2013, Bul. N 24.
  26. Kondratiuk AS, Yusova OI, Grynenco TV. Identification of activity of tissue plasminogen activator in blood plasma. *Lab Diagnost.* 2011; 57(3): 3-9.



27. Roka-Moya YM, Zhernossekov DD, Kondratiuk AS, Grinenko TV. Development and optimization of the methods for determining activity of plasminogen activator inhibitor-1 in plasma. *Ukr Biokhim Zhurn.* 2013; 85(4): 111-118. (In Ukrainian).
28. Kondratiuk AS, Grynenko TV. Quantification of finbinogen in blood plasma by turbidimetric method with the usage of ancystron. *Phisics Alive.* 2010; 18(1): 160-163.
29. Kondratiuk AS, Grynenko TV, Deyev VA, Lysak LI, Kalashnikov AA, Kupovskaya SI. Change of level of components of fibrinolysis at development of adhesion an abdominal cavity. *Lab Diagnost.* 2011; 58(4): 3-6.
30. Pat. 97067 UA, C2 IPC G01 No 33/68 (2006.01). A method for determination of heparin activity in substances and ready-made formulations of heparins / Rybachuk VM, Levchuk OV, Roka-Moya YM, Riasnenko LP, Iusova OI, Hrynenko TV; applicant and patent owner: Palladin Institute of Biochemistry of the NAS of Ukraine – No a 201101810; appl. 26.02.2011; publ. 26.12.2011, Bul. N 24.
31. Pat. 61446 UA, U IPC (20.11.01) G01 No 33/48 (2006.01) G01 No 31/00. Test-system for assessment of the activity of low-molecular heparins / Rybachuk VM, Riasnenko LP, Roka-Moya YM, Kharchenko SM, Grynenko TV; applicant and patent owner: Palladin Institute of Biochemistry of the NAS of Ukraine – No u 201013601; appl. 16.11.2010; publ. 25.07.2011, Bul. N 14.
32. Pat. 98552 UA, IPC (2012.01) G01 No 33/48 (2006.01) G01 No 31/00. A method for assessment of anti-IIA-factor activity of low-molecular heparins / Rybachuk VM, Riasnenko LP, Roka-Moya YM, Kharchenko SM, Grynenko TV; applicant and patent owner: Palladin Institute of Biochemistry of the NAS of Ukraine – No a 201013600; appl. 16.11.2010; publ. 25.05.2012, Bul. No 10.
33. Pat. 63325 UA, IPC (2011.01) G01 No 33/48 (2006.01) G01 No 31/00. A method for assessment of heparins activities / Rybachuk VM, Levchuk OV, Roka-Moya YM, Riasnenko LP, Yusova OI, Grynenko TV; applicant and patent owner: Palladin Institute of Biochemistry of the NAS of Ukraine – No u 201101809; appl. 16.02.2011; publ. 10.10.2011, Bul. N 19.

Отримано 21.06.2016