

УДК 546.284+577.112

## ВПЛИВ ВИСОКОДИСПЕРСНОГО КРЕМНЕЗЕМУ НА АКТИВАЦІЮ ФАКТОРІВ СИСТЕМИ ЗСІДАННЯ КРОВІ

Т. М. Чернишенко<sup>1</sup>В. І. Гришук<sup>1</sup>Н. П. Галаган<sup>2</sup>В. О. Чернишенко<sup>1</sup>О. В. Горницька<sup>1</sup>Т. М. Платонова<sup>1</sup>Е. В. Луговської<sup>1</sup><sup>1</sup>Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ<sup>2</sup>Інститут хімії поверхні ім. О. О. Чуйка НАН України, Київ

E-mail: platonovatn@gmail.com

Отримано 11.06.2012

Використання сорбентів, створених на основі високодисперсного кремнезему, є якісно новим і перспективним засобом припинення кровотеч. Результати дослідження гемостатичної дії високодисперсного кремнезему при поверхневих ушкодженнях дали підстави для його практичного використання в хірургії.

Механізми активації системи гемостазу під дією високодисперсного кремнезему ще не з'ясовано. Наші дослідження було присвячено визначенню його впливу на процес активації окремих факторів системи зсідання крові з метою з'ясування механізму зупинки кровотечі під дією сорбенту.

Активацію окремих факторів зсідання крові визначали за допомогою хромогенних субстратів. Показано здатність високодисперсного кремнезему пришвидшувати активацію в плазмі крові факторів внутрішнього та зовнішнього шляхів зсідання крові під дією реагенту «Активованій частковий тромбопластиновий час» та тромбопластину. З використанням специфічних активаторів з отрути змії визначено мішень його дії, якою є фактор X системи зсідання крові. Пришвидшення активації останнього відбувається, імовірно, через залучення активованих на поверхні сорбенту факторів внутрішнього шляху зсідання крові.

Отримані результати є важливими для з'ясування механізму дії високодисперсного кремнезему на пришвидшення процесу зсідання крові.

**Ключові слова:** високодисперсний кремнезем, система гемостазу, фактор X.

Дослідження останніх років показали, що якісно новим і ефективним засобом припинення кровотеч є використання сорбентів. У сучасній коагулології перспективним вирішенням цієї проблеми є застосування препаратів, створених на основі високодисперсного кремнезему (ВДК), зокрема «Силіксу», запропонованого Інститутом хімії поверхні ім. О. О. Чуйка НАН України. Доцільність його застосування як ентеросорбенту доведено в клініках інфекційних і внутрішніх хвороб, хірургії, кардіології, онкології, дерматології, гематології, алергології, імунології, гастроентерології, наркології тощо [1–3].

Препарат «Силікс» — синтетичний неперистий двоокис кремнію, білий пухкий порошок без запаху, який складається з нанорозмірних частинок (4–40 нм), що здатні утворювати агрегати. Унікальною власти-

вістю ВДК є велика питома поверхня (300 м<sup>2</sup>/г). Поверхня частинок ВДК вкрита гідроксильними групами (так званими силанольними групами Si–OH), що зумовлюють її гідрофільність. Можливість адсорбційних взаємодій із зарядженими молекулами, які здатні утворювати водневі зв'язки O–H...O, зумовлена слабкими протонно-донорними властивостями сорбенту. Особливо слід відзначити здатність поверхні ВДК до адсорбції різних протеїнів [1].

Нанорозмірні частинки цього сорбенту мають ефективну гемостатичну дію, механізм якої полягає в стимуляції мононуклеарних фагоцитів, моноцитів і нейтрофілів зони ушкодження [2, 4]. Із цитоплазми цих клітин вивільняються ефектори, які діють на компоненти різних ланок системи гемостазу. Не виключено, що саме ці процеси можуть бути зумовлені швидким адсорбу-

ванням на поверхні наночастинок ВДК води та протеїнових сполук плазми крові, що пришвидшує активацію проензимів. Оскільки присутність у середовищі твердої поверхні стимулює процеси тромбоутворення, ВДК стає компонентом матриці згустку, консолідує його і призводить до утворення стабільного згустку [1].

Проведені дослідження гемостатичної дії зазначеного сорбенту за поверхневих ушкоджень м'яких та паренхіматозних тканин дали підстави для його практичного використання в хірургії як засобу, що зупиняє кровотечі [3]. Проте одержані результати не дають прямої відповіді на питання стосовно механізмів активації системи гемостазу під дією ВДК.

Метою роботи було дослідження впливу ВДК на процес активації окремих факторів системи зсідання крові для з'ясування механізму кровоспинної дії сорбенту.

### Матеріали і методи

В експериментах використовували ВДК марки А-300 (м. Калущ, Україна), який попередньо витримували при 400 °С протягом 2 годин. Такі умови оброблення його поверхні в лабораторії відповідають фізико-хімічним властивостям препарату сорбенту «Силікс» [5].

Тести на протромбіновий час (ПЧ) та активований частковий тромбопластиновий час (АЧТЧ) виконували згідно з [6, 7]. В експериментах використовували референтну плазму крові донорів «Ренам» (Росія). Сорбент вносили в дослідні проби у вигляді водної суспензії.

Амідолітичну активність тромбіну, фактора Ха системи зсідання крові визначали з використанням хромогенних субстратів S2238, S2765 відповідно, за довжини хвилі 405–492 нм на спектрофотометрі для мікропланшетів Thermo Multiskan EX (Фінляндія).

Вищезазначені хромогенні субстрати — олігопептиди, які відповідають первинній і вторинній специфічності тромбіну та фактора зсідання крові Ха. Розщеплення субстратів призводить до вивільнення паранітроаніліну та зміни поглинання розчину за довжини хвилі 405–492 нм.

Для активації факторів внутрішнього шляху системи зсідання використовували реагент АЧТЧ, зовнішнього шляху — тромбопластин, а для фактора X та протромбіну — RVV (ензим отрути гадюки Рассела) — та екамулін (ензим з отрути ефі багатолуско-

вої) відповідно. Умови активації проензимів: референтна плазма крові — 10 мкл; сорбент — 0,2–2,0 мг/мл; активатор; 3 мМ хромогенний субстрат (S2765 або S2238); 0,05 М трис-НСІ-буфер, що містить 0,13 М NaCl і 0,0025 М CaCl<sub>2</sub>, рН 7,4. Температура інкубації 37 °С [8, 9].

Фракцію вітамін К-залежних протеїнів плазми крові отримували із плазми крові донорів шляхом сорбції на BaSO<sub>4</sub> (з розрахунку 60 мг BaSO<sub>4</sub> на 1 мл плазми крові) впродовж 30 хв за температури 4 °С. BaSO<sub>4</sub> з адсорбованими вітамін К-залежними протеїнами центрифугували при 1 200 g. Елюцію вітамін К-залежних протеїнів проводили 0,05 М трис-НСІ-буфером, рН 7,4, що містив 0,2 М NaCl та 0,02 М ЕДТА, і діалізували проти 0,05 М трис-НСІ-буферу, що містив 0,13 М NaCl, рН 7,4.

Умови активації фактора X такі: фракція вітамін К-залежних протеїнів — 0,016 мг/мл; сорбент — 0,5 мг/мл; активатор фактора X — RVV (ензим отрути гадюки Рассела); 3 мМ хромогенний субстрат — S<sub>2765</sub>; 0,05 М трис-НСІ буфер, що містив 0,13 М NaCl і 0,0025 М CaCl<sub>2</sub>, рН 7,4. Температура інкубації 37 °С.

### Результати та обговорення

ВДК розглядають як гемостатичний препарат місцевої дії, вплив якого, ймовірно, виявляється в активації процесів 1-ї фази зсідання крові [2]. Встановлено, що сорбент спричинює скорочення часу зсідання крові. Окрім того, за його присутності посилюється толерантність плазми крові до гепарину, знижується фібринолітична активність крові, посилюється агрегація тромбоцитів [1], що свідчить про підвищення за присутності сорбенту прокоагулянтного потенціалу системи зсідання крові.

Для з'ясування механізму впливу ВДК на окремі компоненти системи гемостазу визначали час зсідання плазми крові в скрингових тестах на ПЧ та АЧТЧ.

Тест ПЧ базується на активації факторів зовнішнього шляху зсідання крові (VII, X та V) під дією екзогенного тканинного тромбопластину та іонів кальцію. На результати тесту ПЧ не впливають фактори внутрішнього шляху зсідання крові [7].

Для оцінки процесу активації факторів внутрішнього шляху зсідання крові (XII, XI, IX, VIII, X) використовують тест АЧТЧ, за яким визначають час рекальцифікації безтромбоцитарної плазми крові під дією активатора контактної фази та фосфоліпідів.

Додавання такого активуючого агента в плазму крові призводить до подальшої послідовної активації факторів зсідання крові внутрішнього та загального шляху зсідання плазми крові.

Дослідження впливу ВДК на час зсідання плазми крові в зазначених тестах показали, що за присутності сорбенту час зсідання плазми крові скорочується, порівняно з контролем, на 20–30%. Отже, можна припустити існування впливу ВДК на процеси активації факторів системи зсідання крові.

Оскільки ВДК адсорбує на своїй поверхні фібриноген [5], що може впливати на час зсідання плазми крові в коагуляційних тестах, надалі аналіз процесу активації окремих факторів системи зсідання крові проводили спектрофотометрично з використанням специфічних хромогенних субстратів до тромбіну та фактора Ха (S2238 та S2765), відповідно.

Проведений нами аналіз процесу активації факторів внутрішнього шляху зсідання крові реагентом АЧТЧ показав, що за присутності ВДК швидкість їх активації значно зростає. Процес є концентраційно залежним (рис. 1).

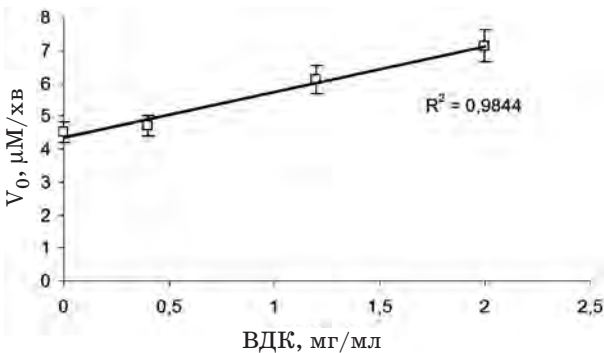


Рис. 1. Концентраційна залежність швидкості активації факторів внутрішнього шляху зсідання крові реагентом АЧТЧ за присутності ВДК

Процеси, що відбуваються *in vivo* в разі ушкодження стінки судин та призводять до утворення згустку крові, моделюють *in vitro* додаванням тромбопластину за присутності іонів кальцію. В активації протромбіну тромбопластином задіяні фактори зовнішнього шляху зсідання крові: VII, X та V. Проведений аналіз показав, що за присутності ВДК процес активації факторів зовнішнього шляху зсідання крові під дією тромбопластину пришвидшується (рис. 2).

Таким чином, за присутності ВДК процес активації факторів як внутрішнього, так і зовнішнього шляхів системи зсідання

крові пришвидшується. Надалі для визначення мішені вияву біологічної активності ВДК було створено модельні системи з використанням ензимів-активаторів з отрути змій, які безпосередньо діють на відповідні проензими системи зсідання крові. Така вибіркова активація протромбіну та фактора X дає змогу виокремити процес активації кожного проензиму.

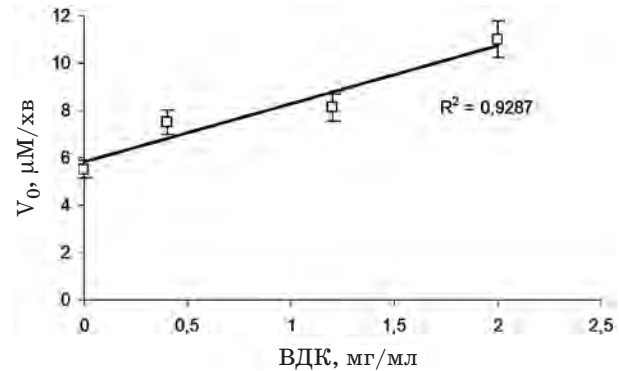


Рис. 2. Концентраційна залежність швидкості активації факторів зовнішнього шляху системи зсідання крові тромбопластином за присутності ВДК

Перша модельна система складалась із плазми крові, активатора протромбіну — екамуліну та ВДК; друга — з плазми крові, активатора фактора X — RVV та ВДК [8–10]. Як контроль застосовували відповідну модельну систему без сорбенту.

Одержані результати показали, що за присутності ВДК швидкість активації фактора X зростає, і цей процес має концентраційно залежний характер (рис. 3). Натомість, процес прямої активації протромбіну екамуліном залишається незмінним як у присутності, так і за відсутності ВДК.

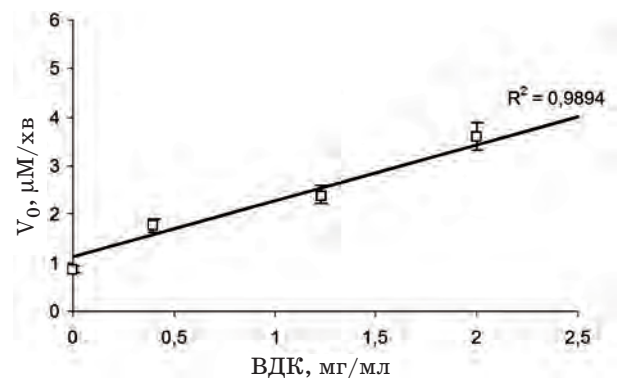


Рис. 3. Концентраційна залежність швидкості активації фактора X плазми крові активатором з отрути гадюки Рассела за присутності ВДК

Виходячи з отриманих результатів ми припустили, що пришвидшення активації фактора X у присутності ВДК в плазмі крові відбувається через залучення факторів внутрішнього шляху зсідання крові (фактори XII, XI), які активуються на поверхні частинок кремнезему. Відомо, що фактор XII може активуватись за контакту з негативно зарядженою поверхнею. Експериментально показано, що в разі взаємодії фактора XII

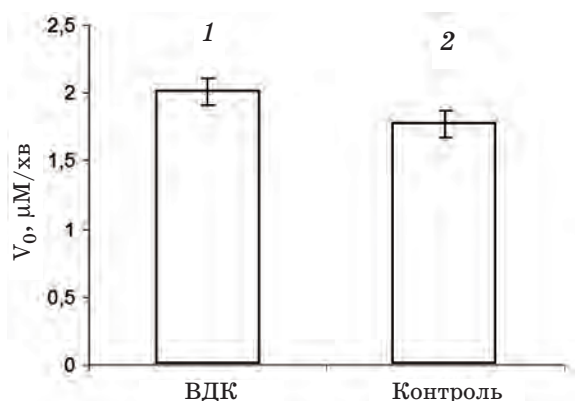


Рис. 4. Активация фактора X у фракції вітамін К-залежних протеїнів активатором з отрути гадюки Рассела у присутності 0,5 мг/мл ВДК (1) та за його відсутності (2)

з колоїдними частинками  $\text{SiO}_2$  відбувається конформаційна перебудова молекули проензиму і перетворення його на каталітично активну форму [11–13].

Для перевірки цього припущення в наступній серії дослідів було розроблено модельну систему з використанням фракції вітамін К-залежних протеїнів плазми крові (фактори II, VII, IX, X системи зсідання крові). У цій модельній системі, на відміну від попередніх, були відсутні фактори внутрішнього шляху зсідання крові XII та XI. Показано, що за таких умов спостерігається лише незначне пришвидшення процесу активації фактора X (рис. 4).

Таким чином, шляхом розділення етапів каскаду ензиматичних реакцій системи зсідання крові визначено вибіркочку дію сорбенту на фактор X. Показано, що ВДК значно посилює активацію саме фактора X плазми крові через залучення активованих на його поверхні факторів внутрішнього шляху. Отримані результати наблизили нас до з'ясування механізму дії високодисперсного кремнезему на пришвидшення процесу зсідання крові.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Чуйко А. А. Медицинская химия и клиническое применение диоксида кремния. — К.: Наук. думка, 2003. — 415 с.
2. Пентюк О. О., Погорелий В. К., Чуйко Н. О. Лікувальні властивості ентеросорбенту силіксу — аморфного ультрадисперсного кремнезему // Медична хімія. — 2003. — Т. 5, № 1. — С. 95–99.
3. Пат. 2093159 RU, 6 А 61 К 33/00. Способ остановки кровотечения / О. И. Бондарчук, Т. А. Кадошук, С. В. Сендер и др. — Заявл. 06.04.88; Зарегистр. 20.10.97.
4. Pokrovskiy V., Galagan N., Chuiko A. Interaction of cells with nanoparticles // Surf. Chem. Biomed. Environ. Sci. — 2006. — V. 2. — P. 277–286.
5. Гриценко И. В., Орел И. Л., Галаган Н. П. Получение нанокомпозитов на основе высокодисперсного кремнезема и некоторых белков крови и определение их биологической активности // Мат. II Всерос. науч. конф. «Сорбенты как фактор качества жизни и здоровья», 18–23 сентября 2006 г., Москва–Белгород. — С. 69–73.
6. Баркаган З. С., Момот А. П. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза. — М.: Ньюдиамед, 2008. — 292 с.
7. Долгов В. В., Свиринов П. В. Лабораторная диагностика нарушений гемостаза. — М.: Триада, 2005. — 227 с.
8. Корольова Д. С., Виноградова Р. П., Чернищенко Т. М. та ін. Використання екамуліну з отрути ефі багатолускової в клінічній лабораторній діагностиці // Лаб. діагностика. — 2006. — Т. 37, № 3. — С. 18–22.
9. Castellone D. D., van Cott M. V. Laboratory monitoring of new anticoagulants // Am. J. Hematol. — 2009. — V. 85. — P. 185–187.
10. Sajevec T., Leonardi A., Krihaj I. Haemostatically active proteins in snake venoms // Toxicon. — 2001. — V. 5. — P. 627–645.
11. Зубаиров Д. М. Молекулярные основы свертывания крови и тромбообразования. — Казань: ФОН, 2000. — 365 с.
12. Margolis J. The effect of colloidal silica on blood coagulation // Austr. J. Exper. Biol. Med. Sci. — 1961. — N 39. — P. 249–258.
13. Lord M. S., Cousins B. G., Doherty P. J. et al. The effect of silica nanoparticulate coatings on serum protein adsorption and cellular response // Biomaterials. — 2006. — V. 28. — P. 4856–4862.



**ВЛИЯНИЕ ВЫСОКОДИСПЕРСНОГО  
КРЕМНЕЗЕМА НА АКТИВАЦИЮ  
ФАКТОРОВ СИСТЕМЫ  
СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ**

*Т. М. Чернышенко<sup>1</sup>  
В. И. Грищук<sup>1</sup>  
Н. П. Галаган<sup>2</sup>  
В. А. Чернышенко<sup>1</sup>  
О. В. Горницкая<sup>1</sup>  
Т. Н. Платонова<sup>1</sup>  
Э. В. Луговской<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Институт биохимии им. А. В. Палладина  
НАН Украины, Киев

<sup>2</sup>Институт химии поверхности  
им. А. А. Чуйко НАН Украины, Киев

*E-mail: platonovatn@gmail.com*

Использование сорбентов, полученных на основе высокодисперсного кремнезема, является новым и перспективным способом прекращения кровотечения. Результаты исследования гемостатического действия этого кремнезема при поверхностных повреждениях дали основание для его практического использования в хирургии.

Механизмы активации системы гемостаза под действием высокодисперсного кремнезема остаются неизвестными. Наши исследования были посвящены определению его влияния на процесс активации отдельных факторов системы свертывания крови для выяснения механизма кровоостанавливающего действия сорбента.

Активацию отдельных факторов системы свертывания крови определяли с помощью специфических хромогенных субстратов. Показана способность высокодисперсного кремнезема ускорять активацию в плазме крови факторов внутреннего и внешнего путей системы свертывания крови, инициированную реагентом «Активированное частичное тромбопластиновое время» и тромбопластином. С использованием специфических активаторов из яда змей определена мишень действия высокодисперсного кремнезема, которой является фактор X системы свертывания крови. Ускорение активации последнего происходит, вероятно, из-за вовлечения активированных на поверхности сорбента факторов внутреннего пути свертывания крови.

Полученные результаты важны для выяснения механизма действия высокодисперсного кремнезема на ускорение процесса свертывания крови.

**Ключевые слова:** высокодисперсный кремнезем, система гемостаза, фактор X.

**ACTION OF HIGH-DISPERSED SILICA  
ON BLOOD COAGULATION FACTORS  
ACTIVATION**

*T. M. Chernyshenko<sup>1</sup>  
V. I. Gryshchuk<sup>1</sup>  
N. P. Galagan<sup>2</sup>  
V. O. Chernyshenko<sup>1</sup>  
O. V. Gornytska<sup>1</sup>  
T. M. Platonova<sup>1</sup>  
E. V. Lugovskoy<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Palladin Institute of Biochemistry  
of National Academy of Sciences of Ukraine,  
Kyiv

<sup>2</sup>Chuiko Institute of Surface Chemistry  
of National Academy of Sciences of Ukraine,  
Kyiv

*E-mail: platonovatn@gmail.com*

Using of high-dispersed silica based sorbents is a new and prospective method of bleeding arrest. Studies of high-dispersed silica haemostatic action during superficial wounds were promising for its surgery usage.

However the mechanisms of haemostatic effects of high-dispersed silica are still unknown. Our investigations were focused on high-dispersed silica action on activation of some blood coagulation factors and clearing of its blood arresting mechanisms.

Activation of individual coagulation factors was measured using specific chromogenic substrates. It was shown that high-dispersed silica increases the activation of intrinsic and extrinsic blood coagulation pathway factors which was initiated by «Activated partial thromboplastin time» and thromboplastin. Blood coagulation factor X was determined as a target of high-dispersed silica using high-specific activators from the snake venoms. Observed increasing of factor X activation could be the consequence of the adsorption of the intrinsic blood coagulation pathway factors on sorbent surface.

Obtained results give a possibility to speculate about high-dispersed silica effects on blood coagulation increasing.

**Key words:** high-dispersed silica, hemostasis system, factor X.