

С-РЕАКТИВНЫЙ БЕЛОК УДЛИНЯЕТ ВРЕМЯ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ В ФОСФОЛИПИД-ЗАВИСИМЫХ КОАГУЛЯЦИОННЫХ ТЕСТАХ

О.П. Близнюков¹, Л.Д. Козмин¹, А.И. Мартынов¹, Т.А. Лисицина², Т.М. Решетняк², В.И. Лауга³
¹Институт иммунологии МЗ РФ, ²ГУ Институт ревматологии РАМН, ³НПП "ВАСМА", Москва

Резюме

Цель. Изучить влияние различных форм СРБ на время свертывания крови в стандартных фосфолипид-зависимых коагуляционных тестах.

Материалы и методы. К плазме здоровых доноров добавляли высокоочищенные нативный СРБ и мономерный СРБ (0 - 1,6 мкМ), а также комплексы нативного СРБ и моноспецифических кроличьих антител к нему (1,6 мкМ). Время свертывания плазмы крови с СРБ регистрировали с помощью оптического коагулометра в фосфолипид-зависимых коагуляционных тестах протромбинового времени, активированного частичного тромбопластинового времени, каолинового времени, времени эллаговой кислоты и теста яда гадюки Рассела.

Результаты. Нативный СРБ способен удлинять время свертывания крови во всех перечисленных коагуляционных тестах, за исключением протромбинового времени. Влияние СРБ на время свертывания крови в этих тестах имеет характер концентрационной зависимости, при этом специфические антитела к нативному СРБ не ингибируют действие белка на время свертывания крови. Мономерный СРБ в диапазоне концентраций 0 - 1,6 мкМ не влияет на свертывание крови в фосфолипид-зависимых коагуляционных тестах.

Заключение. Нативный СРБ при высоком содержании в плазме крови (более 0,4 мкМ) проявляет свойства естественного антикоагулянта в фосфолипид-зависимых коагуляционных тестах *in vitro*.

Ключевые слова: С-реактивный белок (СРБ), фосфолипид-зависимые коагуляционные тесты.

Введение

С-реактивный белок (СРБ) относится к классу сывороточных белков острой фазы воспаления. Содержание этого белка в сыворотке крови является важным клиническим фактором, который позволяет судить об интенсивности воспаления и сопутствующего некроза ткани [1].

СРБ обладает уникально широкой лигандной специфичностью - номенклатура лигандов СРБ включает более 20 макромолекул. Существуют две различные по своим физико-химическим параметрам формы СРБ - нативный (пентамерный) СРБ и мономерный (моносубъединичный) СРБ. Проявлено участие нативного СРБ в процессах иммунорегуляции, неспецифической резистентности к антигенам различной природы, ремоделировании матрикса соединительной ткани, обмене липидов, транспорте и клиренсе различных молекул [2]. Биологическая функция мономерного СРБ неизвестна.

Экспрессия гена СРБ у человека находится под сложным контролем эндогенных и экзогенных факторов - цитокинов, стероидных гормонов, белков теплового шока, ростовых факторов, полисахаридов и др. [1,2]. Содержание СРБ в сыворотке здорового донора составляет по разным данным 0,1 - 3,0 мкг/мл (0,9 - 25 нМ) [3-5]. Факторами, которые определяют низкое содержание СРБ в крови здоровых доноров, являются относительно низкий уровень не стимулированной экспрессии гена СРБ, а также удерживание этого белка внутри клетки с помощью микросомальных карбоксилэстераз, которые действуют в просвете эндоплазматического ретикулума гепатоцитов [2,6].

В клинической практике известны патологические состояния, при которых концентрация сывороточного СРБ увеличивается по сравнению с нормальным уровнем в 100 - 1000 раз. К их числу относятся локализованные формы бактериальных инфекций и сепсис [7,8], а также тромбозы различной локализации [9], септический и ревматоидный

артриты [10,11], паранеопластический синдром при некоторых онкологических заболеваниях [12].

Клиническое развитие ряда перечисленных заболеваний сопровождается нарушением свертывания крови, имеющим различные патогенетические механизмы [13,14]. Лабораторная диагностика тромбофилий при этих состояниях требует выполнения стандартных коагулологических тестов, при этом время свертывания крови стараются связать, прежде всего, с функциональной активностью белков системы гемостаза [15].

Важная роль в реакциях свертывания крови принадлежит фосфолипидам, которые во многом определяют функциональную активность белков - факторов свертывания крови. Взаимодействие фосфолипидов и белков свертывающей системы в составе сложных комплексов (теназного, протромбиназного и комплекса тканевого фактора) является определяющим для коагуляции крови в тестах *in vitro* [15].

СРБ также является белком, который в присутствии ионов Ca^{2+} связывает сывороточные фосфолипиды, их мицеллы и комплексы фосфолипидов с другими белками [16-20]. Конкурентное взаимодействие СРБ и факторов свертывания в фосфолипидных мицеллах теназного и протромбиназного комплексов может удлинять время свертывания крови у больных с высоким содержанием СРБ, по крайней мере, в фосфолипид-зависимых коагуляционных тестах.

Цель работы состояла в изучении влияния различных форм СРБ на время свертывания крови в стандартных фосфолипид-зависимых коагуляционных тестах.

Материалы и методы

Трис, фосфатные соли натрия, $NaCl$, Na_2SO_4 , $CaCl_2$, ЭГТА, ЭДТА, полиэтиленгликоль (ПЭГ) 40000, акриламид, метилен-бис-акриламид, персульфат аммония, ТЕМЕД, до-

дешилсульфат натрия, глицин, веронал натрий, агароза, получены от фирмы "Serva", США. Хроматографические среды - Sephacryl S300 Superfine; CN-Sepharose 4B, CNBr-Sepharose 4B ("Pharmacia", Швеция), гидроксипатит ("BioRad", США).

Выделение нативного СРБ.

Нативный СРБ человека был выделен из 2 л асцитической жидкости онкологических больных; средняя концентрация СРБ в асцитической жидкости составляла 0,3 мг/мл. Процедура выделения СРБ описана ранее K. Hashimoto [21] и включает в себя фракционирование асцитической жидкости на CN-Sepharose 4B и ионообменную хроматографию белка на гидроксипатите.

Препарат нативного СРБ хранили в буферном растворе 20 mM трис, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM NaN₃, pH 7,4 при 4°C в стерильных пластиковых контейнерах не более четырех недель.

Концентрацию СРБ в грубых экстрактах и асцитической жидкости определяли с помощью коммерческой системы ИФА DSL-10-42100 ("Diagnostic Systems Lab.", США).

Концентрацию высокоочищенного СРБ определяли спектрофотометрически с помощью удельного коэффициента поглощения СРБ А 280 0,1% = 1,9 [22].

Получение мономерного СРБ.

Мономерный СРБ получен согласно процедуре, предложенной в работе L.A. Potempa [23]. К буферному раствору нативного СРБ (концентрация белка 3,5 мг/мл) были добавлены мочевины (8,0 M) и EDTA (10 mM). После инкубации в течение 12 час при 4°C, раствор мономерного СРБ диализовали против буферного раствора, содержащего 10 mM трис, pH 7,4 в течение 36 час.

Исследование чистоты препарата СРБ.

Исследование иммунохимической чистоты и гомогенности препарата СРБ проведено с помощью иммуноэлектрофореза по Грабару - Уильямсу [24] и электрофореза в акриламидном геле по Лэммли [25].

Иммуноэлектрофорез.

Препарат высокоочищенного СРБ разделяли в 1% геле агарозы. Для иммунохимического обнаружения СРБ в геле использовали моноспецифические антитела кролика к СРБ человека ("ICN", США). Для исследования иммунохимической чистоты СРБ были использованы антисыворотка к белкам плазмы крови человека ("Sigma", США), а также моноспецифические антитела к сывороточному амилоидному белку, I-кислоту гликопротеину, C3,4 компонентам комплемента и IgG человека ("Sigma", США). Препарат высокоочищенного СРБ не обнаруживал полос преципитации с перечисленными антителами и антисывороткой.

Электрофорез в акриламидном геле.

Препарат высокоочищенного СРБ разделяли в градиенте 5 - 25% полиакриламидного геля в денатурирующих условиях по Лэммли. Гели окрашивали раствором Кумасси синего R250 (порог чувствительности 1 мкг белка в полосе) ("Sigma", США). Препарат СРБ формировал единственную полосу с кажущейся молекулярной массой 23 кДа. В электрофорезе использована смесь белков-стандартов с известной молекулярной массой ("Amersham", США).

В иммуноэлектрофорезе и электрофорезе в акриламидном геле в качестве стандартного образца СРБ использован препарат высокоочищенного нативного СРБ для иммунохимических и структурных исследований ("ICN", США).

По данным электрофоретических методов анализа чистота препарата СРБ составляла не менее 97%.

Коагулологические тесты.

Время свертывания крови в фосфолипид-зависимых коагуляционных тестах протромбинового времени (ПВ), активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ), каолинового времени (КВ), времени эллаговой кислоты (ЭлК) и времени яда гадюки Рассела (dRVVT) определяли с помощью коммерческих систем для лабораторной диагностики (НПО "РЕНАМ"). При определении ПВ использовали тромбопластин из мозга кроликов с МИЧ 1,17. В состав АЧТВ - реагента входил кефалин из мозга кроликов.

В процессе работы был использован восьмиканальный оптический коагулометр АнСО8-01 (НПП "ВАСМА").

В экспериментах использовали пул свежей плазмы крови, которая была получена от семи здоровых доноров и стабилизирована 3,8% раствором цитрата натрия.

К 3,0 мл плазмы крови здоровых доноров добавляли 1,0 мл буферного раствора 20 mM трис, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, pH 7,4, содержащего 0; 0,4; 0,8 и 1,6 мкМ (0; 50; 100; 200 мкг/мл) нативного СРБ или мономерного СРБ. В отдельном эксперименте (эксперимент нейтрализации) к раствору нативного СРБ (концентрация белка 1,6 мкМ) перед его внесением в плазму крови были добавлены моноспецифические антитела кролика к СРБ человека ("ICN", США) (концентрация антител 3,6 мкМ).

В группе контрольных тестов было исследовано влияние на свертывание крови в фосфолипид-зависимых коагуляционных тестах сывороточного альбумина человека ("Sigma", США), γ-глобулинов человека ("Sigma", США), а также буферного раствора 20 mM трис, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, pH 7,4, не содержавшего белок.

Измерение времени свертывания крови в соответствующем коагулологическом тесте для каждой концентрации белка было проведено восемь раз. Результат каждого измерения (в сек.) представляли в виде $M \pm m$. Сравнение полученных средних величин времени свертывания проведено с помощью непараметрического U - критерия Вилкоксона.

Результаты

Чистота препарата нативного СРБ, выделенного из асцитической жидкости онкологических больных, по данным электрофореза по Лэммли и иммуноэлектрофореза составляла не менее 97%.

Влияние двух форм СРБ на время свертывания крови было исследовано далее в коагуляционных тестах ПВ, АЧТВ, КВ, времени ЭлК и dRVVT.

В табл.1 приведено время свертывания плазмы здоровых доноров при добавлении к ней буферного раствора, содержащего 20 mM трис, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, pH 7,4 при объемном соотношении плазма : буферный раствор = 3 : 1. Продemonстрировано, что разведение исходной плазмы буферным раствором незначительно влияет на время ее свертывания в перечисленных коагуляционных тестах.

В табл.2 приведено время свертывания плазмы здоровых доноров при добавлении к ней нативного СРБ (1,6 мкМ), мономерного СРБ (1,6 мкМ) и растворимых комплексов нативного СРБ и моноспецифических антител к

Таблица 1

Время свертывания ($M \pm m$) плазмы крови здоровых доноров и той же плазмы, разведенной 3 : 1 в буферном растворе 20 mM трис, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, pH 7,4

	ПВ, сек.	АЧТВ, сек.	dRVVT, сек.	КВ, сек.	ЭлК, сек.
Плазма крови	23,7±0,3	46,6±0,4	32,5±0,5	108,6±1,2	96,4±1,2
Разведенная плазма крови	24,3±0,2	46,7±0,5	31,6±0,8	110,7±1,0	104,4±1,3

Таблица 2

Время свертывания ($M \pm m$) плазмы крови здоровых доноров в коагуляционных тестах в присутствии нативного СРБ (1,6 мкМ), мономерного СРБ (1,6 мкМ) и комплексов нативного СРБ со специфическими антителами к нему (3,6 мкМ)

	ПВ, сек.	*АЧТВ, сек.	*dRVVT, сек.	*КВ, сек.	*ЭлК, сек.
Буферный раствор без белка	23,8±0,2	46,5±0,3	29,9±0,3	116,7±0,5	114,9±2,0
Нативный СРБ	24,2±0,1	59,9±0,5	38,1±0,5	224,4±1,6	158,3±1,3
Мономерный СРБ	23,9±0,2	45,2±0,4	30,7±0,4	125,8±1,0	112,8±1,5
Нативный СРБ и антитела к нему	25,4±0,2	59,7±0,5	37,8±0,6	162,4±1,2	184,2±1,3

* - коагуляционные тесты, для которых различия средних статистически значимы ($p < 0,05$)

нему (3,6 мкМ). Нативный СРБ, но не мономерный СРБ, удлинял время свертывания плазмы во всех исследованных фосфолипид-зависимых коагуляционных тестах, за исключением протромбинового времени. Из представленных в табл.2 данных следует, что связывание нативного СРБ в иммунные комплексы со специфическими антителами также удлиняет время свертывания плазмы здоровых доноров в тех же фосфолипид-зависимых коагуляционных тестах.

Удлинение времени свертывания крови в тестах АЧТВ, КВ, ЭлК и dRVVT линейно зависело от концентрации нативного СРБ в исследуемой плазме (рис.). Значимое удли-

нение времени свертывания во всех перечисленных тестах наблюдалось при концентрации нативного СРБ в плазме более 0,4 мкМ (47 мкг/мл).

В табл.3 приведено время свертывания плазмы крови здоровых доноров при внесении в нее двух мажорных сывороточных белков - сывороточного альбумина (1,6 мкМ) и γ -глобулинов (1,6 мкМ) плазмы крови человека. Из представленных данных следует, что эти белки не влияют на время свертывания крови в тестах ПВ, АЧТВ, КВ, времени ЭлК и dRVVT.

Обсуждение

В работе исследовано влияние высоких концентраций (0,4 - 1,6 мкМ) нативного СРБ и мономерного СРБ на свертывание крови в коагуляционных фосфолипид-зависимых тестах ПВ, АЧТВ, КВ, времени ЭлК и dRVVT.

Из представленных данных следует, что нативный СРБ способен удлинять время свертывания крови во всех перечисленных коагуляционных тестах, за исключением ПВ, проявляя *in vitro* свойства естественного антикоагулянта. Влияние СРБ на время свертывания крови в этих тестах имеет характер концентрационной зависимости, при этом специфические антитела к нативному СРБ не ингибируют действие белка на время свертывания крови. Следует отметить, что мономерный СРБ в диапазоне концентраций 0 - 1,6 мкМ не влияет на свертывание крови в фосфолипид-зависимых коагуляционных тестах.

Точный молекулярный механизм действия СРБ на реакции коагуляционного каскада неизвестен. Продemonстрировано, что СРБ, взаимодействуя с моноцитами, увеличивает секрецию ими тканевого фактора [26]. Кроме того, показано, что при некоторых патологических состояниях концентрация сывороточного СРБ коррелирует с активностью факторов VII, IX, X [27] и содержанием в крови маркеров повреждения эндотелия - фактором Виллебранда, t-РА, фибронектином и фибриногеном [28]. Высокое содержание СРБ в сыворотке крови и относительно высокое сходство СРБ к белкам матрикса соединительной ткани (фибриноген, фибронектин, коллагены, гликопротеины

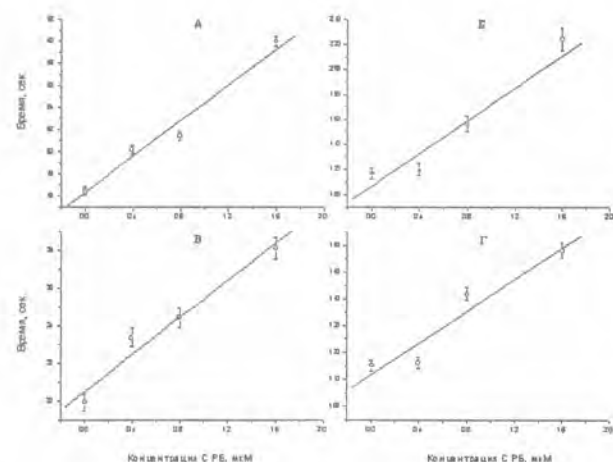


Рис. Зависимость времени свертывания крови в фосфолипид-зависимых коагуляционных тестах: А - частичное тромбoplastиновое время; Б - каолиновое время; В - время яда гадюки Рассела; Г - время элаговой кислоты.

Время свертывания ($M \pm m$) плазмы крови здоровых доноров в коагуляционных тестах в присутствии сывороточного альбумина (1,6 мкМ) и γ -глобулинов (1,6 мкМ) человека

	ПВ, сек.	*АЧТВ, сек.	*dRVVT, сек.	*КВ, сек.	*ЭлК, сек.
Буферный раствор без белка	24,9±0,3	46,6±0,4	30,7±0,5	112,6±1,2	92,4±1,2
Сывороточный альбумин	25,3±0,2	46,3±0,5	30,9±0,8	118,7±1,0	103,4±1,3
γ -Глобулины	24,8±0,2	47,7±0,4	28,2±0,5	111,1±1,0	92,1±0,7

* - коагуляционные тесты, для которых различия средних статистически значимы ($p < 0,05$)

Таблица 3

тромбоцитов) [1,2], а также фосфолипидам [16-20] позволяют рассматривать этот белок как возможный модулятор реакций каскада коагуляции. В настоящее время ведутся поиски других факторов свертывания крови и их регуляторных белков, которые являются специфическими лигандами нативного СРБ. Тем не менее гипотезы о механизмах прокоагулянтного и/или антикоагулянтного действия СРБ в тестах *in vitro* носят спекулятивный характер.

Фосфолипиды являются важными лигандами СРБ. В присутствии ионов Ca^{2+} нативный СРБ способен связывать фосфатидилхолин [16], фосфатидилсерин [16], а также эти фосфолипиды в составе искусственных моно-, бислоев и липосом [18], липопroteinов низкой плотности [19], фрагментов клеточных мембран [20]. Сродство СРБ к фосфолипидам в этом ряду увеличивается; константа ассоциации для взаимодействия СРБ с липосомами составляет $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ [18].

Зависимость времени свертывания крови от фосфолипидов в коагуляционных тестах ПВ, АЧТВ, КВ, времени ЭлК и dRVVT имеет двойной характер:

- фосфолипиды являются компонентами активационного комплекса, добавляемого к плазме крови для запуска коагуляции (препараты тромбопластина и кефалина);
- фосфолипиды исследуемой плазмы являются компонентами теназного, протромбиназного комплексов и комплекса тканевого фактора, которые формируются в процессе коагуляции [15].

Факторы VII, IX, X, V, VIII взаимодействуют с нейтральными (фосфатидилхолин) и анионными (фосфатидилсерин) фосфолипидами, подобно нативному СРБ, в присутствии ионов Ca^{2+} [15]. При этом константа аффинности такого взаимодействия составляет $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ [15]. Обосновано предположение о том, что при высоких концентра-

циях (более $0,4 \text{ мкМ}$) нативный СРБ способен связываться с фосфолипидами в составе теназного и/или протромбиназного комплекса, а также комплекса тканевого фактора. Это конкурентное взаимодействие, возможно, отменяет нормальную сборку белков - факторов свертывания в составе фосфолипидной мицеллы в каталитически - активный комплекс. Значительное различие в константах ассоциации с фосфолипидами для СРБ ($1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$) и для факторов свертывания ($1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$) определяет то, что влияние СРБ на свертывание наблюдается только при высоких концентрациях этого белка в плазме крови (более 47 мкг/мл). В рамках этого предположения находит объяснение тот факт, что мономерный СРБ, в отличие от нативного СРБ, не изменяет время свертывания крови в фосфолипид-зависимых коагуляционных тестах: мономерный СРБ не взаимодействует с фосфолипидами, подобно другим мажорным сывороточным белкам - сывороточному альбумину и γ -глобулинам.

Специфические поликлональные антитела к нативному СРБ не отменяют, как следовало ожидать, его влияние на свертывание крови в фосфолипид-зависимых коагуляционных тестах. Способность этих антител формировать в жидкой фазе комплексы с нативным СРБ была продемонстрирована с помощью иммуноэлектрофореза. Возможно, данная популяция поликлональных антител не экранирует сайт связывания фосфолипидов в молекуле нативного СРБ.

Полученные в этой работе данные не позволяют ответить на вопрос о том, является ли способность нативного СРБ удлинять время свертывания фосфолипид-зависимых реакций в коагуляционных тестах значимой для этих реакций *in vivo* или это исключительно лабораторный феномен.

ЛИТЕРАТУРА

1. Полевщиков А.В., Назаров П.Г. Роль С-реактивного белка и сывороточного амилоидного протеина А в иммунорегуляции. Иммунология, 1993, 4, 6-10.
2. Pepys M.B., Baltz M.L. Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins (pentaxins) and serum amyloid A protein. Adv. Immunol., 1983, 34, 141-212.
3. Borque L., Bellod L., Rus A. et al. Development and validation of an automated and ultrasensitive immunoturbidimetric assay for C-reactive protein. Clin. Chem., 2000, 46, 1839-1842.
4. Hutchinson W., Koenig W., Frohlich M. Immunoradiometric assay of circulating C-reactive protein: age-related values in the adult general population. Clin. Chem., 2000, 46, 934-938.
5. Macy E.M., Hayes T.E., Tracy R.P. Variability in the measurement of C-reactive protein in healthy subjects: implications for reference intervals and epidemiological applications. Clin. Chem., 1997, 43, 52-58.
6. Macintyre S., Samols D., Dailey P. et al. Two carboxylesterases bind C-reactive protein within the endoplasmic reticulum and regulate its secretion during the acute phase response. J. Biol. Chem., 1994, 269, 24496-24503.
7. Peltola H., Rasanen J.A. C-reactive protein in rapid differentiation of acute epiglottitis from spasmodic croup and acute laryngotracheitis: a preliminary report. J. Pediatr., 1983, 102, 713-715.
8. Peltola H., Holmberg C. Rapidity of C-reactive protein in detecting potential septicemia. Pediatr. Infect. Dis., 1983, 2, 374-376.
9. Maseri A. Inflammation, atherosclerosis, and ischemic events - exploring the hidden side of the moon. N. Engl. J. Med., 1997, 336, 1014-1016.
10. Peltola H., Vahvanen V., Alto K. Fever, C-reactive protein, and erythrocyte sedimentation rate in monitoring recovery from septic arthritis: a preliminary study. J. Pediatr. Orthop., 1984, 4, 170-174.
11. Sharif M., Shepstone L., Elson C.J. et al. Increased serum C-reactive protein may reflect events that precede radiographic progression in osteoarthritis of the knee. Ann. Rheum. Dis., 2000, 59, 71-74.
12. Bataille R., Boccadoro M., Klein B. et al. C-reactive protein and beta-2 microglobulin produce a simple and powerful myeloma staging system. Blood, 1992, 80, 733-737.
13. Francis J.L. Laboratory investigation of hypercoagulability. Semin. Thromb. Hemost., 1998, 24, 111-126.
14. Bick R.L. Coagulation abnormalities in malignancy: a review. Semin. Thromb. Hemost., 1992, 18, 353-372.
15. Zwaal R.F., Comfurius P., Bevers E.M. Lipid-protein interactions in blood coagulation. Biochim. Biophys. Acta, 1998, 1376, 433-453.
16. Oliveira E.B., Gotschlich E.C., Liu T.Y. Comparative studies on the binding properties of human and rabbit C-reactive proteins. J. Immunol., 1980, 124, 1396-1402.
17. Sui S., Sun Y., Mi L. Calcium-dependent binding of rabbit C-reactive protein to supported lipid monolayers containing exposed phosphorylcholine group. Biophys. J., 1999, 76, 333-341.
18. Pepys M.B., Rowe I.F., Baltz M. C-reactive protein: binding to lipids and lipoproteins. Int. Rev. Exp. Pathol., 1985, 27, 83-111.
19. de Beer F.C., Soutar A.K., Baltz M.L. Low density lipoprotein and very low density lipoprotein are selectively bound by aggregated C-reactive protein. J. Exp. Med., 1982, 156, 230-242.
20. Narkates A.J., Volanakis J.E. C-reactive protein binding specificities: artificial and natural phospholipid bilayers. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1982, 38, 172-182.
21. Hashimoto K., Tatsumi N. Rapid isolation of human C-reactive protein and serum amyloid P component. J. Immunol. Methods, 1989, 125, 295-296.
22. Macintyre S.S. C-reactive protein. Methods Enzymol., 1988, 163, 383-399.
23. Potempa L.A., Maldonado B.A., Laurent P. Antigenic,

- electrophoretic and binding alterations of human C-reactive protein modified selectively in the absence of calcium. *Mol. Immunol.* 1983, 20, 1165-1175.
24. Grabar P., Williams C.A. Some considerations of the problem of auto-antibody formation. *Tex. Rep. Biol. Med.*, 1965, 23, 278-284.
 25. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 227, 680-685.
 26. Nakagomi A., Freedman S.B., Geczy C.L. Interferon-gamma and lipopolysaccharide potentiate monocyte tissue factor induction by C-reactive protein: relationship with age, sex, and hormone replacement treatment. *Circulation*, 2000, 101, 1785-1791.
 27. Haverkate F., Thompson S.G., Pyke S.D. et al. Production of C-reactive protein and risk of coronary events in stable and unstable angina. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group. *Lancet*, 1997, 349, 462-466.
 28. Yudkin J.S., Stehouwer C.D., Emeis J.J. C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 1999, 19, 972-978.

Abstract

C-reactive protein prolongs blood coagulation time in phospholipids-dependent coagulation tests.

O.P. Bliznukov, L.D. Kostin, A.J. Martinov, T.A. Lisitsina, T.M. Reshetnyak, V.J. Lauga

Objective. To study influence of different CRP forms on blood clotting time in standard phospholipid clotting tests.

Material and methods. Purified native CRP, monomeric CRP (0-1.6 M), immune complexes of native CRP and rabbit polyclonal anti-CRP antibodies (1.6 M) were added to blood plasma of healthy donors. Blood clotting time was registered using optical coagulometer. Phospholipid dependent prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (APTT), kaolin clotting time (KCT) with kaolin and ellagic acid, dilute Russel viper venom time (dRVVT) were determined.

Results. Native CRP was able to increase blood clotting time in all mentioned clotting tests, excluding prothrombin time. CRP influence on blood clotting time showed a concentration dependence. Polyclonal rabbit anti-CRP antibodies had no inhibitory effect on CRP prolonged blood clotting time. Monomeric CRP (0-1.6 M) had no influence on blood clotting time in all phospholipid-dependent clotting tests.

Key words: C-reactive protein, phospholipid-dependent clotting tests.

Поступила 5.02.03