

МЕТОДИКА ОЦЕНКИ ВЛИЯНИЯ РАСТВОРОВ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ НА КОАГУЛЯЦИЮ

В. А. Манувера^{1,2}✉, К. А. Бровина^{1,2}, П. А. Бобровский^{1,2}, Е. Н. Графская¹, Д. Д. Харлампиева¹, В. Н. Лазарев^{1,2}

¹ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени Ю. М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

² Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), г. Долгопрудный, Московская обл., Россия

Поиск новых антикоагулянтов требует простых и недорогих методов первичного определения их активности. Для лабораторной оценки состояния системы гемостаза широко используют клоттинговые тесты, т. е. модельные исследования, оценивающие с клинической точки зрения состояние системы гемостаза по скорости образования фибринового сгустка. Реактивы и приборы для их выполнения производят в России, они имеют низкую себестоимость и просты в применении, однако для исследования активности антикоагулянтов в методике измерения необходимо внести некоторые изменения. Целью работы было показать работоспособность протокола тестирования антикоагуляционной активности растворов с помощью модифицированных стандартных клинических тестов на измерение активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ), протромбинового времени (ПВ) и тромбинового времени (ТВ). Использовали реактивы для измерения АЧТВ, ТВ и ПВ, а также гепарин отечественного производства и два рекомбинантных белка-антикоагулянта медицинской пиявки, полученные в нашей лаборатории. Проводили клоттинговые тесты с добавлением в реакционную смесь антикоагулянтов, определяли работоспособность и границы применимости использованных методов. При исследовании гирудина, гепарина и цистеин-богатого антикоагулянта медицинской пиявки с помощью измерения АЧТВ, ТВ и ПВ продемонстрировано дозо-зависимое увеличение времени образования сгустков. Определена совместимость методов с использованием некоторых распространенных компонентов буферных растворов, используемых в биохимических исследованиях. Показано, что после небольших модификаций стандартных клоттинговых методов определения параметров гемостаза можно использовать их для тестирования растворов новых потенциальных антикоагулянтов.

Ключевые слова: активированное частичное тромбопластиновое время, протромбиновое время, тромбиновое время, антикоагулянт, пиявка

Финансирование: исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-25-00006, <https://rscf.ru/project/23-25-00006/>.

Вклад авторов: В. А. Манувера — концептуализация, эксперименты, написание текста; К. А. Бровина — эксперименты, редактирование текста; П. А. Бобровский — анализ данных, визуализация, редактирование текста; Е. Н. Графская — эксперименты, редактирование текста; Д. Д. Харлампиева — эксперименты, редактирование текста; В. Н. Лазарев — руководство научной группой, редактирование текста.

✉ **Для корреспонденции:** Валентин Александрович Манувера
ул. Малая Пироговская, д. 1А, г. Москва, 119435, Россия; vmanuvera@yandex.ru

Статья получена: 27.03.2024 **Статья принята к печати:** 15.06.2024 **Опубликована онлайн:** 28.06.2024

DOI: 10.47183/mes.2024.026

METHOD TO ASSESS THE EFFECTS OF BIOACTIVE COMPOUNDS SOLUTIONS ON BLOOD CLOTTING

Manuvera VA^{1,2}✉, Brovina KA^{1,2}, Bobrovsky PA^{1,2}, Grafskaya EN¹, Kharlampieva DD¹, Lazarev VN^{1,2}

¹ Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

² Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University), Dolgoprudny, Moscow Region, Russia

The search for new anticoagulants requires simple and affordable methods for primary determination of their activity. Clotting tests are widely used for laboratory evaluation of the hemostatic system. These are model studies that assess the state of the hemostatic system from a clinical point of view based on the fibrin clot formation time. Reagents and instruments for such tests are produced in Russia, they have low manufacturing cost and are easy to use. However, it is necessary to make a few modifications to the measurement methods to assess the anticoagulant activity. The study was aimed to demonstrate performance of the protocol for testing the solution anticoagulant activity using the modified standard clinical tests involving measurement of the activated partial thromboplastin time (aPTT), prothrombin time (PT), and thrombin time (TT). Reagents for measurement of aPTT, PT, and TT were used, along with the domestically produced heparin and two recombinant anticoagulant proteins from the medicinal leech obtained in our laboratory. Clotting tests were performed with the addition of anticoagulants to the reaction mixture were performed; performance and applicability limits of the methods used were determined. When studying hirudin, heparin, and cysteine-rich anticoagulant of medical leech using measurement of aPTT, TT, and PT, a dose-dependent increase in clotting time was demonstrated. The methods' compatibility with the use of various common components of buffer solutions used in biochemical tests was determined. It was shown that the slightly modified standard blood clotting tests for determination of hemostatic parameters could be used to test new potential anticoagulants.

Keywords: activated partial thromboplastin time, prothrombin time, thrombin time, anticoagulant, leech

Funding: the study was supported by the Russian Science Foundation grant No. 23-25-00006, <https://rscf.ru/project/23-25-00006/>.

Author contribution: Manuvera VA — concept, experiments, manuscript writing; Brovina KA — experiments, manuscript editing; Bobrovsky PA — data analysis, visualization, manuscript editing; Grafskaya EN — experiments, manuscript editing; Kharlampieva DD — experiments, manuscript editing; Lazarev VN — research team management, manuscript editing.

✉ **Correspondence should be addressed:** Valentin A. Manuvera
Malaya Pirogovskaya, 1A, Moscow, 119435, Russia; vmanuvera@yandex.ru

Received: 27.03.2024 **Accepted:** 15.06.2024 **Published online:** 28.06.2024

DOI: 10.47183/mes.2024.026

В клинической диагностике используют простые, дешевые и хорошо освоенные тесты на свертываемость крови — активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), протромбиновое время (ПВ) и тромбиновое время (ТВ) [1–3]. Эти тесты предназначены для определения

эффективности гемостаза в плазме крови пациентов. АЧТВ позволяет оценить работу внутреннего пути активации коагуляции, с помощью измерения ПВ определяют коагуляцию при активации внешнего пути, а ТВ показывает эффективность активации тромбином фибриногена и

полимеризации фибрина. В исследовательской работе по поиску новых антикоагулянтов возникает необходимость быстрого и недорогого тестирования веществ-кандидатов *in vitro*. При этом приходится работать с различными сложными смесями белков, экстрактами и другим подобным материалом. На начальном этапе необходимы простые и дешевые способы первичного скрининга.

В нашей лаборатории была разработана и используется методика для определения влияния на свертываемость крови потенциальных белков-антикоагулянтов медицинской пиявки (*Hirudo medicinalis*). Мы приводим используемые нами протоколы измерений и иллюстрируем их работоспособность на примере трех веществ, ингибирующих свертывание крови. Первый из них — цистеин-богатый антикоагулянт медицинской пиявки (CRA) представляет собой недавно обнаруженный нами [4] белок-антикоагулянт, родственник антистазину [5]. Вторым из объектов исследования является рекомбинантный белок гирудин, наиболее известный антикоагулянт медицинской пиявки [6]. Третий использованный антикоагулянт — это гепарин, олигосахарид, очень широко используемый в клинической практике [2, 7].

Целью работы было показать работоспособность протокола тестирования антикоагуляционной активности растворов с помощью модифицированных стандартных клинических тестов на измерение АЧТВ, ПВ и ТВ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оборудование

Анализатор показателей гемостаза АПГ4-03-Пх («ЭМКО»; Россия). Кюветы измерительные одноразовые с шариками для коагулометров («ЭМКО»; Россия). Измерения проводили с использованием оптического канала анализатора (режим «оптика»).

Реактивы

Набор реагентов для определения АЧТВ в плазме крови клоттинговым методом (АЧТВ-тест) ПГ-7/1 (НПО «РЕНАМ»; Россия).

Набор реагентов для определения ТВ «Тромбин-реагент» ПГ-9А (НПО «РЕНАМ»; Россия).

Реактив для определения ПВ «МЛТ-тромбопластин» («ЭМКО»; Россия).

Контрольная плазма (Плазма-Н) КМ-1 (НПО «РЕНАМ»; Россия).

Антикоагулянты

В качестве антикоагулянтов использовали полученные в нашей лаборатории рекомбинантный цистеин-богатый антикоагулянт (CRA) медицинской пиявки [4] и рекомбинантный гирудин (Hir) медицинской пиявки [4], а также раствор среднемолекулярного нефракционированного гепарина натрия (Нер) в ампулах промышленного производства («Синтез»; Россия). Для проведения тестов готовили серию разведений антикоагулянтов. Разведение осуществляли раствором 10 mM TrisCl, pH 7,5.

Клоттинговые тесты

При работе с антикоагулянтами каждый образец измеряли в четырех повторах параллельно, используя

четыре измерительные ячейки коагулометра. Для полученных значений вычисляли среднее арифметическое и стандартное отклонение. На основе полученных значений строили графики времени образования сгустка от концентрации антикоагулянта (рис. 1). При определении влияния различных растворов на результаты измерений каждый образец измеряли в двух повторах параллельно, используя две измерительных ячейки коагулометра одной пары. Для полученных значений вычисляли среднее арифметическое и заносили в таблицу (см. таблицу).

Активированное частичное тромбопластиновое время

Для измерения АЧТВ готовили 2^х АЧТВ-реагент. Для этого во флакон с лиофилизированным АЧТВ-реагентом вносили 2 мл воды, что составляет половину от рекомендованного объема при проведении клинического АЧТВ-теста. Во флакон с лиофилизированной контрольной плазмой крови вносили 1 мл воды, как рекомендовано производителем. Флаконы выдерживали 30 мин при комнатной температуре и периодическом перемешивании для полного растворения осадка. Раствор хлорида кальция помещали в термостатируемую ячейку коагулометра для прогрева до 37 °С. В коагулометрическую кювету вносили 50 мкл контрольной плазмы, 25 мкл исследуемого раствора и 25 мкл 2^х АЧТВ-реагента и перемешивали содержимое кюветы трехкратным пипетированием. В кювету помещали магнитный шарик и переносили в термостатируемую ячейку-таймер коагулометра на 3 мин. После окончания инкубирования перемещали кюветы в измерительные ячейки коагулометра и добавляли 50 мкл прогретого хлорида кальция в режиме «автостарт». Фиксировали время образования сгустка.

Тромбиновое время

Для определения ТВ использовали тромбин-реагент с концентрацией 6 ед./мл. Для его приготовления во флакон с лиофилизированным тромбином вносили 2,7 мл воды и 0,3 мл концентрированного растворителя (буферного раствора из состава набора). Во флакон с лиофилизированной контрольной плазмой крови вносили 1 мл воды, как рекомендовано производителем. Флаконы выдерживали 30 мин при комнатной температуре и периодическом перемешивании для полного растворения осадка. Раствор тромбин-реагента помещали в термостатируемую ячейку коагулометра для прогрева до 37 °С. В коагулометрическую кювету вносили 100 мкл контрольной плазмы и 50 мкл исследуемого раствора, перемешивали содержимое кюветы трехкратным пипетированием. Далее, в кювету помещали магнитный шарик и переносили в термостатируемую ячейку-таймер коагулометра на 3 мин. После окончания инкубирования перемещали кюветы в измерительные ячейки коагулометра и добавляли 50 мкл прогретого тромбин-реагента в режиме «автостарт». Фиксировали время образования сгустка.

Протромбиновое время

Для определения ПВ использовали 2^х раствор тромбопластина. Для его приготовления во флакон с лиофилизированной тромбопластин-кальциевой смесью вносили 3 мл воды, что составляет половину от рекомендованного объема при проведении клинического

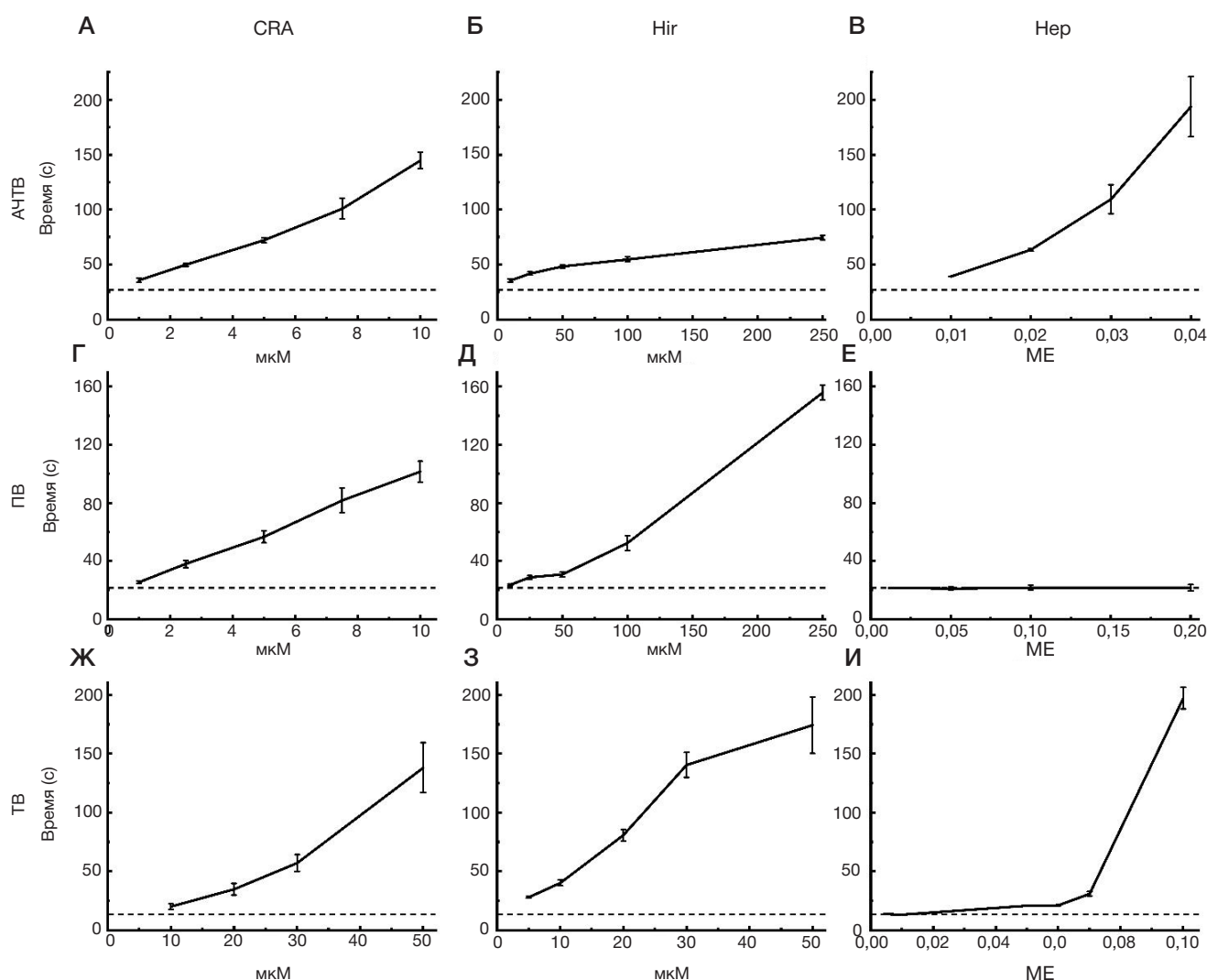


Рис. 1. Результаты измерения АЧТВ, ПВ и ТВ для раствора трех антикоагулянтов — цистеин-богатого антикоагулянта медицинской пиявки (CRA), гирудина (Hir) и гепарина (Hep). Для CRA и Hir концентрации обозначены в мкМ белка в измеряемом растворе, для Hep указано суммарное количество МЕ на реакцию. Пунктирной линией показано среднее время образования сгустка в контрольном образце (10 мМ TrisCl, pH = 7,5). Данные представлены как средние значения времени образования сгустка со стандартными отклонениями. Для каждой точки проводили четыре независимых измерения

ПВ-теста. Во флакон с лиофилизированной контрольной плазмой крови вносили 1 мл воды, как рекомендовано производителем. Флаконы выдерживали 30 мин при комнатной температуре и периодическом перемешивании для полного растворения осадка. Раствор тромбопластина помещали в термостатируемую ячейку коагулометра для прогрева до 37 °C. В коагулометрическую кювету вносили 50 мкл контрольной плазмы и 50 мкл исследуемого раствора, перемешивали содержимое кюветы трехкратным пипетированием. Далее, в кювету помещали магнитный шарик и переносили в термостатируемую ячейку-таймер коагулометра на 3 мин. После окончания инкубирования перемещали кюветы в измерительные ячейки коагулометра и добавляли 50 мкл прогретого раствора тромбопластина в режиме «автостарт». Фиксировали время образования сгустка.

Статистический анализ

Для проведения статистического анализа при сравнении образцов, содержащих исследуемые белки с контрольной плазмой, применяли непараметрический критерий Манна-Уитни с использованием языка программирования Python (версия 3.12) (Python Software Foundation; CША).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты определения АЧТВ представлены на рис. 1 А–В. Для всех трех антикоагулянтов наблюдается четкое увеличение времени образования сгустка с увеличением концентрации действующего вещества.

Результаты измерения ПВ представлены на рис. 1Г–Е. Как и в случае измерения АЧТВ, для CRA (рис. 1Г) и Hep (рис. 1Д) наблюдается увеличение времени застывания реакционной смеси с увеличением концентрации. Гепарин, имевший высокую активность в тесте АЧТВ, при измерении ТВ активности не проявляет (рис. 1Е).

Результаты измерения ТВ представлены на рис. 1Ж–И. Все три антикоагулянта показывают дозозависимое увеличение времени образования сгустка.

Для определения совместимости описываемых методик с компонентами часто применяемых в биохимических исследованиях буферных растворов было проведено определение их влияния на время формирования сгустка для трех описываемых тестов. Результаты приведены в таблице. В большинстве случаев влияние отсутствовало или было незначительно. Однако 1% β-меркаптоэтанол приводил к отсутствию коагуляции при измерении АЧТВ и ПВ, а раствор 1М NaCl вызывал кратное увеличение значений во всех трех тестах.

Таблица. Влияние различных растворов на определение АЧТВ, ТВ и ПВ

Образец/Тест	АЧТВ	ТВ	ПВ
вода (К)	28,7 ± 1,0	12,8 ± 0,6	15,9 ± 0,5
PBS ¹	29,7 ± 0,6	18,0 ± 0,4	18,6 ± 0,1
Tris-HCl 100 мМ	28,0 ± 1,0	17,4 ± 0,4	17,3 ± 0,3
NaCl 9 г/л	29,1 ± 0,4	17,3 ± 0,3	19,0 ± 1,0
NaCl 1 М	62,0 ± 2,0	114,0 ± 18,0	136,8 ± 0,5
SDS 0,1%	31,0 ± 2,0	13,1 ± 0,7	16,1 ± 0,1
SDS 0,01%	28,5 ± 0,2	12,1 ± 0,8	15,2 ± 0,1
мочевина 1 М	29,0 ± 1,0	33,7 ± 0,1	21,3 ± 0,4
мочевина 0,1 М	28,1 ± 0,7	13,9 ± 0,4	15,7 ± 0,1
β-меркаптоэтанол 1 %	н. д. ²	16,0 ± 2,0	н. д. ²
β-меркаптоэтанол 0,1%	33,0 ± 2,0	13,0 ± 2,0	21,8 ± 0,6
Тритон X-100 1%	26,0 ± 1,0	13,0 ± 0,1	н. д. ²
ДТТ 1 мМ	31,0 ± 2,0	14,0 ± 0,4	19,4 ± 0,5

Примечание: указано среднее время образования сгустка в секундах ± стандартное отклонение; ¹ — фосфатный буферный раствор (20 мМ фосфат натрия, 8 г/л хлорид натрия, pH = 7,4); ² — сгусток не сформировался, значение недоступно.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для любого метода ключевым параметром являются граничные условия его применимости. В процессе постановки экспериментов, помимо автоматической фиксации времени формирования сгустка прибором, мы проводили визуальное наблюдение состояния реакционной смеси. При больших концентрациях антикоагулянтов в измерительных кюветах наблюдалась явная неравномерность застывания, отдельные комки и жгуты вокруг магнитных шариков, а также подвижность шариков после срабатывания датчика коагулометра. В таких условиях результаты не могут считаться достоверными, поэтому верхний порог измерений следует ограничивать сотней секунд. Таким образом, во всех трех тестах концентрации антикоагулянтов следует подбирать так, чтобы при максимальной исследуемой концентрации время образования сгустка находилось в районе 100 с. Если в процессе измерения образование сгустка не происходит за это время, следует дополнительно разбавить измеряемый образец. Также следует учитывать, что реактивы и контрольная плазма из разных производственных партий дают при измерении АЧТВ, ТВ и ПВ несколько различающиеся результаты. Вследствие этого строго необходимо всю серию измерений каждого образца (или нескольких образцов при их сравнении) и контрольных образцов проводить с использованием реактивов из одной партии.

Для сравнения результатов, полученных в разное время и с использованием разных реактивов, можно применять различные методы нормализации. Например, в случае ПВ при клинической диагностике широко применяют международное нормализованное отношение (МНО, ISI) [1–3]. Для скрининговых тестов нам представляется возможным использование относительной величины (КО), полученной как частное от времени образования сгустка в исследуемом образце (t_o) к времени образования сгустка в контрольном образце (t_k): $КО = t_o/t_k$.

Предлагая проводить для каждого исследуемого образца три разных теста, авторы исходят из того, что будет производиться поиск веществ с неизвестными характеристиками и механизмом действия, обязательной чертой которых является лишь способность ингибировать коагуляцию. В связи с этим мы считаем, что надо

применять все три теста совместно. Естественно, в большинстве случаев определенные предположения о характеристиках искомого компонента имеются. В таком случае исследователи вполне могут предпочесть тот или иной вариант тестирования, исходя из своих соображений. Различия действия трех использованных в этой работе антикоагулянтов проявляются довольно наглядно.

В тесте АЧТВ для всех исследованных веществ наблюдается явный дозозависимый эффект. Однако CRA показывает время (рис. 1А), соизмеримое с Hir (рис. 1Б), при молярных концентрациях, меньших на порядок величины. Например, время образования сгустка примерно в 50 с достигается уже при концентрации CRA в пробе, равной 2,5 мкМ, а гирудина — только при концентрации 50 мкМ. Можно сделать вывод, что CRA значительно эффективнее ингибирует активацию внутреннего пути свертываемости крови по сравнению с Hir. Вполне ожидаемо, что Нер также эффективно ингибирует коагуляцию (рис. 1В), однако напрямую сравнить его удельную активность с активностью исследуемых белков невозможно, так как концентрация лекарственной формы Нер указана только в международных единицах активности (МЕ).

Несколько иная картина наблюдается при определении ПВ (рис. 1Г–Е). В случае CRA (рис. 1Г) и Нер (рис. 1Д) наблюдается увеличение времени застывания реакционной смеси с увеличением концентрации, как и при определении АЧТВ. В то же время гепарин, имевший высокую активность в тесте АЧТВ, при измерении ТВ не вызывает увеличения времени формирования сгустка (рис. 1Е). Это связано с тем, что он ингибирует факторы Ха и IIa, а также факторы внутреннего пути активации не напрямую, а при посредничестве антитромбина [7].

При определении ТВ (рис. 1Ж–И) примечательно то, что в этом случае наблюдается ситуация, обратная по сравнению со случаем измерения АЧТВ: Hir (рис. 1З) проявляет большую активность, чем CRA (рис. 1Ж). Вероятно, это связано с тем, что Hir является специфичным ингибитором тромбина (фактор IIa) [6], а CRA, помимо тромбина, ингибирует и другие протеиназы каскада свертывания крови [4]. В результате, при измерении АЧТВ активность CRA проявляется более явно за счет накопительного эффекта. Рабочий диапазон измерения для Нер (рис. 1И) в данном случае сильно сужен. При добавлении в реакцию 0,07 МЕ Нер время

застывания составляет $29,3 \pm 2,5$ с, а при добавлении 0,1 МЕ на реакцию полноценное образование сгустка уже не происходит.

При первичном поиске веществ, препятствующих свертыванию крови, исследователи часто имеют лишь общие соображения об их природе и механизме действия, так как для того, чтобы детально исследовать эти аспекты, необходимо сначала действующее вещество обнаружить и получить в относительно чистом виде. Особенно данная проблема проявляется при исследовании сложных смесей природного происхождения — слюны кровососущих животных, секретов, экстрактов и т. д. Исследователи могут видеть проявление биологической активности, но на этом этапе не имеют представления, за счет чего и как она реализуется. Именно поэтому нам кажется обоснованным использовать одновременно три разных теста, нацеленных на три разных части каскада свертывания крови — внутренний путь (АЧТВ), внешний путь (ПВ) и конечную стадию (ТВ). С использованием трех антикоагулянтов разной природы мы показали, что они по-разному проявляют себя в этих тестах.

При исследовании новых потенциальных антикоагулянтов они могут находиться в растворах, содержащих различные низкомолекулярные вещества. Например, при исследовании рекомбинантных белков-антикоагулянтов они после хроматографической очистки или рефолдинга оказываются растворенными в буферных растворах, состав которых зависит от конкретной методики выделения. В каждом конкретном случае строго необходимо выполнять контрольные измерения с

буферным раствором, идентичным тому, в котором растворено исследуемое вещество. Однако некоторые растворы могут быть несовместимы с используемыми методами измерения. Мы проверили влияние на измерение АЧТВ, ТВ и ПВ некоторых распространенных компонентов буферных растворов, используемых в биохимических исследованиях. Результаты представлены в таблице. В большинстве случаев влияние исследуемых растворов на результаты тестов незначительны. Однако прямое использование растворов с высокой ионной силой (1М NaCl) невозможно во всех тестах, а сильных восстановителей (β -меркаптоэтанол) — при определении АЧТВ и ПВ. В то же время растворы, содержащие более слабые восстановители (ДТТ), умеренные количества детергентов (Тритон X-100, додецилсульфат натрия (SDS)) или 0,1 М мочевины, могут быть использованы для проведения измерений.

ВЫВОДЫ

В работе представлены модификации методик определения АЧТВ, ПВ и ТВ с использованием широко распространенных реактивов и коагулометра отечественного производства. Модификации заключаются в изменении объемов реагентов и времени инкубации и не требуют дополнительных реагентов или оборудования для проведения измерений. Описанные методики могут быть полезны при поиске новых антикоагулянтов и исследовании влияния разных веществ на процесс свертывания крови.

Литература

1. Баркаган З. С. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза. Москва: ООО "Медико-технологическое предприятие «НьюДиамед», 2008; 292 с.
2. Winter W, Flax S, Harris N. Coagulation testing in the core laboratory. *Laboratory Medicine*. 2017; 48 (4): 295–313. Available from: <https://doi.org/10.1093/labmed/>.
3. Макаров В. А., Спасов А. А., Плотноков М. Б., Белозерская Г. Г., Васильева Т. М., Дрозд Н. Н., и др. Методические рекомендации по изучению лекарственных средств, влияющих на гемостаз. В книге: Миронов А. Н., Бунятян Н. Д., Васильев А. Н., Верстакова О. Л., Журавлева М. В., Лепяхин В. К., и др, редакторы. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К, 2012; с. 453–479.
4. Manuvera VA, Kharlampieva DD, Bobrovsky PA, Graftskaia EN,

- Brovina KA, Lazarev VN. New anticoagulant protein from medicinal leech. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2024; 696: 149473. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2024.149473>
5. Nutt EM, Jain D, Lenny AB, Schaffer L, Siegl PK, Dunwiddie CT, Purification and characterization of recombinant antistasin: a leech-derived inhibitor of coagulation factor Xa, *Arch Biochem Biophys*. 1991; 285: 37–44. Available from: [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(91\)90325-D](https://doi.org/10.1016/0003-9861(91)90325-D).
6. Müller C, Mescke K, Liebig S, et al. More than just one: multiplicity of Hirudins and Hirudin-like Factors in the Medicinal Leech, *Hirudo medicinalis*. *Mol Genet Genomics*. 2016; 291: 227–240. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00438-015-1100-0>.
7. Onishi A, St Ange K, Dordick JS, Linhardt RJ. Heparin and anticoagulation. *Front Biosci Landmark Ed*. 2016; 21 (7): 1372–92. Available from: <https://doi.org/10.2741/4462>.

References

1. Barkagan ZS. Diagnostika i kontroliruemaja terapija narushenij gemostaza. Moskva: ООО "Mediko-tehnologicheskoe predpriatie «N'judiamed», 2008; 292 s. Russian.
2. Winter W, Flax S, Harris N. Coagulation testing in the core laboratory. *Laboratory Medicine*. 2017; 48 (4): 295–313. Available from: <https://doi.org/10.1093/labmed/>.
3. Makarov VA, Spasov AA, Plotnikov MB, Belozerskaja GG, Vasileva TM, Drozd NN, i dr. Metodicheskie rekomendacii po izucheniju lekarstvennyh sredstv, vlijajushhih na gemostaz. V knige: Mironov AN, Bunjatjan ND, Vasil'ev AN, Verstakova OL, Zhuravleva MV, Lepahin VK, i dr, redaktory. Rukovodstvo po provedeniju doklinicheskikh issledovanij lekarstvennyh sredstv. Chast' pervaja. M.: Grif i K, 2012; s. 453–479. Russian.
4. Manuvera VA, Kharlampieva DD, Bobrovsky PA, Graftskaia EN, Brovina KA, Lazarev VN. New anticoagulant protein from medicinal

- leech. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2024; 696: 149473. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2024.149473>
5. Nutt EM, Jain D, Lenny AB, Schaffer L, Siegl PK, Dunwiddie CT, Purification and characterization of recombinant antistasin: a leech-derived inhibitor of coagulation factor Xa, *Arch Biochem Biophys*. 1991; 285: 37–44. Available from: [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(91\)90325-D](https://doi.org/10.1016/0003-9861(91)90325-D).
6. Müller C, Mescke K, Liebig S, et al. More than just one: multiplicity of Hirudins and Hirudin-like Factors in the Medicinal Leech, *Hirudo medicinalis*. *Mol Genet Genomics*. 2016; 291: 227–240. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00438-015-1100-0>.
7. Onishi A, St Ange K, Dordick JS, Linhardt RJ. Heparin and anticoagulation. *Front Biosci Landmark Ed*. 2016; 21 (7): 1372–92. Available from: <https://doi.org/10.2741/4462>.