

ISSN 1561-8331 (Print)
ISSN 2524-2342 (Online)
УДК 66.081.63
<https://doi.org/10.29235/1561-8331-2022-58-1-86-93>

Поступила в редакцию 28.12.2021
Received 28.12.2021

Т. А. Глевицкая, А. В. Бильдюкевич

Институт физико-органической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

ВЫДЕЛЕНИЕ ТРОМБИНА МЕТОДОМ УЛЬТРАФИЛЬТРАЦИИ

Аннотация. Исследована возможность фракционирования раствора активированного протромбинового комплекса (АПК) методами ультра- и диафильтрации. Для отделения тромбина от высокомолекулярных примесей использовали полволоконную ультрафильтрационную мембрану на основе полиэфирсульфона ПЭС-ПВ-100 (производства ИФОХ НАН Беларуси), последующее концентрирование целевого фильтрата выполняли на мембране из полисульфона ПС-ПВ-20. Установлено, что методы ультрафильтрации подходят для выделения тромбина из АПК. Сравнительный анализ выделенных образцов с коммерческими аналогами коагулологического реагента «Тромбин» показал, что тромбин, выделенный с помощью ультрафильтрации, по своей чистоте не уступает тромбину, выделенному хроматографическим путем.

Ключевые слова: тромбин, ультрафильтрация, диафильтрация, коагулологическая активность, мембрана, полиэфирсульфон

Для цитирования. Глевицкая, Т. А. Выделение тромбина методом ультрафильтрации / Т. А. Глевицкая, А. В. Бильдюкевич // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2022. – Т. 58, № 1. – С. 86–93. <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2022-58-1-86-93>

T. A. Hliavitskaya A. V. Bilydukevich

Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

ISOLATION OF THROMBIN BY ULTRAFILTRATION

Abstract. The feasibility of separation of activated prothrombin complex (APC) solution via ultrafiltration was investigated. To separate thrombin from high molecular weight impurities, polyethersulfone hollow fiber ultrafiltration membrane PES-HF-100 (manufactured by Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus) was used, further concentration of the target filtrate of PES-HF-100 was carried out using polysulfone membrane PS-PV-20. It was found that ultrafiltration methods are suitable for isolation of thrombin from APC. Comparative analysis of prepared samples with commercial analogs of the coagulation reagent “Thrombin” established that thrombin isolated via ultrafiltration is not inferior in purity to thrombin isolated by chromatography.

Keywords: thrombin, ultrafiltration, diafiltration, coagulation activity, membrane, polyethersulfone

For citation. Hliavitskaya T. A., Bilydukevich A. V. Isolation of thrombin by ultrafiltration // *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk = Proceeding of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical series*, 2022, vol. 58, no. 1, pp. 86–93 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2022-58-1-86-93>

Введение. Тромбин нашел широкое применение в лабораторной практике в качестве реагента для определения времени свертывания плазмы крови, тест «Тромбиновое время» (ТВ). По химической природе бычий тромбин является гликопротеидом с молекулярной массой около 36 000 Да [1, 2]. Тромбин образуется из протромбина при ферментативной активации последнего [3–5]. Протромбин представляет собой одноцепочечный гликопротеин с молекулярной массой около 72 000 Да, относящийся к классу α -2-глобулинов. Протромбин сохраняется в плазме при хранении, однако в сыворотке отсутствует, так как потребляется в процессе свертывания крови, превращаясь в тромбин. В норме в плазме крови концентрация протромбина составляет 10–20 мг/дл. Протромбин в чистом виде выделить из плазмы крови довольно сложно [6, 7], однако с помощью этанольного фракционирования плазмы (как бычьей, так и человеческой) [8, 9] можно легко получить протромбиновый комплекс (группу гликопротеинов, включающую протромбин, фактор Стюарта, фактор Кристмаса, конвертин) (табл. 1). Также выделенный способом этанольного фракционирования протромбиновый комплекс содержит дополнительные загрязнители: альбумин, другие белки крови, токсины [8, 10]. Для превращения профермента в тромбин протром-

Т а б л и ц а 1. Характеристика белков неактивной и активной формы бычьего протромбинового комплекса [14]
 T a b l e 1. Characterization of proteins included in inactive and active form of the bovine prothrombin complex [14]

Неактивная форма			После активации тромбопластином	
белок	содержание в плазме, мкг/мл	ММ, Да	белок	ММ, Да
Протромбин	100–200	~ 72 000	Тромбин	~ 36 000
Конвертин	0,5–1,0	~ 50 000	Конвертин	~ 50 000
Фактор Стюарта	7,6	~ 55 400	Активированный фактор Стюарта	~ 45 300
Фактор Кристмаса	5,0	~ 55 000	Фактор Кристмаса	~ 55 000

биновый комплекс подвергают активации тромбопластином в присутствии ионов кальция [11], существуют и другие методы активации протромбина без использования тромбопластина [12, 13].

В литературе описано множество примеров выделения тромбина из активированного протромбинового комплекса (АПК) и все с использованием хроматографических методов очистки [15, 16]. Самым распространенным способом выделения тромбина является многостадийная хроматография с использованием анионо- и катионообменных ионитов, например, диэтиламиноэтил Sepharose® в качестве анионообменной среды и CM или S-Sepharose® в качестве катионообменной среды [11, 15, 16]. Хроматографическое разделение связано с большими затратами времени и существенно увеличивает стоимость реагента.

На наш взгляд, альтернативным методом выделения тромбина из АПК может являться ультрафильтрация, что и предопределило тему дальнейшего исследования.

Экспериментальная часть. Выделение тромбина из активированного протромбинового комплекса проводили на полуволоконных мембранах из полиэфирсульфона и полисульфона с различным номинальным молекулярно-массовым пределом задерживания (НММП) 300, 100, 50 и 20 кДа производства ИФОХ НАН Беларуси (ТУ ВУ 100185198.091–2008, изм.1).

Перед проведением эксперимента по ультрафильтрации предварительно осуществляли химическую мойку мембран с использованием 1 %-ного водного раствора Ultrasil 10 (Ecolab, Швеция) в течение 1 ч. Удельную производительность мембран (J , л/м²ч) определяли при комнатной температуре и давлении в 1 атм. Значения удельной производительности вычисляли по формуле:

$$J = V / (S t), \quad (1)$$

где V – объем фильтрата, л; S – площадь рабочей поверхности мембраны, м²; t – время фильтрации, ч.

Коэффициент задерживания вычисляли по формуле:

$$R = \left(1 - \frac{C_{\phi}}{C_{\text{пит}}} \right) 100 \%, \quad (2)$$

где C_{ϕ} – концентрация калибратора в фильтрате, г/л; $C_{\text{пит}}$ – концентрация калибратора в исходном (питающем) растворе, г/л.

В качестве калибраторов использовали 0,3 %-ный водный раствор поливинилпирролидона марки К-30 (Fluka, Германия), растворы тромбина (НПО «Ренам», Российская Федерация) с концентрацией общего белка $C_{\text{общ}} = 0,40$ г/л и альбумина (бычий сывороточный альбумин, $M_w = 69\,000$ г/моль, Merck), с концентрацией $C_{\text{альб}} = 0,55$ г/л в цитратных буферах (рН 6,6).

Протромбиновый комплекс был выделен из бычьей плазмы многоэтапным методом этапного фракционирования и последующей активацией тромбопластином в присутствии ионов кальция согласно методике, описанной в [10]. Концентрацию общего белка в образцах определяли биуретовым методом, используя раствор бычьего сывороточного альбумина для построения калибровочной кривой. Альбумин определяли колориметрическим методом по реакции с бромкрезоловым зеленым [17]. Концентрация общего белка в образце АПК составила 0,95 г/л, концентрация альбумина – 0,55 г/л.

Контрольные исследования специфической свертывающей активности проводили по тесту «Тромбиновое время» (ТВ) [18] на гемоагулометре СТ 2410 (ЗАО СОЛАР, Беларусь). В качестве

субстрата использовалась аттестованная по этому показателю «Плазма крови контрольная нормальная» (ТУ ВУ 100185198.103-2007, производства ИФОХ НАН Беларуси).

Электрофорез белковых фракций осуществляли на системе для электрофореза SolarSE 2120 (ЗАО СОЛАР, Беларусь) в агарозном геле с использованием вероналового буфера pH 8,9. Белковые полосы в геле окрашивали красителем амидовый черный (CORMAY, Польша). Результаты анализа расшифровывались автоматически при помощи сканирующего денситометра ДМ 2120 (ЗАО СОЛАР, Беларусь).

Результаты и их обсуждение. На основании результатов электрофоретического анализа исходного сырья (АПК, выделенного из бычьей плазмы), используемого для получения тромбина, установлено, что в исходном сырье кроме фракций α -1- и α -2-глобулинов (что соответствует электрофоретической подвижности тромбина [19–22]) также присутствует и фракция альбуминов (рис. 1). В связи с этим состав активированного протромбинового комплекса был оценен путем определения концентрации общего белка ($C_{\text{общ}}$), концентрации альбумина ($C_{\text{альб}}$) и коагулогиче-

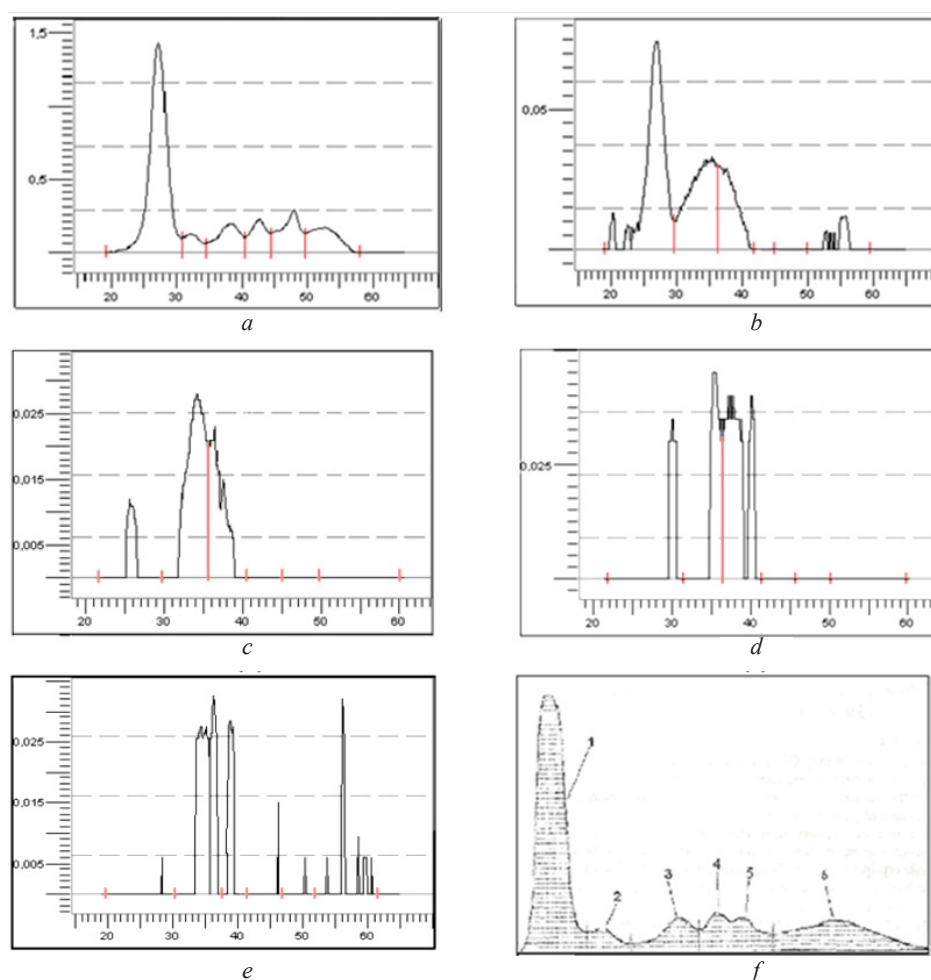


Рис. 1. Результаты электрофоретического анализа бычьей плазмы крови (а), активированного протромбинового комплекса (b), концентратов ПС-ПВ-20, полученных из АПК диафильтрацией в режимах концентрирования/разбавления (с) и при постоянном объеме (d); тромбина, производства НПО «Ренам» (е) в сравнении с литературными данными по электрофоретическому анализу бычьей плазмы крови (f), где фракции 1 – альбуминов, 2 – α -1-глобулинов, 3 – α -2-глобулинов, 4 – β -1-глобулинов, 5 – β -2-глобулинов, 6 – γ -глобулинов [22]

Fig. 1. Results of electrophoretic analysis of bovine blood plasma (a), activated prothrombin complex (b), PS-HF-20 retentate obtained from APC by diafiltration in the concentration/dilution mode (c) and in the constant volume mode (d); thrombin, manufactured by SPS “Renam” (e) in comparison with literature data on electrophoretic analysis of the bovine blood plasma (f), where fraction 1 – albumin, 2 – α -1-globulins, 3 – α -2-globulins, 4 – β -1-globulins, 5 – β -2-globulins, 6 – γ -globulins [22]

ской активности (КА), за которую и отвечает тромбин. Получены следующие данные: $C_{\text{общ}} = 0,95$ г/л, $C_{\text{альб}} = 0,55$ г/л, $КА = 18,5$ с.

Поскольку в исходном сырье кроме тромбина имеется значительная примесь альбумина, оценку транспортных свойств ультрафильтрационных мембран проводили не только по модельным растворам тромбина ($C_{\text{тр}} = 0,40$ г/л, рН 6,6), но и по модельным растворам альбумина ($C_{\text{альб}} = 0,55$ г/л, рН 6,6). Концентрация альбумина в модельных растворах выбрана на основании результатов определения концентрации альбумина в составе исходного раствора АПК. Концентрация модельного раствора тромбина объясняется предположением, что содержание общего белка ($C_{\text{общ}}$) в исходном сырье может быть представлена суммой концентрации альбумина ($C_{\text{альб}}$) и тромбина ($C_{\text{тр}}$). Значение рН 6,6 буферного раствора выбрано на основании литературных данных [11, 23], в которых указано, что наибольшей стабильностью тромбин обладает в диапазоне рН 6,0–7,0. Результаты определения транспортных свойств мембран приведены в табл. 2.

Т а б л и ц а 2. Основные транспортные характеристики используемых полволоконных мембран

Table 2. Transport properties of hollow fiber membranes

Марка мембраны	НММП, кДа	J_0 , л/м ² ч	$R_{к-30}$, %	$J_{\text{альб}}$, л/м ² ч	$R_{\text{альб}}$, %	$J_{\text{тр}}$, л/м ² ч	$R_{\text{тр}}$, %
ПЭС-ПВ-300	300	645	33 – 35	74	91	93	76
ПЭС-ПВ-100	100	355	45 – 47	72	98	81	78
ПЭС-ПВ-50	50	194	74 – 75	33	>99	57	91
ПС-ПВ-20	20	45	79 – 80	16	>99	20	>99

Выделение тромбина из активированного протромбинового комплекса методом ультрафильтрации сводилось к двум этапам: 1) отделение тромбина (36 000 Да) от высокомолекулярных примесей (альбумин, γ -глобулин); 2) концентрирование фильтрата полученного на первой стадии с частичной очисткой от низкомолекулярных примесей.

Сопоставление данных по калибровке мембран модельными растворами тромбина и альбумина (табл. 2) показало, что на первом этапе фракционирования целесообразно использовать мембрану ПЭС-ПВ-100, поскольку данная мембрана практически полностью задерживает альбумин ($R_{\text{альб}} = 98\%$), в то время как значение коэффициента задерживания по тромбину не превышает 78%. Более крупнопористая мембрана ПЭС-ПВ-300 имеет меньший коэффициент задерживания альбумина ($R_{\text{альб}} = 91\%$) при соответствующих значениях коэффициента задерживания по тромбину ($R_{\text{тр}} = 76\%$ для ПЭС-ПВ-300). Для концентрирования раствора тромбина использовали мембрану ПС-ПВ-20, которая практически полностью задерживает тромбин ($R_{\text{тр}} > 99\%$) и в этом случае потери целевого продукта будут минимальными.

Фракционирование АПК на первом этапе проводили двумя способами: 1) диафильтрацией в режиме концентрирования/разбавления и 2) диафильтрацией при постоянном объеме.

Диафильтрация в режиме концентрирования/разбавления на полволоконных мембранах ПЭС-ПВ-100 проводилась следующим образом. На первой стадии осуществлялась 5-кратное концентрирование исходного раствора АПК. После чего производился отбор проб фильтрата и концентрата для определения коагулогической активности и содержания общего белка и альбумина. Результаты эксперимента показали (табл. 3), что фильтрат обладал более низкой свертывающей активностью по сравнению с исходным раствором, а в концентрате, наоборот, наблюдалась более высокая свертывающая активность. Следовательно, довольно значительная часть тромбина оставалась в концентрате. Далее концентрат разбавляли цитратным буфером (рН 6,6) до первоначального объема (разбавление № 1) и полученный раствор снова 5-кратно концентрировали. Когда объем концентрата составлял порядка 20% от исходного, выполнялся отбор проб (табл. 3). Полученный на второй стадии концентрат также обладал высокой свертывающей активностью, поэтому процедуру снова повторяли до тех пор, пока в концентрате не переставала наблюдаться коагулогическая активность. Поскольку за свертывающую активность в активированном протромбиновом комплексе по тесту ТВ отвечает лишь тромбин, то считалось, что отсутствие коагулогической активности в концентрате свидетельствует о том, что практически весь тромбин переходит в фильтрат. Коагулогическая активность считалась следовой, если время свертывания плазмы крови по тесту ТВ находилось в диапазоне 120–300 с.

Т а б л и ц а 3. Результаты ультрафильтрации АПК на мембране ПЭС-ПВ-100 в режиме концентрирования

T a b l e 3. Results of ultrafiltration of APC on a PES-HF-100 membrane in the concentration mode

Стадии фильтрации		КА, с	$C_{\text{общ}}$, г/л	$C_{\text{альб}}$, г/л
1	Исходный	18	0,95	0,55
	Фильтрат	34	0,17	–
	Концентрат	11	4,05	2,65
2	Исходный (разбавление № 1)	27	0,95	0,62
	Фильтрат	49	0,17	–
	Концентрат	18	3,49	2,60
3	Исходный (разбавление № 2)	41	0,93	0,69
	Фильтрат	52	0,15	–
	Концентрат	28	3,08	2,55
4	Исходный (разбавление № 3)	58	0,95	0,79
	Фильтрат	86	0,13	–
	Концентрат	46	2,80	2,55
5	Исходный (разбавление № 4)	110	0,70	0,64
	Фильтрат	Следовая	0,05	–
	Концентрат	68	2,65	2,50
6	Исходный (разбавление № 5)	Следовая	0,88	0,83
	Фильтрат	Следовая	0,03	–
	Концентрат	86	2,57	2,45
7	Исходный (разбавление № 6)	Следовая	1,03	0,98
	Фильтрат	Не обнаружена	0,05	–
	Концентрат	118	2,50	2,36
8	Исходный (разбавление № 7)	Не обнаружена	0,83	0,79
	Фильтрат	Не обнаружена	–	–
	Концентрат	Следовая	2,46	2,36
9	Исходный (разбавление № 8)	Не обнаружена	0,98	0,94
	Фильтрат	Не обнаружена	–	–
	Концентрат	Не обнаружена	2,44	2,30

Увеличение времени свертывания плазмы крови по тесту ТВ, уменьшение концентрации общего белка и сохранение концентрации альбумина практически на постоянном уровне для концентратов, полученных с использованием мембраны ПЭС-ПВ-100 на каждой последующей стадии фильтрации по сравнению с предыдущей, свидетельствуют о протекании процесса фракционирования (об отделении тромбина от альбумина и о постепенном переходе первого в фильтрат). После проведения завершающей стадии ультрафильтрации происходило объединение фильтратов, выделенных на всех стадиях процесса и последующее концентрирование раствора на мембране ПС-ПВ-20 в 3–3,5 раза, результаты которого будут обсуждены ниже.

При диафильтрации при постоянном объеме убыль объема исходного раствора АПК постоянно компенсируется добавлением чистого растворителя [24]. Поскольку мембрана ПЭС-ПВ-100 лишь частично пропускает тромбин ($R_{\text{тр}} = 78\%$), то применение диафильтрации позволяет неограниченно понижать концентрацию тромбина при практически полном сохранении концентрации более высокомолекулярных примесей. Ультрафильтрация на мембране ПЭС-ПВ-100 проводилась в один этап, при этом объем исходного раствора поддерживался постоянным путем организации непрерывной подачи цитратного буферного раствора. Во время диафильтрации через определенные промежутки времени производился забор проб фильтрата и концентрата для проведения дальнейших испытаний. Основные данные о ходе фильтрации приведены на рис. 2.

Установлено, что с повышением степени отбора фильтрата (соотношение объема раствора, прошедшего в фильтрат, к исходному объему) в питающем растворе регистрировалось постепенное увеличение времени свертывания плазмы крови (снижение коагулогической активности), так для степени отбора фильтрата $\varphi = 1,2$, $KA_{\text{пит}} = 76$ с, для $\varphi = 2,3$ определялась лишь следовая $KA_{\text{пит}}$, а для $\varphi = 2,8$ $KA_{\text{пит}}$ и вовсе не зарегистрирована. Вместе с тем в фильтрате ПЭС-ПВ-10 с ростом

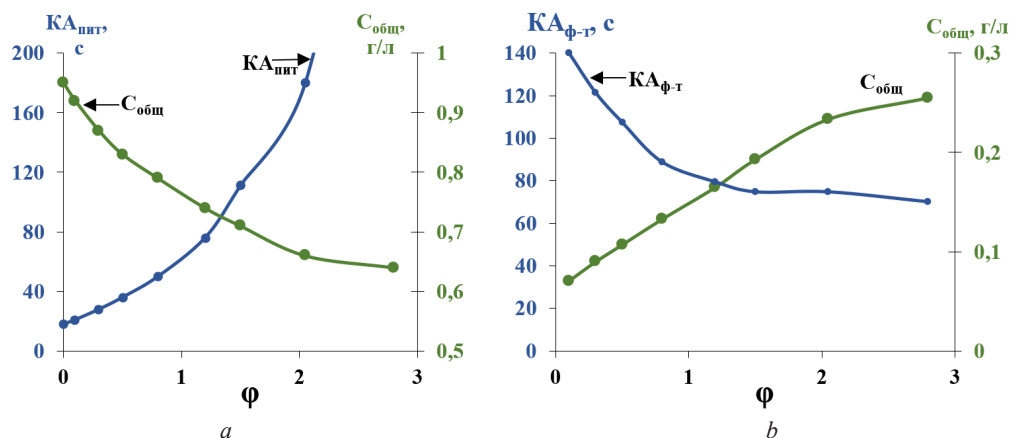


Рис. 2. Зависимости коагулогической активности (КА) и концентрации общего белка ($C_{общ}$) от степени отбора фильтрата (ϕ) для питающего (исходного) раствора (a) и фильтрата ПЭС-ПВ-100 (b)

Fig. 2. Dependences of coagulogic activity (CA) and total protein concentration (C_{total}) on the degree of filtrate selection (ϕ) for feed (initial) solution (a) and PES-HF-100 retentate (b)

ϕ , наоборот, фиксировали рост $KA_{ф-т}$ (снижение времени свертывания плазмы крови) и постепенное увеличение концентрации общего белка, что свидетельствовало об успешном фракционировании АПК и переходе тромбина в фильтрат ПЭС-ПВ-100. Полученный фильтрат также был сконцентрирован на мембране ПС-ПВ-20. Итоговые результаты фракционирования растворов АПК на мембранах ПЭС-ПВ-100 и ПС-ПВ-20 (как в режиме концентрирования/разбавления, так и диафильтрацией при постоянном объеме) приведены в табл. 4.

Таблица 4. Итоговые результаты фракционирования АПК на мембранах ПЭС-ПВ-100 и ПС-ПВ-20

Table 4. Results of fractionation of APC on PES-HF-100 and PS-HF-20 membranes

Раствор	$C_{общ}$, г/л	$C_{альб}$, г/л	КА, с	$\omega_{альб}$, %
Исходный	0,95	0,55	18	58
Концентрат ПС-ПВ-20 (по методу концентрирования/разбавления)	1,55	0,25	11	16
Концентрат ПС-ПВ-20 (диафильтрация при постоянном объеме)	1,40	0,25	13	18

Снижение массовой доли альбумина ($\omega_{альб}$) с 58 % в исходном растворе АПК до 16–18 % в концентратах ПС-ПВ-20 указывает на успешное протекание процесса фракционирования белков. Сравнительный анализ итоговых результатов фильтрации растворов АПК на мембранах ПЭС-ПВ-100 и ПС-ПВ-20 в режиме концентрирования и при постоянном объеме показал, что в обоих случаях концентраты ПС-ПВ-20 обладают сходными значениями $C_{альб}$, $C_{тр}$ и коагулогической активности, но в случае ультрафильтрации в режиме концентрирования на получение конечных растворов расходуется в два раза больший объем буферной смеси, что в свою очередь увеличивает время проведения фильтрации.

Исходный раствор АПК, выделенные концентраты ПС-ПВ-20, а также раствор тромбина производства НПО «Ренам» были подвергнуты электрофоретическому анализу с последующей расшифровкой результатов на сканирующем денситометре (рис. 1, c, d). На электрофореграммах концентратов ПС-ПВ-20 наблюдается значительное уменьшение уровня альбуминов (по сравнению с исходным раствором АПК), практически полное отсутствие фракции α -1-глобулинов и одновременное присутствие фракции α -2-глобулинов, что является еще одним свидетельством успешного протекания процесса фракционирования белков. На электрофореграмме тромбина, производства НПО «Ренам» практически не представлена фракция альбуминов, но четко проявляются фракции α -2- и γ -глобулинов (рис. 1, e). Как уже было отмечено выше, тромбин обладает подвижностью фракций α -1-, α -2-глобулинов, в то время как наличие фракции γ -глобулинов на электрофореграмме коммерческого образца подтверждает наличие посторонних примесей. В то

же время на электрофореграммах концентратов ПС-ПВ-20 фракция γ -глобулинов отсутствует вовсе, хотя последняя и присутствовала в исходном растворе АПК.

Сравнительный анализ коагулогической активности образцов, полученных с использованием ультрафильтрации и растворами тромбина производства НПО «Ренам» (РФ) и «Cormay Diagnostics» (Польша), приведены в табл. 5.

Т а б л и ц а 5. Сравнительный анализ коагулогической активности образцов тромбина

T a b l e 5. Comparative analysis of the coagulologic activity of thrombin samples

Образец	$C_{\text{общ}}, \text{ г/л}$	КА, с
Тромбин НПО «Ренам»	1,01	17
Тромбин «Cormay Diagnostics»	1,04	21
Тромбин (режим концентрирования/разбавления)	1,02	17
Тромбин (диафильтрация при постоянном объеме)	1,05	18

Как коммерческие образцы тромбина, так и образцы, выделенные методами диа- и ультрафильтрации при сходных концентрациях общего белка, обладают сопоставимыми значениями свертывающей активности, что свидетельствует о том, что тромбин, выделенный с помощью ультрафильтрации, не уступает по своим показателям тромбину, выделенному с помощью хроматографических методов очистки.

Заключение. На основании результатов исследования был разработан метод получения коагулогического реагента «Тромбин» из активированного протромбинового комплекса при помощи ультрафильтрации. Являясь мягким методом разделения, мембранная фильтрация позволила не только существенно удешевить технологию производства, но и в максимальной степени сохранить нативные свойства целевого продукта.

Список использованных источников

1. A safety review of topical bovine thrombin-induced generation of antibodies to bovine proteins / F. A. Ofosu [et al.] // *Clinical therapeutics*. – 2009. – Vol. 31, N 4. – P. 679–691.
2. Mann, K. G. The molecular weights of bovine thrombin and its primary autolysis products / K. G. Mann, C. W. Batt // *Journal of Biological Chemistry*. – 1969. – Vol. 244. – N 23. – P. 6555–6557.
3. Method of activating prothrombin / Assignee: Immuno Aktiengesellschaft; pat. 5393666 USA, Int.Cl. C 12 N 11/00, C 12 N 11/16, C 12 N 9/00, A 61 K 37/547; publ. date: 28.02.1995.
4. Prothrombin activation during carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice // *Thrombosis research*. – 2002. – Vol. 106. – N 4–5. – P. 257–261.
5. Suttie, J. W. Prothrombin structure, activation, and biosynthesis / J. W. Suttie, C. M. Jackson // *Physiological Reviews*. – 1977. – Vol. 57. – N 1. – P. 1–70.
6. Aizawa, P. Large-scale preparation of thrombin from human plasma / P. Aizawa, S. Winge, G. Karlsson // *Thrombosis research*. – 2008. – Vol. 122. – N 4. – P. 560–567.
7. Le Bonniec, B. F. Thrombin / B. F. Le Bonniec // *Handbook of Proteolytic Enzymes*. – Academic Press, 2013. – P. 2915–2932.
8. Blood plasma fractionation: pat. 4067863 USA. Int.Cl. C 12 N 9/74. / J. G. Watt; publ. date: 14.11.1975.
9. Burnouf, T. An overview of plasma fractionation / T. Burnouf // *Ann Blood*. – 2018. – Vol. 3. – P. 33.
10. Method for activating prothrombin to thrombin: pat. 5677162 USA. Int.Cl. C 12 N 9/74; C 12 N 7/06; A 61 K 38/48. / J. Zou [et al.]; publ. date: 14.10.1997.
11. Способ крупномасштабного производства устойчивой при хранении композиции тромбина терапевтической степени чистоты: пат. 2144081 РФ. МПК. C 12 N 9/74; A 61 K 35/16 / З. Проба [и др.]; заявл. 21.0.1995; опубл. 10.01.2000.
12. Activation of pure prothrombin to thrombin with about 30 % to about 40% sodium citrate: pat. 6245548 USA. Int.Cl. C 12 N 9/74; A 61 K 38/48 / H. Ralston [et al.]; publ. date: 12.06.2001.
13. One-stage prothrombin assay and compositions useful therein: pat. 4289498 USA. Int.Cl. C 12 N 9/74. / Ortho Diagnostics, Inc.; publ. date: 1987.
14. Химическая энциклопедия. – М.: БРЭ, 1992. – 641 с.
15. Process for producing a virus-inactivated thrombin preparation: pat. 5677162 USA. Int.Cl. C 12 N 9/74. / Connolly C. [et al.]; 22.06.2006; publ. date: 07.05.2013.
16. Allary, M. Isolation of human thrombin by affinity chromatography with silicate to be used in the preparation of biological glue / M. Allary, E. Boschetti, J. L. Lorne // *Annales pharmaceutiques francaises*. – 1990. – Vol. 48. – N 3. – P. 129–135.
17. Справочник биохимика / Р. Досон [и др.]. – М.: Мир, 1991. – 443 с.

18. Баркаган, З. С. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза / З. С. Баркаган, А. П. Момот. – М.: Ньюдиамед, 2001. – 285 с.
19. Мецлер, Д. Биохимия / Д. Мецлер. – М.: Химия, 1980. – Т. 2. – 609 с.
20. Овчинников, Ю. А. Биоорганическая химия / Ю. А. Овчинников. – М.: Просвещение, 1987. – 816 с.
21. Якубке, Х.-Д. Аминокислоты, пептиды, белки / Х.-Д. Якубке, Х. Ешкайт. – М.: Мир, 1985. – 457 с.
22. Титов, В. Н. Электрофорез белков сыворотки крови / В. Н. Титов, В. А. Амелюшкина. – М.: Мир, 1994. – 463 с.
23. Suttie, J. W. Prothrombin structure, activation, and biosynthesis / J. W. Suttie, C. M. Jackson // *J. Physiological Rev.* – 1977. – Vol. 57. – N 1. – P. 1–55.
24. Черкасов, А. Н. Мембраны и сорбенты в биотехнологии / А. Н. Черкасов, В. А. Пасечник. – Л.: Химия, 1991. – 240 с.

References

1. Ofosu F. A. [et al.] A safety review of topical bovine thrombin-induced generation of antibodies to bovine proteins. *Clinical therapeutics*, 2009, vol. 31, no. 4, pp. 679–691.
2. Mann K. G., Batt C. W. The molecular weights of bovine thrombin and its primary autolysis products. *Journal of Biological Chemistry*, 1969, vol. 244, no. 23, pp. 6555–6557.
3. *Method of activating prothrombin*. Pat. 5393666 USA, Int.Cl. C 12 N 11/00, C 12 N 11/16, C 12 N 9/00, A 61 K 37/547. Assignee: Immuno Aktiengesellschaft. dec. 19.05.1993; publ. 28.02.1995.
4. Prothrombin activation during carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice // *Thrombosis research*, 2002, vol. 106, no. 4–5, pp. 257–261.
5. Suttie J. W., Jackson C. M. Prothrombin structure, activation, and biosynthesis. *Physiological Reviews*, 1977, vol. 57, no. 1, pp. 1–70.
6. Aizawa P., Winge S., Karlsson G. Large-scale preparation of thrombin from human plasma. *Thrombosis research*, 2008, vol. 122, no. 4, pp. 560–567.
7. Le Bonniec B. F. Thrombin. *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Academic Press, 2013, pp. 2915–2932.
8. Watt J. G. *Blood plasma fractionation* : Pat. 4067863 USA. Int.Cl. C 12 N 9/74. Publ.: 14.11.1975.
9. Burnouf T. An overview of plasma fractionation. *Ann. Blood*, 2018, vol. 3, pp. 33.
10. Zou J. [et al.]. *Method for activating prothrombin to thrombin* Pat. 5677162 USA. Int.Cl. C 12 N 9/74; C 12 N 7104; C 12 N 7/06; A 61 K 38/48. dec. 19.05.1995; publ. 14.10.1997.
11. Proba Z. [et al.]. Method for Large-Scale Production of a Storage-Stable Therapeutic Grade Thrombin Composition : Pat. 2144081 РФ. Int.Cl. C 12 N 9/74; A 61 K 35/16. dec. 21.0.1995; publ. 10.01.2000 (in Russian).
12. Ralston H. [et al.]. *Activation of pure prothrombin to thrombin with about 30 % to about 40% sodium citrate* Pat. 6245548 США. Int.Cl. C 12 N 9/74; A 61 K 38/48. dec. 09.05.2000; publ.12.06.2001.
13. Baughman D. J., Lytwyn A. *One-stage prothrombin assay and compositions useful therein* / *Ortho Diagnostics, Inc.* : Pat. 4289498 США. Int.Cl. C 12 N 9/74. dec. 1985; publ. 1987.
14. Knunyants I. L. (ed.). *Chemical encyclopedia. Vol. 3. Copper / Polymer*. Moscow, Great Russian encyclopedia, 1992. 641 p. (in Russian).
15. Caroline West Research Office CONNOLLY. *Process for producing a virus-inactivated thrombin preparation*. Patent EP no.1520018B1, 2007.
16. Allary M., Boschetti E., Lorne J. L. Isolation of human thrombin by affinity chromatography with silicate to be used in the preparation of biological glue. *Annales pharmaceutiques francaises*, 1990, vol. 48, no. 3, pp. 129–135.
17. Dawson R. M., Elliott D. C., Elliott W. H., Jones K. M. *Data for biochemical research*. Oxford, Clarendon press, 1986. 580 p.
18. Barkagan Z. S., Momot A. P. *Diagnostics and controlled therapy of hemostasis disorders*. Moscow, N'yudiamed Publ., 2001. 285 p. (in Russian).
19. Metzler D. *Biochemistry*. Moscow, Khimiya Publ., 1980. 609 p. (in Russian).
20. Ovchinnikov Yu. A. *Bioorganic chemistry*. Moscow, Prosveshchenie Publ., 1987. 816 p. (in Russian).
21. Jakubke H.-D., Eshkita H. *Amino acids, peptides, proteins*. Moscow, Mir Publ., 1985. 457 p. (in Russian).
22. Titov V. N., Amelyushkin V. A. *Serum protein electrophoresis*. Moscow, Mir Publ., 1994. 463 p. (in Russian).
23. Suttie J. W., Jackson C. M. Prothrombin structure, activation, and biosynthesis. *Physiological Reviews*, 1977, vol. 57, no. 1, pp. 1–55. <https://doi.org/10.1152/physrev.1977.57.1.1>
24. Cherkasov A. N., Pasechnik V. A. *Membranes and sorbents in biotechnology*. Leningrad, Khimiya Publ., 1991. 240 p. (in Russian).

Информация об авторах

Глевицкая Татьяна Александровна – науч. сотрудник. Институт физико-органической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 13, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: thliavitskaya@gmail.com

Бильдюкевич Александр Викторович – академик, д-р хим. наук, профессор, директор. Институт физико-органической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 13, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: uf@ifoch.bas-net.by

Information about the authors

Hliavitskaya Tatsiana A. – Researcher. Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (13, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: thliavitskaya@gmail.com

Bildyukevich Alexandr V. – Academician, D. Sc. (Chemistry), Professor, Director. Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (13, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: uf@ifoch.bas-net.by