

УДК 577.151.083:615.917

©Коллектив авторов

ВЫДЕЛЕНИЕ И СВОЙСТВА АКТИВАТОРА ПРОТЕИНА С ИЗ ЯДА ЩИТОМОРДНИКА ОБЫКНОВЕННОГО (*AGKISTRODON HALYS HALYS*)

О.В. Горницкая, Т.Н. Платонова

Институт биохимии им. А.В. Палладина НАН Украины, 01030 Киев,
ул. Леонтовича, 9; тел/факс (044)235-5172; эл. почта: gornitskaya@mail.ru

Активатор протеина С, обнаруженный в яде щитомордника обыкновенного (*Agkistrodon halys halys*), выделен и очищен с применением методов ионообменной хроматографии на Q-сефарозе и гель-фильтрации на суперозе 12В. Это одноцепочечный белок с молекулярной массой 34 кДа. рН оптимум действия фермента находится в пределах значений рН 7,5-8,0. Ингибируется диизопропилфторфосфатом, бензамидином, *пара*-метилсульфонилфторидом, этиленгуанидинтетраацетатом. Эффективность действия активатора протеина С при определении уровня протеина С в плазме крови больных с помощью теста "активированное частичное тромбопластиновое время" и в тесте с использованием хромогенного субстрата протеина С такая же, как и препарата "Protac" ("Pentapharm AG", Швейцария). Полученный препарат активатора протеина С апробирован в клинической практике для выявления диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови (ДВС-синдром).

Ключевые слова: яд щитомордника обыкновенного, свертывание крови, активатор протеина С, хромогенный субстрат, тромбофилия.

ВВЕДЕНИЕ. Яды змей содержат ферменты, влияющие на систему свертывания крови. Они обладают коагулирующей и фибринолитической активностью. Особый интерес представляют активаторы факторов системы свертывания крови - протромбина, фактора X, фибриногена и протеина С [1].

Протеин С - витамин-К-зависимый белок плазмы крови, который является одним из основных белков антитромботического регуляторного механизма. Протеин С циркулирует в кровяном русле в виде профермента [2], который превращается в активную форму под действием тромбина, находящегося в комплексе с тромбомодулином. Активированный протеин С функционирует как антикоагулянт, избирательно расщепляя факторы Va и VIIIa системы свертывания крови. Еще одной функцией активированного протеина С является его способность связываться с PAI-I, вследствие чего повышается фибринолитический потенциал [3]. Наследственная или приобретенная недостаточность протеина С приводит к развитию тромбозов [4]. В связи с этим определение уровня активности этого белка представляет большой интерес для клинической практики.

Ранее для активации протеина С использовали неспецифические активаторы - тромбин, трипсин и активатор фактора X, выделенный из яда гадюки Рассела [5]. Процесс активации протекал медленно, и для ускорения требовалось присутствие кофакторов, например, тромбомодулина. В связи с этим определение уровня протеина С было технически сложным. В 1986 г. было показано [6], что яд *Agkistrodon contortrix contortrix* способен активировать протеин С. Рядом исследователей [7-9] из яда этой змеи был выделен активатор протеина С,

известный как Protac. Аналогичные по действию ферменты-активаторы обнаружены также в яде змей рода *Agkistrodon* (*A. contortrix contortrix*, *A. c. piscivorus*, *A. c. pictigaster*, *A. c. mokeson*, *A. bilineatus*, *A. piscivorus leucostoma*) [10].

Активаторы протеина С, содержащиеся в яде змей, удобны для применения, так как исключают использование комплекса тромбин-тромбомодулин для активации протеина С. Преимущество нефизиологических активаторов протеина С, выделенных из яда змей, состоит в их специфичности, в высокой скорости активации протеина С в отсутствии в плазме крови их ингибиторов, а также в их резистентности к высокой ионной силе и присутствию ионов кальция [8], что дает возможность использовать их для определения уровня протеина С *in vitro*. В отличие от иммунологических тестов, применение которых позволяет определить только содержание протеина С, тесты с использованием активатора протеина С характеризуют функциональную активность этого белка [11].

Цель данной работы - выделение активатора протеина С из яда щитомордника обыкновенного, характеристика свойств полученной протеиназы и сопоставление возможностей выделенного фермента и Protac в определении уровня протеина С в плазме крови больных при разных патологиях.

МЕТОДИКА. Кристаллический яд щитомордника обыкновенного был предоставлен лабораторией Трипольского биохимического завода.

Кровь брали из локтевой вены натошак и сразу смешивали с 3,8% раствором лимоннокислого натрия в пропорции 9 частей крови на 1 часть консерванта. Для получения плазмы кровь центрифугировали при 1500 g 40 минут.

Амидазную активность фермента определяли при помощи хромогенных субстратов S₂₂₅₁ (Bz-Val-Ley-Lys-pNA·2HCl), тромбина - S₂₂₃₈ (H-D-Phe-Pip-Arg-pNA·2HCl), фактора X - S₂₇₆₅ (Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA·2HCl), урокиназы - S₂₄₄₄ (pyroGlu-Gly-Arg-pNA.HCl) ("Chromogenic", Швеция) [11].

Эстеразную активность определяли спектрофотометрически, в качестве субстратов используя БАЕЕ (этиловый эфир бензоиларгинина), БАМЕ (метиловый эфир бензоиларгинина) и ТАМЕ (метиловый эфир тозиларгинина) при длине волны 253 нм [12]. Эфиры аминокислот использовали в конечной концентрации 10 мМ.

Действие активатора протеина С на протеин С, протромбин, фибриноген, плазминоген, фактор X определяли в модельной системе, инкубируя 2 мкг активатора протеина С, 3 мкг указанных белков и соответствующих хромогенных субстратов в течение 2 ч при 37°C. Изменение поглощения, вызванное расщеплением субстрата, регистрировали при 405 нм.

Для изучения действия на активатор протеина С ингибиторов протеиназ использовали следующую модельную систему: 2 мкг активатора протеина С добавляли к раствору последних в конечной концентрации 20 мМ и более, инкубировали 10 мин, затем в инкубационную смесь вносили 25 мкл 0,2 мМ хромогенного субстрата Хромозим 236. Скорость расщепления субстрата регистрировали при 405 нм.

Зависимости активности активатора протеина С от pH определяли в среде следующего состава: 2 мкг препарата, 3 мкл плазмы крови доноров, 212 мкл 0,05 М трис-HCl буфера, pH 6,0-9,0. Смесь инкубировали 10 мин, добавляли 25 мкл 0,2 М хромогенного субстрата Хромозим 236. Скорость гидролиза субстрата регистрировали спектрофотометрически при длине волны 405 нм.

Казеинолитическую активность фермента определяли спектрофотометрически [13], измеряя количество растворимых в 15% ТХУ тирозинсодержащих пептидов, образующихся при инкубации казеина с ферментом.

Фибринолитическую активность фермента определяли на фибриновых пластинках [14], нанося 2 мкг образца на поверхность пластины 0,15% фибрина, образованного под действием тромбина. После нанесения образца пластинку инкубировали 17ч при 37°C. Активность оценивали, измеряя площадь лизиса фибриновой пленки.

Очистку активатора протеина С проводили, используя Q-сефарозу и суперозу 12В, при помощи хроматографической системы FPLC ("Pharmacia", Швеция).

АКТИВАТОР ПРОТЕИНА С ИЗ ЯДА ЩИТОМОРДНИКА

Электрофорез в присутствии DS-Na проводили в вертикальных пластинках ПААГ в системе Лэммли [15]. В качестве маркерных белков использовали набор стандартов с известной молекулярной массой (кДа), фосфоорилаза Б - 94, альбумин - 67, овальбумин - 43, карбоангидраза - 30, соевый ингибитор трипсина - 20,1, лактальбумин - 14,4 ("Pharmacia", Швеция).

Влияние активатора протеина С на агрегацию тромбоцитов исследовали по методу [16]. Скорость агрегации регистрировали при помощи агрегометра Араст (Германия) по изменению светорассеяния инкубационной смеси до и после введения в нее 20 мкМ ADP в качестве индуктора, вызывающего агрегацию тромбоцитов.

Для определения уровня протеина С в плазме крови применяли функциональный тест "активированное частичное тромбопластиновое время" (АЧТВ) [17]. В тесте использовали АРТТ-реагент производства фирмы "Sigma" (США) и фирмы "bioMerieux" (Франция) и активатор протеина С, выделенный из яда щитомордника обыкновенного.

Определение уровня активности протеина С при помощи субстрата Хромозим 236 проводили, смешивая 3 мкл исследуемой плазмы крови, 2 мкл активатора протеина С и 25 мкл 0,2 М субстрата. Скорость расщепления субстрата определяли при длине волны 405 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Выделение активатора протеина С проводили следующим образом. 50 мг кристаллического яда щитомордника растворяли в 2 мл 0,02 М веронал-HCl буфера, pH 7,4, содержащего 0,13 М NaCl и 10^{-1} 1 мМ NaN_3 . После центрифугирования раствор яда наносили на голубую сефарозу для получения тромбиноподобного фермента Анцистрон-Н [18]. Материал, не связавшийся с носителем, подвергали дальнейшему разделению на Q-сефарозе (рис. 1А). Полученные фракции анализировали электрофоретически, а также исследовали их влияние на время свертывания в тесте АЧТВ. В одной из фракций был обнаружен компонент, удлинявший время свертывания подобно препарату Protac ("Pentapharm AG", Германия). Дальнейшую очистку белка данной фракции проводили на суперозе 12В (рис. 1Б). По данным электрофореза, полученный препарат представлен одной полипептидной цепью с молекулярной массой 34 ± 1 кДа (рис. 1В).

Оптимум pH полученного фермента находится в диапазоне 7,5 - 8,0.

Субстратную специфичность активатора протеина С исследовали, используя эфиры аминокислот, хромогенные субстраты, белки и проферменты. Фермент не проявлял БАПНА- и ТАМЕ-эстеразную активность, но гидролизировал БАЕЕ. Активность составляла 520 мкмоль/мин на 1 мг белка. Препарат не расщеплял субстраты плазминогена (S_{2251}), фактора Ха (S_{2222} , S_{2765}), урокиназы (S_{2444}), но проявлял слабую амидазную активность на субстрате тромбина (S_{2238}). Фермент не обладал казеинолитической и фибринолитической активностью, не действовал на протромбин, фибриноген, плазминоген, тромбин, не влиял на агрегацию тромбоцитов, что совпадает со свойствами активатора протеина С, выделенного из яда *Agkistrodon contortrix contortrix* [7].

Активность фермента подавлялась ингибиторами сериновых протеиназ диизопропилфторфосфатом (ДФФ), *para*-нитрофенилгуанидинбензоатом (NPGV), бензамидином, *para*-метилсульфонилфторидом (PMSF), хелатирующим соединением этиленгуанидинтетраацетатом (ЭГТА) и не ингибировалась гирудином, синтетическим ингибитором тромбина, соевым ингибитором трипсина (СИТ), гепарином. Не были эффективны также ингибиторы цистеиновых и кислых протеиназ: 0,1 мМ парахлормеркуробензоат (ПХМБ), 10 мМ хлорацетамид. Эти данные (табл. 1) позволяют сделать предположение о наличии в активном центре фермента серина.

Для активации протеина С выделенным активатором не требуются тромбин, тромбомодулин и ионы кальция (рис. 2).

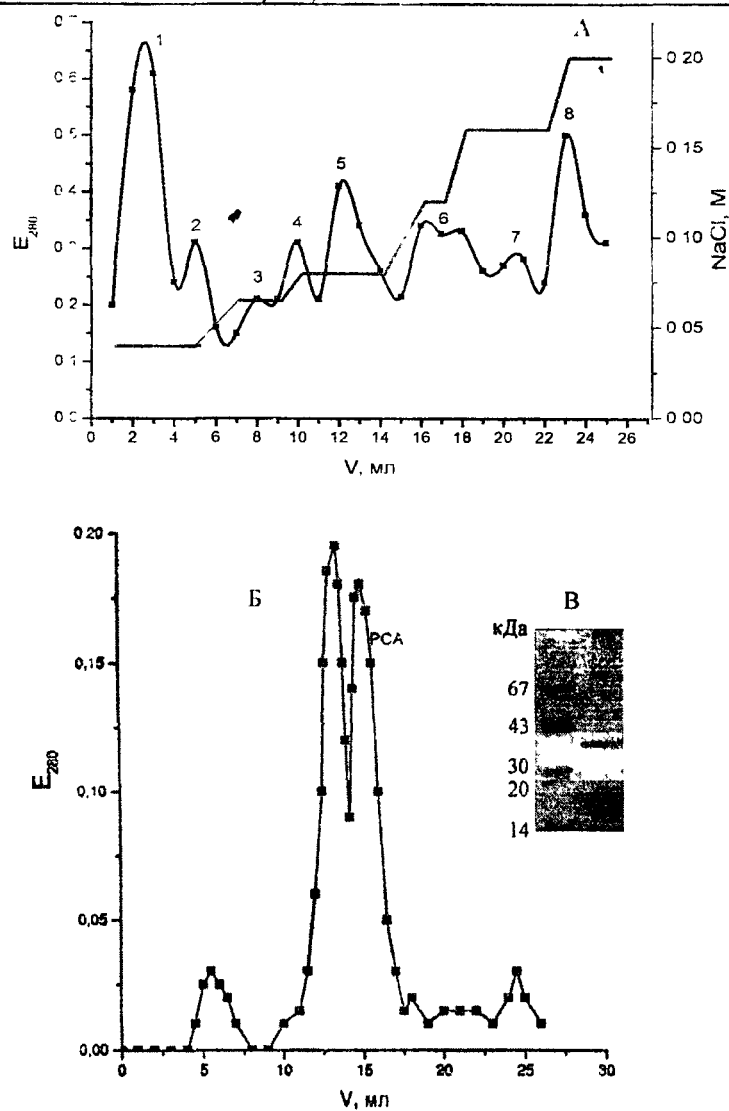


Рисунок 1.

Хроматография белков яда щитомордника
 А - фракционирование на Q-сефарозе. Пик 1 - фракция, содержащая активатор протеина С;
 Б - очистка активатора протеина С на суперозе 12В. В - электрофореграмма фракции, содержащей активатор протеина С.

Таблица 1. Влияние ингибиторов протеиназ на активность активатора протеина С

Ингибитор	Концентрация ингибитора	Остаточная активность активатора протеина С, %
Бензамидин	10 мМ	48
ЭГТА	20 мМ	97
PMSF	200 мМ	22,5
NPGB	10 мМ	30
NPGB	100 мМ	0
АТФ/гепарин	60 мкМ/4 ед/мл	100
СИТ	1 мг/мл	100
ДФФ	10 мМ	0
Mg ²⁺ , Cd ²⁺ , Co ²⁺	20 мМ	100
Контроль	-	100

АКТИВАТОР ПРОТЕИНА С ИЗ ЯДА ЩИТОМОРДНИКА

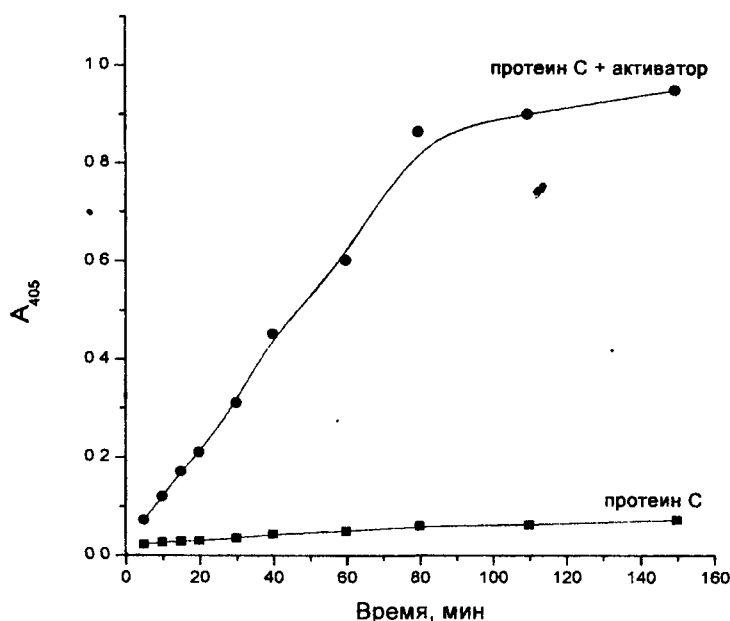


Рисунок 2.

Активация протеина С активатором протеина С из яда щитомордника обыкновенного

Фермент не теряет активности при лиофилизации и последующем хранении при -20°C . Легко растворим в воде.

Вышеуказанные физико-химические свойства активатора протеина С суммированы в табл. 2.

В клинической практике для установления уровня протеина С в крови используют функциональный тест АЧТВ с применением нефизиологических активаторов протеина С. Активированный протеин С инактивирует Va и VIIIa факторы, вследствие чего время свертывания в тесте значительно удлиняется. Уровень протеина С определяют по калибровочной кривой, построенной при использовании дефицитной по протеину С плазмы крови.

Таблица 2. Некоторые физико-химические характеристики активатора протеина С, выделенного из яда щитомордника обыкновенного (*Agkistrodon halys halys*)

	<i>Agkistrodon contortrix contortrix</i> [7]	<i>Agkistrodon bilineatus</i> [10]	<i>Agkistrodon halys halys</i> [21]	<i>Agkistrodon halys halys</i>
Молекулярная масса	37000-39000	35000	36000	34000
pH стабильность	8,3-7,5	8,3-7,5	8,5-7,8	8,2-7,5
ТАМЕ, БАЕЕ, БАМЕ-гидролиз	Н.о.	Н.о.	Н.о.	БАЕЕ
Субстратная специфичность	S ₂₂₃₈ , S ₂₂₂₂ , S ₂₂₆₆ , S ₂₃₆₆	Хромозим ТН	S ₂₃₀₂ , S ₂₂₃₈ , S ₂₃₆₆	S ₂₂₃₈ , S ₂₃₆₆ , Хромозим 236
Ингибиторы	NPGB, PMSF, PPACK, СИТ, р-аминобензамидин	NPGB, PPACK, СИТ	Бензамидин, хлорметилкетон, NPGB	ДФФ, бензамидин, PMSF, ЭГТА
Казеинолитическая, фибринолитическая активность	Не определяли	Не определяли	Не определяли	Отсутствует

При разработке условий теста для определения уровня протеина С при помощи фермента-активатора, выделенного из яда щитомордника, были проведены исследования зависимости активации протеина С от длительности времени инкубации. Экспериментально определяли оптимальное количество

Горницкая и Платонова

фермента, которое в течение 180 с инкубации полностью активирует протеин С в соответствующем объеме плазмы крови и вызывает такое увеличение времени свертывания в тесте АЧТВ, при котором чувствительность теста максимальна. Время образования сгустка в контрольном образце плазмы крови составляет 115-130 с. Разработанный метод чувствителен при содержании функционально активного протеина С в пределах 40-120%.

В табл. 3 представлены данные определения уровня протеина С в плазме крови больных с использованием фирменного препарата "Protac" ("Pentapharm", AG, Швейцария), выделенного из яда *Agkistrodon contortrix contortrix*, и фермента, выделенного из яда *Agkistrodon halys halys*. Показано, что оба препарата с одинаковой эффективностью активируют протеин С в данном тесте ($p > 0,05$).

Таблица 3. Уровень протеина С, измеренный в образцах плазмы крови больных при помощи Protac и активатора протеина С (PCA) из яда *Agkistrodon halys halys*

Пациенты	Уровень протеина С (Protac), %	Уровень протеина С (PCA), %
Контроль (норма)	100	100
1	48	53
2	37	41
3	48	46
4	98	98
5	73	75
6	125	130
7	47	46
8	65	68
9	108	100
10	36	40
11	76	68
SD	71,4 ± 28,6	72,9 ± 26,4

Выделенный нами из яда щитомордника обыкновенного активатор протеина С апробирован на плазме крови больных с нарушением сердечно-сосудистой деятельности ($n=94$) (инфаркт миокарда, стенокардия, гипертония), при абдоминальных кровотечениях при язвенной болезни ($n=100$), с гестозами при беременности ($n=54$), при нефритах ($n=24$), ожогах ($n=42$). Во всех указанных случаях выявлена гиперактивация системы свертывания крови (накопление растворимого фибрина, потребление АТ-III), которая приводит к снижению уровня протеина С (табл. 4).

Таблица 4. Содержание протеина С в плазме крови при развитии ДВС-синдрома

	Беременные с гестозом			Глубокие ожоги	Гипертензия	Инфаркт
	I стадия	II стадия	III стадия			
РС	93,7±3,4	58,8±3,4	39,2±4,3	58,6±12,8	70,75±5,03	67,1±6,34
АТ III	93,1±3,6	74,3±8,9	70,0±3,8	57,2±12,8	91,06±1,22	71,51±8,45
РФ	0,035±0,001	0,075±0,004	0,14±0,008	0,053±0,014	0,05±0,01	0,056±0,01

Примечание: РС - протеин С; АТ-III - антитромбин III; РФ - растворимый фибрин

Для определения уровня протеина С используют хромогенные субстраты Хромозим 236 и S₂₃₆₆. Параллельное выполнение функционального теста АЧТВ и теста с применением хромогенных субстратов дает возможность выявлять нарушение взаимодействия между Va фактором свертывания крови, протеином С и протеином S на фосфолипидной мембране, а также легко и быстро тестировать большие количества образцов с использованием микропланшетов.

В некоторых случаях время свертывания в тесте АЧТВ значительно удлинено, что может быть связано с накоплением ингибиторов свертывания крови (гепарин, продукты деградации фибриногена/фибрина, люпус-антикоагулянты, пр.).

АКТИВАТОР ПРОТЕИНА С ИЗ ЯДА ЩИТОМОРДНИКА

Подтверждением наличия ингибиторов могут служить коррекционно-ингибиторные пробы [19]. При накоплении ингибиторов выполнение функционального теста для определения уровня протеина С может приводить к получению завышенных результатов. В этих случаях между данными функционального теста и теста с использованием хромогенного субстрата наблюдается расхождение (табл. 5) и для получения достоверной информации о функциональной активности протеина С необходимо сравнивать результаты обоих тестов.

Протеин С - белок быстрого реагирования, и его потребление наблюдается сразу (рис. 3 А-В), тогда как снижение содержания АТ-III (менее 70%) происходит только в сложных случаях (рис. 3 Б, В).

Таблица 5. Определение активности протеина С при помощи функционального теста АЧТВ и хромогенного субстрата Хромозим 236.

патологии	контроль	инфаркт	нестаб. стенокардия	гестозы (3-я стадия)	ожоги	абдоминал. кровотечение
АЧТВ, с	36	38	48	45	37	36
Протеин С, %	100	114* 30**	100* 70**	39* 40**	105* 60**	110* 50**

Примечание: *активность протеина С, определенная в функциональном тесте; **активность протеина С, определенная при использовании хромогенного субстрата.

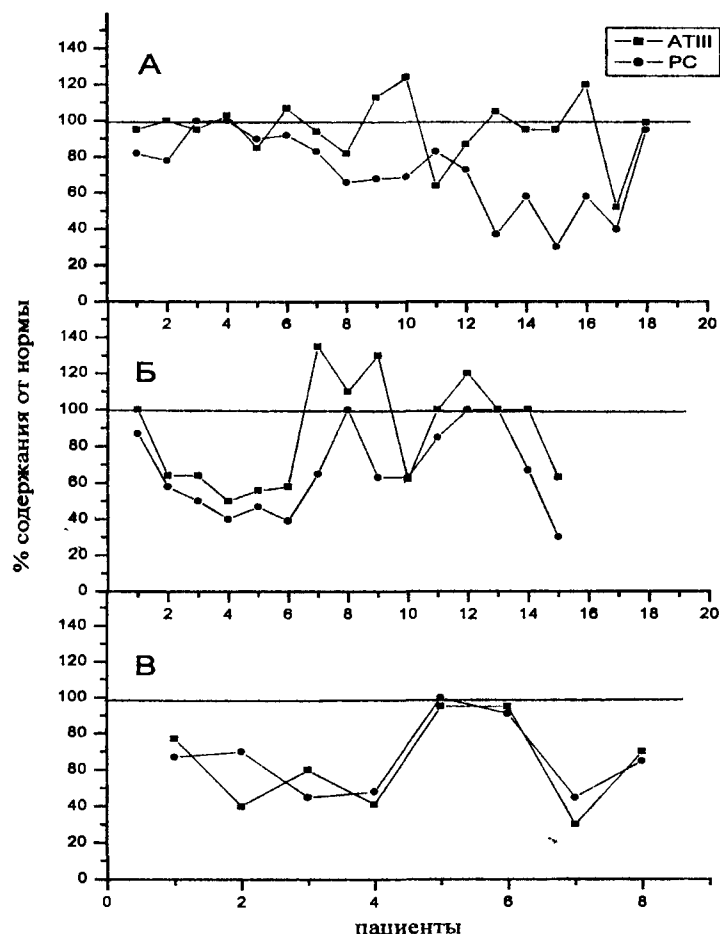


Рисунок 3.

Уровень протеина С и антитромбина III после операции кесарева сечения (А), при инфаркте миокарда (Б), ожогах (В); горизонтальная линия на каждом графике показывает норму

Определение протеина С важно при изучении баланса между потенциалами системы свертывания крови и ингибиторов свертывания. Нарушение такого равновесия приводит к накоплению в кровотоке растворимого фибрина и к снижению содержания протеина С (рис. 4). Степень снижения свидетельствует о развитии ДВС-синдрома: чем меньше активность протеина С, тем больше угроза тромбообразования [4].

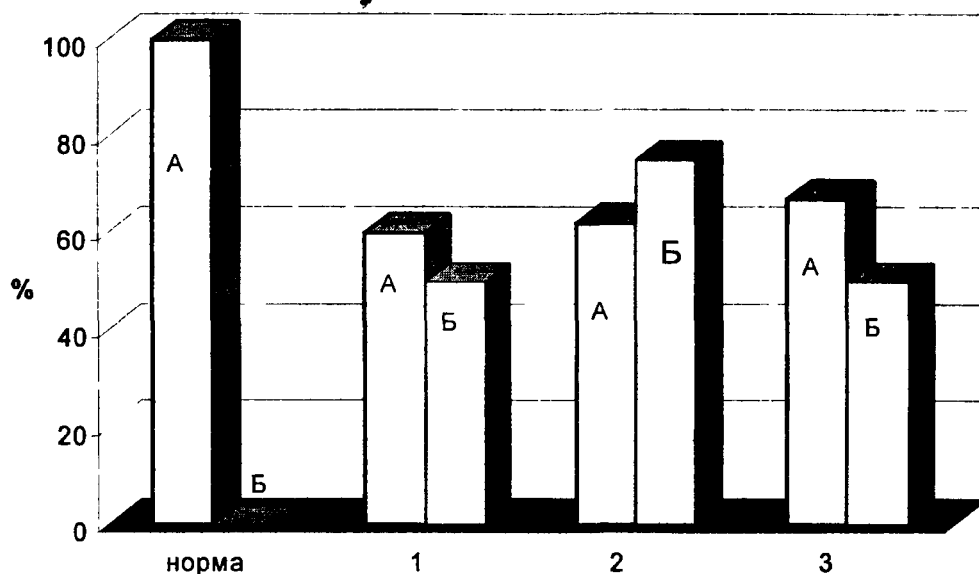


Рисунок 4

Содержание протеина С (А) и растворимого фибрина (Б) при сахарном диабете (1), инфаркте миокарда (2), ожогах (3)

Проведение антитромботической профилактики низкомолекулярными гепаринами приводит к снижению уровня растворимого фибрина и восстановлению уровня протеина С (табл. 6): при эффективном лечении уровень протеина С восстанавливается до величины, близкой к минимальной норме [20, 21].

Таблица 6 Уровень протеина С в плазме крови пациентов до и после тромбопрофилактики

Параметры системы гемостаза	Показатели					
	контроль	у беременных	после кесарева сечения		при инфаркте (терапия стрептокиназой)	
			без тромбопрофилактики (n = 45)	тромбопрофилактика (n = 35)	1-е сутки	30-е сутки
АЧТВ	36±0,36	35,3±0,44	32,0±1,98	42,53±0,78	30,00±1,72	34,85±1,32
Протеин С	100,1±1,3	67,4±2,41	58,3±4,63	79,9±4,48	67,1±6,54	84,42±7,08
РФ	0	0,07±0,0004	0,09±0,0007	0,03±0,003	0,056±0,001	0,04±0,001
АТ-III	99,75±2,1	72,51±2,53	87,4±3,63	98,5±3,05	71,51±8,45	107,42±5,72

Тесты обладают высокой чувствительностью, поскольку выделенный фермент активирует непосредственно протеин С без участия комплекса тромбин-тромбомодулин и ионов кальция и, таким образом, является высокоспецифичным. Диагностическая значимость разработанного метода заключается не только в возможности определения уровня функциональной активности протеина С, но также в осуществлении контроля эффективности проводимого лечения. Препарат активатора протеина С может быть применим как в функциональном тесте, так и в тесте с использованием хромогенного субстрата. Тесты легко выполнимы и информативны.

ЛИТЕРАТУРА

1. Seegers W.H and Quyang. C. (1991) Snake venom and Blood Coagulation. Handb. Exp. Pharm., 52. Snake Venoms, Sigma Chemical Company.
2. Bjorn Dahlback (1995) Thromb. Res., 77 (1), 1-43.
3. de Flouw N.D., van Hinsbergh V.W.M., de Jong F. (1987) Thromb. and Haemost., 57 (2), 176-182.
4. David F.J. Tollefson, Kenneth D. Friedman, Richard A. Marlar et al. (1988) Arch. Surg., 123, 881-884.
5. Esmon Ch.T., Esmon N.L. (1994) Semin. Thromb. and Haemost., 10 (2), 122-130.
6. Klein J.D., Walker F.J. (1986) Biochemistry, 25, 4175-4179.
7. Orthner C.L., Brattacharia P., Strickland D.K. (1988) Biochemistry, 27, 2558-2564.
8. McMullen B.A., Fujikawa K., Kisiel W. (1989) Biochemistry, 28., 674-679.
9. Bakker, H.M., Tans, G., Yukelson, L.Y. et al (1993) Blood Coagulation and Fibrinolysis, 4, 605-614.
10. Stocker K., Fisher H., Meir J. et al. (1986) Behring Inst. Mitt., 79, 37-47.
11. Exner T. (1988). In: Hematology, vol 7, Haemostasis and Animal Venoms, New York, pp. 491-502.
12. Erlanger, B. (1966) Arch. Biochem. Biophys., 115, 206-218.
13. Hummel, B.C.W. (1959) Can. J. Biochem. Physiol., 37 (12), 1393-1399.
14. Robbins V., Summaria L. (1970) Methods Enzymol., (19), 184-186.
15. Astrup, P., Mullertz, S. (1952) Arch. Biochem. Biophys., 40.(2), 346-351.
16. Laemli K.U. (1970) Nature, 227, 680-685.
17. Born G.V.R. (1962) Nature (Lond.), 194, (4832), 927-929.
18. Козинец Г.И., Макаров В.А. (1997) Исследование системы крови в клинической практике. М.: "Триада-Х".
19. Соловьев Д.А., Узарова Т.П. (1993) Биохимия, 58, 33-39.
20. Платонова Т.М., Чернищенко Т.М., Горницька О.В. и др. (2000) Лаб. діагностика, №3, 3-11.
21. Griffin J.H., Mosher D.F., Zimmerman T.S. et al. (1982) Blood, 60, 261-264
22. Vukovich T, Auberger K, Well J. et al. (1988) Brit. J. Haematol., 70, 435-440.

Поступила 21.06.2000.

PURIFICATION AND CHARACTERISTIC OF THE PROTEIN C ACTIVATOR FROM AGKISTRODON HALYS HALYS SNAKE VENOM

O.V. Gornitskaya, T.N. Platonova

Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences, 9 Leontovich st., Kiev, 01030 Ukraine; tel/fax:(044)235-5172, e-mail:gornitskaya@mail.ru

Protein C activator from *Agkistrodon halys halys* venom has been purified by ion-exchange and gel-filtration chromatography. The purified enzyme consists of a single peptide chain with molecular weight of 34 kD. Its pH-optimum was the range of 7.5-8.0. The enzyme was inhibited by DFP, benzamidine, PMSF, EGTA. Protein C activator was as effective as Protac (Pentapharm AG, Switzerland) for determination of protein C level in blood plasma using APTT test and protein C chromogenic substrate.

Key words: copperhead snake venom, the blood coagulation, protein C activator, chromogenic substrate, thrombophilia.