



УКРАЇНА

(19) UA (11) 65219 (13) U
(51) МПК
G01N 33/48 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ПЛАЗМІНОГЕНУ В ПЛАЗМІ КРОВІ

1

(21) u201106579

(22) 26.05.2011

(24) 25.11.2011

(46) 25.11.2011, Бюл.№ 22, 2011 р.

(72) ГРИНЕНКО ТЕТЯНА ВІКТОРІВНА, ЮСОВА
ОЛЕНА ІВАНІВНА, КОНДРАТЮК АННА СЕРГІЙВ-
НА, РИБАЧУК ВАЛЕНТИНА МИКОЛАЇВНА(73) ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ІМ. О.В.ПАЛЛАДІНА НА-
ЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ

(57) 1. Спосіб визначення концентрації плазміно-
гену, що включає визначення часу лізису фібрино-
вого згустку, одержаного з використання фібрин-
мономеру, при активації плазміногену стрептокіна-
зою, який **відрізняється** тим, що визначають час
напівлізису згустку фібрину, за яким розраховують
швидкість лізису згустку фібрину та визначають
концентрацію плазміногену в плазмі крові за калі-
брувальною кривою залежності швидкості лізису
фібринового згустку від концентрації плазміногену.

2

2. Спосіб визначення концентрації плазміногену за
п. 1, який **відрізняється** тим, що визначення напі-
влізису згустку крові проводять автоматично з ви-
користанням турбідиметричного методу.

3. Спосіб визначення концентрації плазміногену за
п. 1, який **відрізняється** тим, що концентрацію
плазміногену в плазмі крові для побудови калібру-
вальної кривої визначають за допомогою афінної
хроматографії.

4. Спосіб визначення концентрації плазміногену за
п. 1, який **відрізняється** тим, що як джерело фіб-
ринового згустку використовують фібрин-мономер
бика.

5. Спосіб визначення концентрації плазміногену за
п. 4, який **відрізняється** тим, що концентрація
фібрин-мономеру в реакційному середовищі скла-
дає 0,2 г/л.

Корисна модель належить до галузі біохімії та
може використовуватися в лабораторній діагнос-
тиці для аналізу крові при порушеннях системи
гемостазу.

При багатьох захворюваннях відбувається по-
рушення балансу між системами згортання та фі-
бринолізу, що вимагає контролю в плазмі крові
рівня компонентів цих систем, зокрема плазміно-
гену. Плазміноген, центральний білок фібринолі-
тичної системи, є проферментом серинової ендो-
пептидази плазміну, який утворюється в крові під
дією активаторів. In vivo активація плазміногену
тканинним активатором відбувається безпосеред-
ньо на фібриновому згустку, з яким зв'язуються
профермент та його активатор. В нормі вільний
плазмін в крові не існує, оскільки швидко та не-
оборотно інактивується інгібіторами, в першу чергу
 α_2 -антиплазміном [1].

Зниження фібринолітичного потенціалу плаз-
ми крові є одним із факторів ризику тромбоутво-
рення. У пацієнтів із тромбозами зафіксовано зни-
ження рівня плазміногену та його активаторів із
одночасним підвищенням концентрації інгібіторів
фібринолізу. Гіпоплазміногенемія спостерігається

при ДВЗ синдромі, онкологічних захворюваннях,
еклампсії, тромболітичній терапії чи порушеннях
синтезу плазміногену при певних захворюваннях
печінки [2-4].

Надмірна активація фібринолітичної системи
внаслідок надходження у кровотік надлишкової
кількості тканинного активатора або у відповідь на
внутрішньосудинне тромбоутворення супроводжу-
ється гіперплазмінемією, гідролізом фібриногену
та інших факторів зсідання крові, і призводить до
геморагій [5].

На сьогодні в медичній практиці для визначен-
ня плазміногену використовують методи, в основі
яких лежать різні принципи та методологічні підхо-
ди: а) спонтанний еуглобуліновий лізис; б) стиму-
льований еуглобуліновий лізис; в) лізис хромоген-
них субстратів; г) гідроліз казеїну; д) імуноферментний аналіз; е) лізис фібринового
згустку [3, 6-10].

Суттєвими недоліками цих методів є їх трудо-
місткість, висока вартість, довготривалість аналізу,
візуальна реєстрація результатів, одержання за-
вищених показників, визначення концентрації

(13) U

(11) 65219

(19) UA

проферменту, а не його функціональної активності.

Найбільш близьким за технічною суттю і результатом до корисної моделі, що заявляється, є спосіб визначення плазміногену за реєстрацією часу лізису фібринового згустку плазміногеном, активованим стрептокіназою, як джерело утворення фібринового згустку використовують фібрин-мономер, одержаний з фібриногену людини, в концентрації 1,0-10,0 г/л в присутності каоліну. Недоліками цього методу є візуальна реєстрація моменту повного лізису фібринового згустку та використання фібрин-мономеру, отриманого з фібриногену плазми крові людини, що збільшує вартість аналізу [11].

Задачею корисної моделі, що заявляється, є розробка високочутливого, простого у виконанні, автоматичного та економічного способу визначення плазміногену в плазмі крові. Поставлена задача вирішується шляхом визначення часу напівлізису фібринового згустку плазміногеном, активованим стрептокіназою, з використанням турбідиметричного методу та автоматичною реєстрацією часу напівлізису фібрин-мономеру, одержаного з фібриногену бика, при концентрації 0,2 г/л у відсутності каоліну.

В основі розробленого методу лежить реєстрація зміни світлорозсіювання в процесі полімеризації та гідролізу фібрину при довжині хвилі 350 нм.

При внесенні фібрин-мономеру в нейтральне середовище відбувається його швидка полімеризація через утворення протофібрил без зміни оптичної густини середовища з наступною латеральною агрегацією протофібрил, яка супроводжується приростом оптичної густини при 350 нм. У присутності в цій системі плазміну або активованого плазміногену, відбувається лізис фібринового згустку, при цьому оптична густина зменшується. Із застосуванням турбідиметричного методу реєструють час напівлізису - проміжок часу від моменту початку утворення фібринового згустку до моменту зменшення на 50 % його максимальної оптичної густини при 350 нм ($t_{1/2}$) та розраховують швидкість лізису фібринового згустку - величину, оборотну часу напівлізису згустку ($1/t_{1/2}$). Відлік часу напівлізису фібринового згустку починають з моменту внесення в реакційне середовище фібрин-мономеру. Зміни світлорозсіювання реєструють автоматично.

Приклад.

А) Кров з ліктьової вени відбирають в пластикову пробірку, що містить 3,8 %-й розчин цитрату натрію, у співвідношенні 9:1, центрифугують протягом 7 хв. при 1000 об./хв. (240 g), відцентрифуговану плазму крові переносять в іншу пробірку та повторно центрифугують протягом 15 хв. при 3000 об./хв. (1200 g). Одержану бідну на тромбоцити плазму крові людини в кількості 1 мл наносять на афінний сорбент лизин-сефарозу 4В. Неспецифічно адсорбовані компоненти плазми відмивають 0,1 М фосфатним буфером (рН 7,4). Специфічно зв'язаний плазміноген елюють 0,05 М фосфатним буфером (рН 7,4), з 0,1 М 6-аміногексановою кислотою (6-АГК). Вміст плазміногену визначають

спектрофотометрично, вимірюючи різницю величин оптичної густини при довжині хвилі 280 та 320 нм. Концентрацію плазміногену в елюаті визначають, використовуючи коефіцієнт абсорбції 17,0 (1 %, 1 см). Визначена концентрація плазміногену в плазмі крові складає 145 мкг/мл. Далі плазму крові з визначеним вмістом плазміногену використовують для побудови калібрувальної кривої.

Б) Фібрин-мономер без домішок плазміногену одержують із фібриногену бика в присутності 6-АГК та п-хлормеркурійбензоату натрію.

В) Для побудови калібрувальної кривої у термостатовану кювету при температурі 37°C вносять від 7 до 28 мкл плазми крові, що містить від 1 до 4 мкг плазміногену, одержаного в п. А прикладу, стрептокіназу з розрахунку 5 МО на 1 мкг плазміногену та 0,05 М трис-НCl буфер (рН 7,4), 0,13 М NaCl, 0,001 М CaCl₂. Утворення фібринового згустку ініціюють внесенням у реакційну суміш 20 мкл 1 %-го розчину фібрин-мономеру. Загальний об'єм реакційної суміші складає 1 мл. Реєструють максимальне значення оптичної густини реакційної суміші при довжині хвилі 350 нм та час його зниження на 50 % ($t_{1/2}$, с) і розраховують швидкість лізису фібринового згустку ($1/t_{1/2}$, с⁻¹). Будують калібрувальну криву залежності швидкості лізису згустку фібрину від концентрації плазміногену (креслення).

Г) Для визначення рівня плазміногену в крові в термостатовану при температурі 37°C кювету вносять по 20 мкл досліджуваного зразка плазми крові, 20 мкл робочого розчину стрептокінази (15 МО), 940 мкл 0,05 М трис-НCl буферу (рН 7,4), 0,13 М NaCl, 0,001 М CaCl₂. Утворення фібринового згустку ініціюють додаванням 20 мкл розчину фібрин-мономеру. Реєструють максимальне значення оптичної густини при довжині хвилі 350 нм та час його зниження на 50 % ($t_{1/2}$, с) і розраховують швидкість лізису фібринового згустку ($1/t_{1/2}$, с⁻¹). За калібрувальною кривою знаходять концентрацію плазміногену в досліджуваній плазмі крові, використовуючи розрахункову формулу:

$$Pg = P \times 50,$$

де: Pg - концентрація плазміногену, мкг/мл;

P - кількість плазміногену, визначена за калібрувальною кривою в 1 мл реакційної суміші, мкг/мл;

50 - коефіцієнт перерахунку на 1 мл плазми крові.

Концентрація плазміногену в досліджуваній плазмі крові, визначена способом, що заявляється, складає 138 мкг/мл.

Таким чином, спосіб, що заявляється, дозволяє визначати вміст плазміногену в плазмі крові в нормі та при патологіях і має ряд переваг порівняно з найближчим аналогом, а саме:

- дозволяє автоматично з великою точністю визначити час напівлізису фібринового згустку;

- джерелом фібринового згустку є фібрин-мономер без домішок плазміногену, одержаний з фібриногену бика;

- концентрація фібрин-мономеру в реакційному середовищі складає 0,2 г/л, що менше від концентрації фібрин-мономеру в найближчому аналогу від 5 до 50 разів;

- забезпечує високу точність та відтворюваність результатів, стандартне відхилення складає близько $\pm 5\%$.

Джерела інформації

1. Castellino F.I., Powell J.R. // Meth. Enzymol. - 1981. - vol. 80. - p. 365-378.

2. Баркаган З.С., Момот А.П., Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза. - М.: Ньюдиамед, 2001. - 285 с.

3. Долгов В.В., Свирин П.В. Лабораторная диагностика нарушений гемостаза. - М. - Тверь: ООО Издательство «Триада», 2005. - 227 с.

4. Назаренко Г.И., Кишкун А.А. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований. М.: Медицина, 2006. - 544 с.

5. Carrel R., Boswell D. Proteinase inhibitors. Eds by Barrett A., Salvesen G. Elsevier. - Amsterdam - 1986. - P. 403-420.

6. Титаева Е.В., Добровольский А.Б., Титов В.Н. Турбидиметрический метод определения плазминогена. - Лабораторное дело. - 1991. - № 1. - С. 32-35.

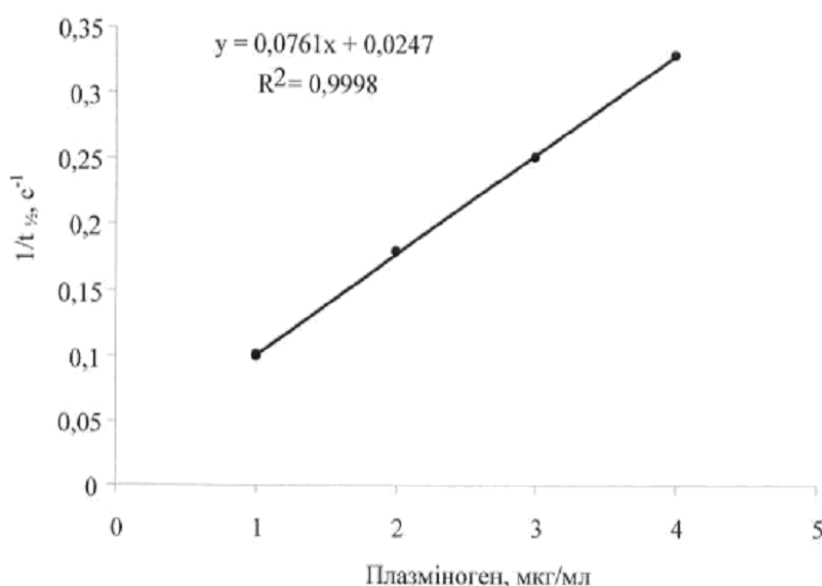
7. Хромо-Тех-плазминоген, тест-набор, ООО Фирма «Технология-Стандарт», кат. № 092, РФ.

8. Реахром-плазминоген, тест-набор, НПО РЕНАМ, кат. ФА-2, РФ.

9. ЗАО «Лабораторная диагностика», Plasminogen Hemosil, кат. № 2009000.

10. TriniCHROM Plasminogen (Tsoag, Ирландия), ТВ T2605.

11. Пат. РФ 2189590, 20.09.2002.



Калібрувальна крива для визначення плазміногену в плазмі крові.