



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 51418

(13) A

(51) 6 C 12 N 9 / 68

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ СТАНУ СИСТЕМИ ФІБРИНОЛІЗУ

1

(21) 2002032098

(22) 15 03 2002

(24) 15 11 2002

(46) 15 11 2002, Бюл. №11, 2002 р.

(72) Савчук Олексій Миколайович, Краснобрига
Євгенія Миколаївна(73) ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ІМ. О. В. ПАЛЛАДІНА
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ(57) 1 Спосіб діагностики стану системи
фібринолізу, що включає проведення лабораторних
тестів та аналіз їх результатів, який
відрізняється тим, що як лабораторні тести вико-
ристовують наступний комплекс тестів визначен-

2

ня часу загального лізису еуглобулінів та тести
визначення активності основних компонентів сис-
теми фібринолізу2 Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що по-
передньо стан системи фібринолізу визначають за
скринінг-тестом визначення часу загального лізису
еуглобулінів3 Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що ви-
явлення причин патології визначають за тестами
визначення активності тканинного активатора плаз-
міногену і його інгібітора першого типу та їх спів-
відношення

Спосіб діагностики стану системи фібринолізу за допомогою комплексу лабораторних тестів може бути використаний в медицині, а саме при порушенні рівноваги між потенціалом систем фібринолізу та зсідання крові і необхідний для прогнозування розвитку дисемінованого мікрозсідання крові (ДВС-синдрому)

Виникнення порушень системи гемостазу в організмі характерно для багатьох захворювань, що викликають зміни параметрів системи гемостазу, і може визначатися порушенням балансу між активаторами й інгібіторами системи фібринолізу. Головний активаторний вклад належить тканинному активатору плазміногена (t-PA), а основним інгібітором є інгібітор тканинного активатора плазміногену першого типу (PAI-1). Іноді причиною виникнення тромботичної загрози є недостатня секреція в кровоток плазміногену чи надлишок основного інгібітору плазміну - α_2 -антиплазміну.

В літературі описані методи визначення, як активності, так і вмісту компонентів системи фібринолізу в плазмі крові. Це імуноферментні методи, в основу яких полягає специфічна взаємодія антиген-антитіло, функціональні методи з використанням специфічних хромогенних субстратів, що розщеплюються безпосередньо активованим досліджуваним білком, а не в сукупності з іншими білками, як це часто буває у функціональних тестах. Крім цього в клінічній практиці використовуються так звані скринінг-тести (АКТ, турбидиметри-

чний аналіз, час загального лізису еуглобулінів плазми крові), проте дані, що отримані скринінговими методами, не можуть відповісти на питання про характер патології і про причину порушень балансу в системі фібринолізу.

Для характеристики стану системи фібринолізу в клінічній практиці проводиться визначення загального часу лізису еуглобулінів, але цей скринінг-тест дозволяє тільки виявити можливі загальні порушення в системі фібринолізу, а не конкретизувати причини їх виникнення.

Завдання винаходу - удосконалення способу діагностики стану системи фібринолізу при розвитку патології.

Завдання вирішується тим, що виконується комплекс лабораторних тестів для визначення параметрів системи фібринолізу, а саме визначення загального часу лізису еуглобулінів (скринінг-тест), активності тканинного активатора плазміногену, інгібітора тканинного активатора плазміногену першого типу, вмісту плазміногену, α_2 -антиплазміну та проводиться аналіз їх результатів. Основна роль приділяється трьом тестам: 1) час загального лізису еуглобулінів, 2) визначення активності тканинного активатора плазміногену, 3) інгібітора тканинного активатора плазміногену першого типу. Принцип методу полягає у визначенні співвідношення між активаторами й інгібіторами фібринолітичної системи.

Визначення активності тканинного активатора

(13) A

(11) 51418

(19) UA

плазміногену, компонента, який вносить головний вклад у фібринолітичний потенціал плазми крові, дозволяє адекватно оцінити потенціал системи фібринолізу та забезпечити своєчасну відповідь на можливу загрозу тромбоутворення. Інформація, що отримана за допомогою зазначених методів може відповісти на питання про причину виникнення в системі фібринолізу дисбалансу.

Запропоновані методи визначення активності тканинного активатора плазміногену і його інгібітора першого типу модифіковані й адаптовані для застосування в клінічній практиці (Савчук О.М., Гамісоня М.Ш., Кізім О.І., Платонова Т.М. Значимість деяких показників фібринолітичної системи в оцінці стану гемостазу // Фізіолог журнал — 2001, т. 47, № 3). Суть модифікації полягає:

1. Потенціальна активність плазміногену вимірюється в казеїнолітичних одиницях (казеїнолітичні одиниці характеризують потенційну плазмінову активність). Кількісне визначення вмісту плазміногену в мг/мол, як це практикується, не дає інформації про потенціал фібринолітичної системи. Використання казеїнолітичних одиниць дозволяє уніфікувати різні препарати плазміногену по активності, що істотно збільшує відтворюваність і точність тестів (Robbins V., Summaria L., Hsieh B., Shah R.J. The peptide chains of human plasmin. Mechanism of activation of human plasminogen to plasmin // J Biol Chem — 1967 — 242 — 2333 - 2342).

2. Застосування як кофактора t-PA бромціанового фрагменту фібриногену - FSB-2 (літературні дані свідчать про позитивний вплив фрагмента на активацію плазміногену t-PA у концентрації, достатньої для успішного виконання тестів). Використання мономерного фібрину чи суміші фрагментів фібрину, як це прийнято використовувати, не дає можливості стандартизувати умову виконання тестів (Bosma J., Rilken C., Nieuwenhuizen W., Binding of tissue-type plasminogen activator to fibrinogen fragments // J Biochem — 1988 — 172 — 399 - 404).

3. Склад інкубаційної суміші для визначення активності t-PA: плазміноген - 1,2к о /мл, еуглобулінова фракція досліджуваної плазми - 0,025мл, хромогенний плазміновий субстрат - 0,025мл, кофактор t-PA (фрагмент FSB-2) - 2мкМ, 0,05М фосфатний буфер, рН 7,4, що містить 0,15% твін 80 - до 0,25мл. Час інкубації 60 хвилин при 37°C. Вимірюється зміна оптичної щільності при 405нм через визначені проміжки часу.

4. Склад інкубаційної суміші для визначення активності PAI-1: плазміноген - 1,2к о /мл, ацетатна плазма - 0,025мл, хромогенний плазміновий субстрат - 0,025мл, кофактор t-PA (фрагмент FSB-2) - 2мкМ, 0,05М фосфатний буфер, рН 7,4, що містить 0,15% твін 80 - до 0,25мл. Час інкубації 45 хвилин при 37°C. Вимірюється зміна оптичної щільності при 405нм через 45 хвилин.

Задача винаходу вирішується виконанням комплексу тестів, визначення активності основних компонентів системи фібринолізу (плазміногену, α_2 -антиплазміну, тканинного активатора плазміногену, інгібітора тканинного активатора плазміногену першого типу), часу загального лізису еуглобулінів. Особливістю способу є те, що тест визначення часу загального лізису еуглобулінів використовується не як основний тест, а як скринінг-тест, що дає попередню інформацію про стан системи фібринолізу. Виконання тестів дає можливість визначення співвідношення активності тканинного активатора плазміногену і його інгібітору. Це дозволяє характеризувати потенціал фібринолітичної системи і прогнозувати тромботичні ускладнення при розвитку патології.

Приклад № 1

Визначення загального часу лізису еуглобулінів, активності тканинного активатора плазміногену й активності інгібітора тканинного активатора плазміногену в плазмі крові групи пацієнтів, які перенесли гострий інфаркт міокарда та в плазмі крові групи пацієнтів, які страждають на діабет.

Таблиця 1

	Час загального лізису еуглобулінів, год	Активність тканинного активатора плазміногену, і о /мл	Активність інгібітора тканинного активатора плазміногену, і о /мл
Норма	2,5 - 3	2,05 ± 0,06	0,6 - 1,5
Гострий інфаркт міокарда			
1	4,4 ± 0,13	1,62 ± 0,03	50 ± 1,5
2	12 ± 0,36	1,7 ± 0,05	45,7 ± 1,37
3	9,3 ± 0,28	0,487 ± 0,014	55 ± 1,65
4	5,3 ± 0,16	0,56 ± 0,02	34,3 ± 1,03
5	6 ± 0,18	0,98 ± 0,03	31,4 ± 0,94
Діабет			
1	8 ± 0,24	0,243 ± 0,007	5,7 ± 0,17
2	9 ± 0,27	0,146 ± 0,004	11,4 ± 0,34
3	6 ± 0,18	0,1 ± 0,003	1,4 ± 0,04
4	4,3 ± 0,13	0,689 ± 0,02	10,6 ± 0,32
5	5,7 ± 0,17	1,23 ± 0,04	7,9 ± 0,24

Висновок. Як видно з таблиці, причиною дисбалансу в системі фібринолізу може бути як зниження активності тканинного активатора плазміногену і підвищення активності його інгібітора (тобто

порушення балансу між активатором та інгібітором), так і зниження тільки активності активатора плазміногену, у той час як активність інгібітора в нормі. Тест "час загального лізису еуглобулінів"

виявляє порушення, але не з'ясовує причин патології. Це підтверджує те, що тест "час загального лізису еуглобулінів" може використовуватися тільки як скринінг-тест на початкових етапах діагностики, а тести визначення активності тканинного активатора плазміногену і його інгібітора повинні виконуватися обов'язково в комплексі для вияв-

лення можливих причин патології

Приклад № 2

Визначення окремих параметрів системи фібринолізу в плазмі крові пацієнтів, що перенесли гострий інфаркт міокарда, після проведення тромболітичної терапії стрептокіназою

Таблиця 2

	Активність плазміногену, %	Активність α_2 -антиплазміну, %	Активність тканинного активатора плазміногену, і о /мл	Активність інгібітора тканинного активатора плазміногену, і о /мл	Час загального лізису еуглобулінів, год
норма	100 \pm 3	100 \pm 3	2,05 \pm 0,06	0,6 - 15	2,5 - 3
1	38 \pm 1,1	50 \pm 1,5	4,48 \pm 0,13	50 \pm 1,5	0
2	18 \pm 0,54	35 \pm 1,1	6,37 \pm 0,19	45,7 \pm 1,37	0,4 \pm 0,01
3	8 \pm 0,24	63 \pm 1,9	5,84 \pm 0,17	55 \pm 65	0
4	12 \pm 0,36	56 \pm 1,7	3,14 \pm 0,09	71 \pm 2,13	0
5	40 \pm 1,2	60 \pm 1,8	8,8 \pm 0,26	31,4 \pm 0,94	0,5 \pm 0,01

Висновок Аналіз параметрів системи фібринолізу після проведення тромболітичної терапії стрептокіназою виявив значне зниження рівня нативного плазміногену і, відповідно, α_2 -антиплазміну. Активність тканинного активатора зростає, як і активність інгібітора, що також є відповіддю на введення стрептокінази. Виконання тесту "загальний час лізису еуглобулінів" немож-

ливо у зв'язку з майже повним розщепленням фібриногену ($<< 1\text{г}$) в плазмі крові на даному етапі проведення тромболітичної терапії

Приклад № 3

Визначення активності тканинного активатора плазміногену в плазмі крові в присутності розчинного фібрину і стрептокінази

Таблиця 3

Зміст розчинного фібрину, г/л	Активність тканинного активатора плазміногену, і о /мл	Активність стрептокінази в плазмі, і о /мл	Активність тканинного активатора плазміногену, і о /мл
0	1,21 \pm 0,03	0	1,45 \pm 0,04
0,03	1,21 \pm 0,03	10	1,45 \pm 0,04
0,06	1,23 \pm 0,03	25	1,5 \pm 0,045
0,12	1,19 \pm 0,02	40	1,39 \pm 0,04

Висновок З таблиці видно, що ні розчинний фібрин, ні стрептокіназа не впливають на визначення активності тканинного активатора плазміногену. Представлені дані свідчать, що тест "визначення активності тканинного активатора плазміногену" є інформативним і достовірним показником стану потенціалу системи фібринолізу,

що дуже важливо як при постановці діагнозу, так і при проведенні контролю ефективності відповідного лікування

Приклад № 4

Визначення параметрів системи фібринолізу у жінок до та після операції кесарева розтину

Таблиця 4

Показник	Норма	До кесаревого розтину	Після кесарева розтину
Плазміноген, %	100 \pm 1,38	89,36 \pm 4,35	105,5 \pm 4,89
α_2 -антиплазмін, %	100 \pm 1,2	78,64 \pm 6,84	71,17 \pm 3,66
Тканинний активатор плазміногену, і о /мл	2,07 \pm 0,04	3,44 \pm 0,59	9,26 \pm 1,67
Інгібітор активатора плазміногену I типу, і о /мл	До 15	58,6 \pm 14	25 \pm 6,7

Висновок Дані про активність плазміногену та α_2 -антиплазміну свідчать про невеликі коливання цих параметрів, що є типовим при багатьох патологіях, в той час як інформація про активність тка-

нинного активатора плазміногену і його інгібітора вказує на причину порушення системи фібринолізу і може служити основою при контролі за станом пацієнта після операції

ДП «Український інститут промислової власності» (Укрпатент)
вул. Сим'ї Хохлових, 15, м. Київ, 04119, Україна
(044) 456 – 20 – 90

ТОВ «Міжнародний науковий комітет»
вул. Артема, 77, м. Київ, 04050, Україна
(044) 216 – 32 – 71