



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 52215

(13) A

(51) G 12N9/68

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ ТРОМБОТИЧНИХ УСКЛАДНЕНЬ ПРИ РІЗНИХ ПАТОЛОГІЯХ, ЩО СУПРОВОДЖУЮТЬСЯ РОЗВИТКОМ ВНУТРІШНЬОСУДИННОГО ЗСІДАННЯ КРОВІ

1

2

(21) 2002032146

(22) 18 03 2002

(24) 16 12 2002

(46) 16 12 2002, Бюл. №12, 2002 р

(72) Савчук Олексій Миколайович, Краснобрига
Євгенія Миколаївна, Чернищенко Тамара Мар-
тинівна, Платонова Тетяна Миколаївна(73) ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ІМ. О.В. ПАЛЛАДИНА
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ(57) 1 Спосіб прогнозування тромботичних усклад-
нень при патологіях, що супроводжуються розвитком
внутрішньосудинного зсідання крові (ВЗК), який
включає проведення лабораторних тестів, за резуль-
татами яких визначають індекс, що використовують
для прогнозування тромботичних ускладнень, який
відрізняється тим, що згадані тести проводять за
наступними параметрами
рівень розчинного фібрину, г/л
активність тканинного активатора плазміногена,
іо/мл

час лізису еуглобулінів, год

2 Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що розра-
хунок індексу (ІТ), що використовують для прогнозу-
вання тромботичних ускладнень, проводять за на-
ступною формулою
$$IT = - R_{FD} / (t-PA_n - t-PA_d),$$

де

ІТ - індекс тромботичного ускладнення,

R_{FD} - вміст розчинного фібрину в досліджуваній
плазмі, в умовних одиницях,t-PA_n - активність тканинного активатора
плазміногена в плазмі крові здорових донорів, іо/мл
(іо - інтернаціональні одиниці виміру активності t-
PA),t-PA_d - активність тканинного активатора
плазміногена в плазмі крові хворого (іо/мл)3 Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що розра-
хунок індексу (ІТ), що використовують для прогнозу-
вання тромботичних ускладнень, проводять за на-
ступною формулою
$$IT = - R_{FD} / (ЗЧЛЕ_n - ЗЧЛЕ_d),$$
 деF_d - вміст розчинного фібрину в досліджуваній
плазмі, в умовних одиницях,ЗЧЛЕ_n - час загального лізису еуглобулінів плазми
крові здорових донорів, год,ЗЧЛЕ_d - час загального лізису еуглобулінів плазми
крові хворого, год4 Спосіб за будь-яким з пп. 1-3, який відрізняється
тим, що додатково проводять уточнюючий тест на
активність інгібітору тканинного активатора
плазміногена

Спосіб прогнозування тромботичних ускладнень при патологіях, що супроводжуються розвитком внутрішньосудинного зсідання крові (ВЗК), має відношення до медицини, а саме за допомогою комплексу лабораторних тестів, які дозволяють визначити співвідношення ступеня активації системи зсідання та потенціалу системи фібринолізу, а також дають змогу проводити діагностику та контроль ефективності лікування при серцево-судинних захворюваннях (стеноскардія та інфаркт міокарду), онкологічних, при ускладненнях під час вагітності, після хірургічного втручання, діабет та інші.

Виникнення тромботичних ускладнень в організмі характерно для багатьох захворювань, що викликають зміни параметрів системи гемостазу, і може визначатися порушенням балансу між системами зсідання та фібринолізу. Раннім маркером патологічної активації системи зсідання є поява в плазмі роз-

чинного фібрину (РФ) та зниження в ній рівня інгібіторів зсідання антитромбіну III та протезу C (Wada H, Sakuragawa N, Mori Y, Takagi M. Hemostatic molecular markers before the onset of disseminated intravascular coagulation // Am J Hematol 1999 Apr; 60(4) 273-8). За багатьох патологічних станів спостерігаються значні відхилення активності тканинного активатора плазміногену (t-PA) - головного фізіологічного активатора в плазмі крові. При патологічній активації системи зсідання зниження активності тканинного активатора плазміногену може бути показником підвищеного ризику тромбоутворення (Савчук О.М., Гамісонія М.Ш., Кізім О.І., Платонова Т.М. Значимість деяких показників фібринолітичної системи в оцінці стану гемостазу // Фізіолог, журнал - 2001, т. 47, №3). Таким чином, співвідношення вище наведених параметрів системи гемостазу може бути високоінформативним для прогнозування процесу тромбо-

(13) A

(11) 52215

(19) UA

утворення, що в свою чергу дозволить попередити імовірні ускладнення

В літературі, описані методи визначення, як активності, так і вмісту компонентів системи гемостазу в плазмі крові. Більшість цих методів - імуноферментні, в основі яких є специфічна взаємодія антиген-антитіло. Існують також методи з використанням специфічних хромогенних субстратів, що розщеплюються безпосередньо досліджуванним білком, а не опосередковано їм, як це часто буває у функціональних тестах. Крім цього в клінічній практиці використовуються так звані скринінг-тести: активований частково тромбoplastиновий час (АЧТЧ),

протромбіновий індекс (ПІ), антитромбін III (АТ III), час рекальцифікації, час загального лізису еуглобулінів плазми крові, проте дані, що отримані вищевказаними методами, не можуть відповісти на питання про характер порушень балансу між ланками зсідання та фібринолізу системи гемостазу.

Грицюк О.Й. запропонував спосіб прогнозування предтромботичного стану або ступеню тромбофілії, в якому використовується індекс тромбофілії - сумарний показник тестів (Грицюк О.Й., Амосова К.М., Грицюк І.О. Практична гемостазиологія -К. Здоров'я, 1994 -256с.)

Таблиця 1

| Параметри, які використовуються для розрахунку індекса тромбофілії по Грицюку | Параметри, які запропоновані нами для розрахунку індекса тромботичного ускладнення |
|---|--|
| Час рекальцифікації плазми, хв | Рівень розчинного фібрину, г/л |
| Толерантність плазми до гепарину, хв | Активність тканинного активатора плазміногену, і о /мл |
| Тромбіновий індекс, % | Час загального лізису еуглобулінів плазми крові, год |
| Гепарин крові, с | Активність інгібітора* тканинного активатора плазміногену, і о /мл |
| Фібриноген, г/л | Рівень фібриногену, г/л* |
| Фібринолітична активність плазми, % | Продукти деградації* фібриногену/фібрину, мг/мл |
| Спонтанний фібриноліз, дні | |
| Показники ТЕГ: R, хв, K, хв, S, хв, MA, мм, E, %, 1, CI | |

* Використовують за необхідністю як уточнюючі

Індекс тромбофілії за методом О.Й. Грицюка отримують шляхом складання індексів усіх вищевказаних показників. Для вираження однакової направленості усіх параметрів, використовують співвідношення показника хворого до відповідного середнього показника здорових людей. Вагоме значення, запропонованого Грицюком О.Й. тесту, має спроба проаналізувати параметри системи задання та системи фібринолізу одночасно. Проте, великий недолік полягає у тому, що майже всі запропоновані тести є скринінговими (окрім визначення вмісту фібриногену та ТЕГ). Недолік таких тестів полягає у тому, що це сумарні тести, в яких відбувається комплексна активація ряду факторів зсідання крові, на які діють інгібітори, внаслідок чого результат нівелюється. Такий підхід може привести до помилкових висновків. Тому необхідно виконувати тести, які безпосередньо виявляють маркери тромбінемії і визначають ступінь активації системи зсідання і потенціал системи фібринолізу.

Завданням винаходу є розробка способу, який дозволяє визначити співвідношення ступеня активації системи зсідання та потенціалу системи фібринолізу, для прогнозування тромботичних ускладнень при розвитку ВЗК-синдрому.

Завдання вирішується тим, що визначають вміст розчинного фібрину (маркера тромбінемії) та характеризують потенціал системи фібринолізу, за такими параметрами, як активність тканинного активатора плазміногену або загальний час лізису еуглобулінів.

Визначення співвідношення між параметрами системи фібринолізу (активність тканинного активатора плазміногену або загального часу лізису еуглобулінів) та системи зсідання крові (вміст розчинного фібрину) проводиться за формулою

$$IT = -R\Phi_d / (t-PA_n - t-PA_d), \quad (1)$$

де IT - індекс тромботичного ускладнення,

RΦ_d - вміст розчинного фібрину в досліджуваній

плазмі (умовні одиниці, 1 у о - 0,03г/л розчинного фібрину),

t-PA_n - активність тканинного активатора плазміногену в плазмі крові практично здорових донорів, в середньому дорівнює - 2,05 і о /мл (і о - Інтернаціональні одиниці виміру активності t-PA),

t-PA_d - активність тканинного активатора плазміногену в плазмі крові хворого (і о /мл),

Розрахунок IT за допомогою другої формули проводиться в тому випадку, коли неможливе визначення активності тканинного активатора плазміногену і виконується скринінг-тест час загального лізису еуглобулінів плазми крові

$$IT = -R\Phi_d / (3\text{ЧЛЕ}_n - 3\text{ЧЛЕ}_d) \quad (2)$$

3ЧЛЕ_n - час загального лізису еуглобулінів плазми крові практично здорових донорів, в середньому дорівнює - 3 години,

3ЧЛЕ_d - час загального лізису еуглобулінів плазми крові хворого (години)

В нормі IT = 0. Чим більше значення IT відрізняється від нуля, тим більший дисбаланс в системі гемостазу хворого. Якщо IT має від'ємний знак, то це свідчить про те, що система фібринолізу пригнічена та в повній мірі не справляється зі своєю функцією. Загроза тромбоутворення, яка виникла внаслідок появи в кровотоці розчинного фібрину, може бути реалізована. Якщо IT має додатне значення, то це свідчить, що система зсідання гіперактивована, а система фібринолізу має великий потенціал, а в цілому система гемостазу відчуває значне навантаження з боку обох ланок гемостазу.

Розрахунки IT за допомогою другої формули та інтерпретація отриманих результатів здійснюються аналогічно вищевказаному.

Для підтвердження достовірності запропонованого коефіцієнту наводиться комплекс лабораторних тестів визначення параметрів систем зсідання та фібринолізу при деяких патологіях. Це визначення

загального часу лізису еуглобулінів (скринінг-тест), вмісту плазміногену та α_2 - антиплазміну, активності тканинного активатора плазміногену, інгібітора тканинного активатора плазміногену першого типу, АЧТЧ, ПІ, РФ, рівень фібриногену, РС, АТІІІ (Платонова Т М, Чернищенко Т М, Горницька О В, Савчук О М, Соколовська Л І, Гамісонія М Ш, Макогоненко

Є М Комплексна лабораторна діагностика порушень системи гемостазу при дисемінованому внутрішньосудинному зсіданні крові // Лаб діагностика - 2000, №3)

ПРИКЛАД №1 Порушення рівноваги між зсідуючою та інгібуючою ланками системи гемостазу у вагітних жінок до та після операції кесарева розтину

Таблиця 2

| Параметри гемостазу | норма | Валтні до операції | Жінки після операції |
|-----------------------------------|----------|--------------------|----------------------|
| Рівень фібриногену г/л | 2,36±0,1 | 4,56±0,12 | 6,37±0,29 |
| Розчинний фібрин мкг/мл | - | 0,07±0,004 | 0,09±0,007 |
| Протромбінів індекс, % | 100 | 107,6±2,26 | 114,8±3,82 |
| Актив, частков тромбoplast час, С | 36±0,36 | 35,3±0,44 | 32±1,98 |
| Рівень АТІІІ % | 100 | 72,51±2,53 | 87,45±3,63 |
| Рівень протеїну С % | 100 | 67,4±2,41 | 58,25±4,63 |

ВИСНОВОК Зменшення часу зсідання в тесті АЧТЧ та підвищення ПІ, накопичення розчинного фібрину (маркеру ВЗК-синдрому) вказують на активацію системи зсідання. Зниження рівня фізіологічних антикоагулянтів (протезу С та антитромбіну ІІІ) та підвищення вмісту фібриногену свідчить про за-

грозу тромбоутворення

ПРИКЛАД №2 Порушення рівноваги між прокоагулянтною та антикоагулянтною ланками системи гемостазу у плазмах хворих на стенокардію та у плазмах пацієнтів, які постраждали від тяжких опіків

Таблиця 3

| № п/п | Рівень фібриногену г/л | РФ, мкг/мл | АЧТЧ, с | ПІ % | РС % |
|-------------------------|------------------------|------------|---------|------|------|
| норма | 2,36±0,1 | - | 36±0,36 | 100 | 100 |
| Нестабільна стенокардія | | | | | |
| 1 | 1,74 | 0,03 | 90 | 31 | 85 |
| 2 | 2,7 | 0,015 | 54 | 96 | 48 |
| 3 | 3 | 0,09 | 90 | 57 | 60 |
| 4 | 2,7 | 0,09 | 86 | 53 | 60 |
| 5 | 3,9 | 0,015 | 80 | 54 | 72 |
| 6 | 4,1 | 0,045 | 50 | 91 | 45 |
| 7 | 4,1 | 0,007 | 47 | 84 | 30 |
| 8 | 4 | 0,015 | 33 | 73 | 46 |
| Пацієнти з опіками | | | | | |
| 1 | 2,9 | 0,09 | 66 | 75 | 100 |
| 2 | 2,3 | 0,02 | 60 | 62 | 48 |
| 3 | 3,2 | 0,09 | 95 | 105 | 45 |
| 4 | 4,6 | 0,07 | 50 | 83 | 48 |
| 5 | 2,9 | 0,015 | 87 | 65 | 60 |

ВИСНОВОК Поява РФ - маркера тромбемії та підвищений рівень фібриногену свідчать про загрозу тромбоутворення

Подовження часу зсідання в тесті АЧТЧ та зниження ПІ пов'язано з накопиченням інгібіторів, які діють на активовані фактори зсідання, але поряд з цим спостерігається зниження рівня фізіологічного

антикоагулянта протеїну С (РС). Таким чином, висновки зроблені на основі тільки скринінгових тестів АЧТЧ та ПІ у даному випадку можуть призвести до помилкової діагностики

ПРИКЛАД №3 Час рекальцифікації плазми крові вагітних жінок до операції кесарева розтину (А) та у групи хворих на діабет (В)

Таблиця 4

Група А

| № п/п | норма | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|------------------------|-------|----------|----|------------|-----|-----------|-----|
| Час рекальцифікації, с | 110 | 88 | 80 | 110 | 100 | 110 | 155 |
| Група В | | | | | | | |
| Умови експерименту | | норма | | ІЗЦД за АП | | ІНЦД з АП | |
| Кількість хворих | | 19 | | 38 | | 30 | |
| Час рекальцифікації, с | | 62,6±3,1 | | 57,4±6,4 | | 62,6±3,1 | |

ВИСНОВОК З наведених даних видно, що тест "час рекальцифікації" нечутливий і не дає інформації про активацію системи зсідання. У першій групі (група А) спостерігається деяке відхилення від норми, у групі В параметри тесту, які були визначені у інсулін-залежних (ІЗЦД) пацієнтів та інсуліннезалежних (ІЦЦД) пацієнтів з анпаціями відповідають нормі. Хоча, при тяжких випадках захворювання діабетом

тобто у випадку діабетичної стопи, час рекальцифікації подовжується до $90 \pm 3,4$ сек.

ПРИКЛАД №4 Визначення загального часу лізису еуглобулінів, активності тканинного активатора плазміногену й активності інгібітора тканинного активатора плазміногену в плазмах крові групи пацієнтів, які перенесли гострий інфаркт міокарда та в плазмах крові групи пацієнтів, які страждають на діабет

Таблиця 5

| | Час загального лізису еуглобулінів, год | Активність тканинного активатора плазміногену, іо /мл | Активність інгібітора тканинного активатора плазміногену, іо /мл |
|--------------------------|---|---|--|
| Норма | 2,5-3 | 2,05 | 0,6-15 |
| Гострий інфаркт міокарда | | | |
| 1 | 4,4 | 1,62 | 50 |
| 2 | 12 | 1,7 | 45,7 |
| 3 | 9,3 | 0,487 | 55 |
| 4 | 5,3 | 0,56 | 34,3 |
| 5 | 6 | 0,98 | 31,4 |
| Діабет | | | |
| 1 | 8 | 0,243 | 5,7 |
| 2 | 9 | 0,146 | 11,4 |
| 3 | 6 | 0,1 | 1,4 |
| 4 | 4,3 | 0,689 | 10,6 |
| 5 | 5,7 | 1,23 | 7,9 |

ВИСНОВОК Як видно з таблиці, причиною виниклого в системі фібринолізу дисбалансу може бути як зниження активності тканинного активатора плазміногену і підвищення активності його інгібітора, 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 виявлення можливих причин патології.

ПРИКЛАД №5 Вміст розчинного фібрину й активності тканинного активатора плазміногену

Таблиця 6

| Умови експерименту | Норма | 1 група | 2 група | 3 група |
|---------------------------------------|-----------------|------------------|-----------------|------------------|
| Гострий інфаркт міокарда | | | | |
| t-PA, іо /мл | $2,07 \pm 0,65$ | $3,66 \pm 0,62$ | $1,49 \pm 0,21$ | $0,61 \pm 0,12$ |
| РФ (г/л) | - | $0,09 \pm 0,06$ | $0,06 \pm 0,03$ | $0,03 \pm 0,007$ |
| ІТ | 0 | -1,8 | 3,9 | -0,71 |
| Валпні до операції кесаревого розтину | | | | |
| t-PA, іо /мл | $2,07 \pm 0,65$ | $7,33 \pm 1,69$ | $2,26 \pm 1,05$ | $0,28 \pm 0,14$ |
| РФ (г/л) | - | $0,08 \pm 0,04$ | $0,08 \pm 0,03$ | $0,05 \pm 0,03$ |
| ІТ | 0 | 0,49 | 10 | -0,99 |
| норма | | | | |
| t-PA, іо /мл | $2,07 \pm 0,65$ | $1,8 \pm 0,77$ | $1,4 \pm 0,92$ | $2,33 \pm 0,06$ |
| РФ (г/л) | - | $0,011 \pm 0,01$ | $0,05 \pm 0,06$ | $0,05 \pm 0,04$ |
| ІТ | 0 | -1,65 | -2,8 | 5,2 |

ВИСНОВОК З наведених даних видно, що тест на РФ та показник активності t-PA є чутливими показниками при різних патологіях.

Отже, співвідношення цих показників є співвід-

ношенням ступеня активації системи зсідання та потенціалу фібринолітичної системи, що є високоефективним показником.

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