



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 88596

(13) C2

(51) МПК (2009)

A61B 10/00

G01N 33/50

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ РОЗВИТКУ ДИСЕМІНОВАНОГО ВНУТРІШНЬОСУДИННОГО ЗСІДАННЯ КРОВІ ПРИ ГОСТРИХ КРОВОВТРАТАХ

1

(21) a200903280

(22) 06.04.2009

(24) 26.10.2009

(46) 26.10.2009, Бюл. № 20, 2009 р.

(72) КІНАХ МАРІЯ ВАСИЛІВНА, КОНДРАЦЬКИЙ  
БОГДАН ОЛЕКСІЙОВИЧ, ГОЛИК ЮРІЙ ЙОСИПО-  
ВИЧ(73) КІНАХ МАРІЯ ВАСИЛІВНА, КОНДРАЦЬКИЙ  
БОГДАН ОЛЕКСІЙОВИЧ, ГОЛИК ЮРІЙ ЙОСИПО-  
ВИЧ

(56) UA 26055 U 27.08.2007

UA 54773 A 17.03.2003

2

(57) Спосіб прогнозування розвитку дисемінованого внутрішньосудинного зсідання (ДВЗ) крові при гострих крововтратах, що включає лабораторні дослідження крові, який відрізняється тим, що в нерозбавленій сироватці або плазмі крові визначають показники прозапальних цитокінів інтерлейкіну 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) і фактора некрозу пухлин- $\alpha$  - (TNF- $\alpha$ ), і при збільшенні рівня IL-1 $\beta$  до 220,8 $\pm$ 10,6 пкг/мл - при нормі не вище 50,0 пкг/мл, а TNF- $\alpha$  - до 250,5 $\pm$ 12,6 пкг/мл - при нормі не вище 50,0 пкг/мл, прогнозують розвиток ДВЗ крові.

Винахід відноситься до медицини, зокрема до клінічної лабораторної діагностики, і може використовуватись для прогнозування розвитку дисемінованого внутрішньосудинного зсідання крові (ДВЗ) при гострих крововтратах.

Відомий спосіб прогнозування розвитку дисемінованого внутрішньосудинного зсідання крові [Савчук О.М. Спосіб прогнозування розвитку дисемінованого внутрішньосудинного зсідання крові /О.М.Савчук, СМ. Краснобрига, Т.М.Чернищенко, Т.М.Платонова, Г.Л.Волков // Лабораторна діагностика. - 2002. - №2. - С.50-53] з аналізом стану системи гемостазу за комплексом тестів, який включає визначення у плазмі крові вмісту фібриногену, розчинного фібриногену, активності протеїну С, активності тканинного активатора плазміногену, активності інгібітора плазміногену, активованого часткового тромбoplastинного часу, протромбінного індексу, часу загального лізису еуглобулінів. Визначення співвідношення між параметрами фібринолітичної системи та системи зсідання крові проводять за формулою:

$$ITU = R_{\Phi} / (TA_{\Pi d} - TA_{\Pi n}),$$

де ITU - індекс тромботичних ускладнень; R $\Phi$  - вміст розчинного фібрину в досліджуваній плазмі крові в умовних одиницях; TA $\Pi d$  - активність тканинного активатора плазміногену в плазмі крові практично здорових людей (донорів); TA $\Pi n$  - активність тканинного активатора плазміногену в досліджуваній плазмі крові.

В нормі ІТУ дорівнює нулю, і чим більше показник ІТУ відрізняється від нуля, тим більший дисбаланс у системі гемостазу у хворого. Якщо ІТУ має від'ємний знак, то це свідчить про зниження потенціалу системи фібринолізу, функція якої не виконується у повній мірі. У кровотоці нагромаджується РФ, внаслідок чого може виникнути загроза тромбоутворення. Якщо ІТУ має додатне значення, то це свідчить про високий потенціал фібринолітичної системи на фоні гіперактивації системи зсідання крові, що також свідчить про загрозу тромботичних ускладнень.

Недоліком цього способу є те, що він займає багато часу. Окрім цього, РФ нагромаджується в присутності тромбіну і є його маркером. Запропоновані тести неможливо виконувати в умовах районних сільських та міських клініко-діагностичних лабораторій.

В основу винаходу поставлено завдання створити спосіб прогнозування розвитку ДВЗ крові при гострих крововтратах до початку розвитку тромбемії, який буде доступний для використання в умовах районних та обласних клініко-діагностичних лабораторій та скоротить час діагностики.

Поставлене завдання досягається тим, що у спосіб прогнозування розвитку ДВЗ крові при гострих крововтратах, що включає лабораторні дослідження крові, згідно з винаходом, в нерозбавленій сироватці або плазмі крові визначають

(13) C2

(11) 88596

(19) UA

показники прозапального цитокіну інтерлейкіну 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) і фактору некрозу пухлин  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), і при збільшенні рівня IL-1 $\beta$  до 220,8 $\pm$ 10,6 пкг/мл (при нормі не вище 50,0 пкг/мл), а TNF- $\alpha$  - до 250,5 $\pm$ 12,6 пкг/мл (при нормі не вище 50,0 пкг/мл) прогнозують розвиток ДВЗ крові.

Цитокіни - протеси з плейотропною активністю, яким належить важлива роль у міжклітинній комунікації та клітинній активації. Інтерлейкіни здатні як втручатися в імунну відповідь, так і впливати на систему гемостазу. Найбільший вплив на систему гемостазу має прозапальний інтерлейкін IL-1 $\beta$ , який діє на судинно-тромбоцитарний гемостаз, коагуляцію і фібриноліз, зокрема, активує адгезію і агрегацію тромбоцитів, а також вторинний гемостаз, провокуючи розвиток ДВЗ крові.

Запропонований спосіб прогнозування розвитку ДВЗ крові при гострих крововтратах здійснюють таким чином.

Для визначення IL-1 $\beta$  використовують твердофазний імуоферментний метод із застосуванням індикаторного ферменту - пероксидази хрому. Один тип антитіл іммобілізується на внутрішніх поверхнях лунок планшетів для мікротитрування. Другий тип моноклеарних тіл до незалежного

епітопу молекули IL-1 $\beta$  знаходиться в наборі у вигляді кон'югата з біотином. Індикаторним компонентом є кон'югат пероксидази хрому із стрептавидином, який має високу спорідненість з біотином.

Після інкубації і промивок в лунки вносять кон'югат пероксидази хрому із стрептавидином, знову інкубують, промивають, вносять субстрат і вимірюють активність зв'язаної пероксидази на автоматичному фотометрі для мікропланшетів з довжиною хвилі 450 нм.

Для проведення дослідження готують необхідну кількість буферних розчинів: на один подвійний стріп потрібно 75мл буферу для промивання (буфер В) і 8мл буферу для розведення взірців і концентрату (буфер С). Відбирають необхідну кількість стріпів, і потрібні лунки стріпів двічі промивають буфером В і двічі - дистильованою водою, вносячи по 300мкл в кожен лунку, з наступною повною аспірацією.

Для отримання стандарту А (1200пкг/мл) розчиняють вміст ампули зі стандартним препаратом (концентратом IL-1 $\beta$ ) в 1мл дистильованої води (буфер С). Готують розчин стандартів IL-1 $\beta$ , змішуючи стандартний розчин А з буфером С (Таблиця 1).

Таблиця 1

Позначення стандарту	Концентрація IL-1 $\beta$ . пкг/мл	Об'єм стандарту А, мкл	Об'єм буфера С, мкл
В	600	100	100
С	300	50	150
Д	150	25	175
Е	60	10	190

В лунки А1-Е1 і/або А2-Е2 мікропланшета вносять по 200мкл стандартів IL-1 $\beta$ , в лунки F1 і/або F2 вносять по 200мкл буферу С (нульова проба), в інші лунки мікропланшета вносять досліджувану плазму також по 200мкл.

Всі лунки інкубують 2 години при температурі 37°C, безперервно струшуючи. Після чого видаляють рідину з лунок, тричі промиваючи їх буфером В (300мкл) і двічі дистильованою водою, та проводять повну аспірацію рідини, що залишилась у лунках. Розводять 1:40 необхідну для аналізу кількість моноклеарних антитіл (АТ-2) біотинованих буфером С в розрахунку 3,2мл готового розчину на 1 здвоєний стріп, добре перемішують розчин. Вносять в кожен лунку по 200мкл другого типу моноклеарних антитіл до незалежного епітопу молекули IL-1 $\beta$  і інкубують при температурі 37°C протягом 30 хвилин.

Після цього видаляють рідину з лунок, промиваючи їх 5 разів буфером В (300мкл на кожен лунку) і двічі дистильованою водою, та проводять повну аспірацію рідини, що залишилась в лунках.

Розводять 1:40 необхідну для аналізу кількість кон'югата стрептавидину з пероксидазою хрому буфером С, вносять по 200мкл розчину в кожен лунку мікропланшета та інкубують 30 хвилин при температурі 20 $\pm$ 2°C при безперервному струшуванні. Видаляють рідину з лунок, промиваючи їх 5 разів буфером В (300мкл на кожен лунку) і двічі дистильованою водою, та проводять повну аспірацію рідини, що залишилась в лунках.

Потім тричі промивають лунки мікропланшета струменем дистильованої води, осушують мікропланшет постукуванням по поверхні лабораторного стола, покритого фільтрувальним папером.

Змішують у рівних кількостях розчини субстрату і реагенту, враховуючи, що на 1 здвоєний стріп потрібно 3,2мл готового розчину. Вносять у всі лунки по 200мкл розчину субстрату з барвником. Інкубують стріпи 10-20 хвилин при кімнатній температурі в захищеному від прямого сонячного світла місці і спостерігають утворення блакитного забарвлення. Зупиняють реакцію додаванням 50мкл стоп-реагенту в кожен лунку.

Проводять облік результатів з використанням автоматичного, напівавтоматичного або ручного фотометра при довжині хвилі 450нм, встановлюючи нульове поглинання по лунці зі стандартом 0. Автоматичний фотометр з мікропроцесором проводить розрахунки при введенні даних калібрувальних розчинів у процесор. При використанні напівавтоматичного аналізатора вираховують значення за калібрувальною кривою - оптична густина/концентрація. Слід зауважити, що використовувати ручний аналізатор недоцільно, оскільки кількість досліджуваного матеріалу і реактивів збільшується у 4 рази.

Для визначення TNF- $\alpha$  використовують твердофазний імуоферментний метод із застосуванням індикаторного ферменту - пероксидази хрому. Один тип антитіл іммобілізується на внутрішніх луках планшетів для мікротитрування. Другий тип

мононуклеарних антитіл до незалежного епітопу молекули TNF-а знаходиться в наборі у вигляді кон'югата з біотином. Індикаторним компонентом є кон'югат пероксидази хрому із стреповидином, який має високу спорідненість з біотином. Після інкубації і промивок в лунки вносять кон'югат пероксидази хрому із стреповидином, знову інкубують, промивають, вносять субстрат і вимірюють активність зв'язаної пероксидази на автоматичному фотометрі для мікро-планшетів з довжиною хвилі 450nm.

Дослідження проводять нерозведеними взірцями сироватки/плазми. Щоб попередити осадження фібриногену, нерозведені взірці сироватки/

плазми швидко розморожують на водяній бані при температурі 37°C.

Перед виконанням дослідження відбирають необхідну кількість моноклональних антитіл (АТ-2) біотинованих. Готують необхідну кількість буферних розчинів у розрахунок на 1 стріп - 50мл буферу В і 8мл буферу С. Відбирають необхідну кількість стріпів з планшети. Двічі промивають буфером В, вносячи 300мкл, після чого промивають один раз дистильованою водою і проводять повну аспірацію рідини.

Для отримання стандарту (1000пкг/мл) ампулу зі стандартом розводять у 1,0мл буферу С. Набір стандартів готують за схемою наведеною в таблиці 2.

Таблиця 2

Позначення стандарту	Концентрація ФНП, пкг/мл	Об'єм стандарту А, мкл	Об'єм буфера С, мкл
A	1000	200	0
B	500	100	10
C	250	50	25
D	125	25	50
E	50	10	100
F	0	0	200

В інші лунки мікропланшета вносять 200мкл досліджуваної плазми/сироватки та інкубують 1 годину при температурі 37°C. Видаляють рідину з планшета, промиваючи буфером С (300мкл) і один раз - дистильованою водою та проводять повну аспірацію рідини.

Розводять 1:20 необхідну для аналізу кількість АТ-2 буфером С у розрахунок 1,6мл готового розчину на 1 стріп, добре перемішують. Піпеткою вносять по 100мкл інших антитіл, інкубують 1 годину при температурі 37°C, постійно струшуючи. Видаляють рідину з лунок, 5 разів промиваючи буфером В (300мкл) і 1 раз дистильованою водою. Проводять повну аспірацію рідини. Розводять 1:20 необхідну кількість кон'югата для аналізу. Розводять 1:20 стрептавидин із пероксидазою хрому буфером С і вносять по 100мкл розчину в кожну лунку мікропланшета. Інкубують 30 хвилин при кімнатній температурі при постійному струшуванні. Видаляють рідину з лунок, 5 разів промиваючи буфером В (300мкл) і 1 раз дистильованою водою, проводять повну аспірацію рідини. Лунки мікропланшета тричі промивають струменем дистильованої води. Осушують мікропланшет, постукуючи по столу, покритому фільтрувальним папером.

Готують розчин субстрату з барвником, змішуючи у рівних кількостях субстрат і реагент, враховуючи, що на один стріп потрібно 1,6мл готового розчину. Вносять по 100мкл в кожну лунку розчину субстрату з барвником, інкубують 10-20 хвилин при кімнатній температурі, уникаючи прямого сонячного світла, і спостерігають утворення блакитного кольору. Зупиняють реакцію додаванням в кожну лунку 50мкл стоп-реагенту.

Проводять облік результатів на автоматичному, напіваавтоматичному або ручному аналізаторі і розраховують за калібрувальною кривою. У випадку, якщо оптична густина перевищує величину для стандарту, досліджувану сироватку/плазму крові розводять у 10 разів. Розведення враховують при обчисленні.

Для підтвердження ефективності запропонованого способу прогнозування розвитку ДВЗ крові при гострих крововтратах були проведені клініко-лабораторні дослідження у групах хворих з гострою крововтратою з розвитком ДВЗ (8 хворих) і без розвитку ДВЗ (12 хворих) в період кровотечі і через добу після її зупинки та в контрольній групі (10 здорових людей-донорів).

Стан системи гемостазу для діагностики ДВЗ оцінювали за показниками: кількість тромбоцитів, час зсідання за Лі-Уайтом, кількість фібриногену за методом Р.А.Рутберг (1962), тромбіновий час (ТЧ) за методом Сірмаї (1964), активований частковий тромбопластиновий час (АЧТЧ) наборами реактивів „Технологія Стандарт”, активність анти тромбіну III (АТ III), ретракція кров'яного згустку (РКЗ) і спонтанний лізис (СЛ) за методом Е.П.Іванова (1977), паракоагуляційні тести (етаноловий і протамін-сульфатний) за методом Ліпінські (1952), орто-фенантроліновий тест наборами реактивів „Технологія Стандарт”, розчинні комплекси мономерів фібрину (РКМФ) продукти деградації фібрину/фібриногену стафілоковим клампінг-тестом наборами реактивів „Simko”. Результати клініко-лабораторних досліджень представлені у таблиці 3.

Таблиця 3

Показники прозапального інтерлейкіну IL-1 $\beta$  і TNF- $\alpha$  у хворих з крововтратами

№ п/п	Показники, од. вимір.	Контроль (n=10)	Без ДВЗ (n=12)	З ДВЗ (n=8)
1.	IL-1 $\beta$ , пкг/мл	42,0 $\pm$ 5,40	58,4 $\pm$ 6,5	318,6 $\pm$ 16,5 P<0,001
2.	TNF- $\alpha$ , пкг/мл	40,0 $\pm$ 5,40	53,2 $\pm$ 6,3	323,6 $\pm$ 21,3 P<0,001

Примітка: P - достовірність у порівнянні з контролем.

При повторному дослідженні через добу у 8 хворих зміни гемостазіологічних показників вказували на розвиток ДВЗ: у 7 хворих - I фази, в 1 хворого - II фази. У I фазі час зсідання крові скоротився до 264,5 $\pm$ 24,6 с (при контролі - 486,8 $\pm$ 14,8 с), ТЧ - до 13Д $\pm$ 0,3 с (при контролі -15,3 $\pm$ 0,4 с), РФ - до 2,6 $\pm$ 0,3 г/л (при контролі - 3,6 $\pm$ 0,2 г/л), АЧТЧ - до 28,4 $\pm$ 2,2 с (при контролі - 3,6 $\pm$ 3,2 с). У I фазі розвитку ДВЗ було зафіксовано появу ПДФ і РКМФ до 9,6 $\pm$ 1,2 (при контролі - 0), підвищення ортофенантролінового тесту - до 6,2 $\pm$ 0,4 (при контролі - 2,1  $\pm$ 0,2мкг/мл), зниження активності АТ III - 68,4 $\pm$ 2,8% (при контролі - 98,8 $\pm$ 8,6%), пригнічення фізіологічного лізису - до 6,4 $\pm$ 0,7% (при контролі - 14,5 $\pm$ 1,2%). Рівень IL-1 $\beta$  підвищувався, у порівнянні з первинним дослідженням з 328,6  $\pm$ 16,5 пкг/мл до 346,5 $\pm$ 14,4 пкг/мл, TNF- $\alpha$  - з 363,6 $\pm$ 21,3 до 410,8 $\pm$ 16,4 пкг/мл (P<0,05). У групі хворих, гемостазіологічні показники яких не вказували на розвиток ДВЗ, рівень IL-1 $\beta$  через добу становив 76,8 $\pm$ 4,9 пкг/мл, TNF- $\alpha$  -80,5 $\pm$ 6,2 пкг/мл.

Клінічний приклад 1. Хворий М., 36 років, поступив в хірургічне відділення ургентно з виразковою хворобою, ускладненою шлунково-кишковою кровотечею. Об'єктивні дані: артеріальний тиск - 110/60мм рт.ст. блідість шкірних покривів. Під час фіброезофагогастроскопії - тромб на виразці.

Результати лабораторних досліджень: загальний аналіз крові: ШОЕ - 18мм/год, гемоглобін 78г/л, лейкоцити - 5,8 Г/л, еритроцити - 2,2 Т/л, лейкоформула: е-4%; п-3%; с-72%; м-7%;л - 16%, гематокрит-23%. Біохімічні дослідження: загальний білок - 64,4 г/л, IL-1 $\beta$  - 46 пкг/мл, TNF- $\alpha$  - 49 пкг/мл.

Гемостазіограма: КТ - 224 Г/л, Лі Уайта 5хв,48 с, АЧТЧ -30 с, ПДФ і РКМФ - 4, ортофенантроліновий тест 2,4 мкг/мл, етанолова проба від'ємна, активність АТ-ІІІ 78%, підвищена ретракція кров'яного згустка до 72,4%.

Через добу зміни гемостазіологічних показників підтримувались на рівні помірної гіперкоагуляції. IL-1 $\beta$  становив 53 пкг/мл (при нормі до 50 пкг/мл), TNF- $\alpha$  - 56 пкг/мл (при нормі до 50 пкг/мл).

Колівання рівня IL-1 $\beta$  та TNF- $\alpha$  в межах норми засвідчили сприятливий прогноз нормалізації гемостазу при гострих крововтратах.

Клінічний приклад 2. Хворий К., 42 роки., поступив у травматологічне відділення з політравмою, в т.ч. черепномозкова травма, розрив печінки.

Об'єктивні дані: хворий непритомний, шкірні покриви бліді, покритий холодним потом, артеріальний тиск -110/60мм рт.ст.;

Результати лабораторних досліджень: загальний аналіз крові - ШОЕ-21мм/год, гемоглобін - 84г/л, лейкоцити - 5,8 Г/л, еритроцити - 1,98 Т/л, лейкоформула - е - 3%; п -4%; с -70%; м - 8%; л - 10%, гематокрит -18%. Біохімічні дослідження: загальний білок - 61,8г/л., сечовина сироватки крові - 2,2ммоль/л (норма - 2,5-8,8ммоль/л), креатинін сироватки крові - 67мкмоль/л (норма - 44 - 97мкмоль/л),загальний білірубін - 38,2мкмоль/л, прямий - 31,4мкмоль/л, непрямий - 6,8мкмоль/л, IL-1 $\beta$  - 282 пкг/мл, TNF- $\alpha$  - 289 пкг/мл.

Гемостазіограма: КТ -214Г/л, Лі Уайта 4хв, 35 с, АЧТЧ-31 с, ПДФ і РКМФ - 4, ортофенантроліновий тест 2,6мкг/мл, етанолова проба від'ємна, активність АТ-ІІІ 72%, підвищена ретракція кров'яного згустка до 76,4% (60-70%), фізіологічний лізис - 24,2 (норма-10-20%).

Через добу зміни гемостазіологічних показників вказували на ДВЗ гіперкоагуляційну фазу: Лі Уайта 4хв 05 с , АЧТЧ - 26 с, ТЧ - 12 с, ПДФ і РКМФ - 8мкг/мл, позитивні етанолова і протамінсульфатна проби, активність АТ III - 68%, о - феантроліновий тест - 10,6мкг/мл, РКЗ - 5,8% , фізіологічний лізис -78%, IL-1 $\beta$  - 323 пкг/мл, TNF- $\alpha$  - 248 пкг/мл.

Підвищення IL-1 $\beta$  та TNF- $\alpha$  вказувало на активацію процесу зсідання, тромбінемії та розвитку ДВЗ крові.

Запропонований спосіб прогнозування розвитку дисемінованого внутрішньосудинного зсідання крові при гострих крововтратах дозволяє передбачити розвиток ДВЗ ще до появи тромбінемії і зробити відповідну корекцію.