



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 86856

(13) C2

(51) МПК (2009)

G01N 33/50

A61B 5/00

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

(54) ТЕСТ-СИСТЕМА ТА СПОСІБ КОНТРОЛЮ ЕФЕКТИВНОСТІ ЛІКУВАННЯ ТА ПРОФІЛАКТИКИ ТРОМБОЗІВ АНТИКОАГУЛЯНТАМИ НЕПРЯМОЇ ДІЇ

1

(21) а200708173

(22) 18.07.2007

(24) 25.05.2009

(46) 25.05.2009, Бюл.№ 10, 2009 р.

(72) КОРОЛЬОВА ДАРЬЯ СЕРГІЙВНА, UA, ЧЕРНИШЕНКО ТАМАРА MARTINIVNA, UA, ПЛАТОНОВА ТЕТЯНА МИКОЛАЇВНА, UA, ВОЛКОВ ГЕОРГІЙ ЛЕОНІДОВИЧ, UA, ДЄЄВ ВАЛЕРІЙ АРКАДІЙОВИЧ, UA, КУПОВСЬКА СВИТЛАНА ІВАНІВНА, UA

(73) ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ІМ. О.В. ПАЛЛАДИНА НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ, UA

(56) Платонова Т.Н., Сушко А. Е., Петров А.В., Соловьев Д.А. "Определение общего уровня протромбина и выявление его функционально неактивных форм с помощью фермента экамулина, выделенного из яда эфы многочешуйчатой" // Украинский биохимический журнал, 1995, стр. 75-60

(57) 1. Тест-система для контролю ефективності лікування та профілактики тромбозів антикоагулянтами непрямої дії, що містить тромбопластин і розчин 0,025 М CaCl₂, яка **відрізняється** тим, що вона додатково містить специфічні компоненти

2

для активації протромбіну та його декарбоксильованої форми: екамулін, хромогенний субстрат тромбіну S2238, контрольну плазму крові, тріс-HCl буфер, рН 7,4 з 0,13М NaCl.

2. Спосіб контролю ефективності лікування та профілактики тромбозів антикоагулянтами непрямої дії, що полягає в порівнянні результатів активації протромбіну плазми крові двома активаторами - тромбопластином та екамуліном, і дозволяє виявити декарбоксильований протромбін, що є маркером ефективності лікування антикоагулянтами непрямої дії, який **відрізняється** тим, що визначення рівня протромбіну проводять за тестом: змішують тромбопластин або екамулін, розчин хлориду кальцію, досліджувану плазму крові та тромбінспецифічний хромогенний субстрат, визначають амідолітичну активність утвореного тромбіну, розрахунки проводять у два етапи, визначаючи протромбінове відношення та екамулінове відношення, результати тесту представляють у вигляді відношення екамулінового відношення до протромбінового відношення, яке за ефективної антикоагулянтної терапії становить від 1,60 до 3,00.

Винахід відноситься до медицини, а саме до гемостазіології, і може бути використаний як спосіб контролю ефективності лікування антикоагулянтами непрямої дії з метою профілактики тромбозів. Контроль ефективності дії антикоагулянтів непрямої дії базується на виявленні функціонально неактивного протромбіну (декарбоксильованого протромбіну) в плазмі крові.

Для профілактики тромбозів в клінічній практиці використовують антикоагулянти прямої (гепарини, ґрудин) та непрямої дії (варфарин, кумарин). До антикоагулянтів непрямої дії належать антагоністи вітаміну К, які порушують посттрансляційне карбоксилювання залишків глутамінової кислоти Гла-домену факторів II, VII, IX, X зсідання крові, протейнів C, S і Z.

Такі некарбоксильовані форми вітаміну К - залежних білків не здатні виконувати відповідні функції і називаються PIVKA-білками (протейни, що

утворюються за відсутності вітаміну К). Накопичення функціонально неактивних PIVKA- білків в крові призводить до зниження потенціалу системи зсідання крові.

Передозування антикоагулянтами непрямої дії чи індивідуальна підвищена чутливість до них може призвести до сильних кровотеч, тому проведення сучасної антикоагулянтної терапії неможливе без відповідного лабораторного контролю за станом системи гемостазу.

Відомо, що сучасні лабораторні методи контролю ефективності лікування антикоагулянтами непрямої дії базуються на виявленні параметрів, що характеризують зниження прокоагулянтного потенціалу системи гемостазу за рахунок накопичення функціонально неактивного протромбіну. З цієї метою у клінічній практиці для контролю ефективності терапії антикоагулянтами непрямої дії використовується тест „протромбіновий час”. Цей

(13) C2

(11) 86856

(19) UA

тест базується на визначенні часу зсідання плазми крові під дією екзогенного тромбoplastину і характеризує зовнішній шлях плазменного гемостазу та опосередковано вказує на рівень функціонально активного протромбіну [1, 2].

Відомо спосіб контролю ефективності лікування непрямыми антикоагулянтами [3], що полягає у визначенні часу зсідання капілярної крові в тесті "протромбіновий час". При цьому протромбіновий час визначають з використанням стандартизованого за міжнародним індексом чутливості тромбoplastину та молярного співвідношення кінцевої концентрації безводного хлориду кальцію до кінцевої концентрації безводного цитрату натрію, що складає від 1,5 до 2,0. Результати протромбінового часу представляють у вигляді міжнародного нормалізованого відношення (MNV) за формулою $MNV = (PCH_{\text{хворого}} / PCH_{\text{контроля}})^{MICH}$, де $PCH_{\text{хворого}}$ - протромбіновий час в капілярній крові хворого, $PCH_{\text{контроля}}$ - протромбіновий час в капілярній крові здорової людини, $MICH$ - міжнародний індекс чутливості тромбoplastину. Підбір дози антикоагулянтів непрямої дії проводиться під контролем визначення MNV, виходячи з того, що показник MNV має бути в діапазоні від 2,0 до 4,0.

Недоліком цього тесту є його чутливість до інгібіторів полімеризації фібрину, оскільки рівень протромбіну визначається за часом зсідання плазми крові. Тому було запропоновано, окрім MNV, враховувати ступінь трансформації фібриногену, що залежить від точки максимального прискорення перетворення фібриногену [4], що в свою чергу ускладнює інтерпретацію отриманих результатів.

Ще один недолік тесту "протромбіновий час" полягає у фізіологічній активації VII, X, V факторів зсідання крові під впливом тромбoplastину з подальшою активацією протромбіну. Тобто цей тест лише опосередковано вказує на рівень функціонально активного протромбіну та залежить від вмісту та функціонального стану зазначених факторів зсідання крові та дії інгібіторів зовнішньої ланки системи зсідання крові [5].

Відомо, що окрім "протромбінового часу" для моніторингу лікування антикоагулянтами непрямої дії запропоновано використовувати тест "екарино-вий час", що базується на визначенні часу зсідання плазми крові під дією активатора протромбіну з отрути ефі піщаної (*Echis carinatus*) екарину, який здатний активувати протромбін та інші його похідні форми [6]. Найбільш близьким за технічним рішенням до об'єкту, що заявляється, є метод визначення "екаринового відношення" та часу зсідання крові. Кількість інгібіторів тромбіну чи антикоагулянтів в плазмі крові визначають за часом зсідання плазми крові, користуючись калібрувальною кривою та спеціально розробленими комп'ютерними програмами [7, 8].

Недоліком даного тесту є те, що рівень протромбіну визначається також за часом зсідання плазми крові, тобто, як і "протромбіновий час", він є високочутливим до інгібіторів полімеризації фібрину та до гепарину і гірудину, які вводяться комбіновано з антикоагулянтами непрямої дії при профілактиці тромбозів [9, 10].

В основу винаходу поставлена розробка тест-системи та способу контролю ефективності лікування антикоагулянтами непрямої дії, максимально незалежного від дії екзогенних та ендогенних інгібіторів системи зсідання крові, що дозволить встановлювати безпосередній результат впливу дії антикоагулянтів непрямої дії: накопичення функціонально неактивних форм протромбіну.

Суть винаходу полягає у порівнянні результатів активації протромбіну плазми крові тромбoplastином та екамуліном (активатором протромбіну з отрути ефі багатолускової, *Echis multisquamatis*) з використанням хромогенного субстрату S2238, що дозволяє визначити вміст декарбоксильованого протромбіну плазми крові за рівнем екамуліново-протромбінового відношення:

1) При активації протромбіну плазми крові тромбoplastином амідолітична активність тромбіну відповідає рівню лише функціонально активного протромбіну плазми крові;

2) При активації протромбіну плазми крові екамуліном (активатором протромбіну з отрути ефі багато лускової) амідолітична активність тромбіну вказує на сумарний рівень функціонально активного та декарбоксильованого протромбіну в досліджуваній плазмі крові.

Рівень протромбіну, визначений з використанням екамуліну та тромбoplastину, виражають як протромбінове та екамулінове відношення, що розраховують за відношенням амідолітичної активності досліджуваної плазми крові до амідолітичної активності контрольної плазми крові у ступені, що характеризує чутливість активатора протромбіну. Екамуліново-протромбінове відношення визначають як відношення екамулінового та протромбінового відношень.

Переваги тест-системи контролю ефективності лікування антикоагулянтами непрямої дії:

- отримання інформації про рівень декарбоксильованого протромбіну в плазмі крові, поява якого є безпосереднім результатом впливу антикоагулянтів непрямої дії;

- використання екамуліну забезпечує високу точність і відтворюваність результатів тесту оскільки він безпосередньо активує протромбін та його функціонально неактивні форми;

- використання тромбін-специфічного хромогенного субстрату для визначення вмісту тромбіну, що утворюється за дії активаторів, нівелює вплив екзогенних та ендогенних інгібіторів системи гемостазу на результати тестів.

Приклад 1

Для перевірки доцільності використання екамуліну для виявлення функціонально неактивних форм протромбіну в плазмі крові створюють модельну систему *in vitro*: в плазму крові позбавлену протромбіну додають виділені та очищені препарати протромбіну або претромбіну 1, який моделює функціонально неактивну форму протромбіну в кінцевих концентраціях 6,4мкг/мл.

Для визначення амідолітичної активності тромбіну, що утворюється при дії активаторів, у планшетну лунку вносять 10мкл плазми крові, препарати: 20мкл екамуліну або тромбoplastину, 10мкл 0,025M $CaCl_2$, 185мкл 0,05M Трис- HCl бу-

феру, рН 7,4 з 0,13М NaCl та 25мкл 2мкМ тромбін-специфічного хромогенного субстрату S2238. Інкують суміш 5 хвилин за температури 37°C, після чого визначають амідолітичну активність утвореного тромбіну спектрофотометрично при довжині хвилі 405-492нм.

При дії екамуліну на донорську плазму крові з протромбіном та на плазму крові, де протромбін

замінений на претромбін 1 спостерігається однакова амідолітична активність. При дії препарату тромбопластину амідолітична активність спостерігається лише в донорській плазмі крові, що свідчить про нездатність тромбопластину активувати претромбін 1 (табл.1).

Таблиця 1

Активация протромбіну та претромбіну 1 екамуліном та тромбопластином в плазмі крові (M±m, n=11)

Модельна система	Амідолітична активність за дії екамуліну, %	Амідолітична активність за дії тромбопластину, %
Плазма крові з протромбіном	100±7	100±9
Плазма крові, де протромбін замінений на претромбін 1	81±5	6±0,5

Показано, що екамулін активує як протромбін так і його функціонально неактивну форму, а тромбопластин здатен активувати лише протромбін. Тому порівняння результатів активації протромбіну плазми крові екамуліном та тромбопластином дозволяє встановити присутність в плазмі крові функціонально неактивних форм протромбіну, до яких належить PIVKA-протромбін.

Приклад 2

В плазмі крові пацієнтів, яким проводилась терапія антикоагулянтами непрямої дії, визнача-

ють амідолітичну активність тромбіну, що утворюється за дії тромбопластину та екамуліну, як описано в прикладі 1. Результати представляють у вигляді протромбінового відношення та екамулінового відношення. Для виявлення PIVKA- протромбіну в плазмі крові визначають екамуліново-протромбінове відношення (ЕПВ - відношення між екамуліновим та протромбіновим відношенням). Про накопичення PIVKA- протромбіну плазмі крові свідчить ЕПВ більше 1,2 (табл.2).

Таблиця 2

Виявлення PIVKA-протромбіну в плазмі крові пацієнтів, яким проводилась терапія антикоагулянтами непрямої дії (M±SD)

Хворі	Протромбінове відношення (ПВ)	Екамулінове відношення (ЕВ)	ЕПВ
А	0,6	0,9	1,5
Б	0,12	0,9	7,5
В	0,5	1,0	2
Г	0,8	0,8	1

Приклад 3

Виявляють накопичення PIVKA-протромбіну, як описано в прикладі 2, до початку лікування антикоагулянтами непрямої дії, на піку лікування

та після зниження дози антикоагулянтів. Порівняльний аналіз показує, що вміст PIVKA-протромбіну змінюється впродовж лікування антикоагулянтами непрямої дії (табл.3).

Таблиця 3

Зміна вмісту PIVKA-протромбіну впродовж лікування антикоагулянтами непрямої дії

№ пацієнта	Екамуліново-протромбінове відношення *		
	До початку лікування	На піку лікування	Після зниження дози антикоагулянтів
1	-	2	1
2	-	11,4	1
3	-	7,5	1,3
4	1	1,6	-
5	1	1,7	-
6	1	1,4	-

*p <0,05

Визначення вмісту декарбоксільованого протромбіну за ЕПВ є ефективним на різних етапах лікування антикоагулянтами непрямої дії.

Приклад 4

Визначають рівень протромбіну за:

а) часом зсідання плазми крові, що визначають візуально після додавання до 100мкл досліджуваної плазми крові 200мкл препарату тромбопластину при температурі 37°C на водяній бані;

б) рівнем розщеплення тромбін-специфічного хромогенного субстрату, що визначають як описано в прикладі 1.

Виявляють інгібітори системи зсідання крові в плазмі крові хворих за допомогою інгібіторно-корекційної проби: суміш донорської плазми крові та досліджуваної плазми крові (у співвідношенні 1:1 загальним об'ємом 100мкл) прогривають впродовж 3 хвилин при температурі 37°C на водяній бані із 100мкл АЧТЧ - реагенту, після чого додають 100мкл 0,025M CaCl₂ та визначають час зсідання плазми крові візуально.

Таблиця 4

Вплив інгібіторів полімеризації фібрину на визначення рівню протромбіну в плазмі крові за часом зсідання плазми крові та за рівнем розщеплення тромбін-специфічного хромогенного субстрату (M±SD)

Інгібіторно-корекційна проба, %	Рівень протромбіну за часом зсідання, відносно норми, %	Рівень протромбіну за розщепленням хромогенного субстрату, відносно норми, %
121,30±6,48	51,00±9,60	173,00±18,00

Показано, що визначення рівню протромбіну з використанням тромбопластину за розщепленням хромогенного субстрату менш чутливе до інгібіторів системи зсідання крові в порівнянні з визначенням рівню протромбіну за часом зсідання плазми крові (Табл.4).

Використання хромогенного субстрату для визначення вмісту протромбіну в плазмі крові хворих нівелює вплив інгібіторів полімеризації фібрину, які впливають на результати визначення рівню протромбіну за часом зсідання плазми крові, що є принциповою відмінністю даної тест-системи від способу визначення загального рівню протромбіну та виявлення його функціонально неактивних форм, запропонованого раніше [11].

Приклад 5:

Досліджують вплив гепарину на діагностичні тести з використанням хромогенного субстрату, додаючи різні концентрації гепарину в донорську плазму крові та визначаючи амідолітичну активність тромбіну за дії тромбопластину та екамуліну як описано в прикладах 1 та 4.

Показано, що присутність гепаринів (нефракціонованого та низькомолекулярного) у терапевтичних концентраціях не впливає на об'єктивність результатів тестів. Натомість визначення вмісту протромбіну за часом зсідання плазми крові є недостатньо об'єктивним (час зсідання плазми крові в тесті протромбіновий час подовжується на 33% за концентрації гепарину 2000од/л плазми крові; час зсідання плазми крові в тесті екамуліновий час - на 50% за концентрації гепарину 2000од/л плазми крові).

Діагностичне визначення рівню протромбіну в плазмі крові за допомогою тромбін-специфічного хромогенного субстрату за умов гепаринотерапії (як нефракціонованим так і низькомолекулярним гепаринами) не залежить від присутності гепарину, на відміну від визначення рівню протромбіну за часом зсідання плазми крові [10].

Приклад 6:

Тест-система контролю ефективності лікування та профілактики тромбозів антикоагулянтами непрямої дії

Тест-система контролю ефективності лікування та профілактики тромбозів антикоагулянтами непрямої дії включає специфічні компоненти для активації протромбіну та його декарбоксільованої форми:

1) тромбопластин з атестованим Міжнародним Індексом Чутливості (МІЧ) ліофільно висушений (перед використанням розчиняється в дистильованій воді та витримується 30хв при температурі 37°C);

2) екамулін ліофільно висушений (перед використанням розчиняється в дистильованій воді та витримується 30хв при температурі 22°C);

3) хромогенний субстрат тромбіну S2238 ліофільно висушений («Ренам», Росія);

4) контрольна плазма крові («Ренам», Росія);

5) розчин 0,025M CaCl₂;

6) трис-НCl буфер, рН 7,4 з 0,13M NaCl.

Виявляють накопичення декарбоксільованих форм протромбіну в плазмі крові пацієнтів (результат лікування антикоагулянтами непрямої дії) в два етапи: на першому етапі визначають протромбінове відношення (ПВ), що характеризує рівень функціонально активного протромбіну та екамулінове відношення (ЕВ) - сумарний рівень функціонально активного та декарбоксільованого протромбіну за формулами:

$$ПВ = (A_d/A_k)^{МІЧ} \quad (1),$$

$$ЕВ = A_d/A_k \quad (2),$$

де: A_d - амідолітична активність досліджуваної плазми крові за дії тромбопластину (1) та екамуліну (2)

A_k - амідолітична активність контрольної плазми крові за дії тромбопластину (1) та екамуліну (2),

МІЧ - Міжнародний Індекс Чутливості препарату тромбопластину.

На другому етапі визначають відношення екамулінового та протромбінового відношення за формулою:

$$\text{ЕПВ} = \text{ЕВ} / \text{ПВ} \quad (3),$$

де: ЕПВ - екамуліново-протромбінове відношення;

ПВ - протромбінове відношення;

ЕВ - екамулінове відношення.

Для забезпечення нормального функціонування системи гемостазу людини при лікуванні антикоагулянтами непрямої дії протромбіново-екамулінове відношення плазми крові має становити від 1.60 до 3.00 (за умови, що $\text{ЕВ} = 1,00 \pm 0,10$).

Амідолітичну активність тромбіну, що утворюється при дії тромбoplastину, визначають таким чином: до кожної планшетної лунки вносять 10мкл плазми крові, препарати: 20мкл тромбoplastину, 10мкл 0,025М CaCl_2 , 25мкл 2мкМ тромбін-специфічного хромогенного субстрату S2238 та 185мкл 0,05М трис-НСІ буферу, рН 7,4 з 0,13М NaCl. Інкують суміш 5 хвилин за температури 37°C, після чого визначають амідолітичну активність утвореного тромбіну спектрофотометрично при довжині хвилі 405-492нм на спектрофотометрі для мікропланшетів.

Для визначення амідолітичної активності тромбіну, що утворюється при дії екамуліну, до кожної планшетної лунки вносять 10мкл плазми крові, препарати 20мкл екамуліну, 10мкл 0,025М CaCl_2 , 25мкл 2мкМ тромбін-специфічного хромогенного субстрату S2238 та 185мкл 0,05М Трис-НСІ буферу, рН 7,4 з 0,13М NaCl. Інкують суміш 5 хвилин за температури 37°C, після чого визначають амідолітичну активність утвореного тромбіну спектрофотометрично при довжині хвилі 405-492нм на спектрофотометрі для мікропланшетів.

Так, наприклад, в плазмі крові пацієнта, якого лікували антикоагулянтами непрямої дії за умови, коли:

а) амідолітична активність тромбіну донорської плазми крові за дії тромбoplastину становить 0,47, амідолітична активність тромбіну донорської плазми крові за дії екамуліну становить 0,35 і МІЧ тромбoplastину становить 1,06;

б) амідолітична активність тромбіну в досліджуваній плазмі крові за дії тромбoplastину становить 0,350, амідолітична активність тромбіну в досліджуваній плазмі крові за дії екамуліну становить 0,265,

то протромбінове відношення (ПВ), розраховане за формулою (1), складає $(0,26/0,47)^{1,06} = 0,55$, екамулінове відношення (ЕВ), розраховане за формулою (2), складає $0,35/0,35 = 1,00$, і, відповідно, екамуліново-протромбінове відношення

(ЕПВ) плазми крові, розраховане за формулою (3), становить $1,00/0,55 = 1,82$, що свідчить про ефективне лікування антикоагулянтами непрямої дії, яке не призведе до виникнення кровотеч, оскільки $1,60 < 1,82 < 3,00$.

Таким чином, використання тест-системи та способу, що заявляється, має такі переваги:

- безпосереднє виявлення впливу антикоагулянтів непрямої дії;
- забезпечення високої точності та відтворюваності результатів тесту;
- нечутливість тест-системи до впливу екзогенних та ендогенних інгібіторів системи гемостазу;
- швидке виконання аналізу (не більше 10хв);
- кількість аналізів з використанням 1 тест-системи - 40;
- доступна вартість аналізу;
- відсутність вітчизняних та закордонних аналогів.

Джерела інформації

1. Ageno W., Turpie A.G.G. A randomized comparison of a computer-based dosing program with a manual system to monitor oral anticoagulant therapy //Thrombosis research, 1998. – Vol.91, N 5. - pp.237-240.
2. Вавилова Т.В. Антитромботическая терапия и методы ее лабораторного контроля (лекция) //Клиническая лабораторная диагностика, 2004. - 12 -С.21-33.
3. RU, 2222019, 20.01.2004.
4. US, 2006149483, 06.07.2006.
5. Момот А.П. Принципи, методи і засоби лабораторної діагностики патології системи гемостазу на сучасному етапі //Лабораторна діагностика, 2004. -N2. – С.0 52-70.
6. Marsh N.A. Diagnostic Uses of Snake Venom //Haemostasis 2001. -31. - P.211-217.
7. US, 6,489,289, 12.03.2002.
8. US, 5,935.802, 08.1.1999.
9. Lange U., Nowak G., Bucha E. Ecarin Chromogenic Assay - A New Method for Quantitative Determination of Direct Thrombin Inhibitors Like Hirudin //Pathology of haemostasis and thrombosis, 2003. – Vol.4 (33). - pp.184-191.
10. Корольова Д.С., Чернишенко В.О., Платонова Т.М. Вплив гепарину на показники тестів протромбінового та екамулінового часу //Лабораторна діагностика, 2006 -Т.38, N4. -С.22-26.
11. Платонова Т.Н., Сушко А.Е., Петров А.В., Соловьев Д.А. Определение общего уровня протромбина и выявление его функционально неактивных форм с помощью фермента экамулин, выделенного из яда эфы многощешуйчатой //Укр. биохим. журнал, 1995 – Т.67, N 4. - С.75-79.