

УДК: 577.112.4:547.962.4

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ФІБРИНОГЕНУ В ПЛАЗМІ КРОВІ ТУРБІДИМЕТРИЧНИМ МЕТОДОМ З ВИКОРИСТАННЯМ АНЦИСТРОНУ

¹Кондратюк А.С., ²Гриненко Т.В.

¹Київський національний університет імені Тараса Шевченка
e-mail: biochimik@ukr.net

²Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна
e-mail: grinenko@biochem.kiev.ua

Поступила в редакцію 25.03.2010

Запропоновано швидкий, простий у виконанні, точний, кількісний спосіб визначення фібриногену в плазмі крові, що полягає у реєстрації зміни оптичної густини розчину при утворенні полімерного фібрину з фібриногену плазми під дією анцистрону-Н. Даний спосіб придатний для використання у вітчизняній клінічно-лабораторній практиці і може бути застосований за умов проведення гепаринотерапії.

Ключові слова: *фібриноген, анцистрон, гепарин, оптична густина.*

ВСТУП

Фібриноген – розчинний білок плазми крові, з якого під дією тромбіну утворюється полімерний фібрин. Концентрація фібриногену в плазмі крові становить 2-4 г в літрі. За різних патологій вона може коливатись в широких межах – від 0 до 10 г/л. Підвищення концентрації фібриногену є одним з основних факторів ризику виникнення серцево-судинних захворювань і призводить до розвитку тромботичних ускладнень та інфаркту міокарда у хворих на синдром внутрішньосудинного зсідання, стенокардію та інші хронічні захворювання серцево-судинної системи [1,2]. Доведено, що розмір зони некрозу при інфаркті міокарда пропорційний концентрації фібриногену в плазмі крові. Окрім того, рівень фібриногену є показником не лише порушень гемостазу та хвороб серцево-судинної системи, але й говорить про ступінь тяжкості запальних, імунних, деструктивних та неопластичних процесів [3-4].

Визначення рівня фібриногену в плазмі крові належить до найпоширеніших тестів в клінічній практиці [5]. Більшість запропонованих на сьогоднішній день методів кількісного визначення фібриногену засновано на реєстрації утворення полімерного фібрину з фібриногену під дією тромбіну [5-7]. Кількість фібрину визначають візуально за часом утворення згустку, ваговим способом або за концентрацією білка після розчинення фібрину. За умов гепаринотерапії застосування таких тестів є некоректним, оскільки відбувається інгібування дії тромбіну комплексом гепарин-антитромбін [6, 8]. Окрім антитромбіну III на активність тромбіну в плазмі крові впливають інші інгібітори білкової природи, концентрація яких значно збільшується за різних патологічних станів [8].

Замість тромбіну для утворення полімерного фібрину з фібриногену гепаринізованої плазми крові, можна використовувати тромбіноподібні ферменти, отримані з отрути змії. Такі ферменти не інгібуються антитромбіном III, не активують фактор XIII зсідання крові та не викликають ретракцію згустків [6, 8, 9]. В лабораторно-клінічній практиці широкого використання набув тромбіноподібний фермент з отрути щитомордника звичайного (*Agkistrodon halys halys*) – анцистрон-Н, комерційні препарати якого випускають під назвою „Анцистрон”. На основі використання анцистрону-Н запропоновано ряд тестів для визначення рівня фібриногену, що базуються на фіксації часу утворення згустку (анцистроновий час) [6].

Полімеризація фібрину супроводжується зміною оптичної густини розчину, що дозволяє застосовувати турбідиметрію як швидкий та чутливий метод для визначення концентрації фібриногену в плазмі крові після додавання до неї тромбіну або тромбіноподібних ферментів [10].

Метою роботи була адаптація турбідиметричного методу аналізу для кількісного визначення фібриногену з застосуванням анцистрону-Н.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Фібриноген одержували з оксалатної плазми крові донорів у присутності соєвого інгібітора трипсину шляхом висолювання сульфатом натрію [11]. Вміст фібриногену, що зсідается під дією тромбіну, становив 95-98%.

Плазму одержували із крові донорів. Кров брали з ліктьової вени натще у пластикову пробірку з 3,8 %-м розчином лимоннокислого натрію у співвідношенні 9:1.

Попереднє визначення концентрації фібриногену в плазмі крові проводили за методом Т.В. Варецької [12].

Реакцію полімеризації фібриногену проводили в термостатованій кюветі спектрофотометру при 37° С. В кювету вносили фібриноген в кількості від 50 до 500 мкг або 100 мкл досліджуваної плазми, 0,02 М вероналовий буфер, що містив 0,13 М хлориду натрію та 0,001 М хлориду кальцію, рН 7,4. Полімеризацію ініціювали додаванням тромбіну (1,5 од. NIH) чи анцистрону (1 од.). Загальний об'єм реакційної суміші становив 1,0 мл. Динаміку утворення фібринових згустків досліджували, вимірюючи зміну оптичної густини розчину при довжині хвилі 350 нм на спектрофотометрі СФ-2000 (ОКБ «Спектр») з програмним забезпеченням, що дозволяє графічно реєструвати зміну оптичної густини. Фіксували максимальне значення оптичної густини інкубаційного середовища через 3 хв. після додавання тромбіну чи анцистрону.

Використовували тромбін фірми Merck (Німеччина). Анцистрон був одержаний з отрути щитомордника звичайного співробітниками відділу структури та функції білка Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України за методом [13].

Чистоту препаратів фібриногену перевіряли методом електрофорезу в поліакриламідному гелі з DS-Na, вони були електрофоретично гомогенними.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Оптична густина полімерного фібрину, утвореного з розчину фібриногену після додавання до нього 1,5 од. NIH тромбіну, прямо пропорційна концентрації фібриногену в досліджуваних межах 0,05-0,5 мг в 1 мл інкубаційного середовища, що дозволяє визначати рівень цього білка з використанням методу турбідиметрії (рис. 1).

Динаміка утворення фібринового згустку при додаванні до 0,1 мл донорської плазми 1,5 од. NIH тромбіну представлена на рис. 2. Короткий лаг-період відповідає процесу формування протофібрил, лінійний відрізок кривої – латеральній асоціації протофібрил з утворенням фібрил. За 1-2 хв. оптична густина розчину досягає максимуму, що відповідає утворенню фібринового згустку.

Як видно з даних, представлених на рис.2, високомолекулярний гепарин впливає на всі стадії формування фібринового згустку: в кількості 0,01 – 0,02 од. гепарину в інкубаційному середовищі спостерігається збільшення лаг-періоду, зменшення кута нахилу кривої полімеризації та максимального значення оптичної густини розчину. За присутності 0,05 од. гепарину полімеризація фібриногену тромбіном не відбувається. Низькомолекулярний гепарин (кліварин) інгібує процес полімеризації фібриногену плазми подібним чином, але в кількості, що на порядок перевищує таку нефракціонованого гепарину.

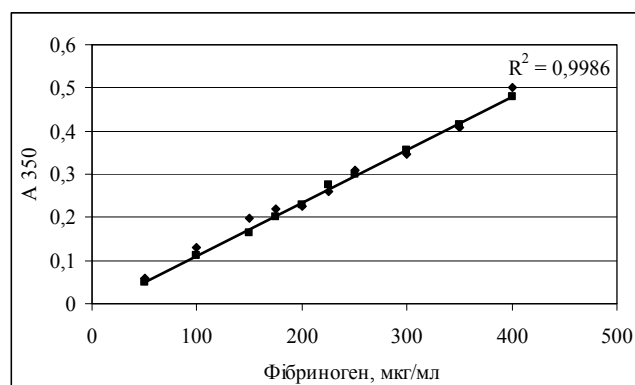


Рис. 1. Залежність оптичної густини полімерного фібрину, утвореного з фібриногену тромбіном, від концентрації фібриногену в інкубаційному середовищі.

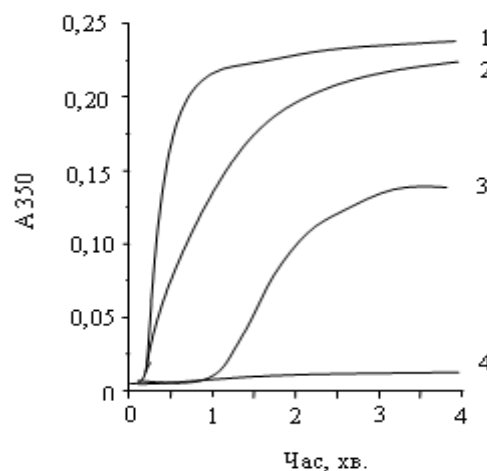


Рис. 2. Вплив нефракціонованого гепарину на полімеризацію фібриногену плазми під дією 1,5 од. NIH тромбіну: 1 – без гепарину; 2-4 в присутності 0,01, 0,02 та 0,05 од. гепарину, відповідно.

Препарати гепарину широко використовуються в клінічній практиці як антикоагулянти прямої дії. Ефект гепарину ґрунтується на підсиленні дії основного інгібітора тромбіну плазми крові антитромбіну III [14-15]. При взаємодії з гепарином молекула інгібітора зазнає конформаційних змін, в результаті чого інгібіторні властивості антитромбіну III по відношенню до тромбіну зростають у 1000-5000 разів [16].

Одним з тромбіноподібних ферментів є анцистрон-Н, одноланцюговий глікопротеїн, молекулярна маса якого складає 34 кДа. Під дією анцистрону з NH₂-кінця кожного з А α -ланцюгів фібриногену відщеплюються фібринопептиди-А, ідентичні тим, що утворюються під дією тромбіну. Після відщеплення фібринопептидів-А в центральній частині молекули фібриногену відкриваються сайти полімеризації E_D, що ініціює процес формування фібрину. На відміну від тромбіну, анцистрон залишає В β -ланцюги інтактними, таким чином, в результаті його дії на фібриноген утворюється desAA-фібрин [13, 17]. Анцистрон не активує протеїн С, фактори IX, X, прекалікреїн та плазміноген. Виявляє амідазну активність по відношенню до таких пептидних субстратів як Chromozym TH (Tos-Gly-Pro-Arg-pNA),

S2160 (Bz-Phe-Val-Arg-pNA), S2266 (Ile-Glu-Gly-Arg-pNA), BApNA (Bz-Arg-pNA). Анцистрон-Н не інгібується антитромбіном III, не активує фактор XIII зсідання крові та не викликає ретракцію згустків [13].

Використовуючи анцистрон для активації фібриногену, попередньо одержаного з донорської плазми, ми показали, що швидкість утворення фібринового згустку та максимальне значення оптичної густини розчину залежать від кількості анцистрону (рис 3). При внесенні в інкубаційне середовище 1 од. тромбінової активності анцистрону, на відміну від тромбіну, дещо збільшується лаг-період і максимальне значення A350 досягається за 3 хв.

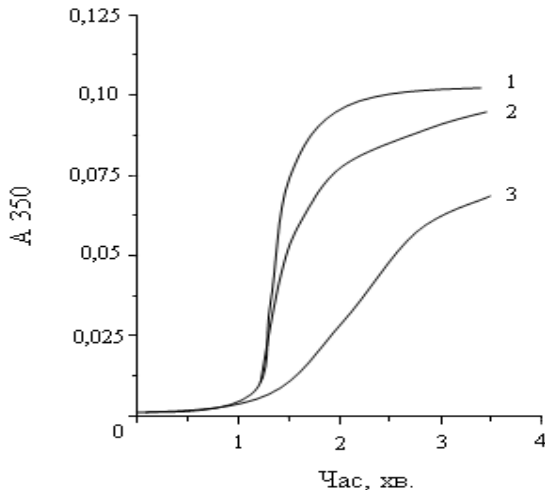


Рис. 3. Утворення згустку з фібриногену людини під дією анцистрону: 1, 2, 3 – 1, 0,7 та 0,5 од. відповідно.

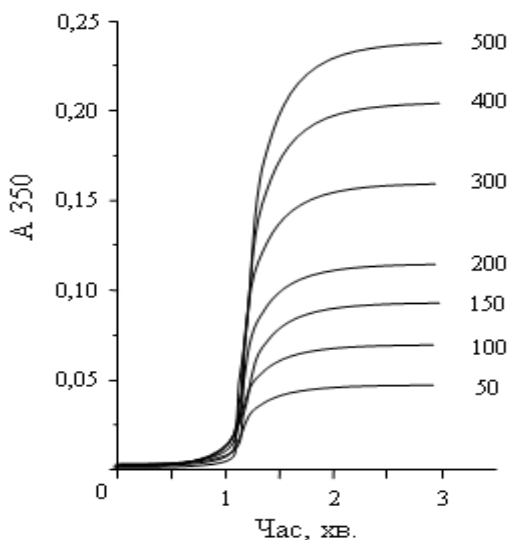


Рис. 4. Зміна оптичної густини інкубаційного середовища за різної концентрації фібриногену (поряд з кривими наведено відповідну кількість фібриногену, мкг).

Як і при використанні тромбіну, максимальне значення A350 прямо пропорційно залежить від кількості фібриногену при додаванні в інкубаційне середовище 1 од. анцистрону (рис 4). Проте згусток утворюється не такий щільний і величина світлорозсіювання desAA-фібрину майже вдвічі

нижча за таку desAABB-фібрину, який утворюється під дією тромбіну.

Для того щоб перевірити чи буде впливати гепарин на утворення фібрину і, відповідно, на визначення фібриногену в плазмі крові з використанням анцистрону, в інкубаційне середовище вносили низькомолекулярний або нефракціонований гепарин в кількості 0,01-1,0 од. та 0,01-5 од. відповідно. При всіх використаних концентраціях гепаринів не спостерігали їх впливу на процес полімеризації фібриногену, що міститься в 0,1 мл плазми, ініційований анцистроном.

Наведені дані доводять можливість використання анцистрону для визначення рівня фібриногену в плазмі крові з застосуванням турбідиметричного методу аналізу.

При побудові калібрувальної кривої для визначення рівня фібриногену, використовували плазму донорів з відомим вмістом фібриногену, який попередньо визначили як описано [12]. В термостатовану кювету вносили 32-320 мкл плазми, що містить від 50 до 500 мкг фібриногену відповідно; 0,02 М вероналовий буфер з 0,13 М хлоридом натрію та 0,001 М хлоридом кальцію, рН 7,4. Полімеризацію фібрину ініціювали додаванням 1 од. анцистрону. Об'єм інкубаційного середовища – 1 мл. Через 3 хв реєстрували значення максимальної оптичної густини (A350). Будували криву залежності значення A350 від концентрації фібриногену в інкубаційному середовищі (рис. 5).

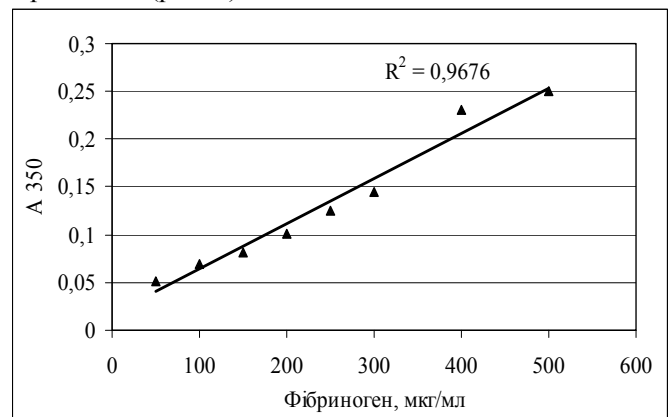


Рис. 5. Калібрувальна крива для визначення рівня фібриногену в плазмі крові з використанням анцистрону турбідиметричним методом.

Для визначення рівня фібриногену в плазмі крові в інкубаційне середовище вносили 100 мкл досліджуваної плазми, буферний розчин та анцистрон, як при побудові калібрувальної кривої. Фіксували значення A350 через 3 хв. За калібрувальною кривою (рис. 5) визначали кількість фібриногену в інкубаційному середовищі. За формулою, що наведена нижче, розраховували вміст фібриногену в 1 мл плазми крові:

$$\text{Фг (мкг/мл)} = (A \cdot 1,1) / 0,1$$

де А – кількість фібриногену (мкг), визначена за калібрувальною кривою; 1,1 – розведення плазми

крові цитратом натрію; 0,1 – кількість плазми крові, що вноситься в інкубаційне середовище (мл).

Показники вмісту фібриногену в плазмі крові донорів (n=10), визначені за допомогою турбідиметричного методу з застосуванням анцистрону та тромбіну, мають близькі значення. Коефіцієнт кореляції (R^2) складає 0,989.

ВИСНОВКИ

Запропоновано швидкий, чутливий, точний, кількісний спосіб визначення фібриногену в плазмі крові, простий у виконанні, придатний для використання у вітчизняній клінічно-лабораторній практиці. Запропонований спосіб полягає у реєстрації зміни оптичної густини розчину при утворенні полімерного фібрину з фібриногену плазми під дією анцистрону. Даний спосіб є ефективним за умов проведення гепаринотерапії.

Література

1. Lowe GD, Rumley A, Mackie JJ. Plasma fibrinogen. // Ann Clin Biochem. – 2004. – Vol. 41, N 6. – P. 430-40.
2. Drouot L, Bal Dit Sollier C. Fibrinogen: factor and marker of cardiovascular risk // J.Mal.Vasc.. – 2002. – Vol. 27, N 3. – P.143-56.
3. Kosmas I, Paraskevas, Daryll M. Baker, George E. Vrentzos, Dimitri P. Mikhailidis. The role of fibrinogen and fibrinolysis in peripheral arterial disease // Thrombosis Research. – 2008. – Vol. 122. – P. 1-12.
4. Kaplan RC, Frishman WH. Systemic inflammation as a cardiovascular disease risk factor and as a potential target for drug therapy // Heart Dis.– 2001. – Vol 3, N 5. – P. 326-32.
5. Долгов В.В., Свирин П.В. Лабораторная диагностика нарушенный гемостаза. – М.-Тверь: ООО «Издательство «Триада», 2005. – 227 с.
6. Баркаган З.С., Момот А.П. Диагностика и контролируемая терапия нарушенный гемостаза. – М.: Ньюдиамед, 2001. – 285 с.

7. Назаренко Г.И., Кишкун А.А. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований. – М.: Медицина, 2006. – 544 с.
8. Платонова Т.М., Сушко О.О., Соловйов Д.О., Єна Я.М. Визначення вмісту фібриногену в плазмі крові людини за допомогою тромбіноподібного ферменту анцистрону-Н та аналіз стану гемостазу при наявності інгібіторів зсідання крові // Фізіол.журн. – 1993. – Т.39., №1. – С.15-19.
9. Якунин Г.А., Смоляницкий А.Я., Юкельсон Л.Я., Барабанщикова Н.А., Садыков Э.С., Золотухин С.В. Использование отечественных заменителей батроксобина при определении фибриногена // Лаб.дело. – 1989. – №12. – С. 36-38.
10. Щербак И.Г., Субботина Т.Ф., Фаенкова В.П., Рюмина Е.В. Турбидиметрический анализ полимеризации фибрина в плазме крови // Вопросы медицинской химии. – 2001. – Т. 47, №1. – С. 80-90.
11. Варецька Т.В., Лосева А., Яценко В. // Укр. Біохім.журн. – 1961. – №33. – С. 657-666.
12. Варецька Т.В. Мікрогетерогенність фібриногену. Кріофібриноген // Укр. біохім журн. – 1960. – Т. 32, № 1. – С.13–24.
13. Соловьев Д.А., Угарова Т.П. Выделение и характеристика α -специфичных тромбиноподобных ферментов из ядов щитомордника обыкновенного (*Agkistrodon halys halys*) и щитомордника восточного (среднеазиатский подвид *Agkistrodon halys Blomhoffii*) // Биохимия. – 1993. – Т.58, Вып. 8. – С. 1221-33.
14. Вавилова Т.В. Антитромботическая терапия и методы ее лабораторного контроля // Клинич. лаб. Диагностика. – 2004. – N.12. – С. 21-33.
15. Борщевская Г.И., Борщевская М.И. К вопросу применения низкомолекулярных гепаринов // Укр. біофарм. журн. – 2009. – Т.1, №3. – С. 48-57.
16. Зубаишров М.Д. Молекулярные основы свёртывания крови и тромбообразования. – Казань: ФОН, 2000. – 321 с.
24. Горницкая О.В., Платонова Т.Н., Волков Г.Л. Ферменты змеиных ядов // Укр. Біохім. Журн. – 2003. – Т.53, №3. – С. 22-34.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФИБРИНОГЕНА В ПЛАЗМЕ КРОВИ ТУРБИДИМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АНЦИСТРОНА

Кондратиук А.С., Гриненко Т.В.

Предложен быстрый, простой в исполнении, точный количественный способ определения фибриногена в плазме крови, который заключается в регистрации изменения оптической плотности раствора при образовании полимерного фибрина из фибриногена плазмы под действием анцистрона-Н. Данный способ доступен для отечественной лабораторно-клинической практики и может быть использован в условиях гепаринотерапии.

Ключові слова: фибриноген, анцистрон, гепарин, оптическая плотность.

QUANTIFICATION OF FIBRINOGEN IN BLOOD PLASMA BY TURBIDIMETRIC METHOD WITH THE USAGE OF ANCYSTRON

Kondratiuk A.S., Grynenko T.V.

A rapid, simple while sharp method of the quantification of fibrinogen in the blood plasma including registration of the exchanges of transmission density of solution during formation of polymeric fibrin from fibrinogen of the blood plasma under influence of ancystron-H is proposed. This method is available for the home laboratory clinical practice and can be applied in condition of heparin therapy.

Key words: fibrinogen, ancystron, heparin, optical density.