

Мониторинг системы свертывания крови

6

Молекулы, ассоциированные с клеточным звеном гемостаза	57
Молекулы плазменного звена гемостаза	60
Антикоагулянтная система	62
Плазминовая система	63

NEW

Существует ряд патологических состояний, при которых показатели стандартных коагуляционных тестов остаются в норме, тем не менее, сохраняется высокий риск тромботических осложнений. Как правило, такой риск связан с белками межклеточной адгезии и регуляторами свертываемости (система антикоагулянтов и плазминовая система). Уровень этих белков можно определить методом ИФА. Technoclone является одним из лидеров в разработке ИФА тест-систем для оценки тромботического риска. Важная особенность этих наборов – определение не только концентрации, но и функциональной активности белков.

Молекулы, ассоциированные с клеточным звеном гемостаза

Тромбоцитарный фактор 4 (PF4)

PF4 высвобождается в плазму из α-гранул тромбоцитов при их активации. PF4 характеризуется антигепариновой активностью, формируя с ним стехиометрический комплекс. Повышенный уровень PF4 наблюдается в различных ситуациях при сильной активации тромбоцитов, например, при воспалении инфекционной природы, ДВС-синдроме, первичной полицитемии, цереброваскулярных нарушениях, диабете, заболеваниях почек, онкологических заболеваниях и при экстракорпоральной циркуляции крови. Сниженный уровень PF4 ассоциирован с синдромом серых тромбоцитов.

Количество и активность фактора Виллебранда (vWF)

vWF – сложный мультимерный адгезивный гликопротеин, синтезируемый эндотелиальными клетками и мегакариоцитами, циркулирующий в плазме крови со средним периодом полураспада около 18 ч, его концентрация в норме составляет примерно 10 мкг/мл. Образование vWF в сосудах разных областей существенно различается. В легких, сердце, скелетных мышцах выявлен высокий уровень м-РНК vWF, а

в почках и печени – низкий. Особая роль vWF в гемостазе определяется его структурой, представляющей собой серию различных по размеру (от 0,5 до 20 млн. Да) мультимеров, состоящих из многократно повторяющихся субъединиц, в которых имеются домены связывания с гликопротеиновыми рецепторами тромбоцитов (GPIb и IIb/IIIa), коллагеном, гепарином, VIII фактором свертывания крови. vWF является носителем-стабилизатором для прокоагулянтного протеина FVIII:C, циркулируя в сыворотке в виде нековалентно связанного комплекса. vWF может взаимодействовать с коллагеном и, возможно, другими эндотелиальными структурами, опосредует адгезию тромбоцитов к субэндотелию через связывание поверхностного рецептора тромбоцитов гликопротеина Ib. Он также может участвовать в тромбоцит-тромбоцитарном взаимодействии через связывание гликопротеина IIb/IIIa. Особо следует отметить значение гемодинамических факторов для адгезии тромбоцитов с участием vWF. Опосредованная vWF адгезия тромбоцитов, происходит наиболее интенсивно при высоких скоростях сдвига, т.е. в артериях. Повышенные уровни vWF и его активности являются индикатором повреждения эндотелия при сосудистых заболеваниях.

При многих патологиях, сопровождающихся острым и хроническим повреждением эндотелия (сахарный диабет, атеросклероз, опухоли различной локализации, гестоз и т.д.), уровень vWF в кро-

ви значительно повышается. Тем не менее, краткое повышение vWF после физической нагрузки, введения адреналина или вазопрессина, а также во время беременности может быть скорее показателем активации или стимуляции эндотелиальных клеток, чем повреждения. Снижение концентрации vWF обнаружено при гипотиреозидизме и системной красной волчанке. Приобретенные формы заболевания описаны при аутоиммунных нарушениях, болезни Вальденстрема, доброкачественных моноклональных гаммапатиях, карциноме надпочечников и ревматоидных васкулитах. Болезнь Виллебранда – врожденный геморрагический диатез, впервые описанный фон Виллебрандом в 1926 г., в легкой форме является самым частым геморрагическим нарушением у мужчин, с частотой 1:100. Это заболевание гетерогенной природы, вызываемое либо дефектами структуры белка, либо снижением концентрации vWF. Классификация заболевания основана на клинической картине, анамнезе и результатах лабораторного анализа, включая время свертывания и определение концентрации и активности vWF. Определение уровня и активности vWF помогает в дифференциальном диагнозе двух основных типов заболевания: типа 1 и 2. Определение типа болезни принципиально, так как от этого зависит выбор тактики ведения больного.

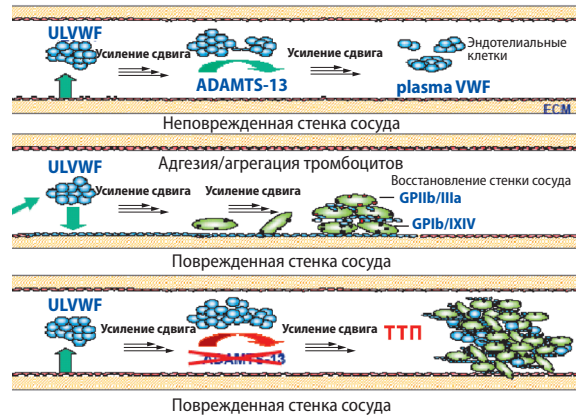
Два варианта иммуноферментных тест-систем производства компании TECHNOCLONE позволяют идентифицировать низкое содержание и низкую функциональную активность vWF в плазме (по способности связываться с сорбированным коллагеном).

ADAMTS-13 и его ингибитор

ADAMTS-13 – металлопротеиназа, принадлежащая к семейству пептидазных белков «ADAM» (A Disintegrin And Metalloproteinase). Биологическая роль протеиназ этого семейства – расщепление экстрацеллюлярного домена трансмембранных белков. ADAMTS-13 по своим функциям не является исключением, она отщепляет фрагменты от мультимерной молекулы vWF. Мультимер vWF синтезируется эндотелиальными клетками и высвобождается N-концом во внеклеточное пространство, оставаясь C-концом связанным с мембраной эндотелиальной клетки. Отщепленные фрагменты мультимера vWF тоже обладают адгезивными свойствами, причем активность vWF тем выше, чем больше мономеров включено в его состав. ADAMTS-13 способна отщеп-

лять фрагменты vWF как от трансмембранной, так и от плазменной формы мультимера.

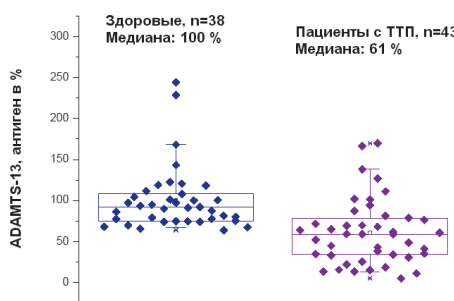
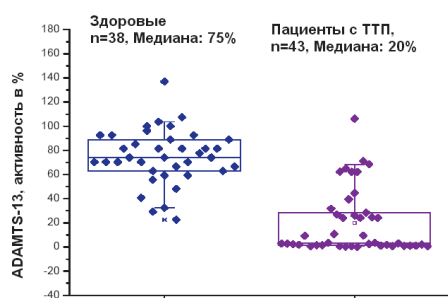
ADAMTS-13 регулирует адгезивные свойства фактора Виллебранда



Таким образом, ADAMTS-13 необходима, во-первых: для высвобождения vWF в плазму, а во-вторых: для регулирования чрезмерной его активности. Недостаток активности ADAMTS-13 приводит к тяжелой аутоиммунной патологии – тромбоцитопенической пурпуре (ТТП). В этом случае мультимеры vWF остаются заякоренными на мембране эндотелиальной клетки, а концентрация в vWF в плазме остается низкой. В свою очередь тромбоциты адгезируются на этих «заякоренных» мультимерах vWF, и в результате в неповрежденном сосуде развивается локальный тромб. Недостаток активности протеиназы может быть обусловлен либо мутацией в активном центре, либо наличием аутоантител. Эти антитела называют ингибитором ADAMTS-13. ТТП – довольно редкий синдром (ежегодно в мире появляется 4-6 больных на 1'000'000 человек). Однако без соответствующей диагностики и лечения смертность при ТТП составляет порядка 95%.

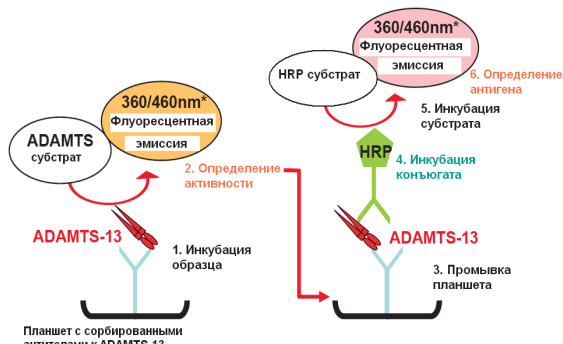
Диагностика ТТП оставалась весьма проблематичной, поскольку только по концентрации ADAMTS-13 сложно поставить диагноз. Так концентрации ADAMTS-13 в группе здоровых (350-730 нг/мл) и в группе пациентов с ТТП (120-360 нг/мл) характеризуются небольшим различием статистически достоверных результатов. Значительно повышает достоверность диагностики определение функциональной активности ADAMTS-13 иммунофлуоресцентным методом.

В образцах с низкой активностью ADAMTS-13 имеет смысл определить антитела к этой протеиназе, чтобы выявить причину данной патологии (врожденная или приобретенная форма). Количественное определение специфических антител к ADAMTS-13 проводится с помощью ИФА-наборов компании Technoclone.



Определение функциональной активности ADAMTS-13 иммунофлуоресцентным методом

Принцип анализа TECHNOZYM® ADAMTS-13 ELISA



Комплекс ADAMTS-13–Фактор XI

ADAMTS-13 образует стабильный комплекс с фактором XI и его активной формой – фактором XIa. Таким образом, часть ADAMTS-13 циркулирует в плазме в виде комплекса и в таком виде не проявляет ферментативной активности. Определение комплекса ADAMTS-13/Фактор XI позволяет выяснить этиологию дефицита ADAMTS-13 (сниженная экспрессия или переход свободной формы в связанную).

Тромбопоэтин (MGDF)

Тромбопоэтин, также известный как фактор роста мегакариоцитов (MGDF), Mpl-лиганд или колониестимулирующий фактор мегакариоцитов (МК-CSF) – гликозилированный полипептид с м.м. 60-70 кДа, синтезируемый гепатоцитами и стромальными клетками костного мозга. Тромбопоэтин вызывает повышение количества мегакариоцитов, улучшает их жизнеспособность, ускоряет клеточный цикл. Уровень циркулирующего тромбопоэтина определяют при различных патологических состояниях: при идиопатических формах тромбоцитопенической пурпуры и тромбоцитопении, при циррозе печени и некоторых видах тромбоцитопении. Хотя тромбопоэтин стимулирует пролиферацию мегакариоцитов (предшественников тромбоцитов), однако прямой корреляции между его уровнем и числом тромбоцитов не наблюдается.

Фибронектин (ФН)

ФН – это гликопротеин с высокой м.м., состоящий из двух практически идентичных полипептидных цепей (каждая по 220 кДа). Он синтезируется и секретируется печенью, нормальная концентрация циркулирующего ФН в кровотоке составляет примерно 330 мкг/мл плазмы. ФН принадлежит к семейству адгезивных белков внеклеточного матрикса. Димерная структура позволяет ему функционировать как молекулярный клей, соединяющий различные молекулы вместе благодаря его связывающим доменам. Плазменный ФН выполняет важную роль в воспалительных, регенеративных процессах и механизмах гемостаза. Снижение уровня ФН в плазме наблюдается при гепатите, сепсисе, физических травмах, в постоперационный период. ФН является белком острой фазы и его уровень может быть повышен во время острой фазы и осложненной беременности. С высоким уровнем ФН также связано развитие злокачественных опухолей и их метастазирование.

Витронектин (ВН)

ВН – полифункциональный гликопротеин (м.м. 78 кДа), компонент крови и внеклеточного матрикса, выполняет функции аналогичные ФН. ВН синтезируется в печени, нормальная концентрация в плазме составляет 250-450 мкг/мл. ВН взаимодействует с комплементом, гепарином, комплексом тромбин-антитромбин III, что указывает на его возможное участие в иммунном ответе и регуляции свертывания крови.

Одна из важнейших функций ВН в регуляции гемостаза – стабилизация ингибирующей конформации PAI-1 (ингибитора активации плазминогена 1). В отсутствие ВН PAI-1 остается в латентной форме и не ингибирует активацию плазминогена. Таким образом, он является кофактором серпинового ингибитора – PAI-1. ВН взаимодействует с гликозаминогликанами, коллагеном, плазминогеном, стабилизирует ингибирующую конформацию PAI-1. 50% снижение уровня ВН наблюдается при ДВС-синдроме и циррозе печени. Отложение ВН на стенках сосудов ассоциировано с атеросклеротическими заболеваниями.

Тромбоспондин-1 (TSP-1)

TSP-1 – гликопротеид с м.м. 165 кДа, наряду с TSP-2, -3, -4 и -5 составляющий одноименное семейство белков. По строению – это мультимер, состоящий из трех идентичных субъединиц, связанных дисульфидными связями. Наибольшее количество TSP-1 представлено в альфа-гранулах тромбоцитов и секретируется в плазму в ответ на их активацию гормонами и цитокинами.

Впервые TSP-1 был выделен из тромбоцитов, стимулированных тромбином, поэтому был назван «тромбин-чувствительный протеин». В настоящее время известно множество биологических функций TSP-1: ангиогенез, апоптоз, активация TGF- β , регуляция иммунного ответа. Биологическая мультифункциональность TSP-1 согласуется с наличием множества рецепторов, взаимодействующих с TSP-1, самые важные из которых: CD36, CD47 и различные интегринины. Так, взаимодействие TSP-1 с CD36, экспрессированном на эндотелиальных клетках, ингибирует их пролиферацию и миграцию, т.е. блокирует процесс ангиогенеза и косвенным образом усиливает апоптоз эндотелиальных клеток. TSP-1 образует комплексы с коллагеном, гепарином, является сильным агрегирующим фактором, опосредуя адгезию тромбоцитов к субэндотелию.

Тромбоспондин-2 (TSP-2)

TSP-2 (THBS-2) – белок семейства тромбоспондинов с м.м. 150 кДа. Аналогично TSP-1 он вызывает множество биологических реакций: пролиферацию, агрегацию, клеточную подвижность, ангиогенез, заживление ран. TSP-2 регулирует формирование коллагенового матрикса, воздействуя на функцию фибробластов. Также TSP-2 обеспечивает взаимодействие клеток экстрацеллюлярным матриксом, что можно отнести к его основной функции. Гепарин-связывающий домен молекулы обеспечивает взаимодействие TSP-2 с различными интегрининами, экспрессированными на поверхности эндотелиальных клеток. TSP-2 может блокировать опухолевый ангиогенез и вызывать апоптоз эндотелиальных клеток сосудов.

Молекулы плазменного звена гемостаза

Тканевой фактор (TF)

TF (тромбопластин или фактор III) представляет собой мембраносвязанный гликопротеин, функционирующий как рецептор и кофактор фактора VII (зимогенной и активной форме), инициирующий активацию внешнего пути системы свертывания. В норме TF либо отсутствует на поверхности сосудистого эндо-

телия, либо представлен конформацией, не реагирующей с фактором VII. При повреждении сосудистого эндотелия происходит взаимодействие фактора VII с TF, и образовавшийся комплекс TF/fVIIa активирует через реакции ограниченного протеолиза факторы IX и X. Запуск каскада системы свертывания в итоге приводит к генерации тромбина и образованию фибриновых сгустков. Уровень TF повышается при стимуляции клеток эндотелия, моноцитов и макрофагов эндотоксинами, цитокинами и лектинами, вследствие чего растет и прокоагулянтная активность. Таким образом, высокая концентрация TF ассоциирована с риском тромботического риска, в частности, с развитием ДВС-синдрома.

Ингибитор пути тканевого фактора (TFPI)

TFPI – главный ингибитор, блокирующий гиперактивацию системы гемостаза при повышенных концентрациях TF. TFPI циркулирует в плазме в виде комплекса с липопротеинами низкой и высокой плотности. Около 10% TFPI находится в тромбоцитах, при активации этих клеток тромбином TFPI высвобождается в плазму. Поэтому при агрегации тромбоцитов уровень TFPI повышается. TFPI является ингибитором протеиназы типа Кунитца, причем обладает двумя характерными доменами. Один Кунитц-домен связывает комплекс TF/fVIIa, другой – фактор Ха. Таким образом, TFPI ингибирует одновременно комплекс TF/fVIIa и фактор Ха. Кроме того, благодаря свойствам С-концевого фрагмента, TFPI с высокой степенью аффинности взаимодействует с гепарином, что позволяет дополнительно эффективно ингибировать фактор Ха. Однако встречается форма TFPI укороченная в С-концевом фрагменте, у этой формы аффинность связывания с гепарином уменьшается, вследствие чего гепарин неэффективно ингибирует фактор Ха. Очевидно, что в этом случае антикоагулянтная гепариновая терапия не дает должного эффекта. ИФА-наборы позволяют дифференцировать формы TFPI и определять концентрацию формы TFPI с укороченным С-фрагментом. Отдельная тест-система предназначена для выявления комплекса TFPI/fХа.

Фактор VII (fVII)

fVII – зимогенная форма фермента «fVIIa», активирующего внешний путь каскада свертывания. Активация fVII приводит к последующему запуску реакций коагуляции с участием факторов IX, X, XII и тромбина. Активная форма fVII может стимулировать зимогенную форму этого фактора (самоактивация по принципу обратной положительной связи). Ферментная активность fVII значительно возрастает при образовании

Анализаторы для коагулологических исследований

- универсальный автоматический анализатор «CEVERON-ALPHA» (*Technoclone*)
- коагулометры «ТРОМБОТРЕК-Solo» и «ТРОМБОТРЕК SELECT-2» (*Axis-shield*)
- широкий спектр реагентов фирмы TECHNOCLONE

CEVERON-ALPHA универсальный автоматический анализатор открытого типа

- коагулометрия АЧТВ, ПВ, ТВ, Фибриноген, Протеин С, ВА, дефицит факторов свертывания, мутация Лейдена
- фотометрия С1-ингибитор, FVIII, Протеин С, АТ-III
- турбидиметрия Д-димер, ВА, С-реактивный белок
- флуориметрия кинетика образования эндогенного тромбина

Скорость проведения анализов до 120 образцов/час (ПВ).



Преимущества коагулометров «Тромботрек-Solo» и «Тромботрек Select-2»:



- открытые аналитические приборы
- высокочувствительный оптико-механический принцип детекции сгустка
- возможность тестирования мутных и непрозрачных образцов
- анализ образцов плазмы, венозной и капиллярной крови
- минимальный объем реакционной смеси составляет всего 150 мкл
- экономный расход реагентов
- результаты свертывания отображаются в секундах и пересчитываются в МНО
- возможность работы в автоматическом и ручном режиме

«Тромботрек-Solo»

одна измерительная ячейка
пять термостатируемых ячеек
автоматическое вычисление значения МНО
изменение параметров контрольного времени свертывания и МИЧ

«Тромботрек Select-2»

две измерительные ячейки
пять термостатируемых ячеек (одна для реагента)
автоматический пересчет результатов в МНО и в % от нормы
построение калибровочной кривой по 5 точкам и пересчет результатов с учетом калибровки
изменение параметров контрольного времени свертывания и МИЧ
возможность печати результатов анализа без компьютера
возможность сохранения результатов в базе данных персонального компьютера

комплекса с TF. ИФА-наборы позволяют определять как общее количество фактора (fVII, fVIIa, комплексы TF/fVII и TF/fVIIa), так и только активную форму – fVIIa и TF/fVIIa. Активная fVII играет роль в развитии ишемической болезни сердца. Нормальная концентрация fVII в плазме – около 500 нг/мл, и лишь около 1% находится в активной форме, т.е. примерно 5нг/мл.

Фактор VIII

Фактор VIII – гликопротеин, ключевой участник внутреннего пути системы свертывания, активирующий фактор X. ИФА позволяет определять нативную и рекомбинантную формы этого белка.

Фибринопептид А (FPA)

FPA образуется при ферментативном действии тромбина в результате отщепления от N-конца А-цепи фибриногена. Повышенный уровень FPA в крови говорит о гиперактивности тромбина и наряду с Д-димером является маркером ДВС-синдрома и риска развития тромбозов. Однако полная корреляция с уровнем Д-димера не обязательна, поскольку FPA образуется на стадии формирования фибринового сгустка, а Д-димер генерируется при его лизисе.

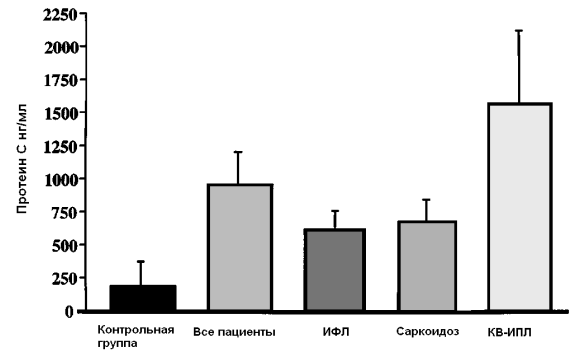
Антикоагулянтная система

Протеин С (PrC)

PrC – главный ингибитор процессов коагуляции. Его концентрация у здорового человека составляет 230 ± 140 нг/мл. Относительно концентрации PrC у новорожденных в норме отметим, что она низкая и достигает нормального уровня взрослого человека примерно к двум годам. Приблизительно у 10% пациентов склонных к тромбозам концентрация PrC значительно снижена.

PrC – витамин К-зависимая сериновая протеаза, которая ингибирует коагуляцию путем инактивирования факторов Va и VIIIa. Кроме того, было показано, что PrC обладает профибринолитической активностью. Наследственный гетерозиготный дефицит PrC ассоциирован с повышенным риском тромбоза вен, а общая гомозиготная недостаточность этого белка была выявлена у новорожденных с purpura fulminans (быстротекущей формой геморрагического васкулита: болезнь Шенлейна-Геноха).

Уровень PrC может значительно возрастать при фиброзах легких различной этиологии, например, при идиопатическом фиброзе легких (ИФЛ), саркоме Бека (саркоидозе), коллагеновых васкулитах, ассоциированных с интерстициальным поражением легких (КВ-ИПЛ)



Снижение уровня PrC может быть связано с дефицитом витамина К, а также с кумариновой терапией. При этой терапии концентрация PrC снижается прежде, чем снижаются концентрации факторов II, IX и X. Таким образом, происходит временный дисбаланс свертывающих и антикоагуляционных факторов, который может стимулировать локальную коагуляцию в венах, что приводит к тромбозу. Поэтому кумариновая терапия должна обязательно проводиться при мониторинге концентрации или активности PrC.

Для определения уровня PrC наиболее простым и надежным методом является ИФА. Время постановки анализа составляет всего 45 мин. Определение активности PrC можно проводить хромогенным методом в ИФА-формате, в 96-луночном планшете при длине волны 405 нм.

Ингибитор протеина С (PrCI)

PrCI (57 кДа) – ингибитор сериновых протеаз (семейство серпинов) гомологичный α -1-антихимотрипсину, α -1-антитрипсину и антитромбину III. PrCI способен ингибировать PrC, двухцепочечную урокиназу, двухцепочечный t-PA, тромбин, фактор Ха, фактор XIa. Поскольку PrCI ингибирует множество плазменных ферментов, его биологическая роль пока точно не выяснена.

Нормальная концентрация PrCI в плазме – 4 мкг/мл, в моче 250 нг/мл, в семенной жидкости 200 мкг/мл.

Пониженная функциональная активность PrCI обнаруживается у пациентов с ДВС, заболеваниями печени. Напротив, повышение активности PrCI наблюдается у пациентов, перенесших инфаркт миокарда. Комплексы u-PA- PrCI выявляются у пациентов, проходящих тромболитическую u-PA-терапию, когда концентрация u-PA превышает концентрацию PAI-1.

ИФА тест-система компании TECHNOCLONE позволяет определять активность PrCI по его способности связываться с урокиназой, которая сорбирована на планшете.

Протеин S (PrS)

PrS – гликопротеин, относящийся вместе с PrC и антитромбином III к системе антикоагулянтов. В норме PrS представлен в плазме двумя формами: свободной (около 40% от общего количества) и в комплексе с фрагментом комплемента C4b (C4b-PrS-форма). Только свободная форма PrS является кофактором для активированного PrC для ингибирования факторов Va и VIIIa.

PrS синтезируется печенью через витамин K-зависимый механизм. Соответственно при неяркой антикоагулянтной терапии (например, при введении варфарина) уровень PrS наряду с PrC падает. Поэтому неяркая антикоагулянтная терапия требует контроля уровня этих протеинов во избежание тромботических осложнений.

Определение свободной формы PrS и его общего количества служит для дифференциальной диагностики трех типов дефицитов этого фактора: тип I – сниженный уровень общей и свободной форм, тип II – нормальный уровень общей и свободной форм при сниженной активности, тип III – нормальный уровень общей формы при недостатке свободной. ИФА-метод позволяет специфично определять свободную форму PrS.

Антитромбин III (At-III)

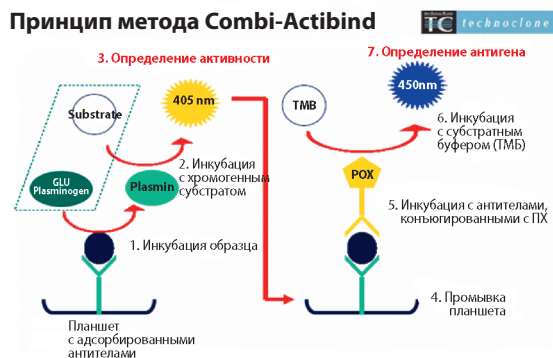
At-III – это альфа2-глобулин с м.м. 58 кДа, наряду с PrC является важным участником системы антикоагулянтов. В норме уровень At-III в плазме составляет 50-150 мкг/мл (50-150%). At-III связывает все активированные факторы свертывания, относящиеся к сериновым протеазам, за исключением fVII. Его активность резко увеличивается при взаимодействии с гепарином и гепариноподобными молекулами на поверхности эндотелия. При связывании остатков лизина At-III с гепарином в его молекуле происходят конформационные сдвиги, способствующие быстрому взаимодействию реактивного сайта At-III с активным центром тромбина. Это свойство гепарина лежит в основе его антикоагулянтного действия. Недостаток функциональной активности At-III приводит к тромботическим осложнениям. Для определения функциональной активности At-III используется хромогенный метод, который можно проводить в ИФА-формате в 96-луночном планшете.

Плазминовая (фибринолитическая) система

К активаторам плазминогена относятся фактор XIIa, тканевой плазминогеновый активатор (t-PA), урокиназа (u-PA). Действие активаторов регулируется ингибиторами активации (PAI-1, α 2-антиплазмин). От соотношения активаторов-ингибиторов плазминовой системы зависит скорость фибринолиза и риск тромботических осложнений.

Тканевой активатор плазминогена (t-PA)

Принцип метода Combi-Actibind



t-PA – гликопротеин с м.м 70 кДа, являющийся основным активатором фибринолитической системы. Он синтезируется эндотелиальными клетками и секретируется в кровоток после воздействия различных стимулов, например, таких как венозная окклюзия или физическая нагрузка.

Концентрация циркулирующего t-PA в плазме составляет примерно 2-8 нг/мл. Однако 95% циркулирующего t-PA входит в состав комплекса с ингибитором активатора плазминогена (PAI-1), следовательно, находится не в активном состоянии. При венозной окклюзии концентрация t-PA увеличивается до 15 нг/мл или выше, соответственно, возрастает и его активность. Такое повышение происходит как благодаря увеличению выброса t-PA эндотелиальными клетками, так и за счет снижения вымывания t-PA из места окклюзии.

Уровень t-PA снижен у пациентов с тромботическими нарушениями (тромбоз глубоких вен, инфаркт миокарда, ишемических инсультов), при злокачественных новообразованиях и сепсисе.

Уникальный ИФА-набор для определения ферментативной активности и количества t-PA последовательно в одной пробе позволяет проводить дифференциальную диагностику многих патологий, связанных с нарушениями в плазминовой системе. Активность t-PA может быть измерена только в образцах, из которых предварительно были удалены его ингибиторы. В методе Actibind это легко достигается специфической иммуноадсорбцией t-PA, содержащегося в образцах плазмы, с помощью антител, иммобилизованных на поверхности лунок микропланшетов. Результаты анализа можно разделить на группы и предположить причины возникших патологий.

1. Повышенный уровень и активность t-PA. Такие результаты свидетельствуют об увеличении выброса t-PA, который не сбалансирован соответствующим усилением выброса PAI-1. Это указывает на первичный гиперфибринолиз и, вероятно, приведет к образованию плазмينا, расходу ингибиторов

плазмина и деградации других белков плазмы, таких как фибриноген и фактор VIII.

2. **Повышенный уровень и нормальная активность t-PA.** Повышенный уровень t-PA антигена при нормальной его активности говорит о сниженной деградации t-PA, что наблюдается при различных заболеваниях печени и при гепариновой терапии.
3. **Пониженный уровень и активность t-PA** – свидетельствуют о низкой секреции t-PA. Приблизительно 10% всех пациентов страдающих тромбозом попадают в эту группу.
4. **Пониженная активность при нормальном уровне t-PA.** В отличие от предыдущей группы, у таких пациентов происходит нормальная секреция t-PA антигена в ответ на венозную окклюзию или иную стимуляцию. Однако слишком высокий уровень PAI-1 нейтрализует увеличившуюся активность t-PA, в результате наблюдается высокий уровень комплекса «t-PA/PAI-1». Приблизительно 20% пациентов с тромбофилией попадают в эту группу. Высокий уровень комплекса «t-PA/PAI-1» также имеет место при дисфункции печени, связанной с нарушениями свертываемости крови. Важно отметить, что около 90% t-PA присутствует в плазме в виде комплекса «t-PA/PAI-1».

Тест по определению активности и количества t-PA можно порекомендовать в качестве предварительного скрининга всей плазминовой системы. Для дальнейшего исследования фибринолитического звена в зависимости от результатов проводятся тесты на определение количества комплекса «t-PA/PAI-1», количества или активности PAI-1, уровня Glu-плазминогена.

Урокиназный активатор плазминогена (u-PA, урокиназа)

u-PA, продуцируется почечной тканью, наряду с t-PA является активатором плазминогена. От концентрации и активности урокиназы в большой степени зависит инициация процесса фибринолиза. Основная функция u-PA – активация плазмина, что используется в медицинской практике для антитромботической терапии. Поскольку опухолевые клетки характеризуются повышенным синтезом u-PA, его также используют в качестве онкомаркера.* Уровень u-PA повышается при онкологических заболеваниях мочеполовой системы и желудочно-кишечного тракта. Также u-PA является прогностическим маркером при раке молочной железы. Диапазон нормальных значений u-PA определен как 1,2-2,4 нг/мл. Уровень u-PA в плазме выше 10 нг/мл может быть вызван онкологическим заболеванием.

Уникальный ИФА-набор для определения ферментативной активности и количества u-PA после-

довательно в одной пробе позволяет проводить дифференциальную диагностику многих патологий, связанных с нарушениями в плазминовой системе.

Ингибитор активации плазминогена I типа (PAI-1)

PAI-1 инактивирует действие активаторов плазминогена (t- и u-PA). PAI-1 – белок острой фазы, его концентрация в плазме возрастает вместе с ростом уровня ИЛ-1. Повышенный уровень PAI-1 отмечается при тромбозах, раке, болезнях печени, в послеоперационном периоде, при септическом шоке, при инфаркте миокарда и коронарных заболеваниях. Резким повышением уровня PAI-1 характеризуется синдром привычного невынашивания беременности.

Для определения активной формы PAI-1 используется набор «Actibind PAI-1 ELISA», где в основу положено свойство ингибитора связываться с t-PA. Только активная и свободная форма PAI-1 останется иммобилизованной в лунке планшета, что выявляется специфичными коъюгированными антителами. Результаты выражаются в Ед/мл и в норме попадают в диапазон: 1-7 Ед/мл. Уровень активного PAI-1 выше 20 Ед/мл может указывать на снижение фибринолитической способности и на склонность к тромбозам.

Для определения общей концентрации PAI-1 используется набор «Antigen PAI-1 ELISA». Диапазон нормальных значений концентрации PAI-1 определен как 7-43 нг/мл. Уровень PAI-1 свыше 100 нг/мл говорит о сниженной фибринолитической активности и повышенном риске тромботических осложнений. Тест-система «Antigen PAI-1 ELISA» определяет свободную и связанную, активную и неактивную формы PAI-1. На точность результатов не влияет присутствие других PAI (-2 или -3).

Измерения должны быть проведены для снижения риска тромбоза у пациентов с повышенным уровнем PAI-1 в плазме. Набор «Actibind PAI-1 ELISA» измеряет только свободную, активную форму PAI-1. На результаты теста не влияют остальные формы PAI-1 или других ингибиторов активаторов плазминогена.

Ингибитор активатора плазминогена II типа (PAI-2)

PAI-2 наряду с PAI-1 ингибирует процесс активации плазминогена. Но если PAI-1 обладает большим сродством к t-PA, то PAI-2 действует в основном на u-PA. Несмотря на очень низкую концентрацию PAI-2 в крови (в периферической крови его уровень, как правило, ниже уровня детекции), он является главным ингиби-

* см. также: главу «Онкомаркеры», стр. 208

тором u-PA. Его уровень значительно повышается (до 550 нг/мл) в третьем триместре беременности. Уровень PAI-2 значительно выше при злокачественных опухолях по сравнению с доброкачественными. PAI-2 встречается в двух формах и в зависимости от степени гликозилирования имеет м.м. 48 или 60 кДа. Первая форма выявляется в плацентарной ткани, а вторая в крови и асцитической жидкости в период беременности. ИФА тест-система выявляет обе формы, причем в свободном и связанном виде (PAI-2 и комплекс PAI-2/u-PA).

Комплекс t-PA/PAI-1

В плазме концентрация PAI-1 значительно превышает концентрацию t-PA. Причем при венозной окклюзии, которая вызывает высвобождение t-PA в плазму, компенсаторно повышается уровень PAI-1. Повышение уровня комплекса t-PA/PAI-1 коррелирует с уровнем активного, свободного PAI-1. Около 95% циркулирующего t-PA находится в составе комплекса с PAI-1.

Ряд патологических состояний ассоциирован с повышенным уровнем t-PA. Основной орган, где происходит деградация t-PA – печень, при различных нарушениях функций печени наблюдается повышение уровня t-PA, и как следствие происходит увеличение концентрации t-PA/PAI-1. В норме, у здоровых людей уровень t-PA увеличивается с возрастом, концентрация t-PA/PAI-1 комплекса соответственно также. Количественное определение t-PA/PAI-1 комплекса помогает в интерпретации результатов при изменении концентрации t-PA и/или PAI-1. Поскольку печень не только орган, где происходит деградация t-PA, но также орган, синтезирующий PAI-1, то количественное определение комплекса t-PA/PAI-1 служит индикатором, показывающим, сколько активного PAI-1 требуется для нейтрализации t-PA, если деградация t-PA в печени снижена. Повышенный уровень комплекса t-PA/PAI-1 также имеет место при дисфункции печени, связанной с нарушениями свертываемости крови. Нормальный уровень комплекса t-PA/PAI-1 в плазме находится в диапазоне 7-20 нг/мл.

Комплекс плазмин-α2-антиплазмин

α2-антиплазмин (α2-АП) – одноцепочечный гликопротеид (70 кДа), относится к семейству серпиновых ингибиторов, синтезируется в печени (время полужизни – 3,3 дня) и способен соединяться с плазмином и фибрином. Ингибирование активности плазмина обусловлено формированием неактивного комплекса с α2-АП. В процессе ингибирования выделяют две стадии. На первой образуется обратимый комплекс

между лизин-связывающим участком плазмина и комплементарным фрагментом α2-АП, расположенным в COOH-регионе. На второй стадии (при расщеплении пептидной связи ингибитора) формируется необратимый комплекс.

Содержание α2-АП в норме – 70 мкг/мл (или 1 мкмоль/л). При свертывании крови α2-АП расходуется, переходя в связанную с плазмином форму (в норме концентрации свободного α2-АП падает на 20%). Уровень α2-АП падает и при тромболитической терапии. Уровень комплекса α2-АП–плазмин в норме находится в пределах 0-520 нг/мл плазмы.

Измерение комплекса α2-АП–плазмин позволяет выявлять плаزمинемию, и, таким образом, геморрагический синдром. При заболеваниях, связанных с повышенным образованием фибрина, происходит реактивное увеличение уровня плазмина, одновременно повышается концентрация комплекса α2-АП–плазмин. При этом наблюдается четкая корреляция между текущей концентрацией комплекса и скоростью образования фибриновых сгустков. Определение уровня α2-АП–плазмин является ценным индикатором для исследования тромботическо-тромболитического равновесия. Плазмин, связавшись с α2-АП, теряет способность разрушать фибрин. Уровень комплекса α2-АП–плазмин – информативный показатель при тромбозах и геморрагиях.

Плазминоген

Плазминоген – неактивный предшественник плазмина (основного фермента фибринолиза). Плазминоген синтезируется в печени как одноцепочечный гликопротеин (92 кДа). Активаторы плазминогена (t- и u-PA) расщепляют в молекуле плазминогена одну связь, в результате получается активный двухцепочечный фермент – плазмин. Плазмин катализирует гидролитическое расщепление пептидов и сложных эфиров аргинина и лизина. Биологическая роль плазмина – превращение фибрина в растворимые продукты, что способствует рассасыванию тромба. Концентрация плазминогена – один из нескольких факторов, определяющих уровень фибринолиза *in vivo*.

Нормальная концентрация плазминогена в плазме примерно 200 мкг/мл, период полужизни белка – 2,2 дня. Уровень плазминогена часто снижается при острых и хронических формах гепатита. Причинами снижения уровня плазминогена может быть и повышенное потребление белка, и подавление его синтеза. При билиарном первичном циррозе печени и на ранней стадии развития желчекаменного синдрома уровень плазминогена остается в норме или даже может быть повышенным. Заметное снижение уровня плазминогена наблюдается у пациентов в

ряде случаев гиперфибринолиза и у новорожденных с синдромом Липстрёма.

Активируемый тромбином ингибитор фибринолиза (TAFI)

AFI (другие названия – прокарбоксипептидаза В или прокарбоксипептидаза U) переходит в активную форму (TAFIa) при участии комплекса тромбин/тромбомодулин. TAFIa преимущественно отщепляет лизиновые и аргининовые остатки от С-конца белков. • Участие TAFIa в фибринолизе заключается в отщеплении лизиновых и аргининовых остатков от фибрина, таким образом происходит частичная деградация фибриновых сгустков. Однако отщепление от фибрина лизиновых и аргининовых остатков ингибирует последующее расщепление фибринового сгустка плазмином. TAFI играет центральную роль в развитии тромбозов, поскольку блокирует лизис фибриновых сгустков.

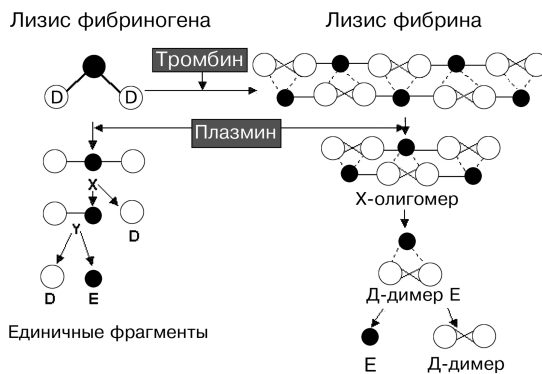
Карбоксипептидазная активность TAFIa в плазме определяется флуорогенным или хромогенным методами, основанными на расщеплении TAFI-специфичного субстрата. Для определения количества TAFI используется ИФА-метод.

C1-ингибитор (C1-INH)

C1-ингибитор – угнетает активность сериновых протеаз: C1r и C1s субкомпонентов комплемента, а также плазмина, калликреина, фактора XIa, фактора XIIa. ••

Д-димер

Под влиянием плазмина расщепляется как фибрин, так и фибриноген, но Д-димер наряду с другими продуктами образуется только при ферментативном расщеплении фибрина. В настоящее время Д-димер остается наиболее специфичным маркером деградации фибриновых сгустков.



• см. также: главу «Система комплемента», стр. 375

•• см. также: главу «Система комплемента», стр. 375

Д-димер – диагностический маркер многих патологических состояний системы гемостаза, сопровождаемых внутрисосудистым отложением фибрина: ДВС (диссеминированное внутрисосудистое свертывание), тромбоза глубоких вен нижних конечностей, эмболии легочной артерии, коронаротромбоза. Определение уровня Д-димера имеет большую клиническую значимость для ортопедии и травматологии пожилого возраста, акушерско-гинекологической практики, спортивной медицины и при тромботических осложнениях онкологических больных. В норме содержание Д-димера в плазме не должно превышать 250 нг/мл. Повышенные уровни Д-димера выявляются при диссеминированной внутрисосудистой коагуляции, тромбозе глубоких вен и эмболии легких. Но и другие обстоятельства могут приводить к высокому уровню Д-димера, например, беременность, заболевания печени, инфекции.

Для лабораторной диагностики уровня Д-димера в настоящее время используется три метода: латексной агглютинации, ИФА и иммунохроматография. Наиболее чувствительный метод ИФА (порог чувствительности: ниже 60 нг/мл).

Отметим особую диагностическую ценность иммунохроматографического метода (Nycocard D-dimer) при тромбозе глубоких вен (ТГВ). Если синдром ТГВ не диагностирован во время и не приняты соответствующие меры, развитие патологии может привести к легочной эмболии. Международная статистика свидетельствует о том, что у 1 человека из 1000 за год развивается ТГВ, у 1-5% человек с ТГВ синдромом развитие патологии приводит к смерти, например, от легочной эмболии. До сих пор самым точным методом диагностики ТГВ остается метод функциональной диагностики (флебография).

Ниже приводятся данные исследований, где результаты экспресс-теста (Nycocard D-dimer) были сопоставлены с результатами флебографии. Обследовано 150 пациентов с подозрением на ТГВ. Особенно высокая корреляция с данными флебографии отмечалась в прогнозировании отсутствия ТГВ.

Метод иммунохроматографии для определения уровня Д-димера (Nycocard D-dimer) сочетает скорость проведения анализа (5 мин.) с достаточно высокой чувствительностью (пороговое значение: 100 нг/мл). Оперативность проведения анализа требуется при тяжелых тромботических осложнениях, когда концентрация Д-димера может значительно изменяться в течение одного часа. От точности и своевременности результатов анализа зависят меры предупреждения тромбоэмболии и инфаркта.

Результат теста	Тромбоз подтвержден флебографией	Тромбоз не подтвержден флебографией	Прогнозирование
положительный (выше Cut-Off)	54	32	тромбоза – 63%
отрицательный (ниже Cut-Off)	5	59	отсутствия тромбоза – 92%

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА



Кат. №	Производитель	Описание
2599006	Technoclone	Д-димер, 96
5450201	Technoclone	Фактор Виллебранда, 96
5450301	Technoclone	Коллаген-связывающая активность фактора Виллебранда, 96
5450501	Technoclone	ADAMTS-13 (протеаза, расщепляющая фактор Виллебранда), (определение количества и активности, 360/460 нм), метод IFA, 96
5450551	Technoclone	ADAMTS-13 (протеаза, расщепляющая фактор Виллебранда), (определение количества и активности, 360/460 нм), метод IFA, 48
5450401	Technoclone	Ингибитор ADAMTS-13 (Антитела к ADAMTS-13), 96
5450451	Technoclone	Ингибитор ADAMTS-13 (Антитела к ADAMTS-13), 48
TC12030	Technoclone	Фибронектин, 96
DTP00B	R&D	Тромбопоэтин, 96
TC12120	Technoclone	Витронектин, 96
TC12021	Technoclone	Протеин С, 96
TC16100	Technoclone	Ингибитор протеина С Actibind (определение активности), 96
TC12040	Technoclone	Glu-плазминоген, 96
TC12005	Technoclone	Тканевой активатор плазминогена (t-PA), 96
TC12010	Technoclone	Урокиназный активатор плазминогена (u-PA), 96
TC16000	Technoclone	t-PA Combi Actibind (определение антигена и активности), 96
TC16010	Technoclone	u-PA Combi Actibind (определение антигена и активности), 96
TC12075	Technoclone	PAI-1 (ингибитор активации плазминогена 1 типа), 96
TC16075	Technoclone	PAI-1 Actibind (определение активности), 96
TC12080	Technoclone	Комплекс t-PA -PAI-1, 96
TC12060	Technoclone	Комплекс плазмин-α2-антиплазмин (PAP), 96
422-1680	BCM Diagnostics	Тромбоспондин-1, 96
DTP00B	R&D	Тромбопоэтин, 96
DTSP20	R&D	Тромбоспондин-2, 96
5340011	Technoclone	Антитромбин III, субстрат для определения активности (405 нм) +
5340212	Technoclone	Антитромбин III, реагент для опред. активности (405 нм), ~50 тестов
5344101	Technoclone	Фактор VIII, определение активности (405 нм), ~80 тестов
5341013	Technoclone	Протеин С, определение активности (405 нм), ~60 тестов
5345003	Technoclone	С1-ингибитор, определение активности (405 нм), ~60 тестов
5006010	Technoclone	Скорость образования тромбина (360/460 нм) ~48 тестов