

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 визначенні вмісту функціонально неактивного протромбіну (декарбоксілюваного протромбіну) в плазмі крові.

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

Такі некарбоксілювані форми вітаміну К - залежних білків не здатні виконувати відповідні функції і називаються PIVKA- білками (протеїни, що утворюються за відсутності вітаміну К). Накопичення функціонально неактивних PIVKA- білків в крові призводить до зниження потенціалу системи з'єднання 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 цією метою у клінічній практиці для контролю ефективності терапії антикоагулянтами непрямої дії використовується тест „протромбіновий час”. Цей тест базується на визначенні часу з'єднання 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 з'єднання 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 (МНВ) за формулою $MNV = (PT_{\text{хворого}} / PT_{\text{контроля}})^{MCH}$, де $PT_{\text{хворого}}$ - протромбіновий час в капілярній крові хворого, $PT_{\text{контроля}}$ - протромбіновий час в капілярній крові здорової людини, MCH - міжнародним індекс чутливості тромбoplastину. Підбір дози антикоагулянтів непрямої дії проводиться під контролем визначення МНВ, виходячи з того, що показник МНВ 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 з'єднання плазми крові. Тому було запропоновано, окрім МНВ, 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 з'єднання крові під впливом тромбoplastину з подальшою активацією протромбіну. Тобто цей тест лише опосередковано вказує на рівень функціонально активного протромбіну та залежить від вмісту та функціонально стану зазначених факторів з'єднання крові та дії інгібіторів зовнішньої ланки системи з'єднання крові [5].

Відомо, що окрім „протромбінового часу” для моніторингу лікування антикоагулянтами непрямої дії запропоновано використовувати тест „екариновий час”, що базується на визначенні часу з'єднання плазми крові під дією активатора протромбіну з отрути ефі піщаної (*Echis carinatus*) екарину ("екариновий час"), 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 з'єднання крові. Кількість інгібіторів тромбіну чи антикоагулянтів в плазмі крові визначають за часом з'єднання плазми крові, користуючись калібрувальною кривою та спеціальними розробленими комп'ютерними програмами [7, 8].

Недоліком даного тесту є те, що рівень протромбіну визначається також за часом з'єднання 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 з'єднання крові, що дозволить встановлювати безпосередній результат впливу дії антикоагулянтів непрямої дії: накопичення функціонально неактивних форм протромбіну.

Суть винаходу полягає у порівнянні результатів тестів на основі тромбoplastину та екамуліну, що дозволяє визначити вміст декарбоксілюваного протромбіну плазми крові за різницею амідолітичної активності тромбіну, що визначається в двох лабораторних тестах з використанням хромогенного субстрату S 2238:

1) "протромбіновий тест" на основі препарату тромбoplastину (амідолітична активність тромбіну відповідає рівню лише функціонально активного протромбіну плазми крові);

2) "екамуліновий тест" на основі активатора протромбіну з отрути ефі багатолускової (амідолітична активність тромбіну вказує на сумарний рівень функціонально активного та декарбоксілюваного протромбіну в досліджуваній плазмі крові).

Результати тестів 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.

Переваги тест-системи контролю ефективності лікування антикоагулянтами непрямої дії:

- отримання інформації про рівень декарбоксілюваного 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 ендogenous 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 тромбопластину, 10мкл 0,025M CaCl₂, 185мкл 0,05M Трис-НСІ буферу, рН 7,4 з 0,13M 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

Активація 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 різниця результатів тестів на основі екамуліну та тромбопластину дозволяє встановити присутність функціонально неактивних форм протромбіну в плазмі крові.

Приклад 2

В плазмі крові пацієнтів, яким проводилась терапія антикоагулянтами непрямої дії, визначають амідолітичну активність тромбіну, що утворюється за дії тромбопластину та екамуліну, як описано в прикладі 1. Результати тестів представляють у вигляді протромбінового відношення та екамулінового відношення. Визначають різницю між протромбіновим та екамуліновим відношенням, що свідчить про рівень PIVKA- протромбіну (Табл. 2).

Таблиця 2

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

Протромбінове відношення (ПВ)	Екамулінове відношення (ЕВ)	Різниця ПВ та ЕВ
1.77±0.67	1.00±0.15	0.76±0.71

Приклад 3

Визначають рівень 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 функціонально неактивних форм протромбіну змінюється в залежності від дози антикоагулянтів непрямої дії (Табл. 3).

Таблиця 3

Зміна вмісту PIVKA- протромбіну при зміні дози антикоагулянтів непрямої дії

№ пацієнта	Різниця протромбінового та екамулінового відношення*		
	До початку лікування	На піку лікування	Після зниження дози антикоагулянтів
1	-	1,5	0
2	-	13,23	0
3	-	7,56	0,49
4	0	0,61	-
5	0	0,86	-
6	0	0,39	-

*p <0,05

Визначення рівню декарбоксильованого протромбіну за різницею протромбінового та екамулінового відношення є ефективним на різних етапах лікування антикоагулянтами непрямої дії.

Приклад 4 Визначають рівень протромбіну за:

а) часом зсідання плазми крові (МНВ), 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 (протромбінове відношення), 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, %	Міжнародне нормалізоване відношення	Протромбінове відношення
121,30±6,48	1,96±0,37	1,37±0,34

Показано, що визначення рівню протромбіну з використанням тромбопластину за розщепленням хромогенного субстрату менш чутливе до інгібіторів системи зсідання крові в порівнянні з МНВ (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.

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 200од/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.

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 декарбоксильованої 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-НСІ буфер, рН 7,4 з 0,13M NaCl;

Виявляють накопичення декарбоксильованих 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 декарбоксильованого протромбіну за формулами:

$PB = (A_d/A_k)^{MIC} \quad (1),$

$EB = A_d/A_k \quad (2),$

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),

MIC - Міжнародний Індекс Чутливості препарату тромбопластину.

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

$DKPr = PB - EB \quad (3),$

де: DKPr - рівень декарбоксильованого протромбіну;

ПВ - протромбінове відношення;

ЕВ - екамулінове відношення.

Для забезпечення нормального функціонування системи гемостазу людини при лікуванні антикоагулянтами непрямої дії рівень декарбоксильованого протромбіну в плазмі крові в нормі має становити від 0,5 до 1,5.

Амідолітичну активність тромбіну, що утворюється при дії тромбопластину, визначають таким чином: до кожної планшетної лунки вносять 10мкл плазми крові, препарати: 20мкл тромбопластину, 10мкл 0,025M CaCl₂, 25мкл 2мкМ тромбін-специфічного хромогенного субстрату S2238 та 185мкл 0,05M трис-НСІ буферу, рН 7,4 з 0,13M 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 0,025M CaCl₂, 25мкл 2мкМ тромбін-специфічного хромогенного субстрату S2238 та 185мкл 0,05M Трис-НСІ буферу, рН 7,4 з 0,13M 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: амідолітична активність тромбіну донорської плазми крові за дії тромбoplastину становить 0,467, амідолітична активність тромбіну донорської плазми крові за дії екамуліну становить 0,350 і МІЧ тромбoplastину становить 1,06;

амідолітична активність тромбіну в досліджуваній плазмі крові за дії тромбoplastину становить 0,265, амідолітична активність тромбіну в досліджуваній плазмі крові за дії екамуліну становить 0,348,

то протромбінові відношення складає $(0,467/0,265)^{1,06}=1,82$ (1)

а екамулінове відношення складає $0,350/0,348=1$ (2),

відповідно рівень декарбоксилюваного протромбіну в плазмі крові становить $1,82-1=0,82$ (3),

що свідчить про ефективне лікування антикоагулянтами непрямої дії, яке не загрожує виникненням кровотеч, оскільки $0,5 < 0,82 < 1,5$.

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., Чернищенко В. О., Платонова Т. М. Вплив гепарину на показники тестів протромбінового та екамулінового часу // Лабораторна діагностика, 2006 - Т.38, N4. – С.22-26.