Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія

НАУКОВО-ПРАКТИЧНИЙ ЖУРНАЛ

4(40)/2007

Заснований 1997 р.

Виходить 4 рази на рік

ГОЛОВНИЙ РЕДАКТОР

М.Р. Гжегоцький

РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ

Аксентійчук Б.І.,
Великий М.М., Влох І.Й.,
Воробець З.Д., Зіменковський Б.С.,
Івасівка С.В., Козявкін В.І.,
Кравців Р.Й., Кундієв Ю.І.,
Магльований А.В.,
Мельник І.А. (*заст. гол. редактора*),
Мисаковець О.Г. (*відп. редактор*),
Петришин Ю.С. (*заст. гол. редактора*),
Сергієнко О.О., Скляров О.Я.,
Снітинський В.В., Стояновський В.Г.

РЕДАКЦІЙНА РАДА

Агаджанян О.О. (*Росія*)
Возіанов С.О. (*Київ, Україна*)
Губський Ю.І. (*Київ, Україна*)
Зембаля М. (*Польща*)
Коенен А. (*Нідерланди*)
Козаков В.М. (*Донецьк, Україна*)
Костюк П.Г. (*Київ, Україна*)
Кубарко А.І. (*Білорусь*)
Мороз В.М. (*Вінниця, Україна*)
Павлік В. (*Польща*)
Пішак В.П. (*Чернівці, Україна*)
Скок В.І. (*Київ, Україна*)
Сольський Я. (*Польща*)
Ткаченко Б.І. (*Росія*)
Філіпов Ю.О. (*Дніпропетровськ, Україна*)
Хобзей М.К. (*Львів, Україна*)

Свідоцтво про державну реєстрацію:
серія КВ №2799

Засновники і видавець:

ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ім. ДАНИЛА ГАЛИЦЬКОГО

ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО "ВСЕУКРАЇНСЬКЕ СПЕЦІАЛІЗОВАНЕ ВИДАВНИЦТВО "СВІТ"

Адреса редколегії:

вул. Пекарська, 52,
м. Львів, 79010,
Україна
тел.: (032) 272-88-07
тел./факс: (032) 275-75-91
e-mail:ecpb@meduniv.lviv.ua

Журнал внесений до переліку видань, у яких можуть публікуватися результати дисертаційних робіт (Бюл. ВАК України, № 4, 1999)

Рекомендовано до видання Вченою радою ЛНМУ ім. Данила Галицького (протокол № 8 — ВР від 31.10.07)

Матеріали друкуються українською, російською, англійською, німецькою мовами.

Рукописи рецензуються. Редколегія залишає за собою право редагування. За вірогідність інформації та реклами відповідають автори та рекламодавці. У разі передруку обов'язкове посилання на журнал.

Передплатний індекс 22611

© Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького, 2007

Зміст

Експериментальна фізіологія та біохімія

ТУЧАК О.І., ЄМЕЛЬЯНЕНКО І.В.

Стан пероксидно-оксидаційних процесів в організмі при експериментальному гіпотиреозі та при корекції "Йодидом-100" 7

КАМІНСЬКИЙ В.О., СТОЙКА Б.Р., СТОЙКА Р.С.

Дослідження фрагментації ДНК та ензиму PARP-1 репарації ДНК у людських сперматозоїдах залежно від їхнього морфо-функціонального стану 10

ДЗЮБЕНКО Н.В., БЕРЕГОВА Т.В.

Вплив блокади іонного каналу глутаматних рецепторів на базальну та стимульовану шлункову секрецію у щурів 18

МАКАРЕНКО О.А.

Експериментальне обґрунтування профілактики естрогенодефіцитного остеопорозу препаратами ізофлавонів 22

ПОКОТИЛО О.С., ЯНОВИЧ В.Г.

Ліпогенез і холестериногенез у печінці морських свинок при навантаженні холестеролом 29

ФУРДИЧКО Л.О.

Зміни параметрів пероксидного окиснення ліпідів у крові щурів за дії високих доз іонізуючого випромінювання 33

КОВЗУН О.І.

Вплив естрадіолу *in vivo* на вміст *ERK*1/2 протеїнкінази і ядерного транскрипційного чинника *c-fos* в адренокортикальній тканині щурів-самців 35

Клінічна фізіологія та біохімія

ВОРОНИЧ-СЕМЧЕНКО Н.М.

Порівняльна характеристика розумового розвитку дітей, які проживають в йододефіцитному та інтактному регіонах 40

ШОРОБУРА М.С.

Динаміка вмісту інтерлейкіну-4 у сироватці крові хворих на розсіяний склероз залежно від клінічних характеристик захворювання 46

ГОРНИЦКАЯ О.В.

Особенности агрегации тромбоцитов при инфаркте миокарда 54

БОНДАРЕНКО Г.М., КОНДАКОВА Г.К.

Вміст цитокінів та продуктів метаболізму L-аргініну при хворобі Рейтера 61

На допомогу лікареві

КОРОЛЬОВА Д.С., ЧЕРНИШЕНКО В.О., ПЛАТОНОВА Т.М.

Тромбопластин та його використання у клінічній лабораторній діагностиці 65

УДК 577.151.042.5: 612.115

Д.С. КОРОЛЬОВА, В.О. ЧЕРНИШЕНКО, Т.М. ПЛАТОНОВА
Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ

Тромбопластин та його використання у клінічній лабораторній діагностиці

Протромбін є попередником одного з ключових ферментів системи гемостазу — тромбіну, що каталізує утворення фібрину, активацію V, VIII, XI, XIII факторів зсідання крові та регулює систему фібринолізу і судинно-тромбоцитарну ланку гемостазу. Крім цього, він бере участь як регулятор у процесах запалення, репарації, проліферації клітин крові і т. ін. [3, 11]. Отже, рівень та функціональний стан протромбіну у плазмі крові є важливою діагностичною ознакою [2, 9].

In vivo активація протромбіну здійснюється фактором Ха у складі протромбіназного комплексу. Субстратом протромбінази є протромбін, асоційований з фосфоліпідами мембран, тоді як тромбін розщеплює протромбін без участі мембранних фосфоліпідів із утворенням функціонально неактивного продукту — претромбіну [2, 13].

Для контролю стану системи зсідання крові застосовують низку скринінгових тестів, передусім "протромбіновий (тромбопластиновий) час" (ПЧ), "тромбіновий час" (ТЧ), "активований частковий тромбопластиновий час" (АЧТЧ) [1].

У клінічній практиці найпоширенішим є протромбіновий час, що моделює *in vitro* зовнішній шлях системи зсідання крові. ПЧ визначають за часом зсідання рекальцифікованої плазми крові при додаванні до неї препарату тромбопластину. Для обчислення результатів застосовують протромбіновий індекс (ПІ). У нормі ПІ становить 80–110%.

$$ПІ = \frac{ПЧ контролю}{ПЧ хворого} \times 100\%.$$

Однак препарати тромбопластину, отримані з різних джерел та за різними методиками мають відповідно різну чутливість. Для уніфікації результатів тесту застосовують калібрування препарату тромбопластину щодо стандартного (еталонного) тромбопластину. За допомогою такого калібрування визначають міжнародний індекс чутливості (МІЧ), що дає змогу отримувати уточнені дані. Для різних препаратів тромбопластину МІЧ дорівнює 1,0–2,8. Рекомендовано використовувати реагенти тромбопластину з МІЧ не менш ніж 0,5 (оптимально 1,0–1,2). Для обчислення результатів тесту ПЧ рекомендується застосовувати міжнародне нормалізоване відношення (МНВ), яке визначають за формулою:

$$МНВ = \left(\frac{ПЧ хворого}{ПЧ контролю}\right)^{МІЧ}.$$

У нормі МНВ становить 0,9–1,1. Що вищих значень сягає МНВ, то більшою є набута гіпокоагуляція, а отже, небезпека геморагічних ускладнень.

Введення МНВ забезпечує оптимізацію терапії антикоагулянтами непрямої дії. Міжнародний комітет зі стандартизації в гематології ре-

© Д.С. Корольова, В.О. Чернишенко, Т.М. Платонова, 2007

комендує під час профілактики і лікування венозних тромбозів та емболій антикоагулянтами непрямої дії прийняти МНВ у межах 2,0–3,0 [1, 2, 4, 8].

Для визначення загального рівня протромбіну використовуються також ферменти-активатори з отрути змій [8, 14].

Мета роботи — характеристика впливу різних факторів на час зсідання плазми крові в тесті "протромбіновий час" та з'ясування доцільності використання пари тестів "екамуліновий час" та "протромбіновий час" для виявлення активації системи зсідання крові та контролю лікування антикоагулянтами непрямої дії.

Матеріали і методи досліджень. Контрольна плазма крові — пул контрольної плазми одержували з крові 8–10 донорів (стандартний метод) [7].

Тест "екамуліновий час" виконували відповідно до методу [5]. До 0,1 мл плазми крові додавали 0,1 мл 0,025М хлориду кальцію та 0,1 мл екамуліну у концентрації, що викликала зсідання плазми крові за 1 хв 45 с–2 хв 5 с (контрольний час) та візуально фіксували час утворення згустка за температури 37°С.

Тест "протромбіновий час" виконували відповідно до методу [5].

Вміст розчинних фібрин-мономерних комплексів визначали відповідно до методу [8].

Результати досліджень та їх обговорення. В основі тесту "протромбіновий час" лежить активація плазми крові препаратом тромбопластину за наявності іонів кальцію. Тромбопластин — препарат, який отримують із тканин різного походження (найчастіше мозку), і який виявляє прокоагулянтну активність та за лічені секунди призводить до зсідання донорської плазми крові. До складу препарату входять мієлінові оболонки, окремі мембрани та навіть органели клітин. Коагуляційну активність препарату тромбопластину зумовлює тканинний фактор [2, 4].

Тканинний фактор (ТФ) є мембранним глікопротеїном з молекулярною масою 45 кДа, що міститься в мембранах ендотеліальних та гладеньком'язових клітин, а також у мембранах моноцитів та макрофагів і завжди функціонує виключно у комплексі з фосфоліпідною матрицею [3, 12].

У процесі пошкодження зовнішньої клітинної мембрани втрачається нормальний асиметричний розподіл ліпідів між її зовнішньою та внутрішньою поверхнями. Водночас на поверхні пошкодженої клітини з'являється ТФ, який за участі іонів кальцію одразу ж формує комплекс із фактором VIIa. Зв'язаний із ліпідною мембраною, цей комплекс переводить в активну форму фактори X і IX (рис. 1).

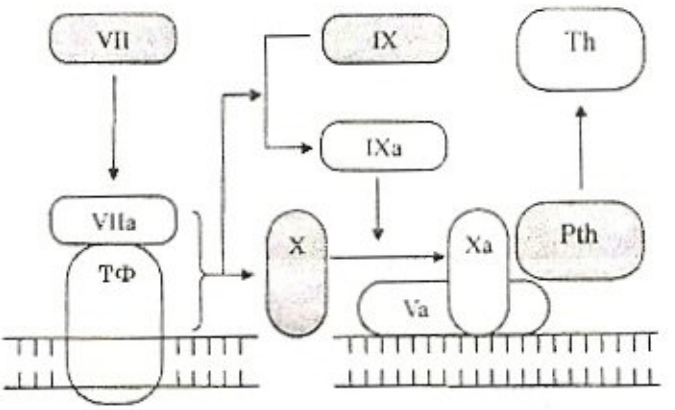

Рис. 1. Роль тканинного фактора (ТФ) у регуляції системи зсідання крові:
Pth — протромбін; Th — тромбін

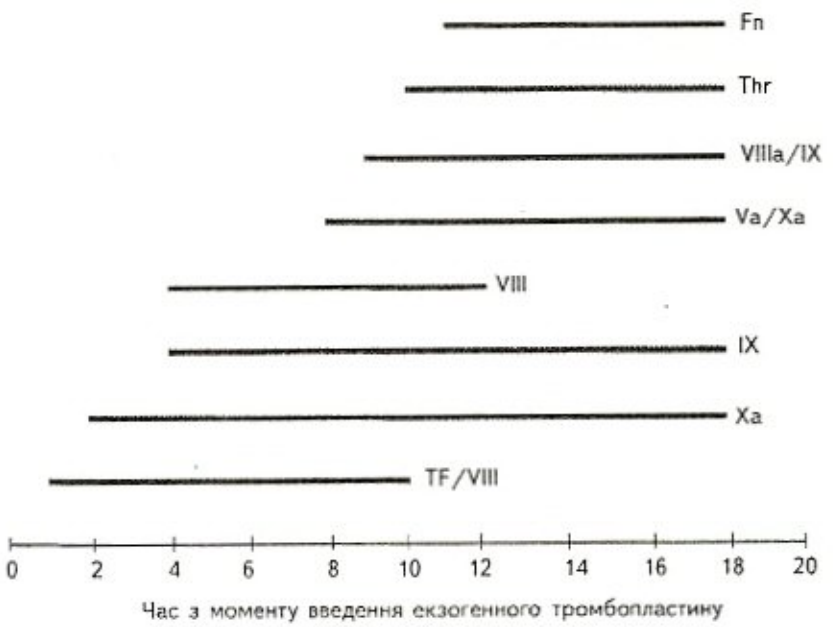

Рис. 2. Динаміка активації коагуляційних факторів у тромбопластиновому тесті (довжина ліній, що відповідають факторам, вказує на час активної дії даних факторів у пробі протягом тесту) [15]:
Fn — фібрин; Th — тромбін; TF — тканинний фактор

Таким чином, ТФ активує зовнішній шлях системи зсідання крові з утворенням фібрину, що є одним з основних механізмів тромбогенезу в судинному руслі.

Слід зазначити здатність ТФ до утворення регуляторних комплексів, зокрема потрійного комплексу з VIIa і антитромбіном III, а також комплексу з інгібітором шляху ТФ (TFPI) та факторами Xa і VIIa [2, 13, 15].

Як бачимо, механізм активації протромбіну в тесті ПЧ не передбачає прямої активації проферменту. Натомість утворення тромбіну здійснюється опосередковано цілою низкою факторів системи зсідання, що в свою чергу активуються за наявності екзогенного тромбопластину (фактори IX, VII, X та ін.). З огляду на це активність згаданих факторів та їх вміст у досліджуваній плазмі може впливати на результати тесту. Черговість реакцій активації у тромбопластиновому тесті подана на рис. 2.

Зважаючи на те, що патології, при яких проводиться тест ПЧ, почасти пов'язані з дефіцитом чи зниженням активності факторів зовнішнього шляху системи зсідання крові, дуже важливим є вивчення впливу цих факторів на час зсідання плазми крові в протромбіновому тесті.

Зокрема, результати тесту "ПЧ", окрім вмісту протромбіну, залежать від вмісту факторів Va, VIIa та Xa. Наявність цих факторів у досліджуваній плазмі у концентрації, меншій за норму, значно подовжують час зсідання плазми крові. Водночас тест ПЧ нечутливий до вмісту факторів VIIIa та IXa [13].

Чутливість тромбопластину до фактора VIIa залежить від технології виробництва та джерела, з якого отримано тромбопластин, і може бути критерієм якості препарату [10]. Така відмінність між препаратами тромбопластину переконливо свідчить на користь використання саме МНВ.

У таблиці наведені різні способи вираження результатів тесту ПЧ за нестабільної та стабільної стенокардії: час зсідання плазми крові, ПІ,

МНВ. Як бачимо, за умов нестабільної стенокардії спостерігається подовження часу зсідання плазми крові під дією тромбопластину та відповідне підвищення МНВ, що може бути пов'язане з накопиченням інгібіторів факторів зсідання крові [14].

Аналіз параметрів системи зсідання крові за умов стабільної стенокардії загалом виявив відхилення від норми лише в одного пацієнта (пацієнт № 7).

Результати тесту "протромбіновий час" за нестабільної стенокардії (пацієнти № 1–5) та стабільної стенокардії (пацієнти № 6–10). Час зсідання контрольної плазми крові — 18 с

Пацієнти (номер)	Протромбіновий час, с	Протромбіновий індекс, %	Міжнародне нормалізоване відношення
1	23	75	1,37
2	27	63	1,61
3	32	53	1,93
4	21	86	1,20
5	25	67	1,51
6	19	94	1,07
7	21	86	1,20
8	17	104	0,93
9	18	100	1
10	19	94	1,07

Подовження часу зсідання плазми крові виявлено при дефіциті вітамін К-залежних білків, який спостерігається при захворюваннях печінки та при лікуванні антикоагулянтами непрямої дії (варфарин, кумарин).

Зокрема, тест "ПЧ" використовується для контролю стану системи зсідання крові під час проведення антитромботичної терапії препаратами гепарину. Проведені нами дослідження *in vitro* на модельній системі, що включала донорську плазму крові та відповідну кількість гепарину, показали його вплив на результати даного тесту. Мінімальна кількість нефракціонованого гепарину, що вводиться в організм (5000 од.), призводить до подовження часу зсідання плазми крові на 40–50%, хоча гепарин безпосередньо не впливає на вміст протромбіну у плазмі крові [6].

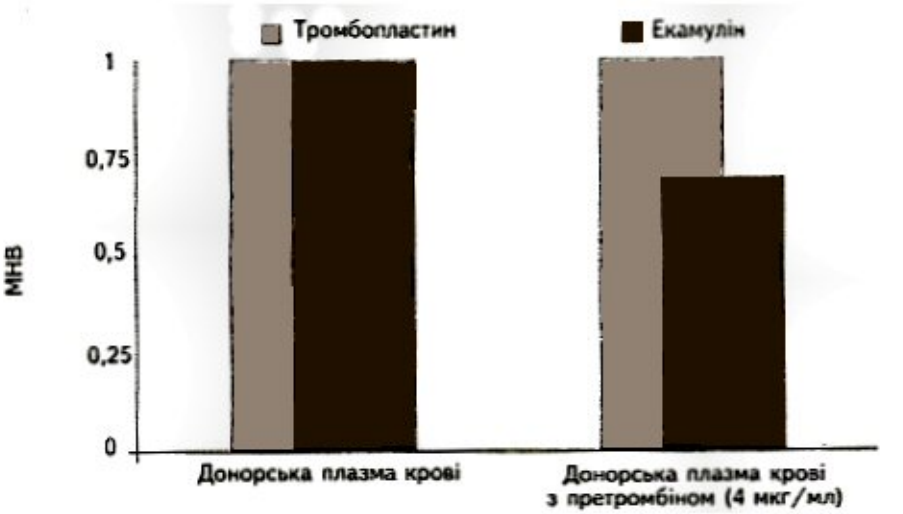

Рис. 3. Вплив претромбіну на час зсідання донорської плазми крові під дією тромбопластину та екамуліну

З огляду на вищезазначене, важливим є пошук діагностичних підходів, які б уможливлювали точне визначення рівня протромбіну та його функціонального стану і не залежали б від інших компонентів системи гемостазу. Одним із таких підходів є використання активаторів протромбіну з отрути змій.

Активатор протромбіну, виділений з отрути *Echis multisquamatis* має назву екамулін. Тест з його використанням отримав назву "екамуліновий час". На модельній системі *in vitro* отримані дані (рис. 3), що свідчать про здатність екамуліну, на відміну від тромбопластину, активувати як протромбін, так і його функціонально неактивні форми, до яких зокрема належить PIVKA-протромбін та проміжний продукт активації протромбіну тромбіном — претромбін. Результати тесту "ЕЧ", представлені у вигляді екамулінового відношення: відношення часу зсідання досліджуваної плазми крові до часу зсідання контрольної плазми крові. При додаванні до донорської плазми крові претромбіну час зсідання плазми крові в тесті "екамуліновий час" скорочується за рахунок активації претромбіну екамуліном, і тому екамулінове відношення знижується.

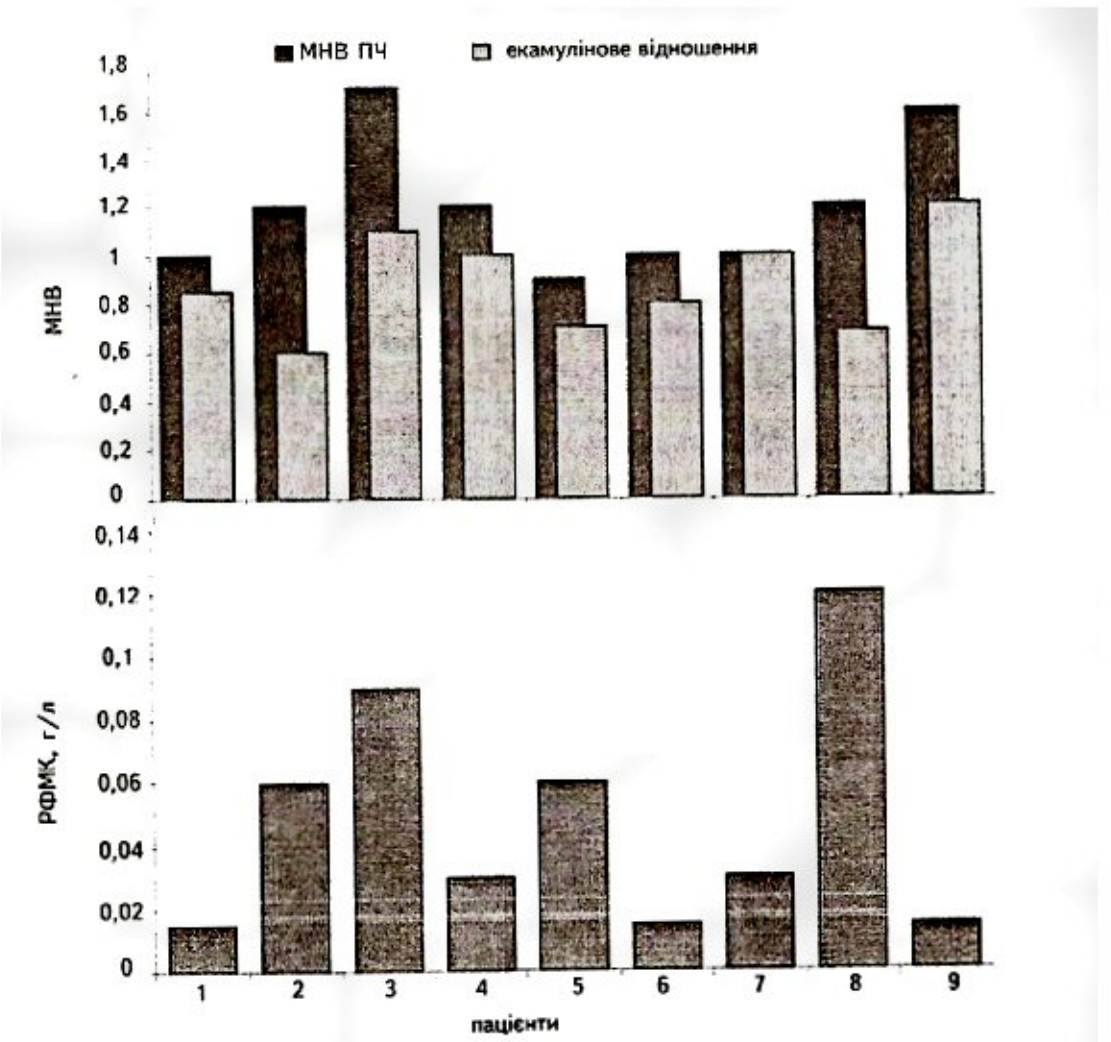

Рис. 4. Міжнародне нормалізоване відношення (МНВ), екамулінове відношення та вміст розчинних фібрин-мономерних комплексів (РФМК) у плазмі крові хворих за гострого інфаркту міокарда

Натомість ПЧ за наявності претромбіну не змінюється, оскільки претромбін під дією тромбопластину не перетворюється на тромбін.

Така здатність екамуліну виявляти функціонально неактивні форми протромбіну визначає його придатність до використання у лабораторній діагностиці [5]. Доцільним є використання пари тестів: "екамуліновий" та "протромбіновий час". Порівняння їх результатів дає змогу виявити функціонально неактивні форми протромбіну і визначити їх вміст [9]. Функціонально неактивні форми протромбіну накопичуються у плазмі крові при активації системи зсідання крові (ВЗК-синдром) та при лікуванні антикоагулянтами непрямої дії.

Слід пам'ятати, що даний параметр не вичерпує характеристику змін у системі гемостазу. Тому моніторинг стану системи гемостазу, особливо в умовах клінічного стаціонару, потребує комплексного підходу.

Існує низка маркерів активації системи зсідання крові, одним із яких є розчинні фібрино-мономерні комплекси (РФМК). Утворення навіть мінімальної кількості РФМК є показником тромбінемії.

На рис. 4 подані результати аналізу стану системи гемостазу хворих за гострого інфаркту міокарда. У всіх випадках поява у плазмі крові функціонально неактивних форм протромбіну (визначаються за різницею результатів протромбінового та екамулінового тестів) пов'язана з активацією системи гемостазу, на що вказує також накопичення в плазмі крові РФМК. Пряма кореляція між цими показниками відсутня, але одночасне виявлення функціонально неактивних форм протромбіну та РФМК підтверджує активацію системи зсідання крові та інформує про ступінь її активації [8].

Висновки. Для діагностики тромбінемії необхідний комплексний аналіз функціонального стану системи гемостазу. Використання пари тестів "екамуліновий" та "протромбіновий час" дає змогу виявити і визначити вміст функціонально неактивних форм протромбіну, що є маркерами активації системи гемостазу та з'являються в кров'яному руслі, зокрема при лікуванні антикоагулянтами непрямої дії.

Одночасне виявлення функціонально неактивних форм протромбіну та розчинних фібрино-мономерних комплексів підтверджує активацію системи зсідання крові та інформує про ступінь її активації.

При проведенні хронометричних тестів "протромбіновий час" та "екамуліновий час" необхідно враховувати дозу введення та час виведення гепарину.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Баркаган З.С., Момот А.П.* Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза. — Изд. 2-е доп. — М.: Ньюдиамед, 2001. — 280 с. 2. *Волков Г.Л., Платонова Т.Н., Савчук А.Н.* Современные представления о системе гемостаза. — К.: Наук. думка, 2005. — 296 с. 3. *Зубаиров М.Д.* Молекулярные основы свертывания крови и тромбообразования. — Казань: ФОН, 2000. — 321 с. 4. *Колмен Р.У.* Нарушения реакций образования тромбина. — М.: Медицина, 1988. — 240 с. 5. *Корольова Д.С., Виноградова Р.П., Чернишенко Т.М. та ін.* Використання екамуліну — активатору протромбіну із отрути ефи багатолускової в клінічній лабораторній діагностиці // Лаб. діагностика. — 2006. — Т. 37, № 3. — С. 18–22. 6. *Корольова Д.С., Чернишенко В.О., Платонова Т.М.* Вплив гепарину на показники тестів протромбінового та екамулінового часу // Лаб. діагностика. — 2006. — Т. 38, № 4. — С. 22–26. 7. *Момот А.П.* Принципи, методи і засоби лабораторної діагностики патології системи гемостазу на сучасному етапі // Лаб. діагностика. — 2004. — № 2. — С. 52–70. 8. *Платонова Т.Н., Чернышенко Т.М., Горницкая О.В. и др.* Комплексная лабораторная диагностика нарушений системы гемостаза при диссеминированном внутрисосудистом свёртывании крови // Лаб. диагностика. — 2000. — № 3. — С. 3–11. 9. *Платонова Т.Н., Сушко Е.А., 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 // Укр. биохим. журн. — 1995. — Т. 67, № 4. — С. 75–79. 10. *Тарасова Л.Н., Репнякова Е.М., Владимирова С.Г.* Получение активных экстрактов для приготовления тромбопластина растворимого // Клин. лаб. диагностика. — 2004. — № 7. — С. 21–24. 11. *Spronk H.M.H., Govers-Reimslag J.W.P. et al.* The Blood Coagulation System as a Molecular Machine // Bio Essays. — 2003. — Vol. 25. — P. 1220–1228. 12. *Hoffman R., Benz E.J., Shattil*

S.J. et al. Hematology. Basic Principles and Practice // Churchill Livingstone. — 1995. — P. 1577–1589. 13. *Khanin M.A., Rakov D. V., Kogan A.E.* Mathematical Model for the Blood Coagulation Prothrombin Time Test // Thrombosis Research. — 1998. — N89. — P. 227–232. 14. *Kornalik F.* Use of Ecarin in Diagnosis of Coagulant Disorders // Haemostasis and Animal Venoms / Ed. by Pirkle H., Markland F. S., 1988. — 628 p. 15. *Steffel J., Luscher T.F., Tanner F.C.* Tissue Factor in Cardiovascular Deseases. Molecular Mechanisms and Clinical Implications // Circulation. — 2006. — Vol. 113. — P. 722–731.

Стаття надійшла до редколегії 15.07.07

THROMBOPLASTINE AND ITS USE IN CLINICAL LABORATORY DIAGNOSTICS

D. KOROLOVA, V. CHERNYSHENKO, T. PLATONOVA

Couple of tests "ecamulin time" and "prothrombin time" are expedient to use for characteristing clotting system state sinse comparing results of these tests makes it possible to find functionally inactive prothrombin forms, which appear during oral anticoagulant treatment and clotting system activation. Simultaneous detection of functionally inactive prothrombin forms and soluble fibrin–monomer complexes confirms clotting system activation and provides its activation level data.

Key words: thromboplastin, prothrombin, snake venom.

ТРОМБОПЛАСТИН И ЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В КЛИНИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ

Д.С. КОРОЛЬОВА, В.О. ЧЕРНИШЕНКО, Т.М. ПЛАТОНОВА

Для характеристики состояния системы свертывания крови целесообразно использовать тесты "экамулиновое время" и "протромбиновое время". Сравнение результатов этих тестов позволяет обнаружить функционально неактивные формы протромбина, которые появляются при лечении антикоагулянтами непрямого действия и активации системы свертывания крови. Одновременное выявление функционально неактивных форм протромбина и растворимых фибрин-мономерных комплексов подтверждает активацию системы свертывания крови и предоставляет информацию о степени ее активации.

Ключевые слова: тромбопластин, протромбин, яд змей.

УДК 616.24-002.5-071

І.Г. ІЛЬНИЦЬКИЙ, К.Д. МАЖАК, Л.І. ІЛЬНИЦЬКА
Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького,
Львівський НДІ епідеміології і гігієни

Характер біохімічних зрушень при туберкульозі на тлі хронічного бронхіту у підлітків в умовах хіміоозонотерапії

За останнє десятиріччя в Україні спостерігається подальше зростання захворюваності, хворобливості і смертності від туберкульозу серед різних вікових груп населення, включаючи дітей та підлітків [7, 12]. Ріст питомої ваги поширених форм туберкульозу легень, ускладнених деструктивними змінами, медикаментозною резистентністю мікобактерій туберкульозу, неспецифічним запаленням у вигляді хронічного бронхіту та хронічних обструктивних захворювань легень призвів до зниження ефективності лікування даної категорії пацієнтів [13], що і визначило актуальність проведених досліджень.

© І.Г. Ільницький, К.Д. Мажак, Л.І. Ільницька, 2007