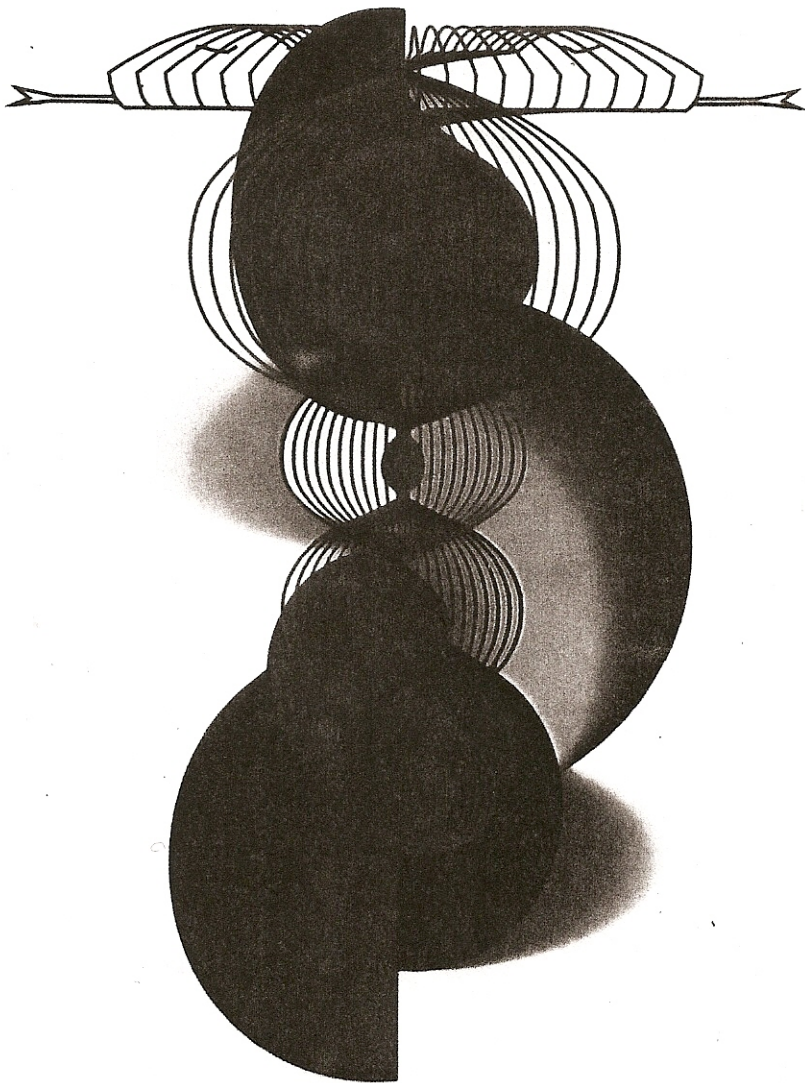


ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА
ТА КЛІНІЧНА
ФІЗІОЛОГІЯ
І БІОХІМІЯ



1 | 2006

УДК 577.151.6:612.115

† О.М. САВЧУК, В.О. ЧЕРНИШЕНКО, Є.М. КРАСНОБРИЖА, О.В. БЄЛЯЄВ,
Є.Д. МОРОЗ, Т.М. ПЛАТОНОВА, Г.Л. ВОЛКОВ
Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ
Київська медична академія післядипломної освіти ім. П.Л. Шупика

Розчинні фібрин-мономерні комплекси — маркери розвитку внутрішньосудинного мікрозсідання крові

Дослідження молекулярних механізмів регуляції білок-білкових взаємодій у системі зсідання крові — необхідна передумова розуміння перебігу опосередкованих ними фізіологічних та патологічних процесів. За різних патологічних станів (запальні процеси, стреси, онкологічні захворювання, ускладнення під час вагітності, серцево-судинні захворювання та ін.) спостерігається різке підвищення вмісту фібриногену в плазмі крові на фоні активації системи зсідання, що супроводжується розвитком внутрішньосудинного мікрозсідання крові (ВЗК-синдром) [21].

Ступінь активації системи зсідання крові визначається накопиченням розчинного фібрину, DD-фрагмента фібрину, фібринопептиду А, тромбін-антитромбінового комплексу, фрагмента 1+2 протромбіну [11, 20].

Важливим показником розвитку ВЗК-синдрому є розчинні комплекси мономерного фібрину з фібриногеном та продуктами деградації фібриногену/фібрину — розчинні фібрин-мономерні комплекси (РФМК). Накопичення РФМК свідчить про патологічну активацію системи зсідання крові та про порушення динамічної рівноваги між функціонуванням систем зсідання крові і фібринолізу [17].

Активація системи зсідання крові та поява розчинного фібрину і мікрозгустків супроводжуються активацією фібринолітичної системи, що призводить до підвищення вмісту продуктів деградації фібриногену/фібрину в плазмі крові людини. З'ясовано, що вони впливають на всі ланки системи гемостазу і беруть участь у багатьох біологічних процесах: підвищують проникність стінок судин, впливають на процес агрегації тромбоцитів, синтез фібриногену, активацію системи фібринолізу [12, 18]. Накопичення продуктів деградації фібриногену/фібрину в плазмі крові під час тромболітичної терапії може сприяти крововиливу, що ускладнює перебіг лікування хвороби та сприяє виникненню коагулопатій різної етіології.

Тому виявлення продуктів деградації фібриногену/фібрину в плазмі крові при різних патологіях, дослідження процесу комплексоутворення їх з фібрин-мономером, а також вивчення впливу утворених РФМК на процеси гемокоагуляції та фібринолізу є важливими насамперед для розуміння механізмів взаємозв'язку між функціонуванням ланок системи гемостазу в організмі і мають не тільки теоретичне, а й практичне значення.

Мета нашої роботи — з'ясування особливостей складу розчинних фібрин-мономерних комплексів, що накопичуються в плазмі крові при різних патологіях, та вивчення впливу цих комплексів на процес зсідання плазми крові.

Матеріал і методи досліджень. Для характеристики системи зсідання крові визначали вміст фібриногену, фактора X, антитромбіну III, протеїну С, розчинного фібрину [4, 5, 10]. Для характеристики внутрішнього та зовнішнього шляхів зсідання крові визначали активований частковий тромбопластиновий час, протромбіновий час [2, 6]; для характеристики кінцевого етапу системи зсідання крові визначали тромбіновий час (ТЧ) та анцистроновий час (АЧ) (аналог рептилазного часу) [1, 9, 19]. Склад фракцій РФМК характеризували методом диск-електрофорезу та вестерн-блотингу [16].

Результати досліджень та їх обговорення. Поява в кровоплинні тромбіну супроводжується перетворенням фібриногену на фібрин-мономер, який може утворювати олігомерні комплекси між собою, фібриногеном, фібронектином та продуктами деградації фібриногену/фібрину. Накопичення РФМК у кровоплинні є фактором ризику тромбоутворення [13, 15]. Для діагностики стану системи гемостазу та прогнозування розвитку тромботичних ускладнень необхідна якісна та кількісна характеристика розчинних фібрин-мономерних комплексів у плазмі крові.

Активацію системи зсідання крові виявляють імунохімічними методами з використанням антитіл до фібринопептидів А та методами, що ґрунтуються на здатності РФМК стимулювати перетворення плазміногену в плазмін під дією тканинного активатора плазміногену [22]. Широко використовують паракоагуляційні тести: етаноловий, β -нафтоловий і протамінсульфатний тести [2, 6]. Однак під час порівняння їх чутливості виявлено, що залежно від вмісту фібриногену етаноловий та β -нафтоловий тести можуть давати як псевдопозитивні, так і псевдонегативні результати. Це пов'язано з осадженням РФМК разом з фібриногеном. Протамінсульфатний тест більш чутливий, але точність його залежить від якості протамінсульфату [7, 8]. В останні роки широко застосовують метод визначення РФМК із використанням 0-фенантроліну гідрохлориду [2].

У зазначених дослідженнях під час аналізу стану системи гемостазу було використано комплекс тестів, який дає змогу визначити більш ніж 20 параметрів цієї системи. Для визначення РФМК було застосовано експрес-метод із використанням фосфатних буферів, який є високочутливим та інформативним і дає змогу визначити вміст РФМК у плазмі крові [8, 10].

У результаті комплексного аналізу стану системи зсідання крові хворих на гострий інфаркт міокарда (ГІМ), тромбоемболію, тяжкі опіки (площа опіку 40...70%), при хірургічному втручанні (кесарів розтин) виявлено підвищення вмісту фібриногену та істотну активацію системи зсідання крові — накопичення розчинних фібрин-мономерних комплексів, зниження активності протеїну С та антитромбіну ІІІ (табл. 1). Це свідчить про глибокі порушення системи гемостазу, що можуть зумовлювати виникнення тромботичної загрози та розвиток процесу тромбоутворення.

Таблиця 1

Основні показники системи зсідання крові за деяких патологій

Патології	Ф	РФМК	АТ ІІІ	ПС	ТЧ	АЧ
ГІМ, n=19	3,1±0,15	0,054±0,001	71,51±8,45	67,1±6,54	11,3±0,37	28,2±1,10
Тромбоемболія легенів, n=18	5,1±0,43	0,03±0,006	87,55±4,01	81,05±6,30	11,3±0,83	31,4±1,83
Тяжкі опіки, n=14	5,1±0,87	0,053±0,001	57,2±12,78	58,6±2,40	12,5±0,63	30,3 ±1,70
Кесарів розтин, n=45	5,9±0,28	0,09±0,007	87,45±3,63	58,3±4,63	10,6±0,20	31,6±0,74
Контрольна група, n=43	2,36±0,10	0	99,75±2,13	100,12±1,33	13,1±0,07	30,0±2,0

Примітка. Ф — фібриноген; АТ ІІІ — антитромбін ІІІ; ПС — протеїн С.

Традиційно до складу тестів, що характеризують стан системи зсідання крові, входять тести визначення вмісту фібриногену та часу зсідання плазми крові під дією тромбіну (тромбіновий час), іонів кальцію (час рекальцифікації), а також тромбіноподібних ферментів (рептилазний та атроксиновий часи). Перелічені тести характеризують процес зсідання

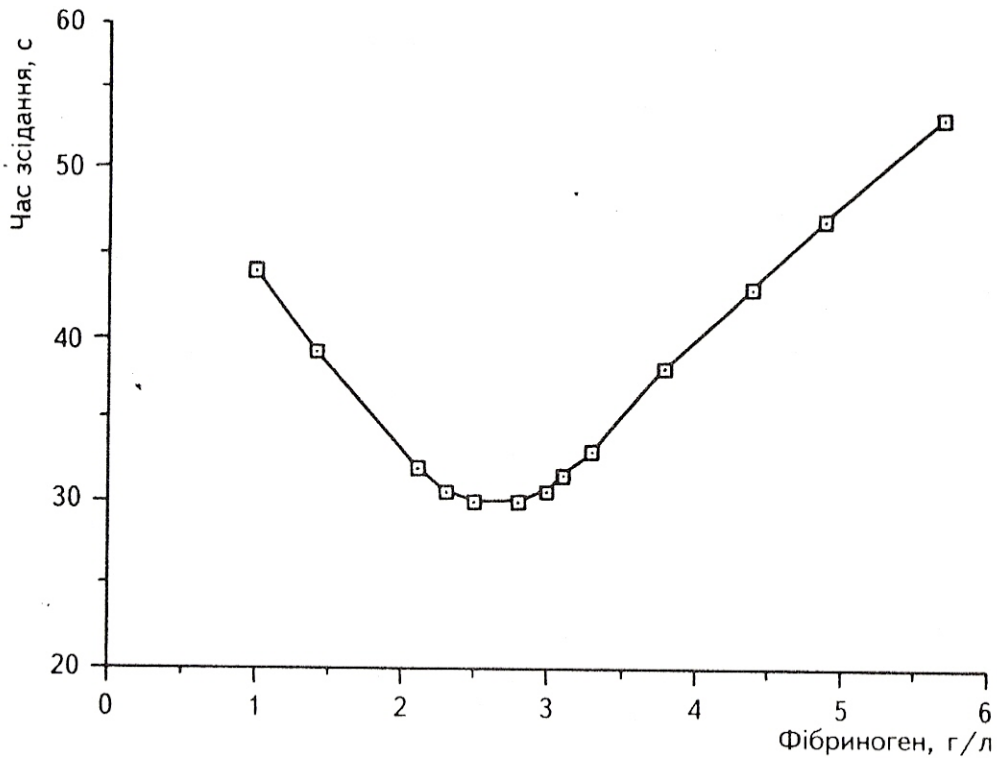


Рис. 1. Залежність часу зсідання плазми крові в тесті — анцистроновий час від вмісту в ній фібриногену

фібриногену в плазмі крові під дією екзогенного ферменту (тромбіну або тромбіноподібних ферментів) [1, 2, 9, 19].

На основі тромбіноподібного ферменту анцистрон *H*, який виділено з отрути щитомордника звичайного (*Agkistrodon halys halys*), розроблено скринінг-тест анцистроновий час [9, 10].

Умови тесту розроблені таким чином, що час зсідання плазми крові в тесті АЧ залежить від концентрації фібриногену: контрольний час зсідання плазми крові в тесті АЧ — 30 с спостерігається при коливаннях рівня фібриногену в межах нормальних показників — 2,2...3,2 г/л. Низький або високий вміст фібриногену призводить до істотного подовження часу зсідання плазми крові в тесті АЧ (рис. 1). На відміну від тромбіну тромбіноподібні ферменти не інгібуються антитромбіном III та гепарином, не активують фактора XIII і не викликають ретракцію згустків. Час зсідання плазми крові в тесті тромбіновий час істотно подовжується при антитромботичній терапії гепарином, тоді як у тесті анцистроновий час це подовження не спостерігається. Таким чином, порівняння результатів тестів ТЧ та АЧ дає змогу контролювати ефективність дії гепарину при здійсненні курсу гепаринотерапії [1, 9].

У результаті аналізу процесу зсідання плазми крові під дією анцистрону *H* ми виявили істотне зменшення часу зсідання плазми крові в тесті АЧ при високому вмісті фібриногену в плазмі крові, що може бути пов'язано з накопиченням РФМК у плазмі крові хворих. Наявний у плазмі крові розчинний фібрин пришвидшує утворення згустку під дією тромбіноподібного ферменту та зумовлює зменшення часу зсідання плазми крові. Таке зменшення часу зсідання плазми крові може бути показником тромбофілічного стану системи гемостазу.

Під час дослідження процесу зсідання плазми крові в модельних системах, у яких до донорської плазми крові додавали розчин фібринмономера, ми виявили обернено пропорційну залежність між вмістом розчинного фібрину та зменшенням часу зсідання плазми крові в тесті АЧ. З'ясували, що при підвищеному вмісті розчинного фібрину істотно зменшується час зсідання плазми крові як у тесті ТЧ, так і в тесті АЧ (рис. 2). Таким чином, можна припустити, що РФМК у плазмі крові

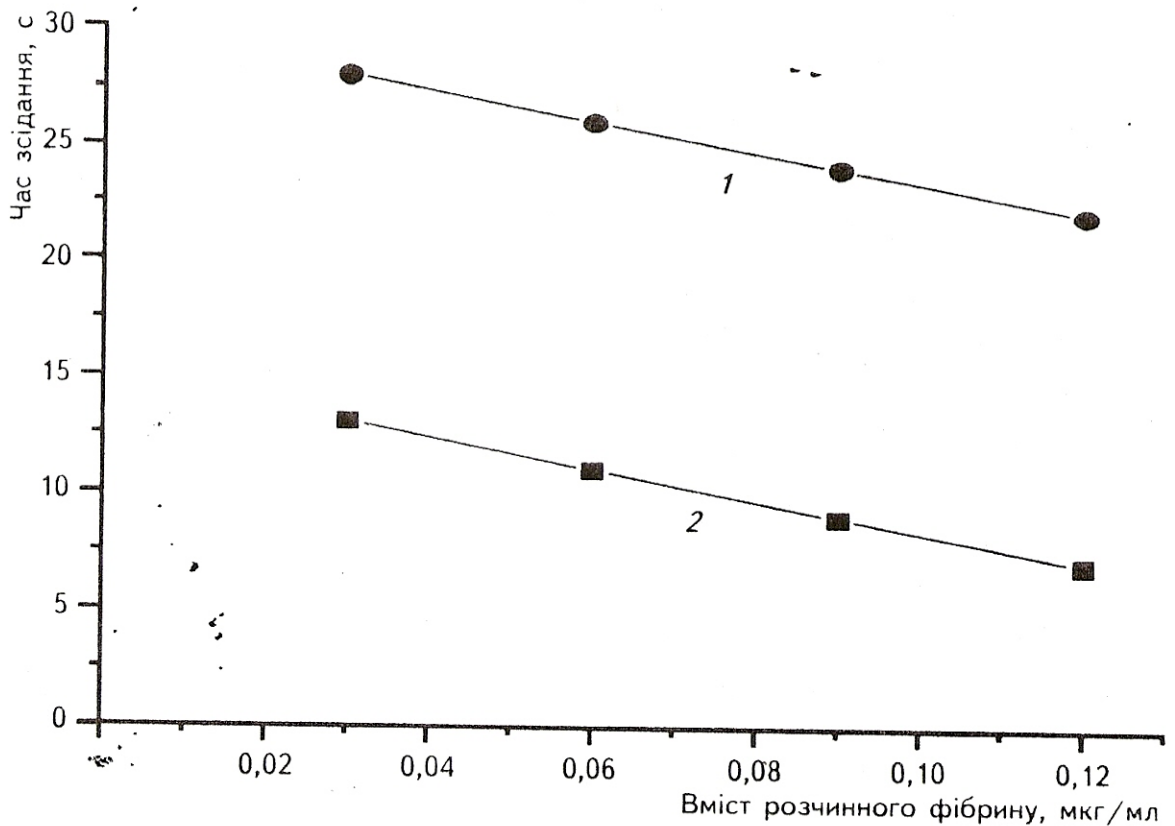


Рис. 2. Залежність часу зсідання плазми крові в тестах — анцистроновий (1) та тромбіновий (2) час від вмісту розчинного фібрину

виконують роль каталізатора, який пришвидшує зсідання плазми крові під дією екзогенного ферменту та може сприяти тромбоутворенню *in vivo*.

Результати комплексного аналізу показників системи зсідання крові та порушень функціонування системи гемостазу при абдомінальній кровотечі у хворих на виразку шлунку ($n=102$) підтвердили, що існує взаємозв'язок між часом зсідання в тесті АЧ і рівнем РФМК: накопичення РФМК призводить до істотного зменшення часу зсідання в тесті АЧ. Коефіцієнт кореляції між цими показниками становить $-0,75$. Одержані дані свідчать, що АЧ — більш чутливий функціональний тест під час аналізу кінцевого етапу зсідання крові. Імовірно, що зменшення АЧ залежить від процесу перетворення фібриногену на фібрин і швидкості утворення згустку під дією тромбіноподібного ферменту, який не інгібується антитромбіном III та комплексом антитромбін III+гепарин. На відміну від АЧ на тест ТЧ, окрім вищезазначеного, можуть впливати специфічні інгібітори серинових протеїназ плазми крові [3].

Вивчення співвідношення компонентів фракції розчинного фібрину (фібрин-мономера та продуктів деградації фібриногену/фібрину) одночасно з визначенням вмісту розчинного фібрину в плазмі крові хворих дає змогу визначити ступінь дисбалансу в системі гемостазу. Така інформація важлива як для оцінки стану системи гемостазу, так і для контролю відповідної терапії в умовах клінічного стаціонару.

Для характеристики якісного складу фракцій РФМК ми здійснювали електрофоретичне дослідження з подальшим аналізом методом вестерн-блотингу зразків фракцій розчинного фібрину, що отримані осадженням фосфатними буферами або етанолом. Дослідження провадили на плазмах крові хворих із тяжкими опіками, жінок після кесаревого розтину, ГІМ.

Під час електрофоретичного аналізу фракцій РФМК у складі комплексів виявлені білкові компоненти молекулярною масою 330, 270...240, 195, 100 та 60 кДа, що дало змогу припустити наявність комплексів фібрин-мономера з фрагментами фібриногену/фібрину (X, DD, D, E). Результати використання специфічних антитіл до фрагментів фібрино-

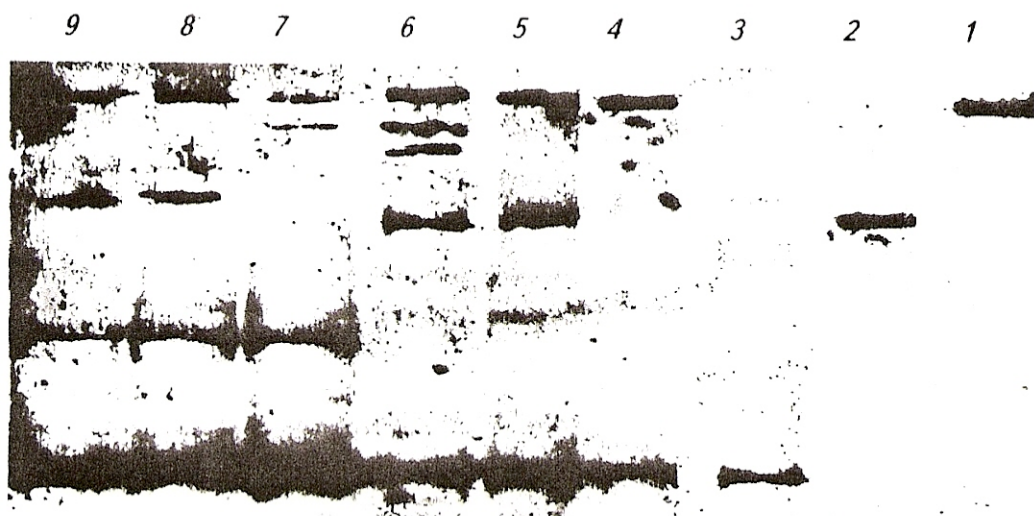


Рис. 3. Вестерн-блотинг фракцій РФМК із плазми крові хворих на ГІМ, хворих із тяжкими опіками та жінок після кесаревого розтину:

1-3 — маркери (1 — фібриноген; 2 — DD-фрагмент фібрину; 3 — E-фрагмент фібрину); 4, 7 — фракції РФМК із плазми крові при ГІМ, що осаджені етанолом та фосфатом відповідно; 5, 8 — фракції РФМК із плазми крові хворих із тяжкими опіками; 6, 9 — фракції РФМК із плазми крові жінок після кесаревого розтину

гену/фібрину підтвердили, що до фракції РФМК входять комплекси фібрину з фрагментами DD, D та E. З огляду на особливу увагу у світовій клінічній практиці до виявлення D-димеру в плазмі крові при ВЗК-синдромі, як до маркера порушення системи гемостазу, важливим є підтвердження його наявності в зразках плазми крові, що досліджувались [14]. Визначенням співвідношення фібрин-мономера та D-димеру в зразках РФМК можна з'ясувати ступінь порушень рівноваги між активацією систем зсідання крові та фібринолізу.

У результаті аналізу за допомогою програми ImageMaster TotalLab v. 2.01 типової блотограми фракцій РФМК (рис. 3), виявлено чотири основні та декілька мінорних смуг залежно від зразка, що досліджувався.

Під час порівняння складу фракцій РФМК, осаджених фосфатними буферами та етанолом, ми з'ясували, що при осадженні етанолом відбувається істотне співосадження фібриногену (від 23 до 52 %), який не входить до складу фібрин-мономерних комплексів та дає похибку під час визначення вмісту розчинного фібрину в плазмі крові. При осадженні фосфатними буферами ми спостерігали співосадження фібриногену на рівні 3...11 %, що майже не впливає на вміст РФМК у плазмі крові (табл. 2). Таким чином, вищезазначені дані свідчать про те, що фосфатний метод визначення РФМК є простим, точним, інформативним та має перевагу над іншими паракоагуляційними тестами.

Висновки. Виявлена неоднорідність складу фракцій розчинного фібрину, які містять олігомерні структури фібрину та фрагменти фібриногену/фібрину, що свідчить про одночасну активацію фібринолітичної та коагуляційної систем.

Контроль вмісту розчинного фібрину одночасно з аналізом продуктів деградації фібриногену/фібрину дає змогу виявляти ступінь дисбалансу в системі гемостазу у хворих.

Зменшення часу зсідання плазми крові в скринінг-тесті антистронувий час свідчить про гіперкоагуляцію.

Вміст деяких білкових компонентів у фракціях РФМК, %

Білкові компоненти	Зразок					
	4	5	6	7	8	9
Ф, 330 кДа	52	24	23	3	9	11
Х, 270 кДа	—	—	10	2	—	—
Х, 240 кДа	—	—	5	—	—	—
DD, 195 кДа	—	20	16	—	10	11
D, 100 кДа	—	—	—	19	21	12
Е, 60 кДа	48	56	46	76	60	66

Примітка. Ф — фібриноген; Х — Х-фрагмент; DD — D-димер; D — D-фрагмент; Е — Е-фрагмент. По значення зразків — згідно з рис. 3.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Аналіз порушень фази фібриноутворення у практично здорових осіб похилого та старечого віку за допомогою анцистронового тесту / Т.М. Платонова, О.О. Сушко, Н.І. Лукінова, Д.О. Соловійов // Фізіол. журн. — 1994. — Т. 40, № 3-4. — С. 63-70.
2. Баркаган З.С., Момот А.П. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза. — М.: Ньюдиамед, 2001.
3. Беляев А.В., Заремба А.М., Платонова Т.Н. Гемостаз у больных, оперированных по поводу абдоминальных кровотечений. Концепция изменений гемостаза // Укр. биохим. журн. — 1997. — Т. 69, № 5-6. — С. 190-195.
4. Кількісне визначення фібриногену в плазмі крові людини / В.О. Беліцер, Т.В. Варецька, К.М. Веремеєнко та ін. // Лаб. діагностика. — 1992. — № 7-8. — С. 1014-1017.
5. Комплексна лабораторна діагностика порушень системи гемостазу при дисдисемінованому внутрішньосудинному зсіданні крові / Т.М. Платонова, Т.М. Чернищенко, О.В. Горницька та ін. // Лаб. діагностика. — 2000. — № 3. — С. 3-11.
6. Меньшиков В.В. Лабораторные методы исследования в клинике. — М., 1987. — 310 с.
7. Михаловская Л.И., Варецкая Т.В., Беліцер В.А. Взаимодействие фибриногена и фибрина с протаминсульфатом // Укр. биохим. журн. — 1988. — Т. 60, № 4. — С. 3-8.
8. Определение растворимого фибрина в плазме крови / Т.В. Варецкая, Л.И. Михаловская, Л.А. Свительская, Я.М. Ена // Клинич. лаб. диагностика. — 1992. — № 7-8. — С. 10-14.
9. Соловьев Д.А., Угарова Т.П. Выделение и характеристика альфа-специфичных тромбиноподобных ферментов из ядов щитомордника обыкновенного (*Agkistrodon Halys Halys*) и щитомордника восточного (среднеазиатский подвид *Agkistrodon Halys Blomhoffii*) // Биохимия. — 1993. — Т. 58, № 8. — С. 1221-1233.
10. Сучасні методи лабораторної діагностики внутрішньосудинного мікрозсідання крові: Метод. рек. — К., 1994. — 22 с.
11. Asakura H., Jokaji H., Saito M., Uotani C. Study of the balance between coagulation and fibrinolysis in disseminated intravascular coagulation using molecular markers // Blood coagul. Fibrinolysis. — 1994. — V. 5, N 5. — P. 829-832.
12. Bell W., Graig M., Townsend R. Stimulation of fibrinogen biosynthesis by fibrinogen fragments D and E // British Journal of Haematology. — 1983. — V. 53. — P. 599-610.
13. Chen J., Nickioes T., Goddard S., Muenchen R. Coupled monitoring of soluble fibrin and D-dimer as a potential marker for acute hypercoagulable state in trauma patients // 16th International congress on fibrinolysis and proteolysis in conjunction with the 17th International fibrinogen workshop. — 2002. — N. 119. — P. 76.
14. Cushman M., Folsom A., Wang L., Aleksic N., Rosamond W., Tracy R., Heckbert S. Fibrin fragment D-dimer and the risk of future venous thrombosis // Blood. — 2003. — V. 101, N 4. — P. 1243-1248.
15. Derhaschnig U., Laggner A., Roggla M., Hirschl M. Evaluation of coagulation markers for early diagnosis of acute coronary syndromes in the emergency room // Clinical Chemistry. — 2002. — V. 48, N 11. — P. 1924-1930.
16. Harlow Ed., Lane D. Antibodies // Cold Spring Harbor Laboratory. — N. Y., 1988. — P. 726.
17. Hetland O., Knudsen A., Dickstein K., Nilsen D. Characteristics and prognostic impact of plasma fibrin monomer (soluble fibrin) in patients with coronary artery disease // Blood Coagul. Fibrinolysis. — 2002. — V. 13, N 4. — P. 301-308.
18. Horah J., Francis C. Fibrin degradation products, fibrin monomer and soluble fibrin in disseminated intravascular coagulation // Semin. Thromb. Hemost. — 2001. — V. 27, N 6. — P. 657-666.
19. Kornalik F. The influence of snake venom enzymes on blood coagulation // Phamarmac. Ther. — 1985. — V. 29, N 2. — P. 1135-1144.
20. Michiels J., Hamulyak K. Laboratory Diagnosis of hereditary Thrombophilia // Seminars in Thrombosis and hemostasis. — 1998. — V. 24, N 4. — P. 309-320.
21. Wada H., Sakuragawa N., Mori Y., Takagi M. Hemostatic molecular markers before the onset of disseminated intravascular coagulation // Am. J. Hematol. — 1999. — V. 60, N 4. — P. 273-278.
22. Wiman B. et al. Determination of soluble fibrin in plasma by a rapid and quantitative spectrophotometric assay // Tromb. Haemost. — 1986. — V. 55, N 2. — P. 189-193.

**РАСТВОРИМЫЕ ФИБРИН-МОНОМЕРНЫЕ КОМПЛЕКСЫ — МАРКЕРЫ
РАЗВИТИЯ ВНУТРИСОСУДИСТОГО МИКРОСВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ**

*А.Н. САВЧУК, В.А. ЧЕРНЫШЕНКО, Е.Н. КРАСНОБРИЖАЯ, А.В. БЕЛЯЕВ,
Е.Д. МОРОЗ, Т.Н. ПЛАТОНОВА, Г.Л. ВОЛКОВ*

Исследование состава фракций растворимых фибрин-мономерных комплексов (РФМК) показало наличие в них олигомерных структур фибрина и продуктов деградации фибриногена/фибрина. Соотношение растворимого фибрина и *D*-димера является показателем степени нарушения баланса между свертывающей системой и фибринолитической. Выявлена корреляция между накоплением РФМК и сокращением времени свертывания в хронометрических тестах.

Ключевые слова: растворимые фибрин-мономерные комплексы, микросвертывание крови.

**SOLUBLE FIBRIN-MONOMERIC COMPLEXES ARE DISSEMINATED
INTRAVASCULAR COAGULATION MARKERS**

*O. SAVCHUK, V. CHERNYSHENKO, Ye. KRASNOBRYZHA,
Ye. MOROZ, O. BIELIAYEV, T. PLATONOVA, G. VOLKOV*

Heterogeneity of the soluble fibrin fraction was determined by analysis of the soluble fibrin-monomeric complexes fraction. Presence of oligomeric fibrin structures and the fibrin fragments have been shown in this fraction. These facts indicate about simultaneous activation of fibrinolytic and coagulation systems.

Soluble fibrin level and FDP analysis allows to determine the haemostasis system disbalance degree. Blood coagulation time decreases in the ancystron time test points to hypercoagulation of haemostasis.

Key words: soluble fibrin-monomeric complexes, disseminated intravascular coagulation.