

# ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА

науково-практичний журнал

Видається з червня 1997 р., щоквартально

Свідоцтво про державну реєстрацію:  
серія КВ № 2522 від 07.03.1997

4(38).2006

## ЗМІСТ

## CONTENTS

### БІОХІМІЯ. ІМУНОЛОГІЯ

- Академік Володимир Олександрович Беліцер — засновник напрямку вивчення структури та функціонування білків системи гемостазу .... 3
- Барська М.Л., Савран В.Р., Сибірна Н.О.*  
Структурно-функціональні особливості вуглеводних детермінант глікопротеїнів мембран поліморфноядерних лейкоцитів у хворих із злоякісними пухлинами молочної залози ..... 5
- Маричев І.Л.*  
Алгоритм діагностики вірусних інфекцій TORCH-комплексу ..... 9
- Льєнга В.Р., Піпа Л.В.*  
Окислювальна модифікація білків крові у дітей з вторинним ацетонемічним синдромом на фоні гострої кишкової інфекції ..... 14
- Шипулін В.П.*  
Біохімічні дослідження в оцінці ефективності лікування хворих на хронічний гепатит ..... 17

### МЕТОДИ. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

- Корольова Д.С., Чернишенко В.О., Платонова Т.М.*  
Вплив гепарину на показники тестів протромбінового та екамулінового часу ..... 22
- Льїнська І.Ф., Матвієнко Ю.О., Ареф'єва Л.В.*  
Визначення поглинальної здатності фагоцитуючих клітин індукованого харкотиння у хворих з бронхолегевими захворюваннями. 26
- Незгода І.І., Боднарюк О.В.*  
Досвід застосування у педіатричній практиці імунохроматографічного аналізу для покращення діагностики гострих кишкових інфекцій у дітей ..... 31

### МІКРОБІОЛОГІЯ

- Марієвський В.Ф., Рубан Н.М., Кролевецька Н.М., Лук'янчук В.В., Поліщук Л.В.*  
Плазмід штама *Escherichia coli* 1257 ..... 35

### BIOCHEMISTRY. IMMUNOLOGY

- Academician Volodymyr Belitser — the creator of the direction in studying the structure and functioning of hemostasis system proteins ..... 3
- Barska M.L., Savran V.R., Sybirna N.O.*  
Structural and functional peculiarities of carbohydrate determinants of polymorphonuclear leucocyte membrane glycoproteins under malignant tumors of mammary gland ..... 5
- Marichev I.L.*  
The algorithm of diagnostics of the TORCH-complex viral infections ..... 9
- Lenga V.R., Pyra L.V.*  
Oxidative modification of blood proteins in children with a secondary acetonemic syndrome in acute intestinal infection ..... 14
- Shypulin V.P.*  
Biochemical researches in estimating the efficiency of treating the patients with chronic hepatitis ..... 17

### METHODS. EXPERIMENTAL INVESTIGATIONS

- Korolyova D.S., Chernyshenko V.O., Platonova T.M.*  
Heparin influence on the indices of the prothrombin and ecamuline time tests ..... 22
- Ilyinska I.F., Matvyenko Yu.O., Arefyeva L.V.*  
Determination of the absorbing capacity of phagocytes in induced sputum in patients with bronchial-pulmonary diseases ..... 26
- Nezgodia I.I., Bodnaryuk O.V.*  
Experience of using the immunochromatographic analysis for improving the diagnostics of acute intestinal infections in children ..... 31

### MICROBIOLOGY

- Mariyevski V.F., Ruban N.M., Krolevetska N.M., Lukyanchuk V.V., Polishchuk L.V.*  
Plasmid of *Escherichia coli* 1257 strain ..... 35

УДК 577.151.042.5: 612.115

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

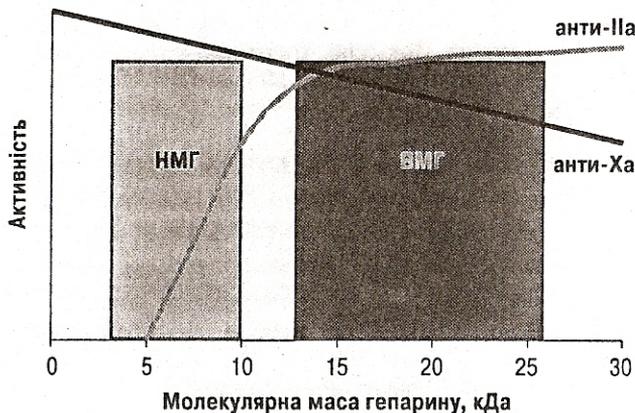
**ВПЛИВ ГЕПАРИНУ НА ПОКАЗНИКИ  
ТЕСТІВ ПРОТРОМБІНОВОГО  
ТА ЕКАМУЛІНОВОГО ЧАСУ**

*Інститут біохімії імені О.В. Палладіна АН України*

Гемостаз — біологічна система, яка забезпечує, з одного боку, збереження рідкого стану крові, а з іншого попередження кровотеч. В основі її функціонування лежить постійна динамічна рівновага між прокоагулянтною та антикоагулянтною ланками.

Прокоагулянтна ланка системи гемостазу спрямована на утворення тромбіну, ключового багатofункціонального ферменту, який відіграє провідну роль в регуляції системи гемостазу та впливає на ендотелій судин, клітини крові та фактори зсідання крові. Неактивним попередником тромбіну є протромбін, який за фізіологічних умов активується фактором Ха у складі протромбіназного комплексу [3, 4]. Вміст та функціональний стан протромбіну у плазмі крові обумовлює прокоагулянтний потенціал системи гемостазу.

Гіперкоагуляція та порушення регуляції системи зсідання крові призводить до розвитку тромботичних ускладнень, які супроводжуються



**Рис. 1.** Антитромботична дія гепарину: НМГ інгібує фактор Ха, має антитромботичну дію; ВМГ — інгібує Ха та тромбін, має антикоагулянтну дію. Із зменшенням молекулярної маси гепарину антикоагуляційний ефект знижується [19]

появою у кровотоці тромбіну. За умов клініки, попередження тромботичних ускладнень здійснюється антикоагулянтами прямої дії, зокрема препаратами гепарину, які займають особливе місце в клінічній практиці, оскільки володіють негайним антикоагулянтним ефектом [5].

Антикоагуляційна дія гепарину ґрунтується на каталітичному підсиленні дії антитромбіну III (АТ III). Зв'язування із гепарином призводить до конформаційних змін у молекулі АТ III, котре забезпечує його більшу спорідненість до активованих факторів зсідання крові. На сьогодні у клінічній практиці застосовуються препарати нефракціонованого гепарину (ВМГ) з молекулярною масою від 3 до 40 кДа та низькомолекулярні препарати гепарину (НМГ) з молекулярною масою близько 5,4 кДа (табл. 1) [10].

У той час, як НМГ прискорює виключно інактивацію фактора Ха, ВМГ додатково підсилює утворення комплексу АТ III з тромбіном. Ця різниця зумовлена тим, що для прискорення інактивації фактора Ха достатньо самих лише конформаційних змін молекули антитромбіну індукованих гепарином. І навпаки — для прискорення інактивації тромбіну додатково необхідно утворення потрійного комплексу тромбін+АТIII+гепарин. Такою здатністю володіють лише достатньо великі молекули гепарину — ВМГ (рис. 1) [9].

Важливою ознакою НМГ є також їх невисока здатність до сорбції на поверхні ендотелію судин та клітинах крові і взаємодії з білками системи гемостазу. Тому НМГ не має інгібувального впливу на фактор Va та значно рідше, ніж ВМГ призводить до тромбоцитопеній.

Відомо два типи гепариніндукованих тромбоцитопеній. Механізм першого типу нез'ясований, але відомо, що він не пов'язаний з імунними розладами і тромбоцитопенія швидко зникає після припинення лікування.

Механізм другого типу тромбоцитопеній пов'язаний з імунною відповіддю, антигеном для якої є комплекс фактору 4 тромбоцитів (ф4т) і гепарину. Коли тромбоцити активуються, ф4т вивільняється в кровоток і частково сорбується на поверхні тромбоцитів. Відомо, що у більш як 8% хворих, яким проводили гепаринотерапію, у кровотоці виявляються антитіла до комплексу

Порівняльна характеристика препаратів НМГ та ВМГ [1, 2, 6, 11, 14, 17]

Характеристики	Низькомолекулярний гепарин (НМГ)	Нефракціонований гепарин (ВМГ)
Молекулярна маса	4–8 тис. Да	3–30 тис. Да
Переважає дія	Протизсідальна	Антитромботична
Доза введення	1750 од.	5–10 (до 30) тис. од.
Біодоступність	Висока	Низька — в 4 рази менша, ніж у НМГ
Період напіввиведення	Більше 4 годин	1–4 год.
Загроза тромбоцитопенії	Низька	Висока

антигіло-ф4т-гепарансульфат [14, 17]. Комплекс антигіло-ф4т-гепарансульфат, що формується на негативно заряджених поверхнях, може активувати тканинний фактор і, таким чином, запускати каскад зсідання крові [4, 6, 11, 18]. Для своєчасного виявлення тромбоцитопенії рекомендується контроль кількості тромбоцитів кожні 2–3 доби [8].

Проведення гепаринотерапії вимагає постійного контролю за станом системи гемостазу, оскільки введення ВМГ може призводити до кровотеч (від 1 до 5%), тромбоцитопеній. Крім того, в деяких випадках спостерігається резистентність до гепарину. В клінічній практиці моніторинг гепаринотерапії здійснюється за результатами тестів протромбіновий, тромбіновий час та АЧТЧ.

На відміну від нефракціонованого гепарину дію НМГ не можна визначити по зміні АЧТЧ та тромбінового часу. У випадку необхідності використовують метод визначення активності анти фактор Ха.

Присутність у кровотоці гепарину може викривляти результати коагуляційних тестів за рахунок його здатності до комплексоутворення з вільними білками плазми крові й форменими елементами крові, що ускладнює визначення параметрів системи гемостазу.

Оскільки визначення вмісту ключового ферменту системи зсідання крові протромбіну є необхідною умовою для характеристики стану системи гемостазу, метою нашої роботи було дослідження впливу гепарину (нефракціонованого та низькомолекулярного) на активацію протромбіну тромбопластином та екамуліном у лабораторних діагностичних тестах.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Для виділення активатора протромбіну екамуліну з отрути ефі багатолускової *Echis multi-*

*squamatus* користувались йонообмінною хроматографією на DEAE-supergose.

Контрольна плазма крові — пул контрольної плазми одержували з крові 8-10 донорів (стандартний метод) [7].

Тест екамуліновий час виконували згідно з методом [5].

Тест протромбіновий час виконували згідно з методом [5].

Амідолітичну активність тромбіну визначали з використанням хромогенного субстрату S2238 (Sigma або Chromogenix H-D-Phe-Pip-Arg-pNA), відповідно до методу, який описано в інструкції Kabi Diagnostica, Швеція.

Вплив гепарину на результати діагностичних тестів визначали, застосовуючи модельну систему з використанням донорської плазми крові, в яку додавали активатори протромбіну та гепарин: нефракціонований (Белмедпрепарат, 5000 од/мл) чи низькомолекулярний (кліварин, фірми Knoll — 1750 од/мл).

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Гепарин використовується у медичній практиці для лікування та профілактики ВЗК-синдрому, ішемічної хвороби серця, тромбоемболій та інших тромботичних ускладнень.

В даній роботі особлива увага приділена визначенню впливу гепарину на час зсідання плазми крові в тесті екамуліновий час, який розроблено на основі ферменту з отрути *Echis multisquamatus*. У світовій клінічній практиці для моніторингу лікування антикоагулянтами непрямої дії застосовують аналогічні тести на основі ферментів з отрути змії [12, 13, 16].

До цієї групи активаторів протромбіну належать екарин, отриманий з отрути *Echis carinatus* та його вітчизняний аналог — екамулін з отрути змії *E. multisquamatus* [15]. Як екамулін, так і екарин активують протромбін та його функціонально

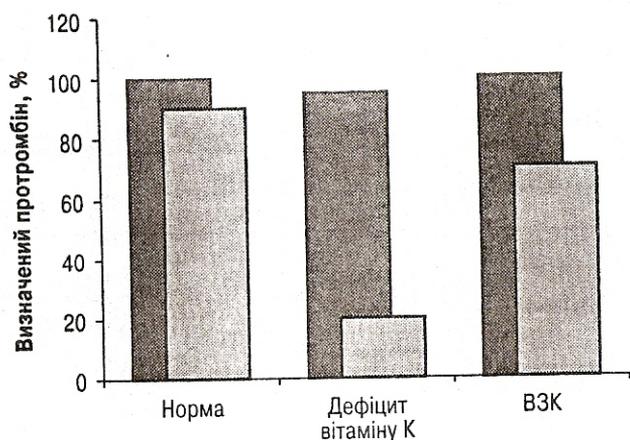
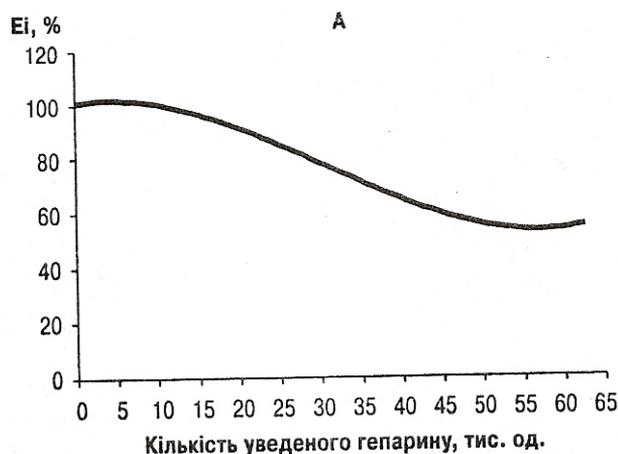


Рис. 2. Визначення вмісту функціонально неактивних форм протромбіну за різницею екаринового та протромбінового часу при дефіциті вітаміну К та дисемінованому внутрішньосудинному мікрозсіданні крові (ВЗК) [15]

■ — екарин; □ — тромбопластин

неактивні форми, до яких належать декарбоксільовані форми протромбіну, що утворюються при лікуванні антикоагулянтами непрямої дії та претромбін I (продукт неповного розщеплення протромбіну тромбіном при гіперактивації системи зсідання крові та недостатній активності фактора Ха). Така властивість екамуліну дала змогу використовувати його як реагент в діагностичних тестах.

На відміну від екамуліну, тромбопластин активує лише функціонально активні форми протромбіну. Порівняння результатів тромбопластинового та екамулінового тестів дає змогу визначати вміст функціонально неактивних форм протромбіну, що є важливим для характеристики стану системи гемостазу та моніторингу антитромботичної терапії антикоагулянтами непрямої дії (рис. 2) [9].



Вплив гепарину на активацію протромбін екзогенними активаторами вивчали на модельних системах *in vitro* двома методами: за розщепленням хромогенного субстрату S2238 та за часом зсідання плазми крові у тестах протромбіновий (ПЧ) і екамуліновий (ЕЧ) час. Модельні системи включали плазму крові донорів, до якої додавали відповідні кількості гепарину та активатор протромбіну.

Показано, що присутність у плазмі крові гепаринів у кількостях, що відповідають однократному введенню (НМГ — 1750 од. та ВМГ — 5-10 тис. од.), не впливає на об'єктивність визначення рівню протромбіну в тестах з використанням хромогенного субстрату (рис. 3).

Таким чином, використання хромогенного субстрату дає можливість визначати загальний вміст протромбіну в плазмі крові за умов гепаринотерапії (як НМГ так і ВМГ).

Водночас, порівняння впливу гепарину результати коагуляційних хронометричних тестів ПЧ та ЕЧ показало чутливість обох цих тестів ВМГ (рис. 4А).

Одноразове введення в організм 1750 од. НМГ, призводить до незначного зниження протромбінового індексу (5–7%) (рис. 4Б).

Вплив гепарину на час зсідання плазми крові в тесті ЕЧ виражений чіткіше. Так, екамуліновий індекс (ЕІ) знижується на 30–35% присутності НМГ (терапевтична доза), тоді протромбіновий індекс (ПІ) знижується не суттєво.

Висока чутливість ЕЧ до гепарину пов'язана із спеціально розробленими умовами тесту і дає змогу рекомендувати його для перевірки толерантності плазми крові до гепарину.

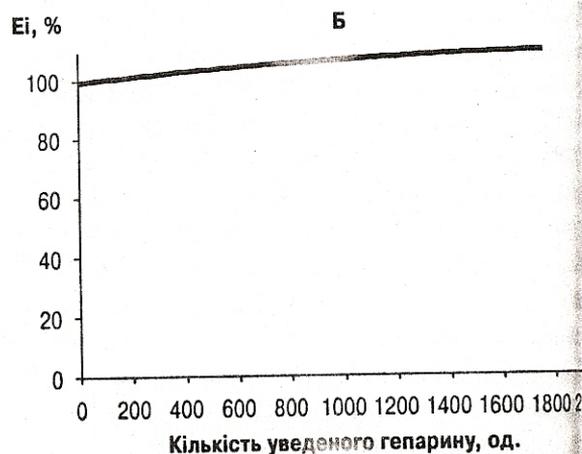


Рис. 3. Вплив нефракціонованого (А) та низькомолекулярного (Б) гепарину на визначення протромбіну в плазмі крові за розщепленням хромогенного субстрату

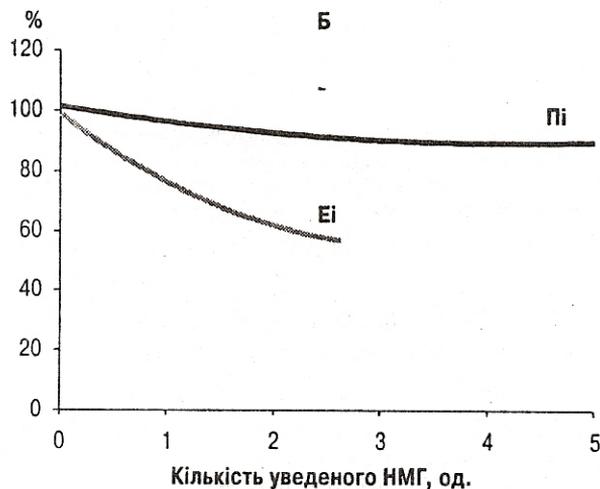
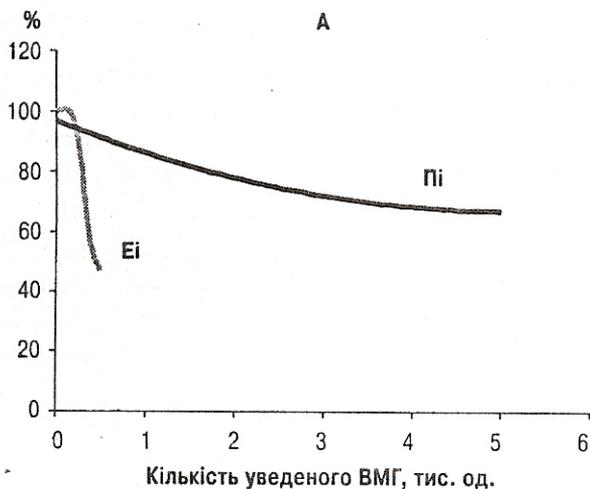


Рис. 4. Вплив нефракціонованого (А) та низькомолекулярного (Б) гепаринів на час зсідання плазми крові в тестах протромбінового та екамулінового часу

Контрольний час зсідання плазми крові в тесті ЕЧ на рівні 105–125 с було підбрано з метою створення умов для максимального виявлення функціонально неактивних форм протромбіну [9]. Обидва тести виявляють однакову чутливість до присутності гепарину, якщо наблизити контрольний час в екамуліновому тесті до значень контролю в тромбoplastиновому тесті (18–20 с) за рахунок введення більшої кількості ферменту (рис. 5). Дані результати представлені нами у міжнародному нормалізованому відношенні (МНВ) — відношенні часу зсідання досліджуваної плазми крові до часу зсідання донорської плазми крові (контролю) у ступені, що відповідає міжнародному індексу чутливості тромбoplastину [7].

Препарати тромбoplastину отримані у різних умовах та із різних джерел мають відповідно різну чутливість. Всі комерційні препарати тромбoplastину калібруються відносно стандартного (еталонного) тромбoplastину і для кожного визначається своя чутливість — МІЧ (міжнародний індекс чутливості). Для порівняння результатів дослідження протромбінового часу необхідно розраховувати МНВ. Застосування саме МНВ замість ПІ для аналізу результатів тесту протромбіновий час, дозволяє уніфікувати результати визначень із використанням різних тромбoplastинів.

## ВИСНОВКИ

1. Показано, що при проведенні хронометричних тестів протромбіновий та екамуліновий час необхідно враховувати дозу введення та час виведення гепарину. Використання хромогенного субстрату, на відміну від хронометричних тестів,

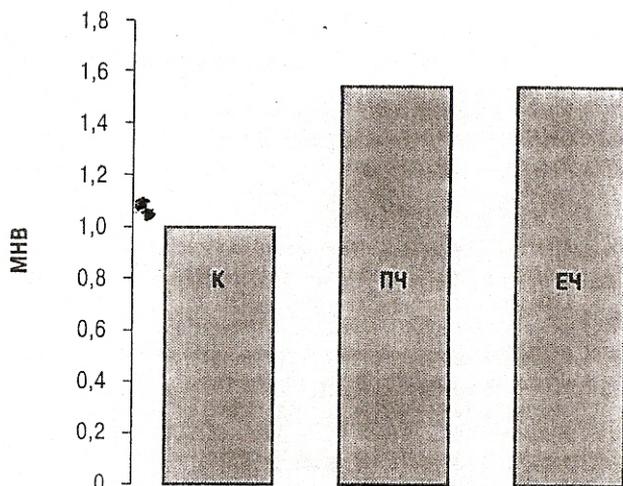


Рис. 5. Чутливість коагуляційних тестів до гепарину за контрольного часу зсідання плазми крові 20 с К — контроль, ПЧ — протромбіновий час; ЕЧ — екамуліновий час; (МНВ — міжнародне нормалізоване відношення)

дає можливість визначати загальний вміст протромбіну в плазмі крові в присутності низькомолекулярного та нефракціонованого гепарину.

2. Висока чутливість екамулінового тесту до гепарину дає змогу рекомендувати екамулін для визначення толерантності плазми крові хворих до гепарину.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Бокарев И.Н., Щепоткин Б.М., Ена И.Н. Внутрисудистое свёртывание крови. — К.: Здоровья, 1989. — 240 с.
2. Вавилова Т.В. Антитромботическая терапия и методы ее лабораторного контроля (лекция) // Клинич. лаб. диагностика, 2004. — 12 — С. 21–33.
3. Волков Г.Л., Платонова Т.Н., Савчук А.Н. Современные представления о системе гемостаза. — К.: Наукова Думка, 2005. — 296 с.

4. Зубаиров М.Д. Молекулярные основы свёртывания крови и тромбообразования. — Казань: ФОН, 2000. — 321 с.
5. Корольова Д.С., Виноградова Р.П., Чернышенко Т.М., Платонова Т.М., Волков Г.Л. Використання екамуліну — активатору протромбіну із отрути ефі багатолускової в клінічній лабораторній діагностиці // *Лаб. діагностика*, 2006. — Т. 37, № 3. — С. 18–22.
6. Могош Г. Тромбозы и эмболии при сердечно-сосудистых заболеваниях. — Бухарест: Научное и энциклопедическое издательство, 1979. — 575 с.
7. Момот А.П. Принципи, методи і засоби лабораторної діагностики патології системи гемостазу на сучасному етапі // *Лаб. діагностика*. — 2004. — № 2. — С. 52–70.
8. Пётч Б., Мадленер К., Сушко Е. Гемостазиология. Рациональная диагностика и терапия: производственное издание. — К.: Здоров'я, 2006. — 287 с.
9. 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.
10. Сенчук А.Я., Венцовский Б.М. Тромбоэмболические осложнения в акушерстве и гинекологии: монография. — К.: Макком, 2003. — 359 с.
11. Bara L., Samama M. Pharmacokinetics of low molecular weight heparins // *Acta Chir. Scand. Suppl.* — 1988. — Vol. 556. — P. 57–61.
12. Devignes J., de Maistre E., Grosjean S., etc. Use of ecarin clotting time in whole blood for monitoring recombinant hirudin treatment during cardiopulmonary bypass in patients with heparin-induced thrombocytopenia // *Ann. Biol. Clin. (Paris)*. — 2005 — Vol. 63 (2). — P. 201–208.
13. Dieri R., Alban S., Beguin S. Thrombin Generation for the Control of heparin treatment, comparison with the activated partial thromboplastin time // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. — 2004. — Vol. 2 (8). — P. 1395–1401.
14. Franchini M., Veneri D. Heparin-induced thrombocytopenia // *Recenti Prog Med*. — 2005. — Vol. 96 (9). — P. 433–435.
15. Kornalik F. Use of Ecarin in Diagnosis of Coagulant Disorders // *Haemostasis and Animal Venoms*. Edited by H. Pirkle, F.S. Markland. — 1988. — P. 628.
16. Legnani C., Preda L., Palareti G., Lunghi B., Rossi E., Coccheri S. Reduced inhibition of activated prothrombin by heparin and venous thromboembolism: heparin resistance revisited // *Am. J. Clin. Pathol.* — 1999. — Vol. 112 (5). — P. 705–711.
17. Nicolaes G.A.F., Sorensen K.W., Friedrich U. Altered Inactivation Pathway of Factor Va by Activated Protein C in the presence of heparin // *Eur. J. Biochem.* — 2004. — 271. — P. 2724–2736.
18. Rydberg E. J., Westfall J. M., Nicholas R.A. Low-Molecular-Weight Heparin in Preventing and Treating DVT // *Am. Fam. Physician*. — 1999. — Vol. 59 (6). — P. 1607–1612.
19. Samama M., Wjman A. Les nouvelles heparins de faible masse moleculaire // *Coeur*. — 1988. — Vol. 19 — P. 42–48.

## ВЛИЯНИЕ ГЕПАРИНА НА ПОКАЗАТЕЛИ ТЕСТОВ ПРОТРОМБИНОВОГО И ЭКАМУЛИНОВОГО ВРЕМЕНИ

Д.С. Корольова, В.А. Чернышенко, Т.Н. Платонова

Присутствие гепарина в кровотоке усложняет лабораторную диагностику состояния системы гемостаза, в том числе и таких важных показателей, как содержание

и функциональное состояние протромбина. Пока что при проведении хронометрических тестов протромбинового и экамулинового времени следует учитывать дозу введения и время выведения гепарина. Испытание хромогенного субстрата, в отличие от хронометрических тестов, позволяет определять общее содержание протромбина в плазме крови в присутствии низомолекулярного и нефракционированного гепарина. Благодаря высокой чувствительности экамулинового теста к гепарину дает возможность рекомендовать экамулин для определения толерантности плазмы крови к гепарину.

## HEPARIN INFLUENCE ON THE INDICES OF THE PROTHROMBIN AND ECAMULINE TIME TESTS

D.S. Korolyova, V.A. Chernyshenko, T.N. Platon

The heparin presence in blood flow complicating laboratory diagnostics of the haemostasis system stating such important parameters as the prothrombin time and the functional state. It has been shown that in comparison with the prothrombin time chronometric tests, the use of a chromogenic substrate allows one to determine the prothrombin general level in blood plasma in the presence of low molecular and non-fractionated heparin. At the same time a high sensitivity of the ecamulin test to heparin allows possible to recommend ecamulin for determining the blood plasma tolerance to heparin.