

УДК 577.151:612.128

А.С. Кондратюк, О.І. Юсова,
Т.В. Гриненко**ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ
ТКАНИННОГО АКТИВАТОРА
ПЛАЗМІНОГЕНУ В ПЛАЗМІ КРОВІ***Інститут біохімії імені О.В. Палладіна НАН України,
м. Київ*

Тканинний активатор плазміногену (t-PA) є основним фізіологічним активатором плазми крові, який забезпечує утворення плазміну, що руйнує фібринові згустки. Т-РА — серинова протеїназа, що синтезується ендотеліальними клітинами судин і секретується в систему циркуляції крові в активній формі. Активація плазміногену t-PA потребує присутності фібрину, який є кофактором реакції активації. Тобто утворення фібринового згустку ініціює процес активації фібринолітичної системи і утворення плазміну. Плазміноген і t-PA специфічно зв'язуються з фібрином, що призводить до збільшення їх локальної концентрації, зміни конформації і просторової орієнтації відносно одне одного, внаслідок чого швидкість реакції активації підвищується на 3 порядки [15, 22]. Плазмін, що утворюється, перебуваючи у зв'язаному з фібрином стані, захищений від інгібування α -2-антиплазміном і тому ефективно гідролізує фібрин на розчинні фрагменти.

Стимулюючий ефект проявляють деякі продукти бромціанового та ферментативного розщеплення фібрин(оген)у — фрагменти FCB-2 та DL відповідно [11, 26]. Ряд білків крові та позаклітинного матриксу також прискорюють швидкість активації плазміногену t-PA, але їх ефект значно слабший за фібрин [17, 23].

Фібринспецифічна дія та висока ефективність t-PA забезпечують розщеплення тромбів без вираженої системної активації фібринолізу. На теперішній час на основі рекомбінантного t-PA створено лікарські тромболітичні препарати Activase (Genentech, Inc.) та Actilyse (Boehringer Ingelheim).

t-PA є одним з важливих показників, який характеризує стан фібринолітичної системи.

Багатьма авторами у хворих на тромбози установлено зниження фібринолітичної активності крові, зменшення рівня t-PA та підвищення інгібіторів фібринолізу. Показано, що зниження фібринолітичної активності у хворих на атеросклероз відбувається за рахунок зменшення вмісту t-PA з одночасним підвищенням рівня інгібіторів. Низький рівень t-PA в плазмі крові спостерігається при патологіях нирок, у хворих на тромбофілію, ревматоїдний артрит, гострий інфаркт міокарду. Зниження активності t-PA при підвищенні рівня антигенів t-PA та його комплексу з інгібітором — PAI-1 є маркером ризику повторного інфаркту міокарду [7, 8, 21]. Наведені дані свідчать про діагностичну цінність визначення вмісту t-PA за багатьох патологій.

У нормі концентрація t-PA в плазмі крові складає 3,5–6,6 нг/мл (0,5–2,0 IU/мл), до того ж більша частина його циркулює у вигляді функціонально неактивного комплексу з специфічним інгібітором — PAI-1. Разом з тим, локальна концентрація тканинного активатора може значно підвищуватись внаслідок секреції ендотеліальними клітинами, яка регулюється різними факторами: тромбіном, гістаміном, брадікініном, ацетилхоліном, венозною оклюзією, стресом та ін. [10].

Широкого застосування для кількісного визначення антигена t-PA набули імуноферментні методи. Проте, антитіла до t-PA реагують з неактивним комплексом t-PA–PAI-1, що пояснює випадки виявлення підвищеної концентрації антигена t-PA на фоні розвитку тромботичних ускладнень. Комерційні набори, що містять полівалентні антитіла до t-PA та моноклональні антитіла до PAI-1, дозволяють за допомогою твердофазного бісайтового імуноферментного методу визначати концентрацію комплексу t-PA/PAI-1. Неактивний комплекс може впливати на активаційні властивості t-PA, конкуруючи з ним за ділянки зв'язування на фібрині [6]. Отже, разом з імунохімічними методами, існує потреба визначення в плазмі крові активності t-PA. Для цього запропоновано тест-систему COASET t-PA (Chromogenix), в якій використовують бромціанові фрагменти фібриногену людини (FCB-2) як стимулятор реакції активації плазміногену t-PA.

Метою роботи було розробити зручний та доступний для використання у лабораторній та клінічній практиці спосіб визначення активності t-PA, в якому стимулятором активації плазміногену є desAABB-фібрин бика.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

У роботі використовували: рекомбінантний t-PA (alteplase ін'єкційного препарату "Актилізе (Actilyse) 50 мг", Boehringer Ingelheim International GmbH, Німеччина), тромбін (Технологія-Стандарт, РФ), стрептокіназу (123000 IU/мг білка, Белмедпрепарат, Білорусія), контрикал (AWD, Німеччина), тест-систему COASET t-PA (Chromogenix AB, Швеція), тест-систему COATEST PAI (Chromogenix AB, Швеція), хромогенний субстрат — H-D-Val-L-Leu-L-Lys-*n*-нітроанілін·HCl (S 2251) (Chromogenix AB, Швеція), трис-(гідроксиметил)амінометан ("Merck", Німеччина), лізин-сефарозу ("Amersham Biosciences AB", Швеція), *n*-ХМБ (Sigma-Aldrich CHEMIE GmbH, Німеччина), електрофоретичні маркери молекулярної маси (Prestained Protein Ladder SM0671, Fermentas, Литва), неорганічні сполуки ступеню чистоти "хч" та "чда" вітчизняного виробника; мікротитраційні планшети (SARSTEDT, США).

Glu-плазміноген одержували з цитратної плазми крові донорів методом афінної хроматографії на лізин-сефарозі [12] в присутності контрикалу.

Фібриноген одержували з оксалатної плазми крові людини або великої рогатої худоби шляхом фракціонування сульфатом натрію в присутності соєвого інгібітора трипсину [4].

DesAABB-фібрин одержували активацією фібриногену тромбіном [3], в присутності 0,05 М 6-аміногексанової кислоти. Для інактивації фактора XIII до реакційного середовища додавали 0,09 М *n*-ХМБ. Препарати desAABB-фібрину не містили домішок плазміногену та t-PA: згусток фібрину, що утворювали з мономеру desAABB, не розчинявся в присутності 15 IU t-PA або 15 мкг плазміногену на 1 мг мономеру протягом 24 год при кімнатній температурі. Одержаний препарат зберігали в 0,125% оцтовій кислоті при 0–4°C.

Концентрацію фібриногену в плазмі крові визначали за методом [2]. Вміст плазміногену в плазмі крові визначали відповідно до методичних рекомендацій KABI Diagnostica із застосуванням хромогенного субстрату S 2251. Рівень PAI-1 в плазмі крові визначали відповідно стандартної

процедури COATEST PAI з деякими модифікаціями: замість бромціанових фрагментів фібриногену вносили таку ж кількість desAABB-фібрину бика. Спонтанний лізис еуглобулінів та розчинний фібрин визначали як описано в роботах [1, 9] відповідно.

Підготовка зразків плазми крові: кров з літрової вени відбирали в пластикову пробірку, що містила 3,8 % розчин цитрату натрію, у співвідношенні 9:1. До 1 мл цитратної крові одразу ж додавали 1 мл 0,2 М ацетату натрію (pH 3,9). Центрифугували 20 хв при 2000–5000 g. До одержаної плазми крові додавали 1М розчину соляної кислоти, у розрахунку 10 мкл на кожні 150 мкл ацетатної плазми. Підкислену плазму крові зберігають при 0–4°C протягом 4 год, або при –20°C протягом тривалого часу. Важливо проводити всі вищезазначені процедури швидко, щоб запобігти інгібуванню тканинного активатора його специфічним інгібітором PAI-1. Для відновлення нейтральних значень pH 0,2 мл одержаної підкисленої плазми крові переносили в пробірку, що містила 0,5 мл охолодженої дистильованої води і 0,55 мл 0,05 М трис-буферу (pH 8,3).

Реакцію активації плазміногену t-PA проводили в мікротитраційних планшетах, в трьох повторностях для кожної точки. Рекомбінантний тканинний активатор плазміногену (rt-PA) з активністю 580000 IU/мг білка, розчиняли в 0,2 М ацетаті натрію (pH 3,9). Активність rt-PA вихідного розчину складала 100 000 IU/мл, його зберігали при +4 °C протягом тижня. Безпосередньо перед роботою готували робочі розчини, шляхом послідовного розведенням вихідного розчину в 0,05 М трис-HCl буфері (pH 7,4).

При одержанні стандартної кривої в лунки мікропланшета вносили по 25 мкл робочих розчинів rt-PA (0,02; 0,03; 0,04; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 IU/мл), 10 мкл плазміногену та 10 мкл desAABB-фібрину з концентрацією 1 мг/мл та 3 мг/мл відповідно. Реакцію активації ініціювали внесенням в лунки 205 мкл 0,05 М трис-HCl буферу (pH 7,4), що містив S 2251 у кількості, що відповідає кінцевій концентрації 0,3 мМ. Об'єм інкубаційного середовища становив 0,25 мл. Інкубацію проводили протягом 4 год. при температурі 37°C. Реакцію зупиняли внесенням у лунку 20 мкл 50%-ої оцтової кислоти. Рівень поглинання *n*-нітроаніліну вимірювали на мікрорідері Multiskan EX Thermo (Китай) за двох довжин хвилі 405 і 495 нм та розраховували $\Delta A = A_{405} - A_{492}$. При визначенні активності t-PA в плазмі крові

в лунки мікропланшета вносили 25 мкл підготовленого зразку плазми крові. Всі інші компоненти та умови проведення реакції були як при одержанні стандартної кривої.

При дослідженні кінетики активації плазміногену t-PA в присутності desAABB-фібрину біка кінцеві концентрації білків в інкубаційному середовищі склали: 0,2 мг/мл desAABB-фібрину ($5,8 \cdot 10^{-7}$ М); 3,0 IU/мл тканинного активатора ($7,25 \cdot 10^{-11}$ М), від 0,5 до 25 мкг/мл Glu-плазміногену ($0,54 \cdot 10^{-8}$ до $26,88 \cdot 10^{-8}$ М). Реакційне середовище містило 0,3 мМ S 2251 та 0,05 М трис-НСІ буфер (рН 7,4). Об'єм інкубаційного середовища становив 0,25 мл. Інкубацію проводили протягом 40 хв. при температурі 37°C.

При визначенні впливу компонентів плазми крові на активацію плазміногену rt-PA в присутності desAABB-фібрину в лунки мікропланшета вносили по 25 мкл робочих розчинів rt-PA (0,02; 0,03; 0,04; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 IU/мл), 10 мкл плазміногену, 10 мкл desAABB-фібрину з концентрацією 1 мг/мл та 3 мг/мл відповідно та 25 мкл зразків плазми: збідненої на t-PA/PAI-1 та свіжодержаної донорської плазми (розведених в 193 рази 0,05 М трис-НСІ буфером рН 7,4), та плазми, витриманої за кислих значень рН таким чином: до 0,5 мл цитратної плазми додавали 1 мл 0,2 М ацетату натрію (рН 3,9) та 100 мкл 1М розчину соляної кислоти; підкислену таким чином плазму крові витримували протягом 10 хв, відбирали 0,2 мл та переносили в пробірку, що містила 0,5 мл охолодженої дистильованої води і 0,55 мл 0,05 М трис-буферу (рН 8,3). Реакцію активації плазміногену запускали внесенням 180 мкл 0,05 М трис-НСІ буферу (рН 7,4), що містив хромогенний субстрат. Інкубацію, зупинку реакції та вимірювання А405–492 проводили як при одержанні стандартної кривої.

Чистоту одержаних білкових препаратів контролювали методом DS-Na-електрофорезу в ПААГ з використанням маркерів молекулярних мас [16].

Концентрацію білків в розчинах визначали спектрофотометрично, за величиною оптичного поглинання при довжині хвилі 280 нм та 320 нм. Для розрахунку концентрацій використовували відповідні значення молярних коефіцієнтів абсорбції (1%, 1 см) і молекулярної маси досліджуваних білків: Glu-плазміноген — 17 і 92 кДа, фібриноген — 15,06 (рН 7,4) та 14,84 (за кислих значень рН) і 340 кДа, t-PA — 20 і 70 кДа.

Представлені на рисунках криві є типовими для серій повторюваних дослідів (не менше трьох у кожній серії).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Визначення активності t-PA в плазмі крові за стандартною процедурою COASET t-PA (Chromogenix) включає наступні етапи: екзогенний плазміноген активують до плазміну t-PA, що міститься в зразках плазми, та визначають кількість *n*-нітроаніліну при 405 нм, який вивільняється з хромогенного субстрату S 2251 внаслідок дії плазміну. Значення А 405 прямо пропорційно активності t-PA в межах 0,25–10 IU/мл плазми. Стимулятором реакції активації виступають бромціанові фрагменти фібриногену людини, що містять сайти зв'язування тканинного активатора та плазміногену [19].

Зважаючи на високу ціну комерційних тест-наборів та необхідність використання високотоксичної речовини BrCN для одержання фрагментів фібриногену, ми вирішили для визначення активності t-PA застосувати фібрин — природний кофактор реакції активації плазміногену тканинним активатором.

Для порівняння ефекторних властивостей FCB-2 та desAABB-фібрину людини вивчали залежність вивільнення *n*-нітроаніліну від кількості тканинного активатора за однакової концентрації FCB-2 та desAABB-фібрину відповідно до стандартної процедури COASET t-PA. Як видно з даних, наведених на рис. 1, за рівних умов проведення реакції швидкість активації плазміно-

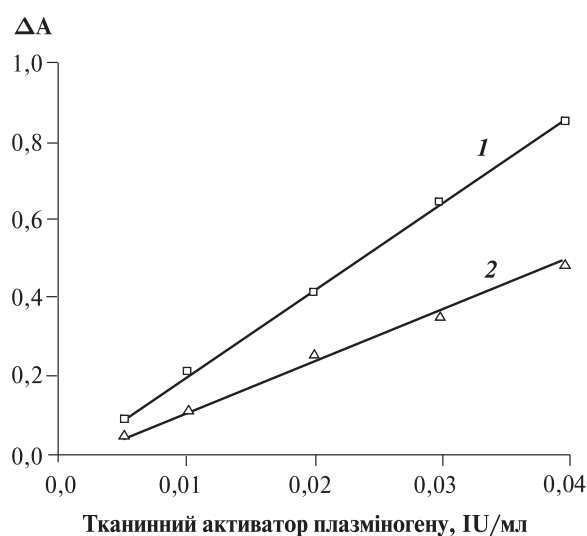


Рис. 1. Залежність вивільнення *n*-нітроаніліну з S-2251 плазміном від кількості тканинного активатора. Активацію Glu-плазміногену проводили в присутності desAABB фібрину (1) або фрагментів бромціанового розщеплення фібриногену (2)

гену t-PA в присутності desAABB-фібрину майже вдвічі перевищує таку, де кофактором виступають бромціанові фрагменти фібриногену. Це свідчить, що desAABB-фібрин має більш високі ефекторні властивості, що можна пояснити більшою кількістю на ньому плазміноген-зв'язувальних ділянок, тому що KD t-PA з фібрином та FCB-2 є однаковою — 1нМ [18].

Більш високі значення A405—492 в присутності desAABB-фібрину за всіх досліджуваних концентрацій t-PA свідчать, що фібрин, який є фізіологічним субстратом плазміну, не впливає на швидкість гідролізу ензимом хромогенного субстрату за умов реакції, коли концентрація останнього на 3 порядки перевищує концентрацію desAABB фібрину. Таким чином, desAABB-фібрин може бути використано як стимулятор активації плазміногену t-PA для визначення активності t-PA з використанням специфічного хромогенного субстрату плазміну S-2251.

Для більшої доступності визначення t-PA в клініко-лабораторній практиці на наступному етапі роботи ми вивчали ефекторні властивості desAABB-фібрину, одержаного з фібриногену плазми крові крупної рогатої худоби. Молекули фібриногену людини і бика виявляють високий ступінь гомології. Існуючі розбіжності пов'язані з замінами полярних амінокислотних залишків на полярні, а неполярних — на неполярні [13, 14]. Ці білки подібні за фізико-хімічними властивостями [25] та здатністю специфічно зв'язувати плазміноген [5].

Кінетику процесу активації Glu-плазміногену t-PA в присутності desAABB-фібрину бика вивчали з застосуванням рекомбінантного t-PA.

Для визначення концентрації плазміну, що утворюється в процесі реакції активації, попередньо було отримано ряд кінетичних кривих вивільнення п-нітроаніліну з S 2251 різною кількістю плазміну (0,25 — 3,0 мкг/мл). Для кожної кривої визначали $tg\alpha$. За цими даними будували калібрувальну криву залежності швидкості руйнування S 2251 плазміном ($tg\alpha$) від концентрації ензиму. Надалі досліджували кінетику реакції активації Glu-плазміногену t-PA за різних концентрацій субстрату. Кінетичні криві мають S-подібну форму, що пов'язано зі збільшенням швидкості активації плазміногену внаслідок часткового руйнування плазміном фібрину і появою на ньому нових плазміноген-зв'язувальних ділянок і, можливо, зміною конфорації плазміногену [20, 24]. Тангенс кута нахилу α дотичної до точки кривої визначали на 20-й хвилині реакції, де процес активації переходить в другу більш швидку фазу, а плазмін, що утворюється, гідролізує S 2251 з постійною швидкістю. За калібрувальною кривою визначали концентрацію плазміну, який утворився за 20 хв в реакції активації Glu-плазміногену t-PA та розраховували швидкість реакції: $V=[\text{плазмін}]/1200 \text{ с}$. Залежність швидкості реакції активації t-PA від концентрації плазміногену та лінеаризація одержаної кривої в координатах Лайнуївера—Берка представлені на рис. 2.

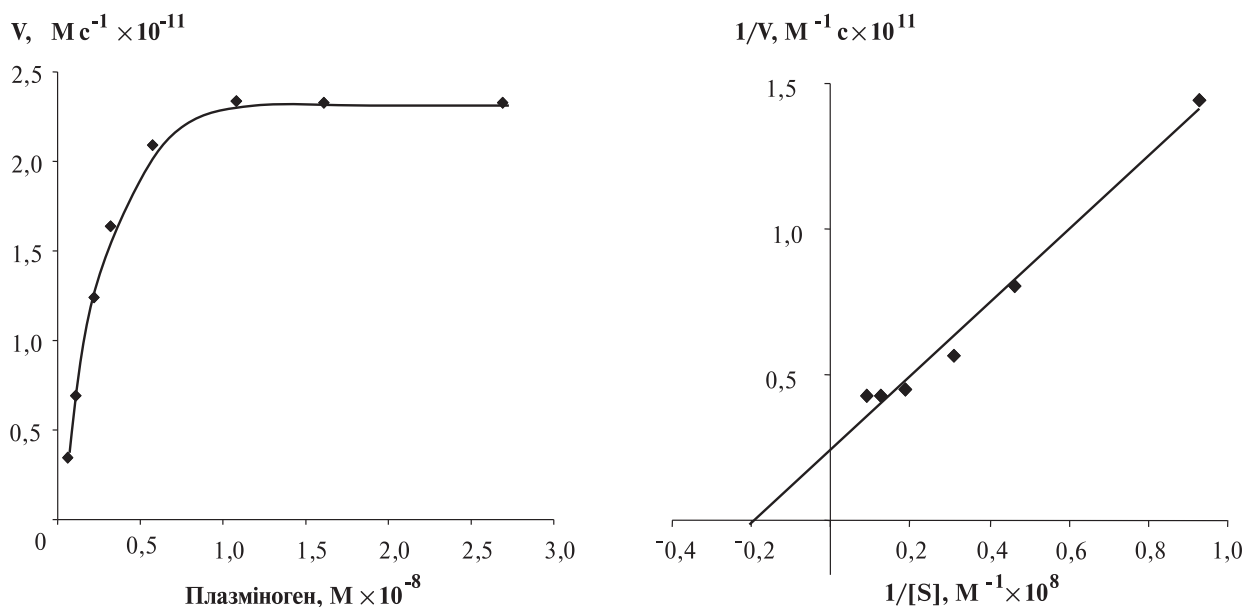


Рис. 2. Залежність швидкості активації Glu-плазміногену t-PA від концентрації плазміногену в присутності desAABB-фібрину бика (А). Лінеаризація кривої в координатах Лайнуївера—Берка (Б)

Розраховані кінетичні константи складають: $K_m=0,5$ мкМ; $k_{cat}=0,5$ сек⁻¹. Отримані значення близькі до кінетичних параметрів реакції активації Glu-плазміногену природним тканинним активатором в присутності фібрину людини [15, 22]. Отже, за каталітичними властивостями та ефективністю дії rt-PA та desAABB-фібрин бика не поступаються t-PA та фібрину людини.

Для визначення активності t-PA в плазмі крові будували калібрувальну криву: реакційне середовище містило rt-PA в кількості 0,002–0,04 IU/мл, плазміноген — 0,04 мг/мл, desAABB-фібрин — 0,12 мг/мл, 0,3 мМ S 2251 та трис-НСІ буфер (рН 7,4) (див. Матеріали та методи). Залежність значення А 405–492 від кількості одиниць тканинного активатора плазміногену в 1 мл інкубаційного середовища представлена на рис. 3.

Для визначення активності t-PA в плазмі крові в лунки мікропланшети замість стандартного розчину t-PA вносять 0,025 мл підготовленого зразку плазми крові. Все інше проводять як описано в матеріалах і методах. За калібрувальною кривою визначають кількість одиниць тканинного активатора в 1 мл інкубаційного середовища. За формулою розраховують активність t-PA в 1 мл плазми крові:

$$\begin{aligned} \text{Активність t-PA (IU/мл плазми)} &= \\ &= A \times 193 \times 0,25 \times 1,1, \end{aligned}$$

де А — кількість одиниць t-PA, визначена за калібрувальною кривою; 193 — коефіцієнт перерахунку розведення плазми крові при підготованні зразків; 0,25 — об'єм реакційного середовища; 1,1 — коефіцієнт перерахунку розведення цитратом натрію.

Якщо активність t-PA в досліджуваній плазмі нижча за 0,25 IU/мл або перевищує 2,0 IU/мл, то кількість зразка плазми, внесеного в інкубаційне середовище, треба вдвічі збільшити або розбавити відповідно.

Валідацію запропонованої методики визначення t-PA в плазмі крові проводили за типовими характеристиками.

Діапазон визначення та лінійність методу проводили за наступних умов: кількість t-PA становила 0,002; 0,004; 0,01; 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,12 та 0,16 IU в 1 мл реакційного середовища, інші компоненти якого були такими ж, як при одержанні калібрувальної кривої. З даних рис. 4 видно, що лінійна ділянка кривої знаходиться в межах 0,002–0,05 одиниць, що дорівнює 0,1–2,5 IU t-PA в 1 мл плазми крові. За фізіологічних

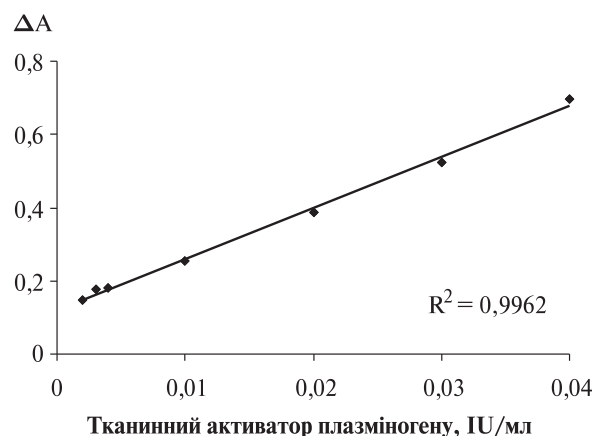


Рис. 3. Калібрувальна крива для визначення активності тканинного активатора плазміногену в плазмі крові

умов 1 мл плазми крові містить 1–2 IU t-PA, що відповідає лінійній ділянці стандартної кривої. Нижча межа визначення активності t-PA становить 0,1 IU t-PA/1 мл плазми.

Про високу точність запропонованої методики свідчить коефіцієнт кореляції, що складає 0,99 для стандартної кривої, кожна точка якої відповідає даним, отриманим в шести повторностях. Запропонований метод має високий рівень відтворюваності, що доведено трьома незалежними кривими, кожен з яких отримували з використанням нових робочих розчинів. Стандартне відхилення кривих складає менше 7,2–12,5%.

Специфічність методу досліджували, вивчаючи вплив компонентів плазми на процес активації Glu-плазміногену t-PA. Порівнювали свіжоотриману донорську плазму крові, плазму, яку витримували за кислих значень рН, як при приготуванні досліджуваного зразка, та дефіцитну на t-PA/PAI-1. Встановлено, що плазма

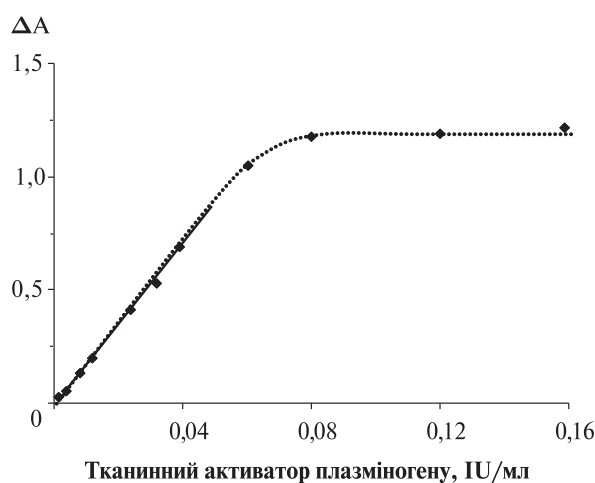


Рис. 4. Лінійність та діапазон визначення тканинного активатора плазміногену в плазмі крові

Показники системи гемостазу при онкологічних захворюваннях верхніх дихальних органів

Показники	Фібриноген, мг/мл	Розчинний фібрин, мг/мл	Плазміноген, мг/мл	Час лізису еуглобулінів, хв	t-PA, IU/мл	PAI-1, IU/мл
Обстежені						
Рак гортані (n=24)	5,4±0,4	0,098±0,003	0,153±0,12	329±29	0,82±0,2	30,8±2,1
Донорська плазма (n=15)	2,2±0,2	Не виявлено	0,158±0,9	245±6	1,94±0,45	16,4±4,1

дефіцитна на t-PA/PAI-1 та плазма, в якій інгібітори були інактивовані кислотною обробкою, не впливає на швидкість активації плазміногену різною кількістю t-PA, доданого в реакційне середовище. В той же час донорська плазма, що містить інгібітор тканинного активатора — PAI-1 та плазміну — α -2-антиплазмін, пригнічує процес активації (рис. 5). Одержані результати свідчать про специфічність реакції активації плазміногену t-PA, яка пригнічується за присутності інгібіторів, тоді як інші компоненти плазми не впливають на цей процес.

На інформативність та прогностичну значимість запропонованої методики вказують дані таблиці стосовно змін активності t-PA та деяких інших ключових показників системи згортання крові та фібринолізу у хворих на рак верхніх дихальних шляхів.

Найбільш частим та загрозливим клінічним ускладненням порушення гемостатичного балансу у хворих онкологічного профілю є розвиток венозних тромбозів, який суттєвим чином впливає на перебіг та наслідки хвороби. В плазмі

крові хворих на рак гортані нами виявлено підвищення концентрації фібриногену та вмісту розчинного фібрину. Концентрація плазміногену не змінюється, тоді як час лізису еуглобулінів подовжується. Активність t-PA знижується більш ніж вдвічі і паралельно вдвічі зростає активність PAI-1. Отримані дані вказують на порушення гемостатичного балансу — підсилення активації системи згортання крові і пригнічення фібринолітичного потенціалу, за якого виникає загроза тромботичних ускладнень.

ВИСНОВКИ

1. Показано, що кінетичні характеристики реакції активації Glu-плазміногену t-PA в присутності дезААВВ-фібрину бика близькі до таких, отриманих з використанням природного t-PA та дезААВВ-фібрину людини.

2. Запропоновано спосіб визначення активності t-PA в плазмі крові, в якому стимулятором реакції активації плазміногену є desААВВ-фібрин бика.

3. За валідаційними характеристиками запропонований спосіб відповідає загальноприйнятим вимогам аналітичних методик.

4. Доведено, що спосіб визначення активності t-PA може бути використано в клінічній та лабораторній практиці.

ЛІТЕРАТУРА

1. Баркаган З.С., Момот А.П. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза. — М.: Ньюдиамед. — 2001. — 285 с.
2. Варецька Т.В. Мікрогетерогенність фібриногену. Кріофібриноген // Укр. біохім журнал. — 1960. — Т. 32, № 1. — С. 13–24.
3. Варецька Т.В. Одержання фібрин-мономеру та вивчення деяких його властивостей // Укр. біохім. журнал. — 1965. — Т. 37, № 2. — С. 194–206.
4. Варецька Т.В., Лосева А., Яценко В. // Укр. біохім. журнал. — 1961. — № 33. — С. 657–666.
5. Гриненко Т.В. Регуляція фібринолізу некаталітичними ділянками молекул плазміногену/плазміну / Автореф. дис. ... д. біол. н. — К., 2007. — 42 с.
6. Добровольський А.Б., Титаєва Е.В. Система фібриноліза: регуляція активності и физиологические функции

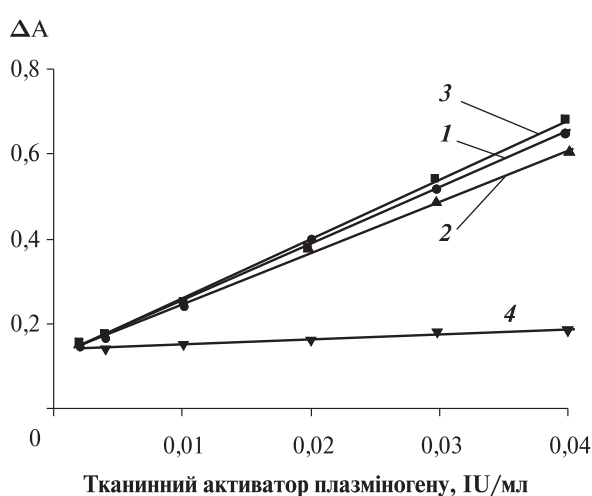


Рис. 5. 1 — стандартна крива; 2 — стандартна крива в присутності дефіцитної на t-PA/PAI-1 плазми; 3 — стандартна крива в присутності плазми, витриманої за низьких значень рН; 4 — стандартна крива в присутності свіжоодержаної плазми

- ее основных компонентов // Биохимия. — 2002. — Т. 67, № 1. — С. 116–127.
7. Долгов В.В., Свиринов П.В. Лабораторная диагностика нарушений гемостаза. — М.—Тверь: ООО “Изд-во “Триада”, 2005. — С. 139–140.
 8. Назаренко Г.И., Кишкун А.А. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований. — М.: Медицина, 2006. — 544 с.
 9. Определение растворимого фибрина в плазме крови / Т.В. Варецкая, Л.И. Михайловская, Л.А. Свистальская, Я.М. Ена // Клин. лаб. диагностика. — 1991. — № 7–8. — С. 10–14.
 10. Cesarman-Maus G., Hajjar K.A. Molecular mechanisms of fibrinolysis // Br. J. Haematol. — 2005. — Vol. 129, № 3. — P. 307–321.
 11. Conversion of fibrinogen to fibrin: mechanism of exposure of tPA- and plasminogen-binding sites / S. Yakovlev, E. Makogonenko, N. Kurochkina, W. Nieuwenhuizen, K. Ingham, L. Medved // Biochemistry. — 2000. — Vol. 39, № 51. — P. 15730–15741.
 12. Deutsch D.G., Mertz E.T. Plasminogen: purification from human plasma by affinity chromatography // Science. — 1970. — Vol. 170, № 3962. — P. 1095–1096.
 13. Henshen A., Lottspeich E., Topfer-Petersen E. Fibrinogen evolution: intra- and inter-species comparisons // Prot. Biol. Fluids. — 1980. — Vol. 28. — P. 47.
 14. Human fibrinogen: sequence, sulphur bridges, glycosylation and some structural variants / A. Henshen, E. Lottspeich, C. Southan, E. Topfer-Petersen // Prot. Biol. Fluids. — 1980. — Vol. 28. — P. 51.
 15. Kinetics of the activation of plasminogen by human tissue plasminogen activator / M. Hoylaerts, D. Rijken, H.R. Lijnen, D. Collen // J. Biol. Chem. — 1982. — Vol. 257, № 6. — P. 29112–2919.
 16. Laemli K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. — 1970. — Vol. 227. — P. 680–685.
 17. Markus G. Conformational changes in plasminogen, their effect on activation, and agents that modulate activation rates — a review // Fibrinolysis. — 1996. — Vol. 10, № 2. — P. 75–85.
 18. Medved L., Nieuwenhuizen W. Molecular mechanisms of initiation of fibrinolysis by fibrin // Thromb. Haemost. — 2003. — Vol. 89, № 3. — P. 409–419.
 19. Nieuwenhuizen W. Fibrin-mediated plasminogen activation // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 2001. — Vol. 936. — P. 237–346.
 20. Normann B., Wallen P., Ranby M. Fibrinolysis mediated by tissue plasminogen activator. Disclosure of kinetic transition // Eur. J. Biochem. — 1985. — Vol. 149, № 1. — P. 193–200.
 21. Plasma levels of tissue plasminogen activator/plasminogen activator inhibitor-1 complex and von Willebrand factor are significant risk markers for recurrent myocardial infarction / B. Wiman, T. Andersson, J. Hallqvist, C. Reuterwall, A. Ahlbom, U. deFaire // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. — 2000. — Vol. 20. — P. 2019–2023.
 22. Ranby M. Studies on the kinetics of plasminogen activation by tissue plasminogen activator // Biochim. Biophys. Acta. — 1982. — Vol. 704, № 3. — P. 466–469.
 23. Stack S., Gonzalez-Gronow M., Pizzo S.V. Regulation of plasminogen activation by components of the extracellular matrix // Biochemistry. — 1990. — Vol. 29, № 20. — P. 4966–4970.
 24. Suenson E., Lutzen O., Thorsen S. Initial plasmin degradation of fibrin as basis of a positive feedback mechanism in fibrinolysis // Eur. J. Biochem. — 1984. — Vol. 140, № 2. — P. 513–522.
 25. Williams R.C. Band patterns seen by electron microscopy in ordered arrays of bovine and human fibrinogen and fib-

- rin after negative staining // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1983. — Vol. 80, № 6. — P. 1570–1573.
26. Zammaron C., Lijnen H.R., Collen D. Kinetics of activation of plasminogen by natural and recombinant tissue-type plasminogen activator // J. Biol. Chem. — 1984. — Vol. 259, № 4. — P. 2080–2083.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ТКАНЕВОГО АКТИВАТОРА ПЛАЗМИНОГЕНА В ПЛАЗМЕ КРОВИ

А.С. Кондратиук, Е.И. Юсова, Т.В. Гриненко

Предложен способ определения активности тканевого активатора плазминогена в плазме крови с использованием дезААВВ-фибрина быка как эффективного стимулятора реакции активации, рекомбинантного тканевого активатора (Actilyse) для построения стандартных калибровочных кривых и специфического хромогенного субстрата плазмина S 2251. Сравнительные исследования показали, что способ является удобным и доступным для использования в лабораторной и клинической практике.

IDENTIFICATION OF ACTIVITY OF TISSUE PLASMINOGEN ACTIVATOR IN BLOOD PLASMA

A.S. Kondratiuk, O.I. Yusova, T.V. Grynenko

A method of identification of activity of tissue plasminogen activator (t-PA) in blood plasma with the usage of bovine desAABB-fibrin as an effective stimulator of activation, recombinant t-PA (Actilyse) for construction of standard curves and specific plasmin chromogenic substrate (S 2251) has been proposed. Comparative investigation has shown that this method is available and easy to use in laboratory and clinical practice.

УДК 612.017.616.000 618.15-076.5

Т.П. Якимова¹, А.Н. Кузьменко²

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИММУННОГО ГОМЕОСТАЗА ПРИ ГАРДНЕРЕЛЛЕЗЕ И НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ГЕНИТАЛИЙ

¹ Харьковская медицинская академия
последипломного образования

² Харьковский национальный медицинский
университет

Воспалительные заболевания наружных гениталий являются наиболее частой патологией женщин [1, 10, 12]. У пациенток, обращающихся к гинекологам, гарднереллез отличается значительной частотой [2, 3, 8]. Несмотря на немалое количество клинических, бактериологических, цитологических и других исследований, пато-