

**Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України  
Національний інститут хірургії та трансплантології  
імені О.О. Шалімова НАМН України**

**ЗАСТОСУВАННЯ ІМУНОЕНЗИМНИХ  
МЕТОДІВ ДЛЯ ЛАБОРАТОРНОЇ  
ДІАГНОСТИКИ ЗАГРОЗИ  
ВНУТРІШНЬОСУДИННОГО  
ТРОМБОУТВОРЕННЯ**

*Методичні рекомендації*

**КИЇВ 2019  
ВИДАВЕЦЬ БИХУН В.Ю.**

УДК 616.151.5  
ББК 54-11  
336

**Установа розробник:**

336 **Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України**  
**С.В. Комісаренко, В.А. Дєєв, Е.В. Луговської, І.М. Колеснікова, Т.М. Платонова, Н.Е. Луговська, О.П. Костюченко, В.О. Чернишенко, Д.С. Корольова, Т.М. Чернишенко, О.В. Ліксунов, О.В. Каширова, Е.Е. Романова.**

Застосування імуноензимних методів для лабораторної діагностики загрози внутрішньосудинного тромбоутворення. — К.: Видавець Бихун В.Ю., 2019. 36 с., іл.

ISBN 978-617-7699-02-5

*Рецензент:*

*Член-кор. НАМН України, Віце-Президент Асоціації кардіологів України, Президент Асоціації з невідкладної кардіології, Лауреат Державної премії України, д.мед.н., професор, керівник відділу реанімації та інтенсивної терапії ДУ «Національний науковий центр «Інститут кардіології імені академіка М.Д. Стражеска» НАМН України О.М. Пархоменко.*

*Художній редактор: Ганна Осадко*

У методичних рекомендаціях висвітлено особливості застосування імуноензимних методів діагностики тромбофілії, розроблених у Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України. Описано принципи дії імунодіагностиків, заснованих на застосуванні моноклональних антитіл, які завдяки своїй унікальній специфічності детектують у плазмі крові основні молекулярні маркери активації системи згортання крові: розчинний фібрин, D-димер та фібриноген. Обґрунтовано необхідність включення розроблених методів до алгоритмів клінічної лабораторної діагностики, доведено унікальне прогностичне значення одночасного визначення концентрації у плазмі крові хворих розчинного фібрину та D-димеру.

**Рекомендації підготовлено за підтримки Міністерства освіти та науки України за договором ДЗ/59-2018 від 5 листопада 2018 року «Розроблення тест-системи для одночасного визначення трьох молекулярних маркерів внутрішньосудинного тромбоутворення».**

*Рекомендовано до друку Вченою радою Національного інституту хірургії та трансплантології імені О.О. Шалімова НАМН України (Протокол №12 від 15 листопада 2019 р).*

УДК 616.151.5  
ББК 54-11

© Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна  
НАН України, Національний інститут хірургії  
та трансплантології імені О.О. Шалімова  
НАМН України, текст, іл., 2019  
© Видавець Бихун В.Ю., оформлення, 2019

ISBN 978-617-7699-02-5

## ЗМІСТ

Вступ.....	4
Тромбофілія.....	5
Аналіз інформативності скринінгових тестів за патології, що супроводжуються високим ризиком тромботичних ускладнень .....	7
Розчинний фібрин та D-димер як маркери тромбофілії .....	12
Імуноензимні тест-системи для кількісного визначення розчинного фібрину, D-димеру й фібриногену .....	15
Одночасне кількісне визначення розчинного фібрину та D-димеру.....	18
Визначення вмісту протеїну С .....	28
Висновок.....	31
Рекомендований список літератури.....	32
Патенти.....	33

## ВСТУП

Клінічна практика останніх років свідчить про підвищення частоти розвитку тромбозів різної локалізації, які також можуть призводити до інвалідності або смерті пацієнтів. Тому точна високоякісна діагностика стану системи гемостазу та своєчасне виявлення загрози тромбоутворення, прогнозування розвитку тромботичних ускладнень нині залишається однією з найважливіших проблем сучасної медицини.

На сьогодні в клінічній практиці існує низка методів для лабораторної діагностики тромбофілії, однак їхня низька чутливість та недостатня інформативність зумовлює необхідність пошуку нових підходів, які б дозволили отримувати об'єктивні дані про стан системи гемостазу та загрозу тромбоутворення.

Найбільш інформативні лабораторні методи діагностики тромбофілії ґрунтуються на кількісному визначенні у плазмі крові специфічних маркерів активації коагуляційного каскаду, ключовими з яких є розчинний фібрин та D-димер. Інформація про концентрацію розчинного фібрину та D-димеру в плазмі крові пацієнтів, особливо в динаміці лікування, необхідна для точної діагностики та моніторингу стану системи гемостазу, виявлення порушення рівноваги між системами згортання крові й фібринолізу, визначення ступеня загрози тромбоутворення, для контролю ефективності антитромботичної терапії.

## ТРОМБОФІЛІЯ

Тромбофілія — це патологічний стан, що характеризується порушенням функціонування системи гемостазу, при якому збільшується ризик розвитку тромбозу.

Причиною тромбофілії можуть бути такі патогенетичні фактори, як:

- пошкодження ендотеліальних клітин із експонуванням тромбогенних субендотеліальних структур;
- патологічна активація тромбоцитів та системи згортання крові;
- дефіцит антикоагулянтів або резистентність до антикоагулянтів;
- зниження фібринолітичного потенціалу;
- реологічні порушення та стаз;
- інфекції та сепсис.

Розрізняють генетичні (спадкові) та набуті форми тромбофілії (табл. 1). До генетичних факторів належить дефіцит фізіологічних антикоагулянтів — антитромбіну III, протеїнів C і S, поліморфізм генів протромбіну і коагуляційного фактора V (фактор V Лейден). Щодо останнього необхідно відзначити, що резистентність фактора V Лейден до активованого протеїну C — найбільш поширена форма тромбофілії, асоційована з венозними тромбозами. Набутими факторами ризику є антифосфоліпідні антитіла (люпус антикоагулянти і/або антикардіоліпінові).

Таблиця 1

Спадкові та набуті фактори ризику патологічного  
тромбоутворення

**Спадкові фактори ризику патологічного тромбоутворення**

Мутація фактора V  
(фактор V Лейден)  
Мутація гену протромбіну G20210A  
Мутація гену МТГФР (метилентетрагідрофолат редуктаза)  
Мутація гену GРІІІа рецептора тромбоцитів  
Гіпергомоцистеїнемія  
Дефіцит протеїну С  
Дефіцит протеїну S  
Дефіцит протеїну АТ ІІІ

**Набуті фактори ризику патологічного тромбоутворення**

Хірургічні втручання та травми  
Імобілізація  
Серцево-судинні захворювання  
Онкологічні захворювання, хіміотерапія  
Запальні процеси та вірусна інфекція  
Аутоімунні захворювання  
Нефротичний синдром  
Прийом гормональних контрацептивів

Розрізняють безсимптомні, симптоматичні або клінічно маніфестуючі форми тромбофілії. Хоча різні види тромбофілії мають спільні клінічні прояви, слід пам'ятати, що вони відрізняються етіологією, характером порушень, ускладненнями та прогнозом. Тому **різні види тромбофілії потребують принципово різних діагностичних, профілактичних та лікувальних заходів.**

## **Аналіз інформативності скринінгових тестів за патологій, що супроводжуються високим ризиком тромботичних ускладнень**

Лабораторна діагностика тромбофілії повинна базуватися на комплексному аналізі показників, які:

- по-перше, є маркерами активації системи згортання крові, тобто підтверджують розвиток тромбофілії;
- по-друге, сприяють з'ясуванню механізмів тромбоутворення за певної патології, тобто вказують на шляхи ефективного лікування.

При наявності відповідних клінічних симптомів тромбофілії показники лабораторної діагностики повинні сприяти точному встановленню діагнозу та слугувати основою для призначення необхідної терапії.

Таким чином, задачами лабораторної діагностики є:

- вибір тестів для виявлення ранніх маркерів активації системи згортання крові та загрози внутрішньосудинного тромбоутворення;
- своєчасне тестування стану системи гемостазу на всіх етапах лікування;
- моніторинг ефективності антитромботичної терапії.

На сьогодні у клінічній практиці для визначення характеру гемостатичних порушень і діагностики тромбофілії зазвичай використовують лише скринінгові тести, які відображають стан окремих ланок системи гемостазу (визначення функціональної активності факторів внутрішнього і зовнішнього шляхів згортання крові, споживання фізіологічних антикоагулянтів, характеристика фібринолітичного потенціалу та процесу агрегації тромбоцитів). Скринінгові тести є недостатніми для прогнозування патологічного внутрішньосудинного тромбоутворення (табл. 2).

Таблиця 2

## Скринінгові тести для оцінки окремих ланок системи гемостазу

<b>Тести</b>	<b>Результат</b>
Активованій частковий тромбoplastиновий час (АЧТЧ)	Характеристика процесу активації факторів внутрішнього шляху згортання крові. Виявлення порушення рівноваги між прокоагулянтами і антикоагулянтами
Протромбіновий час (ПЧ)	Характеристика процесу активації факторів зовнішнього шляху згортання крові
Тромбіновий час (ТЧ)	Характеристика кінцевого етапу згортання крові (перетворення фібриногену на фібрин). Виявлення гіпофібриногенемії та інгібіторів тромбіну
Вміст фібриногену	Виявлення гіпо- та гіперфібриногенемії
Спонтанний лізис еуглобулінової фракції	Спонтанна фібринолітична активність плазми крові
Агрегація тромбоцитів	Характеристика функціонування тромбоцитарної ланки гемостазу

\* — Значення показників залежить від якості реактивів і техніки виконання (ручний варіант, на коагулометрі). Важлива стандартизація кожної методики для можливості порівняння результатів різних лабораторій.



**Активований частковий тромбoplastиновий час (АЧТЧ)** характеризує ступінь активації системи згортання крові (високомолекулярного кініногену, прекалік-реїну, факторів внутрішнього шляху згортання крові: XII, XI, IX, X, V, протромбіну). Виконується для перевірки ефективності гепаринотерапії, а також для виявлення вивчаючого антикоагулянту.

**Протромбіновий час (ПЧ)** характеризує процес активації факторів зовнішнього шляху згортання крові (VII, X, V, протромбіну) і, насамперед, виконується для контролю ефективності лікування антикоагулянтами непрямої дії.

Скорочення часу згортання бодай в одному зі скринінгових тестів свідчить про активацію системи згортання крові. Однак, розвиток тромбофілії часто спостерігається при нормальному або навіть подовженому часі згортання плазми крові в коагуляційних скринінгових коагулограмах.

Скринінгові тести не дозволяють точно визначати реальний ступінь активації системи згортання крові та загрози внутрішньосудинного тромбоутворення, а відтак не є надійною основою для вибору тактики лікування. Діагностична значимість цих тестів полягає в тому, що зазвичай вдається лише визначити напрямок пошуку порушеної ланки гемостазу.

**Концентрація фібриногену.** Гіперфібриногенемія спостерігається при запальних процесах, інфекційних захворюваннях, хірургічних втручаннях, захворюваннях нирок, на останніх місяцях вагітності тощо. Підвищена концентрація фібриногену є додатковим фактором ризику тромботичних ускладнень.

Гіпофібриногенемія спостерігається при спадковому дефіциті фібриногену, синдромі внутрішньосудинного згортання крові (ВЗК-синдромі), ураженні кісткового мозку, при інфекційному мононуклеозі, порушенні синтезу фібриногену у випадку печінкової недостатності. Застосування фібринолітичних препаратів може супроводжуватись лізисом не тільки згустку фібрину, але і циркулюючого фібриногену. Різке зниження концентрації фібриногену в плазмі крові може призводити до виникнення кровотеч.

У сучасній клінічній практиці існує два різні підходи для визначення вмісту фібриногену в плазмі крові. Перший ґрунтується на згортанні фібриногену препаратами тромбіну або тромбопластину, що викликають утворення фібринового згустку. При цьому вміст фібриногену визначають за вагою утвореного згустку (метод Рутберг) або за часом згортання плазми крові (метод Клауса).

Основними недоліками цих методів є недостовірність результатів при значному зниженні вмісту фібриногену, при накопиченні у крові продуктів деградації фібрину (наприклад, при тромбозах артерій і вен, тромболізисі) та при проведенні гепаринотерапії (при гострому коронарному синдромі, інших артеріальних і венозних тромбозах).

Найбільш точні результати визначення вмісту фібриногену в плазмі крові можна отримати за допомогою імунохімічних методів, що ґрунтуються на використанні моноклональних антитіл, специфічних до фібриногену.

Розглянемо деякі приклади застосування скринінгових тестів для діагностики тромбофілії за тромбоемболії легеневої артерії (ТЕЛА), ускладненої вагітності та важких опіків.

Значне скорочення часу згортання плазми крові в тесті

АЧТЧ спостерігали у 50 % обстежених при інфаркті міокарда та у 64 % хворих на ТЕЛА. Однак, протромбіновий час при цих патологіях відповідав нормі або навіть був подовжений.

В той же час у 68,2 % жінок із ускладненою вагітністю у третьому триместрі виявлено значне скорочення часу згортання плазми крові в тесті ПЧ. Це може бути пов'язано з посиленням прокоагулянтної ланки системи гемостазу напередодні пологів, і в деяких випадках супроводжуватися надмірною активацією системи згортання крові.

Розвиток тромбофілії не завжди супроводжується скороченням часу згортання плазми крові у скринінгових тестах, прикладом чого можуть бути результати дослідження стану системи гемостазу у пацієнтів із опіками: у 39 % хворих відзначають значне уповільнення процесу активації факторів зовнішнього шляху згортання крові в тесті ПЧ і факторів внутрішнього шляху згортання крові в тесті АЧТЧ. Таке подовження часу згортання плазми крові, імовірно, пов'язано з накопиченням патологічних інгібіторів згортання крові, які маскують справжній стан системи гемостазу при важких опіках.

Таким чином, за допомогою скринінгових тестів можна лише відокремити пацієнтів з певними порушеннями системи гемостазу, але неможливо точно визначити ступінь активації системи згортання крові та прогнозувати розвиток внутрішньосудинного тромбоутворення, що необхідно для ефективного вибору антитромботичної терапії та для її моніторингу.

Важливо підкреслити, що для всіх перелічених патологій тією чи іншою мірою характерне накопичення у плазмі крові хворих розчинного фібрину. Зростання його

концентрації у плазмі крові пацієнта є прямим свідченням активації системи згортання крові та загрози тромбоутворення. Тому саме цей показник є **єдиним прогностичним молекулярним маркером** патологічного внутрішньосудинного тромбоутворення.

### **Розчинний фібрин та D-димер як маркери тромбофілії**

**Розчинний фібрин** — специфічний маркер активації системи згортання крові. Він являє собою розчинні комплекси олігомерів фібрину з молекулами фібриногену, що вільно циркулюють у крові. Підвищення концентрації розчинного фібрину свідчить про появу у кров'яному руслі тромбіну, утворення мономерного фібрину, його комплексів з фібриногеном і розчинного олігомерного фібрину. Залежно від концентрації трьох ензимів (тромбіну, фактора XIIIa та плазміну) далі відбуваються паралельні процеси стабілізації олігомерного фібрину фактором XIIIa, формування тривимірної сітки фібрину — каркаса тромбу і розщеплення фібрину.

Підвищення концентрації у плазмі крові розчинного фібрину є раннім прогностичним показником загрози внутрішньосудинного тромбоутворення. Концентрація у плазмі крові розчинного фібрину характеризує ступінь активації системи згортання крові. Патологічна активація системи згортання крові та передтромботичні стани можуть спостерігатися при хірургічних втручаннях, опіках, ускладненій вагітності, серцево-судинних захворюваннях, цукровому діабеті, онкологічних, аутоімунних захворюваннях, венозних тромбоутвореннях і емболії та при інших патологіях.

На сьогодні в Україні у клінічній практиці розчинний фібрин не визначають, а існуючі імуноензимні тест-системи не знайшли широкого застосування і у світовій клінічній практиці. Натомість визначають у плазмі крові розчинні фібрин-мономерні комплекси за допомогою таких методів:

1. Преципітація хімічними агентами (орто-фенантраліном, протамінсульфатом,  $\beta$ -нафтолом, етанолом, фосфатами калію и натрію);

2. Функціональні методи, що ґрунтуються на здатності розчинного фібрину прискорювати перетворення плазміногену у плазмін під дією t-РА.

Перелічені методи, визначення вмісту в плазмі крові розчинних фібрин-мономерних комплексів є напівкількісними, а тому не дозволяють точно проводити визначення концентрації розчинного фібрину. Імунохімічні методи визначення розчинного фібрину дозволяють з високою точністю визначати концентрацію розчинного фібрину і таким чином адекватно оцінювати ризик внутрішньосудинного тромбоутворення. На сьогодні кількість таких тест-систем є обмеженою у зв'язку з малою кількістю фібринспецифічних моноклональних антитіл, придатних для використання у тест-системах, адаптованих для промислового виробництва.

Визначенню концентрації **D-димеру** в плазмі крові у лабораторній діагностиці приділяється особлива увага. D-димер — *найбільший* кінцевий продукт плазмінового розщеплення фібрину, стабілізованого фактором XIIIa. Тест для кількісного визначення D-димеру входить у всі алгоритми діагностики тромбозу глибоких вен, тромбоемболії легеневої артерії та інших патологій, пов'язаних з внутрішньосудинним венозним тромбоутворенням. Підвищений рівень D-димеру опосередковано вказує на утворення фібрину в плазмі крові, на його стабілізацію

фактором XIIIa, та лізис плазміном стабілізованого фібрину. Єдиним способом визначення концентрації D-димеру є імуноензимний аналіз. Нині у клінічній практиці застосовують високовартісні імпортні тест-системи.

Підбір найбільш інформативних для певної патології лабораторних діагностичних тестів дає можливість не тільки прогнозувати розвиток тромботичних ускладнень, а й одержувати важливу інформацію для правильного призначення та контролю ефективності антитромботичної терапії (табл. 3).

Алгоритм діагностики системи гемостазу має включати визначення в плазмі крові пацієнтів концентрації розчинного фібрину та D-димеру як основних маркерів порушень функціонування системи гемостазу. В ряді випадків суттєву інформацію надає визначення концентрації фібриногену, вмісту протеїну С та антитромбіну III.

*Таблиця 3*

Інформативність лабораторних діагностичних тестів для визначення вмісту маркерів активації системи згортання крові за різних патологій

Патологія \ Тести	Інфаркт міокарда, ТЕЛА	Оперативне втручання	Тяжкі опіки	Ускладнена вагітність	СЧВ
АЧТЧ	+	-	-	-	+
ПЧ	-	-	-	+	-
Вміст фібриногену	+	++	++	++	+
РФ	+	++	++	+	++
D-димер*	+	++	++	++	+
Активність фактора Ха	-	-	++	++	-
ПС	++	++	++	++	++
АТШ	++	+	++	+	+

+ - показник є інформативним при даній патології; - - показник не є інформативним; СЧВ — системний червоний вовчак; \* - у випадку, коли D-димер відсутній на тлі високого розчинного фібрину потрібен особливий контроль.

## Імуноензимні тест-системи для кількісного визначення розчинного фібрину, D-димеру й фібриногену

На основі отриманих в Інституті біохімії ім. О.В. Паладіна НАН України моноклональних антитіл було розроблено методи визначення розчинного фібрину, D-димеру та фібриногену в плазмі крові, які можуть стати основою високочутливих та специфічних тест-систем для визначення цих молекулярних маркерів у лабораторній діагностиці. Принцип аналізу в розроблених тест-системах базується на бісайтовому твердофазному імуноензимному аналізі. Як імуносорбент в ньому використовуються високоспецифічні моноклональні антитіла до розчинного фібрину, D-димеру та фібриногену. Завдяки унікальній специфічності моноклональні антитіла (FnI-3C, III-3B та 2d-2a) зв'язують із досліджуваного зразка плазми крові вибірково тільки фібрин, D-димер або фібриноген відповідно і не реагують з іншими протеїнами плазми крові. Далі з молекулярним маркером, що зв'язався з імуносорбентом, зв'язується вторинне детектуюче моноклональне антитіло II-4d, специфічне до трьох вказаних молекулярних маркерів. Його використання дозволяє здійснювати детекцію всіх трьох молекулярних маркерів з однаковою ефективністю.

Підсилення сигналу в тест-системах досягається завдяки біотинілюванню антитіла II-4d та наступному утворенню комплексу біотин-стрептавідин-пероксидаза. Забарвлення відбувається за рахунок окислення пероксидазою субстрату — тетраметилбензидину або ортофенілендіаміну. За інтенсивністю забарвлення роблять висновок про концентрацію молекулярного маркера, яку

визначають кількісно за калібрувальною кривою, побудованою з використанням протеїну-калібратора (фібрину, D-димеру або фібриногену відповідно).

У плазмі крові здорових донорів концентрація D-димеру, що визначена з використанням розроблених методів, варіює в діапазоні 0-100 нг/мл, а концентрація розчинного фібрину становить до 0-3 мкг/мл.

Завдяки використанню моноклональних антитіл високоспецифічних до молекулярних маркерів загрози тромботворення — фібриногену, розчинного фібрину, D-димеру — вдалося уникнути перехресної реакції з іншими протеїнами плазми крові. Використання розроблених методів дозволяє визначати у плазмі крові мінімальні концентрації фібриногену від 2,5 мкг/мл, розчинного фібрину від 0,5 мкг/мл та D-димеру від 10 нг/мл.

Такий підхід забезпечує швидке та точне визначення у плазмі крові людини наявності та кількості трьох молекулярних маркерів активації системи гемостазу — розчинного фібрину, D-димеру та фібриногену. Методи прості та надійні в роботі, що важливо для їх використання в тест-системах для широкої клініко-лабораторної практики. Основні їхні переваги такі:

- використання високоспецифічних до розчинного фібрину, D-димеру та фібриногену моноклональних антитіл власного виробництва;
- висока чутливість;
- автоматичне кількісне визначення вказаних молекулярних маркерів;
- стабільність імуносорбенту під час зберігання.

Однчасне кількісне визначення трьох найголовніших молекулярних маркерів активації системи гемостазу: розчинного фібрину, D-димеру та фібриногену, особливо в



динаміці лікування, необхідне для одержання інтегральної картини щодо стану системи згортання крові, діагностики передтромботичних станів, своєчасного призначення та моніторингу ефективності антитромботичної терапії за різних патологій.

Розроблені тест-системи було успішно апробовано в клініці для дослідження стану системи гемостазу пацієнтів за патологій, пов'язаних із загрозою внутрішньосудинного тромбоутворення: серцево-судинними хворобами, ускладненою вагітністю, хворих на діабет, на різних етапах хірургічного втручання (аневризма черевної аорти, тромбоз глибоких вен, ендопротезування кульшового суглоба) та за інших патологій. Розглянемо деякі показові випадки, коли застосування розроблених нами імунодіагностикумів дозволило охарактеризувати стан системи згортання крові та визначити загрозу розвитку тромбофілії.

## Одночасне кількісне визначення розчинного фібрину та D-димеру

**Приклад 1.** Оперативне втручання — один із факторів, що має значний вплив на систему гемостазу. В післяопераційний період порушення роботи системи гемостазу можуть поглиблюватись. Операції з приводу аневризми черевної аорти є найбільш важкими та небезпечними в судинній хірургії, оскільки пов'язані з високою летальністю. Аналіз стану системи згортання крові напередодні операції з приводу аневризми черевної аорти засвідчив, що у 55 % хворих значно підвищений вміст у плазмі крові фібриногену (від 4 до 7 г/л), у 91 % — розчинного фібрину (від 4,1-128 мкг/мл, при нормі 1-3 мкг/мл), у 100 % — D-димеру (від 171,2 до 1429 нг/мл, при нормі  $70 \pm 20$  нг/мл). Активність фізіологічного антикоагулянту протеїну С у 25 % хворих значно знижена. Таким чином, **ще до операції у таких пацієнтів спостерігається значна активація системи згортання крові та ознаки тромбофілії.**

Для детального аналізу стану системи згортання крові пацієнтів до операції умовно розділили на дві групи: в першу групу включили пацієнтів з невисоким вмістом розчинного фібрину в плазмі крові (нижче подвійної норми — менше 6 мкг/мл), а в другу групу — пацієнтів із високим вмістом розчинного фібрину (вище подвійної норми — більше 6 мкг/мл). Після операції було виявлено значне зростання вмісту маркерів тромбофілії (розчинного фібрину та D-димеру) в плазмі крові хворих другої групи (рис. 1 А). Крім того, у 35 % з пацієнтів другої групи спостерігали знижену активність протеїну С.

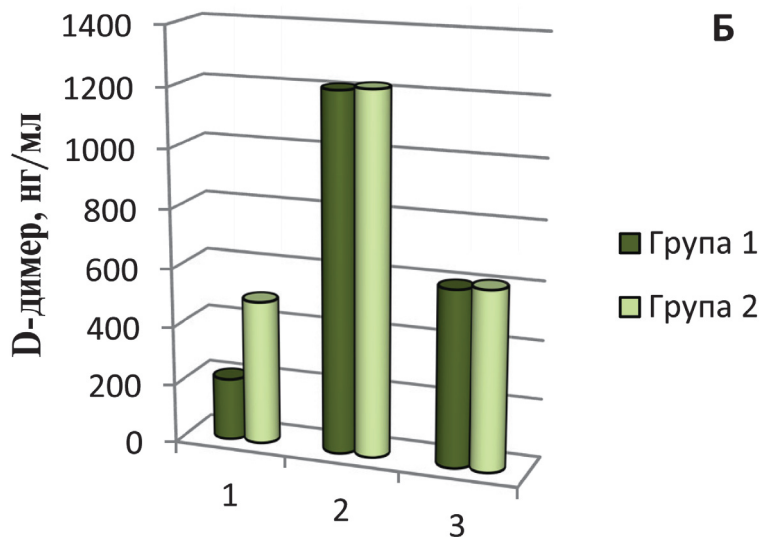
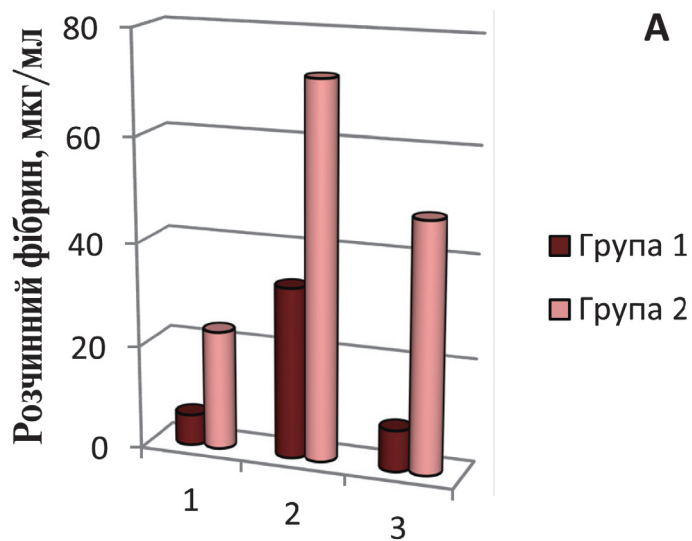


Рис. 1 Концентрація розчинного фібрину (А) та D-димеру (Б) у плазмі крові хворих, прооперованих з приводу аневризми черевної аорти: 1 - показники до операції; 2 - показники на 1-у добу після операції; 3 - показники на 3-ю добу після операції.

Дані рис. 1Б свідчать, що концентрація D-димеру в плазмі крові хворих обох груп практично не відрізняється на всіх етапах лікування. Тому цей показник, без проведення додаткових тестів, не може бути використаний для виявлення групи ризику. Натомість концентрація розчинного фібрину зростає після операції та знижується у процесі лікування, при цьому в другій групі концентрація розчинного фібрину після операції вдвічі перевищує таку для першої групи. Таким чином, концентрація розчинного фібрину є прогностичним показником загрози тромбоутворення та демонструє високу діагностичну інформативність.

Після операції рівень D-димеру стрімко росте в обох групах, однак в другій групі це відбувається на фоні різкого зростання концентрації розчинного фібрину (до 72 мкг/мл), в той час як в першій групі рівень розчинного фібрину підвищується помірно. Отже, ризик тромбоутворення значно вищий у другій групі, яку було виокремлено завдяки визначенню концентрації розчинного фібрину до операції.

**Приклад 2.** Ендопротезування кульшового суглоба відносять до категорії операцій з високим ступенем ризику післяопераційних тромбоемболічних ускладнень. Існує ризик розвитку тромбозу не тільки в перші дні після операції, але і в наступні кілька місяців. У зв'язку з цим ще на етапі доопераційного планування доцільно визначити ймовірність розвитку венозного тромбозу і вибрати оптимальний алгоритм тромбопрофілактики.

Аналіз стану системи згортання крові пацієнтів до оперативного втручання з приводу ендопротезування кульшового суглоба показав, що вміст фібриногену та розчинного фібрину було значно підвищено у 50 % пацієнтів.

ентів, а D-димеру — у 23% хворих. При цьому у 13% хворих спостерігалось значне зниження активності протеїну С.

За вмістом розчинного фібрину в плазмі крові до операції хворих було поділено на дві групи: в першу групу включили пацієнтів з невисоким вмістом розчинного фібрину в плазмі крові (нижче подвійної норми — менше 6 мкг/мл), а в другу групу — пацієнтів із високим вмістом розчинного фібрину (вище подвійної норми — більше 6 мкг/мл).

Проведено статистичний аналіз концентрації розчинного фібрину і D-димеру в плазмі крові до операції та на 1-у добу після операції (табл. 4).

*Таблиця 4*

Статистичний аналіз вмісту розчинного фібрину та D-димеру в плазмі крові хворих I та II груп при ендотезуванні кульшового суглоба до операції та на 1-у добу після неї (n = 55)

Параметр	Етап лікування	група 1		група 2		Достовірність різниці параметрів між групами (p)
		медіана (Mn)	діапазон	медіана (Mn)	діапазон	
РФ, мкг/мл	до операції	3,3	1,0-6,5	26,0	9,5-109,6	<b>0,000012</b>
	після операції	6,4	2,2-13,0	22,4	7,8-102,7	<b>0,00037</b>
D-димер, нг/мл	до операції	88,2	4,2-553,0	239,5	8,17-1533,7	<b>0,027</b>
	після операції	350,8	25,0-1160,0	361,8	36,6-1186,0	<b>0,8</b>

Виявлено порівняно незначне підвищення концентрації розчинного фібрину після операції у хворих першої групи (до 6,4 мкг/мл). У хворих другої групи концентрація розчинного фібрину в плазмі крові до операції була підвищена в середньому до 26 мкг/мл, в окремих випадках до 109 мкг/мл і продовжувала зростати впродовж 1-ї доби після операції, у порівнянні з нормою (1-3 мкг/мл).

У плазмі крові хворих першої групи спостерігали підвищення вмісту D-димеру в середньому до 350 нг/мл. Водночас у плазмі крові пацієнтів другої групи на фоні накопичення розчинного фібрину концентрація D-димеру не зростала.

Підвищення концентрації розчинного фібрину на фоні накопичення D-димеру свідчить про порушення динамічної рівноваги між згортанням крові та фібринолізом, активацію системи згортання крові та про ризик внутрішньосудинного тромбоутворення, яке неможливо діагностувати, визначаючи виключно концентрацію D-димеру.

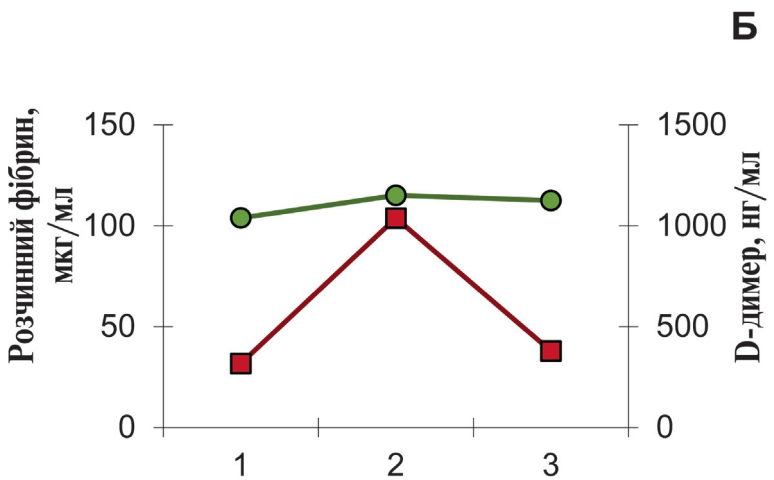
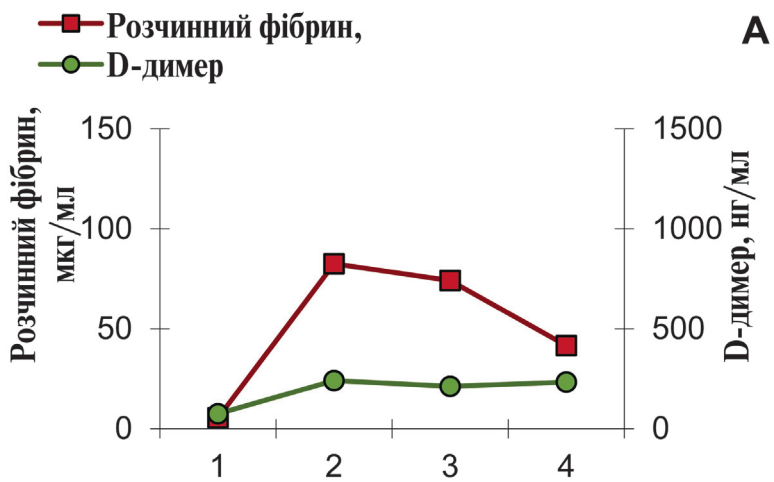
Тому для ефективного прогнозування тромботичних ускладнень необхідно спостерігати одночасно зміну концентрацій розчинного фібрину та D-димеру на всіх етапах лікування. Це дозволяє контролювати процеси утворення фібрину та його розщеплення і визначати ступінь загрози тромбоутворення для своєчасного проведення ефективної антитромботичної терапії.

**Приклад 3.** Важливість одночасного кількісного визначення концентрацій розчинного фібрину та D-димеру доцільно проілюструвати на прикладі аналізу стану системи згортання крові окремих пацієнтів за ендопротезування кульшового суглоба.

У хворого А концентрація в плазмі крові розчинного фібрину після операції була значно підвищена, що є свідченням активації системи згортання крові. Концентрація D-димеру на третю добу після операції не змінювалася та зберігалася в межах норми (Рис. 2А).

Оскільки у хворого впродовж спостереження виявлено високий вміст маркера активації системи згортання крові — розчинного фібрину, відсутність D-димеру не можна розглядати, як позитивний прогноз. У цьому разі низький вміст D-димеру свідчить не про відсутність тромбоутворення, а про зниження ефективності розщеплення стабілізованого фібрину.

У хворого Б (Рис. 2Б) виявлено накопичення в плазмі крові розчинного фібрину ще до операції та його значне підвищення після операції, що вказує на ризик внутрішньосудинного тромбоутворення. Підвищена концентрація D-димеру на всіх етапах лікування свідчить як про активацію системи фібринолізу та баланс між ланками системи гемостазу, так і про розщеплення стабілізованого фібрину, який вже утворився. Зниження концентрації розчинного фібрину на третю добу після операції дає надію на зниження ризику подальшого тромбоутворення, але постійна присутність підвищеної кількості D-димеру свідчить про існування стабілізованого фібрину, який вже утворився та продовжує розщеплюватися. Загроза тромботичних ускладнень залишається, оскільки концентрація обох молекулярних маркерів активації системи згортання крові значно перевищує норму і тому необхідно проводити подальший контроль стану системи гемостазу та проводити відповідну терапію.





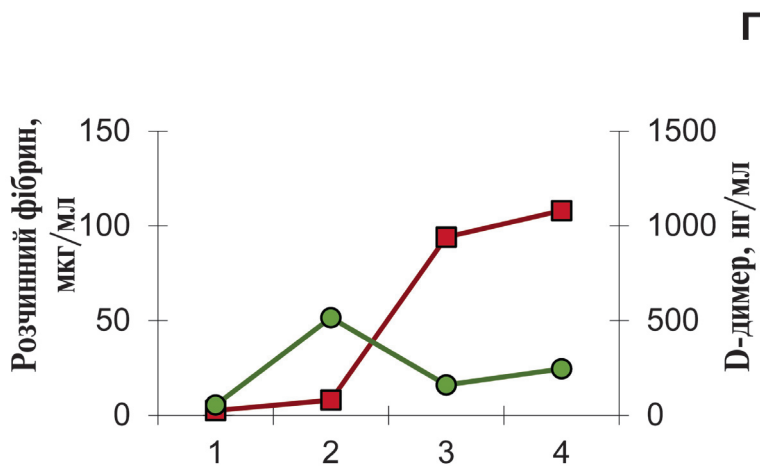
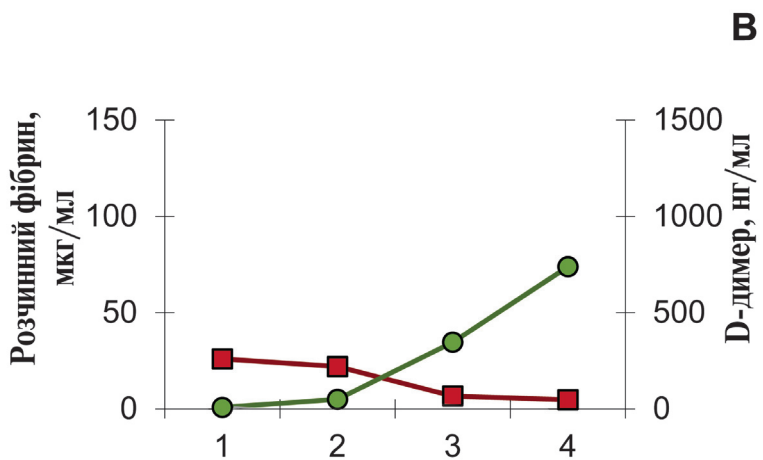


Рис. 2 Вміст розчинного фібрину та D-димеру в плазмі крові хворих (А, Б, В і Г) до операції (1), після операції (2), на третю добу (3), на сьому добу (4) після операції ендопротезування кульшового суглоба.

У хворого В виявлено підвищення концентрації розчинного фібрину в плазмі крові до та після операції за відсутності D-димеру. Зростання вмісту D-димеру відмічається тільки на третю та сьому добу, що свідчить про розщеплення стабілізованого фібрину, що утворився внаслідок активації системи згортання крові та дії фібринолізу. Зниження кількості розчинного фібрину є позитивною прогностичною ознакою, яка вказує на суттєве зниження ризику подальшого тромбоутворення у такого пацієнта. Поява D-димеру на третю та сьому добу після операції може бути наслідком розщеплення депозитів фібрину. Хворий В потребує подальшого спостереження до нормалізації показників.

У хворого Г підвищення вмісту розчинного фібрину до операції та на першу добу після операції не спостерігали, однак на третю добу виявлено значну активацію системи згортання крові, про що свідчить накопичення розчинного фібрину, вміст якого не знижується і на сьому добу після операції. Таке збільшення концентрації розчинного фібрину, попри низький вміст D-димеру, свідчить про загрозу тромбоутворення. Таким чином, позитивний прогноз на початкових етапах не є гарантією сприятливого перебігу лікування. Контролювати концентрацію молекулярних маркерів активації системи згортання крові — розчинного фібрину та D-димеру — необхідно як до операції, так і на всіх етапах лікування.

Отже, для прогнозування розвитку тромботичних ускладнень за патологій, пов'язаних з розвитком внутрішньосудинного тромбоутворення (серцево-судинні захворювання, хірургічні втручання, ускладнена вагітність, аутоімунні захворювання, онкологічні захворювання, діа-

бет тощо), **важливо проводити одночасне кількісне визначення вмісту розчинного фібрину та D-димеру.**

Вирішальне значення при цьому належить визначенню розчинного фібрину, збільшення концентрації якого вказує на ступінь активації системи згортання крові.

Підвищення концентрації D-димеру може свідчити як про наявність у крові стабілізованого фібрину, так і про ефективну роботу фібринолітичної системи. Тому навіть при низькому вмісті D-димеру на фоні зростання концентрації розчинного фібрину може спостерігатися суттєвий ризик розвитку тромбозів. Одночасне незначне збільшення концентрації розчинного фібрину та D-димеру свідчить про баланс між системами згортання крові та фібринолізу, такі пацієнти потребують подальшого спостереження. Водночас, значне зростання концентрації розчинного фібрину і D-димеру вказує не тільки на ризик подальшого тромбоутворення, але і свідчить про появу фібринових депозитів. Такі випадки потребують більш ретельного обстеження пацієнта.

## Визначення вмісту протеїну С

**Приклад 1.** Важливим маркером тромбофілії є зниження активності протеїну С та антитромбіну ІІІ — фізіологічних інгібіторів коагуляційного процесу, які підтримують рівновагу між про- і антикоагулянтною ланками системи гемостазу. При активації системи згортання крові відбувається споживання обох антикоагулянтів, однак необхідно зазначити, що тоді як активність протеїну С знижується дуже швидко, значне споживання антитромбіну ІІІ спостерігається лише в критичних випадках, наприклад при інфаркті міокарда, глибоких опіках тощо. Зниження активності протеїну С у плазмі крові розглядається нами як один з основних маркерів розвитку тромбофілії, що свідчить про порушення динамічної рівноваги між про- і антикоагулянтною ланками системи гемостазу.

Активність протеїну С визначали двома способами: перший спосіб — за часом згортання плазми крові в тесті з використанням активатора протеїну С, отриманого з отрути щитомордника звичайного (*Agkistrodon halys halys*) та реагенту АЧТЧ; другий спосіб — за розщепленням хромогенного субстрату S2236 в тесті з використанням активатора протеїну С.

На рис. 3. наведено результати визначення активності протеїну С і антитромбіну ІІІ у плазмі крові хворих за системного червоного вовчака (СЧВ). Показано, що у 62 % хворих активність протеїну С знижена на 30-50 %, тоді як активність антитромбіну ІІІ знижується тільки у 10 % хворих.

Варто зазначити, що зниження вмісту протеїну С як правило корелює з накопиченням розчинного фібрину.

**Приклад 2.** У 50 % хворих напередодні операції з ендопротезування кульшового суглоба спостерігали розвиток запального процесу та активації системи згортання

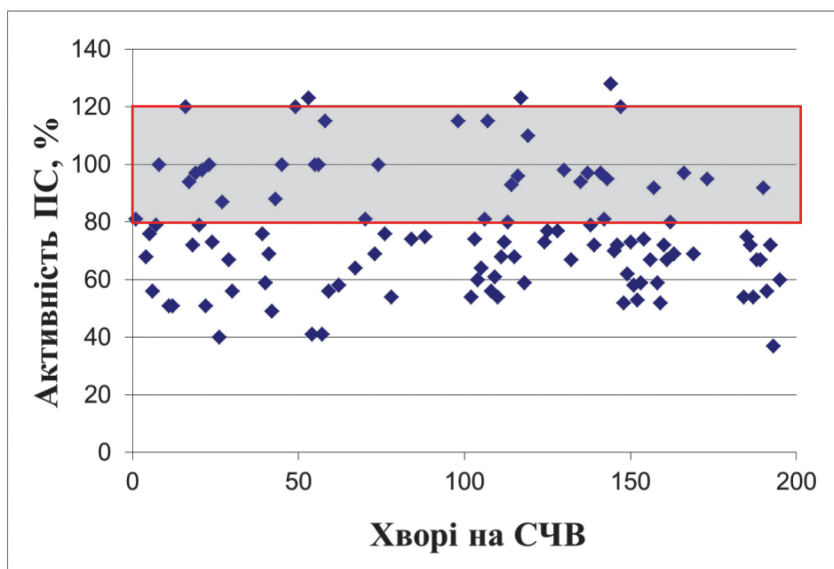
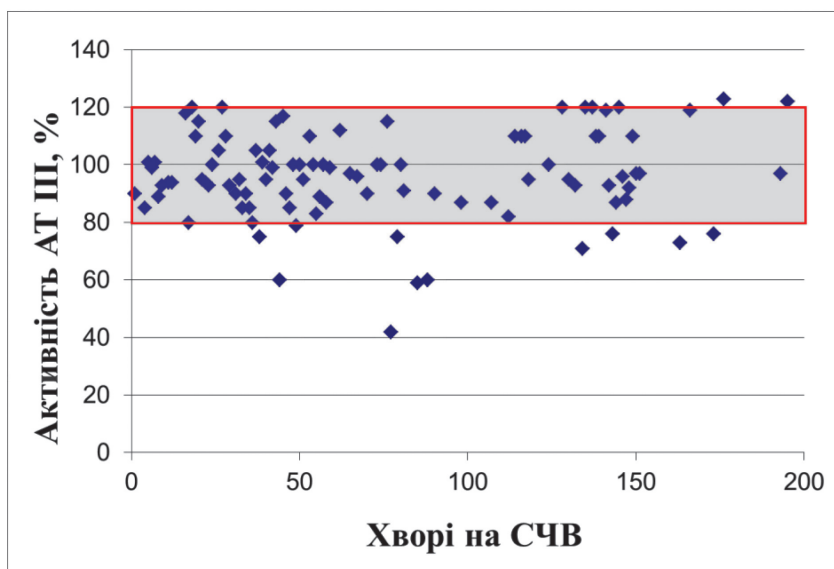


Рис. 3. Активність антитромбіну ІІІ (АТ ІІІ) та протеїну С (ПС) в плазмі крові хворих на системний червоний вовчак (n = 199). Норма для АТ-ІІІ та протеїну С 80-120%

крові, що було підтверджено зростанням вмісту фібриногену та розчинного фібрину. У 27 % хворих було також виявлено зниження вмісту протеїну С. Антитромботична терапія препаратами низькомолекулярного гепарину (НМГ) на всіх етапах лікування сприяє зниженню концентрації розчинного фібрину. Нормалізації вмісту протеїну С вдається досягнути на 7-му добу після операції: число хворих зі зниженою активністю протеїну С становить менше 10 % (рис. 4).

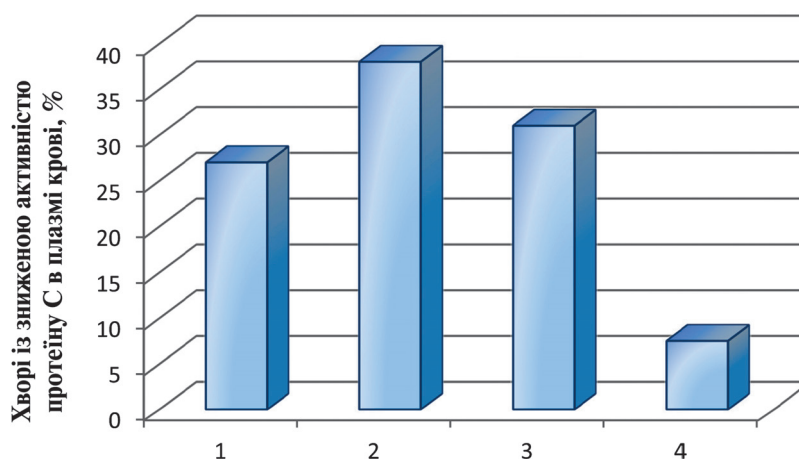


Рис. 4. Відсоток хворих зі зниженою активністю протеїну С за ендопротезування кульшового суглоба (1 — до операції, 2 — на 1-у добу після операції, 3 — на 3-ю добу після операції, 4 — на 7-у добу після операції).

Отже, ймовірність розвитку тромбозу прямо пропорційна не тільки накопиченню розчинного фібрину в плазмі крові, але і зниженню активності протеїну С. Контролювати активність протеїну С необхідно на всіх етапах лікування.

## ВИСНОВОК

Кількісні імунохімічні методи визначення концентрації розчинного фібрину, D-димеру та фібриногену необхідно включити до алгоритмів лабораторної діагностики загрози внутрішньосудинного тромбоутворення при захворюваннях, пов'язаних з патологічною активацією системи гемостазу.

Прогностичним маркером активації системи гемостазу і загрози тромбоутворення є насамперед розчинний фібрин, який бажано визначати в парі з D-димером. Саме таке поєднання тестів дозволяє здійснювати своєчасну діагностику тромбофілії, прогнозувати можливі ускладнення, призначати та контролювати ефективність антитромботичної терапії.

Наявність D-димеру вказує на існування стабілізованого фібрину, який зазнає розщеплення системою фібринолізу, але не характеризує ступінь активації системи згортання крові в момент проведення аналізу. Зростання концентрації розчинного фібрину в плазмі крові навіть на фоні одночасного зниження концентрації D-димеру може свідчити про високу ймовірність розвитку тромботичних ускладнень.

Необхідно визначати вміст протейну С та концентрацію фібриногену, як додаткові показники, що характеризують порушення балансу у системі гемостазу, за всіх захворювань, пов'язаних з її патологічною активацією.

З метою уникнення загрози внутрішньосудинного тромбоутворення лабораторний контроль необхідно проводити на всіх етапах лікування патологій, пов'язаних із загрозою внутрішньосудинного тромбоутворення.

## Рекомендований список літератури

Молекулярные механизмы образования и разрушения фибрина / Э.В. Луговской, Е.М. Макогоненко, С.В. Комисаренко — Киев: Наукова думка, 2013. — 230 с.

Современные представления о системе гемостаза / Г.Л. Волков, Т.Н. Платонова, А.Н. Савчук и др. — Киев: Наукова думка, 2005. — 296 с.

Лабораторная диагностика нарушений гемостаза / Долгов В.В., Свирин П.В. — Москва-Тверь: ООО «Издательство «Триада», 2005. — 227 с.

Lugovskoi E.V., Kolesnikova I.N., Platonova T.N., Lugovskaia N.E., Litvinova L.M., Kostiuchenko E.P., Chernyshenko T.M., Ganova L.A., Spivak N.Ia., Komisarenko S.V. Simultaneous quantification of soluble fibrin and D-dimer in blood plasma for the assessment of the threat of thrombosis. *Klin Med (Mosk)*. — 2013. — Vol. 91, № 11. — P. 38-44.

Нікульніков П. І., Ліксунов О. В., Ратушнюк А. В., Луговської Е. В., Колеснікова І. М., Литвинова Л. М., Костюченко О. П., Чернищенко Т. М., Горницька О. В., Платонова Т. М. Оцінка стану системи згортання крові після операції з приводу аневризми черевної аорти // *Клінічна хірургія*. — 2012. — № 9. — С. 32-36.

Розчинний фібрин. Молекулярна структура і кількісне визначення / Е.В. Луговської, П.Г. Гриценко, Н.Е. Луговська, І.Н. Колеснікова, С.В. Комісаренко // *Лабораторна діагностика*. 2006. 3, № 37. С. 1117.

Луговська Н.Е. Винахідницька діяльність відділів структури і функції білка та молекулярної імунології інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України. Частина II. Вітчизняний прорив у дослідженні та діагностиці системи гемостазу людини // *Укр. біох. журн.* — 2016.— 88.— № 3.— С.106-118.

Моноклональні антитіла, специфічні до фібрину людини / І. М. Колеснікова, Н. Е. Луговська, Е. В. Луговської, П. Г. Гриценко, К. Д. Ляшко, Г. К. Гоголінська, Л. М. Литвинова, О. П. Костюченко, С. В. Комісаренко // *ДАН України*. - 2006. - № 9. - С. 170-174.



Lugovskoy E.V., Kolesnikova I.N., Gritsenko P.G., Zolotareva E.N., Geffney P., Nieuwenhuizen W., Komisarenko S.V. A neoantigenic determinant in the D-dimer fragment of fibrin // Trombosis research. – 2002. – № 107, 3-4, – P. 151-156.

Lugovskoy E.V., Gritsenko P.G., Kolesnikova I.N. et al. A neoantigenic determinant in coiled coil region of human fibrin  $\beta$ -chain // Thromb. Res. – 2009. – № 123. – P. 765-770.

## Патенти

Пат. 73823 Україна, МПК7 С 12 N 5/12, С 12 N 5/18, С 12 N 5/20. Штам гібридомних тваринних клітин MUS MUSCULUS L., що культивуються та продукують моноклональні антитіла, специфічні до D-димеру фібрину людини / Комісаренко С.В., Колеснікова І.М., Луговський Е.В., Ляшко К.Д., Литвинова Л.М., Костюченко О.П., Гоголінська Г.К., Гриценко П.Г.; заявник і патентовласник Ін-т біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України. – № 2003076213; заявл. 04.07.03; опубл. 15.09.2005, бюл. № 9.

Pat. 4,758,524 US, IPC C07K 16/18 (2006.01.01); G01N 33/86 (2006.01.01); G01N 033/53; C12N 015/00. Monoclonal antibodies with specificity for crosslinked fibrin derivatives and assay for said derivatives / Bundesen P.G., Rylatt D.B.; Patentees Fielder Gillespie David Limited (Sydney, AU) / – Nb 06/590,054; prior. date Mar 17, 1983; publ. date July 19, 1988.

Пат. 87375 Україна, МПК (2009): С 12 N 5/20, С 07 K 16/36 (2009.01) Штам гібридомних тваринних клітин Mus musculus L., що культивуються та продукують моноклональні антитіла, які специфічно зв'язуються з розчинним фібрином людини / Комісаренко С.В., Колеснікова І.М., Луговської Е.В., Ляшко К.Д., Гриценко П.Г., Литвинова Л.М., Костюченко О.П., Луговська Н.Е., Гоголінська Г.К.; заявник і патентовласник Ін-т біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України. – № a200712284; заявл. 06.11.2007; опубл. 10.07.2009, бюл. № 13.

Пат. 70456 У Україна, МПК (2011.01): А 61К 39/44. Тест-система імуноферментна для кількісного визначення фібриногену в плазмі крові людини / Комісаренко С.В., Луговської Е.В., Колеснікова І.М., Співак М.Я., Гриценко П.Г., Ганова Л.О., Луговська Н.Е., Литвинова Л.М., Ляшко К.Д., Костюченко О.П., Позняк Т.А., Гоголінська Г.К., Ковтонюк Г.В., Терещенко М.І.; заявники та

патентовласники Ін-т біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Ін-т мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України. — № u201114516 ; заявл. 07.12.11 ; опубл. 11.06.2012. бюл. № 11.

Пат. 69283 У Україна, МПК: А 61К 39/44 (2006.01). Тест-система імуноферментна для кількісного визначення розчинного фібрину в плазмі крові людини / Комісаренко С.В., Луговської Е.В., Колеснікова І.М., Співак М.Я., Гриценко П.Г., Ганова Л.О., Луговська Н.Е., Литвинова Л.М., Ляшко К.Д., Костюченко О.П., Позняк Т.А., Гоголінська Г.К., Ковтонюк Г.В., Терещенко М.І.; заявники та патентовласники Ін-т біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Ін-т мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України. — № u201111735 ; заявл. 05.10.11 ; опубл. 25.04.2012. бюл. № 8.

Пат. 69284 У Україна, МПК (2011.01): А 61К 39/44. Тест-система імуноферментна для кількісного визначення D-димеру в плазмі крові людини / Комісаренко С.В., Луговської Е.В., Колеснікова І.М., Співак М.Я., Гриценко П.Г., Ганова Л.О., Луговська Н.Е., Литвинова Л.М., Ляшко К.Д., Костюченко О.П., Позняк Т.А., Гоголінська Г.К., Ковтонюк Г.В., Терещенко М.І.; заявники та патентовласники Ін-т біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Ін-т мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України. — № u201111736 ; заявл. 05.10.11 ; опубл. 25.04.2012. бюл. № 8.

Пат. 73233 UA. МПК7 С 12 N 5/18, С 12 Р 21/08. Штам гібридомних тваринних клітин MUS MUSCULUS L. — продуцент моноклональних антитіл, що специфічні до епітопу N-кінцевої ділянки В $\beta$ -ланцюга фібриногену людини / Комісаренко С.В., Колеснікова І.М., Луговський Е.В., Ляшко К.Д., Литвинова Л.М., Костюченко О.П., Гоголінська Г.К., Гриценко П.Г.; заявник і патентовласник Ін-т біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України. — № 2003077106 ; заявл. 28.07.03 ; опубл. 15.06.2005, бюл. № 6.

Пат. 73232 Україна, МПК7 С 12 N 5/18, С 12 Р 21/08. Штам гібридомних тваринних клітин MUS MUSCULUS L. — продуцент моноклональних антитіл, які специфічно реагують з епітопом N-кінцевої ділянки  $\gamma$ -ланцюга D-димеру фібрину та D-фрагмента фібриногену людини / Комісаренко С.В., Колеснікова І.М., Луговський Е.В., Ляшко К.Д., Литвинова Л.М., Костюченко О.П., Гоголінська Г.К., Гриценко П.Г.; заявник і патентовласник Ін-т біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України. — № 2003077105; заявл. 28.07.03 ; опубл. 15.06.2005, бюл. № 6.

ДЛЯ НОТАТОК



Науково-методичне видання

**Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України  
Національний інститут хірургії та трансплантології  
імені О.О. Шалімова НАМН України**

Застосування імуноензимних методів  
для лабораторної діагностики загрози  
внутрішньосудинного тромбоутворення

*Методичні рекомендації*

Художній редактор: Ганна Осадко

Художнє оформлення та верстання А. Брем

Підп. до друку 4.12.2019 р. Формат 84x108/32.  
Папір крейд. Друк цифровий. Ум. друк. арк. 4,62.  
Наклад 1000 прим.  
Зам. № 5/6-2.

ФОП Бихун В.Ю.  
вул. Леонтовича, 9, к. 18, м. Київ, 01030  
Свідоцтво про внесення суб'єкта видавничої справи  
до Державного реєстру видавців, виготівників  
і розповсюджувачів видавничої продукції  
ДК № 5366 від 26.06.2017 р.  
тел./ факс: +38 044 235 000 9  
моб.: +38 050 310 22 04  
e-mail: lk@ukr.net

