РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) RU (11) 2 717 946 (13) C1

(51) МПК
G01N 33/50 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
G01N 33/5091 (2020.02); G01N 2800/00 (2020.02)

(21)(22) Заявка: **2019118311, 13.06.2019**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
13.06.2019

Дата регистрации:
27.03.2020

Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: **13.06.2019**

(45) Опубликовано: **27.03.2020** Бюл. № **9**

Адрес для переписки:
101000, Москва, Петроверигский пер., 10, стр. 3, ФГБУ "НМИЦ ПМ" Минздрава России, в отдел инновационной и патентно-правовой деятельности, Учеваткиной Н.В.

(72) Автор(ы):
Драпкина Оксана Михайловна (RU),
Шойбонов Батожаб Батожаргалович (RU),
Баронец Татьяна Павловна (RU),
Григорьева Диана Викторовна (RU),
Лебедева Ольга Алексеевна (RU),
Литинская Ольга Анатольевна (RU),
Серебрякова Наталья Юрьевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):
Федеральное государственное бюджетное учреждение "Национальный медицинский исследовательский центр профилактической медицины" Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ "НМИЦ ПМ" Минздрава России) (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **HUBER-LUNG M. et al. Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway // Nature Medicine Letters, 2006, V.12, pp.682-687. RU 2666957 C1, 13.09.2018. HOLM G. HAEMOLYTIC ACTIVITY OF HUMAN BLOOD MONOCYTES LYSIS OF HUMAN ERYTHROCYTES TREATED WITH ANTI-A SERUM // Clin. Exp. Immunol., 1973, V.13, pp.29-43. ДРАПКИНА О.М. и др.** (см. прод.)

(54) Способ определения тромбинового пути активации системы комплемента

(57) Реферат:

Изобретение относится к клинической иммунологии и гемостазиологии. Раскрыт способ определения тромбинового пути активации системы комплемента (ТПАСК) по лизису эритроцитов человека группы А, включающий использование цитратной плазмы крови человека как источник циркулирующего тромбина, его природного субстрата - компонента С5 и белков мембрано-атакующего комплекса С6, С7, С8 и С9, протеолиз компонента С5 комплемента тромбином приводит к формированию мембрано-атакующего комплекса и лизису добавленной 1% суспензии эритроцитов, активность ТПАСК в пробе определяют турбидиметрически после 10-минутной инкубации при 37°С по калибровочному графику, где 100% лизис представляет собой полный лизис эритроцитов человека при добавлении воды, а контроль эритроцитов на спонтанный лизис - 0% лизиса, при лизисе до 30% эритроцитов человека считают нормальной активность тромбинового пути системы комплемента, от 30 до 60% - повышенная

RU 2717946 C1

RU 2717946 C1

активность и свыше 60% лизиса - высокая активность тромбинового пути системы комплемента человека. Изобретение обеспечивает новый подход для определения активности тромбинового пути активации системы комплемента, а также упрощает тестирование и исключает многократный контакт оператора с биоматериалом. 3 ил., 7 табл., 9 пр.

(56) (продолжение):
СПОСОБ ОЦЕНКИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ С3-КОНВЕРТАЗЫ КЛАССИЧЕСКОГО ПУТИ АКТИВАЦИИ КОМПЛЕМЕНТА // КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА, 2017, Т.62, стр.177-181.

RU 2717946 C1

RU 2717946 C1

RUSSIAN FEDERATION

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 717 946**(13) **C1**

(51) Int. Cl.
G01N 33/50 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC
G01N 33/5091 (2020.02); G01N 2800/00 (2020.02)

(21)(22) Application: **2019118311, 13.06.2019**

(24) Effective date for property rights:
13.06.2019

Registration date:
27.03.2020

Priority:
(22) Date of filing: **13.06.2019**

(45) Date of publication: **27.03.2020** Bull. № **9**

Mail address:
101000, Moskva, Petroverigskij per., 10, str. 3, FGBU "NMITS PM" Minzdrava Rossii, v otdel innovatsionnoj i patentno-pravovoj deyatelnosti, Uchevatkinoj N.V.

(72) Inventor(s):
Drapkina Oksana Mikhajlovna (RU),
Shojbonov Batozhab Batozhargalovich (RU),
Baronets Tatyana Pavlovna (RU),
Grigoreva Diana Viktorovna (RU),
Lebedeva Olga Alekseevna (RU),
Litinskaya Olga Anatolevna (RU),
Serebryakova Natalya Yurevna (RU)

(73) Proprietor(s):
Federalnoe gosudarstvennoe byudzhetnoe uchrezhdenie "Natsionalnyj meditsinskij issledovatelskij tsentr profilakticheskoj meditsiny" Ministerstva zdravookhraneniya Rossijskoj Federatsii (FGBU "NMITS PM" Minzdrava Rossii) (RU)

(54) METHOD OF DETERMINING THROMBIN COMPLEMENTARITY SYSTEM ACTIVATION PATHWAY

(57) Abstract:

FIELD: immunology.

SUBSTANCE: invention refers to clinical immunology and haemostasiology. Disclosed is a method for determining a thrombin pathway of complement system activation (TPCSA) by human group A erythrocysis lysis, involving using citrated human blood plasma as a source of circulating thrombin, its natural substrate - component C5 and proteins of membrane-attack complex C6, C7, C8 and C9, proteolysis of component C5 of complement thrombin leads to formation of membrane-attack complex and lysis of added erythrocyte 1 % suspension, the TPCSA activity in the sample is determined by turbidimetry after 10-minute incubation at 37 °C according to the calibration curve, where 100 % lysis is complete lysis of human erythrocytes with water addition, and control of erythrocytes on spontaneous lysis - 0 % lysis, in lysis to 30 % human erythrocytes is considered normal activity of thrombin path complement system, from 30 to 60 % - increased activity and more than 60 % of lysis - high activity of human complement's thrombin pathway.

EFFECT: invention provides a novel approach for determining activity of a thrombin pathway of complement system activation, simplifies testing and eliminates multiple contact of the operator with the biomaterial.

1 cl, 3 dwg, 7 tbl, 9 ex

RU 2717946 C1

RU 2717946 C1

Изобретение относится к клинической иммунологии и гемостазиологии и касается определения тромбинового пути активации системы комплемента.

Тромбин (3.4.21.5.) - сериновая протеиназа трипсиноподобного действия - является ключевым ферментом сложного каскада реакций, вызывающих свертывание крови. Участие тромбина в гемостазе не ограничено только расщеплением фибриногена. Тромбин взаимодействует различными звеньями многоступенчатого процесса свертывания крови: с тромбоцитами, факторами свертывания плазмы и компонентами стенок сосудов [Струков А.И., Струкова С.Н. Структурно-функциональные основы гемостаза и его патология // Арх. патологии, 1980, 42,№9: 26-45], ускоряя или замедляя тромбогенез. Более того, установлено участие тромбина в биохимических процессах, непосредственно не связанных со свертыванием крови: в активации системы комплемента [Huber-Lang M., Sarma J.V., Zetoune F.S., Rittirsch D et al. Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway // Nature Medicine, 2006, V. 12, №6: 682-687; doi: 10.1038/nm1419]; стимуляции роста клеток [Gandossi E., Lunven C., Berry C.N. Role of clot-assosiated (-derived) thrombin in cell proliferation induced by fibrin clots in vitro // British Journal of Pharmacology (2000) 129, 1021-7]. Все это свидетельствует о том, что тромбин следует рассматривать как важнейшую биорегуляторную протеиназу.

Традиционно системы комплемента и коагуляции рассматривают как отдельные каскадные системы в организме человека и животных. Оба протеолитических каскада состоят из сериновых протеаз с общими структурными характеристиками как высоко консервативные каталитические участки, содержащие аминокислотные остатки серина, гистидина и аспартата [Krem M.M., Di Cera E. // Trends Biochem Sci. 2002, 27: 67-74; Esmon C.T. // Tromb Res. 2004, 114: 321-327]. Кроме того, обе системы принадлежат к общей воспалительной сети [Rittirch D., Flier M.F., Ward P.A. // Nat. Rev. Immunol. 2008, 8: 776-787] и проявляют некоторые подобные характеристики, соответствующие специализированным функциям их активаторов и ингибиторов. В частности, фактор свертывания XII может активировать C1r и, таким образом, инициирует классический путь активации системы комплемента. В свою очередь C1-ингибитор подавляет не только три пути активации комплемента (классический, альтернативный и лектиновый), но также внутренний коагуляционный путь активации гемостаза (калликреин, фактор XIIa) [Davis A.E. III, Mejia P., Lu F. // Mol. Immunol. 2008, 45: 4057-4063; Ghebrehiwet B., Silverberg M., Kaplan A.P. // J. Exp.Med. 1981, 153:665-676]. В работе Clark и соавт. (2008) показано, что тромбин и плазмин могут участвовать в нетрадиционной активации системы комплемента при регенерации печени даже в отсутствие компонента C4 классического пути и при ингибировании фактора B альтернативного пути активации системы комплемента [Clark A., Weymann A., Hartman E., Turmelle Y., Carroll M., Thurman J.M. et al. // Mol. Immunol. 2008, 45: 3125-3132.]. При системной воспалительной реакции активация коагуляционного каскада сопровождается глубокой активацией системы комплемента, которая приводит к генерации анафилатоксинов C3a и C5a [Levi M., van der Poll., Buller H.LV / Circulation 2004, 109: 2698-2704]. Также C5a индуцирует активность тканевого фактора в человеческих эндотелиальных клетках [Ikeda K., Nagasawa K., Horiuchi T., Nishizaka H., Niho Y. // Thromb. Haemost. 1997,77: 394-398] и поэтому вовлекается в активацию внешнего коагуляционного пути гемостаза. Кроме того, C5a стимулирует экспрессию тканевого фактора на нейтрофилах через C5a-рецептор, который связан с высокой про-коагулянтной активностью [Ritis K., Doumas M., Mastellos D., Micheli A., Giglis S., Magotti P., et al. // J. Immunol. 2006, 177:4794-4802]. Новые доказательства про-коагулянтных эффектов комплемента получены и представлены в недавних исследованиях, где покзано, что in vitro маннан-связывающий лектин-

ассоциированная протеаза-2 лектинового пути активации комплемента способна запускать потребление (активацию) фибриногена с помощью превращения протромбина в тромбин [Krarup A., Wallis R., Presanis S., Gal P., Sim R.B. (2007). Plos ONE 2:e623]. Еще в 1986 году Wiedmer и соавт.показали, что терминальный комплементный комплекс (ТКК), C5b-9, может катализировать расщепление протромбина в тромбин даже в отсутствие фактора V, тем самым специфически повышать тромбоцитарную протромбиназную активность [Wiedmer T., Esmon C.T., Sim P.J. // Blood. 1986, 68: 875-880]. С другой стороны, C5a оказывает фибринолитический эффект с помощью подавления экспрессии ингибитора-1 плазминогенового активатора в человеческих тучных клетках [Wojta J., Kaun C, Zorn G., Ghannadan M., Hauswirth A.W., Sperr W.R., et al. // Blood 2002, 100: 517-523].

Таким образом, в настоящее время становится очевидным то, что обе каскадные системы могут взаимодействовать более широко, чем ранее предполагалось [Markiewski M.M., Nilsson D., Ekdahl K.N., Mollnes T.E., Lambris J.D. // Trends Immunol. 2007, 28: 184-192].

В процессе свертывания тромбин адсорбируется на фибрине [Lui Cy., Nossel H.L., Kaplan K.L. // J. Biol. Chem. 1979, 254: 10421-5; Hogg P.J., Jackson CM. Fibrin monomer protects thrombin from inactivation by heparin-antithrombin III: Implication for heparin efficacy // Proc Natl Acad Sci USA 1989, 86: 3619-3623]. Связанный с фибриновым сгустком тромбин сохраняет каталитическую активность, как было показано с освобождением пептида А (ФПА) от фибриногена [Weitz J.I., Hudoba M, Massel D., Maranore J., Hirsh J.J. // Clin Invest. 1990, 86: 385-391], при гидролизе хромогенного субстрата и укорочением времени коагуляции плазмы крови [Bendayan P., Baccalon H., Dupouy D., Boneu B. // Thromb Haemost. 1994,71: 576-580]. Фибриновый сгусток, таким образом, ведет себя как резервуар активного тромбина. Оказалось, что связанный с фибрином тромбин не чувствителен к действию антитромбина III в отличие от жидкофазного тромбина [Weitz J.I., Leslie B., Hudoba M. // Circulation. 1998,97: 544-552]. Показано [Beguin S., Kessels H., Hemker H.C. (1993) Thromb Haemost. 69: 811; Kumar N., Beguin S., Hemker H.C. // Thromb Haemost. 1994, 72(5): 713-721], что фибрин-связанный тромбин может усиливать образование дополнительно тромбина за счет активации плазменных кофакторов, белков V и VIII. Авторы также показали, что тромбоцит-богатая плазма в присутствии фибрин-связанного тромбина свертывается значительно быстрее за счет укорочения лаг-фазы, предшествующей взрыву при генерации тромбина. Данный факт свидетельствует о том, что тромбоциты находятся в «пред»-активированном состоянии под действием тромбина, связанного с фибриновым сгустком.

Тромбин белок коагуляционной системы с многогранным воздействием при онкологических заболеваниях с метастазированием. В настоящее время связь между коагуляцией и развитием рака хорошо установлена. Тромбин может также запускать клеточные процессы через протеаза-активируемые рецепторы (ПАР-1 и ПАР-4), приводящие к прогрессированию рака. Получены доказательства участия тромбина в метастазировании рака путем повышения адгезивного потенциала злокачественных клеток. Существуют доказательства участия тромбина на каждой стадии диссеминирования рака: 1) распространение раковых клеток путем отрыва от первичной опухоли, миграция; 2) поступление в кровяное русло; 3) циркуляция в кровяном русле; 4) выход из кровотока; 5) имплантация в органы и ткани. Недавние исследования обеспечили новые молекулярные механизмы о генерации тромбина у раковых больных при помощи которых тромбин участвует в транс-эндотелиальной миграции, взаимодействии тромбоцитов с опухолевыми клетками, ангиогенезе и других процессах.

В настоящее время появляются все новые данные о тромбин-опосредованных процессах, которые требуют дальнейших комплексных исследований при метастазах [Wojtukiewicz M.Z., Hempel D., Sierko E., Tucker S., Honn K.V. // Cancer Metastasis Rev. 2016, 35: 213-233].

Другим аспектом роли тромбина при патологических состояниях является ожирение. Ожирение способствует развитию хронического воспалительного и гиперкоагуляционного состояния, которое приводит к сердечно-сосудистым заболеваниям, диабету 2 типа, ожирению печени. Повышенная активность тромбина лежит в основе связанных с ожирением тромбоэмболических событий, но прямые связи между тромбином/фибрином и патологиями, связанными с ожирением, не полностью понятны. В работе Копек с соавт. (2017) иммуногистохимическими методами выявлены внесосудистые отложения фибрина в пределах белой жировой ткани и в печени у мышей, получавших рацион с высоким содержанием жиров, а также у пациентов с ожирением. Мыши, несущие мутантные формы фибриногена ($Fib\gamma^{390-396A}$) неспособные связывать лейкоцитарный $\alpha m\beta_2$-интегрин, были защищены от вызванного рационом с высоким содержанием жиров увеличения веса и ожирения. У мышей $Fib\gamma^{390-396A}$ заметно ниже системное, жировое и печеночное воспаление с меньшим количеством макрофагов в пределах белой жировой ткани, а также почти полная защита от развития жировой болезни печени и нарушения метаболизма глюкозы. Гомозиготные же тромбомодулин-мутантные мыши $Thbd^{Pro}$, у которых повышена функция тромбина, отличались заметным увеличением в весе и воспалительной реакцией при ожирении по сравнению с дикими мышами. Лечение дабигатраном, прямым ингибитором тромбина, ограничивало развитие ожирения, вызванное диетой с высоким содержанием жиров, и подавляло прогрессирование осложнений у мышей с ожирением. В совокупности эти данные подтверждают роль тромбина и фибрина как маркеров системной воспалительной реакции при ожирении [Kopec A.K., Abrahams S.R., Thornton S., Joseph S. Palumbo J.S., Mullins E.S., Divanovic S. Thrombin promotes diet-induced obesity through fibrin-driven inflammation // J Clin Invest. 2017; 127(8):3152-3166. doi. 10.1172/JCI92744].

Таким образом, роль тромбина, связанного с растворимыми фибрин-мономерными комплексами, остается до конца не исследованным из-за отсутствия доступных методик определения данной формы тромбина, как маркера внутрисосудистой активации свертывающей системы и системы комплемента.

Биохимические методы определения активности тромбина можно разбить на две группы. В первой группе применяются низкомолекулярные пептидные субстраты, которые расщепляются ферментом с образованием окрашенного продукта. Примерами таких субстратов служат H-D-Phe-Pro-Arg-п-нитроанилид (FPR) [Whitton C, Sands D., Lee T., Chang A., Longstaff C. Thromb Haemost. - 2005. - V. 93. - P. 261-266], h-D-Phe-Pro-Phe-п-нитроанилид (FpF) [Bush L.A., Nelson R.W., Di Cera E. (2006). J.Biol. Chem., 281,7183-7188]. Данная реакция характеризует активность только каталитического центра тромбина, поэтому корректнее использовать методы второй группы.

Ко второй группе относятся методы, учитывающие эффективность как работы каталитической триады, так и связывания природных субстратов с распознающим участком протеазы. Активность тромбина можно определить исходя из кривых накопления продуктов реакции PARI, PAR4, протеина С или фибриногена [Nieman M.T., Schmaier A.H. (2007). Biochemistry, 46, 8603-8610; Mullin J.L., Gorkun O.V., Binnie C.G., Lord S.T. (2000). J. Biol. Chem., 275, 25329-25246; Pineda A.O., Cantwell A.M., Bush L.A., Rose T., Di Cera E. (2002). J. Biol. Chem., 97, 807-813.]. Отщепляемые пептиды от фибриногена при активации тромбином определяют хроматографическими методами.

При определении фибрина, продукта протеолиза фибриногена тромбином, используются оптико-механические или спектрофотометрические методы тестирования.

Суть оптико-механического метода состоит в перемешивании реакционной смеси магнитной мешалкой, что приводит к наматыванию на нее фибриновых нитей, которые тормозят вращению мешалки вплоть до полной остановки. Время остановки мешалки фиксируется как время сворачивания плазмы. Несмотря на некоторую условность получаемой величины и отсутствие корреляции с кинетическими параметрами, стандартизация реагентов и условий реакции делают время сворачивания хорошо воспроизводимым параметром. Оптико-механический метод, в основном, находит применение в клинических лабораториях, что объясняется небольшим диапазоном определяемой активности тромбина (0,3-0,6 IU на 300 мкл пробы), значительной погрешностью результатов (до 50%) и потребностью в узкоспециализированном оборудовании. [Спиридонова В.А., Рог УюВ., Баранов Ю.В., Дугина Т.Н., Струкова СМ., Копылов А.М. (2003). Биоорг. Химия. 29, 1-4.]. Результаты оптико-механического метода недостоверно отражают степень агрегации фибрина в случае некоторых мутаций, поэтому более предпочтительно использование спектрофотометрических методов исследования агрегированного фибрина [Lefkowitz J.B., DeBoom T., Weller A., Clarke S., Lavrinets D. (2000). Am J Hematol., 63, 149-155.].

В спектрофотометрических методах определения активности тромбина не используется перемешивание раствора во время реакции. На начальных этапах протеолиза раствор агрегирующего фибрина ведет себя подобно коллоидному раствору, который с течением реакции переходит в гель, образованный трехмерным каркасом агрегированного фибрина и раствора низкомолекулярных соединений, удерживаемого им. Протекание реакции сопровождается помутнением и увеличением вязкости, соответственно для наблюдения можно использовать нефелометрию, турбидиметрию, вискозиметрию.

Тест генерации тромбина является одним из «глобальных» тестов, разработанных в 2001 г. [Hemker H.C, Giesen P., Al Dieri R., Regnault V., de Smedt E., Wagenvoord R., Lecompte T., Beguin S. (2003) Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. Pathophysiol. Haemost. Thromb., 33, 4-15.]. Принцип метода заключается в использовании специфического к тромбину флуорогенного субстрата. После предварительной инкубации тромбоцит-богатой плазмы крови в нее вносят буфер, содержащий ионизированный кальций и флуорогенный субстрат. Образующийся тромбин расщепляет субстрат, в результате высвобождается молекула флуорофора, излучение которого автоматически регистрируется флуориметром через равные промежутки времени. Интенсивность свечения пропорциональна концентрации образовавшегося тромбина. На основании измерений с помощью программного обеспечения выстраивается кривая генерации тромбина. В ходе исследования оцениваются: время задержки образования тромбина (лаг-период), максимальная скорость образования тромбина (пик), время достижения максимальной скорости (время пик), количество образовавшегося тромбина (площадь под кривой, эндогенный тромбиновый потенциал) и некоторые другие параметры.

Известен также способ определения генерации анафилатоксина C5a тромбином в отсутствие компонента C3 комплемента у мышей [Huber-Lang M., Sarma J.V., Zetoune F.S., Rittirsch D., Neff T.A., McGuire S.R. et al. (2006). Nature Medicine, 12: 682-687. doi: 10.1038/nm1419]. Авторами было показано образование активного C5a анафилатоксина при инкубации компонента C5 комплемента человека с тромбином. Генерацию анафилатоксина C5a в данной работе тестировали методом иммуноферментного

анализа.

Задачей настоящего изобретения является расширение арсенала лабораторных тестов для определения тромбинового пути активации системы комплемента.

Технический результат заявленного изобретения заключается в принципиально новом подходе для определения активности тромбинового пути системы комплемента по лизису эритроцитов человека группы крови А. В качестве природного субстрата циркулирующего тромбина, связанного с фибрин-мономерными комплексами используется компонент С5 системы комплемента, а уровень потребления компонента С5 оценивают по лизису эритроцитов человека с группой крови А при формировании мембрано-атакующего комплекса (С5b-9).

Технический результат достигается тем, что для определения активности тромбинового пути системы комплемента используют цитратную плазму крови человека как источник комплементов С5, С6, С7, С8 и С9 для формирования мембраноатакующего комплекса. С целью ингибирования образования С5-конвертазы трех путей системы комплемента (классического, альтернативного и лектинового) в тесте не проводят рекальцификацию цитратной плазмы. При наличии циркулирующего тромбина активируется компонент С5 и формируется мембрано-атакующий комплекс, который определяют по лизису эритроцитов человека. Активность тромбинового пути комплемента определяют по калибровочному графику, где 100% лизис представляет собой полный лизис эритроцитов человека при добавлении воды, а контроль эритроцитов на спонтанный лизис - 0% лизиса.

Способ осуществляют следующим образом. Проводят стандартный забор крови в раствор 3,8% цитрата натрия в соотношении 9:1, готовят тромбоцит-обедненную плазму путем центрифугирования при 3000 об/мин в течение 20 мин. Затем для определения активности тромбинового пути системы комплемента в лунки иммунологических планшет с плоским дном вносят 25 мкл цитратной плазмы, 50 мкл вероналового буфера и 25 мкл 1% суспензии эритроцитов человека (ЭЧ) с группой крови А. В качестве контролей используют: контроль на полный лизис ЭЧ (25 мкл ЭЧ + 75 мкл H_2O) и контроль на спонтанный лизис ЭЧ (25 мкл ЭЧ + 75 мкл вероналового буфера). Пробы тщательно перемешивают и инкубируют при постоянном перемешивании в термостате для иммунологических 96-ти луночных планшет при 37°С в течение 10 мин. После инкубации измеряют оптическую плотность проб на фотометре для иммуноферментного анализа при 620 нм. Активность тромбинового пути системы комплемента определяют по степени лизиса ЭЧ с использованием калибровочного графика, где 100% лизис представляет собой полный лизис эритроцитов человека при добавлении воды, а контроль эритроцитов на спонтанный лизис - 0% лизиса. При лизисе до 30% констатируют нормальную тромбиновую активность плазмы крови, от 30 до 60% - повышенную и при лизисе более 60% констатируют высокую активность тромбинового пути активации системы комплемента.

Изобретение поясняется следующими фигурами:

Фиг. 1. Калибровочный график для определения степени лизиса эритроцитов человека по оптической плотности при длине волны 620 нм.

Фиг. 2. Чувствительность ЭЧ к лизису при активации системы комплемента по тромбиновому пути в зависимости от группы крови человека

Фиг. 3. Активность тромбинового пути системы комплемента в цитратных плазмах крови (n=305). Обозначения: по оси Y - количество проб цитратной плазмы; по оси X -распределение по группам в зависимости от активности тромбинового пути активации системы комплемента.

Пример 1. Определение оптимальной концентрации эритроцитов барана для определения активности циркулирующего тромбина. Эритроциты барана (ЭБ) 3 раза отмывают 0,15 М раствором NaCl центрифугированием в течение 10 мин при 2500 об/мин. Строят график зависимости оптической плотности суспензии эритроцитов (при длине волны 620 нм) от концентрации эритроцитов. Для этого 1% суспензию эритроцитов прогрессивно разводят в плоскодонной 96-ти луночной иммунологической планшете в объеме 25 мкл 0,15М NaCl, добавляют 75 мкл физиологического раствора, тщательно перемешивают и измеряют на фотометре для иммуноферментного анализа при длине волны 620 нм. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1

Зависимость оптической плотности 1% суспензии эритроцитов барана (ЭБ) при длине волны 620 нм (A_{620}) от концентрации

	1	2	3	4	5	6	7
1% ЭБ, мкл в 100 мкл пробы	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	-
A_{620}	0,78	0,56	0,35	0,22	0,14	0,09	0,038

Как видно из данных, представленных в таблице 1, наблюдается линейная зависимость оптической плотности суспензии от концентрации ЭБ в растворе до A_{620} равной 0,56 ЕД. Свыше 0,56 ЕД при A_{620} данная зависимость - нелинейная. Поэтому для теста определения активности циркулирующего тромбина нами выбрана концентрация суспензии ЭБ, которая в объеме 100 мкл в 96-луночных планшетах дает оптическую плотность, равную 0,40-0,56 ЕД. Для определения степени лизиса эритроцитов нами предложен калибровочный график, в котором динамику лизиса эритроцитов оценивают по снижению оптической плотности при длине волны 620 нм. За 0% лизиса принимают оптическую плотность контроля эритроцитов на спонтанный лизис (25 мкл ЭБ + 75 мкл вероналового буфера), соответственно за 100% лизис принимают оптическую плотность контроля на полный лизис (25 мкл ЭБ + 75 мкл H_2O) (фиг. 1). Определяют мутность эритроцитов турбидиметрически при длине волны 620 нм после 10 мин инкубации при 37°С и по калибровочному графику определяют степень лизиса (фиг. 1).

Как видно из фиг. 1, калибровочный график позволяет определять степень лизиса эритроцитов в процентах по оптической плотности пробы без стадии центрифугирования и измерения гемоглобина в супернатанте и последующего расчета степени лизиса эритроцитов по формуле, что существенно упрощает регистрацию результатов анализа активности циркулирующего тромбина по лизису ЭБ в рутинных исследованиях.

Пример 2. Определение активности циркулирующего тромбина по лизису эритроцитов барана. Тест проводят в 96-луночных плоскодонных иммунологических планшетах. Вначале по 25 мкл цитратной плазмы вносят в лунки, затем последовательно добавляют по 50 мкл вероналового буфера и 25 мкл суспензии стандартизованных (A_{620}=0,56 оптических единиц) в этом же буфере ЭБ. Параллельно ставят контроли: 3 контроля на полный лизис (25 мкл ЭБ + 75 мкл H_2O); 3 контроля на спонтанный лизис эритроцитов (25 мкл ЭБ + 75 мкл вероналового буфера). Тщательно перемешивают и сразу измеряют оптическую плотность на фотометре для иммуноферментного анализа при длине волны

620 нм (бланк устанавливают против воздуха). После измерения планшеты инкубируют при 37°С в течение 10 мин при постоянном перемешивании. После 10-ти мин инкубации измеряют оптическую плотность при тех же условиях, что описано выше.

Проведено исследование циркулирующего тромбина в тесте активации комплемента в 40 пробах цитратной плазмы крови пациентов «НМИЦ профилактической медицины». Полученные результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2

Тромбиновая активность цитратных плазм (ТАЦП) в тесте активации комплемента и лизиса эритроцитов барана

№ проб	ТАЦП, % лизиса	№ проб	ТАЦП, % лизиса	№ проб	ТАЦП, % лизиса	№ проб	ТАЦП, % лизиса
1	100	11	0	21	0		0
2	55	12	0	22	4		24
3	31	13	0	23	8	33	20
4	1	14	0	24	0	34	35
5	23	15	0	25	8	35	10
6	14	16	0	26	6	36	8
7	35	17	27	27	58	37	30
8	15	18	3	28	0	38	12
9	0	19	0	29	0	39	0
10	0	20	3	30	0	40	0

Как видно из данных, представленных в таблице 2, в 14 пробах наблюдается лизис эритроцитов барана более 10%, что составляет 35% из тестированных 40 проб.

Таким образом, инкубация ЭБ с цитратными плазмами приводит к активации компонента С5 циркулирующим тромбином, генерированным в условиях in vivo, формированию мембрано-атакующего комплекса и лизису ЭБ. Присутствие цитрата натрия в пробе обеспечивает ингибирование активации по классическому пути начиная с С1 комплекса, активация которого иммунными комплексами зависит от присутствия ионов кальция. Отсутствие же в среде ионов магния ингибирует формирование и активацию С3-конвертазы, а отсутствие С3-конвертазы - формирование С5-конвертазы всех трех путей активации системы комплемента. Полученные результаты убедительно

доказывают четвертый путь активации системы комплемента - тромбиновый путь активации комплемента, который запускается прямой активацией компонента C5 и последующим формированием мембрано-атакующего комплекса, который вызывает лизис ЭБ.

Пример 3. Определение тромбина в цитратных плазмах с хромогенным субстратом. Определение активности тромбина в цитратной плазме проводили как описано в работе [Stief T.W. Specific determination of plasmatic thrombin activity // Clinical and Applied Thrombosis/Haemostasis, 2006, 12(3): 324-329], используя конечную концентрацию хромогенного субстрата 0,38 мМоль/л (в прототипе менее 0,4 мМоль/л). Концентрацию цитратной плазмы использовали 25% в конечном объеме инкубационной системы равной 100 мкл. После добавления 20 мкл хромогенного субстрата (Chromozym® TH (Tos-Gly-Pro-Arg-pNA), с исходной концентрацией 1,9 мМоль/л) к 80 мкл разведенной цитратной плазмы (конечная концентрация плазмы в пробе составляет 25%) в лунки иммунологической планшеты с плоским дном, тщательно перемешивали и определяли оптическую плотность проб при 405 нм. Пробы инкубировали в течение 10 мин при 37°C и повторно измеряли изменение оптической плотности проб. В качестве контроля использовали тромбин производства «Boehringer Mannheim» (Германия) с активностью 3 NIH и контроль бланка хромогенного субстрата. Для сравнительного анализа использовали активности тромбина в цитратных плазмах и в контроле тромбина использовали изменение оптической плотности пробы при 405 нм в мин. Параллельно определяли тромбиновую активность цитратной плазмы (ТАЦП) в тесте активации комплемента по лизису ЭБ, как описано выше. Полученные результаты представлены в таблице №3.

Таблица 3

Активность тромбина в цитратных плазмах с хромогенным субстратом и тромбиновой активности цитратной плазмы (ТАЦП)

№ пробы	Активность тромбина с хромогенным субстратом (ΔA_{405}/мин) ($n \times 10^{-4}$)	ТАЦП, % лизиса	№ пробы	Активность тромбина с хромогенным субстратом (ΔA_{405}/мин) ($n \times 10^{-4}$)	ТАЦП, % лизиса
1	10	99	15	18	99
2	7,7	67	16	15	98
3	9,3	37	17	14	98
4	11,0	0	18	22	90
5	13,0	22	19	12	54
6	14,0	10	20	65	19
7	14,0	27	21	6,3	45
8	12,0	5	22	88	78
9	13,0	37	23	79	17
10	9,7	74	24	13	23
11	13	39	Ктр	590	
12	12	8	Ктр	600	
13	12	37	Ктр	590	
14	13	19	Бланк	0	

Как видно из данных, представленных в таблице 3, нами не выявлены прямые зависимости амидолитической активности тромбина по хромогенному субстрату и тромбиновой активности цитратной плазмы в тесте активации комплемента по лизису ЭБ.

Пример 4. Определение плазмина в цитратных плазмах с хромогенным субстратом. Определение активности плазмина в цитратной плазме проводили, используя конечную концентрацию хромогенного субстрата 1 мкМоль/л. Концентрацию цитратной плазмы использовали 25% в конечном объеме инкубационной системы равной 100 мкл. После добавления 50 мкл хромогенного субстрата (Chromozym® PL (Tos-Gly-Pro-Lys-pNA), с исходной концентрацией 2 мкМоль/л) к 50 мкл разведенной 50% цитратной плазмы в лунки иммунологической планшеты с плоским дном, тщательно перемешивали и определяли оптическую плотность проб при 405 нм. Пробы инкубировали в течение 10 мин при 37°С и повторно измеряли изменение оптической плотности проб. Ставили

контроль бланка хромогенного субстрата. Активность плазмина цитратной плазмы определяли как отношение изменения экстинкции при А405 в опытных пробах в минуту (ΔА405/мин). Параллельно в этих же пробах определяли тромбиновую активность цитратной плазмы (ТАЦП) в тесте активации комплемента по лизису ЭБ, как описано выше. Полученные результаты представлены в таблице №4.

Таблица 4

Активность плазмина в цитратных плазмах с хромогенным субстратом и ТАЦП

№ пробы	Активность плазмина с хромогенным субстратом (ΔA_{405}/мин) ($n \times 10^{-4}$)	ТАЦП, % лизиса	№ пробы	Активность плазмина с хромогенным субстратом (ΔA_{405}/мин) ($n \times 10^{-4}$)	ТАЦП,% лизиса
1	19	99	15	29	99
2	8,7	67	16	18	98
3	21	37	17	10	98
4	16	0	18	19	90
5	29	22	19	13	54
6	23	10	20	22	19
7	27	27	21	6,3	45
8	11	5	22	33	78
9	30	37	23	46	17
10	19	74	24	74	23
11	22	39	Бланк	0	
12	10	8			
13	14	37			
14	7	19			

Как видно из данных, представленных в таблице 4, нами также не выявлена зависимость между амидолитической активностью плазмина с хромогенным субстратом и тромбиновой активностью цитратной плазмы в тесте активации комплемента по лизису ЭБ. Ниже представлена сводная таблица (таблица 5) амидолитической активности тромбина, плазмина и тромбиновая активность цитратной плазмы (ТАЦП) в тесте активации комплемента по лизису ЭБ.

Таблица 5

Тромбиновая активность цитратной плазмы в тесте активации комплемента и лизиса эритроцитов барана, амидолитическая активность тромбина и плазмина по гидролизу их хромогенных субстратов

№ пробы	Активность плазмина с хромогенным субстратом (ΔA_{405}/мин) (n $\times 10^{-4}$)	Активность тромбина с хромогенным субстратом (ΔA_{405}/мин) (n $\times 10^{-4}$)	ТАЦП, % лизиса
1	19	10	99
2	8,7	7,7	67
3	21	9,3	37
4	16	11,0	0
5	29	13,0	22
6	23	14,0	10
7	27	14,0	27
8	11	12,0	5
9	30	13,0	37
10	19	9,7	74
11	22	13	39
12	10	12	8
13	14	12	37
14	7	13	19
15	29	18	99
16	18	15	98
17	10	14	98

18	19	22	90
19	13	12	54
20	22	65	19
21	6,3	6,3	45
22	33	88	78
23	46	79	17
24	74	13	23
Бланк	0	0	

Как видно из данных, представленных в таблице 5, между амидолитическими активностями, как тромбина, так и плазмина и комплемент-активирующей активностью циркулирующего тромбина в тесте лизиса ЭБ какой-либо зависимости не было выявлено. Данные результаты могут свидетельствовать о том, что в активации комплемента роль плазмина явно не подтверждается. В то время как связывание тромбина с растворимыми фибрин-мономерными комплексами или же с антитромбином III, а также модификация тромбина нейтрофильной эластазой при активации нейтрофилов приводит к изменениям специфичности тромбина, что мы и наблюдаем при определении тромбина в тесте активации комплемента по лизису ЭБ. Для подтверждения данной гипотезы нами проведены исследования связывания тромбина с растворимыми фибрин-мономерными комплексами.

Пример 5. Определение связывания тромбина с растворимыми фибрин-мономерными комплексами. Для подтверждения образования комплекса тромбина с растворимыми фибрин-мономерными комплексами были проведены следующие исследования. В опытных пробах цитратную плазму инкубировали 5 мин при 56°С для термо-коагуляции фибриногена и растворимых фибрин-мономерных комплексов. Далее коагулированный фибриноген осаждали центрифугированием при 8000 об/мин. В супернатанте определяли тромбиновую активность в тесте активации комплемента по лизису ЭБ, как описано выше. В качестве контроля использовали исходные цитратные плазмы без термо-коагуляции фибриногена. Полученные результаты представлены в таблице 6.

Таблица 6

Тромбиновые активности супернатанта цитратной плазмы после термокоагуляции фибриногена и исходных плазм в тесте активации комплемента и лизиса ЭБ

№ проб	ТАЦП (супернатант), % лизиса Опыт	ТАЦП (исходная плазма), % лизиса Контроль
1	0	100
2	0	19
3	0	1
4	0	32
5	0	8
6	0	21
7	0	72
8	0	1

Как видно из данных, представленных в таблице 6, тромбин полностью осаждается вместе с термо-коагулированным фибриногеном/фибрином.

Таким образом, полученные данные полностью подтверждают данные, полученные с тромбином, связанным с фибриновым сгустком, описанным в работе Waitz J.I. и соавт. (1998). Дополнительно были проведены исследования амидолитической активности исходных цитратных плазм (контроль) и супернатанта (опыт) после осаждения термокоагулированного фибриногена с использованием хромогенного субстрата тромбина и плазмина. Условия подробно описаны выше (см. пример 4). Полученные результаты представлены в таблице 7.

Таблица 7

Амидолитическая активность тромбина и плазмина по гидролизу хромогенных субстратов в супернатанте (опыт) и в исходной плазме (контроль)

№ проб	Активность плазмина по хромогенному субстрату (ΔA_{405}/мин) ($n\times10^{-4}$)		Активность тромбина по хромогенному субстрату (ΔA_{405}/мин) ($n\times10^{-4}$)	
	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль
1	29	20	2,3	3,3
2	14	6	2,3	3,3
3	11	7	4,0	3,7
4	7	11	6,3	6,7
5	6	8	2,7	3,7
6	12	10	5	6,0
7	19	7	37	5,0
8	10	15	5,3	5,7

Как видно из данных, представленных в таблице 7, амидолитическая активность плазмина и тромбина в отличие от тромбиновой активности плазмы в тесте активации комплемента по лизису ЭБ существенно не меняется в супернатанте по сравнению с амидолитической активностью исходной цитратной плазмы. Интересные данные получены по амидолитической активности плазмина (проба №2) в супернатанте, где почти в 2 раза активность выше, чем в исходной плазме крови. При термокоагуляции фибриногена/фибрина, видимо, происходит диссоциация плазмина от фибриногена/фибрина и за счет этого возрастает амидолитическая активность плазмина в опытных пробах. Далее были проведены исследования резистентности тромбина, связанного с растворимыми фибрин-мономерными комплексами, к действию гепарина.

Пример 6. Определение ингибирования циркулирующего тромбина, связанного с фибрин-мономерными комплексами, гепарином в тесте активации комплемента по лизису эритроцитов барана. Предварительно в тесте определения активности контактного пути коагуляции цитратной плазмы при рекальцификации подбирали эффективную дозу гепарина с 25% плазмой. Для этого раствор гепарина (10 мг/мл) предварительно раститровали на 16 лунок в объеме 25 мкл, далее добавляли по 25 мкл вероналового буфера, цитратной плазмы и 10% раствора хлорида кальция, разведенного 1:31 раствором 0,15 М NaCl. Ставили контроли плазмы без гепарина и бланка плазмы. Пробы инкубировали 30 мин при 37°С и степень коагуляции определяли турбидиметрически при длине волны 450 нм. При концентрации 0,15 мкг/мл гепарина в пробе наблюдается полное ингибирование коагуляции 25% цитратной плазмы при рекальцификации. Для дальнейших исследований нами использована концентрация гепарина в 2 раза превышающая эффективную концентрацию в тесте рекальцификации,

т.е. 0,3 мкг/мл.

Описание эксперимента. В опытную пробу, содержащую 25 мкл вероналового буфера, 25 мкл цитратной плазмы и 25 мкл стандартизованных эритроцитов барана ($1,5 * 10^8$ кл/мл), добавляли 25 мкл раствора гепарина (1 мкг/мл). Ставили следующие контроли: Контроль системы (не содержал гепарина); контроль ЭБ на спонтанный лизис (25 мкл ЭБ + 75 мкл вероналового буфера); контроль полного лизиса (25 мкл ЭБ + 75 мкл дистиллированной воды). Пробы тщательно перемешивали и инкубировали 10 мин при 37°С при постоянном перемешивании. После инкубации степень лизиса определяли турбидиметрически при длине волны 620 нм на фотометре для иммуноферментного анализа. Полученные результаты свидетельствовали об отсутствии ингибирования циркулирующего тромбина, связанного с растворимыми фибрин-мономерными комплексами при данных концентрациях гепарина.

Пример 7. Определение чувствительности эритроцитов человека (ЭЧ) к лизису при активации системы комплемента по тромбиновому пути. Предварительно осадок ЭЧ человека 2 раза отмывали 0,15 М раствором NaCl путем центрифугирования. Затем готовили 1% суспензию ЭЧ в физ. растворе. Тест проводят следующим образом. В опытную пробу добавляют 25 мкл цитратной плазмы с высокой активностью тромбина, связанного с фибрином, 50 мкл вероналового буфера и 25 мкл 1% суспензии ЭЧ. Параллельно ставят два контроля: контроль ЭЧ на спонтанный лизис (25 мкл 1% суспензии ЭЧ + 75 мкл вероналового буфера); контроль ЭЧ на полный лизис (25 мкл 1% суспензии ЭЧ + 75 мкл дистиллированной воды). Пробы инкубируют в течение 10 мин при 37°С при постоянном перемешивании. После инкубации определяют степень лизиса турбидиметрически при длине волны 620 нм. По калибровочному графику определяют степень лизиса в процентах.

Пример 8. Определение группы крови в тестированных эритроцитах человека. Во всех пробах ЭЧ (195 проб) определяют группу крови с использованием реагентов «Набор для определения групп крови человека систем АВО» (Цоликлон анти-А - моноклональные IgM к антигену А; Цоликлон анти-В - моноклональные IgM к антигену В) фирмы «Медиклон», Российская Федерация. Полученные результаты представлены на фиг.2. Как видно из данных, представленных на фиг. 2, самыми чувствительными к лизису при активации системы комплемента по тромбиновому пути оказались эритроциты группы А (в среднем 81,9% лизиса), на втором месте эритроциты группы крови АВ (в среднем 77,0% лизиса), на третьем месте эритроциты группы крови В (в среднем 44,3% лизиса). Наиболее устойчивыми к лизису оказались эритроциты группы крови О (в среднем 0,3%). Известно, что устойчивость ЭЧ к комплемент-опосредованному лизису обеспечивает в основном ингибитор мембрано-атакующего комплекса - CD5 9, который экспессирован на клеточных мембранах органов и тканей, в частности, эритроцитов. Полученные результаты вносят весомый вклад для прогнозирования предрасположенности человека к реперфузионным повреждениям при сосудистых катастрофах.

Пример 9. Определение тромбинового пути активации системы комплемента в цитратных плазмах по лизису эритроцитов группы крови А человека. Тест проводят в 96-луночных плоскодонных иммунологических планшетах. Вначале по 25 мкл цитратной плазмы вносят в лунки, затем последовательно добавляют по 50 мкл вероналового буфера и 25 мкл 1% суспензии эритроцитов человека (ЭЧ). Параллельно ставят контроли: 3 контроля на полный лизис (25 мкл ЭЧ + 75 мкл H_2O); 3 контроля на спонтанный лизис эритроцитов (25 мкл ЭЧ + 75 мкл вероналового буфера). Тщательно перемешивают и сразу измеряют оптическую плотность на фотометре для иммуноферментного анализа

при длине волны 620 нм (бланк устанавливают против воздуха). После измерения планшеты инкубируют при 37°С в течение 10 мин при постоянном перемешивании. После 10-ти мин инкубации измеряют оптическую плотность при тех же условиях, что описано выше. Проведены исследования тромбинового пути активации комплемента в 305 пробах цитратной плазмы крови пациентов «НМИЦ профилактической медицины». Полученные результаты представлены на фиг. 3.

Как видно из данных, представленных на фиг. 3., в 182 пробах наблюдается лизис эритроцитов человека до 30%, в 56 пробах от 30 до 60% и 33 пробах - лизис более 60%.

Таким образом, инкубация ЭЧ с нитратными плазмами приводит к активации компонента С5 циркулирующим тромбином, генерированным в условиях in vivo, формированию мембрано-атакующего комплекса и лизису ЭЧ. Присутствие цитрата натрия в пробе обеспечивает ингибирование активации по классическому пути начиная с С1 комплекса, активация которого иммунными комплексами зависит от присутствия ионов кальция. Отсутствие в среде ионов магния ингибирует формирование и активацию С3-конвертазы, а отсутствие С3-конвертазы также ингибирует формирование С5-концертазы трех путей активации системы комплемента. Полученные результаты убедительно доказывают четвертый путь активации системы комплемента - тромбиновый путь активации системы комплемента, который связан с прямой активацией компонента С5 и формированием мембрано-атакующего комплекса с последующим лизисом ЭЧ.

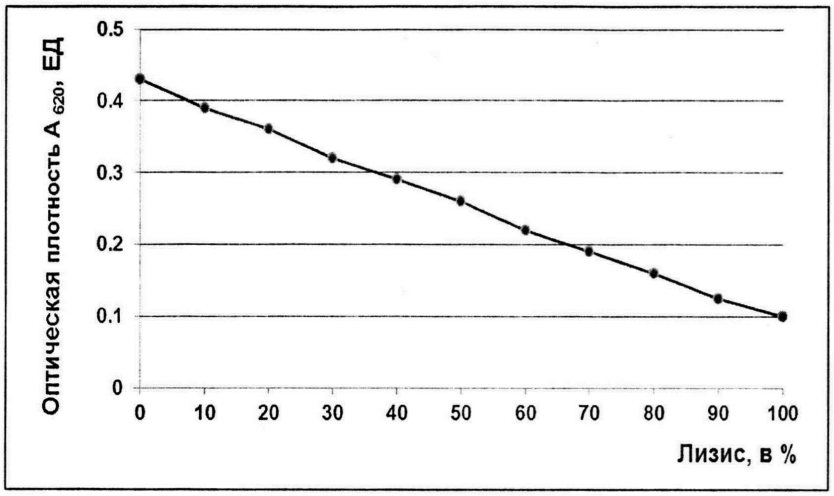
Таким образом, разработан принципиальной новый тест определения активности тромбинового пути системы комплемента с использованием эритроцитов человека группы А крови. Протеолиз С5 компонента определяют по формированию мембрано-атакующего комплекса (С5b-9) и лизиса эритроцитов человека. Для ингибирования комплемента и формирования С5-конвертаз по трем путям активации комплемента (классическому и лектиновому - С4bС2aС3b, альтернативному - С3bBbС3b), используется цитратная плазма, т.е. не требуется дополнительные реактивы для проведения теста. Следующим достоинством теста является использование метода турбидиметрии для оценки степени лизиса эритроцитов человека и инкубация в течение 10 мин, что многократно упрощает тест и исключает многократный контакт оператора с биоматериалом. Тест также может быть использован для поиска и скрининга препаратов, ингибирующих тромбин, связанный с циркулирующими фибрин-мономерными комплексами. Как было нами показано, что такая форма тромбина является резистентной к действию препаратов гепарина. Учитывая наличие протеазо-активируемых рецепторов на мембранах органов и тканей выявление тромбина, связанного с циркулирующими фибрин-мономерными комплексами, в тесте активации комплемента до 30% лизиса эритроцитов барана можно считать нормой, от 30 до 60% повышенной активностью и свыше 60% лизиса - высокой активностью тромбинового пути активации системы комплемента.

(57) Формула изобретения

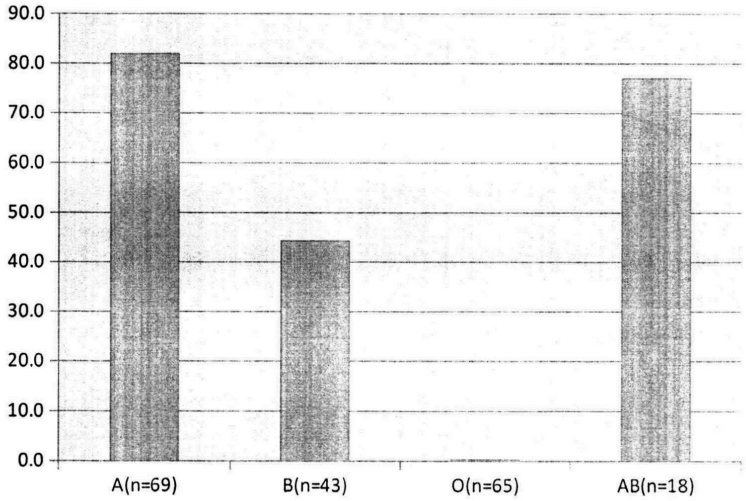
Способ определения тромбинового пути активации системы комплемента (ТПАСК) по лизису эритроцитов человека группы А, включающий использование цитратной плазмы крови человека как источник циркулирующего тромбина, его природного субстрата - компонента С5 и белков мембрано-атакующего комплекса С6, С7, С8 и С9, протеолиз компонента С5 комплемента тромбином приводит к формированию мембрано-атакующего комплекса и лизису добавленной 1% суспензии эритроцитов, активность ТПАСК в пробе определяют турбидиметрически после 10-минутной

инкубации при 37°С по калибровочному графику, где 100% лизис представляет собой полный лизис эритроцитов человека при добавлении воды, а контроль эритроцитов на спонтанный лизис - 0% лизиса, при лизисе до 30% эритроцитов человека считают нормальной активность тромбинового пути системы комплемента, от 30 до 60% - повышенная активность и свыше 60% лизиса - высокая активность тромбинового пути системы комплемента человека.

1

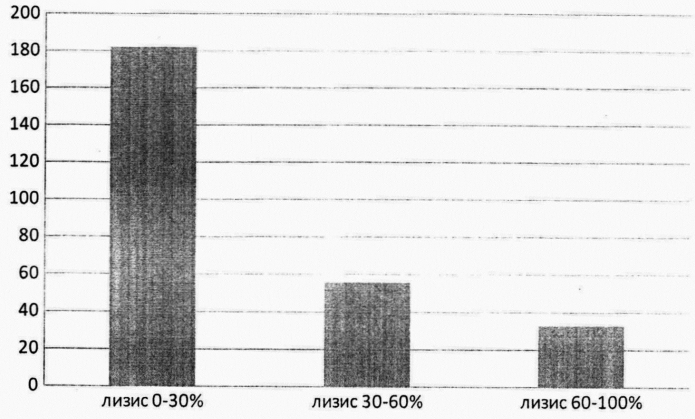

Оптическая плотность A_{620}, ЕД
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
Лизис, в %

Фиг.1


90.0
80.0
70.0
60.0
50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
A(n=69)
B(n=43)
O(n=65)
AB(n=18)

Фиг. 2

2


200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
лизис 0-30%
лизис 30-60%
лизис 60-100%

Фиг. 3