РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) RU (11) 2 732 385 (13) C1

(51) МПК
G01N 33/53 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
G01N 33/00 (2020.08); G01N 33/53 (2020.08)

(21)(22) Заявка: **2020116388, 27.04.2020**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
27.04.2020

Дата регистрации:
16.09.2020

Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: **27.04.2020**

(45) Опубликовано: **16.09.2020** Бюл. № **26**

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

(72) Автор(ы):
Драпкина Оксана Михайловна (RU),
Шойбонов Батожаб Батожарголович (RU),
Баронец Татьяна Павловна (RU),
Худяков Михаил Борисович (RU),
Раднаева Чимит Батожабовна (RU),
Лебедева Ольга Алексеевна (RU),
Литинская Ольга Анатольевна (RU)

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

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **RU 2595806 C2, 27.08.2016. RU 2703541 C1, 21.10.2019. RU 2298189 C2, 27.04.2007.**

(54) Способ определения модифицированного окислением фибриногена

(57) Реферат:

Изобретение относится к лабораторной диагностике и может быть использовано для определения модифицированного окислением фибриногена. Способ определения модифицированного окислением фибриногена (моФГ) при рекальцификации цитратной плазмы включает определение коагуляции цитратной плазмы фотометрически по изменению мутности проб при длине волны 450 нм с интервалами измерения 0, 30 и 60 мин, определение фибриногена (ФГ) по методу Клаусса, расчёт индивидуального коэффициента (ИК) перевода изменений оптической плотности (ΔA450) проб после 60 мин инкубации как отношение ФГ, определенного по методу Клаусса, к ΔA450 на 60 мин инкубации, определение ΔA450 на 30 мин инкубации, расчет ФГ, коагулированного на 30 мин инкубации, по формуле:

ФГ(30) (г/л) = ΔA450 (30 мин) × ИК, далее рассчитывают содержание моФГ, определяют % содержания моФГ к общему ФГ, определенному по методу Клаусса, при содержании более 10% констатируют повышенный уровень моФГ и наличие окислительного стресса в организме человека. Изобретение позволяет проводить широкий скрининг, выявлять людей с повышенным окислительным стрессом, проводить противовоспалительную терапию и контролировать эффективность проводимой терапии. 1 табл.

RU 2732385 C1

RU 2732385 C1

RUSSIAN FEDERATION

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 732 385** (13) **C1**

(51) Int. Cl.
G01N 33/53 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC
G01N 33/00 (2020.08); G01N 33/53 (2020.08)

(21)(22) Application: **2020116388, 27.04.2020**

(24) Effective date for property rights:
27.04.2020

Registration date:
16.09.2020

Priority:
(22) Date of filing: **27.04.2020**

(45) Date of publication: **16.09.2020** Bull. № **26**

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

(72) Inventor(s):
Drapkina Oksana Mikhajlovna (RU),
Shojbonov Batozhab Batozhargolovich (RU),
Baronets Tatyana Pavlovna (RU),
Khudyakov Mikhail Borisovich (RU),
Radnaeva Chimit Batozhabovna (RU),
Lebedeva Olga Alekseevna (RU),
Litinskaya Olga Anatolevna (RU)

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

(54) METHOD FOR OXIDATION-MODIFIED FIBRINOGEN

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to laboratory diagnostics and can be used for determination of oxidised fibrinogen. Method of determining oxidation-modulated fibrinogen (omFG) during recalcification of citrate plasma involves determining coagulation of citrate plasma photometrically by changing the turbidity of samples at wavelength of 450 nm with measurement intervals of 0, 30 and 60 min, determining fibrinogen (FG) by the Claus method, calculation of individual coefficient (IC) of transfer of changes of optical density (ΔA450) of samples after 60 minutes of incubation as the ratio of FG, determined by the method of Klaus, to ΔA450 for 60 minutes of incubation, determination of ΔA450 for 30 minutes of incubation, calculation of FG, coagulated for 30 minutes of incubation, by formula: FG(30) (g/l) = ΔA450 (30 min) × IC, then calculating the content of omFG, determining the content of omFG to total PH determined by the Klaus method, if the content is more than 10 %, the high level of omFG and the presence of oxidative stress in the human body are stated.

EFFECT: invention provides wide screening, detecting people with high oxidative stress, conducting an anti-inflammatory therapy and monitoring the effectiveness of the therapy.

1 cl, 1 tbl

RU 2732385 C1

RU 2732385 C1

Фибриноген - основной гликопротеин плазмы крови, который необходим для свертывания крови. Количество фибриногена, присутствующего в крови, прямо пропорционально способности крови образовывать тромбы. Фибриноген в крови трансформируется в фибрин в процессе образования тромба, таким образом, дефицит фибриногена будет выражаться в неадекватном образовании фибрина и неадекватном свертывании.

В настоящее время накоплены многочисленные данные о важной патогенетической роли перекисного окисления липидов, являющегося неотъемлемой составляющей окислительного стресса, в инициации и развитии многих острых и хронических заболеваний. Однако активные кислородные метаболиты, наряду с окислительной модификацией липидов, вызывают также и одновременную окислительную модификацию белков, приводящую к патологическим изменениям их свойств и функций, к фрагменации и агрегации. Применительно к процессам окислительной модификации белков при патологии сердечно-сосудистой системы атеросклеротического генеза большой интерес представляет окисление фибриногена крови. Поскольку повышенный уровень ФГ является диагностически и прогностически значимым маркером не только атеросклероза, но многих других хронических воспалительных заболеваний, и его окислительная модификация еще более значительно потенцирует нарушения системы гемостаза, сопряженные с эндотелиальной дисфункцией, что в конечном итоге приводит к нарушению агрегации тромбоцитов и эритроцитов и к повышенной секреции цитокинов [Ройтман Е.В., Азизова О.А., Морозов Ю.А., Асейчев А.В. Влияние окисленного фибриногена на свертывающую систему крови // Бюлл. экспер. биологии и медицины, 2004, 138, 5: 467-469.].

Известны способы определения окислительной модификации фибриногена плазмы крови [Рагино Ю.И., Баум В.А., Полонская Я.В. Патент РФ №2298189. Опубликовано 27.04.2007. Бюл, №12; Швачко А.Г., Пирязев А.П., Азизова О.А., Сергиенко В.И., Быкова А.А. Способ определения окислительной модификации фибриногена плазмы крови по содержанию карбонильных групп в фибриновом сгустке // Патент РФ №2595806. Опубликовано 27.08.2016. Бюл. №24]. Суть обоих методов заключается в предварительном приготовлении фибринового сгустка по Рутбергу, определении его массы. Затем к сгустку добавляют равные объемы физраствора и 20% ТХУ для денатурации и осаждения ФГ. Далее определяют окислительную модификацию фибрина с 2,4-динитрофенилгидразином (2,4-ДНФГ), как описано в работе Дубининой и соавт., 1995 [Дубинина Е.Е., Бурмистров С.О., Ходов Д.А., Поротов Г.Е. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения // Вопросы медицинской химии, 1995, 41,1:24-26.].

Недостатком описанных способов является необходимость выделения фибринового сгустка, причем инкубация в течение 10 мин недостаточна для коагуляции окисленного фибриногена. Метод трудно выполним в условиях рутинных исследований.

Задачей настоящего изобретения является расширение арсенала лабораторных тестов для определения модифицированного окислением фибриногена (моФГ).

Технический результат заявленного изобретения заключается в повышении производительности, доступности теста определения моФГ для рутинных исследований, повышении точности за счет полной коагуляции плазменного фибриногена при рекальцификации цитратной плазмы крови человека.

Технический результат достигается тем, что для повышения производительности определение окФГ анализ проводят в 96-ти луночных плоскодонных иммунологических планшетах, определение коагуляции цитратной плазмы проводят фотометрически по

изменению мутности проб при длине волны 450 нм с интервалами измерения 0, 30 и 60 мин, определяют фибриноген (ФГ) по методу Клаусса, рассчитывают индивидуальный коэффициент (ИК) перевода изменений оптической плотности (ΔА450) проб после 60 мин инкубации как отношение ФГ, определенного по методу Клаусса, к ΔА450 на 60 мин инкубации, определяют ΔА450 на 30 мин инкубации, рассчитывают ФГ, коагулированный на 30 мин инкубации, по формуле:

ФГ(30) (г/л) = ΔА450 (30 мин) × ИК,

где ΔА450 (30) - изменение оптической плотности пробы при коагуляции цитратной плазмы на 30 мин инкубации, рассчитанный как А450(опыт) - А450(бланк);

ИК - индивидуальный коэффициент для перевода изменений оптической плотности пробы при коагуляции цитратной плазмы в г/л.

Рассчитывают содержание моФГ как разность между ФГ, определенным по методу Клаусса и ФГ, коагулированным на 30 мин инкубации, определяют % содержания моФГ, при содержании более 10% констатируют повышенный уровень моФГ и наличие окислительного стресса в организме человека.

Высокая точность определения окФГ обеспечивается использованием индивидуального коэффициента перевода изменений оптической плотности фибринового сгустка при рекальцификации цитратной плазмы.

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 10 мин. Затем в лунки 96-ти луночных плоскодонных иммунологических планшет вносят последовательно 50 мкл цитратной плазмы, 100 мкл вероналового буфера с pH 7,4 и хлорида кальция. Тщательно перемешивают пробы и измеряют поглощение при 450 нм на фотометре для иммуноферментного анализа (бланк A_{450}), далее пробы инкубируют в течение 90 мин при 37°С и измеряют степень коагуляции турбидиметрически при 450 нм с интервалами 0, 30 и 60 минут. Параллельно определяют фибриноген по Клауссу. Рассчитывают индивидуальный коэффициент (ИК) перевода изменений оптической плотности (ΔA_{450}) проб после 60 минут как отношение ФГ, определенного по методу по Клаусса к ΔA_{450} на 60 мин инкубации. Далее определяют ΔA_{450} на 30 мин инкубации, рассчитывают количество ФГ, коагулированного в течение 30 мин по формуле:

ФГ (30), г/л = ΔA_{450} (30 мин) × ИК

где:

ΔA_{450} (30 мин) - изменение оптической плотности пробы при коагуляции плазмы на 30 минут инкубации, рассчитанный как $A_{450(опыт)}$ - $A_{450(бланк)}$;

ИК - индивидуальный коэффициент для перевода изменений оптической плотности пробы при коагуляции цитратной плазмы в г/л.

Содержание моФГ рассчитывают, как разность между ФГ, определенным по методу Клаусса и расчетным ФГ, коагулированным в течение 30 мин инкубации. Определяют % содержания моФГ, при содержании более 10% констатируют повышенный уровень моФГ и наличие окислительного стресса в организме человека.

Расчет коэффициента для перевода изменений оптической плотности при коагуляции индивидуальных проб цитратной плазмы в количество фибриногена в г/л. В 96-ти луночные плоскодонные планшеты, в лунки опытных проб последовательно вносят по 50 мкл цитратной плазмы, 100 буфера вероналового буфера (VBS) и 50 мкл 25 мМ Ca^{2+}. Пробы тщательно перемешивают, измеряют поглощение при 450 нм и проводят

первую инкубацию в течение 30 мин. Определяют коагуляцию плазмы турбидиметрически по изменению поглощения в пробах (ΔA_{450}). Параллельно в исходных пробах цитратной плазмы определяют фибриноген по Клауссу с использованием коммерческих наборов «Фибриноген» (Hemosil, Италия) на автоматическом гематологическом анализаторе ACL8/9/1000 System (Instrum. Lab. Comp., США). Рассчитывают коэффициент перевода ΔA_{450} в г/л ФГ. Полученные результаты представлены в таблице.

Как видно из данных, представленных в таблице, фактор для перевода изменений оптической плотности плазмы при коагуляции (при рекальцификации), который рассчитывали как отношение фибриногена, определенному по методу Клаусса к изменению оптической плотности проб при инкубации в течение 60 мин колебался от 6,3 до 10. Для более точного определения ФГ при коагуляции цитратных плазм при рекальцификации использовали не среднее значение коэффициента при переводе изменений оптической плотности при инкубации в течение 30 мин, а индивидуальные коэффициенты, полученные для каждой пробы. Полученные данные представлены в таблице.

Как видно из данных, представленных в таблице, только в 8 пробах (21%) коагуляция ФГ в течение 30 мин была полной, в остальных же 31 пробах (79%) фибриноген не коагулировал полностью в течение 30 мин и поэтому дальнейшая 30 мин инкубация требовалась для завершения реакции. Учитывая разницу исходного уровня содержания ФГ, более информативным является расчет % моФГ к общему ФГ, определенному по Клауссу.

Содержание моФГ рассчитывают, как разность между ФГ, определенным по методу Клаусса и расчетным ФГ, коагулированным в течение 30 мин инкубации. Определяют % содержания моФГ, при содержании более 10% констатируют повышенный уровень моФГ и наличие окислительного стресса в организме человека.

Таким образом, определение содержания моФГ расширяет общее представление о состоянии окислительного стресса в организме человека. При высоком содержании моФГ требуется дополнительные вмешательства для коррекции уровня моФГ путем назначения противовоспалительной терапии. Разработанный метод определения моФГ может быть удобным маркером для контроля эффективности терапии.

Таблица

Данные содержания модифицированного окислением фибриногена в цитратных плазмах крови человека

№ проб	0 мин A_{450}	30 мин A_{450}	60 мин A_{450}	ФГ по Клауссу, г/л	ΔA_{450} 60 мин	Коэффициент (К)	ΔA_{450} 30 мин	ФГ за 30 мин, г/л	моФГ, г/л	% моФГ
1	0,142	0,604	0.593	4,1	0,451	9,1	0,461	4,2	0	0
2	0,227	0,776	0.774	5	0,547	9,1	0,549	5	0	0
3	0,193	0,586	0.617	3,7	0,424	8,7	0,393	3,4	0,3	8
4	0,130	0,752	0.791	5,7	0,661	8,6	0,622	5,3	0,4	7
5	0,167	0,598	0.584	3,9	0,417	9,4	0,425	4	0	0
6	0,162	0,625	0.657	4,1	0,495	8,3	0,463	3,8	0,3	7
7	0,136	0,788	0.811	5,8	0,675	8,6	0,652	5,6	0,2	3
8	0,166	0,673	0.738	4,8	0,572	8,4	0,507	4,3	0,5	10
9	0,146	0,657	0.709	4,7	0,563	8,3	0,511	4,2	0,5	11
10	0,197	0,660	0.729	4	0,532	7,5	0,463	3,5	0,5	13
11	0,135	0,858	0.939	5,8	0,804	7,2	0,723	5,2	0,6	10
12	0,142	0,789	0.818	5,7	0,676	8,4	0,647	5,4	0,3	5
13	0,193	1,013	1.102	6,2	0,909	6,8	0,82	5,6	0,6	10
14	0,175	0,492	0.505	3,3	0,33	10	0,317	3,2	0,1	3
15	0,241	0,667	0.767	3,6	0,526	6,8	0,426	2,9	0,7	19
16	0,195	0,729	0.776	4,3	0,581	7,4	0,534	4	0,3	7
17	0,209	0,489	0.631	3,3	0,422	7,8	0,281	2,2	1,1	33
18	0,198	0,592	0.584	3,5	0,386	9,1	0,394	3,6	0	0
19	0,156	0,681	0.698	4,6	0,542	8,5	0,525	4,5	0,1	2
20	0,163	0,670	0.697	4	0,534	7,5	0,507	3,8	0,2	5
21	0,196	0,706	0.763	4,5	0,567	7,9	0,51	4	0,5	11
22	0,164	0,605	0.634	4,1	0,47	8,7	0,441	3,8	0,3	8
23	0,182	0,668	0.751	4,3	0,569	7,6	0,486	3,7	0,6	14
24	0,150	0,678	0.741	4,3	0,591	7,3	0,528	3,9	0,4	9
25	0,134	0,849	0.976	5,3	0,842	6,3	0,716	4,5	0,8	15
26	0,228	0,754	0.797	4,1	0,569	7,2	0,526	3,8	0,3	7
27	0,146	0,473	0.647	3,4	0,501	6,8	0,327	2,2	1,2	35
28	0,213	0,405	0.736	4,4	0,523	8,4	0,192	1,6	2,8	64
29	0,147	0,600	0.677	4,3	0,53	8,1	0,453	3,7	0,6	14
30	0,183	0,213	0.773	4,7	0,59	8	0,03	0,2	4,5	96
31	0,135	0,673	0.924	5,1	0,789	6,5	0,538	3,5	1,6	31
32	0,176	0,611	0.714	3	0,538	5,6	0,435	2,4	0,6	20
33	0,132	0,473	0.496	3,5	0,364	9,6	0,341	3,3	0,2	6
34	0,262	0,401	0.647	2,9	0,385	7,5	0,139	1	1,9	66
35	0,152	0,504	1.040	5,9	0,888	6,6	0,352	2,3	3,6	61
36	0,156	0,711	0.847	4,8	0,691	6,9	0,555	3,8	1	21
37	0,145	0,647	0.901	4,9	0,756	6,5	0,502	3,3	1,6	33
38	0,275	0,527	0.904	4,5	0,629	7,2	0,252	1,8	2,7	60
39	0,195	0,632	0.746	4,1	0,551	7,4	0,437	3,2	0,9	22

(57) Формула изобретения

Способ определения модифицированного окислением фибриногена (моФГ) при рекальцификации цитратной плазмы, включающий активацию контактного пути коагуляции в полистироловых 96-луночных плоскодонных иммунологических планшетах путем смешивания цитратной плазмы крови с хлоридом кальция с последующей фотометрической регистрацией свертывания, отличающийся тем, что определение коагуляции цитратной плазмы проводят фотометрически по изменению мутности проб при длине волны 450 нм с интервалами измерения 0, 30 и 60 мин, определяют фибриноген (ФГ) по методу Клаусса, рассчитывают индивидуальный коэффициент (ИК) перевода изменений оптической плотности (ΔA450) проб после 60 мин инкубации как отношение ФГ, определенного по методу Клаусса, к ΔA450 на 60 мин инкубации, определяют ΔA450 на 30 мин инкубации, рассчитывают ФГ, коагулированный на 30 мин инкубации, по формуле:

ФГ(30) (г/л) = ΔA450 (30 мин) × ИК, где

ΔA450 (30) - изменение оптической плотности пробы при коагуляции цитратной плазмы на 30 мин инкубации, рассчитанный как A450(опыт) - A450(бланк); где A450 (бланк) - оптическая плотность пробы при коагуляции цитратной плазмы до начала

инкубации;

ИК - индивидуальный коэффициент для перевода изменений оптической плотности пробы при коагуляции цитратной плазмы в г/л, рассчитывают содержание моФГ как разность между ФГ, определенным по методу Клаусса, и ФГ, коагулированным на 30 мин инкубации, определяют % содержания моФГ к общему ФГ, определенному по методу Клаусса, при содержании более 10% констатируют повышенный уровень моФГ и наличие окислительного стресса в организме человека.