



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
G01N 33/50 (2020.08); C12Q 1/37 (2020.08)

(21)(22) Заявка: 2019131354, 04.10.2019

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
04.10.2019

Дата регистрации:
21.12.2020

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 04.10.2019

(45) Опубликовано: 21.12.2020 Бюл. № 36

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 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 терапии и
профилактической медицины" Министерства
здравоохранения Российской Федерации
(ФГБУ "НМИЦ ТПМ" Минздрава России)
(RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2251697 C1, 10.05.2005. RU
2124209 C1, 27.12.1998. EA 29355 B1, 30.03.2018.
RU 2292217 C2, 27.01.2007. Krarup, A., Wallis
R., Presanis J.S., Gal P., Sim R.B. Simultaneous
Activation of Complement and Coagulation by
MBL-Associated Serine Protease 2. // PLoS. ONE.
(2007) 2(7): e623. DOI:10.1371/
journal.pone.0000623.

(54) Способ определения активности маннан-связывающих лектин-ассоциированных сериновых протеаз в тесте коагуляции фибриногена

(57) Реферат:

Изобретение относится к клинической иммунологии и гемостазиологии и касается определения активности маннан-связывающих лектин-ассоциированных сериновых протеаз-1 и 2 (МАСП-1,2) в тесте коагуляции фибриногена. Способ определения активности маннан-связывающих лектин-ассоциированных сериновых протеаз-1 и 2 (МАСП-1 и МАСП-2) в тесте коагуляции фибриногена, включающий использование ЭДТА-плазмы в качестве источника фибриногена МАСП-1 и МАСП-2, а

в качестве активатора лектинового пути системы комплемента используют дрожжевой маннан, реакцию активации МАСП запускают добавлением 25 мкл 10% раствора CaCl₂ разведенного (1:31) к 25 мкл пулированной ЭДТА-плазмы крови здоровых доноров и 50 мкл трис-имидазолового буфера, рН 7,4, затем степень коагуляции фибриногена определяют как разность изменения мутности пробы при 450 нм после 45 минутной инкубации при 37°C, степень коагуляции оценивают относительно пробы,

содержащей человеческий тромбин вместо исследуемой плазмы крови человека, максимальную абсорбцию фибринового сгустка, полученного с тромбином, при 450 нм принимают за 100% коагуляцию фибриногена, при этом коагуляцию до 25% считают низкой активностью МАСП-1 и МАСП-2 в тесте коагуляции фибриногена, от 26% до 49% - как среднюю активность МАСП-1 и МАСП-2 и выше 50% -

как высокую активность МАСП-1 и МАСП-2 в тесте коагуляции фибриногена. Изобретение обеспечивает расширение арсенала лабораторных скрининг-тестов для диагностики гиперкоагуляции и угрозы тромбоза, обусловленных высокой функциональной активностью МАСП-1,2 в тесте коагуляции фибриногена. 4 табл., 2 пр.

R U 2 7 3 9 1 1 3 C 1

R U 2 7 3 9 1 1 3 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
G01N 33/50 (2006.01)
C12Q 1/37 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
G01N 33/50 (2020.08); *C12Q 1/37* (2020.08)

(21)(22) Application: **2019131354, 04.10.2019**

(24) Effective date for property rights:
04.10.2019

Registration date:
21.12.2020

Priority:

(22) Date of filing: **04.10.2019**

(45) Date of publication: **21.12.2020 Bull. № 36**

Mail address:

101000, Moskva, Petroverigskij per., 10, str. 3,
FGBU "NMITS TPM" Minzdrava Rossii, v otdel
innovatsionnoj i patentno-pravovoj deyatel'nosti,
Uchevatkinoy 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 byudzhethnoe
uchrezhdenie "Natsionalnyj meditsinskij
issledovatel'skij tsentr terapii i profilakticheskoy
meditsiny" Ministerstva zdravookhraneniya
Rossijskoj Federatsii (FGBU "NMITS TPM"
Minzdrava Rossii) (RU)**

(54) **METHOD FOR DETERMINING ACTIVITY OF MANNAN-BINDING LECTIN-ASSOCIATED SERINE PROTEASES IN A FIBRINOGEN COAGULATION TEST**

(57) Abstract:

FIELD: clinical immunology; haemostasiology.

SUBSTANCE: invention relates to determining the activity of mannan-binding lectin-associated serine proteases-1 and 2 (MASP-1,2) in a fibrinogen coagulation test. A method for determining activity of mannan-binding lectin-associated serine proteases-1 and 2 (MASP-1 and MASP-2) in a fibrinogen coagulation test, involving the use of EDTA plasma as a source of fibrinogen MASP-1 and MASP-2, and as the activator of the lectin pathway of the complement system used is yeast mannan, activation of MASP activation is started by adding 25 mcl of 10 % CaCl₂ diluted (1:31) solution to 25 mcl of the fused EDTA-blood plasma of healthy donors and 50 mcl of tris-imidazole buffer, pH 7.4, then degree of fibrinogen coagulation is determined as difference of change of

turbidity of sample at 450 nm after 45 minute incubation at 37 °C, degree of coagulation is evaluated relative to sample, containing human thrombin in place of human blood plasma analyzed, maximum absorption of fibrin clot obtained with thrombin at 450 nm is taken as 100 % coagulation of fibrinogen, wherein coagulation to 25 % is considered low activity of MASP-1 and MASP-2 in fibrinogen coagulation test, from 26 % to 49 % as average activity of MASP-1 and MASP-2 and higher than 50 % as high activity of MASP-1 and MASP-2 in fibrinogen coagulation test.

EFFECT: invention provides extending the range of laboratory screening tests for diagnosing hypercoagulation and thrombosis threat caused by high functional activity of MASP-1,2 in fibrinogen coagulation test.

1 cl, 4 tbl, 2 ex

C1
2739113
RU

RU
2739113
C1

Изобретение относится к клинической иммунологии и гемостазиологии и касается определения активности маннан-связывающий лектин-ассоциированных сериновых протеаз-1 и 2 (МАСП-1,2) в тесте коагуляции фибриногена.

5 Система комплемента представляет собой механизм раннего реагирования, служащий для инициации и усиления воспалительной реакции в ответ на микробную инфекцию и другие острые повреждения [1].

Несмотря на то, что активация комплемента обеспечивает весьма эффективную первичную защиту от потенциальных патогенов, активность комплемента, которая вызывает защитную воспалительную реакцию, может также представлять
10 потенциальную угрозу для организма хозяина [2,3]

Например, протеолитические продукты C3 и C5 мобилизуют и активируют полиморфноядерные нейтрофилы. Эти активированные клетки являются неспецифичными при выработке разрушающих ферментов и могут привести к поражению собственных органов. Кроме того, активация комплемента может привести
15 к накоплению цитолитического комплекса, терминальных компонентов комплемента, как на микробных клетках-мишенях, так и на соседних клетках организма хозяина, что приводит к лизису клеток организма хозяина. Система комплемента принимает участие в патогенезе многочисленных острых и хронических заболеваний, включая: инфаркт миокарда, реваскуляризация вследствие нарушения мозгового кровообращения,
20 респираторный дистресс-синдром у взрослых, поражение вследствие реперфузии, септический шок, капиллярное кровотечение вследствие термического ожога, воспаление вследствие кардио-легочного шунтирования, отторжение трансплантата, ревматоидный артрит, рассеянный склероз, прогрессирующая миастения, и болезнь Альцгеймера. Почти во всех перечисленных случаях комплемент не является непосредственной
25 причиной данных заболеваний, но представляет собой один из серьезных факторов, вовлеченных в патогенез. Тем не менее, активация комплемента может быть главным патологическим механизмом и представлять собой эффективный показатель для клинического контроля при многих указанных выше заболеваниях. Растущее признание важности комплемент-опосредованных поражений тканей при множестве болезней
30 подчеркивает необходимость создания эффективных медикаментов для ингибирования комплемента. В настоящее время не существует официально одобренных для использования человеком медикаментов, которые бы имели специфическую нацеленность и ингибировали бы активацию комплемента.

Известно, что система комплемента может быть активирована тремя различными
35 путями: классическим, лектиновым и альтернативным. Классический путь активации системы комплемента инициируется при связывании антитела с инородной частицей (т.е., антигеном) и, таким образом, требует предварительного воздействия данного антигена для генерации специфического антитела. Поскольку активация классического пути связана с развитием иммунной реакции, классический путь активации является
40 частью приобретенной иммунной системы. В отличие от этого, лектиновый и альтернативный пути не зависят от клонального иммунитета и являются частью врожденной иммунной системы.

Первым шагом в активации классического пути является прикрепление специфической молекулы распознавания, C1q, к антигенно-нагруженным элементам IgG и IgM.
45 Результатом активации системы комплемента является последовательная активация зимогенов сериновой протеазы. C1q связан с проферментами сериновой протеазы C1r и C1s в комплексе, известном как компонент C1, при связывании C1q с иммунным комплексом, аутопротеолитическое расщепление участка Arg-Ile субкомпонента C1r

сопровождается активацией C1s, которая необходима для расщепления компонентов C4 и C2. Расщепление C4 на два фрагмента, обозначенных соответственно C4a и C4b, позволяет фрагментам C4b сформировать ковалентные связи с примыкающим гидроксильными или amino-группами на поверхности патогена посредством нековалентного взаимодействия с фрагментом C4b компонента C2, расщепления под действием C1si последующей генерацией конвертазы C3 (C4b2a).

C3-конвертаза (C4b2a) активирует компонент C3, который вызывает генерацию C5-конвертазы (C4b2a3b) и формирование мембрано-атакующего комплекса (C5b-9), что может спровоцировать микробный лизис. Активированные формы C3 и C4 (C3b и C4b) ковалентно связываются на чужеродных поверхностях и опсонизируют их для распознавания рецепторами комплемента-1 (CR-1) на фагоцитах.

Первым шагом в активации системы комплемента по лектиновому пути также является прикрепление специфической молекулы распознавания, за которым следует активация ассоциированных сериновых протеаз. Однако более верным, чем прикрепление к иммунным комплексам при помощи C1q, является то, что молекулы распознавания в лектиновом пути активации представляют собой белки, связывающие углеводы (маннан-связывающий лектин (МСЛ), Н-фиколин, М-фиколин, и L-фиколин) [4-6]. Икеда и соавторы первыми продемонстрировали, что подобно молекуле C1q, МСЛ может активировать систему комплемента C4-зависимым путем, прикрепляясь к эритроцитам, покрытым маннанами дрожжей [7]. МСЛ, член семейства коллектиновых белков, представляет собой кальций-зависимый лектин, который связывает углеводы с гидроксильными группами в 3 и 4 положении, ориентированными в экваториальной плоскости пиранозного кольца. Главными лигандами для МСЛ являются, таким образом, D-манноза и N-ацетил-D-глюкозамин, в то время как для углеводов, не соответствующих подобному стерическому требованию, афинность по отношению к МСЛ не выявлена [8]. Взаимодействие между МСЛ и моновалентными сахарами является чрезвычайно слабым, с типичными константами диссоциации порядка 2 ммоль. МСЛ достигает стойкого специфического связывания с полисахаридными лигандами в процессе одновременного взаимодействия с множественными остатками моносахаридов [9]. МСЛ распознает углеводные структуры, которые обычно покрывают микроорганизмы, такие как бактерии, дрожжи, паразиты и некоторые вирусы. Однако МСЛ не распознает D-галактозу и сиаловую кислоту, которые обычно покрывают «зрелый» гликоконъюгатный комплекс гликопротеинов, присутствующих в плазме млекопитающих и находящихся на поверхности их клеток. Данная специфичность связывания может помочь в защите от самопроизвольной активации. Однако MBL не образует высокоаффинных связей со скоплениями высокоразветвленных маннозных предшественников гликанов на N-связанных гликопротеинах и гликолипидах, находящихся в эндоплазмическом ретикулуме и звездчатых невритах (Гольджи) клеток млекопитающих [10]. Следовательно, поврежденные клетки являются потенциальными мишенями для лектинового пути активации посредством MBL-связывания.

Фиколины обладают отличным от MBL типом лектинового домена, известным как фибриноген-подобный домен. Фиколины связывают остатки сахара Ca²⁺-независимым образом. У людей идентифицировано три типа фиколинов: L-фиколин, М-фиколин и Н-фиколин. Два сывороточных фиколина, L-фиколин и Н-фиколин имеют общность в специфичности к N-ацетил-D-глюкозамину; однако Н-фиколин также связывается с N-ацетил-D-галактозамином. Специфичность по отношению к различным сахарам у L-фиколина, Н-фиколина и MBL означает, что различные лектины могут быть

комплементарны различным, хотя и частично перекрывающимся гликоконъюгатам. Данная концепция поддерживается недавним сообщением о том, что среди известных лектинов, принимающих участие в лектиновом пути активации, только L-фиколин специфическим образом связывается с липотейхоевой кислотой, гликоконъюгатом клеточной стенки, обнаруженным во всех грамм-положительных бактериях [11].

Коллектины, то есть, MBL и фиколины, не имеют значительного сходства в аминокислотной последовательности. Однако эти две группы белков имеют схожие организации доменов и, подобно Clq, собираются в олигомерные структуры, которые максимально увеличивают возможность многосайтового связывания. У здоровых людей концентрация MBL в сыворотке сильно варьирует в популяциях, и он генетически контролируется полиморфизмом или мутациями как в промоторе, так и в кодирующей области гена MBL. Так как белок MBL является белком острой фазы, то его дальнейшая экспрессия регулируется во время воспалительного процесса. L-фиколин присутствует в сыворотке в такой же концентрации, как и MBL. Поэтому, роль L-фиколина в лектиновом пути активации по значимости потенциально сравнима с ролью MBL. MBL и фиколины могут также выступать в роли опсоинов, которые требуют взаимодействия между данными белками и рецепторами фагоцитов [12,13]. Однако идентичность рецептора (ов) на клетках-фагоцитах не была установлена. MBL человека при помощи своего коллагено-подобного домена осуществляет высокоаффинное специфичное взаимодействие с уникальными Clr/Clс-подобными сериновыми протеазами, названными MBL-ассоциированными сериновыми протеазами (МАСП). К настоящему времени описано три типа МАСП. Сначала одиночный фермент «МАСП» был идентифицирован и охарактеризован как фермент, отвечающий за инициацию классического пути активации комплемента (т.е., расщепление C2 и C4) [14]. Позже выяснилось, что МАСП на самом деле представляет собой комбинацию двух протеаз: МАСП-1 и МАСП-2 [15]. Однако было продемонстрировано, что комплекс MBL-MASP-2 сам по себе является достаточным для активации комплемента [16]. Кроме того, только MASP-2 расщеплял C2 и C4 с высокой эффективностью [17]. Поэтому, MASP-2 представляет собой протеазу, ответственную за активацию C4 и C2 для генерации C3-конвертазы, C4b2a. В этом заключается его значительное отличие от комплекса C1, где скоординированная активность двух специфичных сериновых протеаз (C1r и C1s) приводит к активации системы комплемента. Недавно была выделена третья новая протеаза, MASP-3 [18].

MASP-1 и MASP-3 представляют собой продукты одного и того же гена, полученные в результате альтернативного сплайсинга. Их биологические функции до сих пор остаются невыясненными. MASPs имеют одинаковую доменную организацию с белками C1r и C1s, ферментными субкомпонентами комплекса C1, классического пути активации системы комплемента [19]. Как в протеазах C1, активация MASP-2 протекает при расщеплении связи Arg-Pe, примыкающей к домену сериновой протеазы, это приводит к расщеплению фермента на связанные дисульфидными связями цепочки A и B, последняя из которых состоит из домена сериновой протеазы. Генетически обусловленная неполноценность MASP-2 была описана в недавних исследованиях [20]. Мутация одного нуклеотида приводит к замене Asp в домене CUB1, что в свою очередь лишает MASP-2 способности связываться с MBL. MBL также связывается с неферментным белком, обозначаемым как MBL-связанный белок 19 кДа (МАр19) [21] или малым MBL-связанным белком (sMAP) [22]. МАр19 формируется при альтернативном сплайсинге продукта гена MASP-2 и содержит два первых домена MASP-2, за которыми следует дополнительная последовательность четырех уникальных аминокислот. Гены MASP-1 и MASP-2 расположены на хромосомах 3 и 1, соответственно

[23]. Ряд данных указывают на то, что существуют различные комплексы MBL-MASPs, а также на то, что значительная часть находящихся в сыворотке MASPs не связана с MBL [24]. H- и L-фиколин также связываются с MASP и активируют лектиновый путь также, как MBL [25].

5 Оба - лектиновый и классический, - пути активации комплемента формируют общую C3-конвертазу (C4b2a) и оба пути активации сходятся в этом пункте. Считается, что лектиновому пути активации комплемента принадлежит ведущая роль в иммунной
10 защите организма против инфекции. Доказательства вовлеченности MBL в иммунную реакцию были получены в результате наблюдений за субъектами, имеющими
15 пониженный уровень функционального MBL в сыворотке [26]. Такие субъекты демонстрируют восприимчивость к рецидивирующим бактериальным и грибковым инфекциям. Данные симптомы обычно проявляются в раннем возрасте, во время
20 определенного промежутка времени, когда титр производных от материнских антител снижается, а собственные антитела еще не вырабатываются в полном объеме. Данный синдром часто является следствием мутаций некоторых сайтов в коллагеновой части
25 MBL, которая препятствует непосредственному образованию олигомеров MBL. MBL способен функционировать в качестве независимого от комплемента опсонина, остается невыясненным, до какого предела повышенная восприимчивость к инфекции обусловлена нарушениями в активации комплемента. Несмотря на исчерпывающие
30 доказательства участия всех путей активации классического и альтернативных - в патогенезе неинфекционных человеческих заболеваний, роль лектинового пути активации только начинают оценивать. Недавние исследования показали, что активация лектинового пути может провоцировать активацию комплемента и воспаление, связанное с реперфузионным повреждением после ишемии. Коллард и соавт. (2000)
35 показали, что культивируемые эндотелиальные клетки, подвергнутые окислительному стрессу, связываются с MBL и демонстрируют отложение C3b в присутствии человеческой сыворотки [27]. Кроме того, обработка человеческой сыворотки блокирующими анти-MBL моноклональными антителами ингибирует связывание MBL и активацию комплемента. Данные открытия были проверены опытным путем на
40 лабораторных крысах с ишемией-реперфузией миокарда, в процессе чего у крыс, подвергшихся лечению с использованием блокирующих крысиных моноклональных антител к MBL, наблюдали значительно меньше случаев поражения миокарда вследствие закупорки коронарной артерии, чем у крыс, подвергнутых лечению контрольными антителами [28].

35 Все три пути активации (т.е., классический, лектиновый и альтернативный) сходятся на компоненте C5, который расщепляется на C5a и C5b. C5a является самым сильным анафилатоксином, индуцирующим изменения как в гладкой мускулатуре и сосудистом тоне, так и в проницаемости сосудов. Он также представляет собой эффективный хемотаксин и активатор как нейтрофилов, так и моноцитов. C5a-опосредованная
40 клеточная активация может значительным образом усиливать воспалительные реакции путем индуцирования секреции дополнительных воспалительных медиаторов, включая цитокины, гидролитические ферменты, метаболиты арахидоновой кислоты и активные формы кислорода. Расщепленный C5b приводит к формированию C5b-9, также известного как мембрано-атакующий комплекс (МАК). В настоящее время имеются
45 веские доказательства того, что сублитическое отложение МАК может играть важную роль в воспалительном процессе в дополнение к роли литического, поро-формирующего комплекса при активации системы комплемента.

В дополнение к клеточным и сосудистым эффектам вышеописанного

активированного компонента комплемента, который может объяснить связь между травмой и ДВС, появляются новые данные, которые подтверждают прямые молекулярные взаимодействия между системами комплемента и коагуляции.

5 Экспериментальные данные были получены при исследованиях на мышцах нокаутных по компоненту C3 комплемента. Поскольку C3 является общим компонентом для всех трех путей активации комплемента, у мышей с дефицитом компонента C3 нарушена функция комплемента. Однако мышцы с C3-дефицитом могут превосходно активировать терминальные компоненты комплемента [29]. Детальные исследования выявили, что C3-независимая активация терминальных компонентов комплемента опосредована
10 тромбином, ключевым ферментом коагуляционного каскада [30]. Молекулярные компоненты, опосредующие активацию тромбина после начальной активации комплемента, остались пока невыясненными. Авторы показали молекулярную основу связи между комплементом и коагуляционными каскадами и идентифицировали MASP-2 в качестве центральной молекулы, связывающей две системы. Биохимические
15 исследования о субстратной специфичности MASP-2 идентифицировали протромбин в качестве возможного субстрата в дополнение к широко известным белкам комплемента C2 и C4. MASP-2 специфически расщепляет протромбин, генерируя тромбин, ключевой фермент, регулирующий скорость коагуляционного каскада плазмы крови [31]. Тромбин, генерированный MASP-2, стимулировал отложение фибрина в условиях *in vitro*,
20 демонстрируя специфичность расщепления протромбина MASP-2 [32]. Авторы подтвердили физиологическую значимость данного открытия *in vivo* посредством определения активации тромбина в нормальной сыворотке грызунов после активации лектинового пути, а также продемонстрировали, что данный процесс блокируется нейтрализующими MASP-2 моноклональными антителами. MASP-2 может представлять
25 центральную точку разветвления в лектиновом пути, способную стимулировать активацию как системы комплемента, так и коагуляцию плазмы. Поскольку активация лектинового пути представляет собой физиологическую реакцию на многие виды травматических повреждений, авторы полагают, что сопутствующее системное воспаление (опосредованное компонентами комплемента) и диссеминированное
30 внутрисосудистое свертывание (ДВС) (опосредованное через коагуляционный путь) можно объяснить способностью MASP-2 активировать оба пути. Данный факт подтверждает роль MASP-2 в развитии ДВС синдрома и терапевтическую целесообразность ингибирования MASP-2 при лечении или предупреждении ДВС синдрома. MASP-2 может обеспечить молекулярную связь между комплементом и
35 коагуляционной системой, и активация лектинового пути, возникающая при разных травмах, может непосредственно инициировать активацию коагуляционной системы через ось «MASP-2-тромбин», обеспечивая механизм связи между травмой и ДВС.

MASP-1 похожа с тромбином в том, что она расщепляет фактор XIII, фибриноген и тромбин-активируемый ингибитор фибринолиза (ТАИФ), в то время как MASP-2
40 расщепляет только протромбин [33-35]

Гулла и соавт. (2010) показали, что MСЛ-МАСП и L-фиколин-МАСП комплексы активируют коагуляционную систему при связывании к их соответствующими лигандами с образованием фибринового сгустка. Образовавшийся фибриновый сгусток фиксирует микробы и ингибирует их распространение [36].

45 Также как тромбин, MASP-1 способен активировать протеазо-активируемый рецептор 4, который является медиатором тромбоцитарной активации и воспаления [37]. MASP-3 расщепляет инсулино-подобный ростовой фактор-связывающий белок 5 (ИПРФСБ-5), который связывает к инсулино-подобному фактору роста (ИПФР) и

модулирует его действие на клеточную пролиферацию, дифференциацию, выживание [38]. ИПРФСБ-5 также регулирует эти клеточные события через ИПФР-независимые механизмы. Недавно было показано, что дефицит МАСП-3 у человека обусловлен мутацией гена МАСП-1 и связан с нарушениями эмбрионального развития, одним из синдромов которого является лицевая расщелина - «волчья пасть». Данный факт предполагает, что МАСП-3 выполняет критическую роль в эмбриональном развитии плода [39].

Таким образом, в настоящее время не существует доступных тест-систем определения функциональной активности МАСП в тесте коагуляции фибриногена для рутинных исследований.

Из уровня техники известен способ определения активности МСЛ-ассоциированных сериновых протеаз-2 (МАСП-2) по коагуляции фибриногена. Для этого предварительно 96-ти луночные иммунологические планшеты сорбируют маннаном в течение 18 часов при 4°C, отмывают активизирующим буфером. Параллельно в другой 96-ти луночной планшете собирают тестовую систему, включающую крысиные рекомбинантные маннан-связывающий лектин (рМСЛ) и рекомбинантный МАСП-2 (рМАСП-2), инкубируют их в течение 1 часа при 4°C и переносят в первую планшету с иммобилизованным маннаном. Повторно инкубируют собранную систему из двух очищенных белков в течение ночи при 4°C для того, чтобы комплексы рМСЛ/рМАСП-2 связались с маннаном. На следующий день после отмывки добавляют очищенные из плазмы протромбин и фибриноген в соответствующих количествах. Далее пробы инкубируют при 37°C и фотометрируют при длине волны 405 нм для определения полимеризации фибрина. За 100% коагуляцию фибриногена при данной концентрации принимают максимальную абсорбцию фибринового сгустка, которая была получена при инкубации фибриногена с активным человеческим тромбином [32].

Недостатком известного способа определения активности МАСП-2 в тесте коагуляции фибриногена с одной стороны является использование очищенных белков из плазмы крови человека (протромбина и фибриногена) и рекомбинантных белков (рМСЛ и рМАСП-2), что делает тест не доступным для рутинных исследований.

Задачей настоящего изобретения является создание скрининг-теста для определения активности маннан-связывающий лектин-ассоциированных сериновых протеаз в тесте коагуляции фибриногена для диагностики гиперкоагуляции и угрозы тромбоза, обусловленных высокой функциональной активностью лектинового пути системы комплемента.

Техническим результатом предлагаемого способа является расширение арсенала лабораторных скрининг-тестов для диагностики гиперкоагуляции и угрозы тромбоза, обусловленных высокой функциональной активностью МАСП-1,2 в тесте коагуляции фибриногена.

Указанный результат достигается тем, что определение функциональной активности МАСП в тесте коагуляции фибриногена проводят с использованием ЭДТА-плазмы в качестве источника фибриногена и МАСП-1,2, а в качестве активатора лектинового пути системы комплемента используют дрожжевой маннан. Реакцию активации МАСП запускают добавлением оптимальной концентрации кальция. Степень коагуляции фибриногена определяют как разность изменения мутности пробы при 450 нм после 45 минутной инкубации при 37°C. Степень коагуляции оценивают относительно пробы, содержащей человеческий тромбин вместо исследуемой плазмы крови человека. Максимальную абсорбцию фибринового сгустка, полученного с тромбином, при 450 нм принимают за 100% коагуляцию фибриногена. Коагуляция до 25% считают низкой

активностью МАСП-1/2 в тесте коагуляции фибриногена, от 26% до 49% - средняя активность МАСП-1/2 и выше 50% - как высокую активность МАСП-1/2 в тесте коагуляции фибриногена.

Способ осуществляют следующим образом. Проводят забор крови в вакутейнер, содержащий ЭДТА, готовят тромбоцит обедненную плазму. Проведение теста коагуляции фибриногена с использованием ЭДТА-плазмы, маннана в качестве активатора лектинового пути системы комплемента, и CaCl_2 для рекальцификации ЭДТА-плазмы. Время проведения теста составляет 60 мин.

Определение оптимальной концентрации хлорида кальция для запуска коагуляции ЭДТА-плазмы. С этой целью предварительно в 96-ти луночных плоскодонных планшетах 25 мкл 10% раствор хлорида кальция был прогрессивно раститрован начиная со второй лунки по восьмую лунку. После добавляют по 50 мкл трис-имидазолового буфера, рН 7,4 и 25 мкл пулированной ЭДТА-плазмы относительно здоровых доноров. Тщательно перемешивают и измеряют поглощение в пробах при 450 нм на фотометре для ИФА анализа (0 мин), далее ставят на 60-минутную инкубацию при 37°C. Измерение поглощения проб для контроля коагуляции проводят каждые 10 мин инкубации (10, 20, и 30 мин). Полученные данные представлены в таблице 1.

Как видно из данных, представленных в таблице 1, максимальная коагуляция ЭДТА-плазмы наблюдается при добавлении 25 мкл 10% раствора CaCl_2 , разведенного (1:31), к 25 мкл пулированной ЭДТА-плазмы крови здоровых доноров и 50 мкл трис-имидазолового буфера, рН 7,4.

Таблица 1

Влияние концентрации 0,25 М раствора хлорида кальция на коагуляцию 25% пулированной ЭДТА-плазмы доноров

25

10% CaCl_2 , мкл в 100 мкл 25% ЭДТА-плазмы		25	12,5	6,25	3,125	1,56	0,78	0,39	0,195
A ₄₅₀	0 мин	0,105	0,107	0,101	0,103	0,100	0,100	0,102	0,103
	10 мин	0,116	0,115	0,103	0,103	0,101	0,101	0,102	0,104
	20 мин	0,12	0,119	0,101	0,102	0,101	0,187	0,101	0,103
	30 мин	0,125	0,122	0,105	0,102	0,382	0,383	0,100	0,103

30

Определение коагуляции ЭДТА-плазмы при рекальцификации. К 25 мкл ЭДТА-плазмы добавляли 50 мкл трис-имидазолового буфера, рН 7,4 и 25 мкл 10% раствора CaCl_2 , разведенного (1:31). Пробы тщательно перемешивали и измеряли оптическую плотность проб при длине волны 450 нм (0 мин). Затем пробы инкубировали в течение 45 и 60 мин при 37°C. В качестве контроля 100% коагуляции ЭДТА-плазмы использовали пробы с тромбином (к 25 мкл ЭДТА-плазмы добавляли 65 мкл трис-имидазолового буфера и 10 мкл тромбина с активностью 10 НИН). Полученные результаты представлены в таблице 2.

35

Как видно из данных, представленных в таблице 2, в ЭДТА-плазмах при рекальцификации и последующей 60-ти минутной инкубации коагулируют фибриноген от 0 до 54,7%. При рекальцификации цитратных плазм в отличие от ЭДТА-плазмы и инкубации в течение 30 мин наблюдается коагуляция 100% фибриногена. Отсутствие коагуляции в некоторых ЭДТА-плазмах при рекальцификации, возможно, связано с ингибированием протромбиназного комплекса, вследствие чего не образуется активный тромбин и не коагулирует фибриноген. В 9 пробах ЭДТА-плазмы при рекальцификации наблюдается коагуляция от 14,4 до 54,7%. В остальных же 15 пробах ЭДТА-плазмы коагуляция фибриногена либо полностью отсутствует, либо не превышает 10% от

40

45

фибриногена в этих пробах.

Таким образом, 45 минутная инкубация нами выбрана как оптимальная для определения активности маннан-связывающий лектин-ассоциированных сериновых протеаз (МАСП) в тесте коагуляции фибриногена, а в качестве специфического активатора лектинового пути системы комплемента нами использован маннан из *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma).

Таблица 2

Влияние рекальцификации ЭДТА-плазмы на коагуляцию фибриногена

№ пробы	0 мин A ₄₅₀	45 мин A ₄₅₀	60 мин A ₄₅₀	ΔA ₄₅₀ (60 мин)	% коагуляции (60 мин)	ΔA ₄₅₀ тромбин/ (100% коагуляции)
1	0,122	0,124	0,125	0,003	0,6	0,537
2	0,107	0,11	0,222	0,115	39,0	0,295
3	0,167	0,216	0,347	0,18	50,3	0,358
4	0,132	0,133	0,14	0,008	1,7	0,47
5	0,099	0,107	0,236	0,137	43,8	0,313
6	0,106	0,106	0,326	0,22	44,9	0,49
7	0,106	0,108	0,123	0,017	3,6	0,477
8	0,096	0,097	0,097	0,001	0,2	0,406
9	0,136	0,138	0,166	0,03	8,2	0,368
10	0,113	0,116	0,137	0,024	4,8	0,500
11	0,099	0,101	0,178	0,079	14,4	0,548
12	0,113	0,115	0,16	0,047	9,9	0,476
13	0,136	0,133	0,137	0,001	0,2	0,496
14	0,111	0,114	0,285	0,174	43,8	0,397
15	0,087	0,088	0,103	0,016	3,0	0,527
16	0,102	0,103	0,105	0,003	0,6	0,474
17	0,099	0,101	0,102	0,003	0,8	0,382
18	0,113	0,166	0,315	0,202	38,3	0,528
19	0,104	0,101	0,101	-0,003	0	0,494
20	0,097	0,098	0,097	0	0	0,52
21	0,111	0,112	0,112	0,001	0,2	0,454
22	0,094	0,317	0,337	0,243	54,7	0,444
23	0,101	0,102	0,311	0,21	45,9	0,458
24	0,111	0,109	0,11	-0,001	0	0,654

Пример осуществления изобретения.

Пример 1.

Определения активности маннан-связывающий лектин-ассоциированных сериновых протеаз в тесте коагуляции фибриногена.

К 25 мкл ЭДТА-плазмы добавляли 40 мкл трис-имидазолового буфера, рН 7,4 и 10 мкл препарата маннана из *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma-Aldrich) с концентрацией 10 мг/мл. Реакцию активации лектинового пути системы комплемента запускали добавлением 25 мкл 10% раствора CaCl₂, разведенного (1:31). Пробы тщательно перемешивали и измеряли оптическую плотность проб при длине волны 450 нм (0 мин). Затем пробы инкубировали в течение 45 при 37°C. В качестве контроля на остаточную коагуляцию использовали пробы ЭДТА-плазмы без маннана, контроль на полную коагуляцию фибриногена в ЭДТА-плазме представлял собой пробы с избытком тромбина с активностью 10 НИН в пробе (25 мкл ЭДТА-плазмы, 65 мкл трис-имидазолового буфера и 10 мкл тромбина). Полученные результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3

Активность МАСП в тесте коагуляции фибриногена

№ пробы	Контр ΔA ₄₅₀	Опыт ΔA ₄₅₀	Контр % коагул	Опыт % коагул	Активность МАСП в % относит. коагуляции тромбином	ΔA ₄₅₀ (тромбин) 100% коагуляция
1	0,002	0,007	0,4	1,3	0,9	0,537
2	0,003	0,102	1,0	34,6	33,6	0,295
3	0,049	0,1	13,7	27,9	14,2	0,358
4	0,001	0,006	0,2	1,3	1,1	0,47
5	0,008	0,104	2,6	33,2	30,6	0,313
6	0	0,003	0	0,6	0,6	0,49
7	0,002	0,118	0,4	24,7	24,3	0,477
8	0,001	0,061	0,2	15,0	14,8	0,406
9	0,002	0,005	0,5	1,4	0,9	0,368
10	0,003	-0,001	0	0	0	0,500
11	0,002	0,001	0,4	0,2	0	0,548
12	0,002	0,003	0,4	0,6	0,2	0,476
13	-0,003	0,01	0	2,0	2,0	0,496
14	0,003	0,03	0,8	0,8	0	0,397
15	0,001	0,017	0,2	3,2	3	0,527
16	0,001	0,064	0,2	13,5	13,3	0,474
17	0,002	0,003	0,5	0,8	0,3	0,382
18	0,053	0,108	10,0	20,5	10,5	0,528
19	-0,003	0	0	0	0	0,494
20	0,001	0,005	0,2	1,0	0,8	0,52
21	0,001	0,002	0,2	0,4	0,2	0,454
22	0,223	0,259	50,2	58,3	8,1	0,444
23	0,001	-0,001	0,2	0	0	0,458
24	0,023	0,389	4,8	81,6	76,8	0,477

Как видно из данных, представленных в таблице 3, рекальцификация ЭДТА-плазмы в присутствии 1 мг/мл препарата маннана вызывает активацию лектинового пути системы комплемента, который приводит к большей степени коагуляции фибриногена при инкубации в течение 45 мин по сравнению с контрольной пробой (без маннана). Как было показано выше, инкубация проб в течение 45 мин не вызывает существенной коагуляции ЭДТА-плазмы при рекальцификации (фоновая коагуляция контрольной пробы). Только в двух контрольных пробах (без маннана) (пробы №3 и 22) фибриноген коагулировал более 10%.

Таким образом, при рекальцификации ЭДТА-плазмы в присутствии маннана, активируется лектиновый путь системы комплемента, который вызывает коагуляции фибриногена.

Пример 2.

Сравнительные исследования активности лектинового пути системы комплемента методами иммуноферментного анализа, теста коагуляции фибриногена и содержание C-реактивного белка (высокочувствительный иммуноферментный анализ).

Проведены сравнительные исследования функциональной активности лектинового пути системы комплемента предлагаемым методом и методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием набора «EuroDiagnostica» (Швеция). Тест определения функциональной активности лектинового пути комплемента проводили как описано выше. Тест ИФА проводили согласно инструкции, прилагаемой к набору WIESLAB Complement system Lectin pathway. В ИФА тесте используются меченные моноклональные антитела к неоантигену (C5b-9), появляющемуся при активации системы комплемента по лектиновому пути. Количество неоантигена пропорционально функциональной активности системы комплемента. В качестве активатора лектинового пути системы комплемента служит иммобилизованный маннан из *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma-

Aldrich) на подложках 96-ти луночных плоскодонных иммунологических планшет. На первом этапе разведенная 1:99 сыворотка инкубируется в течение 60 мин при 37°C. После инкубации планшета отмывается 4 раза промывочным буфером и повторно инкубируются с конъюгатом моноклональных антител к неоантигену C5b-9 с щелочной фосфатазой. Повторно инкубируют в течение 30 мин и промывают планшету 4 раза. После, на 3 этапе, добавляют субстратный буфер и инкубируют в течение 30 мин при комнатной температуре. Результаты теста измеряют при 405 нм на фотометре для ИФА. Рассчитывают функциональную активность лектинового пути системы комплемента относительно контрольной сыворотки в процентах. Нормальным значением функциональной активности лектинового пути комплемента производителем предлагается величина относительной функциональной активности комплемента иммуноферментным методом на уровне 50% при колебании от 0 до 125% (n=120). Также определяли маркер воспалительной реакции, СРБ, с использованием набора реагентов (АО «Вектор-Бест», Россия) для высокочувствительного (вч) иммуноферментного определения СРБ в сыворотке крови лиц с абдоминальным ожирением. Полученные результаты представлены в таблице 4.

Как видно из данных, представленных в таблице 4, повышенная функциональная активность лектинового пути системы комплемента в тесте иммуноферментного анализа выявлена в 24 пробах, что составляет 55%. В то время как высокая активность лектинового пути комплемента в тесте коагуляции ФГ только в 12 пробах превышает 50%, в 13 пробах (30%) средняя активность колеблется в пределах от 26 до 49% и в 16 пробах (36%) низкая активность лектинового пути определяется менее 25%. В трех пробах наблюдается ингибирование фоновой коагуляции контрольной пробы в присутствии маннана. Данный факт свидетельствует о высоком ингибиторном (антикоагулянтном) потенциале при рекальцификации ЭДТА плазмы в присутствии маннана. Определение вчСРБ показало повышенный уровень (более 3МЕ/л) в 21 пробе (48%). Из них только в 12 пробах (57% от всех проб с высоким уровнем вчСРБ) была связана с повышенной активностью лектинового пути, выявленной иммуноферментным анализом. Повышенный уровень всех трех показателей, представленных в таблице №4, определяется только в 4 пробах. Наибольшее совпадение наблюдается в 10 пробах (23%) повышенных активностей функциональной активности лектинового пути системы комплемента и вчСРБ.

Таким образом, повышенная активность лектинового пути активации системы комплемента в тесте коагуляции ФГ не связана с литической активностью ЛПСК и с маркером системной воспалительной реакции, вчСРБ. Повышенная активности ЛПСК в тесте коагуляции ФГ свидетельствует о высокой прокоагулянтной активности комплемента по лектиновому пути активации. Скрининг-тест для определения активности МАСП-1,2 в тесте коагуляции фибриногена может быть использован для диагностики гиперкоагуляции и угрозы тромбоза, обусловленных высокой функциональной активностью лектинового пути системы комплемента.

Таблица 4

Активности лектинового пути системы комплемента (иммуноферментный анализ, тест коагуляции фибриногена) и содержание СРБ (высокочувствительный тест)

№ проб	Активность ЛПСК, % ИФА	Активность ЛПСК (%) в тесте коагуляции ФГ	СРБ (вч), МЕ/л	№ проб	Активность ЛПСК, % ИФА	Активность ЛПСК (%) в тесте коагуляции ФГ	СРБ (вч), МЕ/л
1	116	77	10	23	67	26	6,0
2	67	76	0,75	24	176	7	6,2
3	65	0	4,2	25	69	46	10

	4	126	6	4,2	26	113	80	3,5
	5	158	83	3,8	27	47	64	2,6
	6	100	44	2,9	28	45	75	6,4
	7	25	9	5,0	29	152	-22 !!!	10
5	8	25	51	1,7	30	13	13	1,3
	9	65	14	0,5	31	8	50	4,9
	10	45	32	0,8	32	0	47	4,15
	11	0	32	1,6	33	9	-28 !!!	2,3
	12	111	0	2,3	34	21	30	1,7
	13	11	11	0,5	35	61	21	2,9
10	14	12	45	5,0	36	58	44	1,0
	15	6	48	5,6	37	157	21	7,0
	16	34	9	0,8	38	30	-25 !!!	3,5
	17	103	15	1,1	39	0	-1	4,1
	18	0	63	6,6	40	0	68	2,3
	19	104	3	3,2	41	118	25	1,1
15	20	138	75	1,4	42	216	2	3,8
	21	35	62	2,3	43	142	32	8,1
	22	112	13	1,4	44	63	39	2,0

Литература

1. Liszewski M.K. and Atkinson J.P., 1993, in *Fundamental Immunology*, Third Edition, edited by W.E.Paul, Raven Press, Ltd., New York).
2. Kalli K.R., Hsu P., Fearon D.T. Therapeutic uses of recombinant complement protein inhibitors // *Springer Semin Immunopathol.* - 1994. - V. 15, № 4. - P.417-31.
3. Morgan B.P. Clinical complementology: recent progress and future trends // *Eur J Clin Invest.* - 1994. - V. 24, № 4. - P. 219-228.
4. Lu J., Teh C., Kishore U., Reid K.B. Collectins and ficolins: sugar pattern recognition molecules of the mammalian innate immune system // *Biochim Biophys Acta.* - 2002. - V. 1572, №(2-3). - P.387-400.
5. Holmskov U., Thiel S., Jensenius J.C. Collectins and ficolins: humoral lectins of the innate immune defense // *Annu Rev Immunol.* - 2003. - V. 21. - P.547-78.
6. The C., Le Y., Lee S.H., Lu J.. M-ficolin is expressed on monocytes and is a lectin binding to N-acetyl-D-glucosamine and mediates monocyte adhesion and phagocytosis of *Escherichia coli* // *Immunology.* - 2000. - V. 101, №2. - P. 225-232.
7. Ikeda K., Sannoh T., Kawasaki N., Kawasaki T., Yamashina I. Serum lectin with known structure activates complement through the classical pathway // *J Biol Chem.* - 1987. - V. 262, №16. - P.7451-4.
8. Weis W.I., Drickamer K., Hendrickson W.A. Structure of a C-type mannose-binding protein complexed with an oligosaccharide // *Nature.* - 1992. - V. 360, №6400. - P.127-34.
9. Lee R.T., Ichikawa Y., Kawasaki T., Drickamer K., Lee Y.C. Multivalent ligand binding by serum mannose-binding protein // *Arch Biochem Biophys.* - 1992. - V. 299, № 1.-V. 129-36.
10. Maynard Y., Baenziger J.U. Characterization of a mannose and N-acetylglucosamine-specific lectin present in rat hepatocytes // *J Biol Chem.* - 1982. - V. 257, № 7. - P. 3788-94.
11. Lynch N.J., Roscher S., Hartung T., Morath S., Matsushita M., Maennel D.N., Kuraya M., Fujita T., Schwaible W.J. L-ficolin specifically binds to lipoteichoic acid, a cell wall constituent of Gram-positive bacteria, and activates the lectin pathway of complement // *J Immunol.* - 2004. - V.172, №2. - P.1198-202.
12. Kuhlman M., Joiner K., Ezekowitz R.A. The human mannose-binding protein functions as an opsonin // *J Exp Med.* - 1989. - V. 169, № 5. - P.1733-45.
13. Matsushita M., Endo Y., Taira S., Sato Y., Fujita T., Ichikawa N., Nakata M., Mizuochi T. A novel human serum lectin with collagen- and fibrinogen-like domains that functions as an

opsonin // J Biol Chem. - 1996. - V.271, №5 - P.2448-54.

14. Ji Y.H., Fujita T., Hatsuse H., Takahashi A., Matsushita M., Kawakami M. Activation of the C4 and C2 components of complement by a proteinase in serum bactericidal factor, Ra reactive factor. J. Immunol. 150:571-578, 1993.

5 15. Thiel S., Vorup-Jensen T., Stover C.M., Schwaeble W., Laursen S.B., Poulsen K., Willis A.C., Eggleton P., Hansen S., Holmskov U., Reid K.B., Jensenius J.C. A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement Nature. 1997 Apr 3;386(6624):506-10.

10 16. Vorup-Jensen T., Petersen S.V., Hansen A.G., Poulsen K., Schwaeble W., Sim R.B, Reid K.B., Davis S.J., Thiel S., Jensenius J.C. Distinct pathways of mannan-binding lectin (MBL)- and C1-complex autoactivation revealed by reconstitution of MBL with recombinant MBL-associated serine protease-2. J Immunol. 2000 Aug 15;165(4):2093-100.

15 17. Ambrus G., Gál P., Kojima M., Szilágyi K., Balczer J., Antal J., Gráf L., Laich A., Moffatt B.E., Schwaeble W., Sim R.B., Závodszky P. Natural substrates and inhibitors of mannan-binding lectin-associated serine protease-1 and -2: a study on recombinant catalytic fragments. J Immunol. 2003 Feb 1;170(3):1374-82.

18. Dahl MR., Thiel S., Matsushita M., Fujita T., Willis A.C., Christensen T., Vorup-Jensen T., Jensenius J.C. MASP-3 and its association with distinct complexes of the mannan-binding lectin complement activation pathway. Immunity. 2001; 15(1): 127-35.

20 19. Sim R.B., Laich A. Serine proteases of the complement system. Biochem Soc Trans. 2000; 28(5): 545-50.

20. Stengaard-Pedersen K., Thiel S., Gadjeva M., Møller-Kristensen M., Sørensen R., Jensen L.T., Sjøholm A.G., Fugger L., Jensenius J.C. Inherited deficiency of mannan-binding lectin-associated serine protease 2. N Engl J Med. 2003; 349(6): 554-60.

21. Stover CM(1), Thiel S, Thelen M, Lynch NJ, Vorup-Jensen T, Jensenius JC, Schwaeble WJ. Two constituents of the initiation complex of the mannan-binding lectin activation pathway of complement are encoded by a single structural gene. J Immunol. 1999; 162(6): 3481-90.

22. Takahashi M., Endo Y., Fujita T., Matsushita M. A truncated form of mannose-binding lectin-associated serine protease (MASP)-2 expressed by alternative polyadenylation is a component of the lectin complement pathway. Int Immunol. 1999; 11(5): 859-63.

23. Schwaeble W., Dahl M.R., Thiel S., Stover C., Jensenius J.C. The mannan-binding lectin-associated serine proteases (MASPs) and MAP19: four components of the lectin pathway activation complex encoded by two genes. Immunobiology. 2002; 205(4-5): 455-66.

24. Thiel S., Petersen S.V., Vorup-Jensen T., Matsushita M., Fujita T., Stover C.M., Schwaeble W.J., Jensenius J.C. Interaction of C1q and mannan-binding lectin (MBL) with C1r, C1s, MBL-associated serine proteases 1 and 2, and the MBL-associated protein MAP19. J Immunol. 2000; 165(2): 878-87.

25. Dahl M.R., Thiel S., Matsushita M., Fujita T., Willis A.C., Christensen T,

26. Vorup-Jensen T., Jensenius J.C. MASP-3 and its association with distinct complexes of the mannan-binding lectin complement activation pathway. Immunity. 2001; 15(1):127-35.

27. Matsushita M., Kuraya M., Hamasaki N., Tsujimura M., Shiraki H., Fujita T. Activation of the lectin complement pathway by H-ficolin (Hakata antigen). J Immunol. 2002; 168(7): 3502-6.

28. Kilpatrick D.C. Mannan-binding lectin: clinical significance and applications. Biochim Biophys Acta. 2002; 1572(2-3): 401-13.

29. Collard C.D., **Väkevä A.**, Morrissey M.A., Agah A., Rollins S.A., Reenstra W.R., et al. Complement activation after oxidative stress: role of the lectin complement pathway. *Am J Pathol.* 2000; 156(5): 1549-56.
- 5 30. Jordan J.E., Montalto M.C., Stahl G.L. Inhibition of mannose-binding lectin reduces postischemic myocardial reperfusion injury. *Circulation.* 2001; 104(12): 1413-8.
31. Huber-Lang., Sarma J.V., Zetoune F.S., Rittirsch D., Neff T.A., McGuire S.R., et al. Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway. *Nat Med.* 2006; 12(6): 682-7.
- 10 32. Krarup, A., Wallis R., Presanis J.S., Gal P, Sim R.B. Simultaneous Activation of Complement and Coagulation by MBL-Associated Serine Protease 2. // *PLoS. ONE.* (2007) 2(7): e623. DOI:10.1371/journal.pone.0000623.
33. Krarup, A., WallisR., PresanisJ.S., GalP., SimR.B. Simultaneous Activation of Complement and Coagulation by MBL-Associated Serine Protease 2. // *PLoS. ONE.* (2007) 2(7): e623. Doi: 10.1371/journal.pone.0000623.
- 15 34. Hess K., Ajjan R., Phoenix F., **Dobó J., Gál P.**, Schroeder V. Effects of MASP-1 of the complement system on activation of coagulation factors and plasma clot formation. *PLoS One.* 2012; 7(4): e35690. doi: 10.1371/journal.pone.0035690.
- 20 35. Krarup A., Gulla K.C., **Gál P.**, Hajela K., Sim R.B. The action of MBL-associated serine protease 1 (MASP1) on factor XIII and fibrinogen. *Biochim Biophys Acta.* 2008; 1784(9): 1294-300. doi: 10.1016/j.bbapap.2008.03.020.
36. Krarup A(1), Mitchell DA, Sim RB. Recognition of acetylated oligosaccharides by human L-ficolin. *Immunol Lett.* 2008; 118(2): 152-6. doi: 10.1016/j.imlet.2008.03.014.
- 25 37. Gulla K.C., Gupta K., Krarup A., Gal P, Schwaeble W.J., Sim R.B., O'Connor C.D., Hajela K. Activation of mannan-binding lectin-associated serine proteases leads to generation of a fibrin clot. *Immunology.* 2010; 129(4):482-95. doi: 10.1111/j.1365-2567.2009.03200.x.
38. Megyeri M., **Makó V.**, Beinrohr L., Doleschall Z., **Prohászka Z.**, Cervenak L., **Závodszky P., Gál P.** Complement protease MASP-1 activates human endothelial cells: PAR4 activation is a link between complement and endothelial function. *J Immunol.* 2009; 183(5): 3409-16. doi: 10.4049/jimmunol.0900879.
- 30 39. Cortesio C.L., Jiang W. Mannan-binding lectin-associated serine protease 3 cleaves synthetic peptides and insulin-like growth factor-binding protein 5. *Arch Biochem Biophys.* 2006; 449 (1-2): 164-70.
- 35

(57) Формула изобретения

Способ определения активности маннан-связывающих лектин-ассоциированных сериновых протеаз-1 и 2 (МАСП-1 и МАСП-2) в тесте коагуляции фибриногена, включающий использование ЭДТА-плазмы в качестве источника фибриногена МАСП-1 и МАСП-2, а в качестве активатора лектинового пути системы комплемента используют дрожжевой маннан, реакцию активации МАСП запускают добавлением 25 мкл 10% раствора CaCl₂ разведенного (1:31) к 25 мкл пулированной ЭДТА-плазмы крови здоровых доноров и 50 мкл трис-имидазолового буфера, рН 7,4, затем степень коагуляции фибриногена определяют как разность изменения мутности пробы при 450 нм после 45 минутной инкубации при 37°C, степень коагуляции оценивают относительно пробы, содержащей человеческий тромбин вместо исследуемой плазмы крови человека, максимальную абсорбцию фибринового сгустка, полученного с тромбином, при 450

40

45

нм принимают за 100% коагуляцию фибриногена, при этом коагуляцию до 25% считают низкой активностью МАСП-1 и МАСП-2 в тесте коагуляции фибриногена, от 26% до 49% - как среднюю активность МАСП-1 и МАСП-2 и выше 50% - как высокую активность МАСП-1 и МАСП-2 в тесте коагуляции фибриногена.

5

10

15

20

25

30

35

40

45