РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) **RU** (11) **2 772 195** (13) **C1**

(51) МПК
G01N 33/86 (2006.01)
G01N 33/52 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/49 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
G01N 33/86 (2022.02); G01N 33/52 (2022.02); G01N 33/543 (2022.02); G01N 33/49 (2022.02)

(21)(22) Заявка: **2021131361, 27.10.2021**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
27.10.2021

Дата регистрации:
18.05.2022

Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: **27.10.2021**

(45) Опубликовано: **18.05.2022** Бюл. № **14**

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):
Шойбонов Батожаб Батожаргалович (RU), Драпкина Оксана Михайловна (RU), Раднаева Чимит Батожабовна (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: **SU 1461462 A1, 28.02.1989. SU 1464090 A1, 07.03.1989. SU 1522102 A1, 15.11.1989. RU 2660706 C1, 09.07.2018. EP 0360871 B1, 19.01.1994. CN 104714036 A, 17.06.2015. FAREED J. et al. Application of syntetic chromogenic peptid substrate in the evalution of coagulation enzymes and their inhibitors. 1979.**

(54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ АНТИТРОМБИНА III В ПЛАЗМЕ КРОВИ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины. Предложен способ определения функциональной активности антитромбина III (АТ III) в плазме крови, включающий взаимодействие АТ III с гепарином. Функциональную активность антитромбина III в исследуемой плазме крови определяют как концентрацию гепарина, вызывающую 100% ингибирование контактного пути коагуляции. В качестве контроля используют пробу плазмы без гепарина. Параллельно определяют активность контактного пути коагуляции. Нормой содержания АТ III считают концентрацию гепарина от 0,31 до 0,625 мкг/мл при нормальной активности контактного пути коагуляции. Изобретение обеспечивает удешевление, упрощение теста при диагностике нарушений гемостаза, многократное увеличение производительности исследования функциональной активности АТ III по сравнению с прототипом, а также быструю адаптацию метода для рутинных исследований в условиях клинико-диагностических лабораторий. 4 табл., 2 пр.

RU 2772195 C1

RU 2772195 C1

RUSSIAN FEDERATION

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 772 195** (13) **C1**

(51) Int. Cl.
G01N 33/86 (2006.01)
G01N 33/52 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/49 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC
G01N 33/86 (2022.02); G01N 33/52 (2022.02); G01N 33/543 (2022.02); G01N 33/49 (2022.02)

(21)(22) Application: **2021131361, 27.10.2021**

(24) Effective date for property rights:
27.10.2021

Registration date:
18.05.2022

Priority:
(22) Date of filing: **27.10.2021**

(45) Date of publication: **18.05.2022** Bull. № **14**

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):
Shojbonov Batozhab Batozhargalovich (RU), Drapkina Oksana Mikhajlovna (RU), Radnaeva Chimit Batozhabovna (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 DETERMINING THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF ANTITHROMBIN III IN BLOOD PLASMA

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to the field of medicine. A method is proposed for determining the functional activity of antithrombin III (AT III) in blood plasma, including the interaction of AT III with heparin. The functional activity of antithrombin III in the studied blood plasma is defined as the concentration of heparin that causes 100% inhibition of the contact coagulation pathway. A plasma sample without heparin is used as a control. In parallel, the activity of the contact pathway of coagulation is determined. The norm of the content of AT III is considered to be the concentration of heparin from 0.31 to 0.625 mcg/ml with normal activity of the contact coagulation pathway.

EFFECT: invention provides reduction in cost, simplification of the test in diagnosing hemostasis disorders, multiple increase in the productivity of the study of the functional activity of AT III in comparison with the prototype, as well as rapid adaptation of the method for routine studies in clinical diagnostic laboratories.

1 cl, 4 tbl, 2 ex

RU 2772195 C1

RU 2772195 C1

Изобретение относится к клинической лабораторной диагностике, а именно к способу определения функциональной активности антитромбина III (АТ III) в плазме крови, и может быть использовано для диагностики патологических состояний системы свертывания крови.

Антитромбин III (АТ III) - серпин и основной ингибитор тромбина, ФХа и ФIXа. Он инактивирует также ФXIа и ФXIIа. АТ III нейтрализует тромбин и другие сериновые протеазы посредством ковалентного связывания. В результате формируется неактивный 1:1 стехиометрический комплекс между ферментом и ингибитором путем образования связи аргинин-содержащего активного центра АТ III и активного серинового центра тромбина. Скорость нейтрализации сериновых протеаз антитромбином III в отсутствие гепарина невелика и увеличивается в 1000-100000 раз при его присутствии.

АТ III - α2-гликопротеин с молекулярной массой 580000 Да, синтезируется в печени. Его называют также гепариновым кофактором 1. Гепарин имеет два сайта связывания с АТ III, тромбин - один. Гепарин связывается с лизиновыми остатками на АТ III, что делает аргининовый активный центр доступным для активного серинового центра тромбина. Связывание гепарина с АТ III ускоряет образование комплекса тромбин - АТ III - гепарин. Ковалентная связь между активным сериновым центром тромбина и аргининовым сайтом комплекса АТ III - гепарин вызывает инактивацию активной сериновой протеазы.

После образования комплекса между АТ III и тромбином гепарин диссоциирует из комплекса и связывается с другой молекулой АТ III, генерируя множественные циклы инактивации фермента. Нейтрализация активированных форм иных факторов свертывания крови посредством АТ III происходит по аналогичному механизму, но при различных скоростях инактивации. Для катализа ингибирования ФХа достаточно, чтобы гепарин связался только с АТ III. Однако для ингибирования тромбина гепарин должен связаться с АТ III и тромбином (ФIIа). На долю АТ III приходится более 80% всей противосвертывающей (антикоагулянтной) активности крови.

Дефицит АТ III приводит к развитию различного вида тромбофилий и возникает вследствие снижения его синтеза при тяжелых заболеваниях и повреждениях печени, а также в результате его интенсивного потребления в процессе свертывания крови, например, при ДВС-синдроме, развивающемся при сепсисе, шоке, ожоговой болезни, сочетанных травмах, акушерской патологии, злокачественных новообразованиях, инфекционных заболеваниях, а также при длительном лечении фибринолитиками, гепарином. Уровень содержания АТ III в крови в норме составляет 235±25 мкг/мл, у больных он снижается на 25-50%.

В клинико-лабораторной практике применяют, в основном, непрямые (косвенные) способы определения содержания АТ III в плазме крови, основанные на оценке его активности, определяемой по остаточной активности стандартного препарата тромбина после его инактивации АТ-III-гепариновым комплексом.

Известен косвенный способ определения содержания АТ III в плазме крови, в котором в качестве субстрата для тромбина используют фибриноген, об активности АТ III судят по времени образования фибрина [Баркаган З.С., Макаров В.А., Лычов ВТ. Новые методы лабораторной диагностики диссеминированного внутрисосудистого свертывания (ДВС-синдрома). Методические рекомендации, М., 1989, с. 23]. Активность АТ III выражают в процентах, за 100% принимают активность смеси плазмы здоровых доноров. У здоровых людей активность АТ III, определяемая таким способом, колеблется в пределах 85-115%.

Прямые (непосредственные) способы количественного определения АТ-III в плазме

крови обеспечивают высокую чувствительность, строгую специфичность и характеризуются высокой надежностью, однако, как правило, сложны в выполнении, требуют больших затрат труда и времени и использование специальной аппаратуры и реактивов.

Известен иммуноферментный способ прямого количественного определения АТ-III в плазме крови, осуществляемый как многостадийная последовательность проведения иммунологических и ферментативных реакций [T. Andersson et al. Thrombos. Res., 1996, v. 82, p. 109]. АТ-III взаимодействует со специфичными к нему антителами, иммобилизованными на поверхности лунок полистироловых планшетов. Количественное определение АТ III проводят спектрометрическим анализом образующихся окрашенных продуктов ферментативного гидролиза. Несмотря на высокую чувствительность и специфичность, способ не используют в повседневной лабораторной практике, т.к. он сложен в выполнении и требует дорогостоящего оборудования и реактивов.

Известен способ лазерной нефелометрии, в котором образование иммунных комплексов АТ-III со специфическими к нему антителами протекает в растворе и сопровождается увеличением светорассеяния [K. Akiyata et al. Thrombos. Res., 1993, v. 72, p. 193]. Способ обеспечивает быстрое получение результата, характеризуется высокой чувствительностью и специфичностью, однако требует использования крайне дорогостоящего импортного оборудования, поэтому недоступен для применения в повседневной медицинской практике.

Известен способ определения содержания АТ III в плазме крови методом радиальной иммунодифузии [Энциклопедия клинических лабораторных тестов./ Под ред. Н. Тица, пер. с англ. М., Из-во Лаб. Информ., 1997, с. 1137]. Способ основан на взаимодействии АТ III со специфичными к нему поликлональными антителами, помещенными в 1%-ный агаровый гель. Образцы плазмы крови заливают в пробитые в геле лунки, а затем проводят инкубацию во влажной камере в течение 20 часов. Содержание АТ III определяют на основании измерения диаметра визуально наблюдаемых кольцевых зон преципитации. Способ обеспечивает высокую чувствительность, не требует сложного оборудования, однако для получения результата требуется не менее 18-20 часов, что ограничивает его использование в клинико-лабораторной практике и делает непригодным для экспресс-анализа. В основном этот способ используют в научно-исследовательских целях.

Известен способ определения концентрации АТ III в плазме крови. Сущность способа состоит в том, что используют суспензию сферических частиц карбоксилированного полистирольного латекса, на поверхности которых иммобилизованы специфические поликлональные антитела к АТ III, а в качестве балластного белка добавлен α-казеин молока (АТ 111-латгест), при этом для определения используют последовательные дробные разведения плазмы, и концентрацию АТ III в исходном образце рассчитывают по формуле.

Способ обеспечивает быстрое получение результата, характеризуется высокой чувствительностью и специфичностью, однако способ не отражает функциональной активности АТ-III [Розенфельд М.А, Леонова В.Б., Костанова Е.А., Васильева М.В. Способ определения концентрации антитромбина III в плазме крови //Патент РФ №2262109. Опубл. 10.10.2005. Бюл. №28].

Прототипом предлагаемого способа определения функциональной активности антитромбина III является способ оценки активности АТ-III в плазме крови, основанный на применении строго специфичного тромбину низкомолекулярного хромогенного

субстрата [J. Fareed et al. "Application of syntetic chromogenic peptid substrate in the evalution of coagulation enzymes and their inhibitors", 1979]. Обладая достаточной чувствительностью, этот способ, как косвенный, также может давать искаженный результат из-за влияния побочных факторов. Кроме того, применение этого способа ограничено необходимостью использования дорогостоящего специального оборудования и соответствующих наборов реагентов (тромбина и синтетического субстрата тромбина).

Способ доступен и прост в выполнении, но не может считаться достаточно надежным: являясь косвенным, он не обеспечивает строгую специфичность определения, так как на время образования фибрина, кроме остаточной активности тромбина, могут влиять побочные факторы, например медикаментозные средства, циркулирующие в крови, что приводит к искажению результатов определения. Кроме того, недостаточная чувствительность способа не позволяет регистрировать возникновение дефицита АТ-III на ранних стадиях заболеваний. Кроме того, для проведения теста требуются очищенные и дорогостоящие препараты белков, тромбина и фибриногена.

Задачей настоящего изобретения является разработка простого способа определения функциональной активности антитромбина III. Это позволит многократно увеличить производительность теста, удешевить его за счет использования доступного для клинико-диагностических лабораторий доступных реактивов для теста - препарата гепарина и хлорида кальция.

Техническим результатом предлагаемого способа является удешевление, упрощение теста при диагностике нарушений гемостаза, многократное увеличение производительности исследования функциональной активности АТ III по сравнению с прототипом, а также быстрая адаптация метода для рутинных исследований в условиях клинико-диагностических лабораторий.

Указанный результат достигается тем, что предварительно прогрессивно титруют раствор гепарина, добавляют цитратную плазму и проводят рекальцификацию путем добавления раствора хлорида кальция в лунки 96-ти луночных плоскодонных планшет для иммуноферментного анализа, инкубируют пробы в течение 30 мин при 37°С. Определение коагуляции плазмы проводят фотометрически по изменению мутности при инкубации проб при длине волны 450 нм. Функциональную активность антитромбина III в плазме крови определяют как концентрацию гепарина, вызвающую 100% ингибирование контактного пути коагуляции. В качестве контроля используют пробу плазмы без гепарина. Нормальным значением АТ III считают концентрацию гепарина (эквивалент гепарина (ЭГ) от 0,31 до 0,625 мкг/мл при нормальной активности контактного пути коагуляции.

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 предварительно прогрессивно титруют раствор гепарина от 2,5 мкг/мл до 0,078 мкг/мл, добавляют по 25 мкл трис-имидазолового буфера, исследуемой цитратной плазмы и 10% $CaCl_2$, разведенного 1:31 (общий объем пробы составляет 100 мкл), в лунки 96-ти луночных плоскодонных иммунологических планшет для иммуноферментного анализа, тщательно перемешивают и инкубируют пробы в течение 30 мин при 37°С. Определение коагуляции плазмы проводят фотометрически по изменению мутности проб при длине волны 450 нм. Функциональную активность антитромбина III в исследуемой плазме крови определяет концентрация гепарина, вызвающая 100% ингибирование контактного пути коагуляции. В качестве контроля используют пробу плазмы без гепарина.

Приготовление пулированной цитратной плазмы. Предварительно для отбора

цитратных плазм для приготовления пулированной плазмы проводят тест определения активности контактного пути коагуляции, включающий смешивание цитратной плазмы крови с хлоридом кальция и последующую фотометрическую регистрацию свертывания, при этом в качестве активатора контактного пути коагуляции используют 96-луночные плоскодонные планшеты, запускают реакцию добавлением по 25 мкл 10% раствора хлорида кальция, разведенного 1:31, цитратной плазмы, 50 мкл трис-имидазолового буфера, и после инкубации при 37°С в течение 30 мин проводят фотометрическое определение коагуляции плазмы по изменению мутности проб при длине волны 450 нм с интервалами измерения 0, 5, 10, 15, 20, 25 и 30 мин [Драпкина О.М., Шойбонов Б.Б., Елиашевич С.О. и соавт. Скрининг-тест определения контактного пути коагуляции // Патент РФ №2660706. Опубл. 09.07.2018. Бюл. №19. Полученные данные представлены в таблице 1.

Таблица 1

Определение активности контактного пути коагуляции цитратных плазмах доноров

№ проб	Время инкубации, мин						
	0	5	10	15	20	25	30
	A_{450}						
1	0,1099	0,1123	0,1125	0,1125	0,1167	0,1887	0,2819
2	0,12	0,1202	0,1207	0,1236	0,2027	0,339	0,3772
3	0,0789	0,079	0,0869	0,213	0,5566	0,6884	0,7118
4	0,1027	0,1018	0,1088	0,1483	0,2286	0,2914	0,3135
5	0,0784	0,079	0,0796	0,0906	0,1781	0,3134	0,3679
6	0,1054	0,1044	0,1048	0,1052	0,1141	0,178	0,2699
7	0,0812	0,0813	0,0817	0,0923	0,2647	0,4056	0,4454
8	0,0949	0,0941	0,0948	0,1289	0,2521	0,3158	0,3332
9	0,0837	0,0845	0,0847	0,0846	0,0948	0,1307	0,184
10	0,1259	0,1255	0,1259	0,1261	0,1264	0,1284	0,1444

11	0,147	0,148	0,1482	0,1487	0,1574	0,213	0,2844
12	0,1006	0,1009	0,1012	0,1062	0,1657	0,2433	0,2868
13	0,0996	0,0993	0,1003	0,1354	0,2795	0,371	0,4005
14	0,1126	0,112	0,1123	0,1144	0,1697	0,368	0,4672
15	0,1058	0,1057	0,106	0,1186	0,2695	0,4008	0,4268
16	0,0856	0,0856	0,0855	0,0866	0,1089	0,2408	0,3434
17	0,0793	0,0798	0,0804	0,0934	0,1944	0,3139	0,3516
18	0,1004	0,1005	0,1021	0,1246	0,1591	0,1977	0,226
19	0,0982	0,0965	0,0959	0,0962	0,1497	0,2462	0,2621
20	0,0923	0,0946	0,0955	0,1611	0,3011	0,3161	0,3183
21	0,0944	0,0941	0,0937	0,0935	0,096	0,1196	0,1725
22	0,1144	0,1173	0,1176	0,1179	0,1202	0,146	0,213
23	0,0953	0,0958	0,0955	0,0958	0,1238	0,279	0,3862
24	0,1239	0,129	0,1302	0,2359	0,2825	0,2844	0,284
25	0,0901	0,0904	0,0905	0,0975	0,2284	0,3181	0,3396
26	0,0929	0,0924	0,0924	0,0937	0,1336	0,268	0,3126
27	0,0794	0,08	0,0807	0,1071	0,2352	0,2991	0,3172
28	0,0977	0,0975	0,0972	0,1598	0,384	0,4279	0,4335
29	0,0905	0,0898	0,0914	0,1163	0,2457	0,3377	0,3629
30	0,1013	0,1007	0,1007	0,103	0,2013	0,3704	0,4127
31	0,1102	0,1079	0,1107	0,1662	0,2706	0,3923	0,4283
32	0,0828	0,0828	0,0825	0,0827	0,083	0,1034	0,1924

Как видно из данных, представленных в таблице 1, в 6 пробах цитратной плазмы определяется гипокоагуляция (время коагуляция плазмы более 20 минут). Для приготовления пулированной цитратной плазмы с нормальным временем коагуляции плазмы по контактному пути отобраны пробы, коагулирующие в течение 20 минут.

Определение оптимальной концентрации гепарина для ингибирования контактного пути коагуляции. Предварительно прогрессивно титруют раствор гепарина по 25 мкл (исходная концентрация 10 мг/мл) на 16 лунок (от 1,25 мг/мл до 0,038 мкг/мл) в плоскодонных 96-ти луночных иммунологических планшетах. Затем в лунки добавляют по 25 мкл буфера, пулированной цитратной плазмы и 10% раствор $CaCl_2$, разведенный 1:31. Тщательно перемешивают и измеряют поглощение в пробах при 450 нм на фотометре для ИФА анализа с термостатируемым блоком (0 мин), далее проводят 30-минутную инкубацию при 37°С. Контроль пулированной цитратной плазмы не содержит гепарина. После инкубации измеряют степень коагуляции и рассчитывают процент ингибирования гепарином контактного пути коагуляции относительно контрольной пробы (плазма без гепарина). Полученные результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2

Ингибирование гепарином контактного пути коагуляции (КПК) пулированной цитратной плазмы

Гепарин, мкг/мл	2,5	1,25	0,625	0,31	0,155	0,078	0,039	0
% ингибирования КПК	100	100	100	100	100	88	10	0

Как видно из таблицы 2, полное ингибирование пулированной нормальной цитратной плазмы наблюдается при концентрации гепарина в пробе, равной 0,155 мкг/мл или выше. Эффект ингибирования является дозо-зависимым. Данная концентрация гепарина отражает функциональную активность антитромбина III в тесте ингибирования гепарином контактного пути коагуляции. В дальнейших исследованиях нами использован диапазон концентрации гепарина в пробе от 0,039 до 2,5 мкг/мл по данным графика.

Примеры осуществления изобретения.

Пример 7. Определение функциональной активности АТ III в тесте полного ингибирования гепарином контактного пути коагуляции индивидуальных проб в тесте «СТОКПК» Предварительно готовят раствор гепарина с концентрацией 10 мкг/мл буфера. Затем прогрессивно титруют раствор гепарина по 25 мкл (исходная концентрация 10 мкг/мл) начиная со 2 лунки по 7 лунку плоскодонных 96-ти луночных иммунологических планшет. Затем добавляют по 25 мкл трис-имидазолового буфера, исследуемой цитратной плазмы и 10% $CaCl_2$, разведенного 1:31 (общий объем пробы составляет 100 мкл). Тщательно перемешивают и измеряют поглощение в пробах при 450 нм на фотометре для ИФА анализа с термостатируемым блоком (0 мин), далее проводят 30-минутную инкубацию при 37°С. Для каждой исследуемой плазмы ставят контроль, который не содержит гепарин. После инкубации измеряют степень коагуляции и рассчитывают процент ингибирования гепарином контактного пути коагуляции относительно контрольной пробы.

Параллельно в этих же пробах цитратной плазмы определяют активность контактного пути коагуляции. Условия проведения эксперимента описаны выше. Полученные результаты представлены на таблице 3.

Таблица 3

Определение концентрации гепарина для 100% ингибирования КПК и активность контактного пути коагуляции («СТОКПК») в индивидуальных цитратных плазмах

№ проб	Гепарин, мкг/мл 100% ингибирование	СТОКПК, мин	№ проб	Гепарин, мкг/мл 100% ингибирование	СТОКПК, мин
1	0,31	15	16	0,31	15
2	0,078	20	17	0,31	15
3	0,31	15	18	нет коаг	30
4	0,625	15	19	2,5	20
5	нет коаг.	60	20	0,625	25
6	0,31	15	21	1,25	15
7	0,31	25	22	1,25	15
8	0,625	15	23	2,5	10
9	**2,5**	10	24	2,5	10
10	**0,31**	25	25	2,5	10
12	0,625	10	27	1,25	20
13	0,625	15	28	0,31	15
14	**2,5**	**5**	29	0,625	15
15	0,625	10			

Как видно из данных, представленных в таблице №3, для 100% ингибирования контактного пути коагуляции в индивидуальных пробах цитратной плазмы требуется от 0,078 до 2,5 мкг/мл гепарина. При очень низкой активности контактного пути даже в контроле плазмы мы не видим коагуляции при рекальцификации. В пяти пробах из шести (83%) максимальная концентрация гепарина, ингибирующая на 100% коагуляцию плазмы (2,5 мкг/мл), была четко связана с высокой активностью контактного пути коагуляции. Данный факт показывает, что низкая функциональная активность антитромбина III вызывает гиперкоагуляцию в скрининг-тесте определения активности контактного пути коагуляции. Из семи проб с высокой активностью контактного пути коагуляции в двух пробах (29%) концентрация гепарина, оказывающая 100% ингибирование КПК, была менее 2,5 мкг/мл.

Таким образом, полученные данные при сравнении результатов определения функциональной активности антитромбина III, которая характеризуется концентрацией гепарина, вызывающей 100% ингибирование контактного пути коагуляции, свидетельствуют о том, что высокая активность КПК в 83% обусловлена пониженной функциональной активностью антитромбина III.

Пример 2. Определение содержания АТ III в плазме крови относительно здоровых доноров. Определение концентрации гепарина для 100% ингибирования контактного пути коагуляции и активности КПК в тесте «СТОКПК» проводили как описано выше. Для сравнения в таблице представлены результаты определения функциональной

активности АТ III в тех же образцах, полученные с использованием коммерческого набора реагентов "Реахром - АТ III" (НПО «РЕНАМ», Москва) (прототип) для определения активности АТ III с хромогенным субстратом согласно инструкции производителя. Полученные результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4

Сравнительные данные определения АТ III предлагаемым способом, прототипом и активности контактного пути коагуляции цитратной плазмы (СТОКПК)

№ проб	АТ III - Гепарин, мкг/мл	СТОКП, мин	АТ III, % (83-128%)	№ проб	АТ III - Гепарин, мкг/мл	СТОКПК, мин	АТ III, % (83-128%)
1	0,625	10	83	13	2,5	15	108
2	2,5	10	68	14	1,25	10	107
3	0,31	10	97	15	0,31	10	104
4	0,625	15	103	16	2,5	20	96
5	1,25	15	107	17	0,31	15	101
6	2,5	10	90	18	0,31	10	106
7	1,25	15	92	19	0,625	10	98
8	0,155	10	106	20	1,25	15	87
9	0,625	10	104	21	0,31	15	105
10	0,078	15	98	22	0,078	10	103
11	0,155	15	98	23	0,31	10	87
12	0,625	15	107	24	0,31	Контрольная сыворотка 15	98
13	1,25	15	109	25		Калибратор «РЕНАМ»	102

Как видно из данных, представленных в таблице 4, из 9 проб с нормальной (15 мин) активностью контактного пути коагуляции (КПК) в 4 пробах (44,4%) для 100% ингибирования КПК требуется от 1,25 мкг/мл до 2,5 мкг/мл гепарина, в 3 пробах (33,3%) - от 0,31 до 0,625 мкг/мл, 2 пробах (22,2%), от 0,078 до 0,155 мкг/мл. В контрольной сыворотке с нормальной активностью КПК требуется 0,31 мкг/мл гепарина. В калибраторе присутствует только АТ III, поэтому тест КПК не определялся.

Таким образом нормальная активность КПК обеспечивается функциональной активностью АТ III в 33,3% эквивалентной гепарину (ЭГ) от 0,31 до 0,625 мкг/мл как и в контрольной сыворотке (0,31 мкг/мл) («Ренам», РФ). В то время в 44,4% случаев нормальная активность КПК обусловлена низкой функциональной активностью АТ III (от 1,25 до 2,5 мкг/мл гепарина) и только в 22.2% случаев - высокой функциональной активностью АТ III (0,078-0,155 мкг/мл гепарина).

Интересные данные получены в 12 пробах плазмы из 23 тестированных проб с высокой активностью КПК (10 мин). Нормальный уровень АТ III (0,31-0,625 мкг/мл ЭГ) встречается в 7 пробах (58%), в 3 пробах (25%) (1,25-2,5 мкг/мл ЭГ) и только в 2

пробах (17%) (0,078-0,155 мкг/мл ЭГ).

Полученные результаты с пробами с высокой активностью КПК свидетельствуют с одной стороны о том, что в регуляции активности КПК играет большей степени С1 ингибитор системы комплемента. С другой стороны разработанный тест свидетельствует о том, что модификация АТ III приводит к изменению функциональной активности, когда как низкие концентрации АТ III (менее 0,155 мкг/мл ЭГ), так и высокие концентрации АТ III не существенно влияют на активность КПК.

Таким образом, предлагаемый способ позволяет надежно диагностировать патологические состояния системы свертывания крови, обусловленные модификацией АТ III. Приведенные данные показывают, что в отличии от известных, используемых в настоящее время способов предлагаемый способ определения антитромбина III в плазме крови сочетает высокую чувствительность и надежность с доступностью, простотой выполнения. Для его осуществления не требуется специальное оборудование и реагенты, кроме гепарина и кальция.

Метод является наиболее физиологичным и тестирование концентрации АТ III в комплексе с гепарином (при соотношении 1:1) проводится по естественному субстрату тромбина, фибриногену. Параллельно антикоагулянтный потенциал плазмы отражает тест определения активности контактного пути коагуляции. Для адекватной оценки функциональной активности АТ III необходимо сопоставление этих двух показателей.

(57) Формула изобретения

Способ определения функциональной активности антитромбина III (АТ III) в плазме крови, включающий взаимодействие АТ III с гепарином, отличающийся тем, что предварительно прогрессивно титруют раствор гепарина с 2,5 мкг/мл до 0,078 мкг/мл, добавляют по 25 мкл трис-имидазолового буфера, исследуемой нитратной плазмы и 10% $CaCl_2$, разведенного 1:31, при общем объеме пробы 100 мкл в лунки 96-луночных плоскодонных иммунологических планшет, тщательно перемешивают и инкубируют пробы в течение 30 мин при 37°С, определяют коагуляцию плазмы фотометрически по изменению мутности проб при длине волны 450 нм, функциональную активность антитромбина III в исследуемой плазме крови определяют как концентрацию гепарина, вызывающую 100% ингибирование контактного пути коагуляции, в качестве контроля используют пробу плазмы без гепарина, параллельно определяют активность контактного пути коагуляции и нормой содержания АТ III считают концентрацию гепарина от 0,31 до 0,625 мкг/мл при нормальной активности контактного пути коагуляции.