**СОВЕТ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ И СПЕЦИАЛИСТОВ
ПРИ ГЛАВЕ РЕСПУБЛИКИ СЕВЕРНАЯ ОСЕТИЯ-АЛАНИЯ
МИНИСТЕРСТВО РЕСПУБЛИКИ СЕВЕРНАЯ ОСЕТИЯ-АЛАНИЯ ПО ДЕЛАМ МОЛОДЕЖИ,
ФИЗИЧЕСКОЙ КУЛЬТУРЫ И СПОРТА
ВЛАДИКАВКАЗСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР РАН И ПРАВИТЕЛЬСТВА РСО-АЛАНИЯ
СЕВЕРО-ОСЕТИНСКОЕ РЕГИОНАЛЬНОЕ ОТДЕЛЕНИЕ ОБЩЕРОССИЙСКОЙ ОБЩЕСТВЕННОЙ
ОРГАНИЗАЦИИ «РОССИЙСКИЙ СОЮЗ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ»**



**V МЕЖДУНАРОДНАЯ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ
«МОЛОДЫЕ УЧЕНЫЕ В РЕШЕНИИ АКТУАЛЬНЫХ ПРОБЛЕМ НАУКИ»**

**19-21 июня 2014 г.
Владикавказ**

УДК 577.112:616.15

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ИНГИБИТОРА АКТИВАТОРА ПЛАЗМИНОГЕНА 1 ТИПА В ПЛАЗМЕ КРОВИ

Рока-Моя Я. М., Билоус В. Л., Жерносеков Д. Д., Рыбачук В. Н., Гриненко Т. В.
Институт биохимии имени А.В. Палладина НАН Украины, Украина, г. Киев
E-mail: yanulia@bk.ru

Уровень ингибитора активатора плазминогена 1 типа (PAI-1) является одним из показателей, которые отражают фибринолитический потенциал крови. Повышение концентрации PAI-1 при таких патологических состояниях, как сердечнососудистые заболевания, канцерогенез, сахарный диабет, послеоперационные осложнения, свидетельствует о нарушении гемостатического баланса и является прогностическим маркером риска тромбогенеза. Нами разработан амидолитический метод определения активности PAI-1, основанный на ингибировании реакции активации плазминогена тканевым активатором, с использованием полимерного desAB-фибрина быка в качестве стимулятора. Результаты валидации свидетельствуют о том, что предложенный метод характеризуется высокой точностью, воспроизводимостью, специфичностью и позволяет определять функционально активную форму PAI-1 в плазме крови человека.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF THE METHOD FOR MEASURING PLASMINOGEN ACTIVATOR INHIBITOR-1 ACTIVITY IN BLOOD PLASMA

Roka-Moya Y. M., Bilous V. L., Zhernossekov D. D., Rybachuk V. N., Grinenko T. V.

The level of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) is one of the indicators which reflect the fibrinolytic potential of blood. The increased PAI-1 level during pathological processes such as cardiovascular diseases, tumor, diabetes mellitus and postsurgical complications gives evidence of the hemostatic disbalance and is a prognostic marker of thrombogenesis risk. We have developed the amidolytic method for measuring PAI-1 activity based on the inhibition of plasminogen activation by tissue plasminogen activator with the usage of polymeric bovine desAB-fibrin as a stimulator. The results of carried validation have shown that the proposed method is characterized by high precision, reproducibility and specificity. The method can be used for determination of functionally active form of PAI-1 in human blood plasma.

Ингибиторактиватораплазминогена 1 типа (plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1) –этоприродныйвысоко-специфичныйингибиторпротеиназ-активаторовплазминогена – тканевогоактиватора (tissue plasminogen activator, tPA) иурокиназы. PAI-1 относится к семейству ингибиторов сериновых протеиназ (серпинов). Серпины выступают «суицидальными субстратами», после гидролиза которых протеиназы-мишени оказываются в ловушке ковалентного неактивного комплекса с ингибитором. Однако, PAI-1 отличается от других серпинов крайне коротким периодом полужизни, поскольку спонтанно превращается из активной в термодинамически более стабильную латентную форму. В плазме крови он представлен одновременно в нескольких конформационно-функциональных формах: в активном состоянии в комплексе с адгезивным белком витронектином, в неактивном состоянии в комплексе с tPA и витронектином, в неактивном состоянии вне комплекса [1]. Источником базального уровня PAI-1 плазмы могут быть эндотелиальные клетки стенок сосудов, гепатоциты, адипоциты. В зонах активации реакций каскада свертывания крови или при нарушении целостности сосудов активированные тромбоциты высвобождают дополнительный пул ингибитора.

В работах [2-5] отмечают, что увеличение уровня активной формы PAI-1 в плазме крови является неблагоприятным прогностическим маркером при сердечнососудистых и онкологических заболеваниях, оперативных вмешательствах и воспалительных процессах, в то время как низкий уровень активности этого серпина сопровождается риском развития геморрагий [6]. Ввиду того, что уровень PAI-1 является важным показателем состояния системы гемостаза, существует необходимость в определении этого протеина в плазме крови. Для оценки количества PAI-1 в лабораторно-клинической практике используются методы иммуноферментного анализа. Однако при использовании данных методов следует учитывать, что с анти-PAI-1 антителами могут взаимодействовать различные формы ингибитора. Так, фармакологическая коррекция системного фибринолитического

потенциала при сердечно-сосудистых заболеваниях ассоциирована с изменением активности PAI-1, а уровень PAI-1-антигена, определяемый методом иммуноферментного анализа, остается постоянным [7]. Поэтому для корректной оценки состояния фибринолитической системы наряду с методами иммуноферментного анализа ингибиторную активность данного серпина в плазме крови определяют амидолитическим методом с использованием тест-системы «СОАТЕСТ PAI» (Chromogenix, Швеция) либо её аналогов.

Принцип определения активности PAI-1 по стандартной процедуре «СОАТЕСТ PAI» предусматривает следующие этапы: 1) PAI-1, содержащийся в пробе плазмы крови, взаимодействует с экзогенным tPA; 2) плазминоген активируется остаточным количеством tPA с образованием плазмина, стимулятором реакции активации выступают фрагменты бромцианового расщепления фибриногена человека; 3) плазмин гидролизует хромогенный субстрат S-2403, высвобождение окрашенного продукта реакции фиксируют спектрофотометрически. Значение оптической плотности прямо пропорционально активности остаточного tPA и обратно пропорционально активности PAI-1 в пробе.

Принимая во внимание необходимость использования высокотоксического вещества BrCN для получения фрагментов фибриногена, мы предлагаем использовать полимерный фибрин – естественный кофактор реакции активации плазминогена – для определения активности PAI-1. Ранее нами было показано, что полимерный desAB-фибрин быка проявляет более выраженные эффекторные свойства, чем бромциановые фрагменты фибриногена человека. Так, скорость активации плазминогена tPA в присутствии desAB-фибрина вдвое превышала таковую при использовании фрагментов фибриногена в качестве кофактора [8].

Целью нашей работы была разработка амидолитического метода определения активности PAI-1 в плазме крови с использованием полимерного desAB-фибрина быка и валидация предложенной метода.

Материалы и методы

В работе использовали рекомбинантный tPA (инъекционный препарат «Актилизе», Boehringer Ingelheim International GmbH, Германия), хромогенный субстрат – H-D-Val-L-Leu-L-Lys-n-нитроанилин·HCl (S2251) (Chromogenix AB, Швеция), маркеры молекулярных масс (Prestained Protein Ladder SM0671, Fermentas, Литва). Фибриноген, desAB-фибрин быка и плазминоген человека получали, руководствуясь общепринятыми методиками [9, 10, 11]. Чистоту полученных белковых препаратов контролировали методом SDS-электрофореза в полиакриламидном геле.

Кровь условно здоровых доноров получали в рамках сотрудничества с Центром крови Главного военного клинического госпиталя МОЗ Украины. Доноры были проинформированы и дали согласие на использование биологического материала в исследовательских целях. Забор крови для анализа содержания PAI-1 проводился в утренние часы, когда уровень ингибитора в крови достигает суточного максимума. Кровь с локтевой вены отбирали в пластиковую пробирку, содержащую 3,8% раствор лимоннокислого натрия (кровь: антикоагулянт – 9:1). Осаждение клеток крови осуществляли центрифугированием при 1500 g 20 мин при 4°C (центрифуга «Eppendorf 5415R», Германия). Полученные таким способом образцы плазмы крови сохраняли при -20°C для дальнейшего анализа не более 3 месяцев [12].

Статистическая обработка результатов исследования проведена с использованием общепринятых методов статистики и пакетов программ «MS Excel», «AscentSoftware».

Результаты и обсуждение

Ряд существенных отличий предложенного метода определения активности PAI-1 от метода-прототипа включает: использование desAB-фибрина быка вместо фрагментов бромцианового расщепления фибриногена в качестве стимулятора реакции активации плазминогена, использование хромогенного субстрата плазмина S-2251 вместо S2403, внесение в инкубационную среду плазмы крови без её предварительного разведения, уменьшение общего объема реакционной среды, что позволяет проводить определение активности PAI-1 в микротитрационных планшетах.

Метод определения активности PAI-1 в плазме крови включает следующие этапы:

- 1) в лунку микротитрационного планшета вносят 25 мкл раствора tPA с активностью 25 IU/мл и 5 мкл плазмы крови, инкубируют в течение 15 мин при комнатной температуре;
- 2) добавляют 10 мкл раствора desAB-фибрина и 10 мкл плазминогена с концентрациями 3 мг/мл та 1 мг/мл, соответственно;
- 3) реакцию полимеризации фибрина и активации плазминогена незаингибированным tPA инициируют внесением 200 мкл 0,05 М трис-HCl буфера (pH 7,4), содержащего хромогенный субстрат S2251 в количестве, что соответствует его конечной концентрации 0,3 мМ;
- 4) реакционную смесь инкубируют на протяжении 1 часа при +37°C;

5) реакцию останавливают внесением 25 мкл 50% уксусной кислоты, оптическую плотность среды измеряют на микроридере «Multiskan EX Thermo» (Китай) при двух длинах волн 405 и 495 нм, рассчитывают $\Delta A = A_{405} - A_{492}$.

Для определения активности PAI-1 в образцах плазмы крови строят калибровочную кривую. Реакционная среда содержит 0,0–2 IU/мл t-PA, 0,04 мг/мл плазминогена, 0,12 мг/мл desAB-фибрина, 0,3 мМ S-2251 в 0,05 М трис-НСl буфере (рН 7,4). Поскольку одна единица активности PAI-1 соответствует такому количеству ингибитора, которое ингибирует 1 IU tPA, зависимость значения ΔA от количества единиц tPA является обратно пропорциональной количеству единиц PAI-1, график зависимости представлен на рис 1.

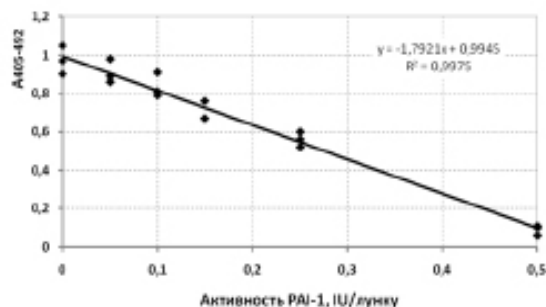


Рис. 1. Калибровочная кривая для определения активности ингибитора активатора плазминогена 1 типа амидолилитическим методом с использованием полимерного desAB-фибрина быка и хромогенного субстрата плазима S2251

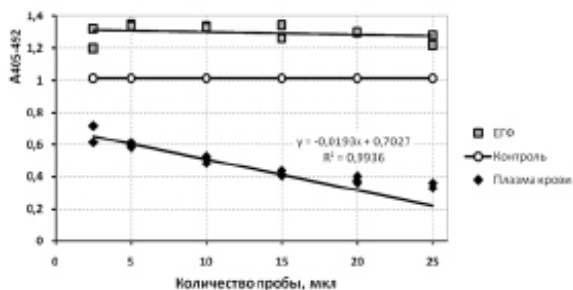


Рис. 2. Влияние плазмы крови и эуглобулиновой фракции (ЕГФ) на активацию плазминогена тканевым активатором в присутствии desAB-фибрина быка как кофактора реакции: контроль – 0,04 мг/мл плазминогена, 2 IU/мл t-PA, 0,12 мг/мл desAB-фибрина, 0,3 мМ S-2251 в 0,05 М трис-НСl буфере (рН 7,4)

По калибровочной кривой определяют число единиц ингибитора в 250 мкл инкубационной среды. За формулой рассчитывают активность PAI-1 в 1 мл плазмы крови:

$$\text{Активность PAI-1 (IU/мл плазмы)} = A \times 1,1 / 0,005$$

где A – количество единиц PAI-1, определенное по калибровочной кривой (IU); 0,005 – объем плазмы, который был внесен в реакционную смесь (мл); 1,1 – коэффициент пересчета разведения крови антикоагулянтном.

В рамках работы проведена валидация предложенной модификации амидолилитического метода определения активности PAI-1 по таким критериям как точность, воспроизводимость, линейность и специфичность. Коэффициент вариации (КВ) результатов в рамках одной процедуры определения (точность типа «*intra-assay*») составляет 2-16%, между отдельными процедурами (точность типа «*inter-assay*») – 1-9%, что свидетельствует о высокой точности данной методики. О ее надлежащей воспроизводимости также свидетельствует низкое значение КВ = 6-15%.

Для оценки линейности метода в качестве источника PAI-1 использовали донорскую плазму крови. При этом нами было установлено оптимальное количество образца, которое может быть взято для анализа, с целью получения корректных значений активности ингибитора. Следует придерживаться общепринятой рекомендации: корректные значения считаются таковыми, если PAI-1 образца ингибирует tPA реакционной системы не более, чем на 50%. В реакционную систему вносили 2,5-25 мкл плазмы. Линейная зависимость оптической плотности от количества внесенного образца лежит в пределах 2,5-15 мкл (коэффициент корреляции составляет 0,993) (рис. 2). Однако, значение КВ при внесении малого объема значительно выше (3-4% и 11%, соответственно). Потому для определения активности PAI-1 с более высокой точностью в систему следует вносить 5-15 мкл плазмы крови.

Для характеристики данной метода по критерию «специфичность» изучали эффект эуглобулиновой фракции на активацию плазминогена tPA в присутствии desAB-фибрина быка. Поскольку эуглобулины плазмы крови выпадают в осадок при кислых значениях рН, в эуглобулиновую фракцию не включаются ингибиторы фибринолитической системы – PAI-1 и α_2 -антиплазмин. Показали, что ЕГФ, в отличие от плазмы, проявляет выраженное активаторное воздействие ввиду наличия в ней функционально активного tPA (рис. 2). Эти результаты дополняют данные, изложенные в нашей работе [8], где установлено отсутствие влияния подкисленной

плазмы крови и плазмы, дефицитной по t-PA/PAI-1, на процесс активации плазминогена t-PA в присутствии desAB-фибрина быка как кофактора реакции. Полученные результаты свидетельствуют о том, что предложенный метод детекции активности PAI-1 является специфичным относительно серпина, тогда как другие компоненты плазмы не влияют на процесс определения.

Разработанный нами амидолитический метод определения активности PAI-1 имеет ряд преимуществ перед ближайшим аналогом, которые обусловлены использованием desAB-фибрина быка вместо фрагментов бромцианового расщепления фибриногена человека. Во-первых, получение фибрина desAB не предусматривает работы с высокотоксическим веществом бромцианом, необходимым для получения фрагментов. Во-вторых, источником получения desAB-фибрина является кровь крупного рогатого скота – более доступное и дешевое сырье по сравнению с кровью доноров. Важно отметить, что desAB-фибрин человека и быка проявляют одинаковую эффективность при стимуляции реакции активации плазминогена t-PA, которая превосходит таковую для бромциановых фрагментов фибриногена. Результаты валидации свидетельствуют о том, что предложенный метод характеризуется высокой точностью, воспроизводимостью, специфичностью и позволяет определять функционально активную форму PAI-1 в плазме крови человека.

Литература

1. *Horrevoets A. J. G.* Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1): in vitro activities and clinical relevance / A.J.G. Horrevoets // *Brit. J. Haematology*. 2004. Vol. 125, № 1. P. 12-23.
2. *Ha H.* The role of plasminogen activator inhibitor-1 in renal and cardiovascular diseases / H. Ha, E.Y. Oh, H.B. Lee // *Nature Reviews Nephrology*. 2009. Vol. 5, N 4. P. 203-211.
3. *Hara M.* Plasma plasminogen activator inhibitor-1, tissue plasminogen activator and serum lipoprotein(a) after reperfusion therapy in acute myocardial infarction: comparison between sequential and direct percutaneous transluminal coronary angioplasty / M. Hara, K. Ito, T. Nawata, Y. Tsunematsu, N. Shimoyama // *Cardiology*. 1995. Vol. 86, № 5. P. 407-410.
4. *Sakata K.* Impaired fibrinolysis early after percutaneous transluminal coronary angioplasty is associated with restenosis / K. Sakata, F. Miura, H. Sugino, M. Shinobe, M. Shirotani, H. Yoshida, N. Mori, T. Hoshino, A. Takada // *Am. Heart J.* 1996. Vol. 131, № 1. P. 1-6.
5. *Czekay R. P.* Unexpected role of plasminogen activator inhibitor-1 in cell adhesion and detachment / R.P. Czekay, D.J. Loskutoff // *Experimental Biology and Medicine*. 2004. Vol. 4. P. 1090-1096.
6. *von Eyben F. E.* Plasminogen activator inhibitor 1 activity and other coronary risk factors / F.E. von Eyben, E. Mouritsen, J. Holm, P. Montvilas, G. Dimcevski, L.L. Kristensen, R. von Eyben // *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* 2005. Vol. 11, N 1. P. 55-61.
7. *Eitzman D. T.* Peptide-mediated inactivation of recombinant and platelet plasminogen activator inhibitor-1 in vitro. / D.T. Eitzman, W.P. Fay, D.A. Lawrence, A.M. Francis-Chmura, J.D. Shore, S.T. Olson, D. Ginsburg // *J. Clin. Invest.* 1995. Vol. 95, N 5. P. 2416-2420.
8. *Кондратюк А. С.* Визначення активності тканинного активатора плазміногену в плазмі крові / А.С. Кондратюк, О.І. Юсова, Т.В. Гриненко // *Лаб. діагностика*. 2011. Т. 3, № 57. С. 3-9.
9. *Варецька Т. В.* Одержання фібриногену з плазми крові фракціонуванням сульфату натрію / Т. В. Варецька, А. Лосева, В. Яценко // *Укр. біохім. журн.* 1961. № 33. С. 657-666.
10. *Варецька Т. В.* Одержання фібрин-мономеру та вивчення деяких його властивостей / Т.В. Варецька // *Укр. біохім. журн.* 1965. Т. 37, № 2. С. 194-206.
11. *Wallen P.* Characterization of human plasminogen. I. On the relationship between different molecular forms of plasminogen demonstrated in plasma and found purified preparations / P. Wallen, B. Wiman // *Biochim. Biophys. Acta*. 1970. Vol. 221, № 1. P. 20-30.
12. *Brogren H.* Plasminogen Activator Inhibitor 1 in Platelets: Studies of Synthesis, Activity and Glycosylation Patterns / H. Brogren. 2008. Sweden: Gutebor. 59 p.