

## РОЗРОБКА СПОСОБУ ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ТКАНИННОГО АКТИВАТОРА В ПЛАЗМІ КРОВІ З ВИКОРИСТАННЯМ DD-ФРАГМЕНТА ФІБРИНУ ЯК СТАБІЛЬНОГО ЕФЕКТИВНОГО СТИМУЛЯТОРА РЕАКЦІЇ АКТИВАЦІЇ ПЛАЗМІНОГЕНУ

**В. Рибачук, Т. Яценко, С. Харченко, О. Савчук, О. Юсова, Т. Гриненко**

*Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України  
вул. Леонтовича, 9, Київ 01601, Україна  
e-mail: topolius@yandex.ua*

Тканинний активатор плазміногену є одним з основних компонентів фібринолітичної системи. Тканинний активатор може використовуватись як прогностичний маркер низки серцево-судинних і онкологічних захворювань, тромботичних і геморагічних станів та запальних процесів. У даній роботі представлено новий непрямий функціональний спосіб визначення активності тканинного активатора у зразках плазми крові донорів з використанням DD-фрагмента фібрину як стабільного стимулятора реакції активації плазміногену, одержання якого не потребує використання токсичних речовин. Спосіб полягає в оцінці рівня активації внесеного плазміногену з утворенням плазміну тканинним активатором еуглобулінової фракції плазми крові за наявності DD-фрагмента фібрину. Вперше запропоновано використання в реакції активації хелатуючого агента (EGTA), який підсилює ефективність дії стимулятора. Даний спосіб є високочутливим, економним, простим і нетривалим у проведенні аналізу та може бути використаний у діагностичній практиці.

*Ключові слова:* тканинний активатор плазміногену, DD-фрагмент фібрину, метод визначення, плазміноген, еуглобулінова фракція плазми крові.

Тканинний активатор плазміногену (ТАП) є основним фізіологічним активатором плазміногену плазми крові, який забезпечує утворення плазміну, що руйнує фібриновий каркас тромбу. ТАП – серинова протеїназа, що синтезується ендотеліальними і гладком'язовими клітинами судин і секретується в систему циркуляції крові в активній формі. Активація плазміногену ТАП відбувається на поверхні фібринового згустку, ініціюючи процес фібринолізу [11, 5]. У нормі концентрація ТАП у плазмі крові становить 3,5-6,6 нг/мл (0,5-2,0 МО/мл) [9].

ТАП є одним із важливих показників, який характеризує стан фібринолітичної системи. Рівень ТАП у крові знижений при тромботичних і підвищений при онкологічних захворюваннях, запальних процесах, кровотечах, деяких аутоімунних захворюваннях [16]. Зниження синтезу активатора є однією з причин тромбозів глибоких вен [10, 6], післяопераційних тромбозів і тромбоемболій [8]. Показано, що рівень ТАП може бути маркером ряду серцево-судинних захворювань, таких як стеноз коронарних судин, інфаркт міокарда, інсульт [12].

Рекомбінантний тканинний активатор (r-ТАП) використовують як лікарський препарат при інфаркті міокарда, тромбоемболії легеневої артерії, гострому ішемічному інсульті.

Таким чином, точне визначення рівня активатора у плазмі крові є необхідним для прогнозування тромботичних станів і кровотеч, а також для контролю активності ТАП під час тромболітичної терапії.

Є три різних способи визначення ТАП: імуноферментний, прямий функціональний і непрямий функціональний. Імуноферментний метод визначає кількість ТАП [4], але не дає інформації про активність ферменту. У прямому функціональному методі використовують

синтетичний хромогенний або флуорогенний субстрат для ТАП [13], проте цей метод є недостатньо чутливим. У непрямому функціональному методі плазміноген активують ТАП за наявності стимулятора активації та хромогенного субстрату для плазміну [1, 2]. Проте їх використання лімітується коротким терміном придатності стимуляторів (фібрин desA та фібрин desAB). Як стабільні стимулятори реакції активації плазміногену ТАП використовують бромціанові фрагменти фібрин(огену) [14, 3]. Недоліком цього способу є застосування високотоксичного бромціану для отримання фрагментів фібрин(огену) і тривалий час проведення аналізу.

Раніше нами вперше було показано, що при використанні хелатуючих агентів у процесі виділення D-доменвісних фрагментів фібриноген/фібрину ці фрагменти проявляють стимулюючі властивості для реакції активації плазміногену ТАП [17]. Використовуючи ці дані, ми розробили високочутливий, економний, простий і нетривалий у виконанні спосіб визначення ТАП у плазмі крові з використанням DD-фрагмента фібрину як стабільного стимулятора, отримання якого не потребує використання токсичних речовин, та хелатора EGTA.

### Матеріали та методи

Фібриноген одержували із плазми крові людини методом фракційного висолювання сульфатом натрію [15] з деякими модифікаціями. Водний розчин антикоагулянта містив 3,8 % цитрату натрію, 0,25 % 6-аміногексанової кислоти і 0,01 % соєвого інгібітор атрипсину.

Glu-плазміноген виділяли зі щойно отриманої плазми донорської крові за допомогою афінної хроматографії на лізин-сефарозі за наявності контрикалу [7].

Плазмін одержували активацією плазміногену урокіназою, іммобілізованою на Sepharose 4B [7].

DD-фрагмент виділяли з плазмінового гідролізату прошитого фібрину як описано в [17]. Фрагмент ізолювали на колонці CM-Sephadex G-50, врівноваженій 0,01 М фосфатним буфером, рН 6,0. DD-фрагмент елюювали 0,02 М фосфатним буфером рН 7,3 з 0,3 М NaCl. Профіль елюції й електрофореграму наведено на рис. 1.

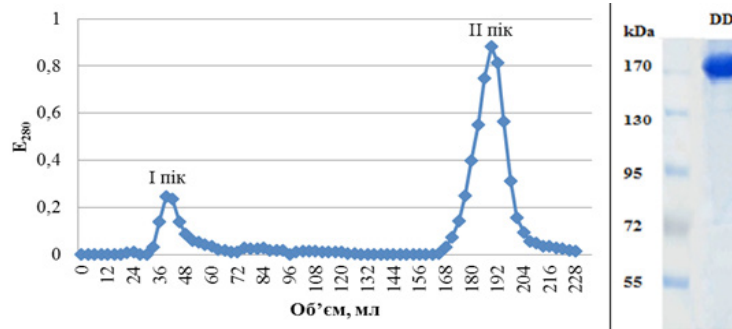


Рис.1. Виділення DD-фрагмента (II пік) фібрину і CM-Sephadex G-50 та аналіз чистоти виділеного фрагмента в 8 % SDS-PAGE

Концентрації розраховували за такими значеннями коефіцієнтів екстинкції ( $E_{280}^{1\%}$ ): Glu-плазміноген – 17,0; фібриноген (лужне середовище) – 15,06; DD-фрагмент – 20,0; ТАП – 20,0.

Для виділення еуглобулінової фракції до 100 мкл цитратної плазми крові додавали 900 мкл дистильованої води, 100 мкл 0,25 % оцтової кислоти й інкубували протягом 1 год при 4 °С. Після центрифугування протягом 10 хв. при 2000 g надосадову рідину декантували. Отриманий осад розчиняли у 100 мкл 0,05 М трис-НСІ-буферу (рН 7,4) з 0,15 М NaCl.

Використаний у даній роботі рекомбінантний тканинний активатор плазміногену відомий як Актилізе (Boeinger Ingelheim GmbH, Німеччина).

Активацию Glu-плазміногену тканинним активатором за наявності DD-фрагмента фібрину визначали за оптичною густиною *n*-нітроаніліну, вивільненого зі специфічного хромогенного субстрату S<sub>2251</sub> плазміном, що утворився протягом реакції. Реакцію проводили в 0,05 М Трис-НСІ буфері, що містив 0,15 М NaCl, 10 мМ EGTA, рН 7,4 в 96-лункових планшетах. Інкубацію реакційної суміші проводили протягом 100 хв при 37 °С. Реакцію зупиняли 50 % розчином оцтової кислоти. Поглинання *n*-нітроаніліну реєстрували за довжини хвилі 405 нм із використанням спектрофотометра Multiscan Titertek (Фінляндія).

Статистичну обробку результатів проводили з використанням пакету програм MO Excel.

### Результати і їхнє обговорення

Для визначення оптимального молярного співвідношення плазміногену та DD-фрагмента при одній концентрації ТАП застосували метод ізомолярних серій (рис. 2). Стимулюючий ефект досягає максимуму при співвідношенні Glu-плазміногену до DD-фрагмента 1,5 – 1,0 М/М.

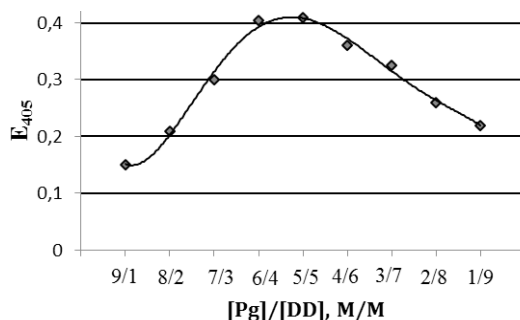


Рис.2. Визначення оптимального молярного співвідношення плазміногену та DD-фрагмента для реакції активації плазміногену ТАП

Для побудови калібрувальної кривої було використано визначене нами оптимальне співвідношення плазміногену та DD-фрагмента. У реакційне середовище, що містило Glu-плазміноген і DD-фрагмент, вносили по 25 мкл робочих розчинів ТАП (0,25 – 1,00 МО/мл), реакцію активації ініціювали внесенням буферу та хромогенного субстрату. За отриманими результатами будували калібрувальну криву (рис. 3).

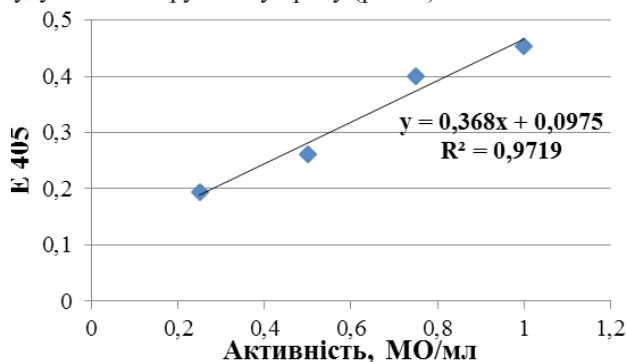


Рис.3. Калібрувальна крива залежності значення оптичної густини реакційної суміші (E<sub>405</sub>) від концентрації ТАП

Для визначення активності ТАП у зразках плазми донорів використовували еуглобулінову фракцію плазми крові, оскільки вона не містить фізіологічних інгібіторів ТАП. В інкубаційне середовище вносили 25 мкл еуглобулінової фракції плазми донорів, визначення проводили як описано вище, за калібрувальною кривою визначали активність ТАП у плазмі крові. У таблиці наведена активність ТАП у різних зразках донорської плазми крові.

Результати визначення активності t-PA у зразках плазми крові

№ п/п	Активність t-PA, МО/мл M ± m
1	0,47 ± 0,032
2	0,60 ± 0,039
3	0,45 ± 0,031
4	0,82 ± 0,055
5	0,55 ± 0,038
6	0,95 ± 0,064

Таким чином, розроблений спосіб визначення тканинного активатора у плазмі крові з використанням нового типу стимулятора активації плазміногену та хелатуючого агента (EGTA), який підсилює ефективність дії стимулятора, можна використовувати для діагностики та контролю у тромболітичній терапії.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Кондратюк А.С., Юсова О.І., Гриненко Т.В. Визначення активності тканинного активатора плазміногену в плазмі крові // Лабораторна діагностика. 2011. Вип.3. №57. С. 3-9.
2. Пат. RU № 2252421 Способ определения тканевого активатора плазминогена / Айсина Р.Б., Булыгин О.Ю., Варфоломеев С.Д. и др. Заявл. 23.10.2003. Опубл. 20.05.2005.
3. Axelsson F. COASET t-PA. Product Monograph. 1995. Chromogenix AB, Sweden.
4. Bergsdorf N., Nilsson T., Wallen P. An enzyme linked immunosorbent assay for determination of tissue plasminogen activator applied to patients with thromboembolic disease // Thromb. Haemost. 1983. Vol. 50. P. 740-744.
5. Cesarman-Maus G., Hajjaqr K.A. Molecular mechanisms of fibrinolysis // Br.J.Haematol. 2005. Vol. 129. № 3. P. 307-321.
6. Dahl L.C., Nasa Z., Chung J. et al. The Influence of Differentially Expressed Tissue-Type Plasminogen Activator in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: Implications for Multiple Sclerosis // PLoS One. 2016. Vol. 11. № 7. e0158653.
7. Deutsch D.G., Mertz E.T. Plasminogen: purification from human plasma by affinity chromatography // Science. 1970. Vol. 170. N 3962. P. 1095-1096.
8. Eriksson B., Eriksson E., Gyzander E. et al. Thrombosis after hip replacement. Relationship to the fibrinolytic system // Acta Orthop. Scand. 1989. Vol 60. P. 159-163.
9. Higazi A. A-R. Plasminogen Activator and Plasmin: FIBRINOLYSIS. Elsevier, 2006. 201-205.
10. Juhan-Vague I., Valadier J., Alessi M.C. et al. Deficient t-PA release and elevated PA inhibitor levels in patients with spontaneous or recurrent deep venous thrombosis // Thromb. Haemostas. 1987. Vol. 57. P. 67-72.
11. Marcus G. Conformational changes in plasminogen, their effect on activation, and agents that modulate activation rates // Fibrinolys. 1996. Vol. 10, № 2. P. 75-85.

12. Meade T.W., Howarth D.J., Cooper J. et al. Fibrinolytic activity and arterial disease // *Lancet*. 1994. Vol.343. P.1442.
13. Pat. US 4278762. Method for the quantitative determination of plasminogen activators / Lars G. Svendsen. Заявл. 11.09.1979. Опубл. 14.07.1981.
14. Pat. US 4563420. Process for assaying the activity of tissue plasminogen activator, and kit suitable for use in said process / J.H. Verheijen, W. Nieuwenhuizen. Заявл. 6.05.1983. Опубл. 7.01.1986.
15. Varetskaya T.V. Microheterogeneity of fibrinogen. Cryofibrinogen. // *Ukr. Biokhim. Zhurn.* 1960. Vol. 32. P. 13–24.
16. Wojtukiewicz M.Z., Sierko E., Klement P., Rak J. The Hemostatic System and Angiogenesis in Malignancy // *Neoplasia*. 2001. Vol. 3. №5. P. 371–384.
17. Yatsenko T., Rybachuk V., Yusova O. et al. Effect of fibrin degradation products on fibrinolytic process // *Ukr. Biochem. J.* 2016. Vol. 88, N 2. P. 16-24.

*Стаття: надійшла до редакції 22.07.16  
доопрацьована 29.08.16  
прийнята до друку 1.09.16*

#### **DEVELOPMENT OF THE APPROACH FOR BLOOD PLASMA TISSUE-TYPE PLASMINOGEN ACTIVATOR ACTIVITY USING FIBRIN FRAGMENT DD AS STABLE EFFECTIVE PLASMINOGEN ACTIVATION STIMULATOR**

**V. Rybachuk, T. Yatsenko, S. Kharchenko,  
O. Savchuk, O. Yusova, T. Grinenko**

*O.V. Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine  
9, Leontovych St., Kyiv 01601, Ukraine  
e-mail: topolius@yandex.ua*

Tissue-type plasminogen activator is one of the main components of fibrinolytic system. Tissue-type activator can be used as a prognostic marker of number of heart and vascular diseases, cancer, thrombotic and hemorrhagic states and inflammation processes. In the present paper, we describe the new indirect functional method for an assessment of tissue-type activator activity in donor blood plasma using fibrin fragment DD as stable plasminogen activation stimulator, which does not require toxic substances for processing. The method supposes estimation of level of plasminogen activation to plasmin by tissue-type activator of blood plasma euglobulin fraction in the presence of fragment DD. Using of chelating agent EGTA in the activation reaction was proposed to increase the stimulator action for the first time. The method is highly sensitive, economically efficient, simple and express and can be used as diagnostic tool.

*Keywords:* tissue-type plasminogen activator, fibrin fragment DD, determination method, plasminogen, euglobulin blood plasma fraction.

**РАЗРАБОТКА СПОСОБА ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ТКАНЕВОГО АКТИВАТОРА ПЛАЗМИНОГЕНА В ПЛАЗМЕ КРОВИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ DD-ФРАГМЕНТА ФИБРИНА КАК СТАБИЛЬНОГО ЭФФЕКТИВНОГО СТИМУЛЯТОРА РЕАКЦИИ АКТИВАЦИИ ПЛАЗМИНОГЕНА**

**В. Рыбачук, Т. Яценко, С. Харченко, О. Савчук, О. Юсова, Т. Гриненко**

*Институт биохимии им. А.В. Палладина НАН Украины  
ул. Леонтовича, 9, Киев 01601, Украина  
e-mail: topolius@yandex.ua*

Тканевой активатор плазминогена является одним из основных компонентов фибринолитической системы. Тканевой активатор может быть использован в качестве прогностического маркера ряда сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний, тромботических и геморрагических состояний и воспалительных процессов. В данной работе представлен новый непрямой функциональный способ оценки активности тканевого активатора в плазме крови доноров с использованием DD-фрагмента фибрина в качестве стабильного стимулятора активации плазминогена, получение которого не требует использования токсических веществ. Способ предполагает оценку уровня активации внесенного плазминогена с образованием плазмина тканевым активатором эуглобулиновой фракции плазмы крови. Впервые предложено использование в реакции активации хелатирующего агента (EGTA), который усиливает эффективность действия стимулятора. Данный способ является высокочувствительным, экономным, простым и недлительным в исполнении и может быть использован в диагностической практике.

*Ключевые слова:* Тканевой активатор плазминогена, DD-фрагмент фибрина, метод определения, плазминоген, эуглобулиновая фракция плазмы крови.