

УДК 616-092

Простой способ определения фибриногена и оценка его функциональности

Шойбонов Б.Б.^{1,2}, Драпкина О.М.¹, Баронец Т.П.³, Серебрякова Н.Ю.¹, Худяков М.Б.¹, Григорьева Д.В.⁴, Лебедева О.А.¹, Литинская О.А.¹, Толпыго С.М.², Лагутина Л.В.²

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр профилактической медицины» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 101990, Москва, Петроверигский пер., д. 10, стр. 3

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт нормальной физиологии имени П.К. Анохина». 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

³ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет). 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

⁴ Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии». 101000, Москва, ул. Покровка, д. 22А

Актуальность. Определение фибриногена (ФГ) по Клауссу является чувствительным к гипо-, дис- и гипер-фибриногенемии, а также к продуктам деградации фибрина, которые влияют на процесс коагуляции и могут быть причиной занижения или повышения уровня фибриногена.

Цель настоящей работы – разработка простого турбидиметрического теста для определения фибриногена и оценка его функциональности.

Материалы и методы. В работе определяли фибриноген в цитратных плазмах 96 пациентов по методу Клаусса, модифицированным методом Рутберга и новым турбидиметрическим тестом.

Результат. Разработан простой турбидиметрический тест определения фибриногена, основанный на определении коагулированного фибриногена при рекальцификации цитратной плазмы по формуле: $FG (г/л) = \Delta A_{450} \times 5,12$, где ΔA_{450} – изменение оптической плотности в опытной пробе; 5,12 – переводной коэффициент ΔA_{450} в г/л ФГ. Корреляционный анализ показал высокую степень сходимости результатов ($R = 0,843$). При разнице ФГ более 10% по Клауссу и по разработанному методу констатируют как нарушенную функциональность ФГ.

Заключение. Использование простого, доступного турбидиметрического метода определения фибриногена в рутинных исследованиях позволяет оценивать функциональность фибриногена.

Ключевые слова: фибриноген; рекальцификация плазмы; турбидиметрия; функциональность фибриногена.

Для цитирования: Шойбонов Б.Б., Драпкина О.М., Баронец Т.П., Серебрякова Н.Ю., Худяков М.Б., Григорьева Д.В., Лебедева О.А., Литинская О.А., Толпыго С.М., Лагутина Л.В. Простой способ определения фибриногена и оценка его функциональности. Патогенез. 2020; 18(1): 74-81.

DOI: 10.25557/2310-0435.2020.01.74-81.

Для корреспонденции: Шойбонов Батожаб Батожаргалович, e-mail: shoibonov@mail.ru

Финансирование: Работа выполнена в рамках реализации государственного задания № АААА-А17-117031310099-1.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Поступила: 26.11.2019

A simple method for measuring fibrinogen and evaluating its functionality

Shoibonov B.B.^{1,2}, Drapkina O.M.¹, Baronets T.P.³, Serebryakova N.Yu.¹, Khudyakov M.B.¹, Grigorieva D.V.⁴, Lebedeva O.A.¹, Litinskaya O.A.¹, Tolpigo S.M.², Lagutina L.V.²

¹ National Medical Research Center for Preventive Medicine, Petroverigskij Pereulok 10, Bldg. 3, Moscow 101990, Russian Federation

² P.K. Anokhin Institute of Normal Physiology, Baltijskaya Str. 8, Moscow 125315, Russian Federation

³ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Trubetskaya Str. 8, Bldg. 2, Moscow 119991, Russian Federation

⁴ Moscow Regional Research Institute of Obstetrics and Gynecology, Pokrovka Str. 22A, Moscow 101000, Russian Federation

Background. The Clauss fibrinogen assay is sensitive to hypo-, dys- and hyper-fibrinogenemia, as well as to fibrin degradation products, which may affect coagulation and cause underestimation of or increase the fibrinogen level.

The aim of this study was to develop a simple turbidimetric test to measure fibrinogen and evaluate its functionality.

Materials and methods. In this study, fibrinogen was measured in citrate plasma from 96 patients using the Clauss assay, a modified Rutberg method, and a new turbidimetric test.

Result. A simple turbidimetric test was developed for measuring fibrinogen. This test is based on measuring coagulated fibrinogen during recalcification of citrate plasma according to the formula, $FG (g/l) = \Delta A_{450} \times 5.12$, where ΔA_{450} is a change in optical density of the experimental sample; 5.12 is a conversion coefficient ΔA_{450} in g/l FG. Correlation analysis showed a high degree of agreement between the results ($R = 0.843$). With a FG difference of more than 10% by the Clauss assay and the developed method, impaired functionality of the FG is stated.

Conclusion. Using a simple, affordable turbidimetric method to determine fibrinogen in routine studies allows accessing the fibrinogen functionality.

Keywords: fibrinogen; plasma recalcification; turbidimetry; fibrinogen functionality.

For citation: Shoibonov B.B., Drapkina O.M., Baronets T.P., Serebryakova N.Yu., Khudyakov M.B., Grigorieva D.V., Lebedeva O.A., Litinskaya O.A., Tolpigo S.M., Lagutina L.V. [A simple method for measuring fibrinogen and evaluating its functionality]. *Patogenez [Pathogenesis]*. 2020; 18(1): 74-81. (in Russian)

DOI: 10.25557/2310-0435.2020.01.74-81

For correspondence: Shoybonov Batozhab Batozhargalovich, **e-mail:** shoibonov@mail.ru

Funding. This work was carried out as part of the implementation of state assignment #AAAA-A17-117031310099-1.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Accepted: 26.11.2019.

Введение

Фибриноген – это протеин плазмы крови, который необходим для надлежащего свертывания крови. Количество фибриногена, присутствующего в крови, прямо пропорционально ее способности образовывать тромбы. Фибриноген в крови трансформируется в фибрин в процессе образования тромба. Функциональный дефицит или абсолютный дефицит фибриногена будет проявляться в неадекватном образовании фибрина и нарушении свертывания крови [1].

В клинической практике наиболее широко используется определение фибриногена по Клауссу, основанное на исследовании времени образования сгустка при добавлении избытка тромбина к разбавленной в 10-20 раз цитратной плазме. Тест выполняется на коагулометрах, при этом логарифм времени образования сгустка обратно пропорционален логарифму концентрации фибриногена. Калибровочная кривая показывает укорочение времени свертывания при увеличении концентрации фибриногена [2]. Основными недостатками метода определения фибриногена по Клауссу является чувствительность результатов к гипо-, дис- и гиперфибриногемии, а также к продуктам деградации фибрина, которые влияют на процесс полимеризации фибрин-мономеров и могут быть причиной как ложно низких, так и ложно повышенных результатов. Метод выполняется только в лабораторных условиях на специальном оборудовании (центрифуга, коагулометр) [3].

Количественным методом определения фибриногена является способ гравиметрического определения концентрации фибриногена по Рутбергу [4], при котором сначала оценивается содержание в плазме крови фибрина, образовавшегося в результате реакции полимеризации после отщепления от фибриногена двух фибринопептидов и, далее, с использованием стандартного коэффициента пересчитывается на содержание фибриногена в плазме (в мг/мл или г/л). Недостатком данного метода является трудоемкость, необходимость выделения фибринового сгустка (многократный контакт персонала с биоматериалом), высушивания (отжимания белков из фибринового сгустка), а также инкубация в течение 10 мин, которая не всегда достаточна для полной коагуляции фибриногена.

Цель настоящей работы – расширение арсенала лабораторных тестов для определения фибриногена и его функциональности.

Материалы и методы исследования

В работе исследовали цитратные плазмы крови 96 пациентов клиники «НМИЦ профилактической медицины». Участие в обследовании подтверждено письменным согласием и одобрено Этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ ПМ» Минздрава России. Забор крови осуществляли из локтевой вены после 14-часового голодания. Готовили плазму путем центрифугирования при 3000 об/мин в течение 15 мин. Определяли показатели плазменного гемостаза (АЧТВ, ПВ, Протромбин по Квику, МНО, фибриноген) с использованием коммерческих наборов Hemosil (Италия) на гемоконцентрационном автоматическом анализаторе ACL 8/9/1000 System (Instrum. Lab. Company, США).

Статистическая обработка результатов исследования проводилась с помощью пакета «Statistica», Ver. 6,1 от компании «StatSoft» и программы MicrosoftXL. Для оценки различия количественных показателей использовали дисперсионный анализ и t-критерий Стьюдента. Характеристика выборок представлены в виде среднего со стандартной ошибкой среднего ($M \pm SE$) при нормальном распределении, и в виде медианы и размаха (min-max) при отклонении от нормального распределения. Критерием статистической значимости полученных результатов считали величину $p < 0,05$.

Результаты исследования

Определение оптимальной концентрации хлорида кальция для запуска контактного пути коагуляции. С этой целью предварительно в 96-луночных плоскостных планшетах 50 мкл 25 мМ раствора хлорида кальция прогрессивно раститровывали и добавляли 100 мкл вероналового буфера без солей (VBS), pH 7,4 и 50 мкл пулированной цитратной плазмы практически здоровых доноров. Тщательно перемешивали и сразу измеряли поглощение в пробах при 450 нм на фотометре для иммуноферментного анализа (0 мин – бланк), инкубировали при 37°C в течение 30 мин с 10 мин ин-

тервалами измерения. После инкубации определяли степень коагуляции цитратной плазмы по изменению оптической плотности при рекальцификации. Полученные данные представлены в **табл. 1**.

Как видно из данных, представленных в табл. 1, максимальная коагуляция цитратной плазмы наблюдалась при добавлении 25 мкл 25 мМ CaCl₂ к 25% пулированной цитратной плазме крови здоровых доноров (выделено жирным шрифтом).

Подбор оптимальной концентрации 10% полиэтиленгликоля с молекулярной массой 3350 (ПЭГ-3350) для усиления коагуляции фибриногена тромбином. К 50 мкл пулированной цитратной плазмы в лунках 96-луночных иммунологических планшет с плоским дном добавляли возрастающие концентрации 10% раствора ПЭГ-3350 (конечная концентрация ПЭГ-3350 в пробах от 1,5% до 2,5%), объем проб доводили буфером VBS до 150 мкл. Измеряли оптическую плотность проб при длине волны 450 нм и затем добавляли 10 мкл препарата тромбина с активностью 3 НИН, инкубировали 0, 5, 10, 20 и 30 мин при 37°C и измеряли оптическую плотность проб при длине волны 450 нм для определения степени коагуляции фибриногена под действием тромбина. Контрольная проба не содержала препарата ПЭГ-3350. Полученные результаты представлены в **табл. 2**.

Как видно из данных, представленных в **табл. 2**, коагуляция фибриногена под действием тромбина усиливается в присутствии возрастающих концентраций ПЭГ-3350. Максимальная коагуляция фибриногена наблюдается при концентрации ПЭГ-3350 равной 2,25% в пробе. При дальнейшем увеличении концентрации ПЭГ-3350 наблюдается резкое снижение коагуляции фибриногена. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в среде 2,25% ПЭГ-3350 увеличивается либо активность тромбина, либо конформационные изменения в молекуле фибриногена в присутствии ПЭГ-3350 делают его более чувствительным к протеолизу, либо активируется фактор XIII (фибринстабилизирующий фактор). Для дальнейшего исследования данного эффекта (эффекта усиления коагуляции плазмы) были проведены исследования влияния ПЭГ-3350 на коагуляцию цитратной плазмы при рекальцификации.

Влияние ПЭГ-3350 на коагуляцию цитратной плазмы при рекальцификации. Предварительно в лунках 96-луночной плоскодонной планшеты прогрессивно разводили 10% раствор ПЭГ-3350 по 64 мкл, затем добавляли в лунки по 36 мкл буфера VBS и 50 мкл пулированной цитратной плазмы крови здоровых доноров. Активацию контактного пути коагуляции в полистироловых

Таблица 1

Влияние концентрации 25 мМ раствора хлорида кальция на коагуляцию 25% пулированной цитратной плазмы доноров

25 мМ CaCl ₂ , мкл в 100 мкл 25% цитратной плазмы		50	25	12,5	6,25	3,125	1,56	0,78	0
A ₄₅₀	0 мин	0,269	0,239	0,213	0,244	0,214	0,236	0,211	0,201
	10 мин	0,261	0,23	0,201	0,233	0,203	0,225	0,198	0,192
	20 мин	0,260	0,387	0,299	0,239	0,191	0,218	0,21	0,173
	30 мин	0,283	0,391	0,299	0,227	0,190	0,218	0,187	0,167

Таблица 2

Влияние ПЭГ-3350 на активность тромбина в тесте коагуляции пулированной цитратной плазмы

Пробы	1	2	3	4	5	6 (Контроль тромбина без ПЭГ-3350)
Пулированная цитратная плазма, мкл	50	50	50	50	50	50
10% ПЭГ-3350, мкл	30	35	40	45	50	—
VBS, мкл	120	115	110	105	100	150
A ₄₅₀ (бланк проб)	0,133	0,135	0,137	0,14	0,128	0,126
Тромбин, мкл	10	10	10	10	10	—
A ₄₅₀ (0 мин)	0,160	0,184	0,158	0,186	0,170	0,139
A ₄₅₀ (5 мин)	0,355	0,418	0,365	0,448	0,288	0,191
A ₄₅₀ (10 мин)	0,372	0,438	0,364	0,477	0,303	0,180
A ₄₅₀ (20 мин)	0,411	0,483	0,414	0,543	0,323	0,190
A ₄₅₀ (30 мин)	0,410	0,494	0,431	0,564	0,327	0,198
% ПЭГ-3350 в пробе	1,5%	1,75%	2,0%	2,25%	2,5%	0%

96-луночных иммунологических планшетах запускали добавлением 50 мкл 25 мМ хлорида кальция, тщательно перемешивали и сразу измеряли поглощение проб при 450 нм на фотометре для иммуноферментного анализа (0 мин – бланк). Далее инкубировали в течение 60 мин при 37°C, измеряли изменение мутности проб через 30 и 60 мин для оценки степени коагуляции цитратной плазмы. В качестве контроля использовали плазму без ПЭГ-3350 и контроль бланка плазмы (без хлорида кальция и ПЭГ-3350). Полученные результаты представлены в табл. 3.

Как видно из данных, представленных в табл. 3, при концентрации ПЭГ-3350 равной 0,6% в пробе наблюдается максимальная коагуляция пулированной цитратной плазмы в течение 60 мин. Концентрация ПЭГ-3350 более 0,6% вызывает незначительное снижение степени коагуляции плазмы по сравнению с контрольными пробами. Эффект усиления коагуляции плавно снижается при уменьшении концентрации ПЭГ-3350 ниже 0,6%.

Таким образом, для дальнейших исследований нами выбрана концентрация 0,6% ПЭГ-3350 в пробе для усиления коагуляции цитратной плазмы при рекальцификации.

Определение белка в фибриновом сгустке, приготовленном при рекальцификации цитратной плазмы в присутствии 0,6% ПЭГ-3350 в пробе и в контрольных пробах без ПЭГ-3350. В лунки 96-луночных плоскодонных иммунологических планшет (опытные пробы) вносили последовательно 50 мкл цитратной плазмы, 84 мкл буфера VBS с pH 7,4, 16 мкл 10% раствора ПЭГ-3350 (таким образом, чтобы в пробе присутствовало 0,6% ПЭГ-3350) и 50 мкл 25 мМ Ca²⁺. В контрольные пробы вместо ПЭГ-3350 вносили 16 мкл буфера VBS с pH 7,4 и в пробы бланка к 50 мкл цитратной плазмы добавляли 150 мкл буфера VBS с pH 7,4. Пробы тщательно перемешивали и инкубировали в течение 60 мин при 37°C. Определяли степень коагуляции плазмы турбидиметрически по изменению поглощения в пробах при длине волны 450 нм через 30 и 60 мин инкубации. Далее аккуратно снимали фибриновые сгустки с опытных и контрольных проб, максимально удаляли сыворотку крови «отжиманием» на фильтровальную бумагу, фибриновый сгусток помещали в пробирки типа «эппендорф» и добавляли 1 мл дистиллированной

воды для отмывки фибринового сгустка от сыворотки крови. После центрифугировали в течение 10 мин при 8000 об/мин для осаждения фибриновых сгустков, тщательно декантировали и преципитат, фибриновый сгусток, растворяли в ½ исходного объема плазмы в 1,0 N NaOH путем инкубации в течение 10 мин при 56°C. Содержание белка в растворенном фибриновом сгустке определяли стандартным способом с использованием биуретового реактива. Параллельно в исходных цитратных плазмах определяли фибриноген по Клауссу с использованием коммерческих наборов Фибриноген (Hemosil, Италия) на автоматическом гематологическом анализаторе ACL 8/9/1000 System, (Instrum. Lab. Company, США). Полученные результаты представлены в табл. 4.

Как видно из данных, представленных в табл. 4, содержание ФГ по Клауссу в 13 пробах (54%) было существенно ниже, чем содержание белка (фибрина) в опытных и контрольных пробах. Совпадение между содержанием белка в фибриновых сгустках опытных проб и фибриногена, определенного по методу Клауса составило 42% (10 проб). В то время как совпадение содержания фибриногена по Клауссу и с белком в фибриновых сгустках контрольных проб составило 29% (7 проб). Совпадение содержания белка в фибриновых сгустках опытных и контрольных пробах было максимальным и составило 79% (19 проб). Следует отметить, что фибриновый сгусток, формирующийся при рекальцификации цитратных плазм, в контрольных пробах характеризовался рыхлостью, плохо «отжимался» и при добавлении воды для промывки существенно разрыхлялся. В опытных же пробах фибриновый сгусток был плотным, хорошо ужатым и при промывании не менял свою структуру.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что в присутствии 0,6% в пробе ПЭГ-3350 коагуляция цитратной плазмы при рекальцификации характеризуется высокой активностью фибринстабилизирующего фактора, о чем свидетельствует более высокая плотность сгустка при турбидиметрии. Фибриновый сгусток в контрольных пробах, приготовленных рекальцификацией без ПЭГа, при визуальной оценке был рыхлым, менее плотным.

Расчет коэффициента для перевода изменений оптической плотности пробы при коагуляции цитратной плазмы

Таблица 3

Влияние ПЭГ-3350 на контактный путь активации плазменного гемостаза при рекальцификации пулированной цитратной плазмы

		1	2	3	4	5	Контрольная пулированная плазма, мкл			К(бл)
ПЭГ-3350, % в пробе		1,2	0,6	0,3	0,15	0,075	0	0	0	0
A ₄₅₀	0 мин	0,219	0,181	0,180	0,182	0,181	0,185	0,184	0,185	0,184
	30 мин	0,176	0,377	0,435	0,573	0,605	0,280	0,314	0,275	0,184
	60 мин	0,516	0,874	0,765	0,678	0,641	0,605	0,612	0,598	0,184

в г/л фибриногена. Фибриновые сгустки из 24 цитратных плазм готовили как описано выше. Определяли содержание белка с использованием биуретового реактива (см. выше). Параллельно в исходных пробах цитратной плазмы определяли фибриноген по Клауссу с использованием коммерческих наборов «Фибриноген» (Nemosil, Италия) на автоматическом гематологическом анализаторе ACL8/9/1000 System (Instrum. Lab. Comp., США). Полученные результаты представлены в **табл. 5**.

Как видно из данных, представленных в **табл. 5**, фактор для перевода изменений оптической плотности плазмы при коагуляции (при рекальцификации), который рассчитывали как отношение содержания белка в фибриновом сгустке к изменению оптической плотности, в среднем составил $5,12 \pm 0,54$. Следовательно, ошибка эксперимента (определения белка) составила примерно 10%, что при переводе на фибриноген колебания коэффициента составили примерно 0,2 г/л по фибриногену.

Таблица 4

Содержание белка в фибриновых сгустках, приготовленных в присутствии 0,6% ПЭГ-3350, без ПЭГа (контроль) и содержание фибриногена в цитратных плазмах, определенных по методу Клаусса

№ пробы	Белок (опыт)	Белок (контроль)	ФГ по Клауссу, г/л
1	4,2	2,4	4,2
2	3,0	2,6	3,0
3	3,7	3,5	3,5
4	2,3	2,4	2,1
5	2,4	2,8	2,4
6	3,2	3,3	2,7
7	2,5	3,1	2,8
8	3,6	3,6	3,3
9	3,6	3,8	3,0
10	2,9	3,2	2,4
11	3,6	3,4	2,8
12	3,3	4,0	2,8
13	4,2	3,8	3,9
14	2,7	3,2	2,2
15	2,1	3,1	3,2
16	3,4	3,8	3,2
17	3,7	3,6	3,0
18	4,4	4,7	3,7
19	3,1	3,4	2,6
20	3,7	3,9	3,1
21	3,8	3,6	3,2
22	3,1	3,2	3,2
23	3,1	3,4	3,1
24	4,0	3,9	2,6

Обсуждение

Как было показано ранее [2], определение содержания ФГ по методу Клаусса является чувствительным к гипо-, дис- и гипер-фибриногенемии, а также к продуктам деградации фибрина, которые влияют на процесс полимеризации фибрин-мономеров и могут быть причиной как занижения, так и завышения результатов анализа ФГ. Тромбиновая активность также зависит от функционального состояния самого фибриногена, т.е. от степени окисленности ФГ. Учитывая этот факт, нами содержание белка в фибриновом сгустке принято, как более точное отражение уровня фибриногена. Проведен сравнительный анализ данных по определению фибриногена тремя разными методами, представленных в **табл. 4**.

Сравнительные данные фибриногена, определенного по методу Клаусса и белка в фибриновом сгустке:

Повышенный уровень ФГ по Клауссу определяется только в 1 пробе, в то время как в фибриновом сгустке определяется в трех пробах повышенный уровень ФГ;

В 8 пробах цитратной плазмы (33%) ФГ по Клауссу и в фибриновом сгустке совпали по величине (разница ФГ на уровне $\pm 0,2$ г/л) была нами принята за ошибку метода, который в процентах составляет 10%;

В 14 пробах (58%) ФГ по методу Клаусса значительно ниже, чем был определен белок в фибриновом сгустке (разница больше 10%), что может свидетельствовать о сниженной протеолитической активности тромбина при окислении фибриногена;

В 2 пробах (8%) ФГ по Клауссу определялся выше, чем белок в фибриновом сгустке. Данный факт может свидетельствовать об ограниченном (незначительном) окислении фибриногена, который делает такой фибриноген более чувствительным к протеолизу под действием тромбина.

Сравнительные данные белка в фибриновом сгустке с данными ФГ по Клауссу и предлагаемым методов:

– в 14 пробах (58%) белок в фибриновом сгустке значительно больше, чем ФГ по Клауссу;

– в 19 пробах (79%) Белок в фибриновом сгустке примерно равен с содержанием ФГ, рассчитанным с использованием F (фактора) для перевода изменений оптической плотности при коагуляции плазмы (ΔA_{450}) в г/л ФГ (предлагаемый метод);

– в 2 пробах (8%) Белок в фибриновом сгустке больше ФГ, рассчитанного по данному методу;

– в 3 пробах плазмы (13%) Белок в фибриновом сгустке меньше расчетного ФГ по данному методу.

Сравнительный анализ ФГ (предлагаемый метод) и ФГ по Клауссу:

– в 3 пробах (13%) выявляется повышенный уровень ФГ, в то время как по Клауссу ФГ только в 1 пробе повышен (>4 г/л);

– в 14 пробах (42%) ФГ (предлагаемый метод) больше, чем ФГ по Клауссу;

– в 10 пробах (38%) ФГ (предлагаемый метод) равен

ФГ, определенному по методу Клаусса.

Таким образом, полученные результаты убедительно показали возможность определения фибриногена по изменению мутности проб при рекальцификации и коагуляции цитратной плазмы фотометрически при длине волны 450 нм с интервалами измерения 0 и 60 мин. Для расчета содержания фибриногена предложена формула: $\text{ФГ (г/л)} = \Delta A_{450} \times 5,12$, где: ΔA_{450} – изменение оптической плотности при коагуляции плазмы; 5,12 – расчетный коэффициент для перевода изменений оптической плотности пробы при коагуляции плазмы в г/л ФГ. Предлагается определение функциональности ФГ как разность между количествами фибриногена, определенными данным способом и по методу Клаусса и при разнице более 10% констатировать как нарушенную функциональность фибриногена.

В настоящее время накоплены многочисленные данные о важной патогенетической роли перекисного

окисления липидов, являющегося неотъемлемой составляющей окислительного стресса, в инициации и развитии многих острых и хронических заболеваний. Однако активные кислородные метаболиты (АКМ), наряду с окислительной модификацией липидов, вызывают также и окислительную модификацию белков, приводящую к патологическим изменениям их функций, к фрагментации и агрегации белковых молекул. Применительно к процессам окислительной модификации белков при патологии сердечно-сосудистой системы атеросклеротического генеза большой интерес представляет окисление гликопротеина, фибриногена крови. Поскольку повышенный уровень ФГ является диагностически и прогностически значимым маркером не только атеросклероза, но многих других хронических воспалительных заболеваний, и его окислительная модификация еще более значительно потенцирует нарушения системы гемостаза, сопряжен-

Таблица 5

Данные содержания фибриногена в цитратной плазме по методу Клаусса, белка в фибриновом сгустке, приготовленном рекальцификацией (реК) и фибриногена по предлагаемому методу

№ проб	ФГ по Клауссу, г/л	Изменение оптической плотности пробы в тесте коагуляции плазмы при реК ΔA_{450}	Белок в преципитатах фибриновых сгустков при реК плазмы, г/л	Коэффициент перевода (F) ΔA_{450} при реК в г/л ФГ	ФГ, г/л = $\Delta A_{450} \times F$ (F=5,12)	Разница между ФГ реК и ФГ по Клауссу	Разница в % к белку в преципитате фибринового сгустка
1	4,2	0,859	4,2	4,9	4,4	0,2	5
2	3,0	0,599	3,0	5,0	3,1	0,1	3
3	3,5	0,731	3,7	5,1	3,7	0,2	5
4	2,1	0,371	2,3	6,2	1,9	-0,2	9
5	2,4	0,469	2,4	5,1	2,4	0	0
6	2,7	0,608	3,2	5,3	3,1	0,4	13
7	2,8	0,516	2,5	4,8	2,6	-0,2	8
8	3,3	0,678	3,6	5,3	3,5	0,2	6
9	3,0	0,633	3,6	5,7	3,2	0,2	6
10	2,4	0,536	2,9	5,4	2,7	0,3	10
11	2,8	0,679	3,6	5,3	3,5	0,7	19
12	2,8	0,647	3,3	5,1	3,3	0,5	15
13	3,9	0,844	4,2	5,0	4,3	0,4	10
14	2,2	0,497	2,7	5,4	2,5	0,3	11
15	3,2	0,686	2,1	3,1	3,5	0,2	10
16	3,2	0,776	3,4	4,5	4,0	0,8	24
17	3,0	0,703	3,7	5,3	3,6	0,6	16
18	3,7	0,921	4,4	4,8	4,7	1,0	23
19	2,6	0,566	3,1	5,5	2,9	0,3	10
20	3,1	0,695	3,7	5,2	3,6	0,5	14
21	3,2	0,753	3,8	5,1	3,9	0,7	18
22	3,1	0,585	3,1	5,3	3,0	-0,1	3
23	3,1	0,603	3,1	5,1	3,1	0	0
24	2,6	0,771	4,0	5,2	3,9	1,3	33

ные с эндотелиальной дисфункцией, что в конечном итоге приводит к нарушению агрегации тромбоцитов, эритроцитов и к повышенной секреции цитокинов [5]. Известны также способы определения окислительной модификации фибриногена плазмы крови [6–9]. Суть обоих методов заключается в предварительном приготовлении фибринового сгустка по Рутбергу, определении его массы. Затем к сгустку добавляют равные объемы физраствора и 20% ТХУ для денатурации и осаждения ФГ. Далее определяют окислительную модификацию фибрина сгустка с 2,4-динитрофенилгидразином (2,4-ДНФГ), как описано в работе Дубининой и соавторов. [10].

Недостатком описанных методов является необходимость выделения фибринового сгустка, причем инкубация в течение 10 мин не достаточна для коагуляции окисленного фибриногена. Метод трудно выполним в условиях клинико-диагностических лабораторий при рутинных исследованиях.

Также известен способ определения функциональности фибриногена, включающий исследование цельной крови с помощью тромбоэластографии. Гепаринизированную кровь и батроксобин вносят в кювету для тромбоэластографии (ТЭГ), после чего проводят ТАГ, определяют параметр максимальной амплитуды на тромбоэластограмме, а концентрацию функционального фибриногена рассчитывают по формуле [3]. Основным недостатком данного определения функциональности ФГ является использование специального фермента, выделенного из яда гремучей змеи *Boothropsatrox*, батроксобина, который является нефизиологическим ферментом для человеческого ФГ, а также низкая производительность и высокая себестоимость анализа с использованием специального прибора – тромбоэластографа. Перечисленные недостатки не позволяют широко использовать данный метод оценки функциональности фибриногена в рутинных исследованиях.

Проведенный корреляционный анализ данных определения ФГ по Клауссу и фибриногеном, полученным предлагаемым способом показал высокую корреляцию ($r = 0,843$) при высокой степени достоверности. Таким образом, разработанный способ определения фибриногена является корректным для рутинных исследований фибриногена и может быть внедрен в лабораторную практику для исследований не только количества фибриногена, но и его функциональности в дополнение к методу определения фибриногена по Клауссу.

Заключение

Простота и доступность теста определения фибриногена, а также наличие анализатора иммуноферментного анализа в клинико-диагностических лабораториях позволяют использовать тест при скринингах большого количества образцов цитратной плазмы.

Определение ФГ разработанным методом и методом Клаусса расширяют арсенал как для количественной оценки уровня ФГ, так и функциональности фибриногена. Как ранее было показано то, что увеличение степени окисления фибриногена снижает скорость превращения ФГ в фибрин под действием тромбина. Данный эффект в методе определения ФГ по Клауссу дает заниженный результат, что нами и показано двумя независимыми способами, модифицированным методом по Рутбергу с использованием активатора коагуляции плазмы при рекальцификации и без этого активатора. Дальнейшие исследования содержания ФГ по Клауссу и предлагаемым методом должны на большем материале подтвердить причину расхождения уровня ФГ за счет изменения функциональности фибриногена (заниженные результаты по Клауссу), с одной стороны, и образование комплексов окисленного фибриногена с окисленными липопротеинами низкой плотности, активированными белками системы комплемента C3b и C4b и с другими белками крови (завышенный результат по белку в фибриновом сгустке). Предлагаемый способ, таким образом, позволяет более углубленно, количественно оценивать уровень фибриногена и его функциональность.

Список литературы

1. Weisel J.W., Litvinov R.I. Mechanisms of fibrin polymerization and clinical implications. *Blood*. 2013; 121(10): 1712-1719. DOI: 10.1182/blood-2012-09-306639
2. Долгов В.В., Свиридов П.В. *Лабораторная диагностика нарушенной гемостаза*. М. – Тверь: ООО Издательство Триада, 2005. 227 с.
3. Полевода О.А., Галстян Г.М., Берковский А.Л., Сергеева Е.В. *Способ определения функционального фибриногена*. Патент РФ № 2669796; 2018.
4. Рутберг Р.А. Простой и быстрый метод определения содержания фибриногена плазмы. *Лабораторное дело*. 1961; 6: 6-7.
5. Ройтман Е.В., Азизова О.А., Морозов Ю.А., Асейчев А.В. Влияние окисленного фибриногена на свертывающую систему крови. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2004; 138(5): 467-469.
6. Rizzo K., Vella K., Zammit D., Gatt P., Grima C., Inguanez M.B., Gerada J., Ellul P., Vassallo M., Azzopardi N., Pocock J., Gatt A. Fibrinogen measurement in liver disease: validation of the functional fibrinogen thromboelastography assay and a novel mathematical predictive model. *Blood Transfus*. 2019; 17(3): 237-246. DOI: 10.2450/2018.0105-18
7. Рагино Ю.И., Баум В.А., Полонская Я.В. *Способ определения окислительной модификации фибриногена плазмы крови*. Патент РФ № 2298189; 2007.
8. Швачко А.Г., Пирязев А.П., Азизова О.А., Сергиенко В.И., Быкова А.А. *Способ определения окислительной модификации фибриногена плазмы крови по содержанию карбонильных групп в фибриновом сгустке*. Патент РФ № 2595806; 2016.
9. Hugenholtz G.C.G., Macrae F., Adelmeijer J., Dulfer S., Porte R.J., Lisman T., Ariëns R.A.S. Procoagulant changes in fibrin clot structure in patients with cirrhosis are associated with oxidative modifications of fibrinogen. *J. Thromb. Haemost.* 2016; 14(5): 1054-1066. DOI: 10.1111/jth.13278
10. Дубинина Е.Е., Бурмистров С.О., Ходов Д.А., Поротов Г.Е. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения. *Вопросы медицинской химии*. 1995; 41(1): 24-26.

References

1. Weisel J.W., Litvinov R.I. Mechanisms of fibrin polymerization and clinical implications. *Blood*. 2013; 121(10): 1712-1719. DOI: 10.1182/blood-2012-09-306639

2. Dolgov VV, Sviridov P.V. [Laboratory diagnosis of hemostatic disorders]. M. – Tver: Triad Publishing House Ltd., 2005. 227 p. (in Russian)
3. Polevoda OA, Galstyan G.M., Berkovsky A.L., Sergeeva E.V. [A method for determining functional fibrinogen]. Patent 2669796, RF; 2018. (in Russian)
4. Rutberg R.A. [A simple and fast method for determining plasma fibrinogen content]. *Laboratornoe delo [Laboratory science]*. 1961; 6: 6-7. (in Russian)
5. Roitman E.V., Azizova O.A., Morozov Yu.A., Aseichev A.V. [The effect of oxidized fibrinogen on the blood coagulation system]. *Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny [Bulletin of Experimental Biology and Medicine]*. 2004; 138(5): 467-469. (in Russian)
6. Rizzo K., Vella K., Zammit D., Gatt P., Grima C., Inguanez M.B., Gerada J., Ellul P., Vassallo M., Azzopardi N., Pocock J., Gatt A. Fibrinogen measurement in liver disease: validation of the functional fibrinogen thromboelastography assay and a novel mathematical predictive model. *Blood Transfus.* 2019; 17(3): 237-246. DOI: 10.2450/2018.0105-18
7. Ragino Yu.I., Baum V.A., Polonskaya Ya.V. [The method for determining the oxidative modification of plasma fibrinogen]. Patent 2298189, RF; 2007. (in Russian)
8. Shvachko A.G., Piryazev A.P., Azizova O.A., Sergienko V.I., Bykova A.A. [A method for determining the oxidative modification of plasma fibrinogen by the content of carbonyl groups in a fibrin clot]. Patent 2595806; RF; 2016. (in Russian)
9. Hugenholtz G.C.G., Macrae F., Adelmeijer J., Dulfer S., Porte R.J., Lisman T., Ariëns R.A.S. Procoagulant changes in fibrin clot structure in patients with cirrhosis are associated with oxidative modifications of fibrinogen. *J. Thromb. Haemost.* 2016; 14(5): 1054-1066. DOI: 10.1111/jth.13278
10. Dubinina E.E., Burmistrov S.O., Khodov D.A., Porotov G.E. [Oxidative modification of human serum proteins, method for its determination]. *Voprosy meditsinskoj khimii [Medical chemistry issues]*. 1995; 41(1): 24-26. (in Russian)

Сведения об авторах:

Шойбонов Батожаб Батожаргалович – кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник отдела фундаментальных и прикладных аспектов ожирения Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр профилактической медицины» Министерства здравоохранения Российской Федерации; ведущий научный сотрудник лаборатории физиологии мотивации Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт нормальной физиологии имени П.К.Анохина»

Драпкина Оксана Михайловна – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, директор Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр профилактической медицины» Министерства здравоохранения Российской Федерации; <http://orcid.org/0000-0002-4453-8430>

Баронец Татьяна Павловна – студентка 6 курса Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М.Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Серебрякова Наталья Юрьевна – лаборант-исследователь отдела фундаментальных и прикладных аспектов ожирения Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр профилактической медицины» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Худяков Михаил Борисович – ведущий инженер отдела укрепления общественного здоровья Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр профилактической медицины» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Григорьева Диана Викторовна – кандидат медицинских наук, научный сотрудник поликлинического отделения Государственного бюджетного учреждения здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии»

Лебедева Ольга Алексеевна – врач-лаборант клинико-диагностической лаборатории Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр профилактической медицины» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Литинская Ольга Анатольевна – кандидат медицинских наук, заведующая клинико-диагностической лабораторией Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр профилактической медицины» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Толпыго Светлана Михайловна – кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории физиологии мотивации Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт нормальной физиологии имени П.К.Анохина»; <http://orcid.org/0000-0002-6457-6725>

Лагутина Лариса Владимировна – младший научный сотрудник лаборатории физиологии мотивации Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт нормальной физиологии имени П.К. Анохина»