

МЕТОДИ

УДК 577.112:616.15

РОЗРОБКА ТА ОПТИМІЗАЦІЯ МЕТОДІВ ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ІНГІБІТОРА АКТИВАТОРА ПЛАЗМІНОГЕНУ 1-го ТИПУ В ПЛАЗМІ КРОВІ

Я. М. РОКА-МОЙЯ, Д. Д. ЖЕРНОСЄКОВ, А. С. КОНДРАТЮК, Т. В. ГРИНЕНКО

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: yanulia@bk.ru

Рівень інгібітора активатора плазміногену 1-го типу (plasminogen activator inhibitor, PAI-1) є важливим показником патологічних процесів, оскільки активність та кількість цього протеїну в плазмі крові підвищується при гострому інфаркті міокарда, злоякісних новоутвореннях, цукровому діабеті та ін. Робота присвячена розробці та оптимізації методів визначення активності PAI-1, які можуть бути впроваджені в лабораторно-клінічну практику. Запропоновано модифікацію методу COATEST PAI для визначення інгібіторної активності з використанням хромогенного субстрату плазміну S2251, за якою фрагменти бромціанового розщеплення фібриногену людини замінено на desAB-фібрин бика. Розроблено метод визначення активності інгібітора PAI-1 із використанням фібринових плівок, де фібрин водночас є стимулятором реакції активації плазміногену та субстратом. Застосування фібрину, природного субстрату плазміну, забезпечує високу специфічність методу і дозволяє уникнути перехресної реакції з іншими ензимами плазми.

Ключові слова: інгібітор активатора плазміногену, активність PAI-1, фібринові плівки, хромогенний субстрат S2251, desAB-фібрин.

Інгібітор активатора плазміногену 1-го типу (plasminogen activator inhibitor, PAI-1) є важливим компонентом системи гемостазу, який пригнічує дію активаторів плазміногену урокіназного та тканинного типу. PAI-1 синтезується мегакаріюцитами, під час фрагментації яких інгібітор накопичується в α -гранулах тромбоцитів, що складає 90% загального вмісту інгібітора в організмі людини. Крім того, PAI-1 продукується в ендотеліальних клітинах, гепатоцитах, адипоцитах та ін. [1]. У плазмі крові здорових донорів активність PAI-1 коливається від 6,5 до 15 IU/мл, концентрація вільного PAI-1 і його комплексної форми становить в середньому 24 нг/мл [2]. Одна одиниця активності PAI-1 відповідає такій кількості, яка інгібує 1 IU тканинного активатора плазміногену (tissue plasminogen activator, tPA).

Таким чином, у нормі рівень PAI-1 у 4–5 разів перевищує рівень tPA в плазмі крові.

Відомо, що в плазмі крові PAI-1 може перебувати в декількох формах: в активному стані – в комплексі з протеїном вітронектином, в неактивному стані – в комплексі з тканинним активатором та вітронектином, а також в неактивному стані поза комплексом. PAI-1 може спонтанно переходити з активної в латентну форму (термодинамічно стабільнішу), проте активна форма PAI-1 стабілізується зв'язуванням із вітронектином, саме в такому стані інгібітор міститься в α -гранулах тромбоцитів [1].

У роботах, присвячених вивченню ролі PAI-1 у патологічних процесах, відзначають, що підвищення рівня активної форми цього протеїну в крові є несприятливим прогностич-

Список умовних скорочень:

PAI-1 – plasminogen activator inhibitor-1, інгібітор активатора плазміногену 1-го типу; tPA – tissue plasminogen activator, тканинний активатор плазміногену; rtPA – recombinant tissue plasminogen activator, рекомбінантний тканинний активатор плазміногену; Pg – plasminogen, плазміноген; Pm – plasmin, плазмін; HAc – оцтова кислота; pNa – *n*-нітроанілін.

ним маркером при онкологічних, серцево-судинних захворюваннях та запальних процесах [2–5], в той час як низький рівень активності інгібітора асоціюється з ризиком крововиливу [6].

Виходячи з того, що активність PAI-1 є важливим показником функціонального стану системи гемостазу, виникає потреба у визначенні кількості цього протеїну та його активності в біологічних зразках. Для оцінки кількості антигену PAI-1 у лабораторно-клінічній практиці найчастіше застосовуються імунохімічні методи, які дозволяють визначити як комплекси PAI-1 із протеїнами, так і вільну форму інгібітора. Зазвичай для аналізу необхідні два типи антитіл: моноклональні антитіла до tPA, завдяки яким формується шар тканинного активатора, який з високою специфічністю зв'язує PAI-1 на поверхні планшета, та мічені моноклональні анти-PAI-1 антитіла для виявлення PAI-1. Щоб оцінити активність цього інгібітора в плазмі крові запропоновано тест-систему COATEST PAI (Chromogenix), в якій бромціанові фрагменти фібриногену людини стимулюють реакції активації плазміногену tPA. Метою роботи була оптимізація цього методу та розробка методу визначення кількості функціонально активного PAI-1 із застосуванням фібринових плівок.

Матеріали і методи

У роботі використовували: рекомбінантний тканинний активатор плазміногену ін'єкційного препарату «Актилізе» (Actilyse; 50 мг), Boehringer Ingelheim International GmbH, Німеччина), тромбін людини (Технологія-Стандарт, РФ), тест-систему «COATEST PAI» (Chromogenix AB, Швеція), хромогенний субстрат – H-D-Val-L-Leu-L-Lys-n-нітроанілін-HCl (S2251) (Chromogenix AB, Швеція), трис-(гідроксиметил) амінометан (Merck, Німеччина), лізин-сефарозу (Amersham Biosciences AB, Швеція), пара-хлормеркурійбензоат (Sigma-Aldrich, Німеччина), електрофоретичні маркери молекулярної маси (Prestained Protein Ladder SM0671, Fermentas, Литва), неорганічні сполуки ступеня чистоти хч та чда (Україна); мікротитраційні планшети (SARSTEDT, США).

Фібриноген, desAB-фібрин-мономер, плазміноген та плазмін отримували, як описано в методиках [7–9]. Чистоту одержаних протеїнових препаратів контролювали методом SDS-електрофорезу в поліакриламідному

гелі з використанням маркерів молекулярних мас [10].

Концентрацію протеїнів у розчинах вимірювали на спектрофотометрі (СФ-2000, Росія), за величиною абсорбції при довжині хвилі 280 та 320 нм. Для розрахунку концентрацій використовували значення молярних коефіцієнтів абсорбції (1%, 1 см) і Мм досліджуваних протеїнів відповідно: Glu-плазміноген – 17 (92 кДа), фібриноген – 15,06 (рН 7,4) та 14,84 (за кислих значень рН) (340 кДа), t-PA – 20,0 (70 кДа).

Приготування фібринових плівок у мікротитраційних планшетах. Для приготування фібринових плівок використовували мікротитраційні планшети з 96 лунками, діаметр лунок – 6 мм. Для роботи брали розчин фібриногену бика (20 мг/мл), детергенту твін 80 (0,06%) та розчин тромбіну людини 50 НІН/мл. Спочатку готували полімеризаційний розчин, що містить 2 мг/мл фібриногену, 0,006% твіну 80 у 0,05М Na-фосфатному буфері, рН-7,4. Потім запускали процес полімеризації, додаючи тромбін із розрахунку 1,5 НІН/мл (загальний об'єм полімеризаційного розчину становив 2 мл). Після внесення тромбіну реакційну суміш швидко розподіляли по 100 мкл у кожен лунку планшета, намагаючись встигнути до моменту застигання гелю (час застигання – 2 хв). Аби заповнити всі лунки планшета, полімеризаційний розчин фібрину необхідно готувати кілька разів. Фібринові гелі залишали на ніч у термостаті при 37 °С. Утворені фібринові плівки двічі промивали бідистильованою водою, просушували 20 хв при 37 °С та зберігали при -20 °С.

Статистичну обробку експериментальних даних здійснювали за допомогою програмного забезпечення MS Excel.

Результати та обговорення

У роботі представлено методи визначення активності PAI-1 з використанням фібрину desAB та фібринових плівок як стимуляторів реакції активації плазміногену тканинним активатором. Активність PAI-1 визначали за амідолітичною або фібринолітичною активністю плазміну, що утворився внаслідок активації плазміногену залишковою кількістю tPA. Амідолітичну активність оцінювали з використанням хромогенного субстрату S2251, а фібринолітичну визначали спектофотометрично, фіксуючи кількість залишкового фібрину плівки. Схематично принцип визначення PAI-1 із використанням запропонованих підходів зображено на рис. 1.

Визначення рівня PAI-1 з використанням хромогенного субстрату S2251. Визначення активності PAI-1 у плазмі крові за стандартною процедурою COATEST PAI (Chromogenix) включає такі етапи: PAI-1, що міститься в плазмі крові, взаємодіє з екзогенним тканинним активатором, який взято у фіксованій надлишковій кількості; на наступному етапі плазміноген активують до плазміну залишком тканинного активатора, стимулятором реакції активації є фрагменти бромціанового розщеплення фібриногену людини; далі спектрофотометрично ($\lambda = 405$ нм) визначають кількість *n*-нітроаніліну (pNa), що вивільнюється із хромогенного субстрату S2251 внаслідок дії плазміну. Значення А 405 прямо пропорційне активності tPA і

обернено пропорційне активності PAI-1 [11]. Беручи до уваги необхідність застосування високотоксичної речовини BtCN для одержання фрагментів фібриногену, ми пропонуємо для визначення активності PAI-1 використовувати полімерний фібрин – природний кофактор реакції активації плазміногену тканинним активатором. Доцільність застосування desAB-фібрину бика замість фрагментів бромціанового розщеплення фібриногену людини та рекомбінантного тканинного активатора (recombinant tissue plasminogen activator, rtPA) замість природного для активації плазміногену обґрунтовано в роботі [12]. Так, показано, що desAB-фібрин має вищі ефекторні властивості в порівнянні із бромціановими фрагментами, тобто за рівних умов проведення

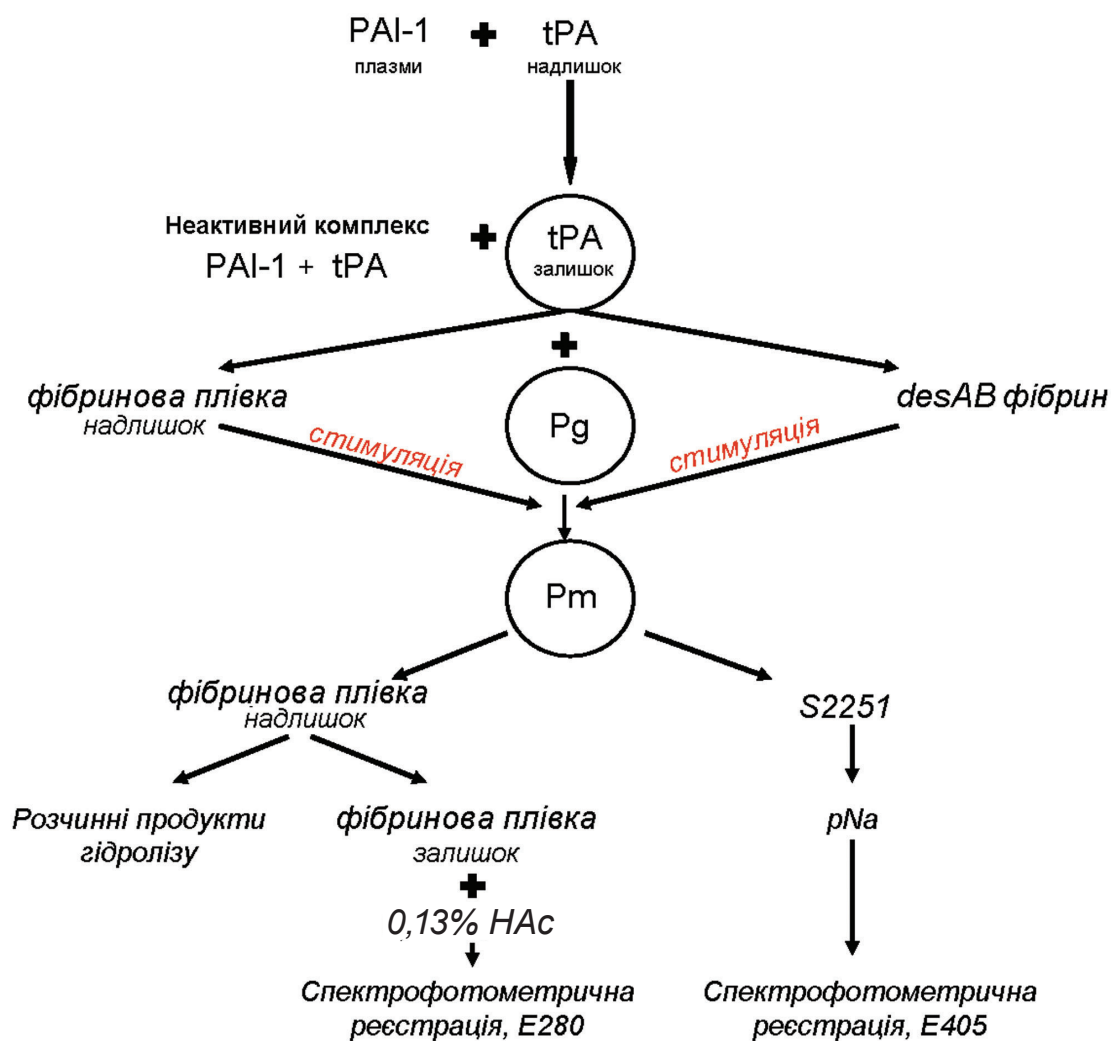


Рис. 1. Принцип методу визначення активності PAI-1 із використанням фібринових плівок та хромогенного субстрату: tPA – тканинний активатор плазміногену, Pg – плазміноген, Pm – плазмін, HAc – оцтова кислота, pNa – *n*-нітроанілін, S2251 – хромогенний субстрат плазміну

реакції швидкість активації плазміногену t-PA в присутності desAB-фібрину майже вдвічі перевищує таку, де кофактором є бромціанові фрагменти фібриногену. DesAB-фібрин бика не поступається desAB-фібрину людини під час визначення кінетичних характеристик реакції активації плазміногену tPA.

Ми показали, що залежність швидкості активації плазміногену (0,04 мг/мл) від концентрації тканинного активатора в присутності фібрину (0,12 мг/мл) має лінійний характер в межах tPA 0,1–2,5 IU/мл. У разі використання 2 IU/мл тканинного активатора в реакції розщеплення хромогенного субстрату S2251 плазміном поглинання розчину при λ 405 нм досягає одиниці за 1 годину інкубації. Дослідження інгібіторного впливу різної кількості плазми крові показало, що 5 мкл плазми інгібують до 50% активності тканинного активатора (2 IU/мл). Тому для визначення активності PAI-1 нами було обрано 5 мкл плазми та 2 IU/мл tPA (в наших експериментах 0,5 IU на 0,25 мл інкубаційного середовища).

Схематично процес визначення PAI-1 з урахуванням наших модифікацій зображено на рис. 1 (права частина).

Побудова калібрувальної графіки. Для визначення інгібіторної активності PAI-1 в плазмі крові будували калібрувальну криву з застосуванням tPA та desAB-фібрину бика.

Препарат t-PA з активністю 580 000 IU/мг протеїну, розчиняли в 0,2 М ацетату натрію (рН 3,9). Активність tPA вихідного розчину складала 100 000 IU/мл, його зберігали при 4 °С протягом тижня. Безпосередньо перед роботою готували робочі розчини шляхом послідовного розведення вихідного розчину в 0,05 М трис-НСІ буфері (рН 7,4).

Під час одержання стандартної кривої в лунки мікропланшета вносили по 25 мкл робочих розчинів tPA (0,0; 0,25; 0,35; 0,40; 0,45; 0,50 IU/об'єм інкубаційного середовища), 10 мкл плазміногену та 10 мкл desAB-фібрину у 0,13% оцтової кислоти з концентрацією 1 мг/мл та 3 мг/мл, відповідно. Реакцію ініціювали внесенням в лунки 205 мкл 0,05 М трис-НСІ буфера (рН 7,4), що містив S2251 у кількості, яка відповідає кінцевій концентрації 0,3 мМ. Об'єм інкубаційного середовища становив 0,25 мл. Інкубацію проводили протягом 1 год при 37 °С. Реакцію зупиняли внесенням у лунку 25 мкл 50%-ї оцтової кислоти. Рівень поглинання *n*-нітроаніліну вимірювали на мікрорідері Multiskan EX Thermo (Китай) за двох довжин хвилі 405 і 495 нм та розраховували $\Delta A = A_{405} - A_{492}$.

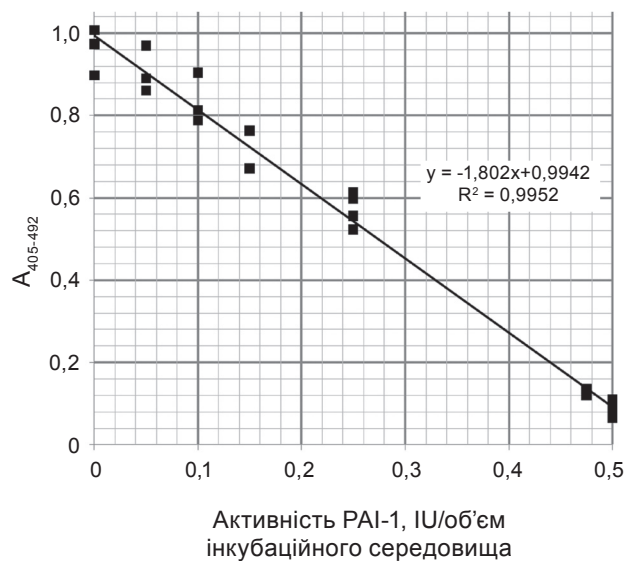


Рис. 2. Калібрувальна крива для визначення PAI-1 із застосуванням хромогенного субстрату плазміну S2251

Оскільки одна одиниця активності PAI-1 відповідає такій кількості інгібітора, яка інгібує 1 IU тканинного активатора, залежність значення ΔA від кількості одиниць tPA є обернено пропорційною кількості одиниць PAI-1. Графік залежності наведено на рис. 2.

Процедура визначення активності PAI-1 у плазмі крові включає такі етапи:

- для передінкубації в лунку мікрититраційного планшета вносять 25 мкл розчину tPA з активністю 20 IU/мл та 5 мкл плазми крові, інкубують протягом 10 хв за кімнатної температури;

- після завершення інкубації вносять 10 мкл розчину desAB-фібрину в 0,13% оцтової кислоти та 10 мкл плазміногену з концентраціями 3 та 1 мг/мл відповідно; внесення здійснюють таким чином, щоб розчини не контактували один з одним;

- реакцію полімеризації фібрину та активації плазміногену незаінгібованим tPA ініціюють внесенням 200 мкл 0,05 М трис-НСІ буфера (рН 7,4), що містить таку кількість хромогенного субстрату S2251, яка відповідає його кінцевій концентрації в реакційній суміші 0,3 мМ;

- протягом 1 год проводять інкубацію реакційної суміші при 37 °С;

- реакцію зупиняють внесенням 25 мкл 50%-ї оцтової кислоти, рівень поглинання *n*-нітроаніліну вимірюють при λ 405 і 495 нм та розраховують $\Delta A = A_{405} - A_{492}$.

За калібрувальною кривою визначають кількість одиниць інгібітора в 250 мкл інкубаційного середовища. Активність PAI-1 в 1 мл плазми крові розраховують за формулою:

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

де А – кількість одиниць PAI-1, визначена за калібрувальною кривою (IU); 0,005 – об'єм зразка плазми, що вноситься в інкубаційне середовище (мл); 1,1 – коефіцієнт перерахунку розведення крові цитратом натрію.

Якщо активність PAI-1 у досліджуваній плазмі нижча за 2 IU/мл або перевищує 40 IU/мл, то кількість зразка плазми, внесеного в інкубаційне середовище, треба вдвічі збільшити або розбавити відповідно.

Для модифікованого методу вимірювання активності PAI-1 у плазмі крові визначено типові валідаційні характеристики, а саме специфічність, відтворюваність, межа виявлення, діапазон застосування. Діапазон застосування для цього методу лежить в межах 2–40 IU PAI-1 в 1 мл плазми крові. Межа виявлення активності PAI-1 становить 2 IU/мл плазми. Специфічність методу досліджували як описано в роботі [12]. Показано, що ацидифікована плазма не впливає на швидкість активації плазміногену тканинним активатором, тоді як нативна плазма пригнічує активність tPA.

Запропонована модифікація методу простіша та доступніша за оригінальний метод, вона має високий рівень відтворюваності, що доведено трьома незалежними кривими, кожна з яких отримували з використанням нових робочих розчинів. Стандартне відхилення кривих складає менше 7,5%.

Використання в методі desAB-фібрину, одержаного з фібриногену плазми крові великої рогатої худоби, замість бромціанових фрагментів фібриногену людини має певні переваги. По-перше, зникає необхідність застосування високотоксичної речовини бромціану для одержання фрагментів. По-друге, у разі використання desAB-фібрину вихідна сировина – плазма великої рогатої худоби – є значно дешевшою. До того ж, слід зауважити, що молекули фібриногену людини і бика виявляють високий ступінь гомології, а за ефективністю дії desAB-фібрин бика не поступається бромціановим фрагментам [12].

Таким чином, запропонований нами метод є доступним, простим у виконанні і дає можливість визначати функціонально активну форму PAI-1.

Визначення активності PAI-1 з використанням фібринових плівок. В основу методу визначення активності PAI-1 із використанням фібринових плівок покладено підхід, запропонований Houlaerts та співавт. [13] при дослідженні процесу активації плазміногену його активаторами. Принцип методу, який ми пропонуємо, полягає в тому, що реакція активації плазміногену під впливом tPA проходить безпосередньо на поверхні плівки фібрину у лунці мікротитраційного планшета (приготування фібринових плівок описано в розділі «Матеріали і методи»). Фібрин є стимулятором реакції активації плазміногену і водночас субстратом для плазміну, що утворився. Швидкість процесу лізису фібрину визначали за кількістю залишкового фібрину в плівці. Схематично принцип визначення представлено на рис. 1 (ліва частина).

Процедура визначення активності PAI-1 у зразку плазми крові згідно з запропонованою методикою передбачає наступні етапи:

- для передінкубації в пластикову мікропробірку вносять 80 мкл безтромбоцитарної плазми крові та 160 мкл розчину tPA із концентрацією 125 IU/мл. Витримують 15 хв при кімнатній температурі;

- у кожен лунку мікротитраційного планшета з фібриною плівкою (200 мкг фібрину) вносять 170 мкл 0,05 М Na-фосфатного буфера, рН 7,4 (загальний об'єм інкубаційного середовища становить 250 мкл) та 50 мкл розчину плазміногену з концентрацією 0,24 мг/мл (12 мкг протеїну);

- запуск реакції активації плазміногену та гідролізу фібрину проводять, додаючи 30 мкл суміші «плазма : тканинний активатор» (із розрахунку, що на 10 мкл плазми припадає 2,5 IU tPA на лунку) послідовно в кожен лунку в напрямку «А» → «Н» через певні проміжки часу, як видно з рис. 3. У перервах між внесеннями суміші планшет струшують на термошейкері при 37 °С, 140 об./хв. За 120 хв від початку реакції в лунці «А» реакцію зупиняють, видаляючи реакційну суміш із лунок планшета;

- залишок фібринової плівки на дні кожної лунки промивають бідистильованою водою та розчиняють у 220 мкл 0,13% оцтової кислоти протягом 30 хв. Абсорбцію розчину фібрину визначають спектрофотометрично (λ 280 нм), попередньо розбавляючи його 0,13% оцтовою кислотою у співвідношенні 1 : 4;

- на основі одержаних даних будують криву, що описує динаміку гідролізу фібрину tPA-активованим плазміногеном (зміна кількості

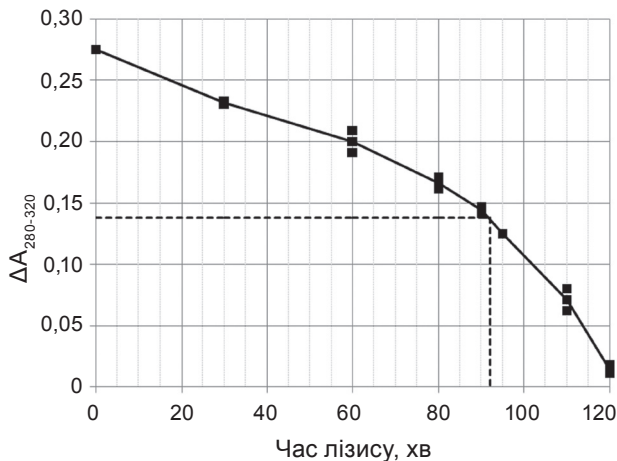


Рис. 3. Типова крива гідролізу фібрину tPA-активованим плазміногеном (0,048 мг/мл плазміногену, 10 IU/мл tPA): $T_{1/2}$ – час напівлізису фібрину

залишкового фібрину в часі). Час напівлізису визначають як період, за який кількість фібрину плівки зменшується на 50%. Типову криву гідролізу фібрину за наявності 0,048 мг/мл плазміногену та 10 IU/мл тканинного активатора в середовищі інкубації наведено на рис. 3.

Побудова калібрувального графіка. Для визначення інгібіторної активності PAI-1 у плазмі крові будували калібрувальний графік залежності часу напівлізису фібрину від концентрації/активності тканинного активатора у розчині. Так, нами отримано серію кривих динаміки гідролізу фібрину фіксованою кількістю плазміногену, що активований tPA у кількостях 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 та 2,5 IU/лунку. Для цього у кожен лунку з фібриною плівкою (200 мкг фібрину) вносили 195–175 мкл 0,05 М Na-фосфатного буфера та 50 мкл розчину плазміногену з концентрацією 0,24 мг/мл (12 мкг протеїну). Запуск реакції проводили додаючи відповідно 5; 10; 15; 20; 25 мкл розчину tPA з активністю 100 IU/мл у кожен лунку через певні проміжки часу. Загальний об'єм інкубаційного середовища становив 0,25 мл. Послідовність подальших процедур була цілком аналогічна описаному вище у разі визначення інгібіторної активності PAI-1-вмісних зразків. Для кожної кривої гідролізу фібрину визначали час напівлізису. Оскільки одна одиниця активності PAI-1 відповідає такій кількості інгібітора, яка інгібує 1 IU tPA, залежність значення часу напівлізису від кількості одиниць tPA є обернено пропорційною кількості

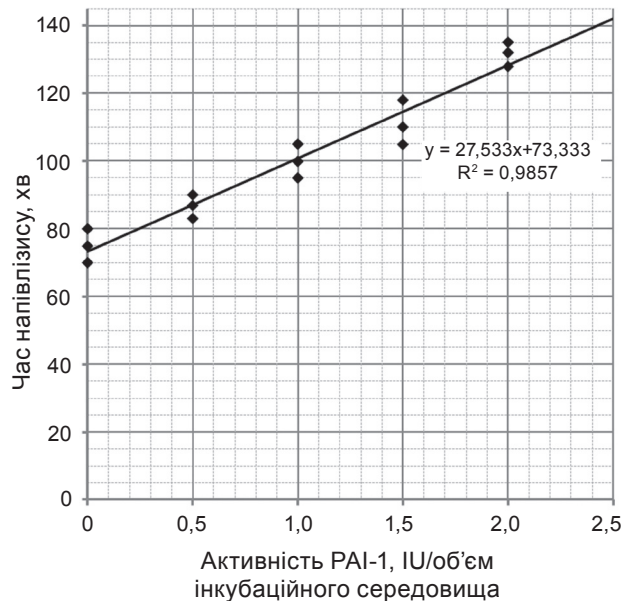


Рис. 4. Калібрувальна крива для визначення активності PAI-1 методом фібринових плівок

одиниць PAI-1. Графік залежності представлений на рис. 4.

За калібрувальною кривою визначали активність інгібітора в 250 мкл інкубаційного середовища. За формулою розраховували чисельне значення активності PAI-1 в 1 мл плазми крові:

$$\begin{aligned} \text{активність PAI-1 (IU/мл плазми)} &= \\ &= A \times 1,1 / 0,010, \end{aligned}$$

де А – кількість одиниць PAI-1, визначена за калібрувальною кривою (IU); 0,010 – об'єм зразка плазми в інкубаційному середовищі (мл); 1,1 – коефіцієнт перерахунку розведення цитратом натрію.

Під час визначення активності PAI-1 із використанням хромогенного субстрату плазміну S2251 слід звернути увагу на те, що він не є винятково специфічним для плазміну і може давати перехресну реакцію з іншими компонентами системи гемостазу, зокрема з калікреїном та тромбіном. Використання фібрину в методі фібринових плівок дозволяє уникнути перехресної реакції з іншими ензимами плазми. Проте широке застосування цього методу буде доцільним лише за умов наявності у дослідника очищених протеїнів – фібриногену і тромбіну.

Запропоновано модифікацію методу визначення активності PAI-1 із використанням хромогенного субстрату S2251, в якому стимулятором реакції активації плазміногену

тканинним активатором є desAB- полімерний фібрин бика. Розроблено метод визначення активності PAI-1 із використанням фібринових плівок як стимулятора реакції активації плазміногену та субстрату плазміну. Обидва способи можуть бути використані в лабораторно-клінічній практиці для визначення PAI-1 у біологічних зразках.

**РАЗРАБОТКА И ОПТИМИЗАЦИЯ
МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
АКТИВНОСТИ ИНГИБИТОРА
АКТИВАТОРА ПЛАЗМИНОГЕНА
1-го ТИПА В ПЛАЗМЕ КРОВИ**

*Я. М. Рока-Мойя, Д. Д. Жерносеков,
А. С. Кондратюк, Т. В. Гриненко*

Институт биохимии им. А.В. Палладина
НАН Украины, Киев;
e-mail: yanulia@bk.ru

Важними показателями патологических процессов принято считать активность и количество ингибитора активатора плазминогена 1-го типа (plasminogen activator inhibitor, PAI-1), поскольку его количество в плазме возрастает при остром инфаркте миокарда, злокачественных новообразованиях, сахарном диабете и т.д. Работа посвящена разработке и оптимизации методов определения PAI-1, которые могут быть использованы в лабораторно-клинической практике. Предложена модификация метода COATEST PAI для определения ингибиторной активности с использованием хромогенного субстрата S2251, согласно с которой мы заменили фрагменты бромцианового расщепления фибриногена человека на desAB-фибрин быка. Разработан также метод определения активности ингибитора с использованием фибриновых пленок, в котором фибрин является одновременно и стимулятором реакции активации, и субстратом. Использование фибрина, природного субстрата плазмина, обеспечивает высокую специфичность метода и позволяет избежать перекрестной реакции с другими энзимами плазмы.

Ключевые слова: ингибитор активатора плазминогена, активность PAI-1, фибриновые пленки, хромогенный субстрат S2251, desAB-фибрин.

**DEVELOPMENT AND
OPTIMIZATION OF THE METHODS
FOR DETERMINING ACTIVITY
OF PLASMINOGEN ACTIVATOR
INHIBITOR-1 IN PLASMA**

*Y. M. Roka-Moya, D. D. Zhernossekov,
A. S. Kondratyuk, T. V. Grinenko*

Palladin Institute of Biochemistry, National
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: yanulia@bk.ru

The activity and content of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) are important indicators of pathological processes, because its content in plasma increases at acute myocardium infarction, tumor, diabetes mellitus, etc. The present work is dedicated to the development and optimization of the methods of PAI-1 activity definition, which can be used in clinical practice. We have proposed the modification of the method COATEST PAI with the usage of chromogenic substrate S2251. According to our modification, the cyanogen bromide fragments of human fibrinogen have been changed into bovine desAB-fibrin. We have also developed the method with the usage of fibrin films. In this method fibrin is used as a stimulator of activation reaction and as a substrate at the same time. Using fibrin, the native substrate of plasmin, we provide high specificity of the reaction and exclude the cross-reaction with other plasma enzymes.

Key words: plasminogen activator inhibitor, PAI-1 activity, fibrin films, S2251 chromogenic substrate, desAB-fibrin.

1. *Horrevoets A. J. G.* // Brit. J. Haematology. – 2004. – **125**. – P. 12–23.
2. *Жерносеков Д. Д., Золотарева Э. Н., Кондратюк А. С.* // Biopolymers & Cell. – 2010. – **26**, № 5. – С. 255–264.
3. *Knudsen E. C., Seljeflot I., Abdelnoor M. et al.* // J. Thromb. Haemost. – 2011. – **9**, N 8. – P. 1468–1474.
4. *von Eyben F. E., Mouritsen E., Holm J. et al.* // Clin. Appl. Thromb. Hemost. – 2005. – **11**, N 1. – P. 55–61.
5. *Brazionis L., Rowley K., Jenkins A. et al.* // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. – 2008. – **28**, N 4. – P. 786–791.

6. Agren A., Kolmert T., Wiman B., Schulman S. // *Thromb. Res.* – 2007. – **119**, N 6. – P. 715–721.
7. Варецька Т. В., Лосева А. Л., Яценко В. І. // *Укр. біохім. журн.* – 1961. – **33**, № 5. – С. 657–666.
8. Варецька Т. В. // *Укр. біохім. журн.* – 1965. – **37**, № 2. – С. 194–206.
9. Wallen P., Wiman B. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1970. – **221**, N 1. – P. 20–30.
10. Laemmli U. K. // *Nature.* – 1970. – **227**, N 5259. – P. 680–685.
11. Mukherjee M., Sembhi K., Kakkar V. V. // *Blood Coagul. Fibrinolysis* – 1996. – **7**, N 4. – P. 491–496.
12. Кондратюк А. С., Юсова О. І., Гриненко Т. В. // *Лаб. діагностика.* – 2011. – **3**, № 57. – С. 3–9.
13. Hoylaerts M., Rijken D. C., Lijnen H. R., Collen D. // *J. Biol. Chem.* – 1982. – **257**, N 6. – P. 2912–2919.

Отримано 24.01.2013