

БЫСТРЫЙ СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММАРНОЙ, ФЕРМЕНТАТИВНОЙ И “НЕФЕРМЕНТАТИВНОЙ” ФИБРИНОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ КРОВИ

Г.К. Иванов, С.А. Градовский, В.В. Оленин

Республиканская клиническая больница № 1 (главрач — Г.П. Арсютов) Министерства здравоохранения Чувашский Республики, г. Чебоксары

Регуляция жидкого состояния крови зависит от множества факторов. Одним из наиболее важных среди них является плазминовая активность. В нормальных условиях из-за выраженных антиплазминовых свойств крови она проявляется слабо [11]. В настоящее время ее нередко определяют путем лизиса сгустка эуглобулиновой фракции плазмы. Однако все существующие для этого методы проводятся без учета влияния комплексных соединений гепарина на лизис сгустка крови. К тому же эуглобулиновая фракция содержит в значительном количестве и ингибиторы фибринолиза.

Экспериментальные исследования Б.А. Кудряшова и др. [4], М.А. Розенфельда и др. [6], Р.И. Литвинова и др. [5] позволили предположить существование второй противосвертывающей системы, основным эффектором которой является образование комплексных соединений гепарина с белками и гормонами крови. Они способны вызывать лизис фибринового сгустка, и данный процесс получил название, “неферментативный” фибринолиз. Доказан и факт образования комплекса *антитромбин-III-гепарин*, который способен ингибировать до 30% всего плазминового потенциала [13].

Мы предлагаем метод выявления спонтанной, ферментативной и “неферментативной” фибринолитической активности крови, который мы использовали при обследовании доноров, больных желчнокаменной болезнью (ЖКБ) и очаговыми поражениями печени (ОПП).

За основу взят способ быстрой оценки спонтанной фибринолитической активности крови, предложенный Н.А. Жуковой и С.С. Хнычевым [1]. Этим методом определяется освобождение эритроцитов из тромба в процессе лизиса сгустка крови: чем активнее лизис, тем больше эритроцитов выделяется в сыворотку. В основе предлагаемого нами метода лежит также измерение относительной величины оптической плотности гемолизата, но уже в трех пробах крови: в физиологическом растворе (суммарная фибринолитическая активность — СФА), в среде с ϵ -аминокапроновой кислотой (ЭАКК) — неферментативная фибринолитическая активность (НФА) и в присутствии 0,015% раствора протамина-сульфата — плазминовая фибринолитическая активность (ПФА).

Готовят 9 пробирок с растворами: в 1 и 2-ю пробирки набирают по 0,1 мл 0,85% раствора хлористого натрия, в 3 и 4-ю — по 0,1 мл 6% раствора ЭАКК, в 5 и 6-ю — по 0,1 мл рабочего

раствора протамина-сульфата, в 7-ю — 4 мл 0,04% раствора аммиака и 0,01 мл физиологического раствора, в 8-ю — 4 мл 0,04% раствора аммиака и 0,01 мл 6% раствора ЭАКК, в 9-ю — 4 мл 0,04% раствора аммиака и 0,01 мл рабочего раствора протамина-сульфата.

Кровь берут из вены без консерванта и сразу же выливают в заранее приготовленные пробирки с растворами: в 1, 2, 3, 4, 5, 6-ю — по 0,2 мл, а в 7, 8, 9-ю — по 0,02 мл крови. В 1, 2 и 7-й пробирках, содержащих раствор хлористого натрия, определяют СФА, в 3, 4 и 8-й, содержащих ЭАКК, — ПФА, а в 5, 6 и 9-й, содержащих протамина-сульфат, — НФА.

Пробы крови в 1, 2, 3, 4, 5, 6-й пробирках инкубируют при температуре 37°C в течение 3 часов, к ним приливают по 0,5 мл раствора хлористого натрия. Образовавшиеся после инкубации сгустки промывают физиологическим раствором, отжимают стеклянной палочкой и удаляют. К оставшейся после удаления сгустков жидкости для растворения эритроцитов и создания гомогенной массы добавляют по 3,5 мл 0,04% раствора аммиака. Рабочий раствор протамина-сульфата готовят на вероналовом буфере: к 1 мл раствора Михаэлиса приливают 0,015 мл 1% раствора протамина-сульфата. Для определения СФА содержимое проб крови в 1 и 2-й пробирках смешивают и измеряют оптическую плотность данной смеси против содержимого 7-й пробирки (на ФЭК-е в кювете размером 0,5 см; длина волны — 540 нм), в 3 и 4-й — против 8-й, в 5 и 6-й — против 9-й и производят расчет по формуле (в %):

$$\text{СФА} = \frac{\text{опт. пл. жидкости из проб 1 и 2}}{\text{опт. пл. жидкости из проб 7}} \cdot 10;$$

$$\text{НФА} = \frac{\text{опт. пл. жидкости из проб 3 и 4}}{\text{опт. пл. жидкости из проб 8}} \cdot 10;$$

$$\text{ПФА} = \frac{\text{опт. пл. жидкости из проб 5 и 6}}{\text{опт. пл. жидкости из проб 9}} \cdot 10.$$

С целью апробации метода мы провели исследования у 17 здоровых доноров и после статистической обработки методом Стьюдента вывели контрольные данные, а в последующем определили все фракции фибринолиза предложенным методом у 50 больных с желчнокаменной болезнью и у 15 — с очаговыми поражениями печени (см. табл.).

Известно, что протамин-сульфат связывает гепарин. Вызывая деионизацию, он осаждает гепарин в растворе. Кроме того, установлено, что

Результаты исследования проб крови на фибринолиз

Обследованные группы	СФА, %	НФА, %	ПФА, %
Доноры	16,3±0,5	11,5±0,6	18,7±0,9
Больные желчнокаменной болезнью	13,6±0,9**	10,1±0,7**	17,0±1,2**
очаговыми пора- жениями печени	8,4±0,7***	7,3±0,9***	8,5±0,9***

** $P < 0,02$, *** $P < 0,001$ — по сравнению с данными доноров.

протамин-сульфат является антагонистом тканевого и кровяного тромбопластина и тормозит локальный фибринолиз [10]. Он способен вызывать явления гипокоагуляции [3]. Согласно результатам исследований В.П. Скипетрова [7], 1—0,01% растворы протамина вызывают мгновенную агглютинацию тромбоцитов и тормозят фибринолитическую активность крови. Антигепариновая активность протамина, несущего положительный заряд, обусловлена образованием комплекса с отрицательно заряженной макромолекулой гепарина, в котором гликозаминогликан теряет способность подавлять свертывание крови, а присутствие плазмы ослабляет агрегацию стехиометрического гепарин-протаминового комплекса [9].

По нашим данным, при добавлении незначительного количества протамин-сульфата в пробы крови происходит увеличение оптической плотности гемолизата, что подтверждает усиление фибринолитической активности крови. Данная активация фибринолиза крови, как нам кажется, происходит вследствие освобождения плазмينا из гепаринового комплекса (гепарин—плазмин) вследствие связывания гепарина протамин-сульфатом. К тому же в присутствии протамин-сульфата гепариновые комплексы с другими белками и пептидами коагуляционного каскада, обладающие неферментативным фибринолитическим действием, теряют свою активность, а плазмин сохраняет ее. Это дает нам право полагать, что усиление фибринолитической активности крови в данном случае является ферментативным (плазминовым).

Известно, что хирургические вмешательства на печени и желчных протоках сопровождаются кровотечением, эмболизацией микроциркуляторного русла и тромбозом [2, 8]. Поэтому в клинической практике часто как во время операции,

так и в послеоперационном периоде возникает необходимость определения состояния фибринолитической системы крови. До сих пор основным таким методом является исследование ФАК эуглобулиновой фракции плазмы. Эта установка принята и Европейским комитетом по тромбозам [12]. Однако из-за вариаций состава эуглобулиновых фракций плазмы данный метод не вполне удовлетворяет клиницистов. Поэтому предложенный нами быстрый способ определения суммарного, ферментативного и “неферментативного” фибринолиза позволяет более полно выявлять степень их участия в фибринолизе крови и в необходимых случаях корректировать их нарушения у больных с желчнокаменной болезнью и очаговыми поражениями печени. Результаты исследования указывают на то, что при очаговых поражениях печени имеет место угнетение всех видов фибринолиза, а при желчнокаменной болезни — суммарного и “неферментативного” при сравнительно высокой плазминовой активности крови.

ЛИТЕРАТУРА

1. Балуда В.П., Баркаган З.С. Лабораторные методы исследования системы гемостаза. — Томск, 1980.
2. Журавлев В.А. Методы резекции и показания к ней при очаговых поражениях печени: Дисс. ... докт. мед. наук. — Киров, 1970.
3. Ефимов В.С.//Фармакол. и токсикол. — 1968. — № 5. — С. 601—604.
4. Кудряшов Б.А. Проблемы свертывания крови и тромбообразования. — М., 1960.
5. Литвинов Р.И., Слабнов Ю.Д., Зубаиров Д.М.// Вопр. мед. химии. — 1981. — Т. 27. — С. 478—481.
6. Розенфельд М.А., Ерзинкян К.Л., Пирузян Л.А.// Тезисы докладов II Всесоюзной конференции по спектроскопии биоматериалов. — Харьков, 1974.
7. Скипетров В.П.//Фармакол. и токсикол. — 1966. — № 2. — С. 188—192.
8. Титова М.И. Послеоперационные нарушения системы гемостаза: Автореф. дисс. ... докт. мед. наук. — М., 1993.
9. Шер А.И., Мазов М.Ю. и др.//Хим. фарм. журн. — 1988. — № 4. — С. 486—490.
10. Beller F., Nagele M.// Arch. Gynec. — 1956. — Bd. 188. — С. 123.
11. Clifton E.G.// J. Amer. Geriat. Soc. — 1958. — Vol. 6. — P. 118.
12. Thromb. Haemost. — 1984. — Vol. 52. — P. 96.
13. Teleforo P., Semeraro N. et al.// Thrombosis Res. — 1975. — Vol. 7 — P. 669—676.

Поступила 14.05.98.