

СССР—ГДР, Астрахань, 1988, 37—38. 4. Заславская Р. М. Суточные ритмы у больных сердечно-сосудистыми заболеваниями, М., Медицина, 1979. 5. Комаров Ф. И., Захаров Л. В., Лисовский В. А. Суточный ритм физиологических функций у здорового и больного человека. Л., 1966. 6. Руководство «Хронобиология и хрономедицина» под ред. акад. АМН СССР Ф. И. Комарова. М., Медицина, 1989. 7. Halberg J., Halberg F., Leach Ch. N. Chronobiologia. 1984, vol. XI, 3, 205—216. 8. Carandente F., Ahlgren A., Halberg F. Chronobiologia, 1984, vol. XI, 3, 189—203.

УДК 57.042.2:578.08

Х. П. БОЯДЖАН

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ α_2 -АНТИПЛАЗМИНА

В течение последних лет, проведенные исследования при помощи метода гельфильтрации, электрофорезы и др. методов показали, что в сыворотке, в плазме и в клеточном составе крови существуют 2 группы ингибиторов: антиплазмины, ингибирующие плазмин и антиактиваторы, ингибирующие активацию плазмина [1, 3, 4].

Неконтролируемая протеолиза может стать саморазрушающимся процессом. Внутрисосудистая протеолиза ограничивается несколькими протеазными ингибиторами, такими как α_1 -антитрипсин, α_2 -макроглобулин, α_1 -антигимотрипсин, интер- α -трипсин ингибитор, C_1 -инактиватор и α_2 -антиплазмин (а-АП).

До недавнего времени считалось, что главным и быстродействующим ингибитором плазмина является α_2 -макроглобулин.

В 1976 г. 4 группы ученых мира одновременно и независимо одна от другой доказали существование нового быстродействующего протеазного ингибитора— α_2 -антиплазмина (а-АП), который ингибирует плазмин за 1/10 секунды [5, 7, 10, 11].

Ингибитор является моноцепным гликопротеином, с весом тела 67 000, который мигрирует на электрофорезу как α_2 -глобулин. Молекула а-АП содержит 500 аминокислот [13]. Ингибитор синтезируется в печени [9, 10].

Существует множество методов исследований а-АП, но как и в остальных энзимах систем коагуляции и фибринолиза отсутствуют международные методы определения энзимной активности.

Известны иммунохимические методы определения антигенной концентрации и энзимные методы с синтетическими субстратами определения функциональной активности энзима. Все они трудно приложимы в лабораториях окружного типа.

Предлагаем доступный фибринолитический метод определения активности а-АП [2].

Принцип—исследованная сыворотка инкубируется с плазмином. Остаточная активность плазмина определяется субстратом фибриноге-

на, коагулированного при помощи тромбина. Определяется время лизиса коагулума, которое соответствует плазминной активности. Чем выше плазминная активность, тем больше ингибируется плазмин, тем медленнее наступает лизис коагулума.

Реактивы: плазмин, говяжья плазма, стрептаза (Bohringwerke) 5000 Е флакон, тромбин (Hoffman Laroche) 5100 НИХ Е, барбитал-ацетатен буфер с рН 7,4. Используется сыворотка больного. Берется кровь утром натощак, по возможности без травмирования вены. Кровь ставят на час-два в термостат. Сыворотка отделяется центрифугированием крови 3000 об/15 мин.

1. Получение плазмينا.

0,5 мл сыворотки, взятой у более 20 здоровых людей, разбавляется 4,9 мл барбитал-ацетатным буфером—рН 7,4, к которой прибавляется 1,25 мл стрептазы 1000 Е/мл, оставляется на 15 мин, при комнатной температуре, после чего сохраняется при 18°C, а во время работы ставится в сосуд со льдом.

С помощью стрептазы, плазминоген из собранной сыворотки превращается в плазмин, который является устойчивым, прочным во времени. Плазмин сохраняет свою активность в холодильнике при 18°C в продолжении 2 недель, но при серийной работе израсходуется почти целое количество плазминного раствора (5 мл).

Состав барбитал-ацетатного буфера.

1. Реактив барбитал-ацетат.

Ацетат натрий 3 Н ₂ O	9.714 г
Барбитал натрий	14,714
Дистиллированная вода (кипяченная и охлажденная)	500 мл

2. Основной раствор.

Реактив барбитал-ацетат	5 мл
НСI н/10	5 мл
NaCl 0,85%	2 мл
Дистиллированная вода	15 мл

3. Буферный раствор.

Основной раствор	1 часть
NaCl 0,85%	4 части.

II. Ход работы.

Видаловы пробирки предварительно темперируются (на каждого больного по три в них капают 0,02 мл, сыворотки, добавляют 0,05 мл плазминного раствора, инкубируется 30 сек, позже капают последовательно 0,025 мл говяжьей плазмы и 0,025 мл тромбинового раствора. Образуется фибриновый коагулум. С помощью платинового ушка определяется время лизиса коагулума.

а-АП, как основной и быстродействующий ингибитор плазмينا, ингибирует плазмин. От концентрации а-АП в сыворотке больного (здо-

рового) человека зависит быстрота лизиса коагулума, чем выше активность а-АП в исследуемой сыворотке, тем медленнее наступает лизис коагулума, в связи с меньшим количеством остаточного ингибируемого плазмينا. Для контрольного опыта, параллельно с плазмин-сывороткой, при построении стандартной кривой используется плазмин-буферный раствор.

III. Построение стандартной кривой.

Ежедневно строим стандартную кривую с помощью серум здоровых лиц с концентрацией сыворотки—800% (0,16 мл сыворотки), 400% (0,08 мл), 200% (0,04 мл), 100% (0,02 мл) сыворотки и 50, 25% и т. д. в соответствии с разбавленной сывороткой. Параллельно этому подготавливаются пробы плазменно-буферного раствора, вместо плазмин-сывороточного р-ра.

IV. Вычисление.

Стандартная кривая наносится на миллиметровую бумагу с абсциссой 35 см и ординатой—25 см. С помощью стандартной кривой вычисляется активность а-АП в исследуемой сыворотке в % активности нормы следующим способом—от стоимости плазмин-сыворотки отнимается стоимость плазмин-буфера, или *плазмин-сыворотки—плазмин буфера—% активности а-АП*. Схематически опыт представлен на таблице 1.

Таблица 1

	Смешанный серум, мл (серум здорового)	Серум больного	Буфер мл	Плазмин, мл	Говяжья плазма мл	Тромбин, мл
Стандартная кривая	0,16	—	—	0,05	0,025	0,025
	0,08	—	—	•	•	•
	0,04	—	—	•	•	•
	0,02	—	—	•	•	•
	—	—	—	—	—	—
Контроль	—	—	0,16	0,05	0,025	0,025
	—	—	0,08	•	•	•
	—	—	0,04	•	•	•
	—	—	0,02	•	•	•
	—	—	—	—	—	—
Опыт (тест)	—	0,02	—	0,05	0,025	0,025
Контроль	—	—	0,02	0,05	0,025	0,025

На стандартной кривой видно (рис. 1), что чем больше количество сыворотки (т. е. чем выше антиплазминовая активность), тем больше разница между временем лизиса коагулума от плазмин-сыворотки и плазмин буфера. При постепенном уменьшении количества сыворотки, т. е. антиплазмينا, уменьшается граница разниц до точки пересечения двух кривых. В этот момент время лизиса в двух опытах выравнивается, в этой точке стоимость а-АП выравнивается—0%.

Необходимо отметить, что для этого нужна строгая прецизность при построении стандартной кривой, от которой зависит достоверность опытов целого дня.

Для большой точности необходимо исследование каждой сыворотки в отдельности (не менее 3 раз), для окончательного результата берется средняя арифметическая стоимость трех опытов. Необходимо отметить, что стандартная кривая неодинакова в разные дни исследования: это получается вследствие влияния атмосферных факторов на биопродукты, с помощью которых проводится опыт. Поэтому стандартные кривые строятся ежедневно.

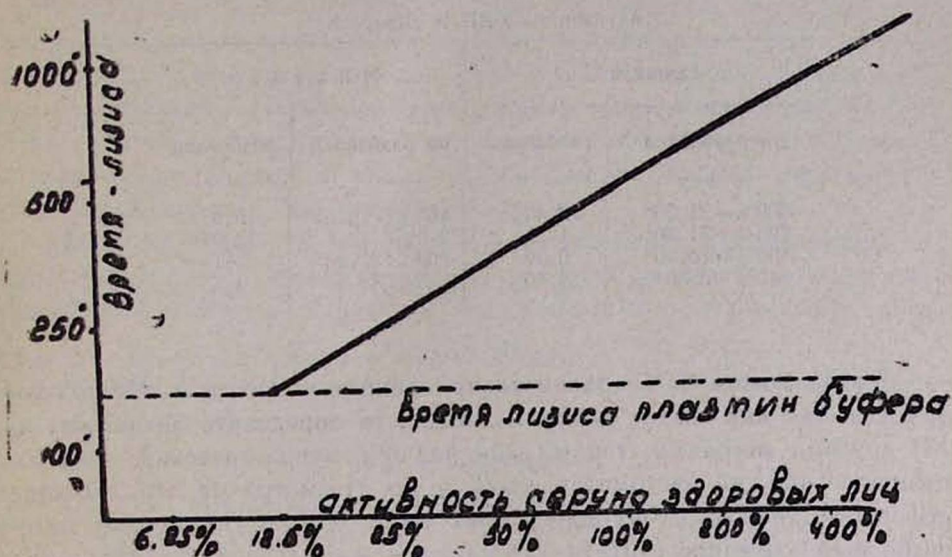


Рис. 1. Стандартная кривая α_2 антиплазмина.

Разница между временем лизиса плазмин-буфера и сывороткой является минимум 1 мин и 50 сек и она различна в разные дни; очень часто достигает до 3—4 минут и т. д. При высокой активности а-АП (чаще всего наблюдается при вирусном гепатите) эта разница ярко выражена и не дает основания сомневаться в результате исследования (рис. 1).

Стрептаза, говяжья плазма и тромбин разводятся барбитал-ацетатным буфером с pH 7,4. Во время работы все реактивы сохраняются на льду. Необходимо работать с идеально чистыми пробирками, без следов тромбина, который может отразиться на конечном результате.

Референтные стоимости а-АП исследованы у 137 здоровых лиц: $\bar{X}$ —98,92; SD—7,11, 2SD—14,22, $X \pm 2SD$ —85—116%. Эти результаты близки результатам, о которых сообщалось еще в 1977 А. А. Т. Nilsson. При работе с трипептидными синтетическими субстратами они нашли референтную активность а-АП—84—116% [12]. Collen D. и с. 1979, также сообщают референтные стоимости при работе с хромогенными субстратами—79—117% [8].

Воспроизводимость.

$n=33$, $\bar{x}=108,69$, $SD=5,39$, $CV=4,96\%$.

Точность.

По причине отсутствия контрольных сывороток с объявленной стоимостью а-АП. точность метода исследована с помощью определения активности энзима в сыворотке с высокой и низкой активностью с разбавлением и без разбавления сыворотки. (В этих условиях полученные стоимости активности а-АП близки и приемлемы (табл. 2).

Таблица 2

Активность а-АП в сыворотке

Высокая		Низкая	
не разбавлен	разбавлен	не разбавлен	разбавлен
400%—21,50*	22,40*	400%—16,55*	16,35*
200%—11,50*	11,55*	200%—12,1*	12,05*
100%—10,00*	9,30*	100%—7,20*	7,15*
50%—6,50*	6,40*	50%—4,5*	4,50*

Мы не можем дать сравнительные данные точности и воспроизводимости, так как мы не имеем возможности определить активность а-АП другими методами, такими как радио-иммунологический, электро-иммунологический, фотометрический и др. Несмотря на это, сходство референтных стоимостей, полученных нами и вышеуказанными авторами дает основание считать, что наш метод достоверен и имеет хорошую точность и воспроизводимость.

Преимущества метода.

1. Сравнительно простая техника.
2. Определяется функциональная активность сыворотки, а не антигенная концентрация.
3. Не требуется специальная аппаратура, кроме термостатической ванны и хронометра.
4. Работа проводится с неразбавленной сывороткой, при которой сохраняются физиологические соотношения между ингибиторами и активаторами сыворотки.
5. Имеет хорошую воспроизводимость в серии— $CV=4,69\%$.
6. Имеет удовлетворительную точность.

Недостатки метода.

1. Капризный метод, как все методы в гемостазеологии, при которых требуются биопродукты, на которые влияют температура, влажность воздуха, атмосферное давление и др. факторы.
2. При ручном определении лизы коагулума, не исключены ошиб-

М. Медицина*, 1982, 4. Aoki N. and Harpel P. C. Seminar in Thrombosis and Hemostasis 1984, 10, 1, 24—41. 5. Bagge L., Jacobsson H., Wallin R. et al. Forensic Sci., 1976, 7, 83. 6. Eoyadjian H. P. IX International Congress on Thrombosis, Jerusalem, 1986, 2, VI. 7. Collen D. Eur. J. Biochem., 1976, 69:209—216. 8. Collen D., Edy J. and Wiman B. Chromogenic Peptide Substrates. 1979, 238—244. 9. Fair D. S. and Plow E. F. J. Clin. and Lab. ed., 1983, 101, 3, 372—384. 10. Moroi M. and Aoki N. J. Biol. Chem., 1976, 251, 5956—5965. 11. Aoki N. and Collen D. J. Biochem. J., 1976, 159:545—553. 12. Teger N., Friberger P. and Gryzander B. J. Clin. Lab. Invest., 1977, 37:403—409. 13. Wiman B. and Collen D. J. Biol. Chem., 1979, 254:9192—9297.

УДК 616.127—005.8:611.1

С. В. ЦЕРЦВАДЗЕ, П. К. ХАДЖИДИС, Э. О. ЧИЧИНАДЗЕ

ИНСТРУМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ МАЛОГО КРУГА КРОВООБРАЩЕНИЯ У БОЛЬНЫХ ОСТРЫМ ИНФАРКТОМ МИОКАРДА

Одним из распространенных и тяжелых осложнений при остром инфаркте миокарда (ОИМ) является сердечная недостаточность (СН), которая отличается от хронической как по темпам развития, так и по результатам лечения и нередко не имеет своего клинического выражения [2, 6, 7]. Поэтому естественно стремление использовать для выявления СН инструментальные методы исследования. Из них наибольшее распространение при ОИМ приобрел метод мониторингирования основных параметров центральной гемодинамики (ЦГ) с помощью плавающих катетеров Swan-Janz [3, 4]. Однако зондирование связано с риском и травматичностью, что ограничивает возможности его длительного применения [8], поэтому особое внимание приобретает разработка неинвазивных атравматичных методов исследования, позволяющих проводить наблюдения в динамике [1, 9].

Целью работы было изучение возможности применения комплекса неинвазивных методов оценки состояния малого круга кровообращения (МКК) для раннего выяснения СН у больных ОИМ.

Материал и методы исследования. Исследовано 80 больных ОИМ (68 мужчин и 12 женщин) в возрасте от 33 до 67 лет в первые сутки от начала заболевания. Больные были разделены на две группы: I—48 больных без клинических проявлений СН и II—32 больных с клиническими признаками СН.

Исследование ЦГ проводили методом радиокардиографии, с использованием в качестве индикатора ¹³¹I-альбумина. Среднее давление в легочной артерии (СДЛА) рассчитывали по формуле, предложенной У. Pinto [12]. Автор, используя метод радиокардиографии, у 10 здоровых и 43 больных, страдающих различными пороками сердца, устано-