

УДК 615.37+616—087.37

Н. Л. АСЛАНЯН, В. М. ШУХЯН

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФИБРИНОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ
ЭУГЛОБУЛИНОВОЙ ФРАКЦИИ ПЛАЗМЫ
И АНТИФИБРИНОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ
СЫВОРОТКИ КРОВИ

В большинстве методов одновременного определения фибринолитической и антифибринолитической активности крови используется дефицитный реактив—стрептокиназа. Н. А. Шилко [4] предлагает метод без применения стрептокиназы. При этом методе лизис сгустка в пробе с антифибринолизинном происходит за 20—24 ч., создавая практические трудности. Кроме того, результаты исследования антифибринолитической активности зависят от величины фибринолитической активности эуглобулиновой фракции испытуемой крови. Для устранения этого недостатка Ю. П. Никитин и Ю. И. Баскакова [3] сыворотку разводят 10-кратно и в качестве субстрата используют раствор эуглобулинов, полученных из плазмы крови людей или собак-доноров. Время лизиса по этому методу составляет 200—300 мин. Этот метод удобен для практического выполнения, однако неизвестно, когда происходит лизис сгустка, и приходится все время следить за лизисом.

М. А. Котовщикова, В. Т. Плешаков [2] с целью исследования антифибринолитической активности крови определяют фибринолитическую активность эуглобулиновой фракции трупной крови при наличии стандартного фибриногена в двух пробах, в одну из которых вносят испытуемую сыворотку. Время лизиса сгустка по этому методу в пробе с сывороткой короче, чем в вышеотмеченных методах, однако наблюдаемые колебания величины фибринолитической активности трупной крови исключают стандартные условия. Кроме того, трупная кровь не всегда доступна.

Для устранения недостатка перечисленных методов мы определяли концентрацию фибрина по цветной реакции с реактивом Фолина-Чикальто в трех пробах: 1) в пробе, содержащей эуглобулины, хлористый кальций и инкубированной в течение 1 ч. в термостате при 37°C; 2) в пробе, содержащей эуглобулины, хлористый кальций и инкубированной в течение 2 ч. при тех же условиях; 3) в пробе, содержащей эуглобулины, хлористый кальций, исследуемую сыворотку и инкубированной в течение 2 ч. при тех же условиях.

Срок инкубации первой пробы в течение 1 ч. был установлен нами при исследовании времени лизиса сгустка эуглобулиновой фракции крови 15 больных с кардиотонзиллярным синдромом. Результаты исследования показали (табл. 1), что количество фибрина в течение 1 ч. прогрессивно нарастает и только с 60-й мин. уменьшается, причем в первые 20 мин. (т. е. с 60 до 80 мин.) инкубации наблюдается резкое падение количества фибрина, а в дальнейшем оно является функцией времени.

Таблица 1
Изменение концентрации фибрина (в единицах оптической плотности) в период инкубации в течение 2 ч. при 37°C

Время инкубации в мин.	Концентрация фибрина в единицах оптической плотности, умноженных на 1000	
	M	±m
20	278	17,4
40	309	25,7
60	324	17,0
80	219	12,9
100	197	10,5
120	169	10,7

Нами применялись следующие реактивы: 1—1%-ый раствор уксусной кислоты (pH—5,2); для этого 1 мл уксусной кислоты удельным весом 1,05 (99,9 г уксусной кислоты в 100 г) развести дистиллированной водой до 100 мл в мерной колбе; 2—физиологический раствор, подщелоченный бурой до pH 7,6; для этого 1 г $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (бура) растворяют в 1000 мл 0,85%-ного раствора поваренной соли (NaCl); 3—0,277%-ный раствор CaCl_2 ; 4—0,1 N NaOH ; 5—12,5%-ный раствор безводного Na_2CO_3 ; 6—0,01 молярный раствор CuSO_4 ; для этого 1600 мг безводного CuSO_4 довести до 1 л дистиллированной водой в мерной колбе; 7—3,8%-ный раствор трехзамещенного лимоннокислого натрия; 8—1,34%-ный раствор щавелевокислого натрия или аммония; 9—реактив Фолина-Чикальто. В колбе с обратным холодильником в течение 10 ч. кипятят: 100 г $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} + 25$ г $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} + 700$ мл дистиллированной воды + 50 мл 85%-ного раствора ортофосфорной кислоты + 100 мл концентрированной HCl . В конце кипячения добавляют 150 г сульфата лития (LiSO_4), 50 мл дистиллированной воды и несколько капель жидкого брома, кипятят 10—15 мин. без холодильника. Раствор охлаждают при комнатной температуре, объем его доводят до 1 л прибавлением дистиллированной воды в мерной колбе и фильтруют. Желтый раствор хранят в склянке, защищенной от попадания пыли и загрязнений.

Для анализа необходимо 1,5 мл цитратной или оксалатной плазмы. Кровь берется из локтевой вены сухой стерильной иглой; 4,5 мл крови наливается в пробирку, куда заранее наливается 0,5 мл 3,8%-ного раствора лимоннокислого натрия или 1,34%-ного раствора щавелевокислого натрия или аммония, и хорошо смешивается. В другую сухую пробирку

ку наливается 1 мл крови для получения сыворотки. Первая пробирка центрифугируется в течение 10 мин. при 1500 об/мин., вторая выдерживается при комнатной температуре от 45 мин. до 1 ч.

В три чистые пробирки вносится по 0,5 мл цитратной или оксалатной плазмы, затем добавляется по 9,5 мл дистиллированной воды и по 0,15 мл 1%-ного раствора уксусной кислоты. Пробирки опускаются в воду со льдом на 30 мин. или ставятся в холодильник при 4°C, после чего их содержание центрифугируется при 1500 об/мин. в течение 10 мин. Жидкость над осадками удаляется и пробирки на 1 мин. опрокидываются на фильтровальную бумагу. Осадок растворяется с помощью тонкой стеклянной палочки в 5 мл физиологического раствора, подщелоченного бурой до pH 7,6. После растворения осадков в третью пробирку добавляется 0,1 мл разведенной 1:9 физиологическим раствором сыворотки той же крови. Затем в трех пробах добавляется по 0,5 мл 0,277%-ного раствора хлористого кальция. Содержимое пробирок перемешивается стеклянной палочкой. Все три пробирки помещаются в термостат, и первая проба инкубируется в течение 1 ч., вторая и третья — 2 ч. при 37°C.

После инкубации все пробирки помещаются в холодильник до продолжения опыта. Заранее в холодильник помещаются также три пробирки, в каждую из которых наливают по 8—10 мл физиологического раствора хлористого натрия.

Во время инкубации в термостате на палочках образуется сгусток фибрина. Палочки со сгустками вынимаются и промываются в охлажденном физиологическом растворе (0,85%-ный раствор хлористого натрия), присушиваются (отжимают жидкость на фильтровальной бумаге), переносятся в мерные пробирки емкостью 10 мл, куда заранее наливается 2 мл 0,1 нормального раствора NaOH. Пробирки ставятся на 5—10 мин. в кипящую водяную баню до растворения сгустка. Затем пробы можно выдерживать в холодильнике в течение ночи. Таким образом, опыт можно продолжать сразу после растворения сгустка или после стояния в холодильнике на следующий день. В каждую пробирку добавляется по 6 мл 12,5%-ного раствора Na_2CO_3 и 1 мл 0,01 молярного раствора CuSO_4 , затем перемешивается и через 10 мин. добавляется 1 мл реактива Фолина-Чикальто, разбавленного 1:2 дистиллированной водой. Через 30—60 мин. определяется оптическая плотность раствора в фотоэлектроколориметре с красным светофильтром в 5-миллиметровой кювете. Контролем служит раствор, содержащий 2 мл 0,1 нормального раствора NaOH, 6 мл 12,5%-ного раствора Na_2CO_3 , 1 мл 0,01 молярного раствора CuSO_4 , 1 мл реактива Фолина-Чикальто, разбавленного 1:2.

Фибринолитическая активность (ФА) зоглобулиновой фракции плазмы крови определяется по формуле:

$$\text{ФА} = \frac{(\text{оптическая плотность (о. п.) I пробы} - \text{о. п. II пробы})}{\text{о. п. I пробы}} \cdot 100$$

Для определения антифибринолитической активности (АФА) сначала определяется фибринолитическая активность третьей пробы по формуле:

$$\text{ФА III пробы} = \frac{(\text{о. п. I пробы} - \text{о. п. III пробы})}{\text{о. п. I пробы}} \cdot 100$$

Затем определяется антифибринолитическая активность сыворотки по формуле:

$$\text{АФА} = \frac{(\text{ФА} - \text{ФА III пробы})}{\text{ФА}} \cdot 100$$

Например: оптическая плотность первой пробы равняется 0,160, второй—0,098, третьей—0,115.

$$\text{ФА} = \frac{(0,160 - 0,098)}{0,160} \cdot 100 = 38,7\%$$

$$\text{ФА III пробы} = \frac{(0,160 - 0,115)}{0,160} \cdot 100 = 28,1\%$$

$$\text{АФА} = \frac{(38,7 - 28,1)}{38,7} \cdot 100 = 27,39\%$$

Антифибринолитическая активность, рассчитанная по описанной формуле, указывает, на сколько процентов уменьшается фибринолитическая активность второй пробы, если ее принимать за 100%. Если ФА равняется нулю или отрицательной цифре, тогда расчет по формуле для определения АФА теряет смысл.

При исследовании крови 25 здоровых первичных доноров нами были получены следующие результаты. Фибринолитическая активность эуглобулиновой фракции плазмы (ФА) такова: $M = 37,2 \pm m 3,14\%$, антифибринолитическая активность сыворотки (АФА)— $13,2 \pm 3,2\%$.

У 80 больных гипертонической болезнью мы определяли антифибринолитическую активность сыворотки одновременно по описанному нами методу и по методу А. И. Грицюка [1]. Результаты показывают определенную прямую корреляцию между данными, полученными этими двумя методами. Коэффициент корреляции при этом равнялся $+0,69$ ($P < 0,01$). Кроме того, у 40 больных определяли фибринолитическую активность эуглобулиновой фракции одновременно по нашему методу и Е. Ковальскому с соавторами [5]. Коэффициент корреляции равнялся $+0,60$ ($P < 0,01$).

Ն. Լ. ԱՍԼԱՆՅԱՆ, Վ. Մ. ՇՈՒԽՅԱՆ

ԱՐՅԱՆ ՊԼԱՉՄԱՅԻ ԷՈՒԳԼՈՐՈՒԼԻՆԱՅԻՆ ՖՐԱԿՑԻԱՅԻ ՖԻԲՐԻՆՈԼԻՏԻԿ
ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ԵՎ ՇԻՃՈՒԿԻ ՀԱԿԱՏԻԲՐԻՆՈԼԻՏԻԿ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ
ՈՐՈՇՄԱՆ ՄԵԹՈԴ

Ա մ փ ո փ ու մ

Առաջարկվում է արյան պլազմայի էուզլորուլինային ֆրակցիայի ֆիբրինո-
լիտիկ ակտիվության և շիճուկի հակաֆիբրինոլիտիկ ակտիվության որոշման
նոր մեթոդ, որի սկզբունքն է ֆիբրինի քանակի որոշումը Ֆոլին-Չիկալտոյի
զուգավորման ռեակցիայի միջոցով՝ տեմպերատուրա 37°-ում ինկուբացիայի
ենթարկելուց հետո, արյան պլազմայի էուզլորուլինային ֆրակցիայում, առանց
շիճուկ ավելացնելու և շիճուկ ավելացնելուց հետո:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Грицюк А. И. Лабораторное дело, 1965, 8, стр. 484.
2. Котовщикова М. А., Плешаков В. Т. Лабораторное дело, 1968, 12, стр. 715.
3. Никитин Ю. П., Баскакова Ю. И. Лабораторное дело, 1967, 11, стр. 672.
4. Шилко Н. А. Лабораторное дело, 1966, 5, стр. 266.
5. Kowalski E., Kopec M., Niewiarowski S. J. Clin, Path. 1959, 12, 215.