

Визначення вмісту фібриногену в плазмі крові людини за допомогою тромбіноподібного ферменту анцистрону-Н та аналіз стану гемостазу при наявності інгібіторів зсідання крові

В статтю проанализированы выявленные при исследовании состояния гемостаза практически здоровых и больных гипертонической болезнью людей пожилого и старческого возраста случаи несвертывания или только частичного свертывания фибриногена плазмы крови под действием тромбина. Показано, что предложенный метод определения фибриногена в плазме крови с использованием тромбиноподобного фермента анцистрона-Н, выделенного из яда змей вида щитомордник обыкновенный, позволяет установить уровень фибриногена в плазме крови даже в случаях, связанных с наличием в плазме крови циркулирующих ингибиторов свертывания. Определению не мешает внесение экзогенного гепарина, в том числе и низкомолекулярных гепаринов типа фраксипарина.

Вступ

Дані останніх років свідчать про вплив підвищеного вмісту фібриногену на розвиток ішемічної хвороби серця, інсульту, артеріальної гіпертензії, атеросклерозу, патології периферичних судин [12, 13]. Підвищення вмісту фібриногену в крові значно збільшує ризик тромботворення за умов росту злоякісних новоутворень, сприяє посиленню метастазування пухлин [10]. За даними ряду авторів фібриноген є статистично вірогідним фактором ризику серцево-судинних захворювань [12].

При загрозі та розвитку тромботичних станів, внутрисудинному зсіданні крові, за умов проведення еферентної терапії застосовується гепарин [2, 5, 8, 16]. В останні роки в клінічній закордонній практиці переважно застосовують препарати гепарину з низькою молекулярною масою (Fragiparin, Calciparin, Fragmin), які позбавлені більшості побічних ефектів гепарину і мають достатньо високу антикоагулянтну активність. Проте, в умовах гепаринотерапії визначення вмісту фібриногену в плазмі крові за допомогою традиційних методів викликає труднощі. Для діагностичних досліджень стану системи гемостазу в умовах гепаринотерапії поширені тести, які засновані на використанні тромбіноподібних ферментів, видалених з отруту змій. Такі ферменти мають специфічність, відмінну від специфічності звичайних факторів системи зсідання, вони не активують XIII фактор зсідання крові, не викликають ретракції згустків, активність їх не пригнічується антитромбіном III в присутності гепарину [14]. Для цієї мети з отруту деяких змій ряд закордонних фірм виробляє такі ферментні препарати: Arvin, Atroxin, Reptilase та ін. В нашій країні подібні препарати не виробляються. Визначення вмісту фібриногену може бути ускладнене в зв'язку не тільки із застосуванням гепарину, але й з деякими станами гемостазу, обумовленими порушенням зсідання крові, а саме накопиченням інгібіторів зсідання крові, природу яких важко з'ясувати [3, 7].

У зв'язку з цим метою нашого дослідження було виявлення особливостей визначення вмісту фібриногену новим, запропонованим нами методом в плазмі крові в присутності гепарину та інгібіторів зсідання крові, а також проведення поглибленого аналізу стану гемостазу, по-

в'язаного з наявністю цих інгібіторів. Застосований нами метод базується на використанні анцистрону-Н — тромбіноподібного ферменту з отрути щитомордника звичайного (*Agkistrodon halys halys*), видаленого та охарактеризованого нами раніше (авторське свідоцтво № 1476649). Препарат анцистрон-Н за своїми властивостями є аналогічним вищевказаним ферментним препаратам з отрут тропічних змій.

Методика

Обстежено 190 осіб похилого та старечого віку (20 практично здорових та 170 хворих на гіпертонічну хворобу). Кров брали пункцією ліктьової вени натщесерце між 8 і 10 год ранку і негайно змішували з 3,8 %-вим розчином лимоникислої натру у такій пропорції: 9 частин крові : 1 частина консерванту. Після перемішування кров центрифугували у пластиковій пробірці на протязі 20 хв при частоті обертів 3000 хв^{-1} , одержану плазму видаляли. Для визначення використовували тільки свіжеотриману плазму, хоча в деяких випадках можливо досліджувати зразки замороженої плазми. Коагулограма вміщувала визначення вмісту фібриногену з застосуванням громбіну [1], вмісту антитромбіну III [6], продуктів розщеплення фібрину й фібриногену [4], протромбіновий індекс плазми (ПІП) [9], тромбіновий час [4, 9], активований частковий тромбoplastиновий час (АЧТЧ) [4, 7, 9], виявлення циркулюючих протизсідуючих агентів та дефіциту вмісту і активності факторів зсідання [7].

Визначення фібриногену за допомогою запропонованого нами методу виконували таким чином. В скляну пробірку ($12 \times 1 \text{ см}$) вносили 0,2 мл досліджуваної плазми та 1,7 мл фосфатного буфера (0,06 моль/л, рН 7,0). В суміш додавали 0,1 мл анцистрона-Н у концентрації 5,0 НН од/мл, суміш знову ретельно перемішували скляною паличкою з шорсткуватою поверхнею і пробірки ставили в термостат (37°C), залишаючи паличку в пробірці. Оскільки анцистрон-Н не впливає на фактор XIII, додавати моноіодоцтову кислоту, яка попереджує активацію фактора XIII, не потрібно. Після 30 хв інкубації утворений згусток фібрину виймали шляхом намотування на паличку і віджимали рідину об стінки пробірки. Далі віджати згусток, не знімаючи з палички, декілька разів промивали в холодному розчині NaCl (0,15 моль/л), усуваючи рідину з поверхні згустка фільтрувальним папіром. Згусток розчиняли в 5 мл 1,5 %-ної оцтової кислоти. Концентрацію білка в одержаному розчині визначали спектрофотометрично, вимірюючи поглинання при довжині хвилі 280 та 320 нм (поглинання при 320 нм визначається для розрахунку поправки на мутність розчину). Вміст фібриногену в досліджуваному зразку розраховували за такою формулою:

$$\Phi = [(E_{280} - E_{320}) \times 255] / 15,06,$$

де Φ — концентрація фібриногену в плазмі (г/л); $(E_{280} - E_{320})$ — різниця між поглинанням при довжині хвилі 280 та 320 нм; 255 — коефіцієнт для перерахунку вмісту фібриногену в досліджуваному об'ємі зразка на його концентрацію в плазмі, 15,067 — коефіцієнт екстинкції поглинання при довжині хвилі 280 нм 1 %-вого розчину фібрину в кислому середовищі.

З метою виявлення можливостей використання запропонованого нами методу для визначення вмісту фібриногену в плазмі крові, яка містить значну кількість гепарину (з розрахунку 40 000 од на одноразове введення) та фраксіпарину (0,3 мл на одноразове введення, що дорівнює 3,1 анти-Ха од.), були проведені порівняльні дослідження.

Результати та їх обговорення

У 171 обстеженої особи (90 %) вміст фібриногену у плазмі крові визначений тромбіновим методом [1] і запропонованим нами методом, збігався з літературними даними [2]. У 10 % обстежених осіб (17 хворих і 2 практично здорових) при проведенні тесту визначення

вмісту фібриногену за допомогою тромбіну [1] була виявлена нездатність зсідання плазми або дуже низький вміст фібриногену (таблиця). При визначенні фібриногену у плазмі крові цих осіб за допомогою нашого методу з використанням анцистрона-Н виявили, що отримані значення його концентрації дорівнюють вже відомим з літератури [2].

Таким чином, особливістю запропонованого нами методу є можливість уточнення вмісту фібриногену при ускладненнях його визначення за допомогою тромбіну.

В літературі ми не знайшли пояснення випадків нездатності зсідання або тільки часткового зсідання *in vitro* фібриногену плазми крові під дією тромбіну. Ми припустили, що пояснення виявленого феномену міститься в наявності інгібіторів зсідання. Для того, щоб з'ясувати наше припущення, детально вивчили стан гемостазу цих осіб. Результати показали зниження концентрації у крові антитромбіну III, подовження АЧТЧ в 1,5—6 разів, тенденцію до зниження ППІ (див. таблицю). В більшості випадків тромбіновий час зсідання плазми крові був подовжений. Значний вміст продуктів розщеплення фібрину й фібриногену при цьому не спостерігався. АЧТЧ та протромбіновий час зсідання є важливими скрінінг-тестами дослідження системи гемостазу [9, 15], їх порушення свідчать про відхилення у внутрішньому та загальному шляхах зсідання, зокрема, про дефіцит в плазмі факторів зсідання (VIII, IX, XI, XII) та недостатню кількість факторів зовнішнього шляху зсідання (II, VII, X) або наявність в плазмі крові циркулюючих інгібіторів зсідання. Для того, щоб розрізнити, яка причина викликає подовження АЧТЧ, в плазму крові хворих вносили у рівних частинах стандартну донорську плазму. В цьому випадку незмінність АЧТЧ свідчить про наявність циркулюючих протизсідуючих агентів, тоді як нормалізація часу зсідання в тесті АЧТЧ свідчить про дефіцит факторів зсідання [7]. У вивчаємих нами прикладах ми спостерігали незмінність часу зсідання в тесті АЧТЧ при додаванні донорської плазми, що підтверджує наше припущення про наявність інгібіторів зсідання.

Відомо, що зсідання крові контролюється складною системою інгібіторів перетворення протромбіну в тромбін, дії тромбіну на фібрино-

Прокоагулянтна ланка гемостазу у випадках зниження зсідання фібриногену під дією тромбіну

Порядковий номер проби крові	Вміст фібриногену, в плазмі крові, г/л		Відносний вміст антитромбіну III, %	Протромбіновий індекс плазми, %	Активованій частковий тромбопластичний час*, с
	при додаванні тромбіну	при додаванні анцистрону-Н			
1-а проба	1,35	3,55	82	100	73
2-а проба	1,69	2,45	95	113	100
3-я проба	—	1,77	90	100	95
4-а проба	1,78	2,28	88	88	75
5-а проба	1,18	2,37	92	93	73
6-а проба	—	2,54	100	100	70
7-а проба	—	3,3	75	71	240
8-а проба	—	2,4	80	88	80
9-а проба	1,27	2,1	70	89	150
10-а проба	1,26	2,62	86	63	300
11-а проба	—	2,2	100	42	240
12-а проба	1,80	2,45	90	85	62
13-а проба	1,69	2,45	105	100	90
14-а проба	1,27	2,54	80	83	150
15-а проба	—	3,38	95	100	73
16-а проба	1,52	2,41	97	93	80
17-а проба	1,70	2,47	70	50	260
18-а проба	1,53	3,64	93	45	300
19-а проба	1,4	3,52	83	70	67

Примітки: риска в цій таблиці означає, що визначення вмісту фібриногену традиційним методом було неможливим; * контрольний час складає 55 с.

ген або на самозборку фібрину [3]. Визначено, що у практично здорових та хворих гіпертонічною хворобою осіб похилого та старечого віку може спостерігатися активність інгібіторів зсідання, не пов'язана з підвищеним рівнем антитромбіна III і продуктів розщеплення фібрину й фібриногену, що може ускладнювати визначення вмісту фібриногену в плазмі крові цього контингенту за допомогою тромбіну. Тому ми вважаємо доцільним використання у таких ситуаціях запропонованого нами методу визначення концентрації фібриногену в плазмі крові за допомогою анцистрону-Н.

Для визначення фібриногену в плазмі крові, яка містить гепарин, може бути використаний тромбін, але в цьому випадку потрібно вносити в плазму протамінсульфат. Препарати протамінсульфату випускаються різними фірмами, і тому можуть розрізнятися за гепаринзв'язуючою активністю. Окрім того, операція внесення в плазму додаткової речовини сама по собі також ускладнює тест. В результаті, стандартизація тесту теж ускладнюється. Ми пропонуємо визначати вміст фібриногену в плазмі при гепаринотерапії, в тому числі при застосуванні низькомолекулярних гепаринів типу фраксипарину, з використанням ферментного препарату анцистрона-Н. Вміст (г/л) фібриногену в плазмі крові, визначений у донорів за допомогою традиційного тромбінового методу [1] та нового, анцистронового методу, у порівнянні має такий вигляд:

Тромбіновий метод (10 визначень)	—2,82 г/л±0,07 г/л
Метод з додаванням анцистрону-Н:	
без гепарину (10 визначень)	—2,80 г/л±0,08 г/л
з гепарином; 40 000 од (10 визначень)	—2,84 г/л±0,07 г/л
з фраксипарином; 3,1 анти-Ха од (10 визначень)	—2,99 г/л±0,05 г/л

Результати наших досліджень довели, що метод визначення вмісту фібриногену в плазмі крові за допомогою анцистрона-Н високочутливий без гепарину і за наявності навіть значної його кількості. Завдяки легкості виконання і високій відтворюваності результатів він може бути рекомендований для широкого застосування в біохімічних та клінічних лабораторіях.

T. N. Platonova, E. A. Sushko, D. O. Soloviev, Ya. M. Ena

PECULIARITIES OF FIBRINOGEN CONTENT DETERMINATION IN BLOOD PLASMA USING THROMBIN-LIKE ENZYME OF ANCISTRONE-H AND ANALYSIS OF HOMEOSTASIS STATE UNDER CONDITIONS OF THE PRESENCE OF BLOOD COAGULATION INHIBITORS

The cases of noncoagulation or only partial coagulation of blood plasma fibrinogen under the effect of thrombin have been revealed while examining the homeostasis state in practically healthy elderly and old people and those with hypertonic disease. These cases have been analyzed. It is shown that the suggested method of fibrinogen determination in blood plasma using thrombin-like enzyme ancistrone-H extracted from venom of snakes (*Agkistrodon halys halys*) permits determining the fibrinogen content in blood plasma even in the cases connected with the presence of circulating coagulation inhibitors in plasma. The determination is not hindered by the introduction of exogenous heparin, including low-molecular heparins of the fraxiparin type.

A. V. Palladin Institute of Biochemistry,
Academy of Sciences of Ukraine, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Белицер В. А., Варецкая Т. В., Бутылин Ю. П. и др. Определение содержания фибриногена в плазме крови // Лаб. дело.— 1983.— № 4.— С. 38—42.
2. Бокарев И. Н., Щепотин Б. И., Ена Я. М. Внутрисосудистое свертывание крови.— Киев: Здоров'я, 1989.— 240 с.
3. Бышевский А. Ш., Терсенов О. А., Галян С. Л. и др. Биохимические компоненты свертывания крови.— Свердловск: Изд-во Урал. ун-та, 1990.— 212 с.