

Оцінка стану рівноваги між згортаючою та фібринолітичною системами крові у практично здорових людей різного фізіологічного стану за допомогою оригінального експрес-мікрометоду

Новым турбидиметрическим экспресс-микрометодом определены шесть следующих показателей свертывания крови и фибринолиза: время свертывания, скорость свертывания, максимальная абсорбция, скорость фибринолиза, время полулизиса фибрина и время полного лизиса фибрина, у доноров молодого возраста, новорожденных, здоровых беременных женщин, здоровых людей пожилого и старческого возраста. Для показателей свертывания крови и фибринолиза обнаружена положительная корреляция результатов, полученных предложенным нами методом и классическими методами исследования гемостаза. Выявлено, что указанные показатели изменяются с возрастом и при беременности.

Вступ

Тримання крові в рідинному стані забезпечується динамічною рівновагою між згортаючою і фібринолітичною системами, порушення якої призводить до серйозних наслідків для організму: тромбозів, геморагій та ін. [4, 9, 10, 16]. Навіть для скринінгової оцінки стану гемостаза здійснюється велика кількість коагулологічних тестів, з одного боку, і тестів, оцінюючих фібринолітичний потенціал, з другого [2].

Ми розробили експрес-мікрометод, що дозволяє одночасно визначити шість параметрів згортання та фібринолізу на одному зразку плазми крові об'ємом 0,1 мл на протязі 5–10 хв за допомогою турбідиметрії [6]. В цій статті описується використання методу для оцінки стану рівноваги між системою згортання і фібринолітичною системою крові при різноманітних фізіологічних станах практично здорових людей: вагітних жінок, новонароджених, людей молодого (20–44 р.), похилого (60–74 р.), та старечого (75–89 р.) віку.

Методика

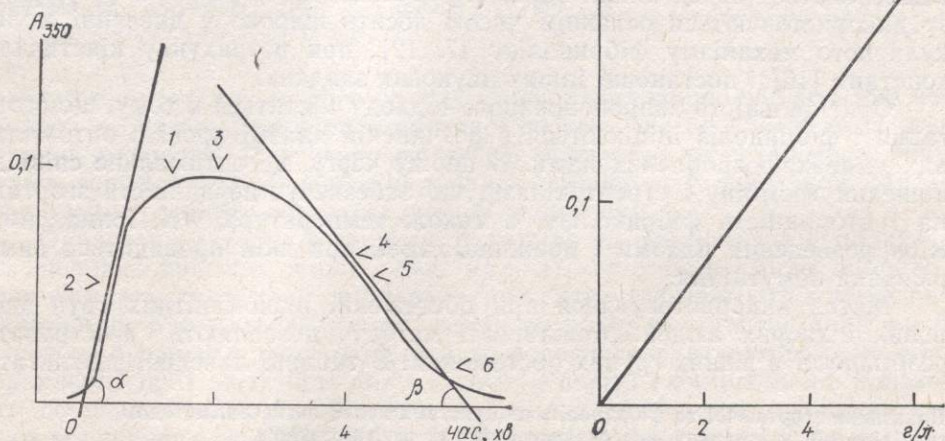
Стан гемостазу і фібринолізу вивчали методом турбідиметрії у 32 практично здорових осіб. Контрольну групу складали 17 здорових донорів (9 чоловіків і 8 жінок) віком від 25 р. до 34 р. (середній вік — 31 р. $\pm$ 1,8 р.). Другу групу складали 9 вагітних жінок у віці 20–32 р. (середній вік — 24,3 р. $\pm$ 5,4 р.) з строком вагітності 38–40 тижнів, третю — 8 новонароджених. Кров брали з пуповини дитини в момент народження, в інших випадках кров брали з ліктьової вени натщесерце між 8 і 10 год ранку. У четверту групу увійшли 5 чоловіків і 10 жінок похилого та старечого віку (60–80 р.; середній вік — 71,4 р. $\pm$ 6,9 р.). 71,4 р. $\pm$ 6,9 р.).

Бідну тромбоцитами плазму одержували центрифугуванням крові, стабілізованої 3,8 %-вим розчином цитрату натрію у відношенні 9 : 1 при 1 200 g 20 хв. Для розведення плазми і виготовлення розчинів використовували вероналовий буфер (0,02 моль/л; рН 7,4), який містить хлориду натрію 0,13 моль/л і хлориду кальцію 0,001 моль/л. Бичий тромбін Каунаського виробничого об'єднання по виготовленню біологічних препаратів розчиняли до концентрації 100 NIH од/мл, фібриноген, який використовували для побудови калібровочної кривої, — до концентрації

2 мг/мл, стрептокіназу («Awelysin») — до концентрації 1 000 міжнар. од./мл. Усі реагенти до виконання тримали у воді з кригою (0 °С), вероналовий буфер — при 37 °С. Аналіз виконували таким чином: в термостабільну кювету спектрофотометра вносили 0,1 мл бідної тромбоцитами плазми, 1,84 мл вероналового буфера (рН 7,4), 0,01 мл розчину стрептокінази і 0,05¹ мл розчину тробміна. Вміст кювети швидко перемішують і автоматично, при довжині хвилі 350 нм, реєструють зміну помутніння з часом у вигляді кривої, по якій розраховують час і швидкість згортання плазми, концентрацію фібриногену, швидкість фібринолізу, активованого стрептокіназою, час напівлізису і час повного лізису фібрину.

Результати та їх обговорення

В основі запропонованого методу лежить аналіз кривої зміни помутніння під час утворення фібринового згустку і наступного його лізису. Утворення фібринового згустку викликає розсіювання світла, спричинене помутнінням, і може бути зареєстроване як зростання абсорбції світла плазмою при 350 нм [8; 13—15]. Стрептокіназа зменшує помутніння рідини під час розчинення фібрину, і при повному розчиненні згустку значення абсорбції світла сягає нуля (мал. 1). Ліва частина кривої абсорбція — час, характеризує згортання фібриногену плазми під дією тробміна. Нахил дотичної до точки максимального збільшення ($\text{tg } \alpha$) визначає швидкість полімеризації фібрину. Ви-



Мал. 1. Визначення показників згортаючої та фібринолітичної систем крові за допомогою турбідиметричної кривої: 1 — час згортання (t_1), хв; 2 — швидкість згортання ($\text{tg } \alpha$); 3 — максимальна абсорбція ($A_{\text{макс}}$); 4 — швидкість фібринолізу ($\text{tg } \beta$); 5 — час напівлізису фібрину ($t_{1/2}$), хв; 6 — час повного лізису фібрину (t_2), хв.

Мал. 2. Калібровочна пряма визначення вмісту фібриногену в плазмі крові методом турбідиметрії.

значення швидкості згортання фібриногену методом графічного диференціювання використовується для вивчення полімеризації фібрину в модельних системах [8, 13, 14] і в природних рідинах, зокрема в плазмі [11, 15]. Через деякий час після початку полімеризації фібрину в розчиненій плазмі абсорбція сягає максимального значення ($A_{\text{макс}}$), яка не зменшується при додаванні каталітичної кількості стрептокінази. Ми продемонстрували, що $A_{\text{макс}}$ прямо пропорційна концентрації згортаемого фібриногену плазми. Калібровочна крива (мал. 2), одержана при використанні екзогенного фібриногена або за допомогою різних розчинів плазми, дозволяє визначити вміст фібриногену в плазмі на протязі 1—2 хв. У 28 осіб вміст фібриногену в плазмі визначали турбідиметричним методом і методом Беліцера та Варецької [3]. Використаний для аналізу метод лінійної регресії показав, що між одержа-

ними значеннями існує залежність, яка описується рівнянням прямої $y=1,04x$, коефіцієнт кореляції $r^2=0,98$. Той факт, що пряма проходить через початок системи координат, є свідомством адекватності результатів визначення рівня фібриногену двома вказаними методами. Час досягання абсорбцією максимального значення (час згортання розчиненої плазми — t_1) корелює з тромбіновим часом згортання $\rho=0,843$ ($P<0,001$). Таким чином, аналіз кривої зміни помутніння дозволяє визначати одночасно три параметри згортання, що характеризують кінцевий етап цього процесу: концентрацію фібриногену, а також швидкість і час згортання. Одержання цієї інформації за допомогою загальноприйнятих коагулологічних тестів [1] служить для прицільної діагностики коагулопатій і, звичайно, випереджає інші дослідження. Порушення, що виявляються на цьому етапі, характеризують міру тяжкості патологічного процесу.

Для характеристики фібринолітичного потенціалу плазми методом турбідиметрії ми запропонували використовувати три параметри, які можуть бути одержані в результаті аналізу правої нисхідної частини кривої. Так, швидкість максимального зменшення абсорбції ($\text{tg } \beta$) характеризує швидкість фібринолізу, як це було вказано нами раніше при вивченні молекулярного механізму фібринолізу в модельних сумішах [5]. Час, за який значення $A_{\text{макс}}$ зменшується в 2 рази ($t_{1/2}$) і час, за який значення абсорбції повертається до вихідного нульового (t_2), означають час напівлізису та час повного лізису фібринового згустку. Показано, що саме ці кінцеві точки кривої зміни помутніння найбільше відтворюються серед інших параметрів. Наведені параметри фібринолізу використовуються останнім часом досить широко у вивченні молекулярного механізму фібринолізу [7, 12], при розрахунку кінетичних констант [16] і постановці інших наукових завдань.

Оригінальність запропонованого підходу міститься в тому, що згортання і фібриноліз ініціюються в розчиненій плазмі крові в оптимальних умовах, розроблених нами. В першу чергу, це оптимальне співвідношення тромбіну і стрептокінази, що забезпечує первинність згортання і вторинність фібринолізу, а також температура, рН, іонна сила, міра розведення плазми і довжина хвилі, при якій провадиться вимірювання помутніння.

Метод використовувався при обстеженні різноманітних груп здорових і хворих людей. Можливості методу дозволяють реєструвати розбіжності в різних групах обстежених. В таблиці наведені результати

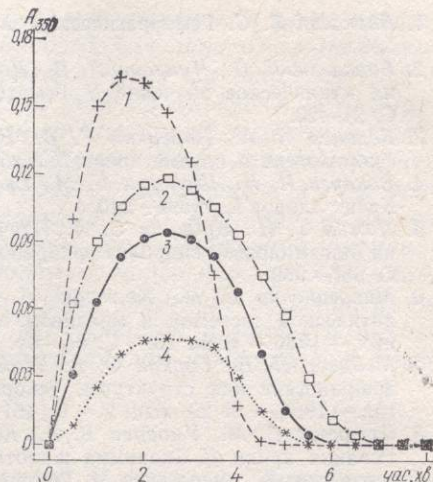
Показники згортаючої та фібринолітичної системи крові, визначені методом турбідиметрії, у здорових людей різного віку та вагітних жінок

Показник	Група обстежених людей			
	новонароджені (n=8)	донори молодого віку—контроль (n=17)	люди похилого та старечого віку (n=15)	вагітні жінки (n=9)
Час полімеризації фібрину (t_1), хв	1,96±0,55	1,2±0,025	1,14±0,15	1,57±0,23
Швидкість полімеризації фібрину (визначена за $\text{tg } \alpha$), умов. од.	2,86±1,53	9,0±0,54	11,2±4,4	14,4±5,03
Концентрація згортаемого фібриногену плазми (визначена за максимальним значенням абсорбції світла плазмою — $A_{\text{макс}}$), од. екст.	0,046±0,024	0,083±0,01	0,126±0,019	0,106±0,033
Швидкість фібринолізу (визначена за $\text{tg } \beta$), умов. од.	1,43±0,82	4,1±0,096	3,76±0,76	4,4±1,3
Час напівлізису, фібрину ($t_{1/2}$), хв	4,56±0,51	3,0±0,11	2,75±0,59	3,2±0,4
Час повного лізису фібрину (t_2), хв	5,1±0,68	3,5±0,143	3,76±0,54	4,1±0,65

визначення параметрів згортання та фібринолізу методом турбідиметрії у вищевказаних групах.

З віком, тобто при різних фізіологічних станах, в організмі людини відбуваються зміни в системі згортання та фібринолізу. Досить демонстративні форми кривих абсорбція—час, одержаних турбідиметричним методом, у новонароджених, людей молодого, похилого та старечого віку, вагітних жінок (мал. 3). Навіть без попередніх розрахунків форма кривої може допомогти в швидкій оцінці стану згортаючої та фібринолітичної систем. Якщо для новонароджених (див. мал. 3) характерні подовження часу згортання, невелика швидкість полімеризації фібрину, низький вміст фібриногену, то з віком (див. мал. 3) просліджується поступове скорочення часу згортання, швидкість згортання підвищується, зростає вміст фібриногену, що може сприяти підвищенню частоти тромботичних ускладнень у людей похилого та старечого віку. Низька

Мал. 3. Типові форми кривих: «абсорбція—час» у різних груп обстежених здорових людей: 1—вагітні жінки; 2—особи похилого та старечого віку; 3—донори молодого віку, 4—новонароджені.



швидкість згортання та фібринолізу у новонароджених свідчить про незрілість згортаючої та фібринолітичної систем, але це є умовою їх стабільної рівноваги. Для здорових людей похилого та старечого віку більш типовим є незначне гальмування фібринолізу, що також підсилює ризик тромботичних ускладнень у цьому віці.

Одночасна активація системи згортання та фібринолізу у практично здорових вагітних жінок (див. мал. 3), зростання вмісту фібриногену свідчать про високу лабільність цих систем, обмежують зону їх балансування і можуть виступати, з одного боку, як адаптаційний засіб жіночого організму, який готується до пологів, але, з другого боку, при відхиленні течії вагітності або полгів від норми скоріше може призвести до геморагічних та тромбо-геморагічних ускладнень, особливо такого поширеного, як ДВЗ-синдром. Визначені нами зміни в системі гемостазу та фібринолізу у людей різного віку та у вагітних жінок співбігають з літературними даними [4].

Отже, визначення стану гемостазу та фібринолізу оригінальним турбідиметричним експрес-мікрометодом дозволяє дуже швидко одержувати інформацію і оцінювати стан рівноваги цих систем у різних груп людей, контролювати вплив профілактичних та лікувальних засобів. Методика може бути запропонована для впровадження в спеціалізованих та клінічних біохімічних лабораторіях.

*T. I. Lezhen, E. M. Makogonenko, E. A. Sushko, L. I. Sushko,
L. I. Sokolovskaya, A. Ya. Senchuk*

ORIGINAL PROXIMATE-MICROMETHOD-AIDED ESTIMATION OF THE STATE OF EQUILIBRIUM BETWEEN COAGULATING AND FIBRINOLYTIC BLOOD SYSTEMS IN PRACTICALLY HEALTHY PEOPLE BEING IN DIFFERENT PHYSIOLOGICAL STATE

A new turbodimetric proximate-micromethod has been used to determine six indices of blood coagulation and fibrinolysis (coagulation time, coagulation rate, maximal absorption, fibrinolysis rate, time of fibrin semilysis and complete lysis) in young donors,

newborns, healthy pregnant women, healthy elderly and old age people. A positive correlation of the results obtained using the method suggested by the authors and conventional methods is found for the indices of blood coagulation and fibrinolysis. It is revealed that the above indices change depending on the physiological state of the human organism.

Research Institute of Gerontology,
Ministry of Public Health of Ukraine, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Баркаган З. С. Геморрагические заболевания и синдромы.— М.: Медицина, 1988.— 528 с.
2. Баркаган Л. З., Чупрова А. В., Дорошенко Л. А. Микротесты оценки гемостаза и их клиническое значение // Гематология и трансфузиология.— 1990.— 35, № 1.— С. 21—23.
3. Белицер В. А., Варецкая Т. В., Бутылин Ю. П. и др. Определение содержания фибриногена в плазме крови // Лаб. дело.— 1983.— № 4.— С. 38—42.
4. Бокарев И. Н., Щепотин Б. М., Ена Я. М. Внутрисосудистое свертывание крови.— Киев: Здоров'я, 1989.— 240 с.
5. Лежен Т. И., Кудинов С. А. Изучение влияния фрагментов Е и Д фибриногена на плазминовый гидролиз фибринового сгустка // Биохимия.— 1986.— 51, № 6.— С. 967—969.
6. Макогоненко Е. М., Колесник Л. А. Разрушение фибринового сгустка фибринолитической системой и механизм его регуляции // Биохимия человека и животных.— 1986.— Вып. 15.— С. 55—64.
7. Медведев Л. В., Горкун О. В., Маняков В. Д., Белицер В. А. С-домены молекулы фибриногена как структуры, ускоряющие самосборку фибрина // Мол. биология.— 1986.— № 20, вып. 2.— С. 461—470.
8. Струкова С. М., Уморова Б. А., Киреева Е. Г. и др. Механизмы регуляции свертывания крови // Биохимия животных и человека.— 1991.— Вып. 15.— С. 1—12.
9. Фермилен Ж., Ферстрате М. Гемостаз.— М.: Медицина, 1984.— 191 с.
10. А. с. 1777089 РФ, 5G01 N 33/86. Способ исследования свертывания крови / Т. И. Лежен, Е. М. Макогоненко, Л. А. Колесник и др.— Оpubл. 1992, Бюл. № 43.
11. Becker U., Barte K., Wahlefeld A. W. A functional photometric assay for plasma fibrinogen // Thromb. Res.— 1984.— 35, N 5.— P. 475—484.
12. Bouvier C. A., Berretta-Piccoli M., Giacometti N. Light-scattering measurements of polymerization and depolymerization of fibrin: A tool for studying coagulation and fibrinolysis // Progress in chemical fibrinolysis and thrombolysis / Eds. Davidson I. E., Samama M. M., Desnoyers P. S.— New York: Raven press.— 1975.— Vol. 1.— P. 281—288.
13. Hemker H. C., Kop I., Willems G. M. The relation between clotting time and clotting velocity // Thromb. Haemost.— 1979.— 41.— P. 309—313.
14. Sato H., Nakajima A. Kinetic study on the initial stage of the fibrinogen—fibrin conversion by Thrombin (III). Effects of competitive inhibitors // Thromb. Res.— 1985.— 37, N 2.— P. 327—335.
15. Soria I., Soria C., Uver I., Samama M. M. Temp de reptilase Etude de la polymérisation de la fibrin en presence de reptilase // Coagulation.— 1969.— 2, N 2.— P. 173—175.
16. Stump D. C., Mann K. G. Mechanisms of thrombus formation and lysis // Ann. Emerg. Med.— 1988.— 17.— P. 1138—1147.

Укр. наук.-дослід. ін-т геронтології
М-ва охорони здоров'я України, Київ

Матеріал надійшов
до редакції 24.07.92