

Аналіз порушення фази фібриноутворення у практично здорових осіб похилого та старечого віку за допомогою анцистронового тесту

У 34 % практически здоровых людей пожилого возраста и 47 % старческого возраста отмечены нарушения фазы фибринообразования, инициированные активацией системы свертывания крови и фибринолиза и связанные с взаимодействием фибриногена и его дериватов — растворимого фибрина, продуктов расщепления фибрина и фибриногена, наличием ингибиторов свертывания крови различной природы. Показана значимость применения разработанного на основе выделенного из яда змеи щитомордник обыкновенный фермента анцистрон-Н теста «анцистроновое время» в оценке состояния фазы фибринообразования как на модельной системе, так и у практически здоровых лиц пожилого и старческого возраста. Анцистроновый тест позволяет в кратчайший срок (30—60 с) получать качественную и количественную характеристику содержания фибриногена в плазме крови, продуктов расщепления фибрина и фибриногена, ингибиторов свертывания крови.

Вступ

Процес старіння — один із головних факторів ризику тромбозу, при якому помічено зростання частоти тромбо-геморагічних ускладнень [13, 17]. У людей похилого та старечого віку особливо швидко тромбоз розвивається при гіповолемії, імобілізації, септичній інфекції [14, 15]. Фаза фібриноутворення є однією з вирішальних при розвитку тромбозу та потребує більш доцільних досліджень, як кінцевий етап зсідання крові, що призводить до формування мікро- та макрозгустків. У клінічній практиці інших країн для діагностики порушень зсідання крові на етапі фібриноутворення використовуються такі діагностичні тести як «рептилазний» і «атроксиновий» час. У тестах застосовується препарат на основі тромбіноподібного ферменту батроксобіну з отрути змій роду *Bothrops Reptilase-R* (фірма «Pentafarm») Швейцарія, його аналог виробляється з отрути змій роду *Agkistrodon* і має комерційну назву *Atroxin* (фірма «Sigma», США) [10, 12]. Раніше з отрути змії щитомордник звичайний (*Agkistrodon halys halys*) нами був видалений фермент анцистрон-Н [10]. Як і вказані вище препарати він є α -специфічним тромбіноподібним ферментом, тобто відщеплює фібринопептид А від молекули фібриногену, запускаючи утворення фібрину з його наступною полімерізацією.

Метою нашої роботи було вивчення стану кінцевого етапу зсідання крові у практично здорових осіб похилого та старечого віку за допомогою тесту — «анцистроновий час», для розробки якого ми застосовували ферментний препарат анцистрон-Н.

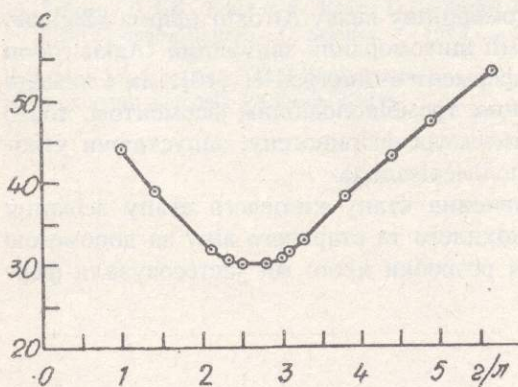
Методика

Обстежено 47 практично здорових людей похилого (30 осіб) та старечого (17 осіб) віку за умов геронтологічної клініки. Контрольну групу склали 20 практично здорових осіб молодого віку. Кров брали пункцією ліктьової вени натщесерце між 8 і 10 год ранку і негайно змішували з 3,8 %-вим розчином лимоннокислого натрію у пропорції 9 частин крові : 1 частина консерванту. Після перемішування кров центрифугували у пластиковій пробірці протягом 20 хв при частоті обертів 3000 хв^{-1} , отриману плазму видаляли. Для дослідження використовували тільки свіжоотриману плазму. Визначали такі коагулологічні показники: вміст фібриногену із застосуванням тромбіну [1] і (або) анцистрону-Н [9], розчинний фібрин (РФ) [4], продукти розщеплення фібрину й фібриногену (ПРФ) [6], тромбіновий час [7], тест на виявлення циркулюючих протизсідуючих агентів та дефіциту вмісту і активності факторів зсідання крові [7]. Результати обробляли статистично.

Анцистроновий час це час зсідання цитратної плазми крові при додаванні до неї стандартного препарату анцистрон-Н в об'ємному співвідношенні 2:1. Контрольний час зсідання за таких умов $30 \pm 2 \text{ с}$. Препарат анцистрон-Н (7 NIH од) розчиняли у 2 мл дистильованої води, перемішували і залишали при кімнатній температурі на 5-10 хв. Розчин анцистрону-Н може зберігатися тиждень у холодильнику при температурі $+4^\circ\text{C}$. У конічну пробірку вносили 0,2 мл цитратної плазми, яку досліджували і поміщали у водяну баню при 37°C на 1 хв, потім мікропіпеткою вносили у пробірку 0,1 мл розчину анцистрону-Н і одночасно вмикали секундомір. Засікали час утворення згустку в водяній бані, помірно струшуючи пробірку. В окремих випадках плазму розчиняли 0,05 моль/л *трис*-HCl буфером (pH 7,5; 0,15 моль/л NaCl).

Результати та їх обговорення

При дослідженні плазми ми помічали подовження анцистронового часу у багатьох випадках. Для правильної інтерпретації одержаних результатів нами було розроблено модельну систему: для моделювання гіперфібриногенемії до донорської плазми додавалися відповідні об'єми очищеного фібриногену, для зниження рівня фібриногену донорську плазму розводили дефібринованою плазмою. Було відзначено, що контрольний час у тесті (30 с) спосте-



Залежність анцистронового часу зсідання плазми від концентрації в ній фібриногену.

рігається при коливаннях рівня фібриногену у межах нормальних показників — 2,2—3,2 г/л. Зниження або підвищення рівня фібриногену призводило до значного подовження анцистронового часу (малюнок). При цьому ми паралельно визначали тромбіновий час, який був мало чутливим до коливань концентрації фібриногену в плазмі крові. Крива (див. малюнок) може бути використана для якісного виявлення ПРФ у плазмі хворих. Якщо в конкретній плазмі визначити кількісний рівень

фібриногену та анцистроновий час, і при цьому визначеному рівню фібриногену на кривій відповідає інший час, це означає, що в даній плазмі присутні ПРФ. Для моделювання присутності ПРФ і гепарину в донорську плазму вносили очищені фрагменти фібриногену і фібрину та екзогенного гепарину. Таке внесення дозволило виявити, що при додаванні фрагментів менш, ніж 10 мкг/мл, істотного подовження анцистронового часу не відзначалося; починаючи з 15 мкг/мл помічено значне подовження часу зсідання в тесті (табл. 1). Крім того, ми порівнювали дані, одержані нами методом із показниками тесту — аналога «атроксиновий час» (діагностичний кіт фірми «Sigma», США) у присутності різних кількостей ПРФ. Нами було показано, що вплив ПРФ на показники обох тестів практично однаковий, тоді як тромбіновий час майже не реагував на присутність ПРФ. З табл.1 також видно, що присутність у плазмі гепарину при введенні людині разової дози 20 тис. од. не впливає на показники анцистронового часу.

Таблиця 1. Порівняння інформативності тестів оцінки фази фібриноутворення в залежності від концентрації продуктів розщеплення фібрину і фібриногену (ПРФ), внесених у донорську плазму

Концентрація ПРФ у донорській плазмі	Тести, що порівнюються			
	Анцистроновий час, с		Тромбіновий час, с	Атроксиновий час, с
	без гепарину	із гепарином		
0 мкг/мл	30	30	11	13
10 мкг/мл	30	30	14	14
40 мкг/мл	32	32	14	15
60 мкг/мл	33	34	14	16
80 мкг/мл	35	35	15	17
160 мкг/мл	36	36	15	18
200 мкг/мл	38	39	15	20
300 мкг/мл	45	46	15	21

Пропонуємо такий алгоритм використання тесту «анцистроновий час»:

Норма	— анцистроновий час 30 с, рівень фібриногену в межах норми, ПРФ і (або) інгібітори зсідання в плазмі не виявляються
Гіперфібриногенемія	— анцистроновий час подовжений, однак при розчинні плазми в 2 рази він відновлюється до норми
Гіпофібриногенемія	— анцистроновий час подовжений, при розчиненні плазми в 2 рази він не відновлюється, кількісне визначення рівня фібриногену допомагає визначити гіперфібриногенемію
Наявність ПРФ	— анцистроновий час подовжений, рівень фібриногену в межах норми, тромбіновий час наблизений до норми
Наявність інгібіторів зсідання	— анцистроновий час подовжений, рівень фібриногену в межах норми, тромбіновий час сильно подовжений або плазма не зсідается екзогеним тромбіном

Присутність гепарину в плазмі не впливає на показники тесту. Якщо при використанні тесту плазма людини зсідается за 30 с, можна зробити висновки про нормальний рівень фібриногену, а також про відсутність значного вмісту ПРФ та інгібіторів зсідання. Наші дослідження показали, що подовження анцистронового часу може помічатися за різних умов: при гіпер- або гіпофібриногенемії, в присутності ПРФ і (або) значної кількості інгібіторів зсідання. Для того, щоб визначити причину подовження анцистроно-

вого часу в кожному конкретному випадку, необхідно розводити плазму, що досліджується, буфером у 1,5 — 2 рази і визначити анцистроновий час зсідання розведеної плазми. Якщо в результаті розведення плазми показник анцистронового часу повертається до норми (30 с), це є свідчить про гіперфібриногенемію. Коли цього не відбувається, а саме, час зсідання розведеної плазми залишається більшим від норми, то необхідно провести кількісне визначення рівня фібриногену. У цьому випадку можна виявити гіпофібриногенемію. Коли ж рівень фібриногену залишається в межах норми, то це засвідчує про наявність у плазмі ПРФ і (або) інгібіторів зсідання. З'ясувати картину можливо шляхом визначення тромбінового часу зсідання даної плазми: на присутність ПРФ тромбіновий час практично не реагує, а наявність інгібіторів зсідання призводить до його подовження, аж до втрати здатності плазми до зсідання під впливом тромбіну. Залежно від змін деяких коагулологічних показників: концентрації фібриногену і ПРФ, тромбінового і анцистронового часу в обстежених нами осіб виявилось можливим виділити наступні стани фази фібриноутворення: нормальний її стан, гіпер- та гіпофібриногенемію, наявність інгібіторів зсідання крові — полімеризації фібрину або самого тромбіну, присутність ПРФ (табл. 2). Таким чином, використання тесту «анцистроновий час» у сукупності з рядом загальноприйнятих тестів діагностики стану гемостазу і фібринолізу дозволяє оцінити кінцевий етап зсідання крові.

Таблиця 2. Коагулологічні показники у деяких обстежених осіб з певним станом фази фібриноутворення

Показник	Стан фази фібриноутворення										
	Нормальний			Гіпо- фібриногенія		Гіпер- фібриногенія		Гальмування фібриноутворення			
								інгібіторами		ПРФ	
	1	2	3	1	2	1	2	1	2	1	2
Концентрація у плазмі крові фібриногену, г/л	2,89	3,06	2,5	1,76	1,65	5,0	4,0	3,5	2,5	3,1	3,64
продуктів розщеплен- ня фібрину і фібрино- гену (ПРФ), мкг/мл	—	—	—	—	—	—	—	—	—	12	23
Час зсідання плазми, с за тромбіновим часом	11	10	12	16	15	9	>60	>60	48	>60	>60
за анцистроновим часом	30	30	29	35	43	45	37	30	43	40	44

У табл. 3 наведено дані коагулологічних показників, які визначені в обстежених групах. Враховуючи кількісне й якісне визначення розчинного фібрину та продуктів розщеплення фібрину й фібриногену, виявлення інгібіторів зсідання крові, групи осіб похилого віку та старечого віку були розподілені відповідно на дві підгрупи — з порушенням фази фібриноутворення та без нього (див. табл. 3). У практично здорових осіб похилого віку ми виявили порушення фази фібриноутворення у 34 % випадків (2-а група). Рівень фібриногену в цій групі невірогідно знижений відносно осіб молодого віку (1-а група) та практично здорових осіб похилого віку без порушень фібриноутворення (3-я група). Takeda, Takeuchi [18] вважають, що зниження рівня фібриногену у здорових осіб може бути пов'язане з прихованими, латентно протікаючими процесами мікрозсідання крові. Ми вважаємо, виходячи з сучасної теорії зсідання крові, що при цьо-

Таблиця 3. Деякі коагулологічні показники у практично здорових людей різного віку (M±m)

Показник	Група обстежених людей				
	молодого віку (1-а група n=20, контроль)	похилого віку		старечого віку	
		з порушенням фібриноутворення (2-а група, n=10)	без порушень фібриноутворення (3-я група, n=19)	з порушенням фібриноутворення (4-а група, n=8)	без порушень фібриноутворення (5-а група, n=8)
Вміст фібриногену в плазмі крові, г/л	2,51±0,17	2,31±0,21	2,63±0,13	2,98±0,15 P ₁₋₄ <0,05 P ₂₋₄ <0,05	3,333±0,29 P ₁₋₅ <0,05 P ₃₋₅ <0,05
Вміст розчинного фібрину в плазмі крові, г/л	—	0,11±0,04 P ₁₋₂ <0,001	0,01±0,005 P ₂₋₃ <0,05	0,09±0,02 P ₁₋₄ <0,001	0,01±0,008 P ₄₋₅ <0,01
Вміст продуктів розщеплення фібриногену і фібрину в плазмі крові, мкг/мл	—	10,1±2,5 P ₁₋₂ <0,05	4,5±1,7 P ₁₋₃ <0,05	3,9±0,8 P ₁₋₄ <0,001	1,45±0,5 P ₁₋₅ <0,001 P ₄₋₅ <0,05
Тромбіновий час, с	11,4±0,4	20,3±6,6	19,9±4,2	11,8±1,0	22,1±7,2
Анцистроновий час, с	29,3±1,3	37,8±2,0 P ₁₋₂ <0,01	30,0±1,0 P ₂₋₃ <0,01	35,7±1,0 P ₁₋₄ <0,01	30,2±1,0 P ₄₋₅ <0,01

му відбувається деяка активація XIII фактора зсідання крові, яка супроводжується утворенням прошитого фібрину. Це підтверджують дослідження Kario та співавт. [15], які визначили, що рівень D-димеру (деривату фібрину) у практично здорових осіб похилого віку вірогідно вище, ніж в здорових молодих осіб. Рівень РФ і ПРФ у 2-й групі вірогідно вище, ніж в 1-й і 3-й групах. Цей факт свідчить про помітну активацію системи фібринолізу у відповідь на мікрозсідання крові. Тромбіновий час невірогідно зростає в 2-й групі відносно 1-ї і майже не відрізняється від 3-ї групи, де порушення фібриноутворення практично відсутні. На відміну від тромбінового часу анцистроновий час вірогідно зростає порівняно як із 1-ю, так і 3-ю групами. Таким чином, анцистроновий час із високою точністю свідчить про істотні зміни в фазі фібриноутворення у практично здорових осіб похилого віку, а саме, в даному випадку, його подовження відображає відносне зниження рівня фібриногену та зростання концентрації ПРФ.

У 2-й групі у 20 % осіб виявлено значну інгібіторну активність плазми, яку оцінювали в комплексі з іншими показниками коагулограми. У літературі затвердилася така точка зору, що інгібіторна активність плазми може бути пов'язана з інгібіторами факторів зсідання крові — V, VIII [17], антифосфоліпідними антитілами типу люпус — антикоагулянту [19], при порушенні контактної фази зсідання [16]. Окрім того інгібіторна активність плазми може бути пов'язана з гальмуванням полімеризації фібрину. У наших дослідженнях інгібіторна активність плазми здебільшого була пов'язана з гальмуванням дії тромбіну та полімеризації фібрину. Так, у 3-й та 5-й групах гальмується дія тромбіну, в 4-й групі — утворення фібринового згустку, а у 2-й групі гальмується як дія тромбіну, так і утворення фібринового згустку (за даними тромбінового та анцистронового часів).

Згідно з концепцією Бишевського та співавт. [3] при загрозі внутрішньосудинного зсідання крові у кровотоці зростає концентрація інгібіторів полімеризації фібрину, що перешкоджає швидкому формуванню фібринових згустків. Отже інгібіторна активність плазми підвищується у практично здорових осіб похилого віку на фоні порушення фібриноутворення, що може розглядатись як захисний механізм старіючого організму, який застерігає його від макротромбоутворення. Це співпадає з уявленням про перехід системи гемостазу в похилому віці на новий рівень функціонування, що включає в себе ряд пристосовно-компенсаторних реакцій [8].

У практично здорових осіб старечого віку відхилення в фазі фібриноутворення ми виявили в 47 % (4-а група). У цих осіб спостерігається вірогідне зростання рівня фібриногену відносно 1-ї, 4-ї та 2-ї груп. Цей факт пояснюється кількома причинами: зміною швидкості катаболізму і кліренсу білка [2, 8], змінами судинної стінки — процесами фізіосклерозу та атеросклерозу, що протікає без клінічних проявів [5]. Вміст РФ та ПРФ у 4-й групі вірогідно вище, ніж у 1-й та 5-й групах. Але концентрація ПРФ залишається значно меншою порівняно з практично здоровими особами похилого віку з порушеннями в фазі фібриноутворення (3-я група), що може свідчити про зменшення інтенсивності процесу фібринолізу з віком. Зростання рівня фібриногену та зниження вмісту ПРФ є більш загрозливою ситуацією ризику розвитку тромбоемболічних станів у старечому віці, ніж в похилому. Тромбіновий час не відповідає в повній мірі змінам третьої фази зсідання крові в 4-й групі. Він майже не відрізняється від контрольного. Це підтверджує наші результати, отримані в експерименті (на модельній системі — див. табл. 1) про нечутливість і невисоку інформативність тесту «тромбіновий час». Анцистроновий час у 4-й групі вірогідно подовжується як відносно 1-ї, так і 5-ї групи. Враховуючи наші результати, одержані за допомогою модельної системи, подовження анцистронового часу в 4-й групі відповідає, як підвищенню рівня фібриногену, так і зростанню концентрації ПРФ відносно групи практично здорових осіб молодого віку (1-а група) та практично здорових осіб старечого віку без порушень у фазі фібриноутворення. У практично здорових осіб старечого віку ми виявили значно меншу інгібіторну активність плазми на відміну від осіб похилого віку. Вона визначалася в 5,8 % у 5-й групі і була пов'язана з присутністю інгібіторів полімеризації фібрину, що свідчило про напруженість гемокоагуляційного потенціалу крові навіть при відсутності наявних ознак порушення в фазі фібриноутворення.

Отже, ми визначили, що у 34 % практично здорових осіб похилого віку та 47 % старечого віку спостерігаються порушення в фазі фібриноутворення, які ініціюються активацією системи зсідання крові та фібринолізу і пов'язані з взаємодією фібриногену та його дериватів — РФ та ПРФ, інгібіторів зсідання крові різної природи. Запропонований і розроблений нами тест «анцистроновий час» дуже чутливий до змін у фазі фібриноутворення, швидко виконується, добре відтворюється. Анцистроновий час несе точну, набагато повнішу інформацію про вміст фібриногену, ПРФ, не реагує на присутність гепарину на відміну від тромбінового часу і, в деяких випадках, може зменшувати обсяг лабораторних тестів, призначених для виявлення небезпечних станів гемостазу щодо тромбозів і геморагій.

Виконання тесту «анцистроновий час» потребує мінімальних затрат часу і плазми крові. Нарівні з такими загальноприйнятими тестами, як активований частковий тромбопластиновий час, протромбіновий час, тромбіновий час, запропонований нами «анцистроновий час» може бути віднесений до

скрінінг-тестів. Його рекомендується використовувати при дослідженні плазми хворих, призначенні гепарину, проведенні екстракорпоральних методів лікування (гемосорбція, плазмаферез, гемодіаліз тощо), оцінці кінцевого етапу зсідання крові.

T.N.Platonova, E.A.Sushko, N.I.Lukina, D.A.Soloviev

AN ANALYSIS OF FIBRIN-FORMATION PHASE DAMAGE IN PRACTICALLY SOUND PEOPLE OF OLD AND SENILE AGE USING AN ANCISTRONE TEST

Damages in the fibrin-formation phase initiated by activation of the blood coagulation system and fibrinolysis and promoted by interaction between fibrinogen and its derivatives (dissolved fibrinogen, products of fibrin and fibrinogen lysis) and by the presence of various blood coagulation inhibitors were found in 34 % of practically sound old people and in 47 % of people of senile age. It is shown very significant to apply the «ancistrone time» test developed on the basis of enzyme ancistrone-H isolated from the venom of snake *Agkistrodon halys halys* for estimating the fibrin-formation phase both on the model system and in practically sound people of old and senile age. The ancistrone test permits rapidly (for 30—60s) obtaining qualitative and quantitative characteristic of the fibrinogen level in the blood plasma, of the products of fibrin and fibrinogen lysis, of the blood coagulation inhibitors.

A.V.Palladin Institute of Biochemistry,
National 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.М., Ена Я.М. Внутрисосудистое свертывание крови. — К.: Здоровья, 1989. — 240 с.
3. Бышевский А.Ш., Тирищев Е.А., Леонова О.П., Михалева И.В. Пептидные ингибиторы коагуляционного превращения фибриногена // Укр. биохим. журн. — 1991. — 63, № 1. — С. 26—33.
4. Варецкая Т.В., Михаловская Л.И., Свистальская Л.А., Ена Я.М. Определение растворимого фибрина в плазме крови // Клинич. и лаб. диагностика. — 1992. — 8, № 7. — С. 10—14.
5. Давыдовский И.В. Геронтология. — М.: Медицина, 1966. — 300 с.
6. Дранник Г.Н., Ена Я.М., Варецкая Т.В. Продукты расщепления фибрина/фибриногена при патологических процессах. — К.: Здоровья, 1987. — 184 с.
7. Иванов Е.П. Руководство по гемостазиологии. — Минск: Беларусь, 1991. — 302 с.
8. Коркушко О.В., Коваленко А.Н. Система свертывания крови при старении. — К.: Здоровья, 1988. — 216 с.
9. Платонова Т.Н., Сушко О.О., Соловйов Д.А., Ена Я.М. Визначення вмісту фібриногену в плазмі крові людини за допомогою тромбіноподібного ферменту анцистрону-Н та аналіз стану гемостазу при наявності інгібіторів зсідання крові // Физиол. журн. — 1993. — 39, № 1. — С. 15—19.
10. Угарова Т.П. Гемокоагулирующие ферменты из ядов змей // Биохим. животных и человека. — 1989. — Вып. 13. — С. 65—74.
11. Угарова Т.П., Соловьев Д.А., Золотухин В.А. и др. Выделение тромбиноподобных ферментов из яда змей рода *Agkistrodon* // Методы получения и анализа биохимических реактивов: Тез. докл. конф., окт. 1987. — Рига, 1987. — 122 с.
12. Esnouf M., Tunnach G. The isolation and properties of the thrombin — like activity from *Agkistrodon rhodostoma* venom // Brit. J. Haematol. — 1967. — 13. — P. 581—590.
13. Gromnica-Ihle F. Blutgerinnung im Alter und Besonderheiten der antithrombotischen Therapie // Z. arztl. Fortbild. — 1989. — 83, № 11. — S. 589—593.
14. Hager K., Setzer J., Vogl Th. et al. Blood coagulation factors in the elderly // Arch. Gerontol. Geriatr. — 1989. — 9, № 3. — P. 277—282.
15. Kario K., Matsuo T., Kobayashi H. Which factors affect high D — dimer levels in the elderly? // Thromb. Res. — 62, № 5. — P. 501—508.
16. Siegert von G., Plat M. Störungen im Kontaktphasensystem der Blutgerinnung als Ursache einer verlängerten partiellen Thromboplastinzeit // Z. gesamte inn. Med. und Grenzgeb. — 1988. — 43, № 9. — P. 228—231.