

З. А. ЧАПЛЫГИНА

СУХИЕ ПРЕПАРАТЫ ФИБРИНОГЕНАЗЫ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ГЕМОФИЛИЯ

(Представлено академиком Л. А. Орбели 13 III 1950)

Исследованиями В. С. Ильина и его сотрудников (¹⁻³) было показано, что в плазме крови внезапно погибших людей, в экстрактах из легких, а также в растворах глобулинов, выделенных из плазмы крови или легочных экстрактов, содержится в активном состоянии фибринолитический (и фибринолитический) фермент — фибриногеназа. Термолability фибриногеназы, уменьшение ее активности при хранении трупной плазмы, легочных экстрактов и растворов активных глобулинов, а также трудность получения этих экстрактов и растворов в стерильном виде, пригодном для внутривенного введения, побудили нас к попыткам получения активных препаратов фермента в сухом виде. Как известно, ферменты в сухих препаратах более стойки к температурным и иным внешним воздействиям и дольше сохраняют активность.

Сначала нами были высушены трупная кровь и активные легочные экстракты в сушильном аппарате с продуванием теплого воздуха (при температуре 40°). При таком высушивании, как показали специальные испытания, терялась часть ферментной активности исходного материала.

Тогда мы перешли к высушиванию способом вакуум-замораживания. Этот способ при определенном режиме с использованием в качестве источника тепловой энергии водяного обогрева и инфракрасного излучения дал вполне удовлетворительные результаты, и мы в дальнейшем пользовались им в нашей работе. Всего было поставлено 5 серий опытов по изучению фибриногено-фибринолитической активности трупной крови, легочных экстрактов и активных глобулинов до и после их высушивания.

Методика

1. Трупная кровь бралась через 3 часа после наступления смерти. Одна порция такой крови (30—50 мл) подвергалась высушиванию, другая порция той же крови оставлялась на леднике как контрольная. После высушивания кровь (1-я порция) растворялась в объеме дистиллированной воды, соответствующем первоначальному объему крови, и одновременно испытывалась активность «сухой» и контрольной («нативной») крови.

С этой целью растворенная сухая кровь и нативная трупная кровь смешивались с кровью здорового человека (донора). Через 2—3 мин. в пробирках образовывались плотные сгустки за счет фибриногена крови донора (в крови внезапно погибших людей фибриногена не содержится (²)). Пробирки помещались в термостат при температуре 37—38°, и спустя 10—15 мин. начиналось разжижение сгустка. Время полного разжи-

жения служило тестом для суждения о фибринолитической активности раствора сухой и нативной крови.

2. Для определения фибринолитической активности опыт ставился таким же образом, с той разницей, что к раствору сухой или нативной крови прибавлялась цитратная плазма и ход фибриногенолиза контролировался путем периодического определения фибриногена (методом Хаув) в пробах из опытной и контрольной пробирок. Время полного исчезновения фибриногена служило тестом фибринолитической активности раствора сухой и нативной трупной крови.

3 и 4. В опытах с экстрактами из легких взятое от трупа легкое взвешивалось, быстро измельчалось в кашицу и делилось на две порции. Одна порция измельченного легкого высушивалась, вторая хранилась на леднике. Из высушенного и свежего легкого готовились экстракты по методу Ильина. Фибринолитическая и фибриногенолитическая активность того и другого экстракта испытывалась теми же способами, как это было описано для опытов с трупной кровью.

5. Из плазмы трупной крови и плазмы крови здоровых людей выделялись глобулины, содержащие активную фибриногеназу, по методу Головановой.

Одна порция полученных активных глобулинов высушивалась, другая служила контролем. Перед опытом полученные сухие препараты глобулинов растворялись в дистиллированной воде с доведением pH до 7,4. Для испытания фибринолитической активности растворов сухих и «контрольных» глобулинов к ним прибавлялся раствор фибриногена и несколько капель тромбина. После образования сгустков пробирки помещались в термостат при температуре 37—38° и определялось время полного разжижения сгустков.

Ввиду того что в опытах всех пяти серий был получен вполне определенный результат: скорость фибринолиза и фибриногенолиза в опытах и контрольных пробирках была всегда почти совершенно одинакова, ограничиваемся приведением средних цифр (табл. 1).

Таблица 1

Влияние высушивания на скорость фибринолиза и фибриногенолиза, вызываемого трупной кровью, экстрактами из трупных легких и активными глобулиновыми препаратами

(средние цифры)

№ серии опытов	Число опытов	Скорость фибринолиза		№ серии опытов	Число опытов	Скорость фибриногенолиза	
		Объект исследования	Время фибринолиза			Объект исследования	Время фибриногенолиза
1	12	Нативная трупная кровь	2 ч. 21 м.	2	11	Нативная трупная кровь	2 ч. 35 м.
		Сухая трупная кровь	2 ч. 12 м.			Сухая трупная кровь	2 ч. 30 м.
3	6	Экстракты легкого	1 ч. 14 м.	4	6	Экстракты легкого	1 ч. 27 м.
		Экстракты высушенного легкого	1 ч. 09 м.			Экстракты высушенного легкого	1 ч. 15 м.
5	10	Раствор активных глобулинов	19.1 м				
		Раствор сухих активных глобулинов	20.9 м				

Для испытания полученных сухих активных глобулиновых препаратов фибриногеназы на кровь в опытах in vivo мы подвергли эти пре-

параты стерилизации в автоклаве и убедились, что такая стерилизация не снижает активности этих препаратов. Таким образом, в настоящее время мы располагаем сухими стерильными и активными препаратами энзима.

Получение сухих стерильных и активных глобулиновых препаратов дало нам возможность перейти к опытам по изучению действия этих препаратов при их введении в циркулирующую кровь, т. е. к изучению их действия в опытах *in vivo*. Первые же опыты такого типа дали столь определенные и несомненные результаты, что, несмотря на сравнительно небольшое число их (23 опыта), представляется возможным привести эти результаты. Сухие препараты активных глобулинов растворялись в небольшом объеме воды с доведением pH раствора до 7,3—7,4 и вводились шприцем в сердце морских свинок. До введения и через различные промежутки времени после введения раствора активных глобулинов брались пробы крови и в них определялась скорость свертывания крови (в аппарате Данилина). В ряде опытов определялась способность взятых проб крови к свертыванию под влиянием прибавления избыточного количества тромбина, а также содержание фибриногена в этих пробах крови (методом Хаув). Опыты эти дали следующие результаты.

В части опытов (14 опытов) кровь, взятая от опытного животного через 5—10 минут после введения наших препаратов, совершенно не свертывалась. У некоторых животных пробы крови, взятые и позже (через 30, 60 и даже 120 минут после введения препарата), также не свертывались.

Прибавление тромбина, даже в очень больших количествах, не свертывало такой жидкой крови. Проба на наличие фибриногена в таких пробах была всегда отрицательной. Таким образом, введение препаратов фибриногеназы в циркулирующую кровь вызывает, как и в опытах *in vitro*, полное исчезновение фибриногена и несвертываемость крови. Этими опытами получен новый вид экспериментальной гемофилии: «афибриногенемия».

Быстроту исчезновения фибриногена из циркулирующей крови (в ряде опытов через 2—3 минуты) после введения активных глобулинов можно сопоставить с быстрым исчезновением фибриногена из крови в момент внезапной смерти (¹⁻³). Этот факт является подтверждением теории В. С. Ильина о причинах жидкого состояния крови внезапно погибших людей (появление активной фибриногеназы в крови в момент внезапной смерти), а также активации фибриногеназы при анафилактическом, пептоновом и гетеро-трансфузионном шоках.

В части опытов после введения активных глобулинов в кровь морских свинок явление полной несвертываемости крови и исчезновение фибриногена из этой крови наблюдались непродолжительное время (до 10 минут после введения активных глобулинов). В этих опытах уже через 10—15 минут после введения глобулинов в крови появлялся фибриноген и постепенно восстанавливалась способность крови к свертыванию. В этих случаях применялась меньшая дозировка препарата или, возможно, препарат обладал меньшей активностью. Эти опыты поучительны в том отношении, что позволяют подойти к изучению способности печени компенсаторно выбрасывать в сосудистое русло значительные количества фибриногена.

В 9 опытах после введения активных глобулинов в сердце морских свинок мы наблюдали только более или менее резкое замедление свертываемости крови.

В качестве контроля к нашим опытам мы вводили в сердце морских свинок препараты фибриногеназы, инактивированные нагреванием (40 минут при 58°). В этих случаях никакого изменения в свертываемости крови не наблюдалось.

Таким образом, во всех наших опытах по проверке активности сухих препаратов фибриногеназы *in vivo* мы получили, повидимому, одно и то же явление — фибриногенолиз в циркулирующей крови, но в различной степени. Разная степень эффективности препаратов могла зависеть от различной дозировки, различной активности препаратов, а также, возможно, и от различной способности морских свинок отвечать на введение фибриногеназы новообразованием фибриногена или, что тоже возможно, нейтрализацией активности введенного энзима выработкой тормозящих веществ (², ³).

Нельзя не упомянуть о том, что за последние годы в литературе появились описания нескольких случаев гемофилии и у людей, характеризующихся отсутствием фибриногена в крови. В одном из этих случаев (врожденная афибриногемия у девочки 13 лет) наиболее радикальным способом борьбы с частыми кровотечениями у больной являлось внутривенное введение растворов фибриногена. Это лечебное мероприятие производило всегда лишь временный эффект: фибриноген довольно быстро исчезал из крови (⁴). Этот факт, как нам кажется, может быть истолкован как новое доказательство проявления действия фибриногеназы в живом организме, в соответствии с взглядами, развиваемыми В. С. Ильиным (², ³) на значение фибриногеназы для обмена фибриногена в организме.

Положительное разрешение вопроса о получении сухих, активных и стерильных препаратов фибриногеназы, а также эффективность их действия при введении в циркулирующую кровь создают предпосылки для дальнейших исследований. В первую очередь нами намечена работа по дальнейшей очистке и обогащению наших препаратов и по изучению механизма их действия в организме. В случае успешного хода намеченных исследований будет произведена попытка применения этих препаратов в клинике.

Ленинградский научно-исследовательский
институт переливания крови
и Ленинградский государственный
стоматологический институт

Поступило
7 III 1950

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. С. Ильин, Тр. Сталинабадск. мед. ин-та, **1**, 107 (1941). ² В. С. Ильин, Усп. соврем. биологии, **26**, № 3, 853 (1948). ³ В. С. Ильин, Биохимия, **14**, № 4, 354 (1949); Т. В. Вольфсон, Биохимия, **14**, № 5, 409 (1949). ⁴ J. L. Pinniger and F. T. G. Prunty, Brit. Journ. Exp. Pathol., **27**, 200 (1946).