

БИОХИМИЯ

З. А. ЧАПЛЫГИНА

**СУХИЕ ПРЕПАРАТЫ ФИБРИНОГЕНАЗЫ  
И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ГЕМОФИЛИЯ**

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

Исследованиями В. С. Ильина и его сотрудников (<sup>1-3</sup>) 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) энзим — фибриногеназа. ТермоЛабильность 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 энзима в сухом виде. Как известно, энзимы 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 энзимной 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 (<sup>2</sup>)). 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 фибриногенолитической 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 фибриногенолитической 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 высшенного и свежего легкого приготовлялись экстракти 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 рН 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	№ серии опытов			Объект исследования	Время фибриногенолиза	
1	12	Нативная трупная кровь . . . . .	2 ч. 21 м.	2	11	Нативная трупная кровь . . . . .	2 ч. 35 м.	2 ч. 30 м.	
		Сухая трупная кровь . . . . .	2 ч. 12 м.						
3	6	Экстракты легкого . . . . .	1 ч. 14 м.	4	6	Экстракты легкого . . . . .	1 ч. 27 м.	1 ч. 15 м.	
		Экстракты высушенного легкого . . . . .	1 ч. 09 м.						
5	10	Раствор активных глобулинов . . . . .	19,1 м			Раствор активных глобулинов . . . . .	20,9 м		
		Раствор сухих активных глобулинов . . . . .							

Для испытания полученных сухих активных глобулиновых препаратов фибриногеназы на кровь в опытах *in vivo* мы подвергли эти пре-  
356

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 свернулись.

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».

Быстрооту 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 (<sup>1-3</sup>). 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-трансфузационном 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 — фибринолиз 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<sup>(2, 3)</sup>.

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 афибриногенемия 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<sup>(4)</sup>. Этот факт, как нам кажется, может быть истолкован как новое доказательство проявления действия фибриногеназы в живом организме, в соответствии с взглядами, разрабатываемыми В. С. Ильиным<sup>(2, 3)</sup> 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

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