

Б. А. КУДРЯШОВ и П. Д. УЛИТИНА

ИЗУЧЕНИЕ ТРОМБОПЛАСТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ КРОВИ

(Представлено академиком В. А. Энгельгардтом 6 VII 1954)

В предшествующих сообщениях были приведены экспериментальные доказательства, свидетельствующие о том, что в плазме крови содержится активатор протромбокиназы — тромботропин (¹⁻⁶). Тромботропин взаимодействует с протромбокиназой и превращает ее в активную тромбокиназу, необходимую для конверсии протромбина в тромбин. Исходя из этих данных, можно допустить, что количество тромбокиназы, возникающей при свертывании крови, должно находиться в зависимости от двух условий: от концентрации в плазме тромботропина и от полноценности источника протромбокиназы. Недостаток того или другого компонента неизбежно должен лимитировать образование тромбокиназы. Настоящее исследование посвящено экспериментальной проверке вышеизложенной гипотезы.

Материал и метод. До настоящего времени не разработано достаточно точных методов определения в относительных количественных показателях тромбокиназы, возникающей из протромбокиназы кровяных пластинок. В основу предлагаемого метода мы положили следующий принцип. Известно, что после энергичного центрифугирования, в связи с удалением из плазмы кровяных пластинок, оксалатная плазма при рекальцификации имеет длительное время свертывания. Если к такой плазме в момент рекальцификации добавить некоторое количество крови, тем или иным путем достаточно очищенной от протромбина и тромбина, то вследствие наличия в этой крови протромбокиназы пластинок или тромбокиназы, возникшей из этой протромбокиназы, контрольная плазма свернется в несколько раз быстрее. При этом скорость свертывания контрольной плазмы должна находиться в зависимости от концентрации протромбокиназы или тромбокиназы в испытуемой крови. Практически эта реакция нами осуществлялась следующим образом. У крыс, с весом тела от 130 г и выше, из яремной вены при помощи шприца берется 0,5 мл крови. Кровь немедленно выливается в пробирку с 0,5 мл 0,85% раствора NaCl и тщательно перемешивается.

Через несколько минут при комнатной температуре в пробирке образуется сгусток, который растирается стеклянной палочкой до однородной массы. После этого пробирка с кровью помещается в лед и хранится в холодильнике. Все дальнейшие манипуляции с этой кровью должны производиться не ранее, чем через 30 мин. после взятия крови из вены.

Для получения контрольной плазмы из яремной вены у крыс берется достаточное количество крови, которая немедленно перемешивается с 0,1 М раствором щавелевокислого натра и помещается в пробирку, охлажденную во льду. На 9 объемов крови следует брать точно 1 объем раствора оксалата. Оксалатная кровь центрифугируется при 2500 об/мин в течение 10—15 мин. После центрифугирования плазма при помощи пипетки осторожно отделяется от форменных элементов крови и помещается в отдельную пробирку. Эта контрольная плазма подвергается сле-

дующей проверке. В пробирку (с внутренним диаметром 0,8 см) берется 0,1 мл 0,025 М раствора CaCl_2 и 0,1 мл 0,85% раствора NaCl , после чего пробирка помещается в водяную баню при 37° (точно!). Через 5 сек. в пробирку добавляется 0,1 мл контрольной плазмы, и с этого момента отсчитывается время, необходимое для образования сгустка. Контрольная плазма считается пригодной для работы, если сгусток образуется в

Таблица 1

Число животных-доноров	Тромбопластич. активность крови в %	Средн. время свертывания контр. плазмы в сек.
144	100	20,5
52	50	21,5
90	33	24,0
75	20	26,7
63	10	32,7
44	5	41,0
16	2,50	55,0
13	1,25	67,0
12	0,6	74,5
12	0,3	80,7
144	0,0	86,0

течение 84—87 сек. Такая плазма пригодна для производства анализов в течение 2—2,5 час.

После подготовки контрольной плазмы пробирка с испытуемой кровью извлекается из рефрижератора и помещается в водяную баню на 10 мин. при температуре 57° (точно!), после чего быстро охлаждается во льду и центрифугируется при 1000 об/мин в течение 1—2 мин. Хранить такую прогретую кровь следует во льду и не более 8—10 мин. до производства анализа ввиду возможного процесса инактивации тромбокиназы.

Анализ тромбопластической активности крови производится следующим образом. В сухую пробирку (с внутренним диаметром 0,8 см) набирается 0,1 мл 0,025 М раствора CaCl_2 и 0,1 мл испытуемой крови. Пробирка погружается в водяную баню при 37°. Через 5 сек. в нее добавляется 0,1 мл контрольной

оксалатной плазмы, и с этого момента производится отсчет времени, необходимого для образования сгустка. Эта реакция повторяется 2—3 раза, с целью контроля. Установленное время свертывания будет характеризовать тромбопластическую активность испытуемой крови.

Таблица 2

	Число животных-доноров	Средн. тромбопластич. активность в %
Кровь	64	97,2
Плазма с пластинками . .	64	99,9
Плазма без пластинок . .	115	2,3
Эритроцитарная масса . .	47	12,0

активности кровь смешивалась с 0,85% раствором NaCl в отношении 1 : 1. Из этой смеси путем соответствующего разбавления солевым раствором приготавливались растворы с 50, 33, 20, 10% и более низкой активностью.

Результаты эксперимента. Изучение тромбопластической активности крови нормальных крыс дало результаты, приведенные в табл. 1, где дано среднее время свертывания контрольной плазмы крыс при рекальцификации ($t = 37^\circ$) в зависимости от степени тромбопластической активности нормальной крови крыс, смешанной в разных объемах с 0,85% раствором NaCl .

Для выяснения вопроса о том, от каких компонентов крови зависит ее тромбопластическая активность, была изучена тромбопластическая активность цельной оксалатной крови после ее предварительной рекальцификации, а также, в тех же условиях, плазмы, содержащей кровяные пластинки, плазмы, очищенной от пластинок путем центрифугирования, и,

наконец, эритроцитарной массы, полученной при помощи слабого центрифугирования и удаления плазмы с пластинками (см. табл. 2).

Из данных табл. 2 видно, что тромбопластическая активность выше в той фракции крови, в которую переходит основная масса кровяных пластинок. Однако этот опыт не дает ответа на вопрос о значении тромботропина плазмы в проявлении тромбопластической активности крови.

В работе (7) было показано, что введение в организм животных дикумарина приводит не только к гипопротромбинемии, но и вызывает резкое снижение в плазме крови концентрации тромботропина. Используя эти данные, мы вызвали резкую гипотромботропинемию у взрослых крыс путем внутримышечных инъекций по 2 мг дикумарина, растворенного в 1% растворе соды. Инъекции делались ежедневно, в течение 5 дней. Контрольные животные получали инъекции содового раствора. От подопытных и контрольных животных бралась кровь для анализа через 13—14 час. после каждой инъекции. Результаты этого эксперимента приведены в табл. 3.

Резкое снижение тромбопластической активности крови после инъекций дикумарина нельзя объяснить уменьшением содержания протромбокиназы в кровяных пластинках или уменьшением числа самих пластинок. Экстракт, полученный из пластинок, выделенных путем фракционного центрифугирования крови, был одинаково активен как в опыте, так и в контроле. Следовательно, снижение тромбопластической активности крови после введения животным дикумарина происходит вследствие недостатка тромботропина в плазме. При недостатке тромботропина в испытуемой крови протромбокиназа кровяных пластинок не превращается в тромбокиназу, в связи с чем резко падает тромбопластическая активность.

На основании изложенного можно придти к заключению, что тромбопластическая активность крови находится в зависимости от полноценности источника кровяной протромбокиназы (кровяные пластинки) и от концентрации в плазме тромботропина, необходимого для превращения протромбокиназы в тромбокиназу.

Таблица 3

Изменение средней тромбопластической активности крови крыс после введения им дикумарина (в %)

До введения	Число инъекций					Число животных
	1	2	3	4	5	

Введение дикумарина

100 | 68,2 | 14,0 | 4,4 | 7,3 | 3,3 | 32

Введение содового раствора (контроль)

98,8 | 99,4 | 100 | 100 | 98,6 | 95,2 | 12

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
6 VII 1954

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ Б. А. Кудряшов, ДАН, 60, 1469 (1948). ² П. Д. Улитина, Б. А. Кудряшов, ДАН, 77, 673 (1951). ³ Б. А. Кудряшов, П. Д. Улитина, ДАН, 84, 563 (1952). ⁴ Б. А. Кудряшов, Л. И. Муравьева, П. Д. Улитина, ДАН, 88, 711 (1953). ⁵ Б. А. Кудряшов, Е. Е. Яскина, ДАН, 95, № 1 (1954). ⁶ Б. А. Кудряшов, Т. М. Калишевская, ДАН, 96, № 5 (1954). ⁷ Г. В. Андреев, ДАН, 61, 1117 (1948).