

Министерство здравоохранения СССР
Полтавский медицинский стоматологический институт

**Гемокоагулирующие и фибринолитические
свойства слюны в диагностике
воспалительных процессов
челюстно-лицевой области**

[Методические рекомендации]

Полтава, 1981

Министерство здравоохранения СССР
ПОЛТАВСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ
СТОМАТОЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ

„Утверждены“
Ученым Советом Полтавского
медицинского стоматологического
института 20-02-81

Гемокоагулирующие и фибринолитические свойства слюны в диагностике воспалительных процессов челюстно-лицевой области

(Методические рекомендации)

Полтава, 1981

В составлении методических рекомендаций принимали участие: канд. мед. наук Ю. К. Сахаров, профессор В. П. Мищенко, доцент Н. П. Мозговой.

Ответственный за подготовку методических рекомендаций — ректор Полтавского медицинского стоматологического института профессор В. А. ДЕЛЬВА.

В методических рекомендациях излагается роль гемокоагулирующих и фибринолитических свойств слюны в диагностике воспалительных процессов в полости рта, слюнных железах и челюстно-лицевой области в целом. Описываются простые и доступные методы исследования коагулирующих свойств слюны, ее фибринстабилизирующей и фибринолитической активности. Рекомендации помогут стоматологам, хирургам отоларингологам, врачам-лаборантам в диагностике и контроле за лечением воспалительных процессов в челюстно - лицевой области и смежных отделах.

Слюна содержит факторы свертывания крови и фибринолиза. Наличие этих соединений играет значительную роль в регуляции свертывания крови и фибринолиза, а также в местном гемостазе и репаративных процессах при повреждениях и воспалениях тканей полости рта, челюстей и слюнных желез.

Повышенная концентрация факторов гемокоагуляции в слюне стимулирует фибринообразование. Последнее способствует надежному гемостазу и предотвращает доступ инфекции вглубь раны тканей полости рта и слюнных желез. Вместе с тем, резкое увеличение коагулирующей активности крови и содержание факторов свертывания в слюне может приводить к тромбозу сосудов в области травмы или воспаления. Эти явления нарушают трофику костной ткани, оттягивают сроки реваскуляризации, что значительно отягощает течение патологических процессов в тканях полости рта и слюнных желез, делает их длительными, незаживающими.

Источником прокоагулянтных свойств слюны являются не только эпителиальные клетки и форменные элементы крови, но также секрет слюнных желез и собственно железистая ткань. Поэтому определение активности и концентрации этих веществ в слюне является важным доказательством функционального состояния слюнных желез.

Наконец, описан параллелизм между содержанием факторов гемокоагуляции в слюне и крови, что позволяет сделать вывод о роли слюнных желез в регуляции процесса свертывания крови. По характеру коагуляционных свойств слюны можно определять и степень их нарушений в крови при самых различных патологических процессах в организме.

Таким образом, определение и оценка гемокоагулирующих и фибринолитических свойств слюны может иметь как диагностическое значение, так и является тестом ориентации для врача при использовании препаратов, влияющих на свертывание крови и фибринолиз.

Увеличение концентрации активаторов фибринолиза в крови и слюне в начале многих патологических процессов в полости рта может оказать отрицательное влияние на фибриновый сгусток, например, соединяющий края раны (при травмах, переломах челюстей;

экстракты зуба и т. п.). В результате такого контакта со слюной, обогащенной активаторами фибринолиза, сгусток крови растворяется, разъедает раневую поверхность; снижает ее заживление и репарацию.

Увеличение концентрации антифибринолитических агентов в этот момент, наоборот, способствует процессу заживления ран в полости рта.

Фибринолитические свойства слюны зависят, в основном, от наличия в слюне клеточных элементов — лейкоцитов и микрофлоры. Однако, если исследовать слюну, очищенную центрифугированием от клеток и их мембран, то также определяются фибринолитические свойства чистой слюны, что может служить диагностическим тестом многих патологических состояний в полости рта, слюнных железах и ряде внутренних органов.

Таким образом, изучение факторов свертывания и фибринолиза в слюне здоровых и больных людей может способствовать разработке новых методов диагностики, лечения и профилактики различных патологических процессов в полости рта и слюнных железах.

Необходимость таких исследований очевидна. Однако, в стоматологической практике она еще не нашла достаточного распространения в связи с отсутствием четких рекомендаций по изучению коагулирующих и фибринолитических свойств слюны. Сказанное и заставило нас написать данные методические рекомендации. Предлагаемые методы не сложны, доступны любой стоматологической клинике.

Для более успешной реализации предлагаемых рекомендаций мы приводим в них краткий перечень необходимого лабораторного оборудования и реактивов, а также методов исследования коагулирующих и фибринолитических свойств слюны.

ОБОРУДОВАНИЕ

Рекомендуемые исследования требуют создания коагулологической лаборатории, оснащение которой несложно, ибо необходимые аппаратура и реактивы не являются дефицитными. Эта лаборатория должна иметь следующее оборудование:

1. Водяная баня с автоматическим терморегулятором, поддерживающим температуру 37 градусов.
2. Клиническая центрифуга ЦЛК-1 со скоростью вращения от 1000 до 3000 об/мин.
3. Суперцентрифуга ЦММ-1 со скоростью вращения до 8—10 тысяч об/мин.
4. Холодильник.

5. Торсионные весы (ВТ-500).
6. Весы для уравнивания пробирок.
7. Секуидомеры.
8. Пробирки центрифужные (градуированные и не градуированные).
9. Штативы для пробирок (на 10, 20, 40 пробирок).
10. Градуированные пипетки на 0,1 мл, 0,2 мл, 1,0 мл, 5,0 мл, 10,0 мл.
11. Цилиндры и мензурки разной емкости.
12. Химические стаканы емкостью 50, 100, 200 и 500 мл.
13. Банки или пузырьки с притертыми пробками на 50, 100, 500 и 1000 мл.
14. Стеклянные палочки.
15. Карандаши для стекла.
16. Чашки Петри.
17. Фильтровальная бумага.
18. Бесы лабораторные.
19. Малый сушильный шкаф (термостат № 3).
20. Термостат электрический суховоздушный ТС-80.

РЕАКТИВЫ

1. 0,9 проц. раствор хлористого натрия.
2. 0,277 проц. раствор хлористого кальция.
3. Тромбин в порошке (Каунасского завода бак. препаратов).
4. Фибриноген (бычий, Каунасского завода бак. препаратов).
5. Фибринолизин.
6. Стрептокиназа (изготовления Ленинградского института переливания крови).
7. 1-проц. раствор уксусной кислоты.
8. Раствор гепарина — 2 ед. в 1 мл. физиологического раствора.
9. Боратный буфер (1 г. буры в 1 литре 0,9 проц. раствора хлористого натрия).
10. Вероналовый буфер Рн 7,6 (0,1 молярный раствор медиала 66,2 мл + 33,8 мл 0,1 н раствора соляной кислоты).
11. Стандартная плазма (способ приготовления: донорская кровь IV группы центрифугируется 30 мин. при 3000 об/мин., и полученная плазма хранится в холодильнике в замороженном состоянии, лучше при —10—12 градусах и в мелких пузырьках по 5, 10, 15 мл. После размораживания плазма пригодна для однократного исследования).

ЗАБОР СЛЮНЫ

Слюна собирается в чистую пробирку после прополаскивания полости рта кипяченой водой в течение 5 минут (первая порция). Для получения чистой паротидной слюны применяется капсула Красногорского (вторая порция). При исследовании больных с заболеланием полости рта исследуется как первая, так и вторая порция слюны. Для оценки нарушения свертываемости крови подлежит изучению только вторая порция, полученная после осаждения всех клеточных элементов (центрифугирование при 8—10 тыс. об/мин. в течение 20 минут).

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ КОАГУЛИРУЮЩИХ СВОЙСТВ СЛЮНЫ

1. Определение тромбопластической активности слюны.

Принцип определения тромбопластической активности слюны основан на определении времени свертывания стабилизированной стандартной плазмы (VI группы) после добавления в нее оптимального количества хлористого кальция. Время рекальцификации такой плазмы характеризует преимущественно ее тромбопластическую активность. Если в одну из пробирок (контроль) добавить 0,1 мл. физраствора $\text{№}2\text{CaCl}_2$, а в другую слюну разведенную в соотношении 1:10 в физрастворе или цельную в том же объеме, то разница во времени контроля и опыта позволяет сделать заключение о тромбопластической активности исследуемой слюны. Укорочение времени рекальцификации плазмы под влиянием слюны по сравнению с контролем будет свидетельствовать о наличии в слюне тромбопластических соединений (с разведением слюны их активность будет падать), удлинение — об их отсутствии или слабой активности. При гиперкоагуляции происходит увеличение тромбопластических свойств слюны, при гипоккоагуляции — наоборот, их снижение.

Техника определения.

К 0,1 мл стандартной плазмы добавить 0,1 мл слюны (в контроле 0,1 мл 0,9 проц. раствора хлористого натрия) и поставить в термостатированную баню (37 град. С) на 60 сек. Затем добавить в каждую пробирку по 0,2 мл. хлористого кальция 0,277 проц. и пустить секундомер. Отметить время появления нитей фибрина или сгустка.

Для большей убедительности определения тромбопластической активности слюны ставится тест на потребление протромбина в сыворотке, отделившейся из сгустка плазмы при добавлении в нее фибриногенотромбопластиновой смеси. Принцип: в течение 1 часа после образования сгустка (в результате рекальцификации) в стеклянной

пробирке вследствие образования кровяного тромбoplastина почти весь протромбин плазмы переходит в тромбин и таким образом потребляется. Если в исследуемой слюне имеется тромбoplastин или протромбин, то протромбин стандартной плазмы после определения времени рекальцификации неполностью превращается в тромбин и в большом количестве остается в сыворотке. По количеству оставшегося в сыворотке протромбина (непотребившегося) судят о содержании тромбoplastина в слюне.

Техника исследования.

После определения времени рекальцификации сгусток инкубируется при 37 град. в течение 1 часа. После этого стеклянной палочкой осторожно отжимают сгусток и пипеткой отсасывают 0,1 мл сыворотки в другую пробирку (прогретую при 37 град. 60 сек), в которую добавлено 0,2 мл смеси (0,4 проц. раствора фибриногена на физрастворе — 1 часть + 2 части 2 проц. взвеси тромбoplastина в дистиллированной воде) и 0,1 мл 0,227 проц. хлористого кальция. Пускается секундомер и отмечается время появления фибрина.

Чем быстрее появится фибрин, тем больше протромбина осталось в сыворотке, тем хуже его потребление и, наоборот, если при использовании сыворотки, взятой из пробирки, в которую была добавлена слюна при определении времени рекальцификации, время будет больше контроля, то это свидетельствует о повышении тромбoplastической активности.

2. Определение антигепариновых и антикоагулянтных свойств слюны.

Косвенно эти свойства слюны могут быть оценены при определении тромбинового времени и толерантности плазмы к гепарину. В первом случае принцип метода заключается в следующем: плазма свертывается тромбином определенной активности (в контроле — 30 сек). Если тромбиновое время в присутствии слюны будет замедляться, то это свидетельствует о наличии в ней антикоагулянтов типа антитромбинов. Укорочение тромбинового времени по сравнению с контролем свидетельствует о наличии в слюне антигепариновой активности.

Техника определения.

К 0,1 мл стандартной плазмы добавить 0,1 мл слюны (для контроля 0,1 мл физраствора) и через 60 сек термостатирования при 37 град. добавить в каждую пробирку 0,1 мл стандартного раствора тромбина (активностью 30 сек) и пустить секундомер. Отметить время появления сгустка.

Приготовление стандартного раствора тромбина. Порошкообразный тромбин (лучше Каунасского завода бакпрепаратов) объемом примерно в спичечную головку высыпать в сухую центрифужную пробирку и добавить в нее 4 мл физраствора, хорошо размешать стеклянной палочкой и поставить в холодильник при $+4-2$ град. на 1 час. Этот базисный раствор тромбина может храниться в холодильнике до 1 месяца при указанной температуре. Из этого раствора путем последовательного разведения в нескольких пробирках подбирается такая концентрация тромбина, которая способна свернуть стандартную плазму с физраствором за 30 секунд. Для предотвращения уменьшения активности стандартный раствор тромбина и плазму во время работы лучше всего хранить в стакане со льдом.

Об этих же свойствах можно судить и по определению толерантности плазмы к гепарину.

Принцип основан на определении времени рекальцификации плазмы при добавлении к ней стандартного количества гепарина. Толерантность плазмы к гепарину характеризует ее свертывающую способность в целом. Однако время этой пробы будет зависеть от содержания в слюне естественных антикоагулянтов (антитромбинов) и антигепаринового фактора. Чем выше концентрация первых веществ в слюне, тем в большей степени удлиняется время толерантности плазмы к гепарину, и, наоборот, снижение концентрации естественных антикоагулянтов в слюне сокращает время этого теста по сравнению с контролем. Толерантность плазмы к гепарину хорошо выявляет изменения коагулологических свойств слюны при гипер и гипокоагуляции, точно отражая сдвиги системы свертывания крови при различной патологии.

Техника определения.

К 0,1 мл стандартной плазмы добавить 0,1 мл гепарина (2 ед в 1 мл физраствора) и 0,1 мл слюны (в контроле 0,1 мл физраствора), поставить пробирку в термостат при 37 град. на 60 сек. после чего добавить 0,2 мл 0,277 проц. раствора хлористого кальция и включить секундомер. Отметить время появления крошек или нитей фибрина.

3. Определение фибринстабилизирующей активности слюны.

Принцип этого способа основан на учете времени растворения сгустка фибрин-мономера в оксалате мочевины. Чем дольше не происходит растворение сгустка, тем выше активность фибриназы. Изменение активности фибриназы стандартной плазмы при добавлении слюны ведет к нарушению процесса образования нерастворимого фибри-

на, в результате чего различный по полноценности структуры сгусток растворяется в растворе щавелевокислой мочевины с неодинаковой скоростью. Ускорение растворения сгустка при добавлении слюны по сравнению с контролем (физраствор) свидетельствует о снижении активности фибринстабилизирующего фактора в слюне и, наоборот — замедление этого процесса — об усилении фибриназной активности.

Техника определения.

В пробирку вносят 0,1 мл плазмы, 0,1 мл исследуемой слюны (в контрольную пробирку 0,1 мл физраствора) 0,05 мл 0,3 проц. монободуксусной кислоты и 0,2 мл 0,277 проц. хлористого кальция. После чего пробирку на 20 минут помещают в водяную баню при 37 град. По истечении указанного срока в пробирку добавляют 1,0 мл щавелевокислой мочевины и добиваются отделения («всплытия») сгустка от стенок пробирки путем ее переворачивания на пальце. При наблюдении за растворением сгустка он не должен контактировать со стенками пробирки, уменьшающими площадь соприкосновения с раствором, поэтому пробирка периодически осторожно (без встряхивания!) переворачивается вверх дном на пальце. Секундомер включается в момент внесения раствора мочевины, а выключается при полном лизисе сгустка. (Приготовление 0,12 проц. раствора кислой щавелевокислой мочевины. 2,4 г мочевины растворить в 8 мл дистиллированной воды. Добавить еще 72,0 мл воды. Затем смешать с 80,0 мл 0,1 и раствора щавелевой кислоты и добавить 160,0 мл дистиллированной воды. Получается 320,0 мл. 0,12 проц. раствора щавелевокислой мочевины. Хранить раствор в холодильнике).

4. Определение фибринолитической активности слюны.

1) Эуглобулиновый метод.

Основан на осаждении в кислой среде и при низкой температуре фракции эуглобулинов, в которой содержится около 25 проц. фибриногена, протромбин, факторы V, VIII, XIII, плазминоген и активаторы фибринолиза. Укорочение времени лизиса по сравнению с контролем говорит об усилении фибринолитической активности слюны, а удлинение — о ее снижении.

Техника определения.

В центрифужные пробирки наливают по 8 мл дистиллированной воды, 0,15 мл 1 проц. уксусной кислоты и 0,5 мл стандартной плазмы. Пробирки помещают в холодильник при +4 град на 30—40 мин. После чего центрифугируют при 1500 об/мин в течение 5 минут для осаждения эуглобулинов. Жидкость над осадком сливают, а про-

бирки не более 1 минуты высушивают опрокидыванием на фильтровальную бумагу.

Затем в пробирки наливают по 0,5 мл боратного буфера и растворяют осадок, помешивая его стеклянной палочкой. После чего добавляют 0,1 мл слюны (в контроле 0,1 мл физраствора), свертывают смесь 0,2 мл 0,277 проц. раствором хлористого кальция и ставят в водяную баню при 37 град. Отмечают время растворения сгустка.

а) Определение фибринолитических компонентов слюны методом фибриновых пластин.

Принцип метода основан на нанесении в секторы фибриновых пластинок, приготовленных на вероналовом буфере рН7,6 разных комбинаций отдельных компонентов фибринолитической системы с исследуемой слюной и без нее. Фибриноген, из которого готовятся фибриновые пленки, содержит плазминоген, который при прогревании при 85 град. С в течение 45 мин. теряет способность переходить в плазмин. Наличие или отсутствие агентов фибринолиза определяется по величинам зон лизиса фибрина на горячих и негорячих пластинках. Если площадь зоны лизиса фибрина на негорячих чашках в первом секторе больше, чем во втором, то в исследуемой слюне имеется праактиватор плазминогена. Большая площадь растворения фибрина в первом секторе негорячих пластин по сравнению с первым сектором на горячих пластинках свидетельствует о присутствии активатора плазминогена. Если площадь зоны лизиса во втором секторе больше, чем в первом на горячих пластинках, то в слюне присутствует плазминоген. Наличие зоны лизиса в первом секторе горячих чашек — в слюне есть плазмин, а меньшая зона лизиса в четвертом секторе по сравнению с пятым на негорячих чашках свидетельствует о наличии в слюне антиплазмина.

Техника определения.

Приготовление фибриновых пластин. Чистые сухие малые чашки Петри расчерчиваются с нижней стороны стеклографом на пять равных секторов.

Один из способов разметки чашек:

Делается пометка для различения гретых чашек и негретых. Нумеруются секторы и ставится шифр различения чашек по порядку исследования. В малую чашку на середину ее выливается 0,2 мл раствора тромбина (100 мг сухого тромбина на 10 мл физраствора) и 9 мл раствора фибриногена (из расчета 30 мг сухого фибриногена на 1 чашку), быстро перемешивается покачиванием и ставится на горизонтальную поверхность на 10—15 минут, прикрыв крышкой. Чашки с пометкой «гретые» прогревают в малом сушильном шкафу при 85 град. 45 минут для инактивации плазминогена. Готовые остывшие чашки с фибриновыми пленками можно хранить в холодильнике при температуре от +2 град. до +4 град. не более 2-х—3-х суток.

Для исследования одной пробы слюны необходимы одна гретая и негретая фибриновая пластина.

На поверхность гретых и негретых фибриновых пластин наносят по 0,03 мл исследуемую слюну в 1-й, 2-й и 4-й секторы; стрептокиназу (150 ед в 0,1 мл физраствора — 5 мг сухой стрептокиназы растворить в 15 мл физраствора, хранить в холодильнике 1 месяц) во 2-й и 3-й секторы; фибринолизин (60 ед. в 1 мл физраствора, 3 мг сухого фибринолизина растворить в 2,5 мл физраствора, раствор готовится непосредственно перед нанесением и хранению не подлежит) в 4-й и 5-й секторы; физиологический раствор в 1-й, 3-й и 5-й секторы. Все жидкости (по 0,03 мл) наносятся на одно и то же место т. е. последующая капля, на имеющуюся в секторе. Всего в каждой чашке должно быть пять капель по числу секторов, каждая из которых должна иметь в своем составе два раствора. После нанесения на чашку капель реактивов и субстрата они помещаются в суховоздушный термостат при 37 град. Спустя 18 часов измеряют зоны лизиса фибрина во всех секторах. Для чего определяют циркулем два взаимноперпендикулярных диаметра зоны лизиса и вычисляют площадь зоны лизиса в кв. миллиметрах по следующей формуле:

где:

Π — число 3,14.

$D/1$ — первый диаметр в мм

$D/2$ — второй диаметр в мм,

C — площадь зоны лизиса в кв. мм.