

7. Kalishevskaya T. M., Golubeva M. G., Bashkov G. V. Efficient thrombolysis by the combination of complex plasmin-heparin with the α -adrenoceptor blocking agent // «Fibrinolysis», 8th Intern. Congr. of Fibrinol.—Austria: Churchill Livingstone.—1986.—Suppl. 1.—Abstr. 358.
8. Kjaeldgaard A., Larsson B., Åsted B. Release of both urokinase and tissue plasminogen activator from veins in vitro // Thromb. Res.—1986.—44.—P. 729—737.
9. Lee K. J., White P. D. A clinical study of the coagulation time of blood // Amer. J. Med. Sci.—1913.—145.—P. 495—500.
10. Nakajima K. Pharmacological observations of plasminogen activator release caused by vasoactive agents in isolated perfused pig ears // Thromb. Res.—1983.—29.—P. 163—174.
11. Nowak G., Markwardt F. The influence of drugs on disseminated intravascular coagulation (DIC). Effects of α -adrenoceptor blocking agents on thrombin-induced DIC in rats. // Ibid.—1981.—22.—P. 417—425.
12. Ruffolo R. R. Distribution and Function of Peripheral α -Adrenoceptors in the Cardiovascular System // Pharmacol., Biochem. and Behav. 1985.—22, N 5.—P. 827—833.
13. Siniziger H. The effect of dihydroergotamine on various platelet function test and venous prostacyclin-formation in men. // Thromb. and Haemostasis.—1985.—53, N 2.—P. 285—286.
14. Wood A. J., Bollin P., Simpson F. O. Prazosin in normal subjects: plasma levels, blood pressure and heart rate // Brit. J. Clin. Pharm.—1976.—3, N 1.—P. 199—201.

Моск. ун-т им. М. В. Ломоносова
М-ва высш. и сред. спец. образования СССР

Поступила 16.10.86

УДК 612.155.12—06:612.89.014.46:615.217.24

Участие α_1 и α_2 -адренорецепторов в осуществлении компенсаторной реакции системы гемостаза на плазмин

Т. М. Калишевская, М. Г. Голубева, Г. В. Башков, М. Е. Григорьева

Фибринолиз — растворение фибринового сгустка плазмином — является важной защитной физиологической реакцией организма, направленной против тромбообразования. Регуляция содержания плазмينا в организме осуществляется посредством ограничения его образования, взаимодействия с основным плазменным ингибитором α_2 -антиплазмином и физиологической компенсаторной реакции системы гемостаза, приводящей к поступлению в кровяное русло ингибиторов плазмينا и прокоагулянтов [1]. Таким образом, наблюдающееся под действием плазмينا начальное торможение свертывания крови и усиление фибринолиза сменяется гиперкоагуляцией и торможением фибринолиза, угрожающих организму тромбозом.

Компенсаторная реакция системы гемостаза на избыток плазмينا в крови развивается в результате активации симпатического отдела вегетативной нервной системы [3]. В экспериментах с использованием α -адреноблокаторов установлено, что конечным участком эфферентного звена компенсаторной реакции на плазмин являются α -адренорецепторы сосудов [2]. Неселективные антагонисты α -адренорецепторов фентоламин, тропafen и дигидроэрготоксин (ДЭТ) блокируют развитие компенсаторной реакции системы гемостаза на плазмин и тем самым значительно пролонгируют его фибринолитические эффекты. Более того, данные препараты вследствие венотонического действия [8] дополнительно повышают фибринолитическую активность крови, освобождая сосудистый активатор плазминогена [9]. Полученные результаты позволяют считать перспективным сочетание α -адреноблокаторов с препаратами фибринолитического и антикоагулянтного действия в лечении тромбозов и эмболий. Применение неселективных α -адреноблокаторов, снижающих артериальное давление и увеличивающих веноз-

ный приток к сердцу, не показано в гипотензивную фазу кардиогенного шока, в то время, как именно в ранние сроки инфаркта миокарда фибринолитическая терапия наиболее эффективна [6].

С целью поиска новых эффективных комбинаций антагонистов α_1 -адренорецепторов с фибринолитическими средствами изучали роль α_1 - и α_2 -адренореактивных структур в осуществлении компенсаторной реакции системы гемостаза на плазмин.

Методика

Плазминоген получали из плазмы крови человека, стабилизированной раствором «ЦОЛИПҚ 7Б», и сырого осадка фракции III по Кону методом биоспецифической хроматографии на лизин-сефарозе («Pharmacia», Швеция) [7]. Плазминоген был гомогенен при электрофорезе в ПААГ-DS-Na и имел молекулярную массу $87\,000 \pm 2\,000$. Плазмин получали активацией плазминогена каталитическими количествами стрептокиназы («Behring AG», ФРГ) или авелизина («Germed», ГДР), растворенных в трис-HCl-буфере (0,05 моль/л, pH 7,4), содержащем 0,15 моль/л NaCl, в течение 20 мин при температуре 37 °C. Молярное соотношение плазминоген / стрептокиназа составляло 1 : 0,05. Казеинолитическая активность плазмина — 5—10 СТА ЕД/мг. Фибринолитическую активность определяли по методу лизиса стандартного сгустка фибрина плазмином [5] и выражали в единицах активности плазмина (ПЕ).

Опыты проведены на белых беспородных крысах средней массой 180—200 г. α_1 -адреноблокатор празозин («Ogion», Финляндия) и α_2 -адреноблокатор йохимбин («Fluka», ФРГ) вводили через зонд в желудок в дозах 2 и 5 мг/кг соответственно. Неселективный α -адреноблокатор дигидроэрготоксин («Spofa», Чехословакия) вводили в яремную вену крыс в дозе 1 мг/кг. Через 30 мин после инъекции α -адреноблокаторов вводили 1 мл плазмина в дозе $1,9\text{—}3,8 \cdot 10^{-6}$ моль/л (500 ПЕ/кг или 1,7 СТА ЕД/кг). В контрольной серии экспериментов вместо α -адреноблокаторов использовали такой же объем физиологического раствора. Кровь для анализа состояния системы гемостаза брали шприцем из v. jugularis до и через 10, 30 и 60 мин после последней инъекции. Кровь стабилизировали 3,8 %-ным раствором цитрата натрия в соотношении кровь/консервант — 9 : 1. В пробах крови определяли: тромбиновое время, ферментативную фибринолитическую активность, активность плазмина и активаторов плазминогена в эуглобулиновой фракции крови на стабилизированных пластинах фибрина [5]; суммарную фибринолитическую активность (СФА) и неферментативную фибринолитическую активность (НФА) на нестабилизированных пластинах фибрина [4]; концентрацию фибриногена сульфитным методом [5]. Графическую регистрацию свертывания рекальцифицированной плазмы крови проводили на тромбоэластографе ГКГМ 4-02 (СССР). Результаты обрабатывали статистически.

Результаты

В первой серии экспериментов изучали влияние на фибринолитическую активность крови плазмина в сочетании с различными α -адреноблокаторами. Установлено, что плазмин (500 ПЕ/кг) вызывает описанную ранее [10] двухфазную реакцию со стороны системы гемостаза: повышение фибринолитической активности, наблюдаемое в первые минуты эксперимента, сменяется торможением фибринолиза — одним из проявлений компенсаторной реакции на плазмин (рис. 1, а). Так, на 10-й минуте после введения плазмина фибринолитическая активность была повышена на 16 % ($P < 0,05$), а через 1 ч понижена на 22 % ($P < 0,05$) по сравнению с исходной. Через 10 мин после введения плазмина на фоне предварительной блокады α -адренорецепторов ДЭТ фибринолитическая активность крови повышалась на 29 % ($P < 0,001$). В сочетании с антагонистом α_1 -адренорецепторов празозином та же доза плазмина на 10-й минуте также увеличивала фибринолитическую активность крови на 214 % ($P < 0,01$). Даже через 1 ч она оставалась повышенной на 170 % по сравнению с исходной. При комбинации плазмина с α_2 -адреноблокатором йохимбином на 10-й минуте эксперимента обнаружено увеличение фибринолитической активности на 29 % ($P <$

$<0,005$), сменявшееся в конце 1-го часа торможением фибринолиза на 36 % ($P<0,005$).

Полученные результаты свидетельствуют, что неселективная блокада α -адренорецепторов ДЭТ и селективная блокада α_1 -адренореактивных структур празозином тормозят развитие одного из проявлений компенсаторной реакции на плазмин — угнетение фибринолиза и тем самым усиливают фибринолитические свойства фермента. При комбинации плазмينا с α_2 -адреноблокатором йохимбином обнаружено тормо-

жение плазминовой активности, начиная с 10-й минуты после введения фермента. Определение плазминовой активности крови показало (рис. 1, б), что неселективная блокада α -адренорецепторов и блокада α_1 -адренореактивных структур исключают ингибирование плазмينا, характерное для компенсаторной реакции системы гемостаза на избыток данного фермента. Превращение плазминогена в плазмин осуществляется его активаторами, которые в значительной мере определяют содержание циркулирующего плазмينا. Установлено, что введение

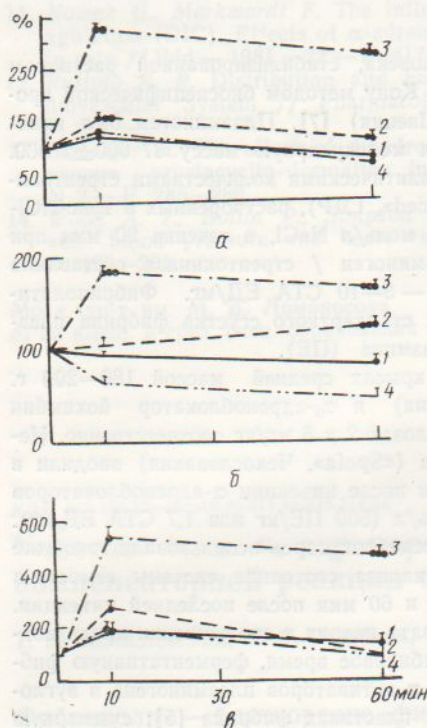


Рис. 1. Влияние плазмينا в сочетании с α -адреноблокаторами ($M \pm m$) на фибринолитическую активность крови:

а — ферментативная фибринолитическая активность, б — активность плазмينا, в — активность активаторов плазминогена (1 — плазмин, 2 — плазмин в сочетании с дигидроэрготоксином, 3 — плазмин в сочетании с празозином, 4 — плазмин в сочетании с йохимбином). По оси абсцисс — время после введения плазмينا, по оси ординат — изменение показателей, % контрольного уровня. За 100 % принято значение показателей до введения препаратов. Каждая экспериментальная группа включала 10–15 животных. — $P<0,5$; .. — $P<0,01$; ... — $P<0,001$.

плазмينا приводит к повышению активности активаторов плазминогена во все сроки наблюдения. На 10-й минуте после инъекции фермента активность активаторов повышена на 79 % ($P<0,05$), а через 1 ч — на 27 % (рис. 1, в; $P<0,05$). По сравнению с плазмином комбинация его с неселективным α -адреноблокатором ДЭТ вызывала более существенное повышение активности активаторов плазминогена. На 10-й минуте после инъекции фермента их активность повышалась на 164 % ($P<0,05$), а к концу 1-го часа возвращалась к исходной. Наибольшее повышение активности активаторов плазминогена обнаружено при введении плазмينا на фоне блокады α_1 -адренорецепторов празозином. На 10-й минуте эксперимента их активность повышалась более чем в 5 раз ($P<0,001$), а через 1 ч — оставалась увеличенной более чем в 4,5 раза ($P<0,001$) по сравнению с исходной. Изменение активности активаторов плазминогена при введении плазмينا в сочетании с α_2 -адреноблокатором йохимбином носило тот же характер, что и при введении одного плазмينا. Это согласуется с полученными ранее результатами об отсутствии влияния α_2 -адреноблокатора на содержание активаторов плазминогена в крови. Таким образом, плазмин, подобно другой сериновой протеиназе системы гемостаза — тромбину [11], вызывает поступление в кровь активаторов плазминогена из сосудистой стенки. При этом несмотря на развитие компенсаторной реакции содержание активаторов плазминогена не изменяется, что свидетельствует о преимущественном ингибировании во время компенсаторной реакции плазмينا, а не активаторов плазминогена. Повышение активности активаторов плазминогена наблюдалось при введении плазмينا в кровь

на фоне неселективной блокады α -адренорецепторов и, в особенности, избирательной блокады α_1 -адренорецепторов. Данный факт объясняется, вероятно, синергическим действием плазмина, ДЭТ и празозина, вызывающих секрецию активаторов пламиногена из сосудистой стенки в кровь.

Состояние противосвертывающей системы организма, одним из компонентов которой является фибринолиз, оценивали по показателям СФА и НФА эуглобулиновой фракции плазмы на нестабилизированных

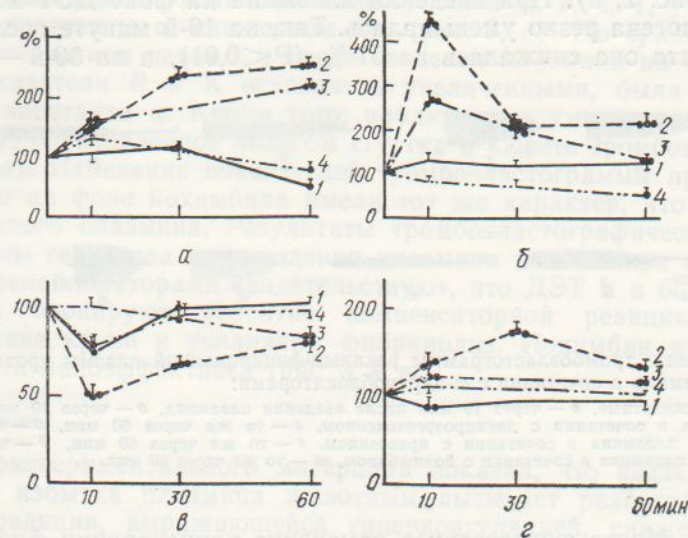


Рис. 2. Изменение показателей (% к контролю) системы гемостаза ($M \pm m$) при введении плазмина в сочетании с α -адреноблокаторами:

а — суммарная фибринолитическая активность, б — неферментативная фибринолитическая активность, в — концентрация фибриногена, г — тромбиновое время. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1.

пластинах фибрина. Установлено, что введение плазмина вызывает повышение СФА в течение 30 мин наблюдения, сменяющееся в конце 1-го часа торможением последней на 47 % ($P < 0,05$) по сравнению с исходной (рис. 2, а). При этом НФА, обусловленная комплексными соединениями гепарина с белками крови, практически не изменяется (рис. 2, б). Уже на 10-й минуте после введения плазмина на фоне ДЭТ значительно возрастает СФА (на 45 %, $P < 0,001$), тогда как НФА увеличивается на 160 % ($P < 0,001$). Оба показателя на протяжении всего периода наблюдения оставались повышенными более чем в 2 раза. Комбинация плазмина с α_1 -адреноблокатором празозином также приводила к существенному повышению СФА, начиная с 10-й минуты и до конца 1-го часа эксперимента. В этих условиях на 10-й минуте после введения плазмина НФА возрастала более чем в 4,5 раза ($P < 0,001$) и через 1 ч также оставалась повышенной на 20 % ($P < 0,01$).

Сочетание плазмина с α_2 -адреноблокатором йохимбином вызывало в течение первых 10 мин увеличение СФА на 28 % ($P < 0,05$), сменявшееся через 60 мин снижением СФА на 22 % ($P < 0,05$). НФА уменьшалась с первых минут эксперимента, и в конце 1-го часа была снижена на 56 % ($P < 0,05$) по сравнению с исходной. Полученные результаты указывают на то, что при развитии компенсаторной реакции на плазмин ингибируется лишь ферментативный фибринолиз, в то время как содержание комплексных соединений гепарина не изменяется. Блокада α -адренорецепторов ДЭТ и α_1 -адренорецепторов празозином препятствует развитию компенсаторной реакции на плазмин. В то же время блокада α_2 -адренорецепторов йохимбином не исключает развития компенсаторной реакции. Более того, йохимбин приводит к усугуб-

лению признаков депрессии противосвертывающей системы при возникновении компенсаторной реакции на избыток плазмينا, что выражается в угнетении НФА.

Определение концентрации фибриногена в плазме крови позволило оценить фибринолитическую активность использованных комбинаций α -адреноблокаторов с плазмином. На 10-й минуте после введения плазмина вызывал снижение концентрации фибриногена на 25 % ($P < 0,05$), которая возвращалась к исходной в конце 1-го часа эксперимента (рис. 2, в). При введении плазмина на фоне ДЭТ концентрация фибриногена резко уменьшалась. Так, на 10-й минуте после инъекции фермента она снижалась на 51 % ($P < 0,01$), а на 30-й — на 33 %

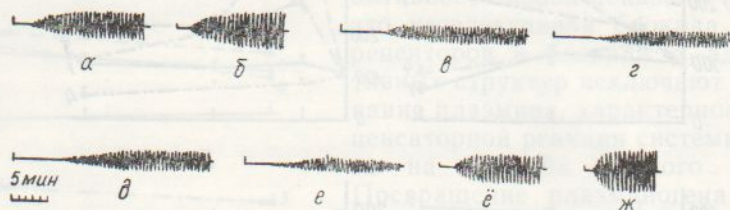


Рис. 3. Типичные тромбозастрограммы рекальцифицированной плазмы крови крыс при введении плазмина в сочетании с α -адреноблокаторами:

а — intactные животные, б — через 10 мин после введения плазмина, в — через 10 мин после введения плазмина в сочетании с дигидроэрготоксином, г — то же через 60 мин, д — через 10 мин после введения плазмина в сочетании с празозином, е — то же через 60 мин, ё — через 10 мин после введения плазмина в сочетании с йохимбином, ж — то же через 60 мин.

($P < 0,001$). Менее существенное изменение концентрации фибриногена отмечалось при комбинации плазмина с α_1 -адреноблокатором празозином. Концентрация фибриногена в этом опыте снижалась на 20 % ($P < 0,01$), и то лишь через 1 ч после введения фермента на фоне действия празозина. Сочетание плазмина с α_2 -адреноблокатором вызывало изменение концентрации фибриногена, подобно наблюдавшемуся под действием одного плазмина. Результаты экспериментов свидетельствуют, что компенсаторная реакция системы гемостаза на плазмин сопровождается увеличением концентрации фибриногена. Неселективный α -адреноблокатор ДЭТ и α_1 -адреноблокатор празозин не только эффективно блокировали развитие данной компенсаторной реакции, но и потенцировали деградацию фибриногена плазмином. Причем комбинация α_1 -адреноблокатора с плазмином вызывала менее выраженный фибринолиз. В результате протеолиза фибриногена и фибрина плазмином образуются продукты деградации фибриногена / фибрина (ПДФ), имеющие антикоагулянтную активность.

В следующей серии экспериментов определяли влияние комбинации плазмина с различными α -адреноблокаторами на антикоагулянтную активность крови, определяемую по тромбиновому времени (рис. 2, г). Введение плазмина вызывало, начиная с 10-й минуты эксперимента, укорочение тромбинового времени на 25 % ($P = 0,01$), что, как установлено ранее [2], является одним из признаков компенсаторной реакции на плазмин. При сочетании плазмина с ДЭТ антикоагулянтная активность плазмы была значительно повышена во все сроки наблюдения: на 10-й минуте — на 34 % ($P < 0,001$), на 30-й — на 69 % ($P < 0,001$) и на 60-й — на 30 % ($P < 0,01$) по сравнению с исходной. Сочетание плазмина с α_1 -адреноблокатором празозином вызывало менее выраженное повышение антикоагулянтной активности (на 10 %, $P < 0,001$), хотя и статистически достоверное. При введении плазмина на фоне йохимбина антикоагулянтная активность плазмы не отличалась существенно от исходной.

Тромбозастрографическое исследование, результаты которого приведены на рис. 3, позволяет оценить общую направленность изменений в системе гемостаза при введении плазмина в сочетании с α -адрено-

блокаторами. Начиная с 10-й минуты, после инъекции плазмينا обнаружены признаки гиперкоагуляции, характерные для компенсаторной реакции на избыток в крови животного данного фермента: уменьшение времени реакции (R), времени образования сгустка (K), константы свертывания крови (t), константы тотального свертывания (T), угловой константы (α) и максимальной амплитуды (Ma) (рис. 3, б).

При комбинации плазмينا с ДЭТ (рис. 3, в) и празозином (рис. 3, д) на 10-й минуте эксперимента обнаружены признаки гипокоагуляции, выразившиеся увеличением показателей R, K, t, T, уменьшением угловой константы α , снижением Ma (рис. 3, в). По сравнению с исходным значением через 1 ч после введения плазмينا на фоне празозина показатели R и K оставались увеличенными, была уменьшена угловая константа α . Кроме того, наблюдалось уменьшение показателей t и T, обусловленное лизисом сгустка в кювете тромбоэластографа (рис. 3, е). Изменения показателей тромбоэластограммы при введении плазмينا на фоне йохимбина имели тот же характер, что и при введении одного плазмينا. Результаты тромбоэластографического анализа системы гемостаза при введении плазмينا в сочетании с различными α -адреноблокаторами свидетельствуют, что ДЭТ и в большей мере празозин блокируют развитие компенсаторной реакции, тормозят свертывание крови и усиливают фибринолиз. Йохимбин в этом отношении был малоэффективен (рис. 3, ё, ж).

Обсуждение

Анализ экспериментального материала показал, что введение относительного избытка плазмينا животным вызывает развитие компенсаторной реакции, выражающейся гиперкоагуляцией, снижением антикоагулянтной и фибринолитической активности крови. При сравнительном анализе фибринолитических эффектов, вызываемых плазмином в сочетании с различными α -адреноблокаторами, установлено, что эффективным средством, тормозящим компенсаторную реакцию на плазмин, является α_1 -адреноблокатор празозин. Это указывает на ведущую роль α_1 -адренорецепторов в реализации эфферентного акта данной реакции.

Наибольшее увеличение содержания активаторов плазминогена и плазмينا в крови наблюдается при комбинации плазмينا с α_1 -адреноблокатором празозином. Однако в случае использования ДЭТ введение плазмينا сопровождается более выраженным фибринолизом и, как следствие, повышением антикоагулянтной активности крови.

Итак, ДЭТ и празозин наряду с их способностью подавлять α -адренорецепцию являются мощными вазоактивными средствами, вызывающими секрецию сосудистого активатора плазминогена. Вместе с тем следует отметить, что празозин, в отличие от неселективного блокатора ДЭТ, имеет ряд особенностей: не оказывает выраженного влияния на венозный тонус и тем самым не увеличивает венозный возврат к сердцу, что дает возможность использовать его с наибольшей эффективностью у больных с диагнозом сердечной недостаточности в случае необходимости применения тромболитической терапии или профилактики тромбообразования. Комбинация празозина с плазмином или с плазмином и гепарином в этих случаях может быть реализована с наибольшей эффективностью.

THE PARTICIPATION OF α_1 - AND α_2 -ADRENORECEPTORS IN THE COMPENSATORY RESPONSE OF THE HAEMOSTASE SYSTEM TO PLASMIN

T. M. Kalishevskaya, M. G. Golubeva, G. V. Bashkov, M. E. Grigorieva

The significance of α -adrenoreceptors in the compensatory response of the haemostase system to plasmin excess has been studied in the experiments on white rats using adrenoreceptors antagonists. The compensatory response manifested in hypercoagulation