

УДК 612.18:612.155.12—06:612.89.014.46:615.217.24

Г. В. Башков, И. Ю. Сергеев, Н. А. Медведева, В. А. Макаров

Стимуляция фибринолиза при холинергических сосудорасширяющих реакциях

Стресс — одна из физиологических реакций, сопровождающаяся увеличением фибринолиза [5]. Повышение литических свойств крови имеет адаптивный характер, поскольку стрессу сопутствует стимуляция свертывания крови, угрожающая организму тромбозом, а гиперфибринолиз препятствует образованию тромбов или же способствует их быстрому рассасыванию. Конкретные механизмы возникновения данного феномена недостаточно ясны. Установлено, что одной из причин гиперфибринолиза является секреция клетками эндотелия тканевого активатора плазминогена (АП) под действием тромбина [9] или же активация этим ферментом противосвертывающей системы крови, также приводящая к выделению в кровь тканевого АП и гепарина [3]. Сходные эффекты обнаружены при стимуляции адренорецепторов сосудов [6, 12], при которой основная роль в увеличении активности фибринолиза принадлежит α -адренореактивным структурам [2]. Наконец, показано участие в данной реакции гипоталамического регуляторного пептида Arg^8 -вазопрессина [14]. Активность АП в крови регулируется специфическими белками-ингибиторами, одним из которых является ингибитор АП I типа (ИАП I), синтезирующийся клетками эндотелия [10]. Вопрос о механизмах регуляции его содержания в организме практически не изучен.

Несмотря на наличие работ, посвященных участию нервной системы в контроле фибринолитической активности крови, до настоящего времени практически не исследованной остается роль симпатического холинергического пути в регуляции фибринолиза при стрессе. Холинергические симпатические влияния, являясь важным вегетативным компонентом стрессорной реакции [11], в работающей скелетной мышце приводят к активации анаэробного обмена и повышению работоспособности [1], а в покое мышце вызывают мощную вазодилатацию [4]. Хорошо известно, что экзогенный ацетилхолин стимулирует освобождение тканевого АП из клеток эндотелия [7]. Можно предположить, что так же действует и эндогенный ацетилхолин, выделяющийся из симпатических холинергических нервных окончаний.

С целью проверки данного предположения и исследования механизмов регуляции фибринолиза при холинергических сосудорасширяющих реакциях было проведено наше исследование.

Методика

Опыты проведены на кошках (2,5—4,0 кг) под эфирно-уретановым наркозом (внутривенно 0,8—1,0 г/кг уретана фирмы «Serva», ФРГ). В ходе опыта регистрировали системное давление в сонной артерии с помощью электроманометра (фирма «Statham R23AA», США). В бедренной артерии и вене устанавливали анастомозы. Артериальный анастомоз использовали для введения вазоактивных препаратов, венозный — для катетерной регистрации кровотока, введения препаратов и взятия проб крови. Периферический конец перерезанной симпатической цепочки раздражали на уровне L₄—L₅ пря-

моугольными импульсами амплитудой 5 В, продолжительностью 0,5 мс, частотой 20 Гц в течение 30 с. После проведения манипуляций, связанных с препарированием сосудов и симпатической цепочки, животному внутривенно болюсно вводили гепарин (330 ед/кг). Аналогично вводили дигидроэрготоксин (1 мг/кг; фирма «Srofa», Чехословакия) и атропин (0,1 мг/кг; фирма «Sigma», США). Ацетилхолин ($1 \cdot 10^{-6}$ г/мл; фирма «Sigma», США), папаверин ($1 \cdot 10^{-5}$ г/мл; фирма «Sigma», США) и нитропруссид натрия (1×10^{-5} г/мл; фирма «Sigma», США) вводили внутриартериально с помощью перфузора марки «Syringe pump mod. 341» (фирма «Sage Instruments», США) со скоростью 0,4 мл/мин в течение 1 мин.

Для оценки состояния фибринолитической системы отбирали пробы крови в объеме в 1 мл через 1 и 5 мин после окончания воздействия. Кровь стабилизировали цитратом натрия (0,11 моль/л) в соотношении кровь : консервант как 9 : 1. Плазму крови, бедную тромбоцитами, получали центрифугированием проб при 4000 г в течение 20 мин. Определяли фибринолитическую активность, активность плазмينا и активаторов плазминогена в эуглобулиновой фракции плазмы крови методом фибриновых пластин [2]. Активность активаторов плазминогена выражали в единицах активности АП, приходящейся на 1 мл плазмы крови. Препарат АП¹, получали из сердца свиньи (2500 ед/мг). Кроме того, определяли активность ИАП I [8]. В связи с содержанием в пробах крови гепарина образование фибринового сгустка после инкубации 0,1 мл плазмы крови с 10 мкл АП (10 ед/мл) вызывали добавлением 0,1 мл *трис*-HCl-буфера (0,05 моль/л; рН 7,4), содержащего 0,15 моль NaCl; 0,03 моль ЭДТА·Na₂; 75 НИН ед/мл тромбина; 7 НИН ед/мл анцистрона-Н и 300 АтЕд/мл апротинина («Гордокс», «Гедон Рихтер», Венгрия). Анцистрон-Н (КНПО «Диагностикум», СССР) — тромбиноподобный фермент из яда щитомордника обыкновенного, вызывал образование сгустка фибрина *без*-АА при наличии гепарина. Активность ИАП I оценивали методом фибриновых пластин и выражали в условных единицах, принимая, что одна условная единица активности ингибитора вызывает 50 %-ное ингибирование лизиса фибрина, вызванного 10 ед/мл АП. Для построения калибровочной кривой в пул плазмы, полученной от 10 животных, вносили АП в конечных концентрациях от 1,6 до 100 ед/мл. Результаты обрабатывали статистически с использованием критерия t Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

Стимуляция периферического конца перерезанной симпатической цепочки на фоне действия α -адреноблокатора дигидроэрготоксина вызывала расширение сосудов скелетных мышц. На максимуме расширения, который приходился на 20—30-ю секунду стимуляции, проводимость сосудистого русла возрастала на $91 \% \pm 11 \%$ ($P < 0,001$). Через 1 мин после окончания раздражения, когда проводимость сосудов возвращалась к исходной (рисунок, а, 1), в оттекающей от мышц крови было обнаружено возрастание активности АП на $130 \% \pm 26 \%$ ($P < 0,001$). Одновременно на $73 \% \pm 26 \%$ ($P < 0,05$) возрастала активность ИАП I. Фибринолитическая активность крови при этом возрастала на $44 \% \pm 16 \%$ ($P < 0,01$) по сравнению с исходной.

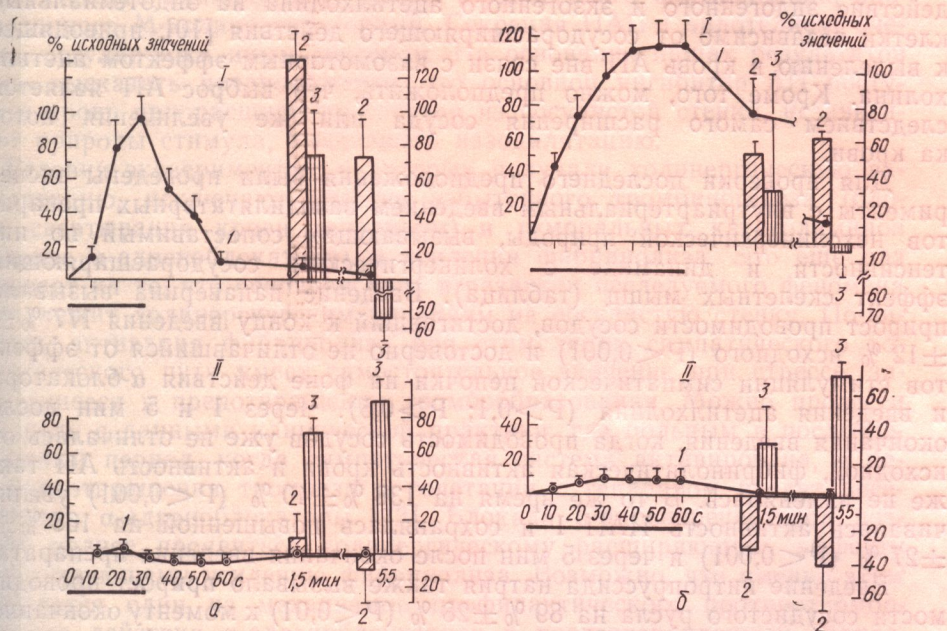
Через 5 мин после окончания стимуляции фибринолитическая активность крови оставалась повышенной по сравнению с исходной на $53 \% \pm 23 \%$ ($P < 0,01$) при неизменном значении проводимости сосудов. Активность АП в этот момент несколько снижалась, но оставалась повышенной по сравнению с исходной на $72 \% \pm 22 \%$ ($P < 0,001$). Снижение активности АП сопровождалось уменьшением активности ИАП I на $55 \% \pm 8 \%$ ($P < 0,05$). Наблюдавшееся через 5 мин снижение активности АП и ИАП I обусловлено, по-видимому, изменением динамики их выброса и потреблением ИАП I на инактивацию АП, основным ингибитором которого он является [10].

Таким образом, стимуляция симпатической цепочки на фоне блокады α -адренорецепторов приводила к расширению сосудов скелетных мышц и выбросу в кровь АП и ИАП I.

Выдвинуто предположение, что обнаруженное поступление в кровь АП и ИАП I имеет общую с расширяющей реакцией холинергическую

¹ Препарат предоставлен Институтом биохимии им. А. В. Палладина АН УССР

природу. Для проверки этого предположения исследовали влияние атропина на ход расширяющей реакции сосудов и фибринолитическую активность отекающей крови. Установлено, что атропин через 10 мин после введения практически полностью блокировал расширение сосудов при стимуляции симпатической цепочки на фоне действия α -блокатора (рисунок, а, II). В то же время наблюдалось повышение активности ИАП I на $73\% \pm 13\%$ ($P < 0,05$) через 1 мин и на $93\% \pm 15\%$ ($P < 0,02$) через 5 мин после воздействия по сравнению со значением этого показателя до стимуляции, но на фоне действия



Изменение проводимости сосудов (I) и прирост значений некоторых показателей фибринолиза крови (2 — активности активатора плазминогена (АП), 3 — активности ингибитора АП типа I) до (I) и после (II) введения атропина:

а — при действии эндогенного ацетилхолина (стимуляция симпатической цепочки на фоне действия α -адреноблокатора дигидроэрготоксина); б — при действии экзогенного ацетилхолина (внутриартериальное введение). Черта под горизонтальной осью — продолжительность воздействия стимулятора симпатической нервной системы.

атропина. Следовательно, атропин не только блокировал сосудорасширяющий эффект стимуляции, но и тормозил выделение АП в кровь. При этом на фоне действия атропина полностью сохранялась секреция в кровь ИАП I в ответ на стимуляцию симпатической цепочки при наличии α -блокатора.

Участие холинореактивных структур сосудистой стенки в повышении фибринолитической активности крови было проведено в экспериментах с внутриартериальным введением ацетилхолина. Ацетилхолин, вводимый в бедренную артерию с постоянной скоростью, вызывал расширение сосудов скелетных мышц. Максимальное увеличение проводимости на $114\% \pm 13\%$ ($P < 0,001$) наблюдалось к моменту прекращения введения препарата (1 мин).

Через 1 мин после окончания введения ацетилхолина активность АП в крови возросла на $54\% \pm 4\%$ ($P < 0,001$), активность ИАП I при этом повысилась на $30\% \pm 69\%$ ($P > 0,5$). Через 5 мин, когда проводимость сосудов не отличалась от исходной (рисунок, б, I), активность АП оставалась увеличенной на $64\% \pm 3\%$ ($P < 0,001$), а активность ИАП I возвращалась к исходной. Атропин через 10 мин после введения полностью блокировал сосудорасширяющий эффект и активацию фибринолиза в ответ на введение ацетилхолина (рисунок, б, II). Через 1 и 5 мин после введения ацетилхолина на фоне действия атропина фибринолитическая активность крови и активность АП не

изменялась, а активность ИАП I возрастала на $31\% \pm 22\%$ ($P > 0,1$) и $74\% \pm 10\%$ соответственно ($P > 0,05$). Увеличение выброса ИАП I, очевидно, отражает особенности регуляции этого фактора в крови, механизм которых в настоящее время неизвестен.

Следовательно, эффект активации фибринолиза при стимуляции симпатической цепочки на фоне действия α -блокатора так же, как расширяющий эффект сосудов скелетных мышц, имеет холинергическую природу. Можно предположить как минимум два пути реализации холинергических влияний на фибринолиз. Это прямое стимулирующее действие эндогенного и экзогенного ацетилхолина на эндотелиальные клетки независимо от сосудорасширяющего действия [10], приводящее к выделению в кровь АП вне связи с вазомоторным эффектом ацетилхолина. Кроме того, можно предположить, что выброс АП является следствием самого расширения сосуда или же увеличения потока крови.

Для проверки последнего предположения были проведены эксперименты с внутриартериальным введением вазодилаторных препаратов нехолинергической природы, вызывающих сопоставимый по интенсивности и динамике с холинергическим сосудорасширяющий эффект скелетных мышц (таблица). Введение папаверина вызывало прирост проводимости сосудов, достигавший к концу введения $177\% \pm 12\%$ исходного ($P < 0,001$) и достоверно не отличавшийся от эффектов стимуляции симпатической цепочки на фоне действия α -блокатора и введения ацетилхолина ($P > 0,1$; $P > 0,5$). Через 1 и 5 мин после окончания введения, когда проводимость сосудов уже не отличалась от исходной, фибринолитическая активность крови и активность АП также не изменялась. В то же время на $138\% \pm 40\%$ ($P < 0,001$) увеличивалась активность ИАП I и сохранялась повышенной на $168\% \pm 27\%$ ($P < 0,001$) и через 5 мин после окончания введения препарата.

Введение нитропруссид натрия также вызывало прирост проводимости сосудистого русла на $89\% \pm 28\%$ ($P < 0,01$) к моменту окончания введения (см. таблицу). Через 1 мин после остановки инфузии, когда проводимость сосудов уже не отличалась от исходной, фибринолитическая активность крови и активность тканевого АП не изменялись, а через 5 мин последняя была снижена на $70\% \pm 10\%$ ($P < 0,01$) по сравнению с исходной. Расширению сосудов под действием нитропруссиды сопутствовало увеличение активности ИАП I на $118\% \pm 31\%$ ($P < 0,02$) и на $168\% \pm 53\%$ ($P < 0,02$) через 1 и 5 мин после окончания введения соответственно. Из приведенных выше результатов следует, что сравнимые по интенсивности с холинергическими сосудорасширяющими реакциями реакции, вызванные препаратами с различ-

Влияние артериальной инфузии вазодилаторов ($1 \cdot 10^{-5}$ г/мл) на прирост значений некоторых показателей сосудорасширяющей реакции в задней конечности и фибринолиза в крови кошек ($M \pm m$), % исходных значений

Показатель	Нитропруссид натрия			Папаверин		
	Момент окончания введения	Через 1 мин после введения	Через 5 мин после введения	Момент окончания введения	Через 1 мин после введения	Через 5 мин после введения
Проводимость сосудов	$88 \pm 28^*$	—	—	$177 \pm 12^{***}$	—	—
Активность активатора пламиногена (АП)	—	$65 \pm 20^*$	$30 \pm 10^*$	—	$81 \pm 13^*$	$87 \pm 33^*$
Активность ингибитора АП I типа (ИАП I)	—	$218 \pm 31^{**}$	$268 \pm 53^{**}$	—	$238 \pm 40^{***}$	$268 \pm 27^{***}$

* $P < 0,1$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

ными механизмами действия на стенку сосуда, не усиливают выброс в кровь АП, а усиливают секрецию ИАП I. Это позволяет считать, что наблюдаемый при стимуляции симпатической цепочки на фоне действия α -адреноблокатора и при внутриартериальном введении ацетилхолина выброс в кровь АП не обусловлен самой вазомоторной реакцией или же увеличением потока крови. Вместе с тем наши результаты не дают возможности полностью исключить участие этих факторов в генезе активации фибринолиза при холинергических воздействиях. Секреция АП из сосудистой стенки, по-видимому, является результатом специфического влияния эндогенного и экзогенного ацетилхолина, опосредованного М-холинорецепторами. Секреция ИАП I эндотелием, очевидно, регулируется иным способом. На основании наших результатов можно высказать предположение, что основной ингибитор АП поступает в кровь при расширении сосудов из сосудистой стенки, независимо от природы стимула, вызвавшего вазодилатацию.

Условия экспериментов, в которых получали холинергическую вазодилатацию, исключают участие избыточного тромбиногенеза (блокада свертывания крови гепарином) и гуморальных катехоламинов (введение α -адреноблокатора) в усилении фибринолиза. Это еще раз указывает на то, что основная роль в развитии исследуемого феномена принадлежит холинергическим влияниям на сосудистую стенку. По-видимому, активация фибринолиза при стимуляции симпатического холинергического пути имеет самостоятельное значение при стрессе, заключающееся в предотвращении тромбообразования. Можно провести параллель с данными клинической практики, где больным в послеоперационный период, когда симпатическая система активирована, в целях предотвращения тромбоза в сочетании с гепарином вводят неселективные α -адреноблокаторы [13]. Блокада α -адренорецепторов позволяет полнее проявиться холинергическому расширяющему эффекту и сопутствующему усилению фибринолиза. Возможно, что именно этим объясняется один из механизмов профилактического противотромботического действия α -адреноблокаторов в послеоперационный период.

G. V. Bashkov, I. Yu. Sergeev, N. A. Medvedeva, V. A. Makarov

FIBRINOLYSIS STIMULATION AT CHOLINERGIC VASODILATATIVE REACTIONS

Changes in the fibrinolytic activity of blood flowing from the skeletal muscles during electrostimulation of the periferal end of the cut-off sympathetic chain at the blockade of α -adrenoceptors have been studied in the acute experiments on cats. It is stated, that this action induces not only an increase of vascular conductivity but also fibrinolysis stimulation relating to the secretion of plasminogen activators to the blood. The effect of fibrinolysis stimulation was reproduced during intraarterial infusion of acetylcholine and was blocked by atropine. The vasodilatative reactions on sodium nitroprusside and papaverine similar by intensity to the cholinergic reactions induce no plasminogen activator release. The existence of the specific regulation mechanism of plasminogen activator secretion, mediated by M-cholinoceptors is suggested.

M. V. Lomonosov University, Moscow
All Union Haematological Research Centre,
Ministry of Public Health of the USSR, Moscow

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бердина Н. А., Виноградова О. Л., Коц Я. М., Родионов И. М. О функциональном значении холинергической вазодилатации // Физиология человека.— 1978.— Т. 4.— С. 481—487.
2. Голубева М. Г., Калишевская Т. М., Башков Г. В., Григорьева М. Е. Влияние α -адреноблокаторов на систему гемостаза // Физиол. журн.— 1988.— 34, № 5.— С. 95—100.
3. Калишевская Т. М. Регуляция жидкого состояния крови и ее свертывания.— М.: Изд-во Моск. ун-та.— 1982.— 182 с.

4. Родионов И. М., Бердина Н. А., Сергеев И. Ю. Периферические механизмы реализации холинергической вазодилатации.— Ереван: Изд-во АН СССР.— 1985.— С. 42—44.
5. Cash J. D. Control mechanism of activator release // Progress in chemical fibrinolysis and thrombolysis.— New York: Raven press.— 1978.— 3.— P. 65—75.
6. Gader A. M. A., Da Costa J., Cash J. D. The effect of propranolol, alprenolol and practolol on the fibrinolytic and factor VIII responses to adrenaline and salbutamol in man // Thromb. Res.— 1974.— 4.— P. 25—33.
7. Klöcking H. P. Release of plasminogen activator by acetylcholine from the isolated perfused pig ear // Ibid.— 1979.— 16.— P. 261—264.
8. Kruithof E. K. O., Tran Thang C., Bachmann F. The fast acting inhibitor of tissue type plasminogen activator in plasma is also the primary plasma inhibitor of urokinase // Thromb. and Haemostasis.— 1986.— 55, N 1.— P. 65—69.
9. Levin E. J., Stern D. M., Nawroth P. P. et al. Specificity of the thrombin-induced release of tissue plasminogen activator from cultured human endothelial cells // Ibid.— 52, N 2.— P. 115—119.
10. Loskutoff D. J., Schleef R. R., Sawdey M. The Fibrinolytic system of cultured endothelial cells // Cardiovascular disease.— New York: Plenum Publish. Corp., 1987.— P. 283—289.
11. Mancía G., Baccelli G., Zanchetti A. Hemodynamic responses to different emotional stimuli in the cat: patterns and mechanism // Amer. J. Physiol.— 1972.— 223.— P. 925—933.
12. Probst A., Lill H., Strein K. Beta-adrenergic receptor mediated release of tissue plasminogen activator in anaesthetized dogs // Thromb. Res.— 1988.— 50, N 1.— P. 9—17.
13. Di Serio F. J., Sasahara A. A. United states trial of dihydroergotamine and heparin prophylaxis of deep vein thrombosis (DVT) // Amer. J. Surg.— 1985.— 8.— P. 25—32.
14. Wilson J., Grant P. J., Davies J. A. et al. The relationship between plasma vasopressin and changes in coagulation and fibrinolysis during hip surgery // Thromb. Res.— 1988.— 51, N 4.— P. 439—445.

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

Материал поступил
в редакцию 10.11.89

УДК 616.001.36

В. Ф. Сагач, А. В. Дмитриева

Роль тромбоцитарноактивирующего фактора в развитии нарушений кровообращения при постишемической шоковой реакции

В последние годы важная роль в развитии нарушений кровообращения при шоковых реакциях различного генеза отводится медиаторам липидной природы [12]. Одним из таких медиаторов является тромбоцитарноактивирующий фактор (ТАФ) [7, 9]. В пользу такого представления свидетельствует ряд фактов. С одной стороны, показано, что введение животным ТАФ вызывает системную гипотензию, снижение сердечного выброса и сократительной активности миокарда, развитие легочной гипертензии, т. е. изменения, характерные для шоковой реакции [11, 15, 20]. С другой, — использование различных блокаторов ТАФ существенно уменьшает выраженность нарушений гемодинамики и деятельности сердца при развитии анафилактической реакции и действия бактериальных токсинов [7, 19]. Кроме того, при действии последних показано выделение различными клетками значительного количества ТАФ. Эти факты привели к заключению о существенной патогенетической роли ТАФ при анафилактическом и эндотоксическом шоках. В то же время роль ТАФ и влияние блокаторов его рецепторов на течение шоковых реакций другого генеза остаются невыясненными [9].

В связи с изложенным цель нашей работы состояла в том, чтобы посредством предварительной блокады рецепторов ТАФ получить представление о его роли в постишемических изменениях кровообращения (турникетный шок).