

К МЕХАНИЗМУ ГЕМОСТАТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ КАТЕХОЛАМИНОВ

Д. М. Зубаиров и Л. Г. Попова

Кафедра биохимии (зав. — проф. Д. М. Зубаиров) и ЦНИЛ (зав. — канд. биол. наук Н. П. Зеленкова) Казанского ордена Трудового Красного Знамени медицинского института им. С. В. Курашова

50 лет назад после детальных исследований В. Кеннона и его сотрудников [6] с неоспоримостью было показано, что адреналин вызывает ускорение свертывания крови у животных. В дальнейшем эти данные были подтверждены многочисленными исследованиями. Адреналин добавляли к растворам анестезирующих средств для ускорения гемостаза в операционной ране. Однако механизм действия адреналина на свертывание крови до сегодняшнего дня не выяснен. Предполагают, что это действие не прямое и что оно обусловлено поступлением в кровоток компонентов свертывающей системы из тканей [2, 9, 10].

В 1964 г. Ратнофф и Крам [14] обнаружили активацию фактора Хагемана под действием танина, пирокатехина и эллаговой кислоты. Поскольку все эти соединения имеют в своих молекулах гидроксилы в ортоположении, мы поставили задачей исследовать в аналогичных экспериментах влияние адреналина и норадреналина, которые являются физиологическими регуляторами ряда функций организма.

Реактивы. 1. Веронал-мединаловый буфер pH 7,5 (7,8 г хлористого натрия, 2,74 г веронала, 2,06 г мединала и бидистиллированной воды до 1 л).

2. 0,1% и 0,01% растворы танина в буфере.

3. 0,01 М и 0,001 М растворы пирокатехина (Мерк) в буфере.

4. 0,01 М и 0,001 М растворы адреналина гидротартрата (Украинского института экспериментальной эндокринологии, г. Харьков) в буфере.

5. 0,01 М и 0,001 М растворы норадреналина (Украинского института экспериментальной эндокринологии, г. Харьков) в буфере.

6. 0,1% раствор фармакологического адреналина (Ивановского и Московского мясокомбинатов). После доведения pH раствора до 7,5 0,1 М раствором NaOH в нем содержалось 0,0266% адреналина и 0,0145% норадреналина. Содержание катехоламинов определяли флуорометрическим методом Э. Ш. Матлиной [3].

7. 0,025 М раствор хлористого кальция.

8. Бестромбоцитарную интактную плазму готовили путем двойного центрифугирования крови, стабилизированной цитратом, при 6000 или 10 000 оборотов в минуту в течение 20 мин. при 0° С. У людей кровь брали из вены платиновой иглой в парафинированные полиэтиленовые пробирки, содержащие 3,8% раствор трехзамещенного цитрата натрия (отношение стабилизатора к крови — 1:9), у животных и птиц — из бедренной и сонной артерий в силиконированные мерные канюли, содержащие тот же антикоагулянт. Количество оставшихся тромбоцитов в плазме после центрифугирования не превышало 150 в 1 мм³.

9. Для получения активированной плазмы 1 мл интактной плазмы вращали в течение 10 мин. с 1 г стеклянных шариков (фирмы Браун, ФРГ) с общей активирующей поверхностью 28,8 см².

10. Истощенную плазму получали из бестромбоцитарной интактной плазмы, которую обрабатывали 20 мин. целитом (Nyflo supercel Chemical and Dyes, London) при 37° С из расчета 30 мг/мл [13]. Целит отделяли центрифугированием, а плазму переносили в свежесиликонированную пробирку и выдерживали при 37° С еще 5—18 часов. Такая плазма лишена способности активироваться при взаимодействии с чужеродными поверхностями и может храниться при —25° С до 2 месяцев. Человеческую плазму мы готовили накануне, а кроличью и бычью сохраняли при —25° С и использовали по мере надобности.

Методика. К 0,1 мл раствора испытуемого вещества, находящегося в силиконированной пробирке и предварительно прогретого в водяной бане до 37° С, добавляли 0,1 мл плазмы. После трехминутной инкубации при отсутствии ионизированного кальция смесь рекальцифицировали 0,1 мл раствора CaCl₂. При такой постановке опыта изменения в системе свертывания крови, происходящие во время инкубации, представляется возможным относить за счет активации XII и XI факторов, ибо для реакций, следующих за контактной фазой, обязательно присутствие Ca⁺⁺.

При хранении плазмы время ее свертывания спонтанно изменяется, особенно у собак. Поэтому каждое определение сопровождалось контролем, в котором регистрировалось время свертывания плазмы после инкубации с вероналовым буфером.

Статистический анализ результатов опытов проведен по Фишеру [5].

Результаты. Трехминутная инкубация интактной плазмы с раствором танина (конечная концентрация 0,03—0,003%) вызывала ускорение свертывания в среднем на 39% (табл. 1).

Влияние танинна на время свертывания (в сек.) кроличьей интактной и активированной плазмы

Вид плазмы	Время свертывания при инкубации с		Разность	Р
	буфером	танином		
Интактная	603,72	367,55	—236,17	$\leq 0,001$
Активированная	91,76	87,60	—4,16	$> 0,5$

В дополнение доказательств, представленных Ратнофф, что влияние танинна и пирокатехина опосредовано через фактор Хагемана, мы обнаружили, что предварительная контактная активация плазмы стеклянными шариками предотвращает действие этих веществ на скорость коагуляции (табл. 1). Если бы влияние танинна было опосредовано через другие звенья свертывающей системы крови, то оно должно было бы суммироваться с действием контактной активации, так как каждый этап свертывания имеет свою константу скорости реакции.

Под действием фармакологического адреналина, получаемого из надпочечников крупного рогатого скота, время свертывания интактной плазмы также ускорялось. Стимулирующее влияние фармакологического адреналина на гемокоагуляцию по выраженности мало отличалось от действия танинна (табл. 2 и 3). Так как в фармакологическом адреналине в качестве консерванта содержится хлорэтон, для опытов были использованы и синтетические препараты гидротартрата адреналина и норадреналина.

Таблица 2

Влияние адреналина и норадреналина на время свертывания интактной плазмы кроликов (в сек.)

Плазма инкубирована с			Разность	Р
буфером	фармакологическим адреналином	синтетическим адреналином		
659,2	449,0		—210,2	$\leq 0,001$
503,4		372,8	—130,6	$\leq 0,001$

Таблица 3

Влияние адреналина, норадреналина, пирокатехина и танинна на время свертывания интактной плазмы человека (в сек.)

Плазма инкубирована с						Разность	Р
буфером	танином	пирокатехином	фармакологическим адреналином	синтетическим адреналином	норадреналином		
483,4	351,2					—132,2	$\leq 0,001$
475,0		319,2				—155,8	$\leq 0,001$
446,6			319,6			—127,0	$\leq 0,001$
481,3				556,2		+74,9	$\leq 0,05$
450,4					320,3	—130,1	$\leq 0,001$

Эти препараты, так же как танин и пирокатехин, стимулировали свертывание интактной плазмы человека и животных.

Плазма кроликов сравнительно с плазмой человека была менее чувствительна к норадреналину. Синтетический адреналин не ускорял свертывания плазмы человека, тогда как фармакологический адреналин оказывал такое влияние.

Способностью ускорять свертывание плазмы обладали не только свежеприготовленные растворы кагехоламинов, но и растворы, хранившиеся при комнатной температуре. В первые 2 суток действие адреналина на гемокоагуляцию по мере образования адrenoхрома даже несколько увеличивалось. Подобная закономерность была ранее отмечена Ратнофф и Крам при использовании растворов танинна, пирогаллола и пирокатехина.

Поскольку ускорение свертывания может быть вызвано действием катехоламинов на разные звенья процесса гемокоагуляции, представляющего собой каскад превращений неактивных проферментов в активные, дальнейшие опыты были направлены на выяснение роли контактной фазы в реализации влияния этих веществ.

Предварительная активация фактора XII в цитратной плазме кролика стеклянными шариками сопровождалась укорочением времени свертывания при рекальцификации с 8—16 мин. в среднем до 87 сек. Добавление растворов биогенного и синтетического адреналина практически не отразилось на времени свертывания такой активированной плазмы (76,8 сек., $P < 0,05$).

Инкубация активированной человеческой плазмы с таннином, пирокатехином, адреналином и норадреналином способствовала не укорочению, а удлинению свертывания (табл. 4).

Таблица 4

Влияние таннина, пирокатехина, адреналина и норадреналина на время свертывания активированной плазмы человека (в сек.)

Плазма инкубирована с						Разность	Р
буфером	таннином	пирокатехином	фармакологическим адреналином	синтетическим адреналином	норадреналином		
163,8	432,2	263,11	188,19	348,66	235,49	+268,4	<0,001
187,37						+75,73	<0,01
176,92						+11,27	<0,001
166,23						+182,43	<0,001
181,49						+54,0	<0,01

В следующей серии опытов испытывали действие катехоламинов на свертывание плазмы, лишенной контактных факторов. В табл. 5 и 6 представлены результаты опытов, проведенных с истощенными плазмами кроликов и человека.

Оказалось, что свертывание плазмы без контактных факторов не ускоряется растворами катехоламинов и таннина. Напротив, оно даже несколько замедляется. Очевидно, стадии свертывания, следующие за контактной, этими веществами даже несколько угнетаются.

Таблица 5

Влияние катехоламинов на время свертывания истощенной плазмы кролика (в сек.)

Буфер	Таннин	Фармакологический адреналин	Синтетический адреналин	Синтетический норадреналин
391	675	431	509	464

Таблица 6

Влияние катехоламинов на истощенную плазму человека

Время свертывания плазмы при инкубации с						Разность	Р
буфером	таннином	пирокатехином	фармакологическим адреналином	синтетическим адреналином	синтетическим норадреналином		
430,1	802,7	471,53	569,7	1075,2	458,3	+372,6	<0,001
440,18						+31,35	<0,05
511,6						+53,1	<0,1
506,0						+569,2	<0,001
440,0						+18,3	<0,001

Подобные же результаты были получены и с кровью собак.

Согласно данным Ятридиса и Фергюссона кровь кур лишена контактного фактора. Чтобы убедиться в этом, мы активировали стеклянными шариками бестромбоцитарную плазму кур. При этом время свертывания куриной плазмы укорачивалось с 943,8 до 542,4 сек. ($P < 0,02$). Степень укорочения во много раз меньше, чем у млекопитающих. На этом основании можно полагать, что в крови кур содержится значительно меньше факторов контактной фазы свертывания, чем у других исследованных нами животных, но утверждение о полном отсутствии их не соответствует действительности.

Влияние катехоламинов на интактную плазму кур

Время свертывания плазмы (в сек.) при инкубации с						Разность	Р
буфером	пирокатехином	танином	фармакологическим адреналином	синтетическим адреналином	норадреналином		
1149,8	936,6	821,3	1437,5	1424,8	1303,2	-110,5	<0,05
1050,3						-229,0	<0,01
1109,0						+328,5	<0,05
1134,2						+290,6	>0,7
1135,0						+168,2	>0,3

Воздействие катехоламинов на плазму кур, как свидетельствует табл. 7, не сопровождалось ускорением ее свертывания. Небольшая степень активации достигалась лишь пирокатехином и танином. Аналогичные результаты были получены с плазмой голубей.

Обсуждение. Полученные данные указывают, что свойство катехоламинов ускорять свертывание опосредовано через контактный фактор плазмы, фактор Хагемана. Он представляет собой глобулин, обладающий эстеразной активностью [15]. Активация при адсорбции на поверхности некоторых твердых тел (стекло, целит, каолин, бентонит, асбест) и капелек жирных кислот [11, 13] с последующим образованием плазменной тромбокиназы и плазмакининов дает право предположить, что явление аллостеризма имеет непосредственное отношение к регуляции фактора Хагемана. Изменение седиментационных свойств высокоочищенного препарата фактора Хагемана (фактора XII) при воздействии эллаговой кислоты, вызывающей его активацию [8], на наш взгляд, тоже свидетельствует в пользу высказанного предположения.

Полученные в наших экспериментах результаты можно объяснить стабилизацией активной конформации фактора Хагемана при воздействии катехоламинов. Образование комплексов катехоламинов с белками было показано ранее [4, 7]. В зависимости от условий катехоламины могут реагировать как амины, фенолы, хиноны, спирты или индолы. Активация фактора Хагемана танином, пирокатехином, пирогаллолом, пурпурогаллином и эллаговой кислотой позволяет считать, что наличие гидроксильных групп в ортоположении у всех этих соединений и адреналина и норадреналина важно для их действия на молекулу фактора XII.

Использованные в наших опытах концентрации адреналина и норадреналина превышают физиологические. Поэтому возникает вопрос, насколько приложимы полученные данные для объяснения регуляции свертываемости крови в организме. Хотя в наших опытах были использованы все известные манипуляции, направленные на предотвращение контактной активации (силиконирование всей посуды, охлаждение крови и плазмы), условия пробирочных опытов нельзя рассматривать как идеальные и целиком гарантирующие от такой активации. На основании наших опытов можно утверждать даже обратное. По мере сохранения плазмы время ее свертывания изменяется, что указывает на денатурационные превращения. Коль скоро даже в этих условиях без ионизированного кальция удается обнаружить значительную активацию контактной фазы свертывания крови, то в условиях организма, значительно более мягких, действие катехоламинов может оказывать регулирующее влияние на процесс скрытого внутрисосудистого свертывания, видимо, в значительно меньших концентрациях. Именно активация контактной фазы свертывания является определяющей реакцией при интактных стенках кровеносных сосудов. Изменения свертываемости крови, по-видимому, отражают сдвиги в стационарных процессах, происходящих в системе гемокоагуляции [1]. Активация фактора Хагемана под действием катехоламинов во всяком случае позволяет высказать предположение, что эта зависимость может иметь значение и для целого организма: в физиологических условиях выделение адреналина надпочечными железами может готовить кровь к более быстрому свертыванию при повреждении целостности тела, а в патологических — способствовать внутрисосудистому тромбообразованию.

Обнаруженное нами прямое активирование системы гемокоагуляции под действием катехоламинов, разумеется, не исключает возможности их косвенного воздействия путем поступления в кровоток тканевых факторов, влияющих на свертывание крови.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зубаиров Д. М. Свертываемость крови. Изд. Казанского ун-та, 1966.
2. Маркосян А. А. Нервная регуляция свертывания крови. Изд. АПН РСФСР, М., 1960.
3. Матлина Э. Ш. В кн.: Методы исследования некоторых гормонов и медиаторов. Под ред. В. В. Кованова, В. М. Банщикова, В. В. Меньшикова. М., 1965.

4. Утевский А. М. В кн.: Проблемы нейро-эндокринной регуляции. Изд. «Наука», М. — Л., 1966. — 5. Фишер Р. А. Статистические методы для исследователей. Госстатиздат, М., 1958. — 6. Кеннон В. Физиология эмоций. Телесные изменения при боли, голоде, страхе и ярости. Перевод с англ. В. А. Дорфман и А. Г. Кратнова. Под редакцией и с предисловием Завадского. Рабочее изд. «Прибой», Л., 1927. — 7. Banks, Heele K. Biochem. J., 1965, 3. — 8. Donaldson V. H., Ratnoff O. D. Science, 1965, 3697. — 9. Forwall G. D., Ingram G. I. C. J. Physiol., 1957, 2. — 10. Ingram G. I. C. J. Physiol., 1961, 156. — 11. Jatrdis P. G., Fergusson I. H. Nature, 1955, 5004. — 12. Margolis J. Austral. J. exper. Biol., 1962, 6. — 13. Nossel H. L. The contact phase of blood coagulation, Davie, Philadelphia, 1964. — 14. Ratnoff O. D., Crum. J. Lab. Clin. Med., 1964, 3. — 15. Schoenmakers J., Matze R., Haanen C., Zilliken F. Biochim. Biophys. Acta, 1964, 2.

УДК 616.71—018.3—002—616—073.75

ЗНАЧЕНИЕ РЕОЭНЦЕФАЛОГРАФИИ В ДИАГНОСТИКЕ ЦЕРЕБРАЛЬНЫХ НАРУШЕНИЙ У БОЛЬНЫХ ШЕЙНЫМ ОСТЕОХОНДРОЗОМ

А. Ю. Ратнер

Кафедра нервных болезней (и о. зав. — доц. А. Н. Смирнов), кафедра рентгенологии № 1 (зав. — проф. М. Х. Файзуллин) и кафедра терапии № 1 (зав. — проф. Л. М. Рахлин) Казанского ГИДУВа им. В. И. Ленина

Метод реоэнцефалографии (РЭГ) основан на изучении электрического сопротивления тканей. Поскольку у всех тканей сопротивление постоянное и меняется лишь в зависимости от объема притекающей крови, то кривая реограммы является отражением объемного пульса.

Под нашим наблюдением находилось 300 больных с церебральными нарушениями, возникшими за счет шейного остеохондроза (так называемая шейная мигрень). У 134 больных, в основном с выраженными дисэнцефальными нарушениями того же генеза, были проведены РЭГ-исследования на двухканальном реографе «Альвар».

В норме на РЭГ, записываемой синхронно с ЭКГ, выделяют (рис. 1) анакротическую часть, вершину, катакротическую часть с 2—3 довольно глубокими инцизурами, «дополнительными волнами». Одновременно записываются обе гемисферы, на верхней РЭГ — правая, на нижней — левая. Перед записью и во время ее дают калибровочный импульс. Некоторые авторы (Г. И. Эннина и др.) склонны математически обрабатывать каждую мельчайшую деталь на РЭГ-кривой, однако опыт показывает, что для суждения об изменениях РЭГ наряду с описательной характеристикой ее достаточно вычисления так называемых величин α , β , $\alpha : \beta$, $\frac{\alpha}{\alpha + \beta}$, Q и i . Такой же точки зрения

придерживается большинство авторов (Jenknep, А. М. Вейн и М. А. Ронкин и др.).

α , время восходящей части волны, в норме равняется 0,1—0,12 сек.; β , время нисходящей части волны, может несколько варьироваться по продолжительности в зависимости от частоты сердечного цикла. Для уточнения взаимоотношений обеих частей цикла вводятся коэффициенты $\alpha : \beta$ (в норме равные 1 : 5,4 или 1 : 5,6) и $\frac{\alpha \cdot 100\%}{\alpha + \beta}$ (в норме 15—15,6%). Одновременная запись РЭГ и ЭКГ позволяет опреде-

лить время распространения реографической волны по отношению к одному из элементов ЭКГ. Поэтому вводится понятие времени распространения пульсовой волны (Q) от зубца Q ЭКГ до начала реографической кривой (в норме оно равно 0,16—0,20 сек.). И, наконец, для суждения об амплитуде РЭГ-кривой пользуются коэффициентом i , который равняется отношению величины амплитуды к величине стандартного калибровочного импульса (в норме $i = 1,2—1,5$).

Спастическое состояние сосудов характеризуется на РЭГ быстрым подъемом кривой, острой вершиной и глубокими волнами на катакротической части; неполная закупорка сосудов проявляется себя уменьшением амплитуды и сглаженностью вершины кривых на стороне поражения. Наконец, при полной закупорке вместо РЭГ-кривой отмечаются только небольшие осцилляции, синхронные пульсу.

Особенно характерны изменения на РЭГ при атеросклеротическом поражении сосудов головного мозга. Kuperi считает, что соответствующие изменения на РЭГ могут служить важным признаком церебрального атеросклероза, нередко более показательным, чем биохимические методы. В связи с уплотнением сосудистой стенки уменьшается время проведения пульсовой волны, подъем анакротической части кривой становится медленным, пологим, вершина — аркообразной или платообразной, а диастолические волны уплощаются или исчезают. Как мы уже сообщали, у больных шейной ми-