

живности эритроцитов (рис. 1 в). Добавление к этой крови *in vitro* 60 ПЕ/мл террилита вызывает значительное снижение адгезивности эритроцитов (рис. 1 г), уменьшение общего числа измененных эритроцитов и эхиноцитов. В результате введения 3000—6000 ПЕ/кг террилита в желудок кроликам с суточными и двухсуточными тромбами число эхиноцитов снижается до 60%, деформированных эритроцитов — до 15% (рис. 1 д). Двух- или трехразовое введение террилита тем же способом приводит к дальнейшей стабилизации поверхности и формы эритроцитов (рис. 1 е).

Анализ результатов влияния террилита на изменения поверхности и формы эритроцитов периферической крови показал, что наибольшее изменение возникает при 20—30-минутной экспозиции цитратной крови с физиологическим раствором *in vitro*. Добавление террилита в кровь уменьшает адсорбционную способность оболочек эритроцитов, связанную, как правило, с уровнем ее заряда. Еще более эффективно пероральное введение препарата, так как оно способствует большей стабилизации поверхности и формы эритроцитов, однако действие террилита проявляется при таком способе применения позднее, поскольку в кровь он попадает не сразу, а через стенку желудка.

Таким образом, исследование показало, что террилит как *in vivo*, так и *in vitro* вызывает стабилизацию поверхности эритроцитов и восстановление их формы. Наряду с тромболитическими свойствами терри-

литин обладает дезагрегационным действием и препятствует оседанию кровяных элементов на стенки сосуда и на уже образовавшийся тромб.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андреев С. В., Рябова С. С., Денисов Л. А. // Моделирование заболеваний. — М., 1973.
2. Андреев С. В., Кубатиев А. А., Юркин В. А., Кольцова Н. Л. // Бюлл. экспер. биол. — 1976. — № 8. — С. 936.
3. Андреев С. В., Кубатиев А. А., Кобкова И. Д. и др. // В кн.: Актуальные проблемы гемостазиологии. — М., 1979.
4. Андреев С. В., Кубатиев А. А., Кобкова И. Д. и др. // В кн.: Актуальные проблемы гемостазиологии. — М., 1981.
5. Андреев С. В., Ковалева Т. Н., Мищенко А. Л. и др. // В кн.: II Всесоюзный съезд гематологов и трансфузиологов. — Тезисы докладов. — 1985.
6. Андреев С. В., Ковалева Т. Н., Кобринский Г. Д. и др. // Бюлл. экспер. биол. — 1987. — № 1. — С. 40—43.
7. Илшинецкий А. А., Бродская С. З., Коршунов В. В. // ДАН СССР. — 1965. — № 3. — С. 737.
8. Козинец Г. // Поверхностная архитектура клеток крови в норме и при заболевании системы крови. — Таллин, 1984.
9. Мамедов Я. Д., Сафаров Р. Г., Гусейнов А. А. и др. // В кн.: Актуальные проблемы гемостазиологии. — М., 1979.
10. Мамедов Я. Д., Рейш А. В. // В кн.: Актуальные проблемы гемостазиологии. — 1981. — С. 392—400.
11. Черкасов Г. В. // Косм. биол. и авиакосм. мед. — 1983. — № 5. — С. 72—75.

Поступила 09.02.88

УДК 615.361.36+615.811.2]—02:612.111.7

ДЕЙСТВИЕ ГЕПАРИНА И ПИЯВИТА НА РЕОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КРОВИ И АГРЕГАЦИЮ ТРОМБОЦИТОВ

М. В. Каменева, А. С. Парфенов, Э. Л. Климанова, С. Халиль, Г. И. Никонов, И. П. Баскова

Кафедра физиологии человека и животных (зав. — акад. АМН СССР И. П. Ашмарин), Научно-исследовательский институт механики Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова, Научно-исследовательский институт физико-химической медицины, Москва

Гепарин в клинической практике используется либо с целью профилактики тромбообразования, либо при проведении экстракорпоральной гемоперфузии (гемо- и плазмосорбция, работа аппаратов искусственного кровообращения и фракционаторов крови). В настоящее время показания к назначению гепарина с лечебной целью имеют тенденцию к ограничению. Это связано с тем, что огромный опыт гепаринотерапии выявил не только благоприятные эффекты гепарина, заключающиеся в его гипокоагуляционном действии, но и возможность развития различных осложнений при его при-

менении. К таким неблагоприятным воздействиям гепарина относится прежде всего тромбоцитопения [10], связанная с внутрисосудистой агрегацией тромбоцитов [14]. Кроме того, в определенных ситуациях гепарин способен при выраженной тромбемии и дефиците антитромбинов блокировать действие антитромбина III [12]. В последнее время появились данные об увеличении концентрации фактора 4 тромбоцитов в плазме больных периферическим атеросклерозом при внутривенном введении гепарина [11]. Следовательно, поиск соединений, способных заменить гепарин, весьма

актуален.

На роль такого соединения может претендовать экстракт из пиявок *Hirudo medicinalis* [7], который еще до открытия гепарина использовали в качестве антикоагулянта [5]. Экстракт обладает небольшой антитромбиновой активностью, связанной с наличием в нем гирудина — высокоспецифического ингибитора фермента тромбина [15]. Препарат способен удлинять время рекальцификации плазмы крови за счет наличия в нем ингибиторов контактной стадии свертывания крови [9]. Содержащаяся в препарате дестабилаза растворяет стабилизированный фибрин [2]. В экстракте определено наличие простагландинов, по спектру действия подобных простаглицину [7]. Очевидно, благодаря присутствию веществ простагландиновой природы, экстракты из пиявок, как и секрет слюнных желез пиявок, ингибируют тромбоцитарно-сосудистый гемостаз [4], что обеспечивает защитное противотромботическое действие экстрактов из медицинских пиявок, обнаруженное при внутривенном и оральном введении животным [3]. Выявлено антиатеросклеротическое действие препаратов [1]. Установлено обусловленное суммарным эффектом пиявочных простагландинов и дестабилазы тромболитическое действие экстракта, проявляющееся при его введении внутрь.

Задачей настоящей работы было сравнительное исследование влияния гепарина и пиявита на реологические свойства крови и функциональные свойства тромбоцитов.

В экспериментах были использованы гепарин «Рихтер» и водный экстракт из порошка лиофилизированных пиявок *Hirudo medicinalis*, названный пиявитом [3]. Гепарин и пиявит применяли в качестве стабилизаторов крысиной крови и крови людей с ишемической болезнью сердца. Их объемное соотношение с кровью составляло 1:9. Обычно в 1 мл крови было 5 ед. активности гепарина или пиявита, содержащего 5—6 мг

белка. Пиявит характеризовался антитромбиновой активностью 0,65—0,80 АТНН (международных единиц) на 1 мг белка, антикалликреиновой активностью около 1 антинаноката на 1 мг белка (по отношению к субстрату S-2302), удлиннял время свертывания цитратной крысиной плазмы крови при рекальцификации в 2 раза и содержал 580 ± 190 пг/мг белка простагландинов, определяемых радиоиммунным методом с антителами к 6-кето-простагландину $F_{1\alpha}$.

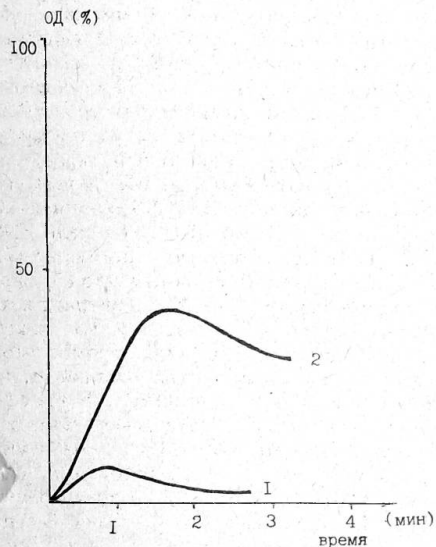
Вязкость крови измеряли на ротационном вискозиметре [6] при напряжении сдвига 0,05 и 0,1 Па. Агрегацию эритроцитов изучали реоскопическим методом [6] по скорости процесса агрегации. О деформируемости эритроцитов судили по скорости фильтрации клеток через фильтры с диаметром пор 5 мкм. Механическую резистентность оценивали по скорости ультразвукового гемолиза при подводимой мощности 0,4 Вт/см² и частоте 880 кГц [8]. Агрегацию тромбоцитов устанавливали фотометрически на агрегометре «Chrono-log» (модель 530, Англия). Плазму, богатую тромбоцитами, получали из венозной крови, взятой в пробирку, содержащую 1 мл 3,8% цитрата натрия (объем крови — 9 мл). В 1 мм³ такой плазмы находилось 250 тыс. тромбоцитов (получали путем центрифугирования цельной крови при 100 g в течение 30 мин при комнатной температуре). На агрегометре регистрировали изменение оптической плотности плазмы, богатой тромбоцитами, при действии АДФ в конечной концентрации $5 \cdot 10^{-6}$ М. Число тромбоцитов подсчитывали на счетчике тромбоцитов «Platelet Counter PL-100» (Япония).

На первом этапе работы изучали влияние гепарина и пиявита на реологические свойства крови крыс. Образцы крови экспонировали в течение 2 ч при комнатной температуре, а затем оценивали их реологические свойства (см. табл.). Агрегация и механическая резистентность эритроцитов крови,

Сравнительная характеристика реологических параметров крови, стабилизированной гепарином или пиявитом

Вид крови и стабилизатора	Гематокрит	Вязкость при напряжении сдвига, мПа·с		Агрегация эритроцитов, с	Фильтруемость эритроцитов, с	Механическая резистентность эритроцитов, с
		0,1 Па	0,05 Па			
Крыс гепарин	44,0 ± 1,0 (n = 16)	3,1 ± 0,3 (n = 16)	7,3 ± 0,5 (n = 16)	34,0 ± 8,1 (n = 7)	16,8 ± 2,7 (n = 7)	224,0 ± 18,0 (n = 6)
пиявит	44,0 ± 1,0 (n = 17)	2,6 ± 0,2 (n = 17)	6,3 ± 0,4 (n = 17)	44,0 ± 7,2 (n = 7)	16,0 ± 3,2 (n = 7)	233,0 ± 15,0 (n = 7)
Людей, больных ишемической бо- лезнью сердца						
гепарин	48,0 ± 1,5	7,9 ± 0,7 (n = 10)	17,4 ± 1,2 (n = 10)	6,9 ± 1,3 (n = 7)	9,7 ± 1,6 (n = 7)	265,0 ± 18,0 (n = 7)
пиявит	48,0 ± 1,5	6,7 ± 0,5 (n = 8)	14,3 ± 1,5 (n = 8)	9,3 ± 1,7 (n = 7)	8,9 ± 1,6 (n = 8)	273,0 ± 22,0 (n = 7)

стабилизированной пиявитом, оказались несколько ниже, а фильтруемость эритроцитов выше, чем те же показатели крови, стабилизированной гепарином. Интегрально все перечисленные отличия проявлялись в более низкой вязкости крови, стабилизированной пиявитом, при одинаковых средних значениях показателей гематокрита и напряжения сдвига. Хотя выявленные различия параметров были статистически недостоверными, очевидно, что пиявит несколько благоприятнее, чем гепарин, воздействует на реологические свойства крови.



Запись АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов в богатой тромбоцитами плазме, стабилизированной пиявитом (1) и гепарином (2).

На следующем этапе работы оценивали влияние гепарина и пиявита на реологические свойства крови больных ишемической болезнью сердца. Из таблицы видно, что хотя обнаруженные различия также недостоверны, однако имеет место такая же тенденция к улучшению реологических свойств крови в присутствии пиявита, которая наблюдается при анализе крови крыс.

Спонтанную агрегацию тромбоцитов изучали в образцах плазмы, стабилизированной пиявитом либо гепарином. Ни в одной из 8 проб, содержащих пиявит, не было отмечено изменения оптической плотности в течение 10 мин (при отсутствии индуктора агрегации). В 5 из 8 проб, содержащих гепарин, имело место снижение оптической плотности (от 10 до 55%) за счет спонтанной агрегации тромбоцитов.

Во второй серии опытов использовали пробы богатой тромбоцитами плазмы, стабилизированной 3,8% раствором цитрата натрия. К плазме добавляли пиявит либо гепарин, инкубировали в течение 2 ч при 37° и вносили АДФ в качестве индуктора агрега-

ции. В пробах плазмы, инкубированной с пиявитом, агрегация была на $34 \pm 8\%$ меньше, чем в пробах, содержащих гепарин. Время агрегации (время достижения минимума оптической плотности) практически не менялось. На рисунке представлены кривые агрегации тромбоцитов, стимулированной АДФ, в присутствии гепарина и пиявита.

В пробах плазмы, полученных из крови больных ишемической болезнью сердца, стабилизированной цитратом натрия, изучали влияние гепарина и пиявита на агрегацию тромбоцитов путем добавления этих растворов непосредственно к кювету агрегометра. В 6 случаях из 8 гепарин в количестве 2 ед./мл вызывал агрегацию тромбоцитов, добавление же пиявита не приводило к изменению оптической плотности. Эти результаты полностью согласуются с данными литературы о способности гепарина индуцировать агрегацию тромбоцитов в опытах *in vitro* и *in vivo* [10, 13].

Таким образом, наши исследования показали, что использование пиявита в качестве стабилизатора крови не только не ухудшает ее реологических свойств, но даже имеет ряд преимуществ по сравнению с гепарином. Эти преимущества выражаются в тенденции к снижению вязкости крови, а также в отсутствии способности вызывать спонтанную агрегацию тромбоцитов. Кроме того, пиявит оказывает более сильное по сравнению с гепарином ингибиторное действие на агрегацию тромбоцитов, индуцированную АДФ. Следовательно, можно надеяться, что в будущем данный комплексный антикоагулянт будет использован в качестве эффективного стабилизатора крови.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баскова И. П., Никонов Г. И. // В кн.: Тезисы II Всесоюзной конференции «Поражение сосудистой стенки и гемостаз». — Минск, 1983.
2. Баскова И. П., Никонов Г. И. // Биохимия. — 1985. — Т. 50. — С. 424—431.
3. Баскова И. П., Никонов Г. И. // Вопросы мед. химии. — 1986. — № 6. — С. 90—93.
4. Баскова И. П., Никонов Г. И., Мазуров А. В. и др. // Биохимия. — 1987. — № 9. — С. 1461—1468.
5. Кричевский Л. // О сравнительном влиянии гистона и пиявочного экстракта на свертываемость крови. — СПб., 1896.
6. Люсов В. А., Парфенов А. С., Белоусов Ю. Б. // Пробл. гематол. — 1979. — № 2. — С. 7—12.
7. Никонов Г. И., Баскова И. П. // Успехи совр. биол. — 1986. — № 1. — С. 141—154.
8. Парфенов А. С., Радчиц Е. Г., Иванова М. В. // Лабор. дело. — 1978. — № 4. — С. 261—264.
9. Халиль С. // Механизмы тромболизиса и ингибирования свертывания крови препаратами из пиявок *Hirudo medicinalis*. — Автореф. канд. дисс. — М., 1987.
10. Cines D., Kaywin P. // New England J. Med. — 1980. — Vol. 303. — P. 788—795.

11. Dunlop M., Prowse C., Dawes J. // *Thromb. Res.*— 1987.— Vol. 46.— P. 409—410.
12. Marciniak E. // *Thrombos Diathes. haemorh. (Stuttg.)*— 1975.— Vol. 34.— P. 748.
13. Matthias F. R. // *Blood Coagulation Disorders.*— 1986.

14. Mims J., Sarji K., Kleinfelder J. // *Thromb. Res.*— 1977.— Vol. 10.— P. 291—299.

15. Walsmann P., Markwardt F. // *Pharmazie.*— 1981.— Vol. 36.— P. 653.

Поступила 15.07.88

УДК 615.811.2—02:612.112.3

ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА ИЗ МЕДИЦИНСКИХ ПИЯВОК (*HIRUDO MEDICINALIS*) НА ФАГОЦИТОЗ И СИСТЕМУ КОМПЛЕМЕНТА

И. П. Баскова, Г. И. Никонов, Э. Г. Миркамалова, В. В. Зинченко, Л. В. Козлов

*Кафедра физиологии человека и животных (зав.— акад. АМН СССР И. П. Ашмарин)
Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова,
Лаборатория клинической иммунологии (зав.— канд. мед. наук Н. И. Гурарий)
Научно-исследовательского института эпидемиологии, микробиологии
и инфекционных заболеваний МЗ УЗССР*

Медицинская пиявка оказывает много-стороннее положительное действие при целом ряде заболеваний [14]. Понимание механизма лечебного эффекта гирудотерапии возможно лишь при изучении широкого спектра биологически активных веществ, продуцируемых медицинской пиявкой и содержащихся в секрете ее слюнных желез.

Кроме таких известных ингибиторов протеолитических ферментов, как гирудин [22], бделлины [18] и эглины [19], а также фермент гиалуронидаза [17], нами в секрете слюнных желез медицинских пиявок были обнаружены новый фермент дестабилаза, разрушающий изопептидные связи в стабилизированном фибрине и оказывающий тромболитическое действие [1], ингибитор калликреина плазмы крови и простагландин [2], по спектру действия подобные простагландину и его стабильным аналогам. Нами показано, что секрет пиявок независимо от наличия в нем гирудина подавляет тромбоцитарно-сосудистый гемостаз, препятствуя адгезии тромбоцитов на поверхности коллагена и агрегации тромбоцитов, стимулированной индукторами различной природы, путем активации аденилатциклазы мембран тромбоцитов [3]. Независимо от наличия гирудина секрет блокирует контактную стадию внутреннего механизма свертывания крови путем ингибирования калликреина плазмы крови и фактора Хагемана [4].

Однако секрет пиявок воздействует не только непосредственно на компоненты, участвующие в процессах гемостаза. Отмечено положительное действие гирудотерапии при ряде заболеваний, непосредственно не связанных с нарушением гемостатического процесса. Так, известно, что гирудотерапия оказывает выраженное противовоспалительное действие [14], повышает фагоцитарную способность крови больных [13], положительно влияет при различных нарушениях функционального состояния организма [9].

В связи с этим целью настоящей работы являлось изучение влияния секрета слюн-

ных желез и экстрактов из медицинских пиявок на фагоцитарную способность нейтрофилов человека, на компоненты системы комплемента, обеспечивающей защитные функции организма.

Секрет слюнных желез получали от медицинских пиявок, голодавших не менее 3 мес. В работе использовали разбавленные физиологическим раствором порции секрета, содержащие около 5 мг белка в 1 мл. Экстракты готовили путем размельчения пиявок в высокоскоростном гомогенизаторе «Полиtron» с двойным объемом физиологического раствора при температуре 4°. Надосадочную жидкость отделяли центрифугированием при 4° в течение 30 мин при 2000 об./мин. В работе применяли также лиофилизированный диализат, который получали после диализа гомогената против дистиллированной воды при 4° в течение 48 ч.

Препараты из медицинских пиявок, применявшиеся нами в работе, обладали характерным для них спектром антигемостатических свойств и ингибировали протеолитическую активность трипсина и химотрипсина [16]. Фагоцитарную активность нейтрофилов человека определяли по известному методу [12]. Антикомплементарную активность (по классическому пути активации) оценивали по снижению гемолитической активности разбавленной сыворотки крови человека после ее инкубации с исследуемым препаратом [6]. В инкубационную смесь вносили 200 мкл суспензии сенсibilизированных эритроцитов барана и продолжали инкубацию. Контрольная проба не содержала исследуемого препарата. После инкубации в каждую пробу добавляли раствор NaCl, центрифугировали и определяли гемолиз по поглощению при длине волны 412 нм. Активацию комплемента по альтернативному пути анализировали в соответствии с методом [7]. Степень влияния концентрации добавленного экстракта на фагоцитарную активность показана на рис. 1: с разведением