

Г. В. АНДРЕЕНКО

ВЛИЯНИЕ ДИКУМАРИНА НА КОНЦЕНТРАЦИЮ В КРОВИ ПРОТРОМБИНА И ТРОМБОТРОПИНА

(Представлено академиком Л. А. Орбели 28 VI 1948)

Работами Б. А. Кудряшова ⁽¹⁾ установлено наличие в плазме крови животных и человека нового фактора, участвующего в осуществлении процесса свертывания крови. Это вещество, названное тромботропином, по видимому, имеет ферментную природу и участвует в I фазе процесса свертывания крови (по Шмидту), т. е. при превращении протромбина в тромбин под воздействием тромбопластина и ионов кальция.

Данная работа посвящена изучению влияния одного из ингибиторов витамина К — дикумарина на протромбин и новый фактор — тромботропин. Действие дикумарина в качестве ингибитора витамина К изучено и описано в 1941 г. ⁽²⁾. Впервые внимание на дикумарин было обращено в 1924 г. в связи с геморрагической болезнью крупного рогатого скота, названной «болезнью сладкого клевера» и вызываемой кормлением животных испорченным клеверным сеном. Дальнейшее изучение показало, что причиной заболевания является действие на животное дикумарина, образующегося из кумарина клевера при загнивании сена. Дикумарин, по мнению ряда исследователей, оказывает влияние только на протромбин крови, снижая его почти до нуля и тем самым вызывая кровоточивость и смерть животных от потери крови. Витамин К в достаточных дозах защищает от развития гипопротромбинемии, вызываемой дикумарином.

В опытах, проведенных на 70 белых крысах, мы полностью убедились в том, что дикумарин при внутривенных и подкожных инъекциях вызывает резкое снижение протромбина на 90—95%. Новый фактор свертывания крови — тромботропин — также значительно снижается, в среднем на 85%, но в большинстве случаев степень снижения его концентрации не совпадает с изменением концентрации протромбина (крысы №№ 49, 18, 19, 21, 23 и т. д.). Получаемый эффект от различных доз дикумарина (0,5; 1,5; 2; 3; 5 и 10 мг) почти одинаков, однако на снижение концентрации протромбина несколько сильнее действует доза в 10 мг (рис. 1).

Оказалось, что максимум действия дикумарина отмечается в первые 24 часа после инъекции. Через 72—96 час. с момента введения живот-

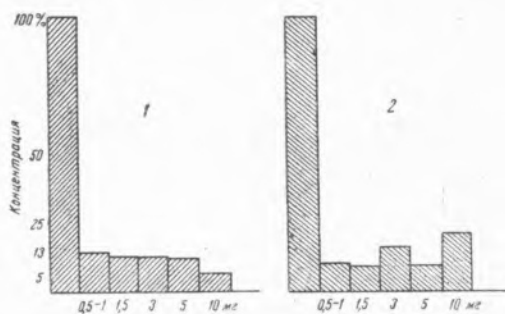


Рис. 1. Изменения концентраций протромбина (1) и тромботропина (2) в крови нормальных крыс, под влиянием инъекций различных доз дикумарина

ному дикумарина наблюдается постепенное восстановление концентрации протромбина и тромботропина, и к 120—144 час. она достигает физиологического уровня. При этом концентрация тромботропина часто снижается меньше, чем концентрация протромбина, и по сравнению с

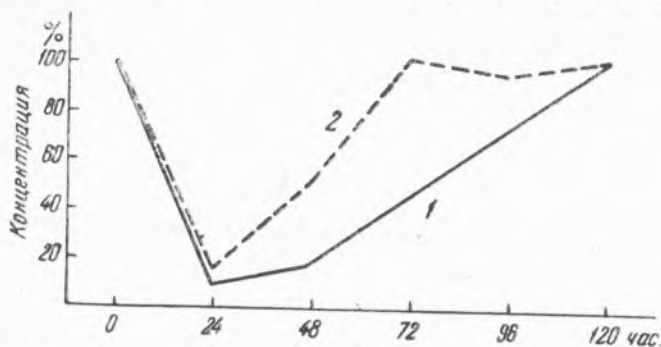


Рис. 2. Изменения концентраций протромбина (1) и тромботропина (2) в крови нормальных крыс под влиянием однократной инъекции дикумарина (средняя для всех доз)

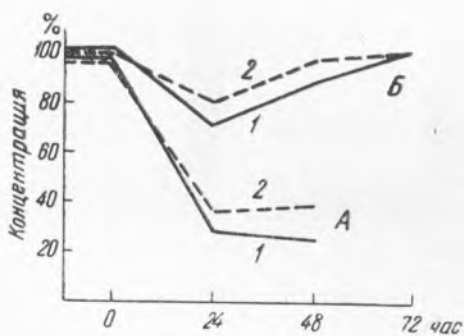


Рис. 3. Изменения концентраций протромбина (1) и тромботропина (2) под влиянием внутривенных однократных инъекций дикумарина и витамина К. А — контроль, Б — опыт

последней быстрее возвращается к физиологической норме (рис. 2). Однако в некоторых случаях наблюдается и обратное соотношение.

Нами была осуществлена попытка выяснить количественное соотношение физиологических взаимно нейтрализующих доз дикумарина и витамина К. Результаты этого эксперимента (рис. 3) свидетельствуют не только о наличии антагонистического взаимодействия между дикумарином и витамином К в смысле стимуляции или угнетения биосинтеза протромбина, но и о диаметрально противоположном влиянии этих веществ

на продукцию в организме тромботропина.

Большой интерес представляет вопрос о том, как влияет дикумарин на витамин К и протромбин, осуществляется ли непосредственное взаимодействие дикумарина с витамином К или нет. С целью пролить свет на этот вопрос нами был поставлен следующий опыт. Крысам с перевязанным желчным протоком (3) и содержащимся на диете, лишенной витамина К, вводился дикумарин. В этот момент концентрация протромбина и тромботропина находилась еще на физиологическом уровне. Введение дикумарина вызывало резкое падение протромбина до 0 и тромботропина в среднем до 18%. В течение 2—3 дней концентрации того и другого фактора оставались крайне низкими. Многие животные погибли с явлениями кровоизлияния в кишечник. Если же крысы переживали этот критический период, то, начиная с 72 час. после инъекции дикумарина, концентрации тромботропина и протромбина у них постепенно возрастали, достигая нормы к 240 час.; через 1—3 дня после этого происходило новое снижение обоих факторов, характерное для экспериментальных К-авитаминозных желтушных крыс.

Таблица 1

	Число животных	Средний % до опыта		Доза дикумарина в мг	Доза витамина К* в мг	Средний % через 24 часа	
		протромбина	тромботропина			протромбина	тромботропина
Опыт	18	100	100	0,5—1	5	71,4	80,4
Контроль	6	100	100	0,5	—	28,2	37,1

* Бисульфитный комплекс 2-метил-1,4-нафтохинона,

Этот опыт свидетельствует о том, что дикумарин, введенный в организм крысы, лишенной притока витамина К извне, вначале подавляет синтез протромбина, однако через некоторое время действие дикумарина ослабевает или исчезает, очевидно, в связи с его распадом или удалением из организма, и вновь восстанавливается синтез протромбина и тромботропина. Это явление свидетельствует о том, что в организме

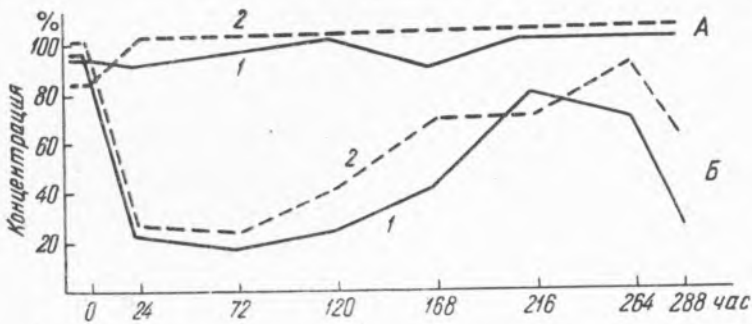


Рис. 4. Изменения концентраций протромбина (1) и тромботропина (2) в крови желтушных крыс под влиянием дикумарина. А — контроль, Б — опыт

подопытных животных сохраняется некоторый запас витамина К, т. е. дикумарин не обладает разрушающим действием на витамин К, сосредоточенный в тканях. Этого запаса витамина К хватает организму на несколько суток, и после его истощения у животных с перевязанным желчным протоком вновь развивается гипопротромбинемия, которую можно устранить только препаратами витамина К (рис. 4).

Опыты, проведенные по установлению минимальной физиологической дозы использованного нами препарата дикумарина, показали, что навески в 10, 50, 100, 150 и 200 γ не дают сколько-нибудь заметных изменений в концентрации протромбина и тромботропина в крови крыс. Некоторое действие дает навеска в 250 γ , снижающая содержание протромбина до 33%, но не действующая на тромботропин. В литературе имеются многочисленные указания на то, что действие дикумарина проявляется не раньше, чем через 24 часа после введения. Наши опыты убедили нас в том, что действие дикумарина проявляется уже через 2 часа после инъекции. Так, концентрация протромбина при этом снижается до 33%, а тромботропина до 18%. Дальнейшее падение концентрации того и другого факторов наблюдается до 18—20 час., после чего, к 24 час., начинается незначительное ее повышение. Сообщения ряда авторов (4) и гипопротромбинемическом действии салициловой кислоты и ее солей нашли подтверждение в наших опытах. При этом оказалось, что при снижении протромбина на 50—40% от нормы тромботропин изменяется лишь незначительно.

Второй задачей нашего исследования мы поставили себе изучение физико-химических свойств тромботропина. В ряде опытов удалось

установить, что тромботропин содержится не только в целой плазме, но и в сыворотке крови крыс, а также в плазме, разведенной 10-кратным количеством дистиллированной воды и подкисленной уксусной кислотой до $pH = 5,3$, т. е. плазме с удаленным протромбином. Изучение воздействия на тромботропин химических агентов и адсорбентов показало, что сульфат аммония полностью подавляет активность тромботропина в сыворотке крови, однако активность восстанавливается полностью после удаления всего сульфата аммония 30—40-часовым диализом большого объема дистиллированной воды.

Трихлоруксусная и фосфорновольфрамовая кислоты необратимо осаждают тромботропин, что свидетельствует, по видимому, в пользу белковой природы этого фактора. Адсорбенты — окись алюминия, бентонит и активированный уголь — адсорбируют тромботропин, но снять его вновь буферным раствором не удается, возможно, потому, что, например, с бентонита лучше всего элюировать щелочными растворами, а в наших опытах оказалось, что подщелачивание ведет к разрушению активности тромботропина. Спирт и ацетон частично осаждают тромботропин, но активность сохраняется как в фильтрате, так и в осадке. Действия на тромботропин химических агентов и адсорбентов оен Диализ того и другого вызывает некоторое увеличение активности.

Таким образом, путем адсорбции или осаждения ацетоном, спиртом или сульфатом аммония нам не удалось получить в более или менее концентрированном виде тромботропин. При помощи диализа через коллоидную мембрану, против чистой воды, сыворотки крови, разведенной водой, был получен некоторый положительный результат. Оказалось, что тромботропин не диализирует через перепонку. При диализе целой сыворотки и разведенной в 2 и 4 раза выпадает белый осадок, при растворении которого в гипертоническом солевом растворе (1,17%) получается активный концентрат тромботропина, дающий в стандартных условиях ⁽¹⁾ время свертывания 7—9 сек. Такие наиболее очищенные растворы с целью изучения устойчивости препарата подвергались нагреванию до различной температуры. Как видно из результатов табл. 2, нагревание до 55° при $pH = 6,2$ значительно снижает активность тромботропина, что, по нашему мнению, свидетельствует в пользу ферментной природы этого вещества.

Таблица 2

Время свертывания до нагревания в сек.	Темп-ра нагревания в °C	Время нагревания в мин.	Время свертывания после нагревания в сек.
	556		
9		30	10
9		15	10
7		10	15
9		10	25
9		10	25
Контроль (чистый тромбопластин)		10	28

Институт зоологии
Московского государственного университета
им. М. В. Ломоносова

Поступило
2 VI 1948

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Б. А. Кудряшов, ДАН, 60, 1469 (1948). ² Н. А. Campbell, W. K. Smith, W. L. Roberts and K. P. Link, J. Biol. Chem., 138, 1 (1941); A. J. Quick, Am. J. Physiol., 118, 260 (1937). ³ Б. А. Кудряшов, П. Д. Улитина и А. А. Пугачева, Бюлл. эксп. биол. и мед., 9, 99 (1941); Б. А. Кудряшов, Усп. совр. биол., 14, 466 (1941). ⁴ К. P. Link, R. S. Overman, W. R. Sullivan, C. F. Huebner and L. D. Scheel, J. Biol. Chem., 147, 463 (1943).