

КЛИНИЧЕСКАЯ БИОХИМИЯ

Н. Е. Максимович

СТЕПЕНЬ АГРЕГАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ У КРЫС ПРИ РЕПЕРфуЗИОННЫХ ПОВРЕЖДЕНИЯХ ГОЛОВНОГО МОЗГА В УСЛОВИЯХ МОДУЛЯЦИИ ПУТИ «L-АРГИНИН-NO»

Гродненский государственный
медицинский университет

В экспериментах у 128 крыс с субтотальной ишемией-реперфузией головного мозга исследовали степень агрегации тромбоцитов в условиях модуляции «L-Аргинин-NO» по методу Born G. на анализаторе агрегации тромбоцитов (AP 21103АО "Солар").

При использовании L-Аргинина, а также ингибиторов NO-синтазы (NOS): неселективного ингибитора N ω -nitro-L-Arginine Methylester, селективного ингибитора нейрональной NOS 7-nitro-Indazole и селективного ингибитора индуцибельной NOS S-Methylisothiurea установлен NO-зависимый характер изменений степени агрегации тромбоцитов у крыс с субтотальной ишемией-реперфузией головного мозга. В ранний период ишемии-реперфузии головного мозга роль повышения степени агрегации тромбоцитов связана с образованием NO при участии нейрональной NO-синтазы, а в поздний период – индуцибельной NO-синтазы. N ω -nitro-L-Arginine Methylester, как ингибитор всех изоформ NOS, включая эндотелиальную NOS, обладает проагрегантными свойствами. L-Аргинин в сочетании с 7-nitro-Indazole и S-Methylisothiurea оказывает наиболее выраженный антиагрегационный эффект. Полученные данные позволяют предположить, что оксид азота, образуемый при участии эндотелиальной NO-синтазы, уменьшает агрегацию тромбоцитов при ишемии-реперфузии головного мозга у крыс.

Одним из основных направлений терапии ишемических и реперфузионных повреждений головного мозга является нормализация реологических свойств крови, нарушение которых играет важную роль в патогенезе постишемического реперфузионного синдрома [1, 2]. При постишемическом реперфузионном синдроме наблюдается повышение адгезии тромбоцитов к поврежденной сосудистой стенке, усиление их агрегации, что приводит к образованию тромбов, блоку микроциркуляции и усилению нейродистрофических процессов.

Важным модулятором реологических свойств крови, а следовательно мозгового кровотока, в норме и при патологии является оксид азота (NO). NO обладает ингибирующими адгезию и агрегацию тромбоцитов свойствами, препятствует развитию вазоспазма и тромбоза [3, 12, 14]. В регуляции мозгового кровотока принимает участие NO, синтезируемый в тромбоцитах и в эндотелии сосудов. NO тромбоцитов усиливает их антиагрегационные и антиадгезивные свойства и тем самым улучшает реологические свойства крови [12]. В регуляции антитромбогенных свойств крови участвует также NO эндотелиального происхождения, а при снижении образования NO в эндотелии активируются тромбогенные эффекты [1, 5, 12, 14]. Однако до сих пор остается открытым вопрос о роли NO нейронального и макрофагального происхождения в изменении агрегации тромбоцитов при ишемии-реперфузии головного мозга (И/РГМ). Предполагается, что NO, образуемый при патологических состояниях при участии нейрональной и индуцибельной изоформ NO-синтаз (NOS), также может оказывать модулирующее функцию тромбоцитов действие.

Целью работы явилось выяснение роли NO различных изоформ NO-синтаз в изменении степени агрегации тромбоцитов

у крыс в ранние и поздние периоды реперфузионных повреждений головного мозга.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проведены на 128 белых беспородных крысах-самцах массой 220-250 г. И/РГМ моделировали путем получасовой двухсторонней окклюзии общих сонных артерий с последующей реперфузией в условиях внутривенного тиопенталового наркоза (60 мг/кг) [9]. По окончании реперфузионного периода осуществляли забор крови для получения обогащенной тромбоцитами плазмы. Все животные были разделены на 8 групп (n=16), каждая из которых состояла из 2-х подгрупп (n=8): с изучением степени агрегации тромбоцитов (САТ) в ранний (30 минут) и в поздний (24 часа) реперфузионные периоды. Крысам первой группы (ложнооперированные крысы, контроль 1) вводили изотонический раствор NaCl (0,5 мл). Крысам второй группы (контроль 2) внутривенно вводили 0,5 мл изотонического раствора NaCl. Крысам остальных (3-8) групп вводили модуляторы пути «L-Аргинин-NO». Крысам третьей группы вводили субстрат для NOS - L-Аргинин (150 мг/кг), четвертой группы - неселективный ингибитор NOS - N ω -nitro-L-Arginine Methyl Ester (L-NAME, 5 мг/кг), пятой группы - селективный ингибитор нейрональной NOS (nNOS) - 7-nitro-Indazole (7-NI, 10 мг/кг), шестой группы - селективный ингибитор индуцибельной NOS (iNOS) - S-Methylisothiourea (S-MT, 1 мг/кг), седьмой группы - 7-NI и S-MT, восьмой группы - 7-NI, S-MT и L-Аргинин в аналогичных дозах. Введение препаратов осуществляли внутривенно непосредственно после окклюзии общих сонных артерий.

Определение степени агрегации тромбоцитов осуществляли по методу Born G. на автоматическом компьютерном анализаторе агрегации тромбоцитов (AP 21103АО "Солар")[4]. В качестве индуктора агрегации использовали АДФ «Sigma» в концентрации 2,5 мкМ. Мерой

агрегационного процесса служило графически регистрируемое падение оптической плотности плазмы крови вследствие потребления тромбоцитов в агрегатах, образующихся под воздействием индуктора агрегации.

Полученные данные обработаны методами вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

У крыс 2-й группы с И/РГМ в ранний период САТ составила $63,3 \pm 1,13\%$, что выше, чем в 1-й группе ($50,0 \pm 0,82\%$, $p < 0,001$), а в поздний период увеличилась до $67,0 \pm 0,85\%$, что также выше, чем у ложнооперированных крыс ($50,0 \pm 0,83\%$, $p < 0,001$) (рис.).

В дальнейшем сравнительный анализ изменений САТ при И/РГМ будет осуществляться в каждой из 3-8 групп со значениями САТ во 2-й группе, а также между значениями САТ некоторых групп и подгрупп (в раннем и в позднем периодах).

При введении крысам с И/РГМ L-Аргинина (3-я группа) САТ в ранний реперфузионный период уменьшилась до $58,9 \pm 0,58\%$ ($p < 0,05$), а в поздний период - до $63,5 \pm 0,73\%$ ($p < 0,05$), что рассматривается как проявление его антиагрегационных эффектов.

В отличие от предыдущей группы введение L-NAME, обладающего свойствами необратимого ингибитора конституциональных изоформ NOS и обратимого ингибитора iNOS (4-я группа), привело к увеличению САТ как в ранний ($75,0 \pm 1,85\%$, $p < 0,001$), так и в поздний ($78,8 \pm 1,13\%$, $p < 0,001$) реперфузионные периоды.

Введение крысам ингибитора nNOS 7-NI (5-я группа) привело к уменьшению САТ в ранний ($59,5 \pm 0,91\%$, $p < 0,05$) и в поздний ($62,0 \pm 1,13\%$, $p < 0,05$) реперфузионные периоды. Это дает основание считать, что NO, образуемый при участии нейрональной NOS, приводит к повышению агрегационных свойств тромбоцитов в оба реперфузионные периода. А анализ результатов изменений САТ в 4-й и 5-й группах позволяет сделать предположение,

что причиной повышения САТ у крыс с введением L-NAME в ранний реперфузионный период является угнетение эндотелиальной NOS. Исходя из обратимости ингибирующего эффекта L-NAME в отношении iNOS, предполагается, что в поздний период И/РГМ повышение агрегационных свойств тромбоцитов связано с гиперактивностью iNOS.

Введение крысам с И/РГМ ингибитора iNOS S-MT привело к снижению САТ только в поздний реперфузионный период ($58,1 \pm 0,55\%$, $p < 0,001$), в то время как в ранний период реперфузии САТ оставалась стабильной ($63,0 \pm 0,85\%$, $p > 0,05$). Следовательно, iNOS участвует в повышении САТ в поздний период И/РГМ.

Введение животным 7-й группы обоих селективных ингибиторов NOS - 7-NI и S-MT вызвало снижение САТ, причем в поздний период более значительное ($55,0 \pm 0,65\%$, $p < 0,05$), чем в группе с изолированным введением S-MT ($p < 0,05$). Однако, в ранний реперфузионный период САТ ($57,0 \pm 0,38\%$, $p < 0,05$) не отличалась от ее значения в группе с введением 7-NI ($p > 0,05$). Эти результаты свидетельствуют о выраженных проагрегационных свойствах NO, образованного при участии nNOS в ранний реперфузионный период, и обеих NOS (nNOS и iNOS) - в поздний период И/РГМ.

Сочетанное введение животным 8-й группы 7-NI, S-MT и L-Аргинина выявило наиболее выраженный антиагрегационный эффект как в ранний (до $52,0 \pm 1,73\%$, $p < 0,05$), так и в поздний (до $51,9 \pm 0,72\%$, $p < 0,001$) реперфузионные периоды. Важно отметить, что САТ у крыс данной группы в ранний реперфузионный период не отличалась от ее значения у ложнооперированных животных ($p > 0,05$), а в поздний период И/РГМ различия со значением САТ в группе контроль 1 продолжали сохраняться ($p < 0,05$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Из анализа полученных результатов следует, что при субтотальной И/РГМ происходит достоверное увеличение САТ в оба реперфузионных периода, причем в поздний реперфузионный период САТ повышается более значительно. Установлено, что увеличение САТ при И/РГМ связано с NO-зависимым механизмом [2, 3].

Введение L-Аргинина уменьшает САТ в оба периода И/РГМ. Антиагрегационный эффект L-Аргинина может быть связан с повышением образования в тромбоцитах и в эндотелии сосудов NO, обладающего антиагрегационными свойствами. Как известно, антиагрегационный эффект NO связан с активацией синтеза цГМФ [12, 18], подавлением на тромбоцитах экспрессии

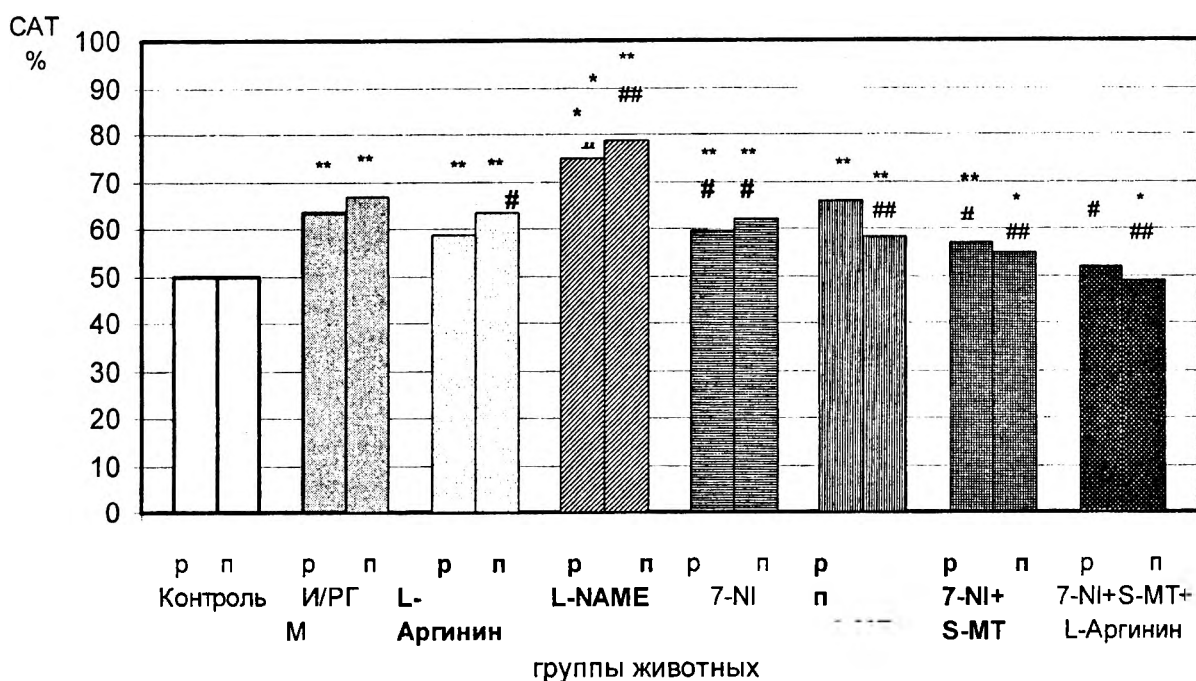


Рис.1 Степень агрегации тромбоцитов (САТ) у крыс с ишемией-реперфузией головного мозга (И/РГМ) в ранний (р) и поздний (п) реперфузионные периоды при введении модуляторов пути "L-Аргинин-NO"

P-селектина, участвующего во взаимодействии тромбоцитов с эндотелием [12], снижением мобилизации Ca^{++} [11].

Кроме того при использовании у крыс с И/РГМ неселективного и селективных ингибиторов NOS установлена зависимость характера изменений САТ от активности различных изоформ NO-синтаз. Исходя из полученного при введении крысам с И/РГМ селективного ингибитора 7-NI антиагрегационного эффекта в ранний и в поздний реперфузионные периоды следует, что возможной причиной увеличения САТ при данной патологии является гиперактивность нейрональной NOS. Следует отметить, что с повышенной активностью nNOS и гиперпродукцией NO при ее участии связаны механизмы глутаматной эксайтотоксичности при ишемических нарушениях мозгового кровообращения. Кроме того избыточные количества NO приводят к окислительному стрессу и повреждению сосудистого эндотелия, как одной из причин повышения агрегационных свойств тромбоцитов [13].

В отличие от 7-NI введение неселективного ингибитора NO L-NAME привело к повышению САТ в оба периода И/РГМ. Как известно, L-NAME наряду с нейрональной изоформой NOS необратимо ингибирует эндотелиальную NOS, а также является обратимым ингибитором индуцибельной NOS. Предполагается, что в ранний период И/РГМ стимулирующий агрегацию тромбоцитов эффект L-NAME связан с его ингибирующим эндотелиальную NOS действием, а в поздний период - с повышением активности индуцибельной NOS. Предполагается, что антиагрегационные эффекты NO эндотелиального происхождения связаны с его антиоксидантными и эндотелийпротекторными свойствами [15]. Одним из важных механизмов защиты эндотелия при участии NO является ингибирование лейкоцитарной адгезии [7].

Выявленный в поздний период И/РГМ антиагрегационный эффект S-MT дает основание считать, что в данный период повышение САТ опосредует NO, образуемый при участии индуцибельной изоформы NOS. В отличие от конституциональных изоформ NOS (eNOS и nNOS) iNOS активируется, начиная с 6-12 часов после ишемического сти-

мула, с достижением максимальной активности к 24 часам [2, 6]. Источниками iNOS в ткани мозга при его ишемии-реперфузии могут быть не только макрофаги, но и эндотелиальные клетки, тромбоциты [10] и даже нейроны [8].

В качестве причины увеличения САТ при повышенной активности nNOS и, в особенности, iNOS предполагается повреждение сосудистого эндотелия и тромбоцитов высокими концентрациями NO. Как известно, значительные концентрации NO вызывают необратимые изменения ферментов дыхательной цепи и ингибируют синтез ДНК [13]. Особенно сильным повреждающим действием обладает образующийся из NO пероксинитрит [13].

ВЫВОДЫ

1. Комплексный анализ изолированного и сочетанного введения селективных и неселективных ингибиторов NO, а также L-Аргинина дает основание считать, что повышение САТ при И/РГМ связано с гиперактивностью нейрональной и индуцибельной изоформ NOS. Увеличение активности nNOS обуславливает повышение САТ в оба периода И/РГМ, а iNOS - только в поздний период И/РГМ.
2. Результаты, полученные при изолированном введении модуляторов пути «L-Аргинин-NO», а также результаты совместного введения 7-NI, S-MT и L-Аргинина, выявившего наиболее выраженный антиагрегационный эффект, доказывают важность эндотелиальной NOS и образованного при ее участии NO в антиагрегационных эффектах NO.
3. Полученные результаты указывают на необходимость избирательного подхода при коррекции агрегационных свойств тромбоцитов при И/РГМ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лобанок Л. М., Лукша Л. С. Функциональная роль эндотелия сосудов: патофизиологические и клинические аспекты // Медицинские новости. - 1999. - № 4. - С. 21 - 29.

2. Нечипуренко Н. И. Роль оксида азота при ишемии головного мозга // Медицинские новости. - 2004. - № 1. - С. 7 - 10.
3. Adams H. P., Emergent Use of Anticoagulation for Treatment of Patients With Ischemic Stroke // Stroke. - 2002. -V. 33(3). - P. 856 - 861.
4. Born G. V. R. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal// Nature. - 1962. - V. 194. - P. 927 - 929.
5. Busse R., Lucknoff A., Bassenge E. Endothelium-derived relaxant factor inhibits platelet activation // Naunyn-Schmeideberg Arch. Pharmacol. - V. 336. -P. 9030 - 9033.
6. Iadecola C., Zhang F., Casey R., Clark H. B., Ross M. E. Inducible nitric oxide synthase gene expression in vascular cells after transient focal cerebral ischemia // Stroke. - 1996. - V. 27(8). - P. 1373 - 1380.
7. Gauthier T. W., Davenpeck K. L., Lefer A. M. Nitric oxide attenuates leukocyte-endothelial interaction via P-selectin in splanchnic ischemia-reperfusion // Am. J. Physiol. - 1994. -V. 267. - P. 562 - 568.
8. Heneka M. T., Galea E., Gavriluyk V., Dumitrescu-Ozimek L. et al. Noradrenergic Depletion Potentiates β -Amyloid-Induced Cortical Inflammation: Implications for Alzheimer's Disease // The Journal of Neuroscience. - 2002. -V. 22(7). - P. 2434 - 2442.
9. Hossman K. A. Experimental models for the investigation of brain ischemia // Cardiovascular Research. - 1998. - V. 39. - P. 106 - 120.
10. Mehta J.L., Chen L.Y., Kone B.C., Mehta P., Turner P. Identification of constitutive and inducible forms of nitric oxide synthase in human platelets // J. Lab. Clin. Med.-1995.- V. 125. - P. 370 - 377.
11. Michelson A. D., Benoit S.E., Furman M.I. et al. Effects of endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide on platelet surface glycoproteins // Am. J. Physiol. - 1996. - V. 270. - P. H1640 - 1648.
12. Moncada S., Radomski M. W.,Palmer R. M. J. Endothelium-derived relaxing factor: identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function // Biochem. Pharmacol. - 1988. - V. 37. - P. 2495 - 2501.
13. Radi R., Beckman J. S., Bush K. M., Freeman B. A. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide // Arch. Biochem. Biophys. - 1991. - V. 288. - P. 481 - 487.
14. Radomski M. W., Zakar T., Salas E. Nitric oxide in platelets // Methods in Enzymology. - 1996. - V.269.-P.88-107.
15. Wink D. A., Miranda K. M., Esprey M. G. et al. Mechanisms of the antioxidant effects of nitric oxide // Antioxidants and Redox Signaling. - 2001.- V.3(2). - P. 203 - 213.

SUMMARY

Maksimovich N. E.

PLATELETS AGREGATION IN RATS WITH BRAIN ISCHAEMIA-REPERFUSION AND MODULATION OF «L-ARGININE-NO» PATHWAY

Platelets aggregation in rats plasma with brain ischaemia-reperfusion and modulation of pathway «L-Arginine-NO» were studied in experiments (method Born in analisator AP 21103AO "SOLAR"). We used L-Arginine and inhibitors of the NO-synthasa: nonselective inhibitor N ω -nitro-L-Arginine Methylester, selective inhibitors of neuronal NO-synthasa - 7-nitro-Indazole and selective inhibitor of inducible NO-synthasa - S-Methylisothiourea. We found, that increase of platelets agregation in rats plasma observed in both periods is mediated via NO: in the early period of brain ischemia it depends on neuronal NO-synthasa and in late period - on inducible NO-synthasa. Moreover, nonselective inhibitor of all isoforms of NO-synthasa (including endothelial NO-synthasa) N ω -nitro-L-Arginine Methylester possesses proagregant properties. On the other hand, L-Arginine in combination with 7-nitro-Indazole and S-Methylisothiourea induces maximal antiagregant effect.

These data allow us to suppose that endothelium-derived NO decrease platelets aggregation in brain ischemia-reperfusion in rats.