

## **КЛИНИКО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ**

УДК 617.54+617.55:616.153-001+57.04  
Коллектив авторов

### **ГЕНЕРАЦИЯ ОКСИДА АЗОТА ТРОМБОЦИТАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА В НОРМЕ И ПРИ РАНЕНИЯХ ГРУДИ И ЖИВОТА**

*М.М. Абакумов, П.П. Голиков, Н.Ю. Николаева, Е.В. Клычникова,  
Т.В. Стоцкая, Б.В. Давыдов, С.Б. Матвеев*

НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского, 129010, Москва,  
Б. Сухаревская пл., 3; факс (095) 921-02-02

Исследована генерация оксида азота тромбоцитами периферической крови человека в норме и при ранениях груди и живота. Тромбоциты выделяли из крови дифференциальным центрифугированием. Генерацию оксида азота тромбоцитами ( $1,0 \times 10^9$ /мл) проводили в среде RPMI 1640, содержащей эмбриональную телячью сыворотку, глутамин и антибиотики, при температуре 37°C в течение 15 ч. Уровень оксида азота определяли по реакции Грисса. Выявлена мощная генерация оксида азота тромбоцитами как в норме ( $7,70 \pm 0,55$  мкмоль/л), так и при ранениях груди и живота ( $11,45 \pm 0,84$  мкмоль/л). При тяжелой степени травматической болезни имеет место гиперпродукция оксида азота, обладающего многофакторным повреждающим действием.

**Ключевые слова:** оксид азота, тромбоциты, ранение.

**ВВЕДЕНИЕ.** В настоящее время установлено, что оксид азота (NO) принимает участие в регуляции сосудистого тонуса, нейроклеточной сигнализации, цитотоксичности, антимикробной защите [1-3]. Специфическую функцию оксида азота в органах и тканях определяют изоформы синтазы оксида азота: нейрональная, индуцибельная и эндотелиальная [1, 4].

Физиологически адекватные пикомолярные концентрации оксида азота, продуцируемые нейрональной и эндотелиальной изоформами синтазы оксида азота, необходимы для регуляции гемодинамики и нейроклеточной сигнализации [1]. Однако наблюдаемый при экстремальных состояниях сверхсинтез (нанолярные концентрации) оксида азота индуцибельной изоформой синтазы оксида азота вносит кардинальный вклад в нарушение процессов регуляции гемодинамики и нейроклеточной сигнализации [4]. Высокий уровень генерации оксида азота индуцибельной синтазой оксида азота, экспрессию которой стимулируют цитокины, определяет цитотоксический потенциал NO, характеризующийся повреждением клеточных структур, мутацией ДНК, интенсивным апоптозом [5]. При этом происходит нарушение функции печени [6], повышение легочной гипертензии, увеличение нейтрофильной инфильтрации в легких [7], снижение мезентериального и почечного кровотока [8].

Одной из важнейших функций макрофагов и лейкоцитов при окислительном стрессе является респираторный взрыв, сопровождающийся гиперпродукцией

активных форм кислорода, в том числе и оксида азота [9, 10]. Взаимодействие оксида азота с супероксид-анион радикалом образует высокотоксичный пероксинитрит ( $\text{ONOO}^-$ ), во многом определяющий интенсивность эндотоксикоза при окислительном стрессе [4].

В то же время роль тромбоцитов в биосинтезе оксида азота изучена крайне недостаточно. Интерес к изучению генерации оксида азота тромбоцитами появился после обнаружения в тромбоцитах синтазы оксида азота [11]. Тромбоциты человека содержат две изоформы синтазы оксида азота: эндотелиальную (eNOS) и индуцибельную (iNOS), которые различаются молекулярной структурой и биохимическими характеристиками [11-13].

Данные о том, что оксид азота, продуцируемый синтазой оксида азота тромбоцитов, ингибирует агрегацию тромбоцитов и проявляет антитромбогенное действие в сосудистой эндотелии, могут иметь определенное клиническое значение [14].

Целью настоящего исследования явилось изучение генерации оксида азота тромбоцитами человека в норме и при ранениях груди и живота, сопровождающихся окислительным стрессом, индуцирующим биосинтез оксида азота.

**МЕТОДИКА.** Изучение генерации оксида азота тромбоцитами проведено у 23 здоровых лиц в возрасте от 18 до 56 лет (контрольная группа) и 22 больных с ранениями груди и живота в возрасте от 24 до 67 лет (основная группа). Согласно шкале тяжести состояния Араче II [15] пострадавшие имели сумму баллов от 12 до 19. Кровь забирали из кубитальной вены (6 мл). В качестве антикоагулянта использовали гепарин в концентрации 20 ед/мл или 3,8% раствор лимоннокислого натрия или 5% раствор динатриевой соли этилендиаминотетракусной кислоты ( $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ ) в 0,15 М NaCl (1:10) [16]. Для эффективного предварительного разделения эритроцитов от лейкоцитов и тромбоцитов к 6 мл крови добавляли равный объем 4% суспензии декстрана-70 [17] и полученную разбавленную кровь оставляли на 40 мин при комнатной температуре для осаждения эритроцитов. Верхний слой, богатый лейкоцитами и тромбоцитами, отбирали и разводили (1:1) фосфатным буфером (20 мМ, pH 7,4), содержащим 20 мМ ЭДТА, центрифугировали при 200 g в течение 10 мин [18]. К верхнему слою, содержащему тромбоциты, добавляли АСД буфер (лимонная кислота 0,8%; цитрат натрия 2,2%, глюкоза 2,4%) в соотношении 8:1 [19] и центрифугировали 10 мин при 200 g для удаления из тромбоцитарной суспензии контаминированных эритроцитов и лейкоцитов. Надосадочную жидкость центрифугировали при 2000 g в течение 20 мин [19]. Чистота выделения тромбоцитов составила 98%. Выделенные из крови тромбоциты разводили смесью, состоящей из среды RPMI 1640 (без фенолового красного) [10], эмбриональной телячьей сыворотки (5%), L-глутамина (2 мМ), гентамицина (80 мкг/мл), пенициллина (100 U/мл), стрептомицина (100 мкг/мл) [9, 20, 21]. Этой смесью доводили концентрацию тромбоцитов до  $0,5 \times 10^8$  в 0,5 мл [22, 23] и в таком объеме суспензию тромбоцитов вносили в лунки плашки для культуры тканей с 24 ячейками диаметром 16 мм (фирма "Costor", США). "Холостая" проба (0,5 мл) не содержала тромбоцитов. Плашку закрывали крышкой и помещали в термостат (37° С) на 15 часов. После инкубации пробы центрифугировали 10 мин при 1500 g. Для определения концентрации стабильного метаболита оксида азота нитрита в пробах использовали реакцию Грисса [24]. К пробам добавляли равный объем реактива Грисса (1% сульфаниламид, 0,1% N-(1-нафтил)этилендиамин, 2,5%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ). Пробы инкубировали 10 мин при 37° С. Оптическую плотность хромогенов проб определяли против "холостой" пробы при длине волны 546 нм [25]. Результат рассчитывали по кривой с использованием стандартных растворов нитрита натрия [4, 26]. Содержание тромбоцитов в цельной крови определяли на гематологическом счетчике "Медоник, СА 530, Mimer" (Швеция).

## ГЕНЕРАЦИЯ NO ТРОМБОЦИТАМИ

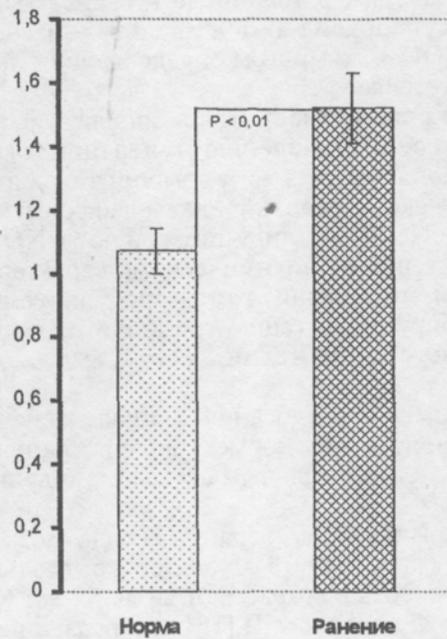


Рисунок 1.

Содержание оксида азота (нмоль/0,5·10<sup>9</sup>) в супернатанте после осаждения тромбоцитов.

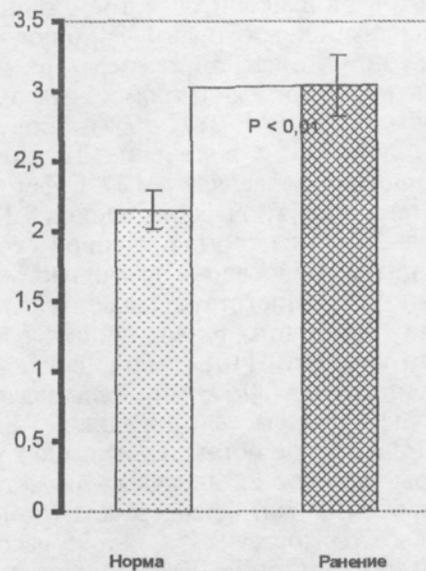


Рисунок 2.

Относительная продукция оксида азота (μмоль/л) тромбоцитами периферической крови

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Результаты исследований показали (рис.1), что уровень генерации оксида азота тромбоцитами в контроле составил  $1,07 \pm 0,07$  нмоль/0,5·10<sup>8</sup> тромбоцитов. У больных с ранениями груди и живота отмечается достоверное повышение уровня генерации оксида азота тромбоцитами -  $1,52 \pm 0,11$  нмоль/0,5·10<sup>8</sup> тромбоцитов ( $P < 0,01$ ) по сравнению с контрольной группой. Относительная концентрация оксида азота, генерируемая тромбоцитами, в контроле составила  $2,15 \pm 0,14$  μмоль/л, а у больных с ранениями

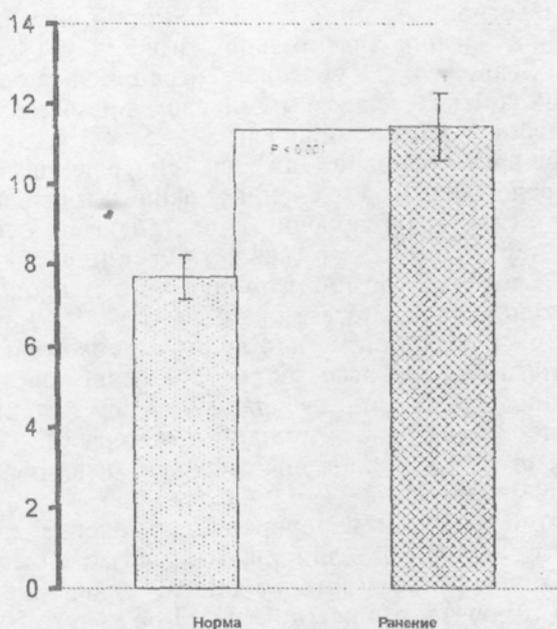


Рисунок 3.

Абсолютная продукция оксида азота (мкмоль/л) тромбоцитами периферической крови.

Таблица. Изоформы синтазы оксида азота [4].

Изоформы	Альтернативные название	Функция/эффект
Тип I (nNOS)	Нейрональная синтаза NO	Нейротрансмиттер Клеточная сигнализация Нейротоксичность
Тип II (iNOS)	Индукцибельная синтаза NO	Цитопротектор Цитотоксичность Антимикробный эффект Иммуномодулятор
Тип III (eNOS)	Эндотелиальная синтаза NO	Клеточная сигнализация Регуляция вазомоторного тонуса

груди и живота она была существенно выше -  $3,05 \pm 0,22$  мкмоль/л ( $P < 0,01$ ) (рис.2).

Абсолютная генерация оксида азота тромбоцитами была определена с учетом конкретного содержания тромбоцитов у каждого исследуемого контрольной и основной групп. В контрольной группе абсолютная концентрация оксида азота, продуцируемая тромбоцитами в сосудистой циркуляции, составила  $7,70 \pm 0,55$  мкмоль/л, а в основной группе -  $11,45 \pm 0,84$  мкмоль/л ( $P < 0,001$ ) (рис.3).

Оценивая полученные нами результаты исследований с учетом абсолютной генерации оксида азота тромбоцитами в сосудистой циркуляции, следует особо подчеркнуть, что тромбоциты периферической крови человека обладают исключительно высокой способностью генерировать оксид азота. При ранениях груди и живота происходит усиление генерации оксида азота тромбоцитами.

По данным Weinberg et al. [9] уровень генерации оксида азота мононуклеарными фагоцитами человека составляет 3-4 мкмоль/л. Продукция оксида азота перитонеальными макрофагами мышей также составляет около 4

мкмоль/л [20]. Известно, что синтетический потенциал индуцибельной синтазы оксида азота мононуклеаров значительно выше, чем у других клеток [1, 27]. Таким образом, обнаруженный уровень генерации оксида азота тромбоцитами соизмерим с биосинтетическим потенциалом индуцибельной синтазы оксида азота других клеточных популяций крови.

В настоящее время основной интерес при изучении патогенетической роли оксида азота сосредоточен на выяснении дефицита оксида азота при сердечно-сосудистой патологии, артериальной гипертензии в особенности. Так, при артериальной гипертензии обнаружено снижение функции эндотелиальной синтазы оксида азота и тромбоцитарной синтазы оксида азота III типа, идентичной эндотелиальной синтазе оксида азота [19]. Как известно, снижение уровня оксида азота в сосудистой эндотелии сопровождается внутриклеточным накоплением  $Ca^{2+}$ , который вызывает сокращение сосудистой стенки [19]. Механизм снижения продукции оксида азота при артериальной гипертензии авторы связывают с нарушением липидного обмена [22]. В связи с этим при артериальной гипертензии предложены лечебные мероприятия, направленные на повышение уровня оксида азота.

С другой стороны, при гиперпродукции оксида азота реализуется его патогенный эффект, связанный с длительным расслаблением сосудистой стенки и последующим снижением артериального давления [4], снижением мезентериального и почечного кровотока [8]. Кроме того, гипергенерация оксида азота в легких вызывает развитие респираторного дистресс-синдрома взрослых [27].

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что абсолютный уровень генерации оксида азота тромбоцитами даже у здоровых существенно превышает абсолютный потенциал генерации оксида азота лейкоцитами. Согласно данным ряда авторов [1, 28] генерация оксида азота конститутивными изоформами синтазы оксида азота составляет пикомолярные концентрации. Следовательно, можно предположить, что обнаруженная суперпродукция оксида азота в тромбоцитах генерируется индуцибельной формой синтазы оксида азота. Это не исключает участия конститутивных изоформ синтазы оксида азота тромбоцитов в общем пуле генерации оксида азота. Учитывая специфичность эффекта изоформ синтазы оксида азота (табл.1) [4], такое участие вполне возможно.

Индуцибельная синтаза оксида азота (iNOS) экспрессируется кининами (фактором некроза опухоли- $\alpha$ , интерфероном  $\gamma$ ) и является кальций-независимой, эндотелиальная (eNOS) - кальций-зависимая и отвечает за физиологический уровень продукции оксида азота, в том числе и в тромбоцитах [19]. При повышении уровня цГМФ усиливается биосинтез оксида азота тромбоцитами [22]. Выявлено, что оксид азота, продуцируемый изоформой синтазы оксида азота (тип III) тромбоцитов, которая идентична эндотелиальной синтазе оксида азота, ингибирует агрегацию тромбоцитов и проявляет антитромбогенное действие в сосудистой эндотелии [19]. При этом оксид азота подавляет действие вазоконстрикторов (тромбоксана A2 и серотонина), выделяемых из тромбоцитов [14]. Механизм антитромбогенного действия оксида азота тромбоцитов обусловлен его влиянием на сигналы адгезивных молекул и способностью ингибировать экспрессию адгезивных молекул эндотелия [29, 30]. Ингибирование агрегации тромбоцитов оксидом азота тесно связано со снижением активности фосфолипазы C и снижением образования тромбоксана A2 в тромбоцитах [31].

С клинической точки зрения представляется важным, что гиперпродукция оксида азота индуцибельной синтазой оксида азота может быть одной из причин вторичного кровотечения, нередко отмечаемого при экстремальных состояниях [1]. Это положение согласуется с нашими данными, согласно которым тромбоциты, действительно, обладают способностью к гиперпродукции оксида азота при тяжелых ранениях груди и живота.

В отличие от нейтрофилов, которые при респираторном взрыве резко

усиливают продукцию супероксидного радикала и оксида азота с образованием токсичного пероксинитрита, тромбоциты прямо не участвуют в процессах респираторного взрыва. Следовательно, формирование пероксинитрита, образующегося в реакции супероксидного радикала и генерируемого тромбоцитами оксида азота необходимо продемонстрировать в прямых экспериментах. Тем более, что как супероксидный радикал, так и оксид азота в силу высокой реактивности взаимодействуют с внутриклеточными структурами, образуя другие реактивные формы кислорода, продукты перекисного окисления липидов, нитриты и нитраты.

Однако вне всякого сомнения, генерация высокой концентрации оксида азота сама по себе вызывает эндотоксикоз, сопровождающийся повреждением клеточных структур, нарушением функции печени, легких, сердца [14, 32].

В клинической практике при лечении состояний, характеризующихся избытком оксида азота, в комплексную терапию все чаще включают препараты, ингибирующие активность индуцибельной синтазы оксида азота. В клинике наиболее широкое применение получили препараты аналоги L-аргинина, такие как N(омега)-нитро-L-аргинин-метил-эфир (L-NAME), N(дельта)-мометил-L-аргинин(L-NMMA) [33,34]. Глюкокортикоиды (преднизолон, дексаметазон) также ингибируют транскрипцию индуцибельной синтазы оксида азота и снижают содержание конечных метаболитов оксида азота, что, по-видимому, и определяет их высокую терапевтическую активность при состояниях, характеризующихся гиперпродукцией оксида азота [35, 36]. Совсем недавно было установлено, что салицилаты и антибиотики группы макролидов ингибируют активность индуцибельной синтазы оксида азота и снижают уровень продукции оксида азота, что, по мнению авторов, и обуславливает их противовоспалительный эффект [37, 38].

Таким образом, результаты наших исследований свидетельствуют о наличии мощной генерации оксида азота тромбоцитами как в норме, так и при ранениях груди и живота. Более того, при тяжелой степени травматической болезни имеет место гиперпродукция оксида азота, обладающего многофакторным повреждающим действием и, в том числе, антитромбогенным, что необходимо учитывать в клинической практике.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Star R.A. (1993) Am. J. Med. Sci., **306**, 348 - 358.
2. Ianaro A., Ialenti A., Maffia P. (2000) J. Pharmacol. Exp. Ther., **292**, 156-163.
3. Cooke J.P., Dzau V.J. (1997) Annu. Rev. Med., **48**, 489-509.
4. Johnson M.L., Billiar T.R. (1998) World J. Surg., **22**, 187-196.
5. Mannick J.B., Asano R. (1994) Cell., **79**, 1137-1141
6. Bautista A.P., Spitzer J.J. (1994) Am. J. Physiol., **266**, G783-G787.
7. Minnard E.A., Shou J. (1994) Arch. Surg., **129**, 142-147.
8. Spain D.A., Wilson M.A. (1994) Surgery, **116**, 322-328.
9. Weinberg J.B., Musuconis M.A., Shami P.J. (1995) Blood, **86**, 1184-1195.
10. Stolarek R., Kulf P., Kurmanowska Z. (1998) Int. Clin. Lab. Res., **28**, 104-109.
11. Mazzanti L., Mutus B. (1997) Clin. Biochem., **30**, 509-515.
12. Marletta M.A. (1993) J. Biol. Chem., **268**, 12231-12234.
13. Mehta J.L., Chen L.Y., Mehta P. (1995) J. Lab. Clin. Med., **125**, 370-377.
14. Mugge A., Forestermann U., Lichtlen P.R. (1991) Ann. Med., **23**, 545-550.
15. Knaus W.A., Draper E.A., Wagner D.P., Zimmerman J.E. (1985) Crit. Care Medicine, **13**, 818 - 829.
16. Новиков А.К., Новикова В.И. (1979) Клеточные методы иммунодиагностики, Минск.
17. Ferrante A., Thong Y.H. (1982) J. Immunol. Methods, **48**, 81-85.
18. Lao S.K., Lai L., Cooper J.A. (1988) Am.J.Pathol., **130**, 22-32.

19. *Camilletti A., Moretti N., Giacchetti G.* (2001) *Am. J. Hypertension*, **14**, 382-386.
20. *Шебзухов Ю.В., Вайсбурд М.Ю., Артюшкин К.В., Мысякин Е.Б.* (1998) *Бюлл. эксперим. биол. мед.*, **125**, 48-50.
21. *Луста И.В., Ситожевский А.В., Сулова Т.Е.* (2000) *Патофизиология органов и систем. Типовые патологические процессы*, М., с.193-194.
22. *Chen L.Y., Mehta P., Mehta J.L.* (1996) *Circulation*, **93**, 1740-1746.
23. *Chen L. Y., Salafranca M.N., Mehta H.* (1997) *Am. J. Physiol.*, **273**, H1854-H1859.
24. *Green L.C., Wagner D.A., Glogowski J., Skipper P.L., Wishnork J.S., Tannenbaum S.R.* (1982) *Anal. Biochem.*, **126**, 131-138.
25. *Ding A.H., Nathan C.F., Stuehr D.J.* (1988) *Immunol.*, **141**, 2407-2412.
26. *Голиков П.П., Николаева Н.Ю., Гавриленко И.А. и др.* (2000) *Пат. физиол.*, №2, 6-9.
27. *Matsuo N.* (1999) *Surg. Today*, **29**, 1068-1074.
28. *Марков Х.М.* (1996) *Вест. РАМН*, №7, 73-78.
29. *Stamler J.S., Simon D.I., Osborne J.A. et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 444-448.
30. *Wilcox C.S., Welch W.J., Murad F. et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 11993-11997.
31. *Durante W., Kroll M.H., Vanhoutte P.M.* (1992) *Blood*, **79**, 110-116.
32. *Tao G., Rafferty J., Olge C.* (1994) *Surgery*, **116**, 332-337.
33. *Cobb J.P., Natanson C.* (1995) *Am. J. Physiol.*, **268**, H1634-H1637.
34. *Kuga T., Mohri M.* (1997) *J. Am. Coll. Cardiol.*, **30**, 108-112.
35. *Мальшиев И.Ю., Манухина Е.Б.* (1998) *Биохимия*, **63**, 992-1006.
36. *Palmer R.M.J., Bridge L., Foxwell N.A., Moncada S.* (1992) *Brit. J. Pharmacol.*, **105**, 11-12.
37. *Ignarro L.J.* (1996) *Kidney Intern.*, **49**, 52-55.
38. *Wang Z., Brecher P.* (1999) *Hypertension*, **34**, 1259-1264.

Поступила 25.12.01.

#### NITRIC OXIDE PRODUCTION BY HUMAN PERIPHERAL BLOOD PLATELETS IN NORMAL CONDITION AND AFTER THORACIC AND ABDOMINAL WOUNDS

*M.M.Abakumov, P.P.Golikov, N.Yu.Nikolaieva, E.V.Klychnikova, T.V.Stotzkaya, B.V.Davydov, S.B.Matveiev*

Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine  
129010, Moscow, B.Sukharevskaya Square, 3, Fax: (095) 921-02-02

Nitric oxide production by the human peripheral blood platelets in normal condition and after thoracic and abdominal wounds was investigated. The platelets were obtained from blood by differential centrifuging. The nitric oxide production by platelets ( $0.5 \times 10^8$ ) was studied in RPMI 1640 medium containing bovine fetal serum, glutamine, and antibiotics, during incubation at 37°C for 15 hours. Nitric oxide level was determined by Griss reaction. A large-scale absolute production of nitric oxide by platelets was revealed both in normal condition ( $7.70 \pm 0.55 \mu\text{mol/l}$ ), and after thoracic and abdominal wounds ( $11.45 \pm 0.84 \mu\text{mol/l}$ ). Severe trauma course is associated with hyperproduction of nitric oxide possessing multiple damaging effects, including the anti-thrombogenic one, which should be taken into account in clinical practice.

**Key words:** nitric oxide, platelets, wound.