

УДК – 612.127.4:611-018.54:612.115.12+616-083.98
© Коллектив авторов

ВЗАИМОСВЯЗЬ ГЕНЕРАЦИИ ОКСИДА АЗОТА ТРОМБОЦИТАМИ С ФИБРИНОГЕНОМ ПЛАЗМЫ КРОВИ ПРИ НЕОТЛОЖНЫХ СОСТОЯНИЯХ

*П.П.Голиков, Н.Ю.Николаева, Е.А. Лужников, Ю.С. Гольдфарб,
В.Л. Лемнев, С.В.Смирнов, М.М. Абакумов*

НИИ скорой помощи им. Н.В.Склифосовского, 129010, Москва,
Б. Сухаревская пл., д.3; тел.: 928-34-15, факс: 921-02-02

Изучена абсолютная генерация оксида азота тромбоцитами у больных с ранением груди и живота, термической травмой, варикозной болезнью, острым отравлением метанолом, острым отравлением лепонексом и определена корреляция между абсолютной генерацией оксида азота тромбоцитами и уровнем фибриногена у этих больных. Максимальная абсолютная генерация оксида азота тромбоцитами выявлена при хирургических заболеваниях, минимальная – при остром отравлении метанолом. Независимо от этиологии и тяжести заболевания установлена тесная достоверная корреляция между абсолютной генерацией оксида азота тромбоцитами и уровнем фибриногена в плазме крови этих больных. Следовательно, оксид азота, генерируемый тромбоцитами, может оказывать существенное влияние на процессы гемостаза.

Ключевые слова: оксид азота, фибриноген, тромбоциты, неотложные состояния

ВВЕДЕНИЕ. Интерес к изучению генерации оксида азота тромбоцитами появился после обнаружения в тромбоцитах синтазы оксида азота [1]. Тромбоциты человека содержат две изоформы синтазы оксида азота: эндотелиальную (eNOS) и индуцибельную (iNOS), которые различаются молекулярной структурой и биохимическими характеристиками [2]. Данные о том, что оксид азота, продуцируемый синтазой оксида азота тромбоцитов, проявляет антитромбогенное действие в сосудистом эндотелии, могут иметь определенное клиническое значение [3, 4]. Роль тромбоцитов в биосинтезе оксида азота при патологических состояниях изучена крайне недостаточно.

Целью данного исследования явилось изучение взаимосвязи абсолютной генерации оксида азота тромбоцитами с уровнем фибриногена плазмы крови в норме и при различных неотложных состояниях.

МЕТОДИКА. Изучение генерации оксида азота тромбоцитами периферической крови проведено у 23 здоровых доноров, здоровых по клиническим, биохимическим и иммунологическим параметрам, и у больных со следующей патологией: 1) ранение груди и живота (10); 2) термическая травма (12); 3) варикозная болезнь (18); 4) острое отравление метанолом (6); 5) острое отравление лепонексом (12). Согласно шкале тяжести состояния APACHE II [5], пострадавшие с ранениями груди и живота имели сумму баллов от 12 до 19. Больные с ожоговой травмой имели площадь поражения 10-45% поверхности тела.

ОКСИД АЗОТА ПРИ НЕОТЛОЖНЫХ СОСТОЯНИЯХ

При этом площадь глубокого поражения составила 5-20% поверхности тела. Больные варикозной болезнью по шкале тяжести состояния имели сумму баллов от 5 до 9. У больных с острым отравлением метанолом (массовое поступление), которое сопровождается накоплением муравьиной кислоты [6], методом газожидкостной хроматографии было установлено, что средняя концентрация метанола в плазме крови отравленных составила 0,85 мг/мл (колебания – от 0,3 до 2,8 мг/мл). Тяжесть состояния пострадавших соответствовала сумме баллов от 6 до 15 [5]. У больных с острым отравлением лепонексом методом газожидкостной хроматографии установлено, что средняя концентрация лепонекса в плазме крови составила $0,72 \pm 0,12$ мкг/мл (колебания – от 0,271 до 1,54 мкг/мл). В соответствии со шкалой тяжести состояния АРАСНЕ II [5] пострадавшие имели сумму баллов от 8 до 19.

Кровь для исследования забирали из кубитальной вены при поступлении пострадавших в стационар. В качестве антикоагулянта использовали 5% раствор динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты ($\text{Na}_2\text{ЭДТА}$) в 0,15 М NaCl (1:10) [7]. Для эффективного предварительного разделения эритроцитов и лейкоцитов к 6 мл крови добавляли равный объем 4% суспензии декстрана-70 [8] и разбавленную кровь оставляли на 40 мин при комнатной температуре для осаждения эритроцитов. Верхний слой, богатый лейкоцитами, отбирали и разводили (1:1) фосфатным буфером pH 7,4 (0,02 М), содержащим 20 мМ $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$, центрифугировали при 200 g в течение 10 мин [9]. Надосадочную жидкость удаляли, а к осадку, загрязненному незначительным количеством эритроцитов, добавляли 10 мл фосфатного буфера pH 7,4 (0,02 М), содержащего 0,15 М NH_4Cl , и в течение 10 мин при 37°C проводили гемолиз эритроцитов [7]. Лейкоциты осаждали центрифугированием при 200 g в течение 10 мин. К надосадочной жидкости, содержащей тромбоциты, добавляли ACD буфер в соотношении 8:1 [10] и центрифугировали 10 мин при 200 g для полного удаления эритроцитов и лейкоцитов из тромбоцитарной суспензии. Для осаждения тромбоцитов надосадочную жидкость центрифугировали при 2000 g в течение 20 мин [10].

Выделенные из крови тромбоциты разводили полной средой, состоящей из среды RPMI 1640 (без фенолового красного) [11], эмбриональной телячьей сыворотки (5%), L-глутамина (2 мМ), гентамицина (80 мкг/мл), пенициллина (100 U/мл), стрептомицина (100 мкг/мл) [12]. Полной средой доводили количество тромбоцитов до 1×10^8 клеток в 1,0 мл, и в объеме 0,5 мл суспензию тромбоцитов вносили в лунки плашки для культуры тканей с 24 ячейками диаметром 16 мм (фирма "Costar", США). Контролем служила полная среда, добавленная в лунки плашки (0,5 мл). Плашку помещали в термостат (37°C) на 15 часов. После инкубации пробы центрифугировали 10 мин при 1500 g. Для определения концентрации стабильного метаболита оксида азота нитрита в пробах использовали реактив Грисса [13]. К пробам добавляли равный объем реактива Грисса (1% сульфаниламид, 0,1% N-(1-нафтил)этилендиамин, 2,5% H_2PO_4) и инкубировали 10 мин при 37°C. Оптическую плотность хромогенов проб определяли при длине волны 546 нм [14]. Результат рассчитывали по кривой с использованием стандартных растворов нитрита натрия [15].

Абсолютная генерация оксида азота тромбоцитами была определена с учетом конкретного содержания тромбоцитов в крови у каждого исследуемого контрольной и основной группы [16]. Содержание тромбоцитов определяли на гематологическом счетчике "Медоник, СА 530, Mimer" (Швеция). Концентрацию фибриногена в плазме крови определяли унифицированным методом [17].

Результаты обработаны методом вариационной статистики на компьютере Pentium-100 в операционных стандартах Windows 97 с помощью лицензионной копии Microsoft Excel 97. Различия были достоверны при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Абсолютная продукция оксида азота тромбоцитами в контрольной группе составила $7,70 \pm 0,55$ мкмоль/л, при ранении груди и живота – $11,45 \pm 0,84$ мкмоль/л ($p < 0,001$); термической травме – $14,68 \pm 0,84$ мкмоль/л ($p < 0,001$); варикозной болезни – $9,54 \pm 0,49$ мкмоль/л ($p < 0,05$);

остром отравлении метанолом – $1,27 \pm 0,20$ мкмоль/л ($p < 0,001$); острым отравлении лепонексом – $8,93 \pm 1,34$ мкмоль/л ($p > 0,05$). Следовательно, при ранении груди и живота, термической травме и варикозной болезни установлено достоверное повышение абсолютной генерации оксида азота тромбоцитами по сравнению с контрольной группой. Уровень абсолютной генерации оксида азота тромбоцитами у больных с острым отравлением метанолом снижался по сравнению с контролем в 6 раз, а при острым отравлении лепонексом – существенно не отличался от контроля. Определение относительной генерации оксида азота тромбоцитами крови доноров в наших исследованиях соответствовало $1,07 \pm 0,07$ нмоль/ $0,5 \times 10^8$ тромбоцитов. По данным других авторов относительная генерация оксида азота тромбоцитами крови доноров составляет $1,06 \pm 0,17$ нмоль/ 10^8 тромбоцитов [18].

Исследования взаимосвязи абсолютной генерации оксида азота тромбоцитами с уровнем фибриногена плазмы крови, представленные на рисунке (А-1 – А-6), показали, что независимо от этиологии и тяжести состояния между этими параметрами обнаружена прямая достоверная корреляция. Особое внимание привлекают данные, полученные при изучении взаимосвязи абсолютной генерации оксида азота тромбоцитами с уровнем фибриногена плазмы крови у больных с острым отравлением метанолом (рис. А-5). Так, несмотря на то, что абсолютная генерация оксида азота тромбоцитами у этих больных снижена в 6 раз по сравнению с контролем, однако сохраняется тесная корреляционная связь между генерацией оксида азота тромбоцитами и фибриногеном ($r = 0,971 \pm 0,01$, $p < 0,01$). Достаточно сильная корреляционная взаимосвязь между генерацией оксида азота тромбоцитами и уровнем фибриногена обнаружена у больных с травмой груди и живота (рис. А-2) ($r = 0,741 \pm 0,146$, $p < 0,01$) и у больных с термической травмой (рис. А-1) ($r = 0,571 \pm 0,191$, $p < 0,01$). Интересно, что у больных с острым отравлением лепонексом (рис. А-6), несмотря на то, что у этих больных уровень генерации оксида азота тромбоцитами существенно не отличался от контрольного, выявлена очень тесная корреляционная взаимосвязь между генерацией оксида азота тромбоцитами и уровнем фибриногена ($r = 0,711 \pm 0,145$, $p < 0,001$).

Сравнительно недавно получены данные о том, что при нефрите отмечается повышение генерации оксида азота тромбоцитами и повышение уровня фибриногена в крови [19]. По-видимому, уровень фибриногена сопряжен с экспрессией индуцибельной синтазы оксида азота тромбоцитами и генерации оксида азота тромбоцитами. Косвенным подтверждением этого служат данные, полученные при исследовании влияния одного из факторов гемостаза – коллагена – на генерацию оксида азота тромбоцитами [18]. При этом было установлено, что стимуляция тромбоцитов коллагеном в диапазоне концентраций от 0,0156 до 25 мкг/мл сопровождалась максимальной генерацией оксида азота тромбоцитами при концентрации коллагена 0,0625 мкг/мл. Более высокие концентрации коллагена не увеличивали продукцию оксида азота тромбоцитами.

С другой стороны, оксид азота ингибирует адгезию тромбоцитов к эндотелиальным клеткам. При этом оксид азота ингибирует агрегацию тромбоцитов и облегчает растворение тромбоцитарных агрегатов. Однако регулирующее действие оксида азота на клетки крови ограничено просветом поверхности эндотелиальных клеток, так как оксид азота быстро инактивируется кислородными радикалами типа супероксидного анион-радикала. Оксид азота может также воздействовать на фибринолитическую активность, регулируя освобождение активатора плазминогена [20]. Механизм антитромбогенного действия оксида азота тромбоцитов обусловлен его влиянием на сигналы адгезивных молекул и способностью ингибировать экспрессию адгезивных молекул эндотелия [21].

ОКСИД АЗОТА ПРИ НЕОТЛОЖНЫХ СОСТОЯНИЯХ

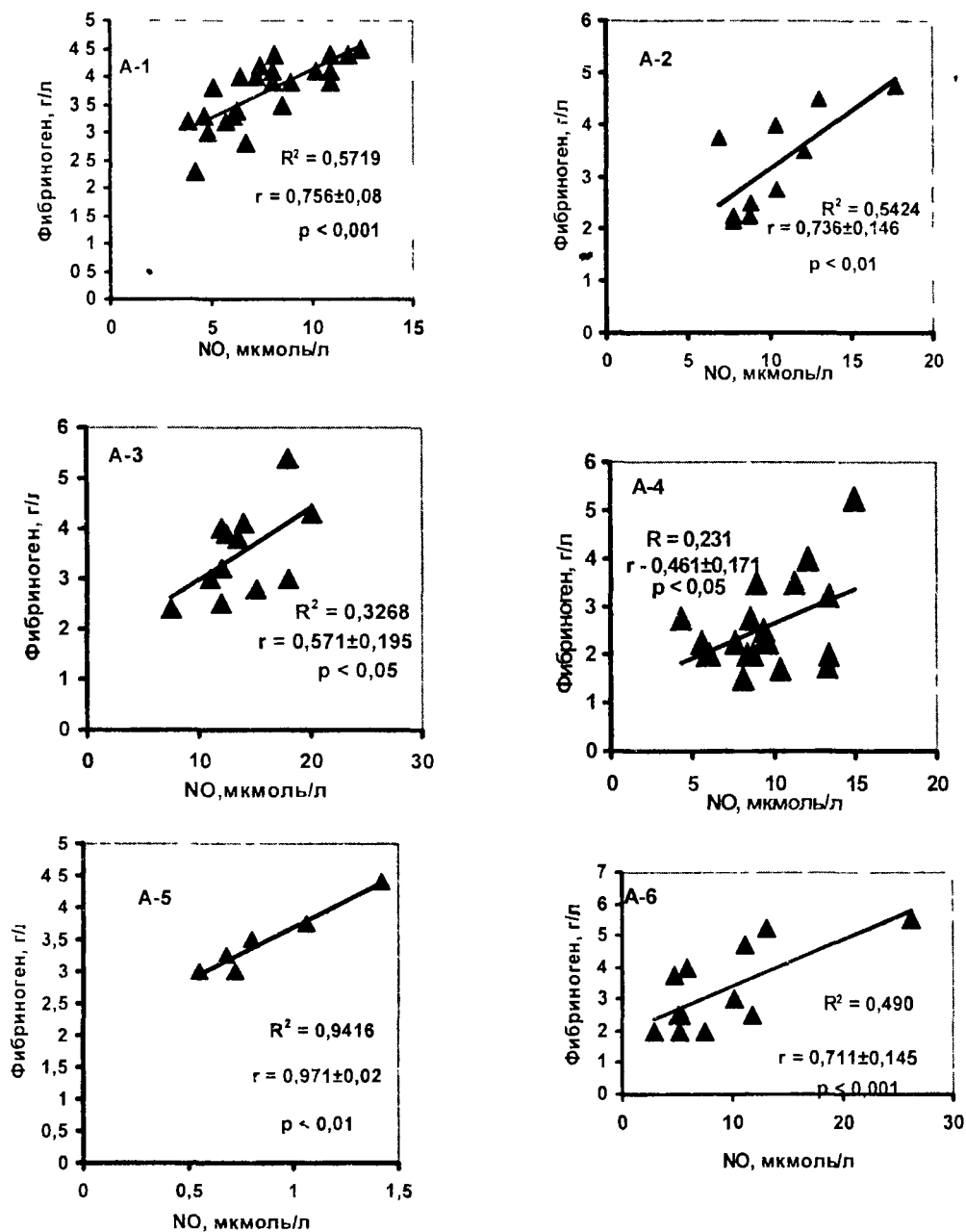


Рисунок.

- A-1 Корреляция абсолютной генерации оксида азота тромбоцитами с фибриногеном плазмы крови доноров
- A-2 Корреляция абсолютной генерации оксида азота тромбоцитами с фибриногеном плазмы крови у больных с ранением груди и живота
- A-3 Корреляция абсолютной генерации оксида азота тромбоцитами с фибриногеном плазмы крови при герметической травме
- A-4 Корреляция абсолютной генерации оксида азота тромбоцитами с фибриногеном плазмы крови при варикозной болезни
- A-5 Корреляция абсолютной генерации оксида азота тромбоцитами с фибриногеном плазмы крови при отравлении метанолом
- A-6 Корреляция абсолютной генерации оксида азота тромбоцитами с фибриногеном плазмы крови при остром отравлении лепонексом

Согласно данным И.С.Севериной [22], экспрессия тромбоцитарной синтазы оксида азота и последующая генерация оксида азота способствуют активации гуанилатциклазы, которая синтезирует cGMP а последний тормозит накопление Ca^{2+} , а следовательно, ингибирует и активацию, и агрегацию тромбоцитов.

Таким образом, наши исследования показали, что абсолютная генерация оксида азота существенно повышается при хирургических заболеваниях и резко снижается при остром отравлении метанолом, которое сопровождается накоплением муравьиной кислоты. Острое отравление антидепрессантом лепонексом не вызывает изменения абсолютной генерации оксида азота. Независимо от этиологии и тяжести состояния пострадавших между абсолютной генерацией оксида азота тромбоцитами и уровнем фибриногена в плазме крови обнаружена прямая достоверная корреляция, что свидетельствует о важной роли абсолютной генерации оксида азота тромбоцитами в процессах гемостаза.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Mazzanti L.* (1997) Clin. Biochem., **30**, 509-515.
2. *Mehta J.L., Chen L.Y., Mehta P. et al.* (1995) J. Lab. Clin. Med., **125**, 370-377.
3. *Mugge A., Forestermann U., Lichlen P.R.* (1991) Ann. Med., **23**, 545-550.
4. *Абакумов М.М., Голиков П.П., Николаева Н.Ю. и др.* (2002) Вopr. мед. химии, **48**(3), 286-292.
5. *Knaus W.A., Draper E.A., Wagner D.P. et al.* (1985) Crit.Care Medicine., **13**, 818-829.
6. *Amin A.R., Attur M., Vyas P. et al.* (1996) J. Inflamm., **47**, 190-198.
7. *Новиков А.К., Новикова В.И.* (1979) Клеточные методы иммунодиагностики. Минск, Беларусь.
8. *Ferrante A., Thong Y.H.* (1982) J. Immunol. Methods, **48**, 81-85.
9. *Lao S.K., Lai L., Cooper J.A.* (1988) Am. J. Pathol., **130**, 22-32.
10. *Camilletti A., Moretti N., Giacchetti G. et al.* (2001) Am. J. Hypertension, **14**, 382-386.
11. *Chen L.Y., Mehta P., Mehta J.L.* (1996) Circulation, **93**, 1740-1746.
12. *Weinberg J.B., Musuconis M.A., Shami P.J. et al.* (1995) Blood, **86**, 1184-1195.
13. *Green L.C., Wagner D.A., Glogowski J. et al.* (1982) Anal. Biochem., **126**, 131-138.
14. *Ding A.H., Nathan C.F., Stuehr D.J.* (1988) J. Immunol., **141**, 2407-2412.
15. *Jordan M.I., Rominski B., Jaquins-Gerstl A. et al.* (1995) Surgery, **118**, 138-146.
16. *Golikov P.P., Smirnov S.V., Nikolaeva N.Yu. et al.* (2003) Human Physiology **29**(2), 233-237.
17. *Меньшиков В.В.* (1987) Лабораторные методы исследования в клинике. М.: Медицина.
18. *Smith C.C., Stanyer L., Cooper M.B., Betteridge D.J.* (1999) Biochim. Biophys. Acta, **1473**, 286-292.
19. *Van Goor N., Albrecht E.D., Heeringa P.* (2001) Nitric Oxide, **5**, 525-533.
20. *Schini-Kerth V.B.* (1999) Transfus. Clin. Biol., **6**, 355-363.
21. *Wilcox C.S., Welch W.J., Murad F. et al.* (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **89**, 11993-11997.
22. *Северина И.С.* (2002) Вopr. мед. химии, **48**(1), 4-30.

Поступила: 01. 12. 2003

ОКСИД АЗОТА ПРИ НЕОТЛОЖНЫХ СОСТОЯНИЯХ

INTERRELATIONSHIP BETWEEN PLATELET NITRIC OXIDE PRODUCTION AND PLASMA FIBRINOGEN LEVEL AT URGENT CONDITIONS

P.P. Golikov, N.Yu. Nikolayeva, E.A. Luzhnikov, Yu.S. Goldfarb, V.L. Lemenev, S.V. Smirnov, M.M. Abakumov

Sklifosovsky Clinical and Research Institute for Emergency Medicine, 3 B. Sukharevskaya Square, Moscow, 129010 Russia; tel.: 7 (095) 928-34-15, fax: 7(095) 921-02-02

Platelet nitric oxide production has been investigated in patients with thoracic and abdominal wounds, thermal trauma, varicose disease, methanol and leponex poisoning. There is correlation between absolute platelets nitric oxide production and fibrinogen plasma level in these patients

The maximal absolute platelets nitric oxide production has been revealed at surgical diseases, and minimal - has been observed at methanol poisoning. Irrespectively to etiology and danger of disease, reliable correlation between absolute platelets nitric oxide production and fibrinogen plasma level of these patients is established. Consequently platelets nitric oxide production may be important for haemostatic processes.

Key words: nitric oxide, fibrinogen, platelets, urgent conditions.