

УДК 616.831-005.4:616.151.5]:599.323.4-019

В.О.Куровська

**ВПЛИВ NO-ЗАЛЕЖНИХ МЕХАНІЗМІВ НА ПОКАЗНИКИ
ФІБРИНОЛІТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ В ГІПОКАМПІ ЩУРІВ ЗА
УМОВ ІШЕМІЇ-РЕПЕРФУЗІЇ ГОЛОВНОГО МОЗКУ**Кафедра фізіології (зав. – проф. С.С.Ткачук)
Буковинського державного медичного університету, м. Чернівці

Резюме. Досліджено вплив оксиду азоту (NO) на стан фібринолітичної активності в гіпокампі щурів. Ішемія протягом 20 хвилин призводить до зростання показників фібринолізу, а подальша 1-годинна та 24-годинна реперфузія – до їх зниження, порівняно з контролем. Уведення

амінокислоти L-аргініну призводить до зростання фібринолітичної активності в усіх полях гіпокампа.

Ключові слова: фібриноліз, оксид азоту, ішемія, реперфузія, гіпокамп.

Вступ. Дисбаланс у системі гемостазу – це складова частина патогенетичних реакцій, що розвиваються за ішемії мозку. У крові хворих у гострому періоді ішемічного інсульту концентрація фібриногену та плазміну зростає [2].

Інші автори зазначають, що при ішемічному інсульті, який розвивається за типом гемореологічної мікрооклюзії спостерігається гіперфібриногенемія, підвищення в'язкості крові, збільшення агрегаційної активності формених елементів (сладж-синдром), який особливо виражений у зоні мікроциркуляції. Таке зростання коагуляційного потенціалу крові, стійка гіперкоагуляція, неминуче призводить до подальшого зриву протизгортальної системи. На перших етапах цей зрив адаптаційних можливостей гемостазу може характеризуватися нормокоагуляцією, оскільки підвищення згортання супроводжується і підвищенням споживання прокоагулянтів (протромбіну, фібриногену). Цей етап швидко переходить у фазу гіпокоагуляції та коагулопатії споживання [5]. Гіпокоагуляція розвивається внаслідок розбалансування згортальної-протизгортальної систем.

Поруч із форменими елементами важливу роль у регуляції гемостазу відіграє ендотелій судин. Він має антикоагулянтні та вазодилатуючі властивості, які, зокрема, полягають у синтезі відповідних біологічно активних речовин. Однією з цих речовин є оксид азоту, виражені антикоагулянтні, антиагрегантні, вазодилатуючі властивості якого загальновідомі.

При пошкодженні судинної стінки чи порушенні функції ендотелію, останній стає ініціатором згортання крові і спазму судин. У нормі це – захисна реакція, що запобігає втраті крові організмом. Але в патологічних ситуаціях даний напрямок активності ендотелію починає чи поглиблює руйнівні процеси [4].

Одним із чинників, що спричиняє пошкодження ендотелію, виступає окисний стрес – основна патогенетична ланка ішемічних та ішемічно-реперфузійних ушкоджень головного мозку. Активні форми кисню, з іншими негативними ефектами, вносять розлад у метаболізм NO, який сам стає ініціатором руйнівних вільнорадикальних реакцій. За таких умов сигнальна, регуляторна роль NO

виключається, а утворені за його участі вільні радикали поглиблюють патологічний процес.

Донором оксиду азоту є амінокислота L-аргінін. Згідно з джерелами літератури, введення L-аргініну, в експерименті, запобігає феномену «no-reflow» [6]. Одночасна активація ендотеліальної форми оксиду азоту та тканинного активатора плазміногена спричиняє позитивний ефект при фокальній ішемії мозку [7].

Даних про вплив оксиду азоту на показники фібринолітичної активності в дискретних структурах мозку за умов ішемічного та ішемічно-реперфузійного ушкодження в літературі не знайдено.

Мета дослідження. Дослідити вплив оксиду азоту на показники фібринолітичної активності полів гіпокампа CA₁, CA₂, CA₃ щурів за умов моделювання ішемії та ішемії-реперфузії головного мозку.

Матеріал і методи. Дослідження проводили на білих безпородних самцях щурів, масою 130-150 г, які знаходилися в умовах віварію на стандартному вигодовуванні. Експерименти проведені з дотриманням Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментах та інших наукових цілях (Страсбург, 1986). Дослідні тварини були розподілені на 8 груп: 1-у групу склали контрольні тварини; 2-у – тварини, яким моделювали неповну глобальну ішемію мозку шляхом накладання затискачів на загальні сонні артерії на 20 хвилин; 3-ю – тварини, які після 20-хвилинної ішемії підлягали реперфузії на 1 годину; 4-у – тварини, які після 20-хвилинної ішемії підлягали реперфузії на 24 години; 5-у – тварини, яким вводили амінокислоту L-аргінін (виробництво «Synex Pharma», Китай) внутрішньовенно, з розрахунку 150мг/кг; 6-у – тварини, які після введення L-аргініну підлягали 20-хвилинній ішемії; 7-у – тварини, яким вводили L-аргінін, піддавали 20-хвилинній ішемії з подальшою реперфузією 1 годину; 8-у – тварини, яким вводили L-аргінін, піддавали 20-хвилинній ішемії з подальшою реперфузією 24 години. Кожна група налічувала 10 тварин. Щурів забивали під каліпсовим наркозом (75 мг/кг). На холоді забирали головний мозок, який одразу поміщали в рідкий азот, виділяли та заби-

Таблиця

Показники фібринолітичної активності в полях гіпокамп шурів SA₁, SA₂, SA₃ за умов ішемії-реперфузії головного мозку та введення амінокислоти L-аргініну

Сумарна фібринолітична активність (мкг азофібрину/г тканини за год)				Ферментативна фібринолітична активність (мкг азофібрину/г тканини за год)				Неферментативна фібринолітична активність (мкг азофібрину/г тканини за год)			
SA ₁	SA ₂	SA ₃		SA ₁	SA ₂	SA ₃		SA ₁	SA ₂	SA ₃	
Контроль											
45,38±1,20	62,2±2,17	54,1±3,13		31,7±1,14	44,8±2,71	34,2±3,11		13,68±1,67	17,4±1,71		19,9±0,46
20-хвилинна ішемія											
57,79±1,12 p<0,005	68,70±2,21 p<0,005	59,7±3,21 p<0,005		36,39±1,82	47,6±2,14 p<0,005	37,9±1,07 p<0,005		21,4±1,44 p<0,005	21,1±1,11 p<0,005		21,80±1,71 p<0,005
1-годинна реперфузія											
26,3±0,92 p ₁ <0,005 p ₂ <0,005	34,3±1,71 p ₁ <0,005	34,5±2,11 p ₂ <0,005		16,91±1,24 p ₁ <0,005	19,1±2,11	21,8±1,58 p ₁ <0,005 p ₂ <0,005		9,39±0,29 p ₁ <0,005 p ₂ <0,005	15,2±0,91 p ₂ <0,005		12,7±1,15 p ₁ <0,005
24-годинна реперфузія											
30,12±1,78 p ₃ <0,005	32,5±0,88 p ₃ <0,005	33,8±2,54 p ₃ <0,005		20,25±1,09	17,8±1,41 p ₃ <0,005	19,7±0,77 p ₃ <0,005		9,87±1,34 p ₃ <0,005 p ₄ <0,005	14,7±0,91 p ₃ <0,005		14,1±1,35 p ₃ <0,005
корекція L-аргінін											
20-хвилинна ішемія та корекція L-аргінін											
42,6±2,49	66,8±2,35	65,8±2,24		32,48±2,15	46,5±1,14	40,2±1,83		10,12±1,31	20,3±1,41		25,6±1,47
1-годинна реперфузія та корекція L-аргінін											
53,7±2,92 p ₁ <0,005 p ₂ <0,005	65,3±2,13 p ₁ <0,005	61,7±2,39 p ₂ <0,005		32,1±2,22 p ₁ <0,005 p ₂ <0,005	45,6±1,91 p ₁ <0,005 p ₂ <0,005	40,4±1,54 p ₂ <0,005		21,6±1,77	19,7±1,39		21,3±1,33 p ₂ <0,005
24-годинна реперфузія та корекція L-аргінін											
72,1±1,96 p ₄ <0,005	72,3±2,75	73,4±2,96 p ₄ <0,005		48,3±1,44 p ₄ <0,005	50,9±3,12 p ₄ <0,005	44,7±2,38 p ₄ <0,005		23,8±2,42 p ₄ <0,005	21,4±1,05 p ₄ <0,005		28,7±1,06 p ₄ <0,005
72,2±2,84 p ₆ <0,005	72,6±1,84 p ₆ <0,005	70,6±2,81 p ₆ <0,005		45,5±0,57 p ₆ <0,005	49,5±2,15 p ₆ <0,005	49,8±2,15 p ₆ <0,005		26,7±0,28 p ₅ <0,005 p ₆ <0,005	23,1±2,06 p ₆ <0,005		20,8±2,04 p ₆ <0,005

Примітки. вірогідність змін порівняно з p – контролем-ішемією; p₁ – контролем – 1год реперфузією; p₂ – 1год реперфузією – ішемією; p₃ – 24год реперфузією – контролем; p₄ – 24год – реперфузією – ішемією; p₅ – 24год реперфузією – 1год реперфузією – 1год реперфузією – контролем; p₆ – L-аргініновим контролем – контролем; p₁ – ішемією L-аргінін – L-аргінін контролем; p₂ – ішемією L-аргінін – ішемією; p₃ – L-аргінін 1год реперфузією – L-аргінін контролем; p₄ – L-аргінін 1год реперфузією – 1год реперфузією – L-аргінін контролем; p₅ – L-аргінін 24год реперфузією – L-аргінін контролем; p₆ – L-аргінін 24год реперфузією – 24год реперфузією

рали поля гіпокампа (CA₁, CA₂, CA₃), згідно з атласом стереотаксичних координат мозку шурів [1]. Наважки зважували та гомогенізували в охоложеному Трис-НСІ буфері (рН – 7,4). В отриманих гомогенатах визначали фібринолітичну активність на основі реакції з азофібрином («Simko» Ltd, Львів). Принцип методу базується на лізисі азофібрину з вивільненням барвника в розчин пропорційно фібринолітичній активності тканини [2]. Визначали сумарну фібринолітичну активність, ферментативну та неферментативну, де ферментативний фібриноліз інгібували шляхом додавання ε-амінокапронової кислоти. Статистичну обробку результатів проводили після створення бази даних у системі Microsoft Excel та за програмою «BioStat» з визначенням t-критерію Стьюдента.

Результати дослідження та їх обговорення. Результати дослідження наведені в таблиці.

Ішемія протягом 20 хв викликала зростання показників сумарної фібринолітичної активності в усіх полях гіпокампа: CA₁ – 1,27 раза (p<0,005), CA₂ – 1,1 раза (p<0,005), CA₃ – 1,1 раза (p<0,005). Активація системи фібринолізу відбувається одночасно з активацією згортальної системи. Відмітимо, що показники фібринолітичної активності нижче в полі CA₁ порівняно з CA₃ та значно нижче, порівняно з полем CA₂. Подібна тенденція прослідковується в усіх дослідних групах, що підтверджує положення про більшу чутливість поля CA₁ і CA₃ до ішемічних впливів.

За умов 1-годинної реперфузії спостерігається зниження показників фібринолітичної активності в усіх полях порівняно з ішемією: CA₁ – 1,72 раза (p₂<0,005), CA₂ – 1,81 раза (p₂<0,005), CA₃ – 1,56 раза (p₂<0,005); та контролем: CA₁ – 2,19 раза (p₁<0,005), CA₂ – 2,00 раза (p₁<0,005), CA₃ – 1,73 раза (p₁<0,005). 24-годинна реперфузія не викликає подальших змін фібринолітичної активності, порівняно з 1-годинною реперфузією. Ці результати погоджуються з даними літератури. Зокрема автор [2] зазначає, що з підвищенням рівня плазміну зростає і рівень його інгібіторів, які зв'язуються з ним, утворюючи комплекси, які позбавлені ферментативної активності. Тому фібринолітична активність близька до контрольних значень у першу добу, незважаючи на значне підвищення плазміну. При цьому рівень фібриногену продовжує бути високим.

Уведення L-аргініну практично не впливає на показники фібринолітичної активності контрольної групи. В умовах ішемії, при введенні L-аргініну показники незначно зростають, порівняно з контролем в усіх полях гіпокампа відповідно: CA₁ – 1,26 раза (p₁'<0,005), CA₂ – 1,02 раза (p₁'<0,005), CA₃ – 1,06 раза (p₁'<0,005). У тварин 7-ї та 8-ї дослідних груп введення L-аргініну зумовило зростання фібринолітичної активності, відносно контролю: CA₁ – 1,69 та 1,69 раза (p₃'<0,005), (p₅'<0,005), CA₂ – 1,08 та 1,08 раза (p₃'<0,005), (p₅'<0,005), CA₃ – 1,11 та 1,07 раза (p₃'<0,005), (p₅'<0,005); та щодо показників 3-ї: CA₁ – 2,74 раза (p₄'<0,005), CA₂ – 2,1 раза

(p₄'<0,005), CA₃ – 2,12 раза (p₄'<0,005); та 4-ї груп: CA₁ – 2,39 раза (p₆'<0,005), CA₂ – 2,23 раза (p₆'<0,005), CA₃ – 2,08 раза (p₆'<0,005).

Відомо, що процес зсідання починається з активації тромбоцитів. На їх мембрані є так звані глікопротеїнові комплекси GP IIa/IIIb. Ці білки належать до сімейства інтегринів і є рецепторами фібриногену, а також фактору Вілебранта. На поверхні неактивованих тромбоцитів GP IIa/IIIb не взаємодіють із своїми лігандами, а здатність до високоафінного зв'язування набувають саме в результаті активації тромбоцитів. Механізм цього процесу до кінця невідомий, однак встановлено, що внаслідок активації відбуваються зміни конформаційної структури GP IIa/IIIb, що призводить до відкриття ділянки зв'язування високомолекулярних лігандів. Головним із цих лігандів є фібриноген. Останній симетричної структури і може взаємодіяти одночасно з двома рецепторами на поверхні сусідніх активованих тромбоцитів. Таким чином, він утворює молекулярні «містки» між тромбоцитами і стимулює їх агрегацію. NO запобігає агрегації, впливаючи саме на GP IIa/IIIb комплекси, змінюючи їх конфігурацію, так що вони не можуть зв'язати фібриноген [8, 9]. Останній, як субстрат, стає доступний для лізису. У такий спосіб оксид азоту, запобігаючи агрегації, збільшує фібринолітичну активність, що в умовах ішемії має позитивне значення.

Висновки

1. За умов 20-хвилинної ішемії в полях гіпокампа CA₁, CA₂, CA₃ спостерігається зростання показників фібринолітичної активності, а при 1-годинній і 24-годинній реперфузії – їх зниження, порівняно з контролем.

2. Величини, що характеризують поле CA₁ менші, порівняно з величинами полів CA₃ і CA₂; вказане поле є більш чутливим до ішемічних впливів.

3. Уведення амінокислоти L-аргініну, як донора оксиду азоту, зумовлює зростання фібринолітичної активності.

Перспективи подальших досліджень. Додільно провести експериментальні дослідження, які моделюють клінічні стани, що супроводжуються виникненням ішемії мозку та ефекти, які зумовлюють при цьому, введення амінокислоти L-аргініну. Цікавим також є деталізація механізму впливу оксиду азоту на глікопротеїнові комплекси тромбоцитів GP IIa/IIIb.

Література

1. Буданцев А.Ю. Стереотаксический атлас мозга крыс (фронтальные сечения) / А.Ю.Буданцев. – Пушино: Аналитическая микроскопия, 2002. – С. 205.
2. Измайлова Н.А. Плазмин и его ингибиторы в крови больных инфарктом мозга и дисциркуляторной энцефалопатией: автореф. дис. на соискание науч. степени канд. мед. наук: спец. 14.00.13 "Нервные болезни" / Н.А.Измайлова. – Пермь, 2008. – 23 с.

3. Кухарчук О.Л. Патогенетична роль та методи корекції інтегративних порушень гормонально-месенджерних систем регуляції гомеостазу при патології нирок: автореф. дис. на здобуття ступеня док. мед. наук: спец. 14.00.16 "Патологічна фізіологія" / О.Л.Кухарчук. – Одеса, 1996. – 36 с.
4. Лупинская З.А. Эндотелий сосудов – основной регулятор местного кровотока / З.А.Лупинская // КРСУ. – 2003. – № 7. – С. 17-21.
5. Фибринолитическая и антикоагулянтная терапия в остром периоде ишемического инсульта / Н.А.Пряникова, Н.М.Ефремова, Л.В.Стаховская [и др.] // Лечение инсульта. – 2005. – № 5. – С. 14-19.
6. Development of 'no-reflow' phenomenon in ischemia/reperfusion injury: failure of active vasomotility and not simply passive vasoconstriction / J. Nanobashvili, C. Neumayer, A. Fuegl [et al.] // European Surgical Research. – 2003. – № 5. – P. 543-549.
7. Protective effects of statins involving both eNOS and t PA in focal cerebral ischemia / M.Asahi, Z.Huang, S.Thomas [et al.] // J. Cereb. Blood Flow Metab. – 2005. – № 6. – P. 722-729.
8. Reinhard M. Actin-bases motility: stop and go with Ena/Vasp proteins / M.Reinhard, T.Jarchau, U.Walter // Trends Biochem. – 2001. – Vol. 26. – P. 243-249.
9. Schawarz U.R. Taming platelets with cyclic nucleotides / U.R.Schawarz, U.Walter, M.Eigenthaler // Biochem. Pharmacol. – 2001. – Vol. 2. – P. 15-28.

**ВЛИЯНИЕ NO-ЗАВИСИМЫХ МЕХАНИЗМОВ НА ПОКАЗАТЕЛИ
ФИБРИНОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ В ГИППОКАМПЕ
КРЫС В УСЛОВИЯХ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ
ГОЛОВНОГО МОЗГА**

В.О.Куровская

Резюме. Исследовано влияние оксида азота (NO) на состоянии фибринолитической активности в гиппокампе крыс. Ишемия продолжительностью 20 мин приводит к возрастанию показателей фибринолиза, а дальнейшая 1-часовая и 24-часовая реперфузия – к их снижению, в сравнении с контролем. Введение аминокислоты L-аргинина приводит к возрастанию фибринолитической активности во всех полях гиппокампа.

Ключевые слова: фибринолиз, оксид азота, ишемия, реперфузия, гиппокамп.

**THE EFFECT OF NO-DEPENDENT MECHANISMS ON THE INDICES OF
THE FIBRINOLYTIC ACTIVITY OF THE HIPPOCAMP UNDER
THE CONDITIONS OF ISCHEMIA-REPERFUSION
OF THE BRAIN**

V.O.Kurovs'ka

Abstract. The effect of nitric oxide (NO) on the state of the fibrinolytic activity of the rat hippocamp has been studied. 20-minute ischemia results in an increase of the fibrinolytic indices and further 1-hour and 24-hour reperfusion in their decrease compared with the control index. The introduction of the amino acid L-arginin causes an increase of the fibrinolytic activity in all the hippocampal fields.

Key words: fibrinolysis, nitric oxide, ischemia, reperfusion, hippocamp

Bukovinian State Medical University (Chernivtsi)

Рецензент – проф. Ю.С.Роговий

Buk. Med. Herald. – 2009. – Vol.13, №3.–P.111-114

Надійшла до редакції 28.05.2009 року