

АГРЕГАТНЫЕ СВОЙСТВА КЛЕТОК КРОВИ В ПРИСУТСТВИИ ДОНОРОВ NO И H₂S В НОРМЕ И У ПАЦИЕНТОВ С КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ

Тихомирова И. А., Муравьев А. В., Кислов Н. В.¹,
Лемехова В. А.¹, Петроченко Е. П., Малышева Ю. В.

Ярославский государственный педагогический университет имени К. Д. Ушинского,
Ярославль, Россия

¹Ярославский государственный медицинский университет, Ярославль, Россия

Введение. Агрегация клеток крови (тромбоцитов и эритроцитов) во многом определяет поддержание оптимальных функциональных свойств цельной крови и эффективность реализации ее кислородтранспортной функции. В условиях опухолевого процесса, когда локальная гипоксия тканей провоцирует рост и диссеминацию опухоли, агрегатные свойства тромбоцитов и эритроцитов приобретают особое значение. Роль газомедиаторов, которые являются нативными биорегуляторами, в процессах агрегации клеток крови до настоящего времени мало изучена.

Цель. Оценить агрегатные свойства тромбоцитов и эритроцитов в присутствии доноров NO и H₂S в норме и у пациентов с колоректальным раком.

Методы исследования. В исследование были включены практически здоровые добровольцы (группа контроля), n= 26 человек, средний возраст 51,4±6,6 лет; и группа пациентов Ярославской областной клинической онкологической больницы с верифицированным диагнозом колоректальный рак, n= 27, средний возраст 57,3±7,1 лет.

Эффект оксида азота оценивали с использованием доноров NO (SNP (нитропруссид натрия) и Spermine NONOate) и сероводорода (NaHS и GYY4137) в конечной концентрации 10 μM. Показатели агрегации тромбоцитов измеряли с помощью лазерного анализатора агрегации тромбоцитов АЛАТ-2 «Биола» (Москва, ООО НПФ «Биола»), агрегацию эритроцитов исследовали методом оптической микроскопии с последующей видеорегистрацией и компьютерным анализом изображения.

Результаты и их обсуждение. АДФ-индуцированная агрегация тромбоцитов в присутствии донора оксида азота (SNP) снизилась в группе здорового контроля и у пациентов на 32,5% и 33,6% (p<0,05) соответственно. Добавление донора сероводорода NaHS к обогащенной тромбоцитами плазме привело к снижению показателей АДФ-индуцированной агрегации в группе здорового контроля на 32,9% (p<0,01), у пациентов антиагрегационный эффект NaHS был менее выражен и составил 17% (p<0,05). Так же, как и для АДФ-индуцированной агрегации, в случае применения адреналина в качестве индуктора агрегации тромбоцитов, более выраженный антиагрегационный эффект донора оксида азота SNP был отмечен в группе здорового контроля – снижение показателя агрегации составило 28,3% (p<0,05), для пациентов этот показатель уменьшился на 19,8% (p<0,05). В присутствии донора сероводорода

NaHS показатель агрегации тромбоцитов в контроле снизился на 18,9% ($p<0,05$), у пациентов с колоректальным раком – на 15,1% ($p<0,05$).

Введение в обогащенную тромбоцитами плазму ингибитора аденилатциклазы SQ 22,536 практически не изменило антиагрегантный эффект донора сероводорода NaHS на показатели АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов ни в группе контроля, ни у пациентов с колоректальным раком. Однако для адреналин-индуцированной агрегации тромбоцитов, ингибированной NaHS, зафиксировано статистически значимое дополнительное снижение (на 29,8%, $p<0,05$ для здоровых лиц и на 25,2%, $p<0,05$ для пациентов) в присутствии ингибитора аденилатциклазы SQ 22,536).

В группе здорового контроля степень агрегации эритроцитов в присутствии донора сероводорода GYY4137 достоверно не изменилась (отмечена лишь тенденция к снижению этого показателя), присутствие ингибитора аденилатциклазы SQ22,536 не оказало заметного влияния на агрегируемость эритроцитов здоровых лиц. У пациентов с колоректальным раком исходные показатели степени агрегации эритроцитов в 2,4 раза ($p<0,01$) превышали нормальные значения и под влиянием донора сероводорода GYY4137 снизились на 29,4% ($p<0,05$). В присутствии ингибитора аденилатциклазы SQ22,536 отмечено дополнительное снижение степени агрегации эритроцитов у пациентов еще на 38% ($p<0,05$).

Ингибирование АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов донором оксида азота SNP было почти полностью элиминировано при введении в плазму ингибитора гуанилатциклазы ODQ: в группе контроля показатель агрегации возрос на 34,2% ($p<0,05$), в группе пациентов – на 39% ($p<0,05$). Для адреналин-индуцированной агрегации тромбоцитов, сниженной в присутствии SNP прирост степени агрегации под влиянием ингибитора гуанилатциклазы ODQ составил 26,9% ($p<0,05$) в контроле и 29,1% ($p<0,05$) у пациентов. В группе здорового контроля в присутствии SpermineNONOate отмечена тенденция к снижению степени агрегации эритроцитов и ее прирост после добавления ингибитора гуанилатциклазы ODQ тоже только на уровне тенденции. У пациентов с колоректальным раком донор оксида азота способствовал существенному снижению степени агрегации эритроцитов (на 46,9%, $p<0,01$), присутствие ингибитора гуанилатциклазы ODQ не оказало значимого влияния на показатели агрегации в условиях воздействия SpermineNONOate.

Агрегация тромбоцитов, сниженная в присутствии NaHS и SNP не претерпела существенных изменений при блокировании K^+ _{АТФ}-каналов глибенкламидом. Ингибирование АТФ-зависимых K^+ каналов никак не повлияло и на антиагрегантный эффект NaHS в отношении АДФ- и адреналин-индуцированной агрегации тромбоцитов у здоровых лиц и пациентов с колоректальным раком. Агрегация эритроцитов, сниженная в присутствии GYY4137, практически не изменилась при блокировании АТФ-зависимых K^+ каналов глибенкламидом и в контроле, и у пациентов.

Из опубликованных данных известно, что в сердечно-сосудистой системе регуляторный эффект сероводорода реализуется с участием

аденилатциклазной системы (например, при регуляции сократимости кардиомиоцитов) [1], а, к примеру, вазорелаксационный эффект сероводорода (в отличие от аналогичного эффекта NO) реализуется без участия гуанилатциклазной системы [2]. Исходя из этого, нами было выдвинуто предположение о возможной вовлеченности системы аденилатциклаза – цАМФ в трансдукцию сигнала при реализации антиагрегантного эффекта NaHS в отношении клеток крови. Использование ингибитора аденилатциклазы оказало значимое влияние только на процесс ингибирования адреналин-индуцированной агрегации тромбоцитов.

Известно, что механизм действия NO в разных тканях связан с активацией растворимой гуанилатциклазы, что ведет к повышению уровня цГМФ, который, в свою очередь, активирует цГМФ-зависимую протеинкиназу PKG [3]. Функционирование тромбоцитарной гуанилатциклазы и агрегационная способность тромбоцитов взаимосвязаны. Активация гуанилатциклазы тормозит агрегацию тромбоцитов, и регуляторная роль гуанилатциклазы проявляется на самой ранней (обратимой) стадии агрегационного процесса [4]. В нашем исследовании при использовании ингибитора гуанилатциклазы и проникающего аналога цГМФ была подтверждена вовлеченность системы цГМФ-гуанилатциклаза в реализацию антиагрегантного эффекта донора NO как в норме, так и у пациентов с колоректальным раком.

Опубликованные данные указывают и на возможное участие АТФ-зависимых K^+ каналов в реализации сигнальных эффектов газомедиаторов. Ряд регуляторных эффектов H_2S блокируется при ингибировании АТФ-зависимых K^+ каналов глибенкламидом (например, отрицательный хронотропный и инотропный эффект, сосудорасширяющий эффект обусловлен главным образом открытием этих каналов и т.д.) [5]. Поэтому представляло интерес оценить возможную вовлеченность и этого элемента сигнального пути в реализацию антиагрегантного эффекта сероводорода и оксида азота. Применение блокатора этих каналов никак не повлияло на эффекты исследуемых газомедиаторов, что не позволило подтвердить участие K^+_{ATP} -каналов в реализации сигнала NO и H_2S при ингибировании ими агрегации тромбоцитов и эритроцитов.

Недавно было показано, что, кроме депонирования NO, участие эритроцитов в метаболизме этого газа обеспечивается еще и его активным синтезом красными клетками крови: в эритроцитах была идентифицирована каталитически активная eNOS (NOS3 1 типа), идентичная эндотелиальной eNOS [6]. В ряде исследований также было продемонстрировано заметная активность H_2S -продуцирующих ферментов в эритроцитах, что указывает на способность этих клеток крови генерировать сероводород [7, 8]. Способность красных клеток крови продуцировать молекулы газомедиаторов предполагает их возможную регуляторную роль и в отношении самих эритроцитов.

В условиях нормы изменения агрегации эритроцитов в присутствии доноров оксида азота и сероводорода проявились лишь в тенденции к снижению. У пациентов с колоректальным раком исходная степень агрегации эритроцитов была значительно выше нормы и оба газомедиатора проявили

выраженный антиагрегационный эффект. Модификация антиагрегационного эффекта донора сероводорода в присутствии ингибитора аденилатциклазы позволяет предположить вовлеченность системы аденилатциклаза-цАМФ в трансдукцию сигнала сероводорода при ингибировании агрегации эритроцитов при колоректальном раке.

Выводы. Отмечено снижение агрегации тромбоцитов в присутствии доноров газомедиаторов как в норме, так и при колоректальном раке. В трансдукции сигнала при ингибировании адреналин-индуцированной агрегации тромбоцитов (в отличие от АДФ-индуцированной) и агрегации эритроцитов под действием NaHS отчасти задействована аденилатциклазная система. В реализацию клеточного ответа тромбоцитов на воздействие NO вовлечена гуанилатциклазная система. Участие цГМФ в процессе снижения агрегируемости эритроцитов под действием донора NO подтвердить не удалось – по всей видимости антиагрегационный эффект NO в отношении эритроцитов при колоректальном раке реализуется по цГМФ-независимому пути. K^+ _{АТФ}-каналы не задействованы в реализации антиагрегантного эффекта NO и H₂S в норме и при колоректальном раке.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-015-00143

ЛИТЕРАТУРА

1. Elsey D., Fowkes R., Baxter G. Regulation of cardiovascular cell function by hydrogen sulfide (H₂S)// Cell Biochem Funct. – 2010. – Vol. 28, № 2. – P. 95–106.
2. Zhao W., Zhang J., Lu Y., Wang R. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K (ATP) channel opener// EMBO J. – 2001. – № 20. – P.6008–6016.
3. Barvitenko N., Adragna N., Weber R. Erythrocyte Signal Transduction Pathways, their Oxygenation Dependence and Functional Significance // Cell Physiol Biochem. – 2005. – Vol. 15, № 1-4. – P. 1–18.
4. Riddell D., Owen J. Nitric oxide and platelet aggregation // Vitam Horm. – 1999. – № 57. – P. 5–48.
5. Martelli A., Testai L., Breschi M. et al. Vasorelaxation by hydrogen sulphide involves activation of Kv7 potassium channels // Pharmacol Res. – 2013. – № 70. – P. 27–34.
6. Kuhn V., Diederich L., Keller T. et al. Red Blood Cell Function and Dysfunction: Redox Regulation, Nitric Oxide Metabolism, Anemia // Antioxid Redox Signal. – 2017. – Vol. 26, № 13. – P.718–742.
7. Vitvitsky V., Yadav P. K., Kurthen A. et al. Sulfide oxidation by a noncanonical pathway in red blood cells generates thiosulfate and polysulfides// The Journal of Biological Chemistry. – 2015. – Vol. 290, № 13. – P. 8310–8320.
8. Wang G., Huang Y., Zhang N. et al. Hydrogen Sulfide Is a Regulator of Hemoglobin Oxygen-Carrying Capacity via Controlling 2,3-BPG Production in Erythrocytes. Oxid Med Cell Longev. – 2021. – Vol. 2021:8877691.