23

Влияние газотрансмиттера оксида азота на агрегацию тромбоцитов: исследование методом светопропускания *in vitro*

© Д.А. Умеренков[1], П.Б. Ермолинский[1], А.Е. Луговцов[1], М.К. Максимов[1], И.А. Тихомирова[2], А.В. Муравьев[2], А.В. Приезжев[1]

[1] Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия
[2] Ярославский государственный педагогический университет имени К.Д. Ушинского, Ярославль, Россия

e-mail: umerenkov.da19@physics.msu.ru

Поступила в редакцию 01.07.2025 г.
В окончательной редакции 24.08.2025 г.
Принята к публикации 25.11.2025 г.

Методом турбидиметрической лазерной агрегометрии, при которой регистрируется сигнал светопропускания обогащенной тромбоцитами плазмы, проведен анализ влияния газотрансмиттера оксида азота (NO) на агрегационную активность тромбоцитов *in vitro*. Целью исследования было выявление доз зависимого и время зависимого влияния NO на процесс агрегации тромбоцитов, а также установление биохимических сигнальных каскадов, задействованных в этих процессах. Исследованы образцы крови 5 здоровых доноров. Показано, что оксид азота оказывает выраженное ингибирующее действие на агрегацию тромбоцитов, проявляющееся уже при минимальной концентрации прямого донора NO — нитропруссида натрия в $1\,\mu$M. При увеличении концентрации и времени инкубации наблюдалось статистически значимое снижение как степени, так и скорости агрегации тромбоцитов, что говорит о том, что сигнальный путь, опосредованный оксидом азота (NO/р-ГЦ/цГМФ/ПКГ), оказывает ингибирующее действие на агрегацию тромбоцитов. Подтверждена перспективность применения доноров NO в качестве средств коррекции агрегационной активности тромбоцитов, продемонстрирована высокая информативность лазерной агрегометрии как метода анализа микрореологических свойств тромбоцитов.

Ключевые слова: агрегация тромбоцитов, газотрансмиттеры, нитропруссид натрия, оксид азота, светопропускание, турбидиметрия.

DOI: 10.21883/0000000000

1. Введение

Тромбоциты принимают участие в тромбообразовании и в коагуляции крови. Они являются критически важными элементами системы гемостаза, предупреждающими кровопотерю при разрыве стенок сосудов. После контакта с поврежденной стенкой сосуда тромбоциты активируются, прикрепляются к сосуду и образуют агрегат и тромб в месте повреждения, предотвращая кровопотери. Оба состояния как кровотечение, так и тромбоз могут быть результатом нарушений функции агрегации тромбоцитов [1]. Таким образом, оценка функции тромбоцитов жизненно важна для диагностики состояния крови и терапии патологических отклонений от нормы.

Оксид азота (NO), в свою очередь, служит необходимым физиологическим и регуляторным биологическим медиатором, модулирующим тонус сосудистой стенки и гемостатико-тромботический баланс. Нарушение концентрации NO в организме человека влечет за собой различного рода сердечно-сосудистые заболевания, включая тромбоз, атеросклероз и др. [2,3].

Для оценки функции тромбоцитов в клинике проводится анализ агрегации тромбоцитов — коагулограмма. Исследование позволяет диагностировать риск развития кровоточивости, тромбофилии, оценить эффективность антиагрегантной/антикоагулянтной терапии и подобрать оптимальную дозу антиагрегантов/антикоагулянтов, в том числе при хирургических вмешательствах. Отклонение показателей агрегации тромбоцитов от нормы в большинстве случаев сигнализирует о нарушении гемостаза и каких-либо функций в организме человека. Например, в настоящее время показано, что повышение агрегации тромбоцитов является важным элементом патогенеза как развития, прогрессирования сердечно-сосудистых заболеваний (ишемическая болезнь сердца, инфаркт миокарда и др.), так и возникновения осложнений [4].

В последнее время активно развиваются методы экспресс-диагностики образцов крови для исследования агрегационных свойств эритроцитов и тромбоцитов с помощью оптических методов. Преимущество оптических методов связано с их простотой, относительной дешевизной и возможностью использования непосредственно в клинике из-за небольших размеров и необходимости небольших объемов крови, которую берут у пациента вместе с основными клиническими анализами. Более того, оптические методы позволяют получать не только статические характеристики агрегации клеток, но и су-

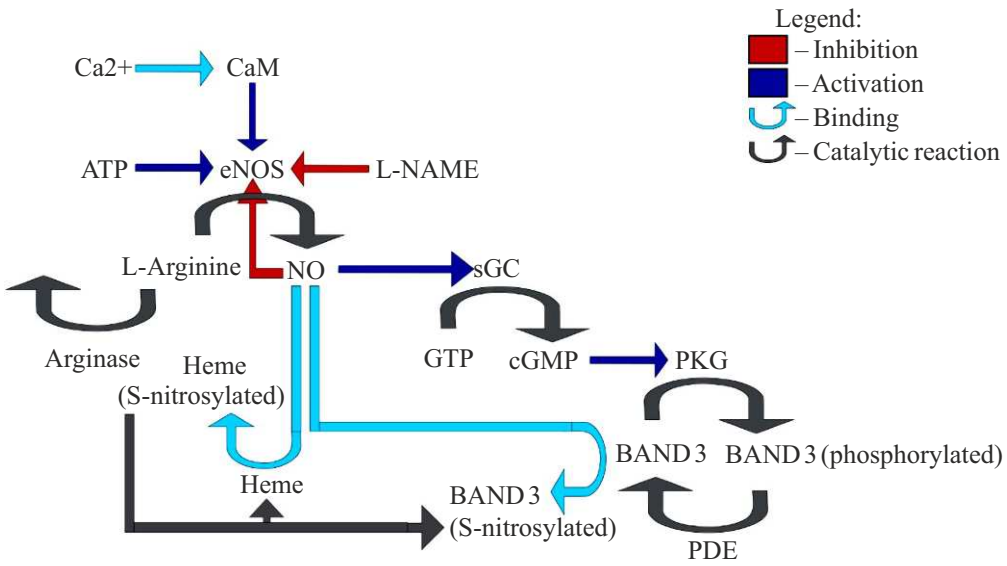

Рис. 1. Основной сигнальный путь, опосредованный NO (sGC — растворимая гуанилатциклаза [р-ГЦ], eNOS — эндотелиальная синтаза оксида азота, CaM — кальмодулин, ATP — аденозинтрифосфат, GTP — гуанозинтрифосфат, cGMP — циклический гуанозинмонофосфат [цГМФ], PKG — протеинкиназа G [ПКГ], PDE — фосфодиэстераза).

дить о ходе самого процесса путем регистрации сигнала рассеяния света или интенсивности света, прошедшего через образцы крови. Методы лазерной агрегометрии и турбидиметрии обладают высокой точностью и повторяемостью [5,6].

Целью данного исследования является изучение процесса агрегации тромбоцитов *in vitro* с использованием метода лазерной агрегометрии. Основной акцент сделан на исследование влияния на агрегацию клеток газотрансмиттера NO — нитропруссида натрия (НПН), который является прямым донором NO. Регистрация кинетики агрегации тромбоцитов проводилась при различных концентрациях НПН и времени его инкубации с обогащенной тромбоцитами плазмой (ОТП). Выполнен анализ механизма воздействия газотрансмиттера NO на агрегацию тромбоцитов и сигнального пути, опосредованного данной молекулой.

2. Роль оксида азота в регуляции кровообращения

В последнее время особый интерес среди ученых вызывает способ межклеточной и внутриклеточной коммуникации с помощью газовых медиаторов, или газотрансмиттеров (ГТ) — сигнальных молекул. В настоящее время наиболее изученными являются три молекулы: оксид азота (NO), монооксид углерода (CO) и сероводород (H_2S) [7–9].

В течение длительного промежутка времени вышеупомянутые газовые медиаторы описывались как токсичные газы, оказывающие повреждающее действие на организм человека. Вместе с тем относительно недавно было установлено, что эти соединения эндогенно синтезируются клетками организма и являются сигнальными молекулами, выполняющими как аутокринную, так и паракринную регуляцию во многих тканях и органах тела человека и животных [10]. Изучение механизмов действия ГТ — важная задача современной физиологии.

Объектом регуляторного воздействия являются клеточные структуры системы кровообращения. Известно, что артериальное давление и перфузия тканей в значительной мере регулируются артериолами и артериями. Паракринные регуляторные воздействия, и в том числе с участием ГТ, расширяют мелкие артерии и артериолы и тем самым обеспечивают эффективную тканевую перфузию [11]. Известно, что NO стимулируют образование циклических нуклеотидов (цАМФ/цГМФ) и активируют внутриклеточные протеинкиназы (ПКГ/ПКА), что вызывает вазодилатацию (рис. 1).

Газотрансмиттеры участвуют в регуляции кровообращения, включая сосудистый компонент, а также текущую по сосудам кровь, управляя ее текучестью и транспортным потенциалом через регуляторное воздействие на эндотелиальный слой клеток, выстилающий сосуды, микрореологию клеток крови и особенно эритроцитов [12]. В системе кровообращения роль NO заключается в регулировании кровяного давления и сосудистого тонуса, повышении деформируемости эритроцитов, ингибировании агрегации эритроцитов, тромбоцитов и адгезии лейкоцитов [13]. Сниженная биодоступность NO считается одним из основных факторов сердечно-сосудистых заболеваний. Экзогенные доноры NO и вещества, стимулирующие внутриклеточную NO-синтазу (L-аргинин, L-цитруллин, статины), широко используются в клинической практике и служат основой для

разработки новых поколений лекарственных препаратов на основе метаболизма NO [14].

3. Материалы и методы

Венозная кровь для проведения экспериментов забиралась натощак у здоровых доноров, которые не принимали никаких лекарств по крайней мере за 2 недели до сдачи крови. Все волонтеры были проинформированы о цели исследования и дали информированное согласие в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации. Исследование одобрено Этическим комитетом Медицинского научно образовательного центра МГУ имени М.В. Ломоносова. В качестве антикоагулянта использовался цитрат натрия 3.8 %, который минимально влияет на свойства тромбоцитов к агрегации. Для приготовления обогащенной тромбоцитами плазмы (ОТП) цельную кровь центрифугировали при 200 g в пробирках типа „Эппендорф“ в течение 7 min. Из каждой пробирки отбиралось по 800 μL супернатанта (верхнего слоя). Подготовленная к исследованию ОТП разливалась в кюветы и устанавливалась в термостат при температуре 37° для нагрева до физиологических значений ОТП в течение 3 min. Вязкость приготовленных образцов крови для контроля корректности их приготовления измерялась на ротационном вискозиметре RM100 CP1000 (Lamy Rheology Instruments, Франция), приобретенном в рамках программы развития МГУ имени М.В. Ломоносова. Все приготовленные образцы соответствовали норме по вязкости, как и предполагает методика измерения. Перемешивание суспензии тромбоцитов и возможность образования агрегатов обеспечивались с помощью вращающегося магнитного стержня, который промывался в дистиллированной воде и помещался магнитом в верхнюю часть кюветы, где и удерживался до переноса кюветы в измерительную ячейку. Далее перед началом измерения добавлялся нитропруссид натрия (НПН), который является прямым донором NO (т.е. это химическое вещество, которое генерирует NO посредством механизмов, не зависящих от ферментативного действия NO-синтазы), в объеме 15 μL до достижения следующих конечных концентраций 1, 10, 25 50 и 100 μM. Необходимая концентрация достигалась путем добавления дистиллированной воды в раствор НПН в соответствующих пропорциях. Инкубация с НПН проводилась в течение 0, 5, 15, 25 и 40 min при 37 °C.

Через 10 s после начала измерения в измерительную кювету добавляли 15 μL индуктора агрегации тромбоцитов АДФ (аденозиндифосфат) в концентрации 5 μM. В процессе измерений регистрировалась агрегатограмма — зависимость сигнала светопропускания через кювету с ОТП от времени. Чем выше сигнал светопропускания, тем меньше оптическая плотность среды, которая зависит от характерных размеров рассеивателей — агрегатов тромбоцитов. Более того, по агрегатограмме можно судить о скорости образования агрегатов в процессе их образований, поскольку это влияет на увеличение сигнала светопропускания, регистрируемого в эксперименте. На основе полученной зависимости вычислялись степень агрегации (максимальный сигнал светопропускания на протяжении 5 min процесса агрегации) и скорость агрегации (максимальный наклон кривой светопропускания в течение 5 min) (рис. 2).

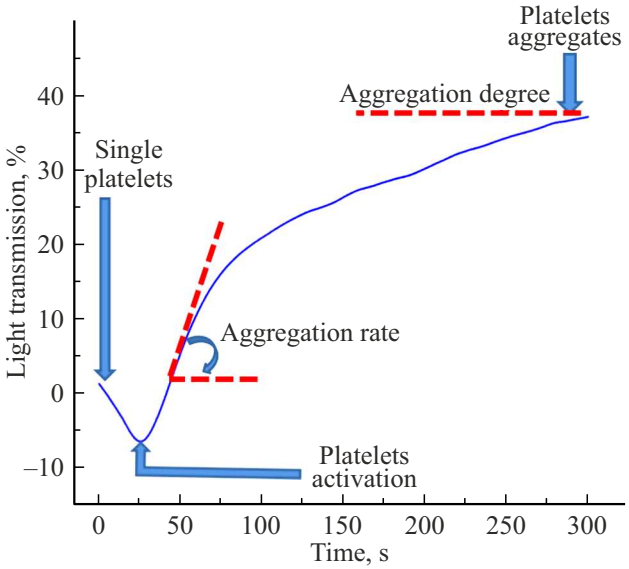

Рис. 2. Пример агрегатограммы, получаемой в методе турбидиметрии при добавлении в обогащенную тромбоцитами плазму АДФ.

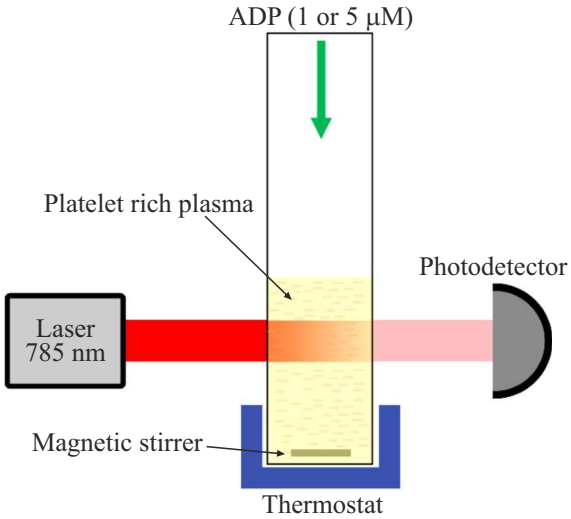

Рис. 3. Принципиальная схема метода лазерной агрегометрии тромбоцитов.

Эксперименты проводились на лазерном анализаторе агрегации тромбоцитов АЛАТ-2 „Биола“, в котором используется турбидиметрический метод оценки параметров агрегации тромбоцитов (рис. 3). Изменение оптических свойств исследуемой суспензии в процессе

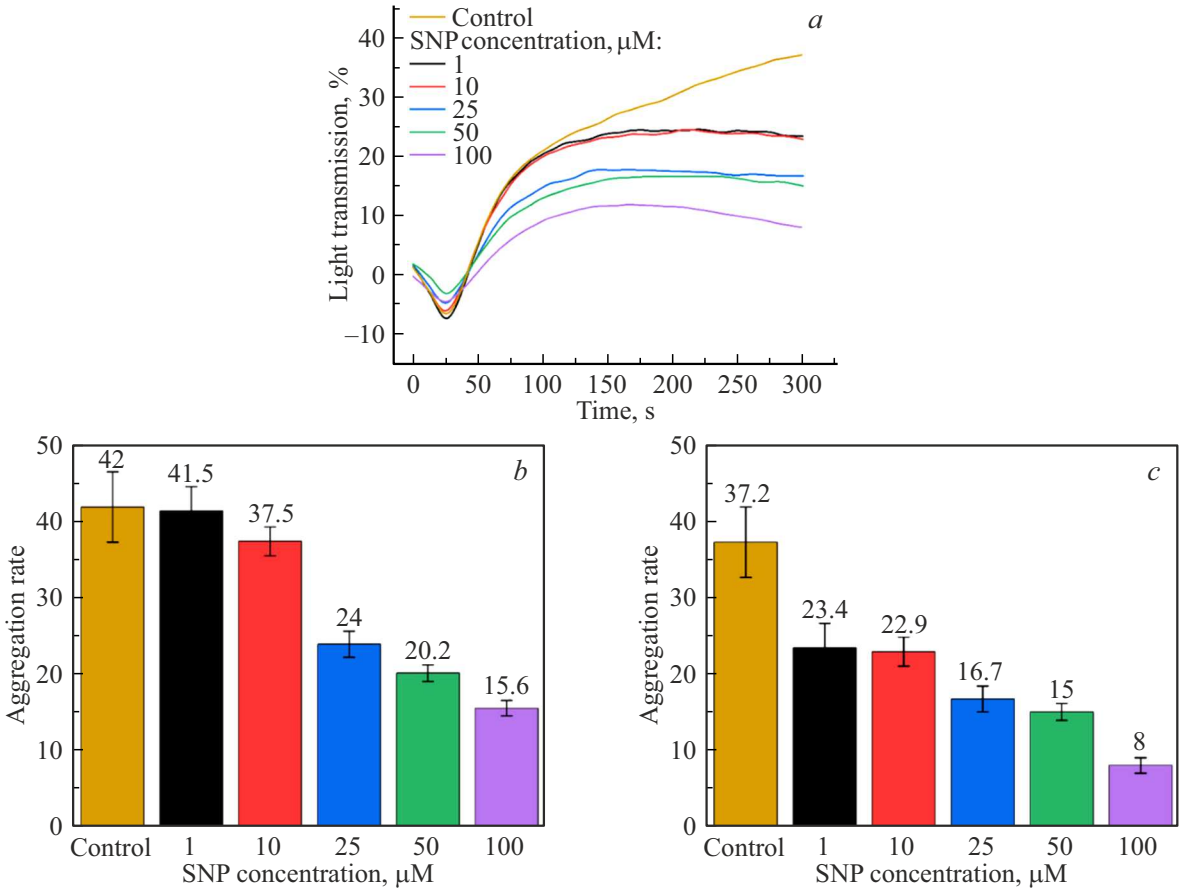

Рис. 4. Кинетики светопропускания (*a*), скорость (*b*) и степень (*c*) агрегации тромбоцитов под воздействием NO при различных концентрациях НПН(SNP).

агрегации тромбоцитов обусловлено уменьшением общей рассеивающей поверхности клеток и увеличением сечения рассеяния характерных частиц в результате образования тромбоцитарных агрегатов [15]. При анализе агрегатограмм оцениваются степень агрегации (достижение максимальной агрегации), скорость агрегации (изменение оптической плотности плазмы за первую минуту или угол наклона кривой на этапе бурной агрегации) [15]. В качестве источника света использовался полупроводниковый лазер мощностью порядка 1–50 mW с длиной волны 785 nm, которая лежит в окне оптической прозрачности тромбоцитов. Таким образом, тепловым воздействием на ОТП можно пренебречь.

При проведении экспериментов были получены кривые (агрегатограммы), отражающие зависимость интенсивности света, рассеянного вперед (светопропускания) от времени (рис. 2). За 0% агрегации принимается начальное состояние — первые 10 s после начала измерения до добавления АДФ — обогащенной тромбоцитами плазмы, а за 100% принимается состояние бедной тромбоцитами плазмы (БТП). При этом с достаточной для практики точностью можно считать, что оптические свойства БТП и дистиллированной воды эквивалентны (на приборе АЛАТ-2 калибровка 100% производится на дистиллированной воде). Уменьшение светопропускания на 10 s связано с активацией тромбоцитов, в ходе которой они изменяют свою форму от дисковидной до сферической с образованием псевдоподий. В результате этого светопропускание света становится меньше изначального (на графике отчетливо виден спад светопропускания). Также необходимо отметить, что в момент добавления АДФ агрегация уже идет. Далее начинается активная агрегация тромбоцитов (чему соответствует наиболее крутой участок графика), после чего агрегация постепенно выходит на насыщение.

4. Результаты и обсуждение

Были измерены зависимости степени и скорости агрегации тромбоцитов от концентрации НПН в диапазоне 1–100 μM. Результаты, полученные на ОТП, инкубированной с НПН, а также на плазме с тромбоцитами без НПН, представлены на рис. 4. На графиках рис. 4, *a* показаны сглаженные кривые зависимости светопропускания от времени, усредненные по 5 измерениям, и абсолютные разницы в измерениях для каждой концентрации НПН. Статистическая значимость различий полученных

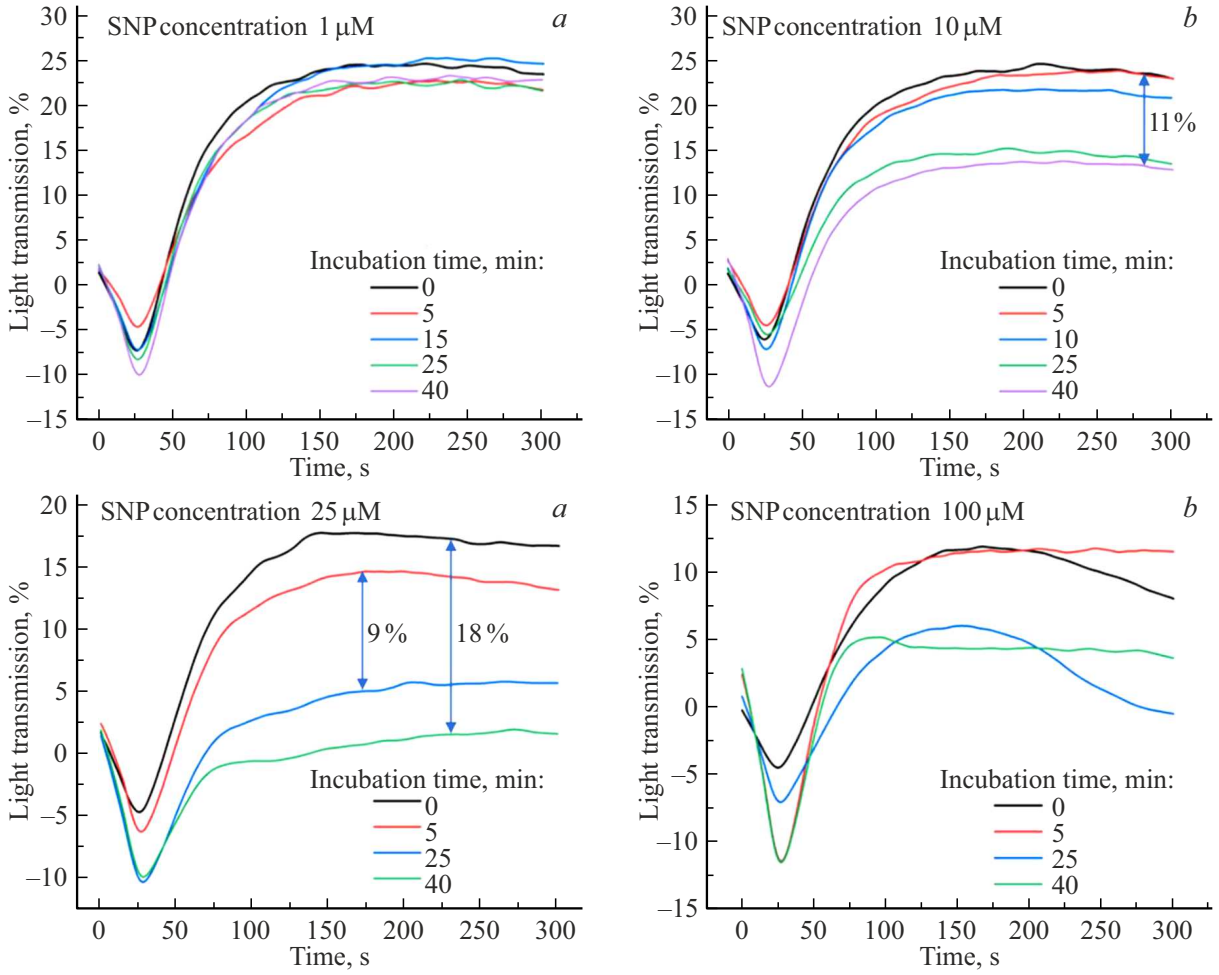

Рис. 5. Кинетики светопропускания при агрегации тромбоцитов под воздействием NO при различных временах инкубации НПН с ОТП и концентрациях НПН 1 μM (*a*), 10 μM (*b*), 25 μM (*c*), 100 μM (*d*).

результатов оценивалась с помощью двухстороннего критерия Манна-Уитни.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что НПН — донор NO — оказывает значительное влияние на параметры агрегации тромбоцитов *in vitro*. Стоит отметить, что даже при самой низкой концентрации в 1 μM, использованной в эксперименте, наблюдается ингибирующий эффект NO на агрегацию тромбоцитов. Степень агрегации у образца, инкубированного с НПН в концентрации 1 μM, уменьшается на $(37-7)\,\%$, однако *скорость агрегации* не изменяется в пределах погрешности (рис. 4, *b, c*). При более высоких концентрациях НПН заметно еще более выраженное ингибирование агрегации тромбоцитов, причем скорость агрегации тромбоцитов также уменьшается (рис. 4, *b, c*). При концентрации НПН в 100 μM степень агрегации уменьшается на $(70 \pm 9)\,\%$, а скорость агрегации уменьшается на $(27 \pm 5)\,\%$ относительно значений без НПН. Статистически значимое уменьшение скорости агрегации тромбоцитов наблюдается при концентрации НПН более 25 μM ($p < 0.05$) (рис. 4, *c*).

В последнее время в литературе стали появляться новые гипотезы о стимулирующих или двойственных функциях ПКГ в тромбоцитах. Группой ученых из Китая был поднят вопрос о функциях цГМФ/ПКГ и их роли в активации тромбоцитов [16,17]. В настоящей работе показано, что сигнальный путь NO/р-ГЦ/цГМФ/ПКГ является одним из ключевых в ингибировании активности тромбоцитов, что полностью противоречит теории о его активирующем воздействии на агрегацию тромбоцитов.

Также мы исследовали вопрос о зависимости воздействия NO на агрегацию тромбоцитов от времени инкубации НПН с ОТП при различных концентрациях в диапазоне 0–40 min. Полученные агрегатограммы представлены на рис. 5, 6.

Исходя из полученных результатов видно, что при концентрации НПН в 1 μM агрегация тромбоцитов практически не зависит от времени инкубации (рис. 5, *a*). Таким образом, можно предположить, что при данной концентрации бóльшая часть NO, оказывающая воздействие на агрегацию тромбоцитов, выделяется менее чем за 10 s (время добавления АДФ).

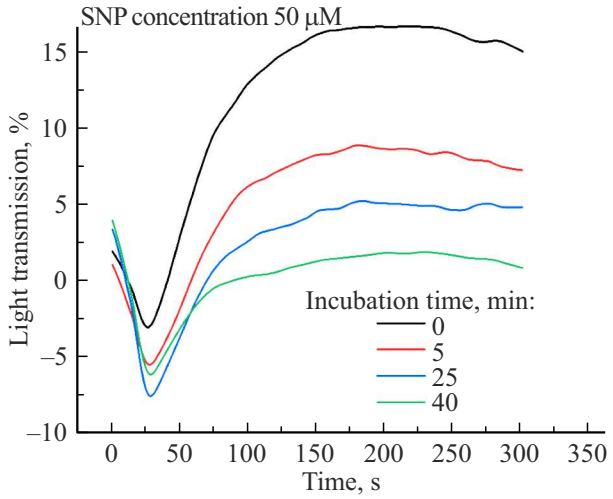

Рис. 6. Кинетики светопропускания при агрегации тромбоцитов под воздействием NO при концентрации НПН 50 μM и различных временах инкубации НПН с ОТП.

Однако при концентрации НПН в 10 μM наблюдается значительное влияние NO на агрегацию тромбоцитов в зависимости от времени инкубации, и можно условно разделить полученные агрегатограммы на две группы по времени инкубации (0–10 min и 25–40 min), разница в степени агрегации тромбоцитов для которых составляет (54 ± 7) % (рис. 5, *b*).

При концентрациях НПН в 25 и 100 μM наблюдается еще более выраженное влияние времени инкубации на агрегацию тромбоцитов, и агрегатограммы также можно разделить на две условные группы, однако при концентрации НПН в 25 μM интервал между группами больше в сравнении с концентрацией в 100 μM (рис. 5, *c, d*). Из полученных графиков прослеживается тенденция увеличения ингибирующего эффекта на агрегацию тромбоцитов с увеличением времени инкубации НПН с ОТП при концентрациях НПН больше 10 μM. Можно предположить, что при малых концентрациях НПН образование молекул NO, оказывающих ингибирующее действие на агрегацию тромбоцитов, происходит за первые секунды эксперимента, поэтому на данном масштабе времени мы не наблюдаем эффекта, связанного с временем инкубации.

Можно отметить, что при концентрации в 50 μM каждая агрегатограмма формируется по своей индивидуальной траектории (рис. 6) без образования двух групп по времени инкубации. Тем самым можно предположить, что время инкубации существенно влияет на количество продуцируемого оксида азота, который воздействует на агрегацию тромбоцитов.

5. Выводы

В ходе выполнения работы использованный турбидиметрический метод продемонстрировал высокую чувствительность к изменениям параметров агрегации тромбоцитов при воздействии на них газотрансмиттера NO — были найдены статистически достоверные отличия кинетик и параметров агрегации тромбоцитов при инкубировании с НПН. Проведенный анализ влияния NO на агрегационные свойства тромбоцитов показал ингибирующий эффект этого влияния по сигнальному пути, опосредованному NO. Данный эффект зависит от времени инкубации и концентрации НПН. На основе рассмотрения полученных данных микрореологических ответов тромбоцитов на донора газотрансмиттера NO можно заключить, что оксид азота эффективно ингибирует агрегацию тромбоцитов *in vitro* через сигнальный путь NO/р-ГЦ/цГМФ/ПКГ и является перспективным соединением, использование которого может быть включено в одну из важных терапевтических рекомендаций при ряде заболеваний.

Финансирование работы

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (РНФ) в рамках проекта № 25-15-00172.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

[1] М.А. Пантелеев, А.Н. Свешникова. Онкогематология, **9** (2), 65–73 (2014). DOI: 10.17650/1818-8346-2014-9-2-65-73

[2] P.Y. Cheung, E. Salas, R. Schulz, M.W. Radomski. Semin. Perinatol., **21** (5), 367–376 (1997). DOI: 10.1016/S0146-0005(97)80006-7

[3] В.В. Зинчук, А.В. Муравьев, Е.С. Билецкая, П.В. Михайлов, И.А. Тихомирова, А.В. Замышляев, Р.С. Остроумов. Тромбоз, гемостаз и реология, (2), (2022). DOI: 10.25555/thr.2022.2.1022

[4] E. Vrigkou, I. Tsangaris, S. Bonovas, P. Kopterides, E. Kyriakou, D. Konstantonis, A. Tsantes. Platelets, **30** (5), 646–651 (2019). DOI: 10.1080/09537104.2018.1499890

[5] A.E. Lugovtsov, Yu.I. Gurfinkel, P.B. Ermolinskiy, A.I. Maslyanitsina, L.I. Dyachuk, A.V. Priezzhev. Biomed. Opt. Express, **10** (8), 3974–3986 (2019). DOI: 10.1364/BOE.10.003974

[6] O.K. Baskurt, M. Boynard, G.C. Cokelet, P. Connes, B.M. Cooke, S. Forconi, F. Liao, M.R. Hardeman, F. Jung, H.J. Meiselman, G. Nash, N. Nemeth, B. Neu, B. Sandhagen, S. Shin, G. Thurston, J.L. Wautier. Clin. Hemorheol. Microcirc., **42** (2), 75–97 (2009). DOI: 10.3233/CH-2009-1202

[7] H. Li, U. Förstermann. J. Pathol., **190** (3), 244–254 (2000). DOI: 10.1002/(SICI)1096-9896(200002)190:3<244::AID-PATH575>3.0.CO;2-8

[8] A.K. Mustafa, M.M. Gadalla, S.H. Snyder. Sci. Signal., **2** (68), re2 (2009). DOI: 10.1126/scisignal.268re2

[9] E. Sélley et al. Cardiovasc. Diabetol., **13**, 69 (2014). DOI: 10.1186/1475-2840-13-69
[10] Г.Ф. Ситдикова, А.В. Яковлев, А.Л. Зефиров. Бюллетень сибирской медицины, **13** (6), 185–200 (2014). DOI: 10.20538/1682-0363-2014-6-185-200
[11] C. Munteanu, C. Popescu, A.-I. Vlădulescu-Trandafir, G. Onose. Antioxidants, **13**, 1158 (2024). DOI: 10.3390/antiox13101158
[12] J. Kobayashi, K. Ohtake, I. Murata, K. Sonoda. Nitric Oxide, **129**, 25–29 (2022). DOI: 10.1016/j.niox.2022.09.004
[13] A.V. Muravyov, I.A. Tikhomirova, P.V. Avdonin, S.V. Bulaeva, J.V. Malisheva. J. Cell. Biotechnol., **7** (1), 1–9 (2021). DOI: 10.3233/jcb-200023
[14] K.F. Beck, J. Pfeilschifter. Cell. Signal., **77**, 109823 (2021). DOI: 10.1016/j.cellsig.2020.109823
[15] A.A. Filkova et al. Sci. Rep., **9** (1), 6217 (2019). DOI: 10.1038/s41598-019-42701-0
[16] Z. Li et al. Blood, **101** (11), 4423–4429 (2003).
[17] Z. Li et al. Cell, **112** (1), 77–86 (2003). DOI: 10.1016/S0092-8674(02)01254-0