

ФИЗИОЛОГИЯ

УДК 612.115:577.175.343

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ВАЗОПРЕССИНА И ЕГО СТРУКТУРНОГО АНАЛОГА DGAVP НА АГРЕГАТНОЕ СОСТОЯНИЕ КРОВИ**М.Г. Голубева, М.Е. Григорьева, С.А. Горбунова***(кафедра физиологии человека и животных; e-mail: Mgolubeva46@mail.ru)*

Нейрогипофизарный гормон вазопрессин (AVP) относится к группе пептидов, которые играют важнейшую роль в регуляции многих функций организма, в том числе и в свертывании крови. В крови AVP обычно присутствует в небольших концентрациях (1–5 пг/мл) и не оказывает влияния на показатели системы гемостаза. Изменение реакций свертывания и фибринолиза происходит при концентрациях пептида значительно выше физиологических значений, при этом в кровотоке отмечается повышение свертывающей и фибринолитической активности крови (Шитикова, 2000). Увеличение свертывающего потенциала обеспечивается, во-первых, активацией калликреин-кининовой системы, во-вторых, за счет освобождения в кровь прокоагулянтов и прежде всего Ф VIII (Grant, 1993). Усиление фибринолитической активности определяется значительным повышением уровня тканевого активатора плазминогена. Не останавливаясь подробно на всех аспектах реакций системы гемостаза на AVP, уделим больше внимания реакциям тромбоцитарного звена.

Вазопрессин вызывает активацию и агрегацию тромбоцитов при нефизиологически высоких концентрациях (28 ± 2 нМ). Такие количества пептида отмечаются в организме при патологических условиях стресса и шока. Низкие концентрации нейрогипофизарного гормона, имеющиеся в циркулирующей крови, действуют на кровяные пластинки синергично с другими индукторами, усиливая их агрегационный эффект (Шитикова, 2000).

Пептид влияет на агрегацию тромбоцитов через взаимодействие со специфическими V_{1a} рецепторами, расположенными на тромбоцитах (Lachant et al., 1995; Голубева и др., 1999; Thibonnier, 2001). В реакциях кровяных пластинок на вазопрессин имеет значение и стимуляция пептидом образования тромбосана B_2 , блокада которого в какой-то степени может предупреждать агрегацию, вызванную AVP (Launay et al., 1987; Filep, Rozenkranz, 1987).

В наших предыдущих исследованиях было показано, что аналог вазопрессина дезглициламид-аргинил вазопрессин (DGAVP) вызывает значительное повышение свертывающей активности крови, но в отличие от AVP снижает ее фибринолитиче-

скую активность (Голубева и др., 1990). Если в современной литературе существует определенное количество исследований, посвященных влиянию вазопрессина и окситоцина на агрегацию тромбоцитов (Бурова, 1990; Anfossi et al., 1991), то в отношении их структурных аналогов такие данные отсутствуют. Поэтому целью настоящей работы было сравнить влияние AVP и его синтетического аналога DGAVP на агрегацию тромбоцитов в плазме крови людей и крыс.

Методика

Центрифугировали кровь человека или белых крыс (весом 180–200 г), взятую с 3,8%-м цитратом Na (соотношение кровь/консервант — 9 : 1), со скоростью 1000 об/мин в течение 7 мин для получения богатой тромбоцитами плазмы. Были отобраны пробы плазмы крови, содержащей от 200 до 300×10^9 /л тромбоцитов. В качестве индукторов агрегации использовали AVP или DGAVP в концентрации 10^{-5} М.

В отдельной серии экспериментов использовали отмытые тромбоциты крыс, которые получали из богатой тромбоцитами плазмы, стабилизированной цитратом Na, трижды отмытые в 15 мМ Трис-НСl буфере pH 7,4. Эксперименты проводили в присутствии 1 мМ $CaCl_2$. Пептиды (конечная концентрация 10^{-5} – 10^{-7} М, объем 0,05 мл) добавляли к 0,2 мл суспензии тромбоцитов и инкубировали в течение 2 мин при 37°. В контрольной серии вместо пептидов использовали равный объем 0,85%-го раствора NaCl. В качестве индуктора агрегации использовали АДФ в конечной концентрации 10^{-5} М или 0,5 МЕ/мл тромбина. Агрегацию тромбоцитов регистрировали на агрегометре и оценивали по величине светопропускания суспензии тромбоцитов, рассчитывая процент ингибирования или стимуляции (Hashimoto et al., 1987). Данные обрабатывали статистически.

Результаты и обсуждение

В первой серии экспериментов проводили сравнение роли вазопрессина и его аналога DGAVP

в качестве индукторов агрегации при добавлении к плазме крови человека. Эта часть работы была выполнена в детском консультативном гематологическом центре. Отбирали группы больных без нарушений тромбоцитарного гемостаза. У них были выполнены стандартные тесты по определению агрегации тромбоцитов под действием ристомидина и разных концентраций АДФ. Только при отсутствии нарушений этих показателей такие пробы крови включались в тестирование. Кроме того, сразу исключались из исследования больные с тромбоцитопениями.

Результаты этих исследований представлены в табл. 1, из которой видно, что почти по всем показателям агрегатограммы DGAVP оказывал более сильные эффекты, чем AVP, а по максимальной скорости агрегации и по показателям угла агрегации эти различия были статистически достоверны. Таким образом, как вазопрессин, так и его аналог DGAVP вызывали агрегацию тромбоцитов при добавлении к богатой плазме крови человека, но эффекты синтетического аналога были сильнее.

Таблица 1

Изменение параметров агрегации тромбоцитов в плазме крови человека под действием AVP и DGAVP в качестве индукторов агрегации

Показатели агрегации		Статистические показатели		
		$M \pm m$	n	P
Время агрегации, мин	AVP	$3,7 \pm 3,1$	7	$P > 0,1$
	DGAVP	$3,07 \pm 0,5$	8	
Степень агрегации, %	AVP	$43,3 \pm 6,8$	7	$P > 0,1$
	DGAVP	$54,5 \pm 8,5$	8	
Скорость агрегации, %/мин	AVP	$13,5 \pm 3,4$	7	$P > 0,1$
	DGAVP	$19,7 \pm 3,4$	8	
Максимальная скорость агрегации, %/мин	AVP	$117,0 \pm 16,8$	7	$P < 0,05$
	DGAVP	$171,7 \pm 14,3$	8	
Угол агрегации, градус	AVP	$12,4 \pm 3,1$	7	$P < 0,05$
	DGAVP	$17,9 \pm 2,8$	8	

Примечание. Достоверность рассчитана между показателями группы 1 (AVP) и группы 2 (DGAVP).

В следующей серии экспериментов изучали влияние AVP и DGAVP в качестве индукторов агрегации на богатую тромбоцитами плазму крови крыс. Известно, что при наличии общих закономерностей в регуляции гемостаза у животных и человека могут наблюдаться определенные отличия, в частности в агрегации тромбоцитов. Так, у крыс тромбоцитов значительно больше (их число составляет в среднем $400\text{--}450 \times 10^9/\text{л}$), но они более мелкие. При добавлении в качестве индуктора AVP в конечной концентрации 10^{-6} М максимальный про-

цент светопропускания составил 11,7%. При увеличении концентрации в 10 раз эффект пептида составил 14% (рис. 1).

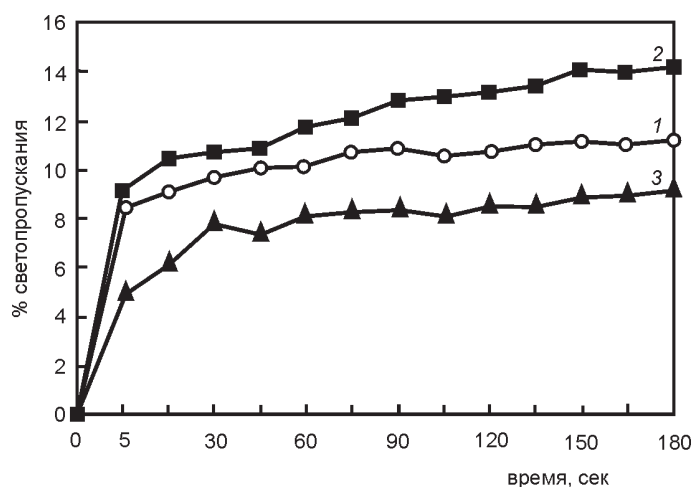


Рис. 1. Изменение процента светопропускания в богатой тромбоцитами плазме крови крыс под действием AVP в качестве индуктора агрегации: 1 — 10^{-6} М, 2 — 10^{-5} М, 3 — 0,85% NaCl

Аналог вазопрессина DGAVP в низкой концентрации не вызывал изменений агрегации в богатой тромбоцитами плазме крови крыс, и только при увеличении концентрации до 10^{-5} М процент светопропускания достигал 16,5% (рис. 2).

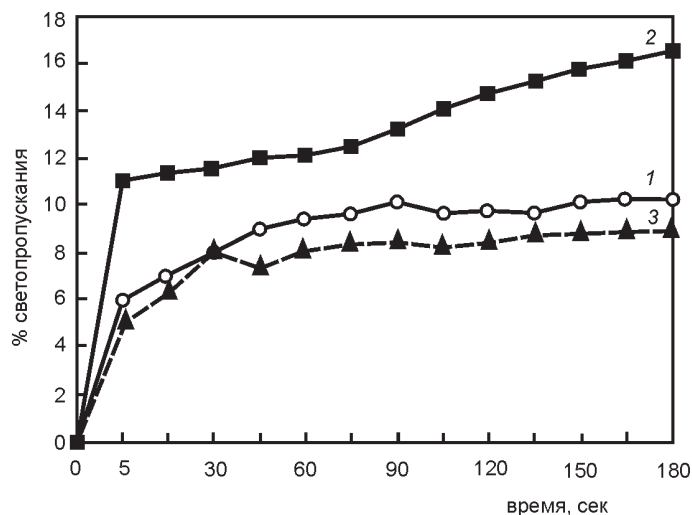


Рис. 2. Изменение процента светопропускания в богатой тромбоцитами плазме крови крыс под действием DGAVP в качестве индуктора агрегации: 1 — 10^{-6} М, 2 — 10^{-5} М, 3 — 0,85% NaCl

Таким образом, вазопрессин и DGAVP при добавлении к богатой тромбоцитами плазме крови крыс вызывали агрегацию тромбоцитов, но в меньшей степени, чем в плазме крови человека. Кроме того, в последнем случае DGAVP являлся значительно более сильным индуктором агрегации, чем вазопрессин, тогда как в плазме крови крыс их эффекты были практически одинаковыми.

Рассматривая действие вазопрессина и его синтетического аналога на агрегацию тромбоцитов можно видеть, что, являясь слабыми индукторами агрегации, они оказывают влияние на многие показатели тромбоцитарного гемостаза, что было показано ранее (Голубева и др., 1994). Поскольку до настоящего времени окончательно не установлен механизм синергичного действия различных агонистов агрегации тромбоцитов, мы попытались выяснить, какие эффекты будут оказывать вазопрессин и DGAVP на АДФ- или тромбин-стимулированную агрегацию кровяных пластинок.

Наши эксперименты показали, что как сам AVP, так и его аналог DGAVP не оказывали существенного влияния на агрегацию отмытых тромбоцитов под действием АДФ.

Однако если в качестве индуктора использовался тромбин, то при предварительном добавлении AVP и DGAVP в разных концентрациях к суспензии отмытых тромбоцитов наблюдалось усиление агрегации (табл. 2). Кроме того, индекс стимулирования тромбин-агрегации тромбоцитов при инкубации их с DGAVP был значительно больше, чем после инкубации с AVP.

Таким образом, результаты этой серии экспериментов показали, что AVP и DGAVP значительно изменяют агрегацию тромбоцитов, индуцированную тромбином, практически не влияя на агрегацию тромбоцитов под действием АДФ.

Ранее было показано, что оба пептида, с одной стороны, усиливают тромбоцитогенез, а с другой — оказывают определенное стимулирующее влияние на самые разные звенья тромбоцитарного гемостаза, усиливая активацию тромбоцитов, что отмечалось по увеличению активности тромбоцитарного фактора P4, и изменяя ристоцетин-ко-факторную

Таблица 2

Влияние AVP и DGAVP на агрегацию отмытых тромбоцитов крыс, индуцированную тромбином

Концентрации пептидов, М		Статистические показатели		
		% светопропускания	индекс стимулирования, %	P
10 ⁻⁵	AVP	25,8 ± 1,8	44,9	P < 0,01
	DGAVP	32,3 ± 2,0	81,5	P < 0,001
10 ⁻⁶	AVP	35,7 ± 1,3	100,6	P < 0,001
	DGAVP	42,5 ± 2,5	138,7	P < 0,001
5 × 10 ⁻⁷	AVP	22,3 ± 1,2	25,3	P < 0,01
	DGAVP	35,8 ± 2,6	101,1	P < 0,001
10 ⁻⁷	AVP	35,4 ± 1,9	98,8	P < 0,001
	DGAVP	21,5 ± 1,2	20,8	P < 0,05
15 мМ Трис-НСl буфер		17,8 ± 2,8	—	—

Примечание. Достоверность рассчитана по отношению к контролю (добавление к отмытым тромбоцитам раствора Трис-НСl буфера).

активность (Голубева и др., 1994). Возможно, что в данном случае наблюдается суммация эффектов тромбоцитов как на действие пептидов, так и на влияние самого тромбина. Таким образом, полифункциональность действия вазопрессина и его синтетического аналога DGAVP на агрегатное состояние крови может быть обусловлено как прямым взаимодействием пептидов с тромбоцитами, так и, возможно, синергичным их взаимодействием с другими агонистами. Однако до сих пор многие вопросы остаются невыясненными.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Бурова М.Б. 1990. Исследование роли окситоцина в регуляции системы гемостаза: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Саратов.

Голубева М.Г., Григорьева М.Е. 2000. Влияние нейрогипофизарных гормонов и их синтетических аналогов на агрегацию тромбоцитов // Изв. РАН. Сер. биол. № 5. 631—635.

Голубева М.Г., Калишевская Т.М., Григорьева М.Е. 1999. Вазопрессин, его аналоги и система гемостаза // Вестн. Моск. ун-та. Сер. Биология. № 4. 3—11.

Голубева М.Г., Калишевская Т.М., Григорьева М.Е., Воскресенская О.Г., Кауров О.А., Смирнова М.П. 1994. Влияние аналога вазопрессина дезглициламид-аргинил вазопрессина при интраназальном введении на процессы обучения и состояние системы гемостаза в эксперименте // Вестн. Моск. ун-та. Сер. Биология. № 4. 28—31.

Голубева М.Г., Калишевская Т.М., Соловьева М.Е. 1990. Влияние вазопрессина и его аналогов на свертывание крови у крыс // Физиол. журн. 33. № 3. 25—30.

Шитикова А.С. 2000. Тромбоцитарный гемостаз. СПб.

Anfossi G., Mularoni F., Massucco P. et al. 1991. Calcium-channel blocking agents verapamil and diltiazem are inhibitors of vasopressin — induced human platelet aggregation // Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 18. N 11. 767—773.

Filep J., Rosenkranz B. 1987. Mechanism of vasopressin induced platelet aggregation // Thromb. Res. 45. N 1. 7—16.

Grant P.J. 1993. Regulation of Haemostasis. The role of arginine vasopressin // Desmopressin in Bleeding Disorders. New York. P. 1—11.

Hashimoto S., Itoh Y., Kawaguchi A. et al. 1987. Supernate or thymosin fraction 5 on rabbit platelet aggregation and intracellular cyclic AMP levels // J. of Clinical Physiol. 133. 499—506.

Lachant N.A., Smith M.R., Xie Z.J. et al. 1995. Heterogeneity of the aggregation response of human platelets to arginine vasopressin // Am. J. Hematol. 49. N 1. 56—66.

Launay J., Vittel D., Vjdaud M. et al. 1987. V1a-vasopressin specific receptors on human platelet: potentiation by ADP and epinephrine and evidence for homologues down-regulation // *Thromb. Res.* **5**. N 4. 323—332.

Thibonnier M., Plesnicher C.I., Berrada K. et al. 2001. Role of human receptor COOH terminus in internalization and mitogenic signal transduction // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **281**. 81—92.

Поступила в редакцию
5.10.06

COMPARATIVE STUDYING INFLUENCE OF VASOPRESSIN AND ITS STRUCTURAL ANALOGUE DGAVP ON PLATELET AGGREGATION

M.G. Golubeva, M.E. Grigorjeva, S.A. Gorbunova

In experiments in vitro comparison of influence vasopressin and its analogue DGAVP on platelet aggregation is lead. It is shown, that peptides cause aggregation at addition both to the human, and rats platelet rich plasma. In human plasma DGAVP is much stronger inductor of aggregation, than vasopressin, whereas in rats plasma effects of peptides aren't different. Besides vasopressin and DGAVP considerably increase thrombin-induced aggregation of rats washed platelets, but do not influence on ADP-induced platelet aggregation. Thus, multifunctional action of these peptides on platelet aggregation can be caused both their direct interaction with platelet, and possible synergic action of peptides with others agonists.