

54. Song R, Zhou Z, Kim PK, Shapiro RA, Liu F, Ferran C, Choi AM, Otterbein LE. Carbon monoxide promotes Fas/CD95-induced apoptosis in Jurkat cells. *J Biol Chem* 2004;279:44327–44334. [PubMed: 15280387]
55. Stahl S.M. *Psychopharmacology of Antipsychotics*, ed. Martin Dunitz, London 1999, pp. 6-13.
56. Tang XD, Rong X, Reynolds MF, Garcia ML, Heinemann SM, Hoshi T. Haem can bind to and inhibit mammalian calcium-dependent Slo1 BK channels. *Nature* 2003;425:531–535. [PubMed:14523450]
57. Tulis DA. Salutary properties of YC-1 in the cardiovascular and hematological systems. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents* 2004;2:343–59. [PubMed: 15320784]
58. Vreman HJ, Stevenson DH. Heme oxygenase activity as measured by carbon monoxide production. *Anal Biochem* 1988; 168: 31.38.
59. Williams SE, Wootton P, Mason HS, Bould J, Iles DE, Riccardi D, Peers C, Kemp PJ. Hemoxygenase-2 is an oxygen sensor for a calcium-sensitive potassium channel. *Science* 2004;306:2093–2097. [PubMed: 15528406]
60. Zhang F, Kaide J, Wei Y, Jiang H, Yu C, Balazy M, Abraham NG, Wang W, Nasjletti A. Carbon monoxide produced by isolated arterioles attenuates pressure-induced vasoconstriction. *Am J Physiol* 2001;281:H350–H358.
61. Zhang X, Shan P, Otterbein LE, Alam J, Flavell RA, Davis RJ, Choi AM, Lee PJ. Carbon monoxide inhibition of apoptosis during ischemia-reperfusion lung injury is dependent on the p38 mitogenactivated protein kinase pathway and involves caspase 3. *J Biol Chem* 2003;278:1248–1258. [PubMed: 12399465]

ATEROTROMBOZA

Ala Ambros, Leonid Lisii, Svetlana Bobcov, Svetlana Protopop, Radu Tabac
Catedra Biochimie și Biochimie clinică USMF „Nicolae Testemițanu”

Summary

Atherothrombosis

There are a lot of modifications in arterial wall in atherosclerosis; the most important is the phenomenon of thrombosis. The formation of thrombus is determined by the action of two groups of factors: the first- homeostatic independent factors (superficial erosion and rupture of fibrous cap), the second group-modifications in homeostasis: endothelial dysfunction, modifications in fibrinolysis, decrease of natural inhibitors, increase of some coagulation factors, platelets hyperactivity. Evolution of mural thrombus presents a risk for cerebral accidents, myocardial infarction, peripheral manifestations of ischemia.

Rezumat

În patologia aterosclerotică sunt înregistrate un șir de modificări locale ale peretelui vascular, cea mai importantă fiind formarea trombului mural. Instalarea lui are loc sub acțiunea factorilor homeostatici independenți - eroziunea și fisurarea plăcii, expunerea componentelor înalt trombogene cât și a modificărilor homeostaziei locale- disfuncția endotelială și a sistemului fibrinolic, scăderea ponderii inhibitorilor naturali, creșterea concentrației unor factori ai coagulării, hiperactivitate trombocitară. Evoluția trombului se manifestă prin accidente cerebrale, infarct miocardic, ischemie periferică dar poate decurge și asimptomatic.

Obiectivul

Elucidarea mecanismului trombotic în patologia clasică și a factorilor implicați în modificarea homeostaziei sanguine.

Materiale și metode

Studiul prezent este realizat în baza analizei unor publicații în domeniu. Metoda de lucru constă în cercetarea, procesarea și studiul comparativ al materialelor utilizate.

Mecanismul apariției trombului în patologia aterosclerotică implica combinarea a două fenomene ce condiționează formarea și stabilizarea lui:

- 1) Acțiunea factorilor fizici: ruptura plăcii, curgere turbulentă, adeziune la substrat;
- 2) Modificarea parametrilor homeostatici: activarea factorilor procoagulanți, dereglarea sistemului de fibrinoliza, inactivarea inhibitorilor etc.

1. Instalarea homeostatic-independentă a trombului

În majoritatea cazurilor, originea trombului este de natură mecanică - fisurarea sau eroziunea plăcii la nivelul capului fibros. În rezultat discontinuității endoteliale, are loc contactarea componentelor sanguine cu elemente înalt trombogene: centrul necrotic, factor tisular, fibre de collagen, suprafețe cristaline. Activarea trombocitelor determină constituirea trombului mural. Factorii incriminați în ruptura plăcii sunt: stare hipertensivă, prevalența lipidică a plăcii → scăderea rezistenței capsulei, apoptoza unor celule (epiteliale, musculare) precum și activitatea metaloproteazică a macrofagelor - degradarea matricei extracelulare → fragilizarea capsulei (1,19).

La dezvoltarea trombului fixat de placa ruptă contribuie următorii factori: *locali reologici; legați de substrat; locali vasoconstrictori; sistemici* (7,9,14,22).

- Factorii locali reologici

Prezența stenozei la nivelul plăcii determină modificări cantitative și calitative ale afluxului sanguin. Astfel, la nivelul stenozei curentul sanguin prezintă accelerare înainte și deaccelerare după stenoza, fapt ce determină separarea în diferite curenți determinând fenomenul de "forfecare" și recircularea unor zone din poststenoza. În rezultat, are loc intensificarea interacțiunii reciproce a trombocitelor, la fel și cu peretele vascular. Trombii astfel constituiți vor avea următoarea configurație:

- capul alb (bogat în trombocite)
- corpul roșu (bogat în fibrină și hematii).

- Factorii legați de substrat

Componentele mediei vasculare prezintă o activitate trombogenică înaltă datorată prezenței fibrelor de collagen și în special centrului "core", bogat în lipide. Acestea constituie premiza dezvoltării și fixării aici a trombului.

- Factori locali vasoconstrictori

Evoluția plăcii aterosclerotice este însoțită de modificarea tonusului vascular, prin instalarea vasospasmului determinat de concentrații înalte de vasoconstrictori. Vasoconstricția locală va crea condiții de turbulență, rata înaltă a forțelor de foarfecare, care vor contribui la activarea locală a celulelor și tromboză. Anumite substanțe vasoconstrictoare (E.T.-1) sunt și trombogenice, pe când vasorelaxantele (EDRF, PGI-2) sunt și inhibitori ai agregării trombocitare. Tromboxan A-2 (factor al agregării plachetare) eliberat de trombocite are un efect puternic vasoconstrictor.

- Factorii sistemici

Statutul procoagulant este determinat inclusiv de prezența cantităților mărite de epinefrină. Epinefrina este un activator trombocitar indirect, în asociere cu alți factori. Incidența infarctului miocardic acut, a morții subite și a accidentelor vasculare cerebrale arată o variație circadiană cu creștere importantă în primele ore ale dimineții, când predomină *stimularea simpatoadrenergică*.

2. Modificări homeostatice

Eroziunea plăcii și prezentarea substratului tromboactiv evoluează spre formarea trombului doar în condițiile unei stări procoagulante și a unui sistem fibrinolic defect. Statusul normal fiziologic litic pozitiv împiedică dezvoltarea formațiunii trombotice.(19)

Tromboza este rezultatul apariției mai multor modificări în homeostazia locală:

- a) disfuncția endotelială,
- b) modificări ale sistemului fibrinolic,
- c) creșterea conținutului unor factori ai coagulării,
- d) scăderea inhibitorilor naturali,
- e) hiperactivitatea trombocitară

a. Disfuncția endotelială este desemnată drept "răspunsul la injurie" al endoteliului, având drept consecință pierderea totală sau parțială a rolului deținut în menținerea echilibrului sanguin. Manifestările primare ale acestui fenomen sunt pierderea învelișului proteoglicanic extern, ce împiedică adeziunea trombocitelor la peretele vascular. Secundar se remarcă alterarea sistemului de sinteză al celulei.

Manifestările disfuncției endoteliale:

-
- ↓ eliberare PG₂
 - ↓ ON ăzetnis
 - defecte ale trombomodulinei
 - ↓ sau ↑ a activatorului tisular al plasminogenului(t-PA)
 - ↑ producere/eliberare PAI
 - ↑ sinteza/ eliberare endotelină
 - ↑ producere TF
 - ↑ vWF
 - ↑ sinteza PAF

▪ **Metabolismul Oxidului Nitric**

Cunoscut deasemeni sub denumirea de *endothelium derived relaxing factor* (EDRF), reprezintă un mediator de importanță cardinală în reglarea tonusului vascular. NO este un gaz lipofil sintetizat în celule endoteliale, cu o perioadă scurtă de înjumătățire, cu rol în reglarea activității plachetare, musculare netede și endoteliale.

Oxidului Nitric în homeostaza cardiovasculară are rol:

- *vasodilatator* - scade rezistența periferică relaxând musculatura netedă;
- *antiproliferativ*- împiedică remodelarea vasculară - inhibă proliferarea și migrarea celulelor musculaturii netede;
- *antiinflamator*-inhibă adghezia și migrarea monocitelor;
- *antiagregant*- inhibă adhezia și agregarea trombocitelor;
- *antiaterogen*-acțiune antioxidantă (5,28,20 ,4,13).

NO sintaza (NOS) reprezintă o enzima NADPH dependentă, utilizează un substrat L-Argina, producând NO și citrulină. Enzima este activă în stare fosforilată, în prezența ionilor Ca²⁺ și a calmodulinei. În patologia aterosclerotică enzima este inhibată de prezența unor oxizilozofosfatidilcolina (LPC) și 7-oxocolesterol - compuși identificați în componența LDL-ului oxidat. Ambii compuși inhibă fosforilarea enzimei în poziția SER¹¹⁷⁷. LPC blochează cascada de fosforilare indusă de acțiunea histaminei printr-un mecanism Ca²⁺ dependent. 7-oxocolesterolul inhibă reacțiile de fosforilare a *Phosfoinositide kinase* și *Extracelular regulated kinase* (cascada histaminică) inhibând astfel activitatea NO sintazei și fosfolipaza A₂ citosolică (cPLA2 implicată în sinteza de acid arahidonic-precursor al prostacilinei) [18,8] (fig.1).

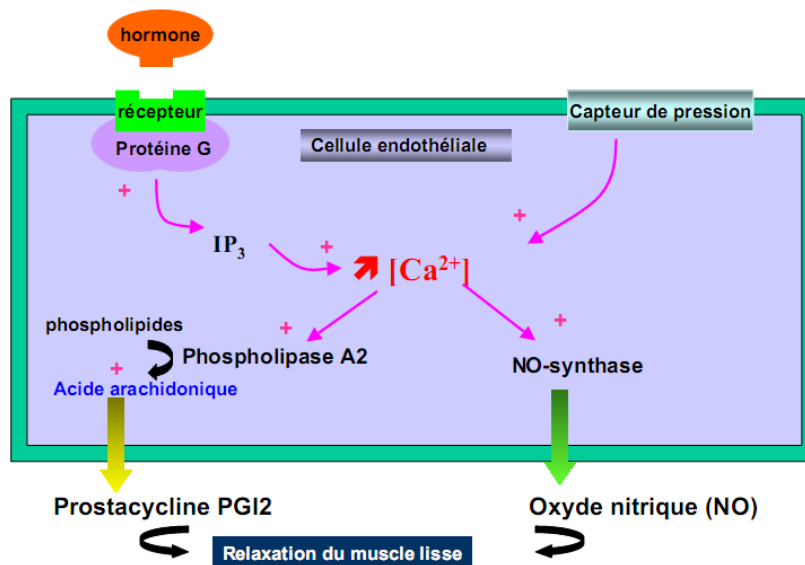


Fig 1. Activitatea Ca^{2+} dependentă a NO sintazei și cPLA2

Activitatea antiagregantă a oxidului nitric se manifesta prin blocarea eliberării intraplachetare a fosfolipidelor în sinteza Tromboxanului A_2 (implicat în adeziunea plachetară) totodată NO activează prin intermediul cGMP protein kinaza C care determina activarea protein kinazei (pk47) plachetare → activarea inositol trifosfat 5-monoesterazei, astfel diminuând concentrația de inositol 1,4,5-trifosfat, blocarea eliberării de Ca^{2+} cu inhibarea activării plachetare (4).

- **Trombomodulina** (TM) este o glicoproteină transmembranară a celulei endoteliale, compusa din 6 domenii *epidermal growth factor* (EGF)- like, o secvență Ser/Trh și un scurt fragment citoplasmatic. Trombomodulina reprezintă un receptor de înaltă afinitate pentru trombină. La fixarea acesteia pe domeniile EGF 5-6 are loc formarea complexului trombin-trombomodulină cu rol în activarea *Proteinei C*, respectiv descomunerea proteolitică a factorilor coagulării VIII, VI, V. În rezultatul afectării endoteliale are loc scăderea capacității de formare a complexelor trombin-trombomodulină [17].

- Creșterea disponibilității de **Factor Tisular** (FT) - glicoproteină membranară exprimată pe suprafața endoteliocitelor (29) - determină interacțiunea cu FVII plasmatic, respectiv activarea căii extrinseci de coagularea cu activarea factorului X: $X_{in} \rightarrow X_{a(15,19)}$ totodată, are loc activarea FIX din calea intrinsecă de coagulare și constituirea microtrombulului.

Endoteliul vascular asigură secreția inhibitorului pentru **TF-TF Pathway Inhibitor**. Acesta inhibă coagularea prin inactivarea FT. Însuși TFPI este inhibat (60-70%) de prezența în sânge a lipoproteinelor. Mărirea concentrației de lipoproteine, determină scăderea conținutului de TFPI liber, favorizând fenomenul de coagulare.

- **PAF** (factorul activator al plachetelor) este o alchil-2-acetil-3-f-glicerol f-inozitid colină sintetizată în endoteliu, cu rol în stimularea secreției, agregării trombocitare precum și adeziunii neutrofilelor la stratul endotelial. În ateroscleroză, stimularea endoteliocitelor cu trombină (deja existentă), bradikinină, histamină, leucotriene măresc rata secreției acestui factor (29, 25).

- **Factorul von Willebrand** (vWF) element important al statutului protrombotic - mediază adeziunea trombocitelor la stratul subendotelial precum și agregarea plachetară. Prezența focarului inflamator este însoțită de secreția stimulilor inflamatori locali IL-1, TNF- α , lipopolizaharide. Celulele endoteliale pot secreta vWF cu rol protrombotic sub acțiunea stimulului inflamator, sau a LDL-ului oxidat (25).

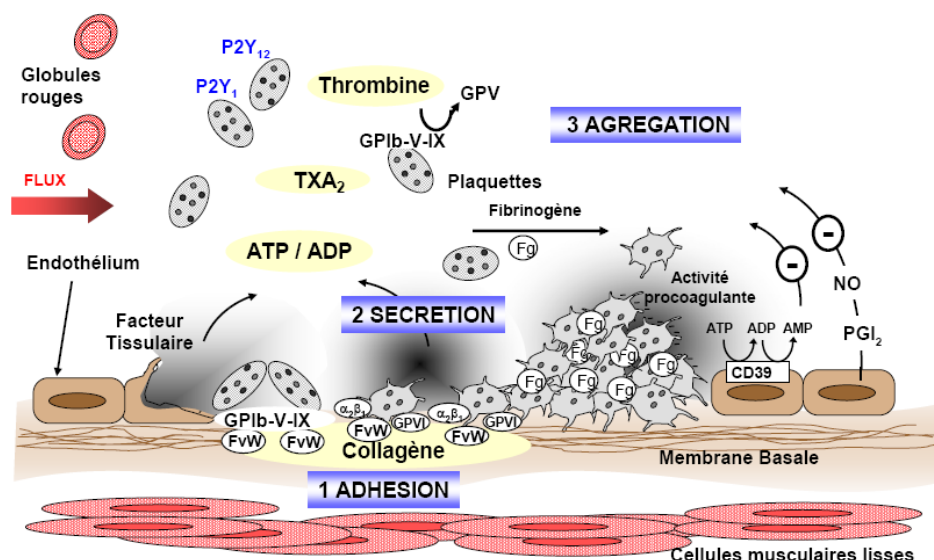


Fig 2. Manifestări ale disfuncției endoteliale

b. Modificările sistemului fibrinolitic-activitatea sistemului fibrinolitic în ateroscleroză prezintă diferite modificări, care pot evolua spre generarea statusului protrombotic și eventual spre formarea trombului.

Convertirea plasminogenului în plasmină este asigurată de acțiunea a doi componente plasmatici: activatorul tisular al plasminogenului (tPA) și urokinaza specifică (uPA). Activatorul major constituie t-PA- serinprotează sintetizată în celulele endoteliale, 50kDA, perioada de înjumătățire 5'(17,16). În plasmă 80% t-PA formează un complex cu inhibitorul său PAI-1, fiind eliberat. PAI-1 este în mod fiziologic secretat de către celulele hepatice, celulele musculare netede ale vaselor, adipocite și trombocite. În condiții patologice celulele endoteliale pot să producă PAI-1, în condițiile activării de către citokine inflamatorii, TNF(25). Totodată este menționată capacitatea adipocitelor (țesutul adipos visceral) de a secreta PAI-1(11).

Creșterea activității TAFI plasmatică (inhibitorul fibrinolizei activat de trombină)

-proteină serică sintetizată în hepatocit, identificată drept procarboxipeptidaza U / R. Proteina inactivă interacționează cu complexe trombin-trombomodulin transformându-se în carboxipeptidaza B. Activitatea antifibrinolitice se manifestă prin eliminarea / dezactivarea situsurilor de pe molecula de fibrină ce permit recunoașterea acesteia de către plasmină. Rolul inhibitorului în patologia ateromatoasă se manifestă prin inhibarea fibrinolizei sub influența concentrației mărite de trombină(16)

c.d. Aplicarea concentrației unor factori de coagulare și scăderea inhibitorilor naturali

Este remarcată creșterea valorii unor factori de coagulare ca: fibrinogenul, FVII, FVIII, FIX, FX, aflați în stare activă în spațiul plasmatic. Mediatorul responsabil de inducție este IL-6- desemnat drept factor de risc în ateroscleroză. IL-6 este produsă preponderent în țesutul adipos, argumentând prezența unui sindrom inflamator metabolic. Majorarea concentrației de IL-6 este proporțională cu gradul de obezitate. Mecanismul de acțiune se manifestă prin stimularea indirectă a hepatocitelor și secreția proteinelor de fază acută- fibrinogen, haptoglobine, proteina C reactivă, a moleculelor de adeziune și factorilor sus enumerați (28,29,11). Concentrații corespunzătoare ale IL-1, IL-6, IL-10 și CRP (*C reactiv protein*) sunt considerate factori de instabilitate a plăcii, conducând spre fisurarea ateromului și apariția manifestărilor cardiovasculare acute(2,24, 27, 26, 21).

De menționat că anticoagulantul natural de ordin major este *heparina*. În patologie se înregistrează creșterea rezistenței la heparină (secreție trombocitară de PF4 antiheparinic), totodată scăderea nivelului ei plasmatic. Disfuncția endotelială prezentă în anumite porțiuni ale sistemului vascular are drept consecință pierderea stratului non-adeziv de *heparan-sulfat* (28,29).

e. Hiperactivitatea trombocitară

Agregarea plachetară este evenimentul-cheie în constituirea trombului independent de origine; premiza aterosclerotică comportă modificări importante la nivelul acestui sistem:

Modificări plachetare cardinale sunt:

- creșterea adezivității cu/sau fără defecte moleculare;
- hiperagregare cu mediatori agreganți;
- agregare ocazională;
- hipersecreție;
- amplificarea ponderii -antiplasminei plachetare;
- scăderea antitrombinei III
- diminuarea concentrației gama glutamil transferzei;
- eliberare accelerată de PGF₂, PGE, TXA₂;
- defect de transport al glucozei prin membrană;
- alterarea fosfolipidelor membranare;
- scurtarea duratei de viață.

Stresul oxidativ, element caracteristic al patologiei, determină procese oxidative ale LDL plasmatice generând LDLoxidat, concomitent sub acțiunea 12-lipoxygenazei are loc transformarea acidului arahidonic(AA) într-un derivat activ 12-hidroperoxi –eicosatetraenoic (HpETE). Acești radicali sunt cauza activării cPLA₂, prin fosforilarea proteinei p38MAPK (componentă a sistemului de eliberare a AA din fosfolipidele membranare). Concentrațiile înalte de AA evoluează în direcția formării unui metabolit procoagulant TxA₂.(6).

Evoluția trombului

Importanța procesului trombotic și a consecințelor sale este variabilă. O deosebită atenție este acordată formării trombului luminal ocluziv, ce se manifestă simptomatic prin infarct de miocard, accidente cerebrale, ischemie periferică. Trombii murali neocluzivi sunt incorporați în interiorul plăcii, contribuind la dezvoltarea ei, sau sunt antrenați în procese de embolizare generând necroze în țesuturile distale(1).

Concluzii

Formarea trombului este un fenomen multifactorial; statusul procoagulant este generat de modificări multiple ale parametrilor homeostatici, premiza instalării structurii trombotice fiind reprezentată de fenomenul fizic de ruptură a plăcii. Este de menționat creșterea concentrației unor factori ai coagulării și a mediatorilor inflamatori. Un rol deosebit în aterotromboză îl are defectul sintezei de NO, întrucât acesta deține roluri cheie în inhibiția proceselor de agregare, inflamție, proliferare și vasoconstricție. Elementul responsabil în patologie este LDL-ul modificat, care prin acțiuni defectuoase asupra endoteliului determină pierderea stratului non-adeziv protector, creșterea concentrației de procoagulanți și inhibitori ai fibrinolizei. Realizarea complexă a fenomenelor menționate evoluează spre modificări ireversibile ale vaselor, apariția accidentelor cerebrale, infarct miocardic.

Bibliografie

- 1)Bauters Christophe: Physiopatologie de l'Atherosclerose; Hôpital Cardiologique, Lille, 2003,1-14.
- 2) Caligiuri Giuseppina: Rôle de l'immunité dans l'athérosclérose et dans les syndromes coronariens aigus, 2004, vol nr.2 175-179.
- 3) Cavelier Clara: Apolipoprotein A1, transcytosis through aortic endothelial cells, Dissertation for the degree of Doctor of Sciences,2006, 5-10.
- 4) Chudik Anita: Nitric oxide, its role and molecular mechanisms of action in blood platelets and the influence and side-effects of the exogenous NO inhalation therapy on hemostasis; Review Article ,1999, 794-798.

- 5) Cooke John: Flow, NO, and atherogenesis; University School of Medicine, Stanford, CA, 2003 , vol.3, 769.
- 6) Coulon Laurent: L'effet d'un hydroxiperoxy lipidique et des LDL oxides, sur les enzymes implique dans la liberation du acide arachidonic dans les phospholipides membranaires, 2004, 14-73.
- 7) Dahmanin Omar, Belcaid Amal, Ouafa el Azouzi, Dr Hayat el Hami : Mecanisme de l'atherosclerose,2005, 108-110.
- 8) David-Duflho Monique, Elisabeth Millanvoye-Van Brussel, Francine Rendu: Endothelial trombomodulin induces Ca^{2+} signals and NO synthesis through epidermal growth factor receptor kinase and calmodulin kinase, 2005, 1-10.
- 9) Dobre Gratiela:Ateroscleroza și regresia plăcii de aterom, Universitatea Oradea, 2003,1-4
- 10) Duriez Patrick: Metabolic Syndrome, type II Diabetes and Atherosclerosis; Institut Pasteur, Lille, France, 2006 .1-4.
- 11) Hermans Cedric :Sindrom metabolic et Hypercoagulabilite, 2006, 111-118
Introducere.
- 12) Homeister Jon: The Cholesterol Hypothesis of Atherogenesis from a Translational Research Viewpoint, 2008, 9-34.
- 13) Filimon Silvia: Disfunctia endoteliala si glicometabolica la bolnavii cu infarct miocardic vechi, sub infkuenta tratamentului hipolipemiant; Teză de doctor în medicină, 2006, 4-6, 10-13
- 14) Gherasim L.: Ateroscleroza; Medicină Internă. Boli cardiovasculare si metabolice,2004, vol 2 p.591,544.
- 15) Gregory Y. H. Lip, Andrew D. Blann: Thrombogenesis and fibrinolysis in acute coronary syndromes, Important facets of a prothrombotic or hypercoagulable state, 2003, 643-649.
- 16) Léautaud P, Hernando C: Fibrinolyse-thrombose, 2001, 1-7.
- 17) Lisii Leonid: Hemostaza si fibrinoliza; Biochimie Medicală 569.
- 18) Millanovoie-van Brussel, Elisabeth,Annie Brunet, Val'erie Deckert, Francine Rendu: Lysophosphatidylcholine and 7-oxocholesterol modulate Ca^{2+} signals and inhibit the phosphorylation of endothelial NO synthase and cytosolic phospholipase; 2004, 533-539.
- 19) Mojca Stegnar: Atherothrombosis-Pathogenesis of cardiovascular disease; 2001,Vol 13 No 2, 111- 116.
- 20) Nikolaus Marx: Endothelial dysfunction and cardiovascular disease – the lull before the storm, Ulm, Germany; 2007,82-83.
- 21) Rousseaux J : Biochimie metabolique, notions de pathologie lipidique; Cours 2-version,2003, 1-37.
- 22) Serban C. : Evolitivitatea leziunilor aterosclerotice,2008, 1- 11.
Actualitati.
- 23) Strauss Williams, Iree M. :Molecular characterisation of atherosclerosis, 2007, 1-7.
- 24) Subodh Verma : Aterosclerose, inflamation et eveniments cliniques, 2004, 5-11.
- 25) Știrban Alin, Monica Negrean, Simona Petrule: Disfuncția endotelială – Legătura între insulinorezistență, diabet zaharat și Ateroscleroză; 2004, 1-12.
- 26) Tarek Bouhali: L'adiponectine un modulateur du risque de maladie coronarienne; 2006, 1-17.
- 27) Tedgui A.et Z. Mallat :Inflamation et Atherosclerose, 2004, 11-17.
- 28) Ulutin Orhan: The patogenesis and laboratory findings from laboratory standpoint; Istanbul University,2000, 45-48.
- 29) Ulutin Orhan N: The Relationship of Haemostatic System to the Vessel Wall, Thromboembolism, 2002; 7-29.