

6. Доссон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика. М., 1991. С. 193, 466.

7. Hundle B.S., Beyer P., Kleinig H. et al. // Photochem Photobiol. 1991. Vol. 54. P. 89.

Поступила в редакцию 04.02.2004.

Юлия Валерьевна Селезнева – младший научный сотрудник НИЛ молекулярной генетики бактерий БГУ.

Анатолий Николаевич Евтушенко – доктор биологических наук, доцент кафедры молекулярной биологии.

Владимир Анатольевич Прокулевич – доктор биологических наук, профессор кафедры микробиологии.

УДК 612.111.7:546.17

Е.В. ШАМОВА, А.Б. САМАЛЬ

НО-ИНДУЦИРОВАННАЯ ДЕЗАГРЕГАЦИЯ ТРОМБОЦИТОВ И УМЕНЬШЕНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ

It was shown, that NO induced desaggregation only during the first steps of platelet aggregation. At the same time NO decreased the cytoplasmic calcium concentration independently on the moment of its addition. We proposed, that NO-Induced calcium decrease was connected with the process of aggregation but not desaggregation of platelets.

Оксид азота (NO) является важным биологическим медиатором, который вовлечен во множество физиологических процессов, в том числе и гемостаз. В последнем случае он играет главную роль благодаря регуляции функциональной активности тромбоцитов. В настоящее время известно несколько механизмов, посредством которых NO ингибирует агрегацию клеток. Основной механизм связан с влиянием на внутриклеточный уровень свободных ионов Ca^{2+} . Известно, что в результате активации клеток происходит высвобождение ионов Ca^{2+} из внутриклеточных депо, что инициирует дальнейший рост концентрации цитозольного кальция за счет входа через ионные каналы (депозависимый вход ионов Ca^{2+}) [1, 2]. NO-индуцированная активация растворимой гуанилатциклазы и образование цГМФ ингибируют этот процесс двумя путями: первый – посредством цГМФ-зависимых протеинкиназ G (ПКГ), которые инактивируют инозитол-1,4,5-трифосфатрегулируемые каналы и блокируют высвобождение кальция из депо [2]; второй – через ПКГ-независимый механизм, связанный с цГМФ опосредованным ингибированием полимеризации актина и блокированием кальциевых каналов плазматической мембраны [2]. NO также уменьшает агрегацию тромбоцитов за счет инактивации фосфоинозитол-3-киназы (ФИ3-киназа) [3], которая играет важную роль в реорганизации цитоскелета и активации гликопротеинового комплекса GPIIb/IIIa, связывающего фибриноген, что необходимо для образования и стабилизации тромбоцитарных агрегатов [4–6].

Известно также, что NO может регулировать работу Ca^{2+} -АТФаз, в частности активирует Ca^{2+} -АТФазу плазматической мембраны (ПМ) через цГМФ/ПКГ-зависимый механизм [2]. NO также способствует ускорению работы Ca^{2+} -АТФазы эндоплазматического ретикулума (ЭР), причем через цГМФ-зависимый и цГМФ-независимый пути [7]. Однако функциональная значимость такой регуляции остается не ясной. В работах [8, 9] было показано, что соединения, вызывающие дезагрегацию тромбоцитов, активируют системы, удаляющие ионы Ca^{2+} из их цитоплазмы. Мы предположили, что NO может проявлять дезагрегационную способность и вызывать распад тромбоцитарных агрегатов. Интерес представляло исследование взаимосвязи действия NO на активированные тромбоциты и NO-индуцированного изменения цитоплазматического кальция.

Материал и методика

Свежую донорскую кровь, стабилизированную глицеролом, брали на Республиканской станции переливания крови. Обогащенную тромбоцитами плазму (ОТП) получали центрифугированием крови при 200 g в течение 10 мин при комнатной температуре. Количество тромбоцитов в ОТП довели до $2,5 \cdot 10^8$ кп/мл разбавлением содержащим ионы Ca^{2+} фосфатно-солевым буфером (ФСБ): 137 mM NaCl, 2,7 – KCl, 10 – $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, 1 mM CaCl_2 , pH 7,35.

Агрегацию и дезагрегацию тромбоцитов изучали с помощью компьютеризированного анализатора AP2110 Научно-производственного центра «СОЛАР» (Минск, Беларусь). При исследовании агрегации тромбоцитов в кювету агрегометра вносили 400 мкл ОТП, инкубировали при 37 °C и перемешивали в течение 2 мин, затем добавляли агрегант АДФ. Процесс агрегации и дезагрегации непрерывно регистрировался как изменение светопропускания клеточной суспензии. Дезагрегацию тромбоцитов вызывали добавлением нитропруссид натрия (НП), который использовали в качестве донора NO. Для характеристики процесса дезагрегации ввели параметр $\alpha_{\text{нп}}$, который рассчитывали следующим образом:

$$\frac{T_{\text{max}} - T_9}{T_{\text{max}}} \cdot 100 \%, \text{ где } T_{\text{max}} - \text{максимальная величина светопропускания}$$

АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов в отсутствие действия НП и T_9 – величина светопропускания через 9 мин после добавления НП.

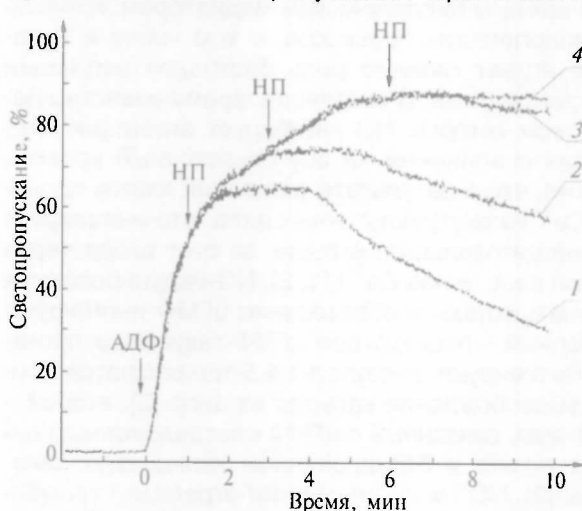


Рис. 1. Влияние НП (0,5 mM) на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов в зависимости от времени внесения: 1 – через 1 мин, 2 – 3, 3 – 6 мин после АДФ (5 мкМ), 4 – контроль (необратимая агрегация тромбоцитов, вызванная АДФ)

Концентрацию цитоплазматического кальция в тромбоцитах определяли флуоресцентным зондом фура-2АМ по методике [10, 11]. В 2 мл ОТП добавляли 8 мкл 0,5 mM фуры-2АМ и инкубировали в течение 45 мин при 37 °C. Нагруженные клетки отмывали от инкубационной среды, суспензировали в HEPES-буфере (145 mM NaCl, 10 – HEPES, 10 – D-глюкоза, 5 – KCl, 1 mM MgSO_4 , pH 7,45), не содержащем CaCl_2 и сохраняли в качестве исходной суспензии при комнатной температуре. Для измерения внутриклеточной концентрации ионов кальция в кювету спектрофлуориметра вносили 1,2 мл HEPES-буфера, содержащего 1 mM CaCl_2 , и 50 мкл исходной суспензии клеток. Измерение флуоресценции было проведено при 37 °C с использованием спектрофлуориметра LSF1211A Научно-производственного центра «СОЛАР». Изменение концентрации цитозольного Ca^{2+} оценивали по изменению отношения интенсивностей флуоресценции F_{340}/F_{380} , регистрируемых на 510 нм при возбуждении длинами волн 340 и 380 нм.

Результаты и их обсуждение

Агрегацию тромбоцитов, при которой образуются стабильные клеточные агрегаты, индуцировали 5 мкМ АДФ (рис. 1, кривая 1). Дезагрегационный эффект НП изучали на разных стадиях необратимой агрегации, добавляя его через 1, 3 и 6 мин после действия АДФ. На рис. 1 видно, что в при-

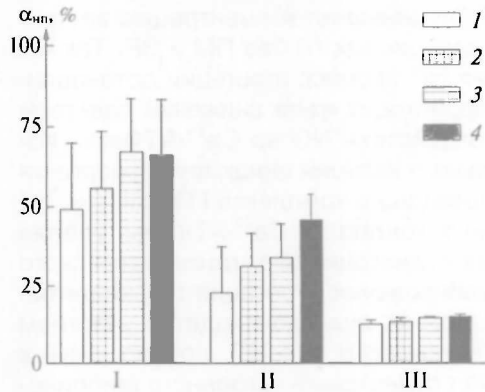


Рис. 2. Зависимость дезагрегационного эффекта НП от концентрации и времени добавления после АДФ:
 I – через 1 мин, II – 3, III – 6 мин; 1 – 0,15 мМ; 2 – 0,30; 3 – 0,50; 4 – 1,00 мМ

сутствии НП индуцируется дезагрегация тромбоцитов, причем она происходит не сразу после добавления НП, а через некоторое время. Наибольший дезагрегационный эффект НП достигался при добавлении через 1 мин после АДФ. Эти данные свидетельствуют о том, что НП способен индуцировать дезагрегацию на начальных этапах активации клеток и практически не влияет на тромбоцитарные агрегаты, образованные на более поздних стадиях. Такой вывод подтверждается исследованием НП-индуцированной дезагрегации в зависимости от концентрации (рис. 2): дезагрегационный

эффект НП наблюдался в узком интервале концентраций – от 0,15 до 0,5 мМ, при увеличении концентрации в 2 раза оставался на том же уровне.

На рис. 3 показана кинетика изменения концентрации ионов внутриклеточного кальция при действии АДФ и влияние НП, добавленного до и после АДФ. НП в концентрации 150 мкМ практически полностью ингибировал кальциевый ответ тромбоцитов на АДФ (рис. 3 а), а добавленный в разное время после АДФ снижал уровень ионов Ca^{2+} в цитоплазме независимо от момента его внесения (см. рис. 3 б, в, г).

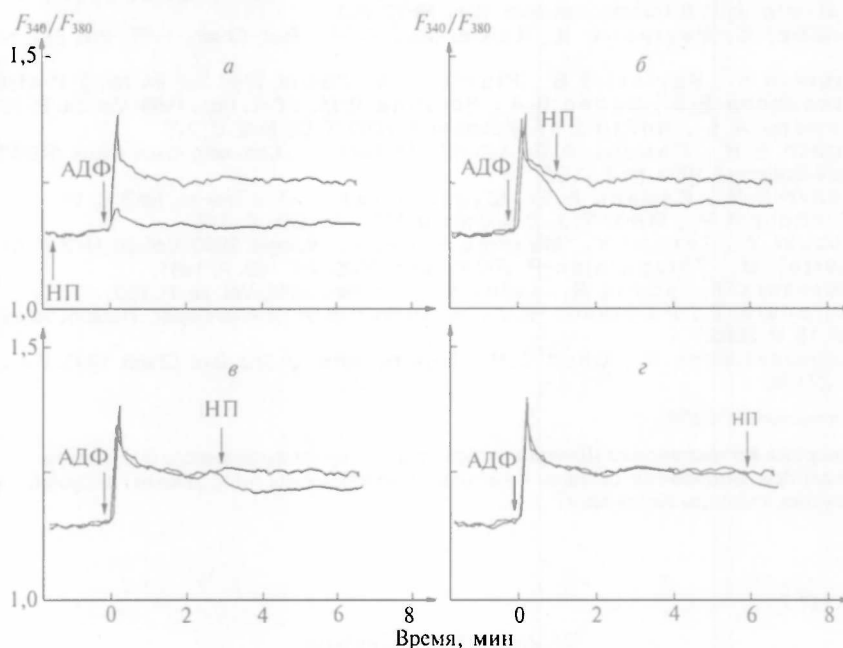


Рис. 3. НП-индуцированное уменьшение внутриклеточных ионов кальция, мобилизованных АДФ:
 а – НП (150 мкМ) добавлен до АДФ (40 мкМ); б–г – после АДФ через 1 (б), 3 (в) и 6 мин (г)

Таким образом, нами установлено, что НП вызывает дезагрегацию тромбоцитов, которая начинается через некоторое время, тогда как снижение кальция, индуцированное НП, происходит сразу же после его добавления. Результаты, свидетельствующие о NO-индуцированном уменьшении внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} , хорошо согласуются с имеющимися

в литературе данными [2, 7]. По [2, 7] NO уменьшает концентрацию внутриклеточного кальция за счет регуляции кальциевых АТФаз ПМ и ЭР. Так как в наших экспериментах при добавлении НП процесс агрегации останавливался, можно предположить, что это происходит из-за снижения содержания ионов кальция в клетке за счет воздействия NO на Ca^{2+} -АТФазы. Известно, что повышение уровня цитозольного кальция инициирует реорганизацию цитоскелета, активацию гликопротеидного комплекса $GP IIb/IIIa$ и, таким образом, образование межклеточных контактов. Ca^{2+} -АТФазы, удаляя цитоплазматический кальций, вызывают диссоциацию гликопротеидного комплекса $GP IIb/IIIa$, что приводит к ингибированию агрегации тромбоцитов. Что же касается дезагрегации, то, возможно, она происходит с участием других механизмов. В работе [12] было показано, что НП, добавленный к активированным тромбоцитам, уменьшал содержание связанного фибриногена. Можно предположить, что дезагрегация осуществляется за счет разрушения межклеточных контактов, образованных связыванием фибриногена с $GP IIb/IIIa$. Также известно, что в результате активации клеток происходит высвобождение из α -гранул P -селектина, который, связываясь с лигандом на мембране, способствует стабилизации тромбоцитарных агрегатов [13]. Ранее было показано, что за счет инактивации ПКС NO ингибирует экспрессию P -селектина на мембране клетки [14–16], поэтому дезагрегационный эффект НП может быть обусловлен ингибированием образования межклеточных контактов посредством P -селектинов.

1. Rosado J.A., Brownlow S.L., Sage S.O. // J. Biol. Chem. 2002. Vol. 277. № 44. P. 42157.
2. Rosado J.A., Porras T., Conde M. // Ibid. 2001. Vol. 276. № 19. P. 15666.
3. Pigazzi A., Heydrick S., Folli F. // Ibid. 1999. Vol. 274. № 20. P. 14368.
4. Calvete J.J. // Thromb. Haemost. 1994. № 72. P. 1.
5. Gachet C., Payrastre B., Guinebault C. // J. Biol. Chem. 1997. Vol. 272. № 8. P. 4850.
6. Trumen K., Payrastre B., Plantavid M. // Blood. 1999. Vol. 94. № 12. P. 4156.
7. Трепакова Е.С., Cohen R.A., Voiotina V.M. // Circ. Res. 1999. Vol. 84. P. 201.
8. Самаль А.В., Лойко Е.Н. // Биохимия. 2000. Т. 65. № 2. С. 276.
9. Лойко Е.Н., Самаль А.В. // Весті НАН Біларусі. Сер. мед.-біял. навук (NEWS of Biomedical Sciences). 2003. № 4. С. 80.
10. Лойко Е.Н., Самаль А.В., Шуляковская С.М. // Там же. № 2. С. 97.
11. Cobbold P.H., Rink T.J. // Biochem. J. 1987. Vol. 248. P. 313.
12. Suzuki Y., Takami Y., Mayama K. // Haematologia. 2000. Vol. 30. № 2. P. 81.
13. Merten M., Thiagarajan P. // Circulation. 2000. Vol. 102. P. 1931.
14. Murohara T., Scalia R., Lefer A. // Circ. Res. 1996. Vol. 78. P. 780.
15. Murohara T., Parkinson S.J., Waldman S.A. // Arterioscler. Thromb. VascBiol. 1995. Vol. 15. P. 2068.
16. Gopalakrishna R., Chen Z.H., Gundimeda U. // J. Biol. Chem. 1993. Vol. 268. № 36. P. 27180.

Поступила в редакцию 04.12.2003.

Екатерина Вячеславовна Шамова – студентка 5-го курса физического факультета.
Александра Борисовна Самаль – кандидат биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник кафедры биофизики.

УДК 612:111.7

И.А. ДРЕМУК, А.Б. САМАЛЬ

ВЛИЯНИЕ АСПИРИНА НА АТФ-ИНДУЦИРОВАННУЮ ДЕЗАГРЕГАЦИЮ ТРОМБОЦИТОВ

Disaggregation of ADP-aggregated platelets by ATP at the absence and presence of aspirin was studied. The results suggest that cyclooxygenase inhibition decreases the formation of inducible contacts in platelets.

Одной из основных функций тромбоцитов – безъядерных клеток крови – является агрегация. Под действием индукторов агрегации тромбоциты пе-

