

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. Trepakova E.S., Cohen R.A., Boiotina 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 Бєларусі. 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-



переходят в активированное состояние, взаимодействуя друг с другом и образуя тромбоцитарные агрегаты двух типов: неустойчивые, существующие в течение короткого промежутка времени и спонтанно распадающиеся на одиночные тромбоциты, и устойчивые (стабильные), не разрушающиеся в течение длительного промежутка времени [1, 2]. Появление последних в крови опасно для здоровья человека [3]. Решение проблем тромбообразования напрямую связано с установлением механизмов образования устойчивых межклеточных контактов и механизмов дезагрегации. До настоящего времени внутриклеточные процессы, способствующие появлению стабильных тромбоцитарных агрегатов, остаются не известными. Процесс дезагрегации изучен в меньшей степени, чем процесс агрегации. Представляет интерес дезагрегация тромбоцитов в присутствии аспирина – ингибитора циклооксигеназы. Известно, что *in vitro* аспирин не влияет на скорость АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов, в то же время сведения о действии аспирина на процессы дезагрегации отсутствуют. В этой связи целью настоящей работы явилось исследование АДФ-индуцированной дезагрегации тромбоцитов, агрегированных под действием АДФ, и роли циклооксигеназы в образовании устойчивых агрегатов.

Материал и методика

Свежую донорскую кровь брали на Республиканской станции переливания крови. Обогащенную тромбоцитами плазму (ОТП) получали центрифугированием крови при скорости 1000 об/мин в течение 10 мин в центрифуге ОПН-03. В работе использовали фосфатно-солевой буфер (ФСБ), содержащий ионы кальция (137 мМ NaCl, 2,7 – KCl, 5 – Na₂HPO₄, 1,5 – KH₂PO₄, 1 мМ CaCl₂, pH 7,35).

Агрегацию и дезагрегацию исследовали с применением компьютеризированного анализатора AP2110 Научно-производственного центра «СОЛАР» (Минск, Беларусь), как описано в работе [4]. В кювету вносили по 200 мкл ОТП и ФСБ, инкубировали в течение 2 мин при 37 °С и постоянном перемешивании, добавляли АДФ, а затем через определенные промежутки времени – АТФ. Аспирин добавляли к тромбоцитам за 2 мин до введения АДФ либо одновременно с АТФ.

Процессы агрегации и дезагрегации регистрировали по изменению светопропускания исследуемой системы. Для каждой агрегационной кривой максимальное светопропускание ($T_{\max}$, %) определялось автоматически. Ингибирующий эффект аспирина оценивали по изменению отношения V/V_0 , где V и V_0 – скорости АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов в присутствии и в отсутствие аспирина соответственно. Дезагрегацию характеризовали скоростью данного процесса, которую определяли как отношение $V_d = \Delta T / \Delta t$, где ΔT – изменение светопропускания после добавления АТФ, а Δt – промежуток времени, за который произошло данное изменение.

Результаты представлены как средние значения $\pm$ стандартное отклонение для пяти независимых экспериментов, выполненных с кровью разных доноров. Достоверность значений определяли по t -критерию Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

Известно, что необратимую агрегацию тромбоцитов вызывает АДФ в концентрациях 2,5–20 мкМ. В наших экспериментах использовали АДФ в концентрации 15 мкМ. На кривой 5 рис. 1 видно, что при необратимой АДФ-индуцированной агрегации светопропускание достигает максимального значения и остается постоянным, свидетельствуя об образовании стабильных агрегатов. На рис. 1 показан дезагрегационный эффект АТФ, добавленного на разных стадиях АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов. Установлено, что в этом случае ход агрегационных кривых изменялся: агрегация тормозилась и сменялась дезагрегацией, о чем свидетельствовало уменьшение светопропускания, как это было показано в [5]. АТФ (300 мкМ), добавленный через 1 мин после начала агрегации, вызывал дезагрегацию тром-

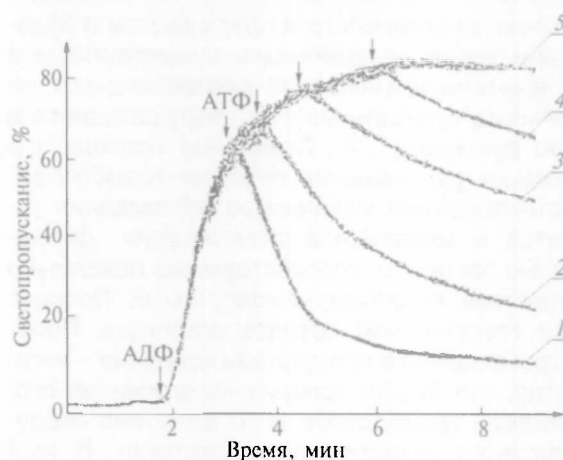


Рис. 1. АДФ-индуцированная агрегация тромбоцитов и дезагрегация, индуцированная АТФ (300 мкМ), добавленным после АДФ через 1, 2, 3 и 4 мин соответственно (1-4); 5 – контроль

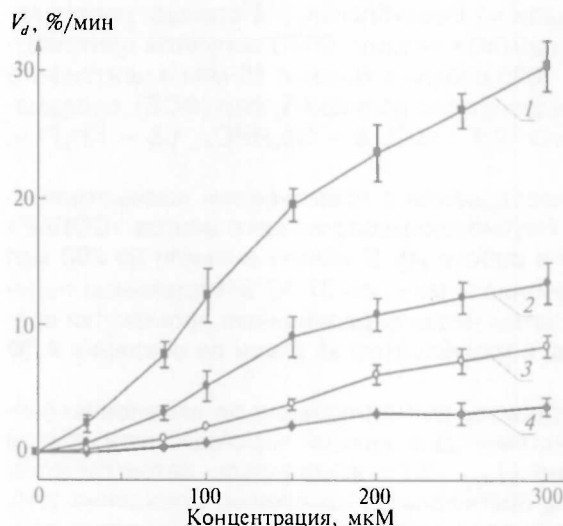


Рис. 2. Зависимость скорости АТФ-индуцированной дезагрегации тромбоцитов от концентрации АТФ. АТФ добавлен в моменты времени, аналогичные рис. 1

боцитов, при которой распалось около 70 % образовавшихся агрегатов. На более поздних стадиях агрегации процесс дезагрегации протекал с меньшей скоростью, которая зависела от концентрации АТФ (рис. 2). Представленные данные свидетельствуют о том, что АТФ, добавленный через 4 мин после АДФ (на стадии максимальной агрегации), не способен индуцировать дезагрегацию тромбоцитов, образовавших стабильные агрегаты.

Влияние аспирина на АТФ-индуцированную дезагрегацию тромбоцитов показано на рис. 3. В одном случае тромбоциты инкубировали с аспирином, затем добавляли АДФ и АТФ. Сам АТФ в концентрации 100 мкМ вызывал незначительный эффект (рис. 3, кривая 3). Инкубирование тромбоцитов с аспирином не влияло на их агрегационную способность и отношение скорости АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов, инкубированных с аспирином в концентрации 3 мМ, к скорости в контроле было равно $(0,93 \pm 0,04)$. Однако, как видно на кривой 1 рис. 3, при добавлении АТФ агрегаты, образованные тромбоцитами, подвергнутыми действию аспирина, практически полностью распались.

В случае, когда аспирин добавляли одновременно с АТФ, дезагрегация тромбоцитов также усиливалась (см. рис. 3, кривая 2). Из данных рис. 3 б видно, что в присутствии аспирина скорость АТФ-индуцированной дезагрегации тромбоцитов увеличивалась при добавлении АТФ на всех исследованных стадиях агрегации. При одновременном действии аспирина и АТФ тромбоциты дезагрегировали с большей скоростью, чем при действии одного АТФ, но с меньшей, чем тромбоциты, преинкубированные с аспирином. Сам аспирин дезагрегационную способность не показывал.

АДФ является наиболее важным физиологическим индуктором агрегации. В настоящее время показано, что АДФ вызывает агрегацию тромбоцитов, взаимодействуя с двумя типами пуриновых рецепторов плазматической мембраны тромбоцитов – $P_{\text{ФЛС}}$ (P_2Y_1) и $P_{\text{АЦ}}$ (P_2Y_{12}) [2, 6]. Рецептор $P_{\text{ФЛС}}$ связан с активацией фосфолипазы С и образованием вторичных мессенджеров, приводящих к мобилизации кальция из внутриклеточных депо, рецептор $P_{\text{АЦ}}$ – с ингибированием аденилатциклазы. Использование специ-

фических ингибиторов рецепторов показало, что для АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов существенное значение имеет одновременная активация обоих типов рецепторов [1]. Внеклеточный АТФ взаимодействовал с теми же рецепторами, что и АДФ, однако агрегацию тромбоцитов не вызывал [7]. Показано, что АТФ, добавленный после действия АДФ, инициирует дезагрегацию тромбоцитов за счет механизма, связанного с рецепторами P_{AC} и отменой ингибирования аденилатциклазы [8].

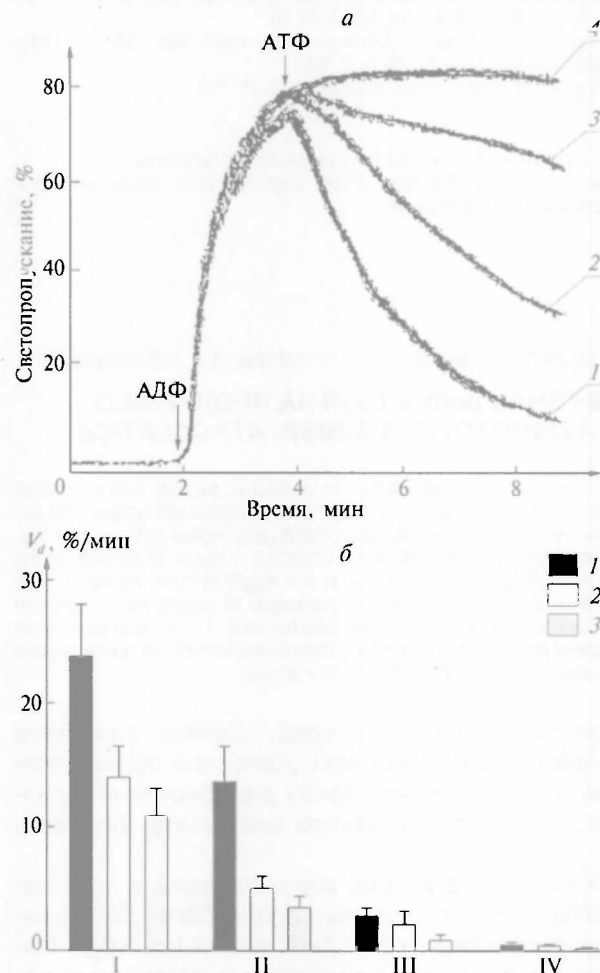


Рис. 3. Влияние аспирина на АТФ-индуцированную дезагрегацию тромбоцитов (а) и зависимость скорости дезагрегации от времени добавления АТФ (б): I – аспирин добавлен до АДФ и АТФ, II – одновременно с АТФ, III – АТФ в отсутствие аспирина, IV – контроль; 1 – 3 мин, 2 – 4, 3 – 6 мин

формирования тромбоцитарных агрегатов в ответ на действие АДФ не изменяется, но нарушает другой, благодаря которому агрегаты становятся устойчивыми к действию дезагреганта. Результаты позволяют предположить, что циклооксигеназа необходима для формирования стабильных агрегатов. В работе [9] показано, что активированные тромбоциты посредством связывания ГП IIb/IIIa с фибриногеном взаимодействуют друг с другом и это взаимодействие является сигналом для образования продуктов циклооксигеназного метаболизма арахидоновой кислоты, назначение которых не было понятно. С учетом литературных данных и собственных исследований можно предположить, что активация циклооксигеназного пути при АДФ-ин-

Результаты проведенной работы свидетельствуют о том, что дезагрегационный эффект АТФ проявляется только на ранних стадиях агрегации и отсутствует, когда образуются стабильные агрегаты.

Известно, что аспирин ингибирует активность циклооксигеназы – фермента, катализирующего биосинтез простагландинов и тромбоксана A_2 . Полученные нами данные подтверждают известный факт, что этот фермент не включается в механизм АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов, поскольку в отсутствие и в присутствии аспирина АДФ вызывал максимальную агрегацию и количество образовавшихся агрегатов в обоих случаях было одинаковым. Однако в условиях ингибирования циклооксигеназы под действием АТФ распадалось больше агрегатов, в том числе и образованных на стадии максимальной агрегации. Следовательно, при ингибировании циклооксигеназы аспирином процесс

дуцированной агрегации приводит к образованию стабильных межклеточных контактов.

1. Woulfe D., Yang J., Brass L. // J. Clin. Invest. 2001. Vol. 107. № 12. P. 1503.
2. James L. D., Dangelmaier C., Jianguo J. // J. Biol. Chem. 1998. Vol. 273. № 4. P. 861.
3. Keaney J., Loscaizo J. // Circulation. 1999. Vol. 99. P. 189.
4. Самаль А.Б., Лойко Е.Н. // Биохимия. 2000. Т. 65. № 2. С. 276.
5. Birk A., Broekman J., Gladek E. // J. Lab. Clin. Med. 2002. Vol. 140. № 3. P. 166.
6. Jianguo J., Kunapuli S. // Cell Biol. 1998. Vol. 95. P. 8070.
7. Soslau G., Youngprapakorn D. // Biochim. Biophys. Acta. 1997. Vol. 1355. P. 131.
8. Soslau G., Parker J. // Blood. 1989. Vol. 74. № 3. P. 984.
9. Jin J., Quinton T., Zhang J. // Blood. 2002. Vol. 99. № 1. P. 193.

Поступила в редакцию 04.12.2003.

Ирина Александровна Дремук – студентка 5-го курса физического факультета.

Александра Борисовна Самаль – кандидат биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник кафедры биофизики физического факультета.

УДК 575.13: 577.21

С.А. СКОБЛЯКОВ, В.Е. МЯМИН, А.Л. ЛАГОНЕНКО, Е.А. НИКОЛАЙЧИК, А.Г. ПЕШНЯКЕВИЧ

ВЛИЯНИЕ МУТАЦИЙ В ГЕНАХ *pelW* и *kdgR* НА ПРОДУКЦИЮ ПЕКТАТЛИАЗ У *ERWINIA CAROTOVORA* SUBSP. *ATROSEPTICA*

We have investigated the role of the regulatory protein KdgR in control of pectate lyase production in *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (Eca). The levels of extracellular pectate lyases and expression of the *pelW* gene coding for the cytoplasmic pectate lyase PelW, are higher in the *kdgR* mutants than in *kdgR*⁺ strains. The addition of polygalacturonic acid (universal inducer of pectate lyase genes) had no effect on the level of extracellular pectate lyases in the *kdgR* mutant. However, the level of extracellular pectate lyases production was lower in the presence of pectic compounds in strains with combined *kdgR* and *pelW* mutations. We propose that Eca bacteria, in contrast to *Erwinia chrysanthemi*, have an additional regulatory mechanism controlling the production of virulence factors which is sensitive to intermediate concentrations of pectin catabolism pathway.

Подобно большинству фитопатогенных бактерий, *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (Eca) в условиях взаимодействия с хозяйским организмом (растениями картофеля) выделяет во внешнюю среду ряд ферментов, разрушающих ткани растения, что приводит к развитию симптомов заболевания «черная ножка» [1].

Установлено, что индукция синтеза факторов вирулентности и патогенности у бактерий *Erwinia carotovora*, как и у *Erwinia chrysanthemi* (Ech), реализуется через нейтрализацию репрессирующего действия белка KdgR при наличии в клетках промежуточных продуктов метаболизма пектиновых веществ: 5-кето-4-дезоксиглюконата (ДК1), 2,5-дикето-3-дезоксиглюконата (ДК2) и 2-кето-3-дезоксиглюконата (КДГ) [2, 3]. Инактивация белка KdgR у бактерий приводит к гиперпродукции факторов вирулентности, основную массу которых составляют ферменты вне- и внутриклеточного метаболизма пектиновых веществ (пектинметилэстеразы, пектатлиазы, полигалактуроназы, олигогалактуронатлиазы и др.), а также ферменты целлюло- и протеолитического комплексов. Действие внеклеточных пектиназ направлено на укорачивание полимерного каркаса пектина, тогда как внутриклеточные ферменты катализируют превращение образующихся олигогалактуронидов и галактуроновой кислоты в 3-фосфоглицеральдегид и пируват [4].

Кроме того, у бактерий Ech охарактеризована группа периплазматических (PelX, PelV, PelW, PelN) и цитоплазматических (PelW) ферментов, специфичных в отношении олигогалактуронатов (рис. 1). Катализируя превращение последних в насыщенную и ненасыщенную дигалактуроновые кислоты и галактуронат, они обеспечивают образование субстратов для последующих стадий утилизации пектина [5–7].