

... БІОХІМІЯ ...

УДК: 577.322.7

**ВЛИЯНИЕ КАТИОНОВ НА АГРЕГАЦИЮ ТРОМБОЦИТОВ
Адиб Ал-Амуш, В.П.Берест, С.В.Гаташ, Е.Э.Перский***Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)*

Исследовано влияние *in vitro* катионов на агрегацию тромбоцитов человека опико-диэлектрическим методом. Получены зависимости степени и скорости агрегации тромбоцитов, индуцированной АДФ и адреналином, от концентрации ионов Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} . Показано, что адреналин-индуцированная агрегация слабее, чем АДФ-индуцированная агрегация зависит от концентрации ионов кальция. Ионы марганца в миллимолярных концентрациях угнетают агрегацию тромбоцитов. Установлено, что степень и скорость агрегации тромбоцитов определяются не только ионной силой среды, а зависят от специфического действия положительных ионов.

Ключевые слова: *тромбоциты, агрегация, катионы, мембраны.*

Введение

Минеральные вещества, содержащиеся в крови в виде солей и свободных ионов, обуславливают осмотическое давление крови, играют важную роль в водном обмене и поддержании кислотно-щелочного баланса. Остается много непонятого и невыясненного в том, какова роль анионов и катионов в процессе свертывания крови. Взаимосвязь между действием агонистов и ответной реакцией тромбоцитов достаточно изучена и определяется метаболизмом арахидоновой кислоты, фосфатидилинозитолами, диацилглицеролом, ионами Ca^{2+} и циклическими нуклеотидами (Siess, 1989). Большинство исследований направлено на изучение роли внутриклеточных ионов в механизмах активации и агрегации тромбоцитов, в то время как зачастую (пребывание на диете, вегетарианство, гипертонические инфузии при лечении гиповолемии, обезвоживание организма) в кровотоке тромбоциты экспонированы к переменным концентрациям одно и двухвалентных ионов (Massey, 2001; Young et al., 1995; Gende, 2003). Кроме того, если в норме количество веществ в плазме крови варьируется в небольших пределах, то при патологии (заболевания почек, сердечно-сосудистой системы) концентрации веществ, в том числе и ионов, влияющих на агрегацию тромбоцитов, могут увеличиваться в несколько раз. Поэтому, исследуя агрегацию тромбоцитов при патологии, необходимо учитывать влияние этих факторов на динамику активации тромбоцитов и образования агрегатов. Цель данной работы заключалась в изучении действия положительных ионов на агрегацию тромбоцитов.

Объекты и методы исследования

В работе использовалась кровь 40 здоровых доноров обоих полов, стабилизированная глюкозо-цитратным буфером в соотношении 4:1. Обогащенная тромбоцитами плазма (ОТП) выделялась путем центрифугирования цельной крови в течение 10 минут при 146 g. Образцы ОТП разводились бестромбоцитарной плазмой до концентрации тромбоцитов $2,5 \times 10^5 \text{ мм}^{-3}$, при этом начальная оптическая плотность образца (D_0) была в пределах 0,7–0,8 относительных единиц.

Влияние катионов на тромбоциты изучалось опико-диэлектрическим методом (Гаташ, 1987). Агрегация тромбоцитов исследовалась методом светорассеяния (Самаль и др., 1990). В качестве индукторов агрегации использовались основные физиологические агонисты АДФ (20 мкг/мл) и адреналин (1 мкг/мл). Далее под концентрацией индуктора агрегации или соли подразумевается их конечная концентрация в кювете. Степень (пропорциональна количеству тромбоцитов в агрегате) и скорость (отражает активацию клеток) агрегации тромбоцитов рассчитывали, как описано ранее (Берест, Гаташ, 1998). В каждой серии измерений использовали набор образцов, приготовленный из одной и той же пробы крови, чтобы свести к минимуму влияние индивидуальных особенностей тромбоцитов и состава плазмы крови доноров.

В работе использовались следующие химические реактивы: АДФ и адреналин («Reanal», Венгрия), ЭДТА и ЭГТА («Sigma»); NaCl, KCl, MgCl₂, CaCl₂ (х.ч.).

Результаты и обсуждение

Влияние катионов на агрегацию тромбоцитов исследовалось на примере АДФ- и адреналин-индуцированной агрегации. Оба вещества являются физиологическими индукторами агрегации и отличаются механизмами активации тромбоцитов.

АДФ, связываясь с гликопротеиновыми рецепторами на плазматической мембране тромбоцита, ингибирует активность аденилатциклазы и тем самым снижает в цитоплазме уровень цАМФ, стимулирует высвобождение арахидоновой кислоты и образование тромбоксана А₂ (Legrand et al., 1984). Эффект адреналина на тромбоциты выражен значительно слабее по сравнению с АДФ. Адреналин вызывает агрегацию тромбоцитов без изменения дисковидной формы, взаимодействуя с α-адренорецепторами плазматической мембраны. При активации адренорецепторов происходит ингибирование аденилатциклазы, при этом предполагается, что механизм действия адреналина не зависит от образования тромбоксана А₂, реакции высвобождения или образования фактора активации тромбоцитов (ФАТ), а связан с модуляцией мембран и изменением их проницаемости к ионам Ca²⁺ (Clerck et al., 1985).

При изучении влияния ионов кальция и магния на агрегацию тромбоцитов, ОТП предварительно инкубировалась в течение 2 минут с 2мМ раствором ЭГТА (хелатор Ca²⁺) или ЭДТА (обладает сродством как к Ca²⁺, так и к Mg²⁺). Концентрация 2 мМ выбиралась экспериментально, как надежно подавляющая индуцированную агрегацию.

Кривая выходит на насыщение при концентрации кальция 2 мМ, и при дальнейшем увеличении концентрации катиона степень АДФ-индуцированной агрегации снижается (рис. 1). Степень агрегации пропорциональна числу тромбоцитов в агрегате и определяется количеством фибриногеновых связей между тромбоцитами. Активация тромбоцитов АДФ приводит к экспонированию рецепторов для фибриногена – гликопротеиновых гетеродимеров αIIb-β3 – на плазматической мембране тромбоцита. Ионы Ca²⁺ участвуют в формировании центра связывания рецептора с фибриногеном, оптимальной для связывания является концентрация кальция 0,1–1 мМ (Siess, 1989). С другой стороны, известно, что высокие (больше 10⁻³ М) внеклеточные концентрации кальция ингибируют как реакцию высвобождения, так и агрегацию (Blache et al., 1987), механизм этого эффекта пока неясен. Поэтому, наблюдаемый рост степени агрегации тромбоцитов при увеличении экстраклеточной концентрации кальция в области физиологических значений 0,5–2 мМ связан с увеличением эффективности связывания фибриногена с тромбоцитарными рецепторами и, соответственно, увеличением размеров агрегатов клеток; а последующее снижение степени агрегации вызвано инактивацией тромбоцитов высокими концентрациями Ca²⁺.

В случае адреналин-индуцированной агрегации наблюдается плавный рост степени агрегации при увеличении внеклеточного содержания Ca²⁺ в ОТП (рис. 1). Отсутствие насыщения в этом случае, по-видимому, связано с тем, что для активации тромбоцитов адреналином необходим внеклеточный кальций, и часть его поступает в клетки при изменении проницаемости кальциевых каналов плазматической мембраны тромбоцитов, вызываемой активацией α-адренорецепторов (Owen et al., 1980). В результате этого уменьшается «эффективная» концентрация Ca²⁺ снаружи клетки, и не наблюдается ингибирования агрегации ионами Ca²⁺ в исследованном интервале концентраций.

Влияние ионов кальция на агрегацию тромбоцитов было изучено также при помощи регистрации изменения диэлектрической проницаемости ОТП в процессе агрегации. Концентрационная зависимость декремента действительной части диэлектрической проницаемости ОТП (Δε') приведена на рис. 2. Δε' измерялась как разность между диэлектрической проницаемостью ОТП перед добавлением индуктора и через 1 минуту после начала агрегации (добавления индуктора) для каждой концентрации иона. Δε', измеренная на частоте 9,3 ГГц, пропорциональна количеству свободной воды в суспензии клеток (Берест и др., 1998). Изменение Δε' может быть обусловлено изменением степени гидратации белков плазмы крови или изменением количества воды, связанной с мембранами клеток. В нашем случае, агонисты вызывают активацию клеток и не затрагивают белки плазмы крови, поэтому считаем, что изменения Δε' отражают изменения "степени гидратации" мембран клеток в процессе активации тромбоцитов.

Изменения количества связанной мембранами воды при активации тромбоцитов АДФ больше по величине, чем при адреналин-индуцированной агрегации, для которой уменьшение этого параметра практически не наблюдается. Указанные отличия, вероятно, связаны с тем, что при действии на тромбоциты АДФ высвобождается арахидоновая кислота, продуктами окисления которой являются пероксиды (Самаль и др., 1990), способные менять структуру липидного бислоя и оказывать влияние на подвижность молекул воды. Кроме того, большие, по сравнению с адреналин-индуцированной агрегацией, величины Δε' можно объяснить большим количеством рецепторов для

АДФ на плазматической мембране тромбоцита по сравнению с числом адренэргических рецепторов (33 000 мест связывания АДФ на клетку и 150–459 мест связывания α -адренорецепторов на клетку) (Siess, 1989); именно конформационные превращения рецепторов для индукторов агрегации на начальных стадиях активации тромбоцитов опосредуют передачу сигнала внутрь клетки.

Следует отметить, что как и в случае с размером агрегатов, количество связанной мембранами клеток воды в процессе активации не изменяется при повышении концентрации ионов Ca^{2+} больше 2 мМ. По-видимому, указанная концентрация Ca^{2+} является оптимальной для стабилизации активных конформаций рецепторов мембран тромбоцитов.

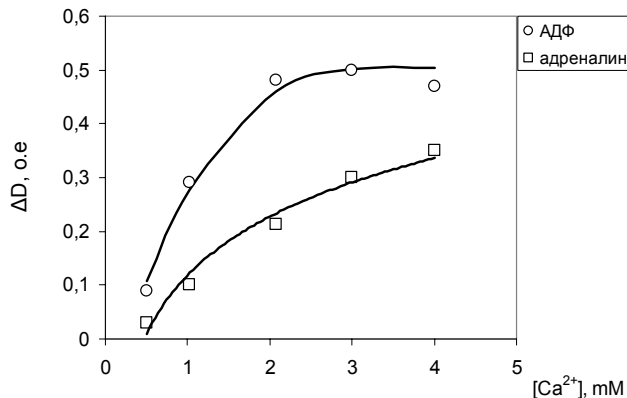


Рис. 1. Зависимость степени агрегации тромбоцитов, индуцированной АДФ или адреналином, от концентрации внеклеточных ионов кальция

Концентрация АДФ – 20 мкг/мл; адреналина – 1 мкг/мл

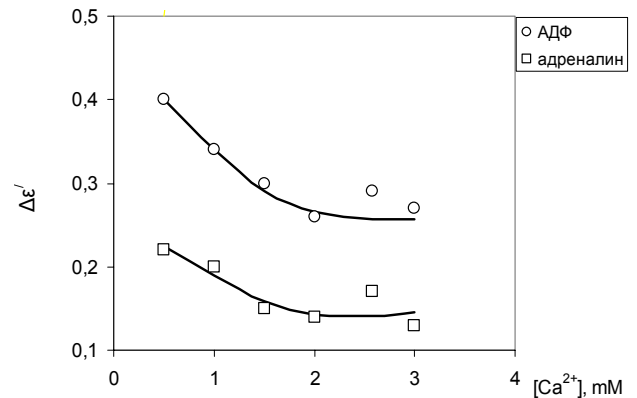


Рис. 2. Зависимость декремента действительной части диэлектрической проницаемости ОТП от концентрации ионов кальция

Влияние ионов магния на агрегацию тромбоцитов было изучено в широком диапазоне концентраций (рис. 3). В отличие от ионов Ca^{2+} , являющихся кофактором агрегации, ионы Mg^{2+} в большом диапазоне концентраций практически не оказывают влияния на агрегацию тромбоцитов и лишь при концентрациях, больших физиологических (~70 мМ), наблюдается подавление агрегации тромбоцитов, индуцированной АДФ (рис. 3) и адреналином (данные не представлены). При этом не наблюдается отличий между концентрационными зависимостями скорости агрегации, индуцированной обоими агонистами. Вероятно, тот факт, что в диапазоне концентраций от 10 до 50 мМ ионы Mg^{2+} не оказывают влияния на скорость агрегации, объясняется наблюдаемым изменением кинетики связывания свободного Mg^{2+} с клетками в процессе агрегации (Kempfert, Behrends, 2003). При малых концентрациях Mg^{2+} увеличение скорости агрегации тромбоцитов, отражающей активацию клеток индукторами, вероятно, связано с активацией G-белков и их диссоциацией на субъединицы в присутствии Mg^{2+} (Siess, 1989), увеличение агрегационной активности тромбоцитов также было отмечено у пациентов с низким уровнем внутриклеточного Mg^{2+} (Kempfert, Behrends, 2003).

Как видно из рис. 3, ионы марганца сильно угнетают процесс индуцированной агрегации тромбоцитов. Известно, что существуют два типа ионных каналов для дивалентных катионов на плазматической мембране тромбоцита, один из них проницаем преимущественно для ионов марганца (Koike et al., 1994). Ионы Mn^{2+} являются блокаторами кальциевых каналов (Smith et al., 1994) и в миллимолярных концентрациях препятствуют поступлению внешнего Ca^{2+} в клетки при действии индукторов агрегации (Blache et al., 1987). В то же время ионы Mn^{2+} увеличивают константу связывания фибриногена с тромбоцитарным рецептором (Azuma et al., 1989), но, как следует из наших результатов и результатов (Blache et al., 1987), при миллимолярных концентрациях преобладающим эффектом ионов марганца будет инактивация поступления кальция внутрь клетки и ингибирование агрегации.

Также, из результатов, приведенных на рис. 3, следует, что в бескальциевых средах ионы магния (но не ионы марганца) могут замещать ионы кальция в роли кофактора агрегации тромбоцитов, например, стабилизируя связь фибриногена с тромбоцитарным рецептором – гликопротеиновым комплексом $\alpha\text{IIb-}\beta\text{3}$.

Предполагается, что в механизмах передачи сигнала от рецепторов мембраны тромбоцитов к кальциевой сигнальной системе важную роль играют ионы натрия или Na^+/H^+ -обмен (Gende, 2003). Нами была изучена агрегация тромбоцитов в гипертонических растворах натрия и калия. Агрегация

тромбоцитов в гипотонических средах была детально исследована ранее (Самаль, 1990), в гипотонической среде (0,2 М NaCl) наблюдается набухание тромбоцитов без разрушения клеток и без высвобождения внутриклеточных ионов кальция, агрегация при этом также имеет место. Предполагается, что в области концентрации 0,1 М NaCl происходит структурная перестройка мембранных систем тромбоцитов. Наши результаты также свидетельствуют об ослаблении активации тромбоцитов, инкубированных в гипотонических растворах натрия и калия. Из литературы было известно, что в гипертонических средах тромбоциты имеют дисковидную форму с филоподиями, наблюдается нарушение целостности плазматической мембраны, нарушение структуры гранул и их количества.

Как видно из рис. 4, двукратное превышение физиологической концентрации Na^+ или K^+ приводит к полному ингибированию агрегации, индуцированной АДФ и тромбином (результаты не приведены), подобные результаты были получены (Young et al., 1995). Инактивация АДФ- и тромбин-индуцированной агрегации ионами натрия косвенно подтверждает гипотезу о том, что Na^+/H^+ -обмен может селективно модулировать высвобождение арахидоновой кислоты в ответ на действие «слабых агонистов» (таких как АДФ и адреналин) (Sweatt et al., 1985).

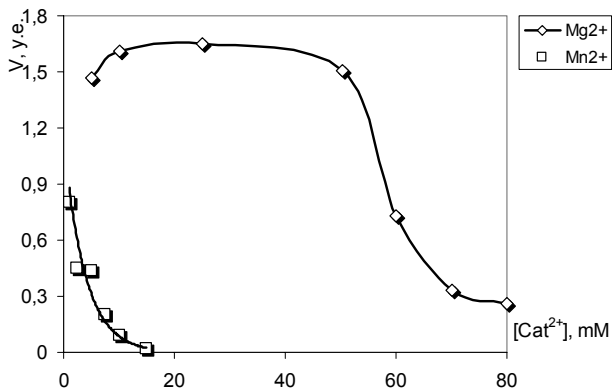


Рис. 3. Зависимость скорости АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов от концентрации ионов магния и марганца
Концентрация АДФ – 20 мкг/мл

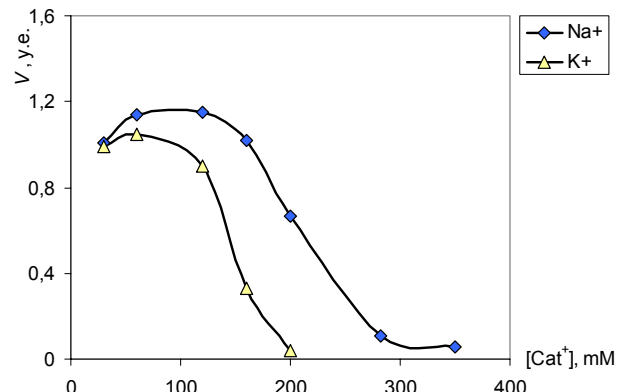


Рис. 4. Зависимость скорости АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов от концентрации ионов натрия и калия
Концентрация АДФ – 20 мкг/мл

Выводы

1. Активация клеток и размеры образующихся под действием АДФ и адреналина агрегатов тромбоцитов нелинейно зависят от концентрации одно- и двухвалентных катионов Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} .
2. Гипо- и гипертонические концентрации ионов Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mn^{2+} вызывают снижение параметров индуцированной агрегации тромбоцитов человека.
3. В бескальциевой среде ионы магния могут замещать ионы кальция в роли кофактора агрегации тромбоцитов.
4. Активация Na^+/H^+ -обмена может селективно вызывать высвобождение арахидоновой кислоты в ответ на действие «слабых индукторов» агрегации, приводя к необратимой агрегации и реакции высвобождения.

Список литературы

- Берест В.П., Гаташ С.В. Вплив температури на агрегацію тромбоцитів // Фізіологічний журнал. – 1998. – Т.44, № 5–6. – С. 89–94.
- Берест В.П., Гаташ С.В., Николов О.Т. Влияние температуры на диэлектрическую проницаемость суспензии тромбоцитов в 3-см диапазоне длин волн // Вісн. Харк. ун-ту. Біофізичний вісник. – 1998. – Вип.3. – С. 94–99.
- Гаташ С.В. Кинетика межклеточных взаимодействий тромбоцитов и влияние электромагнитных излучений. Дис... канд. биол. наук. – Тбилиси, 1987. – 222с.
- Самаль А.Б., Черенкевич С.Н., Хмара Н.Ф. Агрегация тромбоцитов: методы изучения и механизмы. – Минск: Университетское, 1990. – 103с.
- Azuma H., Shigekiyo T., Miura S. et al. Mechanism of potentiation by manganese ion of aggregation of porcine pancreatic elastase-treated human platelets // Thromb Haemost. – 1989. – Vol.62, №3. – P. 984–988.

- Blache D., Ciavatti M., Ojeda C. The effect of calcium channel blockers on blood platelet function, especially calcium uptake // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1987. – Vol.923, №3. – P. 401–412.
- Clerck F., Xhonneux B., Wiele R. Biochemical mechanisms in 5-hydroxytryptamine-induced human platelet aggregation // *Agents Action.* – 1985. – Vol.17, №2. – P. 220–228.
- Gende O.A. Effect of hyperosmolarity on agonist-induced increase of intracellular calcium in human platelets // *Thromb Res.* – 2003. – Vol.110, №1. – P. 33–37.
- Kempfert J., Behrends S. Analysis of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase in human platelets before and after aggregation // *Platelets.* – 2003. – Vol.14, № 7–8. – P. 429–435.
- Koike Y., Ozaki Y., Qi R. et al. Phosphatase inhibitors suppress Ca²⁺ influx induced by receptor-mediated intracellular Ca²⁺ store depletion in human platelets // *Cell Calcium.* – 1994. – Vol.15, №5. – P. 381–390.
- Legrand C., Dubernard V., Caen J. Platelet aggregation: its relation with ADP-induced fibrinogen binding to platelets and ADP-related membrane enzyme activities // *Eur. J. Biochem.* – 1984. – Vol.142, №3. – P. 465–471.
- Massey L.K. Dairy food consumption, blood pressure and stroke // *J. Nutr.* – 2001. – Vol.131, №7. – P. 1875–1878.
- Owen N.E., Feinberg H., Le Breton G.C. Epinephrine induced Ca²⁺ uptake in human blood platelets // *Am. J. Physiol.* – 1980. – Vol. 239, №4. – P. H483–H488.
- Siess W. Molecular mechanisms of platelet activation // *Physiological Reviews.* – 1989. – Vol.69, №1. – P. 58–178.
- Smith J.W., Piotrowicz R.S., Mathis D. A mechanism for divalent cation regulation of beta 3-integrins // *J. Biol. Chem.* – 1994. – Vol.269, №2. – P. 960–967.
- Sweatt J.D., Johnson S.L., Cragoe E.J., Limbird L.E. Inhibitors of Na⁺/H⁺ exchange block stimulus-provoked arachudonic acid release in human platelets. Selective effects on platelet activation by epinephrine, ADP, and lower concentrations of thrombine // *J. Biol. Chem.* – 1985. – Vol.260, №24. – P. 12910–12919.
- Young D.B., Lin H., McCabe R.D. Potassium's cardiovascular protective mechanisms // *Am. J. Physiol.* – 1995. – Vol.268, №4. Pt 2. – P. 825–837.

ВПЛИВ КАТІОНІВ НА АГРЕГАЦІЮ ТРОМБОЦИТІВ Адиб Ал-Амуш, В.П.Берест, С.В.Гаташ, Є.Е.Перський

Досліджено вплив *in vitro* катіонів на агрегацію тромбоцитів людини оптико-діелектричним методом. Отримано залежності ступеня та швидкості агрегації тромбоцитів, індукованої АДФ та адреналіном, від концентрації іонів Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺. Показано, що адреналін-індукована агрегація менше, ніж АДФ-індукована агрегація, залежить від концентрації іонів кальцію. Іони марганцю в мілімолярних концентраціях пригнічують агрегацію тромбоцитів. Встановлено, що ступінь та швидкість агрегації тромбоцитів визначається не лише іонною силою середовища, а залежить від специфічного ефекту додатних іонів.

Ключові слова: *тромбоцити, агрегація, катіони, мембрани.*

THE EFFECT OF CATIONS ON PLATELET AGGREGATION Adib Al-Amoush, V.P.Berest, S.V.Gatash, Ye.E.Perskii

The *in vitro* effect of mono- and divalent cations on human blood platelet aggregation has been studied with the help of optical and dielectrical method. The dependencies of the degree and rate of platelet aggregation induced by ADP and epinephrine on Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺ ion concentration have been obtained. It was shown that epinephrine-induced aggregation is less dependent on Ca²⁺ concentration than that of ADP-induced. Milimolar concentrations of manganese ions inhibited platelet aggregation. It was shown that the degree and rate of platelet aggregation depends a sort of cation rather than on ionic strength of the medium.

Key words: *platelets, aggregation, cations, membranes.*

Представлено Є.О.Гордієнком
Рекомендовано до друку В.А.Бондаренком