

УДК 618.3-008.6

## МОЛЕКУЛЯРНО-МЕМБРАННЫЕ МЕХАНИЗМЫ НАРУШЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ И ПРОТЕАЗО-ИНДУЦИРОВАННОЙ АГРЕГАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ ПРИ БЕРЕМЕННОСТИ, ОСЛОЖНЕННОЙ ГЕСТОЗОМ

В.Н. Сидоренко, В.М. Мажуль, Т.С. Черновец

Белорусский государственный медицинский университет НАН Беларуси

*Изучена протеазо-индуцированная агрегация тромбоцитов беременных женщин с гестозом. Установлены молекулярно-мембранные механизмы нарушений функциональной активности тромбоцитов при данной патологии гестации. Выявлено, что значения светопропускания ниже 70% диагностирует гестоз легкой степени тяжести, а при величине от 34% до 0 – тяжелую степень гестоза.*

**Ключевые слова:** беременность, гестоз, протеазо-индуцированная агрегация, тромбоциты, мембранные белки.

*The protease-induced aggregate of thrombocytes of the pregnant women with gestosis has been studied. The molecular-membrane mechanisms of thrombocytes functional activity disturbance have been established in the given graviditas pathology. It has been detected that the light values to skip which are lower than 70 % diagnose gestosis of a mild severity, and at value from 34 % up to 0 severe gestosis.*

**Key words:** pregnancy, gestosis, protease-induced aggregate, thrombocytes, membrane protein.

Гестоз по-прежнему остается загадкой человечества, истинная причина его возникновения неизвестна, механизмы развития остаются до конца не выясненными.

Согласно современным представлениям развитие гестоза сопряжено с выраженными повреждениями системы гемостаза, в том числе со сдвигом функциональной активности тромбоцитов [4].

На основании собственных научных исследований, с учетом современных литературных данных полагаем, что изменения в звене «сосуды – тромбоциты» у беременных женщин при гестозах развиваются в следующей последовательности:

неспецифическое действие (психогенные раздражители, токсины, иммунные комплексы и др.);

↓

окислительный стресс (локальный): усиление чувствительности сосудов плаценты к  $H_2O_2$ , увеличение эндогенной концентрации  $H_2O_2$ ;

↓

нарушение фосфолипидного состава мембран тромбоцитов, изменение внутримолекулярной динамики структуры белков, изменение формы тромбоцитов;

↓

активация тромбоцитов: повышение агрегационной способности тромбоцитов, повышение их чувствительности к инициаторам агрегаций (АДФ), увеличение рецептор – зависимого поступления  $Ca^{+2}$  в цитоплазму;

↓

компенсаторное снижение числа тромбоцитов в крови;

↓

нарушение баланса выделяемых в ходе реакции высвобождения биологически активных веществ ( $Mg^{+2}$ ↓, АТФ↓, тромбопластического фактора↑, серотонин↑, тромбоксан  $A_2$ ↑, лизосомальные ферменты↑ и др.);

↓

дестабилизация и дисфункция эндотелия сосудов маточно-плацентарного комплекса: снижение простаглицлина↓, NO↓, антитромбина III ↓, протеина C↓, на фоне увеличения тромбоксана  $A_2$ ↑, фактора Вилленбранда↑, коллагена↑, фибронектина↑, т.е. преобладание тромбогенного потенциала сосудистой стенки над атромбогенным; усиление сократительных реакций сосудов плаценты; снижение вазодилататорных эффектов доноров NO в сосудах плаценты и в целом, нарушение проницаемости сосудов;

↓

вазоспазм локальный (маточно-плацентарный) проявляется фетоплацентарной недостаточностью, внутриматочной гипоксией плода, ЗВУР;

↓

генерализованный вазоспазм: клинические проявления гестоза (отеки, АД↑, белок в моче, патологическая прибавка массы);

↓

нарушение жизненно – важных функций организма (полиорганная и полисистемная функциональная недостаточность).

Сериновые протеазы играют важную роль в регуляции разнообразных функций клеток, в том числе в контроле их адгезионной активности [2, 3].

Молекулярные механизмы активации тромбоцитов тромбином рассмотрены в обзоре Siess W.

[10]. В лаборатории протеомики Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси были установлены универсальные закономерности действия сериновых протеаз на клетки: низкие эффективные концентрации фермента, короткие времена экспозиции, необходимые для проявления биологического эффекта, быстрое развитие функционального ответа клеток [1, 2, 3, 5].

С помощью метода триптофановой фосфоресценции при комнатной температуре (ТФКТ) изучена медленная внутримолекулярная динамика (ВМД) структуры мембранных белков тромбоцитов в местах локализации триптофанилов. Обнаружено, что обработка тромбоцитов человека тромбином, трипсином или а-химотрипсином в тех же концентрациях, при которых наблюдалась быстроразвивающаяся агрегация клеток, вызывала функционально значимые сдвиги внутримолекулярной динамики мембранных белков тромбоцитов, что указывает на важную роль в механизмах агрегации и, наряду с конформационными перестройками изменений ВМД мембранных белков, участников процессов преобразования и передачи внешних сигналов внутрь клетки.

До настоящего времени в литературе отсутствуют сведения об особенностях протеазо-индуцированной агрегации тромбоцитов при беременности, осложненной гестозом.

Целью работы явилось изучение протеазо-индуцированной агрегации и молекулярно – мембранных механизмов нарушения функциональной активности тромбоцитов при беременности, осложненной гестозом.

#### Материалы и методы исследования

Протеазо-индуцированную агрегацию тромбоцитов исследовали с помощью автоматизированного агрегометра AP 2110 (SOLAR).

Перед регистрацией агрегатограммы в термостатируемую при 37°C пластиковую кювету агрегометра вносили 450 мкл обогащенной тромбоцитами плазмы и фосфатно-солевого буфера, pH 7,35 в модификации Дюльбеко (137 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 1,48 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 8,06 mM  $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1 mM  $\text{CaCl}_2$ ) в такой пропорции, чтобы конечная концентрация тромбоцитов в пробе составляла  $2,5 \cdot 10^8$  кл/мл. Затем в кювету добавляли 50 мкл трипсина в различных конечных концентрациях.

Степень протеазо-индуцированной агрегации тромбоцитов оценивали по возрастанию светопропускания суспензии с помощью спектрофлуориметра.

Для определения функциональной активности тромбоцитов использован новый метод, основанный на измерении кинетики затухания триптофановой фосфоресценции, осуществлявшийся с помощью созданной в лаборатории протеомики Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси автоматизированной системы для люминесцентных исследований. При проведении фосфоресцентных исследований 500 мкл тромбоцитов в суспензии вносили в кварцевую кювету и после

удаления кислорода помещали в кюветное отделение прибора. Возбуждение триптофановой фосфоресценции осуществляли светом с длиной волны 297 нм, регистрацию - при 446 нм.

Кинетику затухания фосфоресценции тромбоцитов анализировали в биэкспоненциальном приближении с помощью программы Origin 7.0 по формуле:

$$I(t) = I_0 \cdot (\alpha_1 \exp^{-t/\tau_1} + \alpha_2 \cdot \exp^{-t/\tau_2}),$$

где  $I(t)$  интенсивность фосфоресценции,  $I_0$  - интенсивность фосфоресценции в начальный момент времени,  $\tau_1$  и  $\tau_2$  - времена жизни быстрого и медленного компонентов фосфоресценции,  $\alpha_1$  и  $\alpha_2$  вклады быстрого и медленного компонентов затухания фосфоресценции, соответственно.

Для оценки адекватности выбранной модели экспериментальным данным использовали критерий  $\chi^2$ .

(Исследования выполнены в лаборатории протеомики Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, зав. лабораторией член корр, д.б.н., проф. В.М. Мажуль).

#### Результаты и их обсуждение

Как было отмечено выше, с началом беременности в результате перестройки организма женщины к вынашиванию плода наступает период кратковременной тромбоцитопении, а затем наблюдается активация системы гемостаза, являющиеся физиологическими реакциями организма на беременность. При гестозе эти процессы значительно активизируются и сопровождаются нарушениями функциональных способностей тромбоцитов, в первую очередь, это касается изменений их агрегационной активности.

Нами исследованы закономерности индуцированной трипсином агрегации тромбоцитов женщин с неосложненной беременностью и гестозами различной степени тяжести. После внесения в суспензию тромбоцитов трипсина (тромбина и а-химотрипсина) в низких концентрациях (100 мкг/мл) следовала короткая лаг-фаза, а затем быстро развивалась агрегация клеток. Степень протеазо-индуцированной агрегации тромбоцитов оценивалась нами по возрастанию светопропускания субстрата на агрегометре).

Как видно из рисунка 1 (гистограмма 1), при активации тромбоцитов здоровых беременных женщин трипсином значение степени агрегации клеток составляло  $73 \pm 3$  %.

Полученные в наших экспериментах результаты хорошо согласуются с данными литературы, согласно которым состояние тромбоцитарного звена гемостаза у женщин с неосложненной беременностью характеризуется достаточно высоким гемостатическим потенциалом.

При исследовании агрегации тромбоцитов беременных женщин с гестозами различной степени тяжести обнаружено, что агрегация, индуцированная трипсином, снижалась по сравнению с ее показателями у женщин с неосложненной беремен-

ностью (рисунок 1, гистограмма 2, 3, 4). Причем степень тяжести гестозов коррелировала с величиной светопропускания обогащенной тромбоцитами плазмы женщин.

При гестозе легкой степени тяжести способность к агрегации тромбоцитов под действием протеаз снижалась (рисунок 1, гистограмма 2) и соответствовала 50-69% значений светопропускания.

Как следует из рисунка 1, гистограмма 3, гестоз средней степени тяжести характеризовался существенно сниженной способностью тромбоцитов к протеазо-индуцированной агрегации и соответствовал 35-49% значений светопропускания при нормальной беременности.

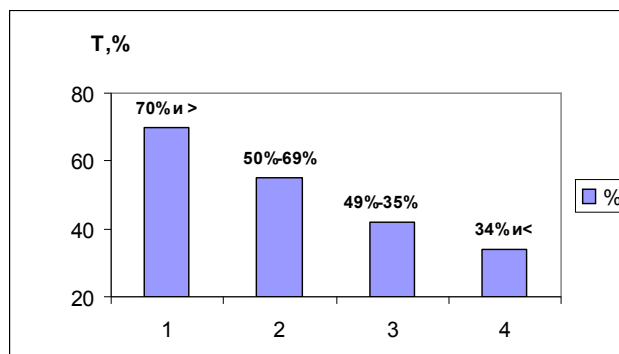
Агрегационная способность тромбоцитов под действием протеаз при гестозе тяжелой степени была слабо выражена или вовсе отсутствовала (рисунок 1, гистограмма 4), при этом величины светопропускания имели наиболее низкие или близкие к нулевым значения.

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что для гестоза характерны нарушения функциональной активности тромбоцитов, что, вероятно, связано с повышенной активацией системы гемостаза, прежде всего, активации его тромбоцитарного звена.

Причины снижения способности тромбоцитов к протеазо-индуцированной агрегации могут быть связаны с нарушениями в системе рецепторного аппарата клетки, процессов внутриклеточной трансдукции сигнала, изменениями структурно-динамического состояния мембранных белков, индуцированной секрецией нуклеотидов [3,7].

Согласно современным представлениям, сериновые протеазы регулируют функциональную активность посредством специфических протеазо-активируемых рецепторов клеточной поверхности (PARs) [7, 9]. В настоящее время известно, что на плазматической мембране тромбоцитов экспонированы рецепторы тромбина - PAR-1 и PAR-4 [9]. После взаимодействия протеазы с этими рецепторами запускаются процессы передачи сигнала внутрь клетки и его преобразования, которые ведут к формированию межклеточных контактов [10], т.е. к агрегации. Известно, что трансдукция внешнего сигнала при активации тромбоцитов осуществляется с участием сложной системы вторичных мессенджеров (циклических мононуклеотидов и катионов кальция [6, 10].

Таким образом, показатели светопропускания обогащенной тромбоцитами плазмы после обработки трипсином, отражают способность тромбоцитов к протеазо-индуцированной агрегации и имеют диагностическую ценность. Регистрируемые агрегометром значения светопропускания в пределах 70-100% свидетельствуют об отсутствии у беременной гестоза, при значениях светопропускания 50-69% диагностируется легкая степень гестоза при снижении показателя на 35-49% - средняя степень, а при его величине от 34% до 0 - тяжелая степень.



- 1 - здоровые беременные;  
 2 - беременные с гестозом легкой степени тяжести;  
 3 - беременные с гестозом средней степени тяжести;  
 4 - беременные с гестозом тяжелой степени

Рис. 1. Степени агрегации тромбоцитов беременных женщин, индуцированных трипсином в конечной концентрации 100 мкг/мл

Способность клеток к агрегации во многом определяется конформацией и внутримолекулярной динамикой (ВМД) мембранных белков. Несмотря на многочисленные исследования, механизмы развития гестозов на молекулярном, мембранном и клеточном уровнях во многом остаются не выясненными.

Ранее в лаборатории протеомики Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси был установлен новый механизм регуляции функциональной активности клеток, реализующийся путем изменения ВМД структуры мембранных белков. Показана важность роли изменений медленной ВМД мембранных белков в развитии патологии (рак, аутоиммунные заболевания, катаракта и др.) [3]. Как известно, ВМД представляет собой тепловые флуктуации конструктивных элементов глобулы белков вблизи положения равновесия, т.е. в пределах их конформации – статичной структуры. ВМД белков реализуется в широком временном диапазоне – от пикосекунд до нескольких секунд. Наибольшую функциональную значимость имеют медленные, с миллисекундными характеристиками временами, внутримолекулярные движения, которые осуществляются на уровне крупных фрагментов полипептидной цепи, доменов и субъединиц [3, 4].

Уникальные возможности изучения ВМД белков в миллисекундном и секундном диапазонах предоставляет метод, основанный на измерении параметров триптофановой флуоресценции при комнатной температуре (ТФКТ). Выраженная зависимость значений времени жизни и квантового выхода триптофановой флуоресценции от молекулярной подвижности окружения хромофора и соответствие времен жизни ТФКТ характерным временам низкочастотных флуктуаций структуры макромолекул позволяют изучать флуоресцентным методом медленную ВМД белков в диапазоне 10-3 – 10 с [3, 4].

Как показано в работе [3], в клетке способностью к ТФКТ обладают, в основном, белки, включенные в состав мембранных структур. Это дает возможность исследовать фосфоресцентным методом медленную ВМД мембранных белков *in situ*, без предварительного выделения биомембран из клеток. Существенно, что информация о ВМД мембранных белков может быть получена на основании анализа фосфоресцентных свойств естественных хромофоров белка (триптофанилов), а не искусственно «привитых» фосфоресцентных меток и зондов, способных сами по себе изменить структурно-динамическое состояние мембранных белков. Методом ТФКТ были зарегистрированы функционально значимые изменения медленной ВМД мембранных белков тромбоцитов человека при активации клеток сериновыми протеазами в низких концентрациях [5]. Однако медленная ВМД мембранных белков тромбоцитов при гестозах остается неизученной.

В настоящем разделе представлены результаты фосфоресцентного анализа медленной ВМД структуры мембранных белков тромбоцитов беременных с факторами риска развития гестоза и гестозом. Полученные результаты сопоставлены с данными изучения трипсин-индуцированной агрегации тромбоцитов.

Кинетики затухания ТФКТ тромбоцитов беременных хорошо аппроксимируются суммой двух экспонент. Биэкспоненциальность кинетических кривых затухания ТФКТ отражает существование в мембранных белках тромбоцитов структур, дискретно различающихся по жесткости. Триптофанилы, фосфоресцирующие с временем жизни  $\tau_1$  (около 100-150 мс) включены в состав участков структуры мембранных белков с умеренно лабилизированной ВМД. С временем жизни  $\tau_2$  (около 1 с) фосфоресцируют триптофанилы, локализованные в тех местах, где ВМД белков заторможена в наибольшей степени. Обычно участки с такой жесткой структурой находятся в глубине жесткого гидрофобного ядра глобулы. Значения времени жизни медленного компонента ТФКТ тромбоцитов беременных с риском развития гестоза составляют  $147 \pm 22$  мс, быстрого компонента –  $688 \pm 30$  мс, что говорит об усилении медленной ВМД мембранных белков тромбоцитов женщин с факторами риска гестоза.

Значения времени жизни медленного компонента ТФКТ тромбоцитов беременных с гестозом составляют  $122 \pm 16$  мс, быстрого компонента –  $576 \pm 28$  мс. Таким образом, при гестозе наблюдается дальнейшее усиление медленной ВМД белков, включенных в состав мембран тромбоцитов. Эти результаты свидетельствуют о выраженной лабилизации структурно-динамического состояния мембранных белков тромбоцитов при развитии гестоза, которая может нарушить нормальное функционирование клеток.

Агрегационная активность является одной из основных функций тромбоцитов. Способность кле-

ток к установлению взаимных адгезионных контактов во многом определяется конформацией и ВМД мембранных белков. Такой вывод был получен ранее на основании изучения механизмов протеазо-индуцированной агрегации различных клеток животного происхождения [5, 6]. Согласно результатам наших исследований, при развитии у беременных гестоза происходит существенное снижение способности тромбоцитов к протеазо-индуцированной агрегации. Учитывая зависимость способности клеток к агрегации от структурно-динамического состояния мембранных белков, можно предположить, что чрезмерное усиление медленной ВМД белков мембран тромбоцитов при гестозе приводит к нарушению их способности к протеазо-индуцированной агрегации. Известно, что при действии на тромбоциты сериновых протеаз в низких концентрациях инициируется последующая передача сигнала внутрь клетки с участием эффекторных белков и вторичных посредников. Конечным результатом этих событий являются быстроразвивающиеся физиологические ответы клетки, в том числе агрегация тромбоцитов. Причины наблюдаемого снижения способности тромбоцитов к агрегации могут быть связаны с нарушениями процессов внутриклеточной трансдукции сигнала, вызванными чрезмерной лабилизацией медленной ВМД мембранных белков.

Таким образом, функциональная активность тромбоцитов зависит от молекулярно-мембранных механизмов их регуляции. Выраженная лабилизация структурно-динамического состояния мембранных белков тромбоцитов нарушает нормальное функционирование клеток (прежде всего, их агрегационную способность), что свидетельствует о развитии гестоза.

#### Литература

1. Мажуль В.М., Зайцева Е.М., Щербин Д.Г. Белок: стратегия функционирования // Биофизика живых систем: от молекулы к организму / Под ред. И.Д. Вологовского. - Минск: Белсене, 2002. - С. 27-40.
2. Мажуль В.М., Зайцева Е.М., Щербин Д.Г. Внутримолекулярная динамика и функциональная активность белков // Биофизика. 2000. Т.45. В. 6. С. 965-989.
3. Мажуль В.М., Черновец Т.С., Зайцева Е.М., Щербин Д.Г. Действие сериновых протеаз на внутримолекулярную динамику мембранных белков и агрегацию тромбоцитов человека. Биофизика. 47 (4): 2002. - С. 653-662.
4. Сидоренко В.Н., Тарарук В.А., Комар Е.Н., Буланова К.Я., Пискунова И.П., Лобанок Л.М. Функциональное состояние тромбоцитов при преэклампсии // Материалы VII съезда акушер-гинекологов и неонатологов РБ, Гродно, 2002.
5. Черновец Т.С. Закономерности агрегации тромбоцитов, индуцированной действием протеаз в низких концентрациях. Респ. конф. Молодых ученых НАН Беларуси «Молодежь в науке». Мн., 2003.-С. 283—287.
6. Brass L.F., Manning D.R., Cichowski K., Abrams C.S. 1997. Signaling through G proteins in platelets: to the integrins and beyond. *Thromb. Haem.* 78 (1): 581—589.
7. Burger M.M. 1970. Proteolytic enzymes initiating cell division and escape from contact inhibition of growth. *Nature.* 227: 170-171.
8. Nicolson G.L. 1972. Topography of membrane cononavalin A sites modified by proteolysis // *Natyr.* *NewBiol.* 239 : 193—197
9. O'Brien P.J., Molino M, Kahn M., Brass L.F. 2001. Protease activated receptors: theme and variations. *Oncogene.* 20 (13) : 1570—1581.
10. Siess W. 1989. Molecular mechanisms of platelet activation.. *Phys. Rew.* 69 : 58—178.

Поступила 28.03.07