

УДК 612.115.12

©Коллектив авторов

## РОЛЬ РЕЦЕПТОРА PAR1 В ПРОТЕКТОРНОМ ДЕЙСТВИИ АКТИВИРОВАННОГО ПРОТЕИНА С ПРИ НЕИММУННОЙ АКТИВАЦИИ ТУЧНЫХ КЛЕТОК

*А.М. Макарова<sup>1</sup>, Л.Р. Горбачева<sup>1</sup>, Т.С. Замолодчикова<sup>2</sup>, Л.Д. Руми<sup>2</sup>,  
М. Смирнов<sup>3</sup>, С.М. Струкова<sup>1\*</sup>*

<sup>1</sup>Кафедра физиологии человека и животных, Биологический факультет МГУ им.  
М.В. Ломоносова, 119899 Москва, МГУ, Ленинские горы; тел.: 939-14-16;  
эл. почта: Strukova@mail.ru

<sup>2</sup>Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10.

<sup>3</sup>Инструментальная лаборатория, Оранжебург, Нью-Йорк, США.

При исследовании влияния активированного протеина С (АПС) на функциональную активность перитонеальных тучных клеток (ПТК) крысы обнаружено снижение секреции медиатора -  $\beta$ -гексозаминидазы, маркера дегрануляции тучных клеток. Показано, что АПС модулирует как спонтанную секрецию тучных клеток, так и вызванную индукторами дегрануляции: пептидом-агонистом рецепторов, активированных протеиназами подтипа 1 (PAR1-AP), и веществом 48/80. Установлено, что десенситизация PAR1 тромбином отменяет вызванное низкими концентрациями АПС ( $\leq 1,5$  нМ) снижение секреции  $\beta$ -гексозаминидазы. АПС, инактивированный фенилметилсульфонилфторидом (PMSF), не имитирует действие фермента. Показано, что протеиназа двенадцатиперстной кишки – дуоденаза, активирует ПТК через рецепторы PAR1. АПС отменяет провоспалительное действие дуоденазы и PAR1-AP, снижая секрецию медиаторов тучными клетками. Действие АПС обусловлено освобождением тучными клетками оксида азота (NO), поскольку обнаружено восстановление секреторной функции тучных клеток в присутствии L-NAME. Эти данные свидетельствуют об участии PAR1 тучных клеток в механизме регуляторного противовоспалительного действия АПС.

**Ключевые слова:** активированный протеин С; дуоденаза; рецепторы, активируемые протеиназами; тучные клетки; секреция  $\beta$ -гексозаминидазы; оксид азота; воспаление.

---

\* - адресат для переписки

**ВВЕДЕНИЕ.** Активация процесса свертывания крови при воспалении приводит к появлению сериновых протеиназ - факторов VIIa, Xa и тромбина, которые участвуют в провокации и регуляции воспаления, поскольку активируют клетки крови и соединительной ткани [1, 2]. Тромбин – мультифункциональная протеиназа системы гемостаза, - активирует тромбоциты, каскад свертывания крови, а также антикоагулянтный путь протеина С. На поверхности эндотелия сосудов тромбин взаимодействует с рецептором - тромбомодулином и в присутствии кофактора - эндотелиального рецептора протеина С (EPCR) - превращает профермент - протеин С в сериновую протеиназу - активированный протеин С (APC) [3, 4]. При этом тромбин, связанный с тромбомодулином через специфический анионсвязывающий сайт 1 (ABE1), теряет свои прокоагулянтные свойства и способность взаимодействовать с рецептором, активируемым протеиназами подтипа 1 (PAR1) [5]. Образовавшийся APC в присутствии кофактора - протеина S (витамин К-зависимого белка), иммобилизованного на эндотелии и/или тромбоцитах, специфически расщепляет активные формы факторов V и VIII свертывания крови, блокируя тем самым генерацию тромбина [5].

Система протеина С кроме антикоагулянтных свойств проявляет противовоспалительную и антиапоптотическую активность [6-8]. Непрямой противовоспалительный эффект APC реализуется через ингибирование генерации тромбина, который в высоких концентрациях обладает провоспалительной активностью. Прямое противовоспалительное действие APC проявляется в снижении продукции цитокинов (в частности, интерлейкина-6), хемокинов, адгезивных молекул (Р- и Е-селектинов), факторов роста и ряда транскрипционных факторов эндотелиальными клетками, что приводит к подавлению начальных стадий воспаления и отвечает, по-видимому, за его противовоспалительный эффект при системном воспалении и сепсисе [9, 10]. APC модулирует воспалительные ответы слизистой оболочки кишечника, желудка и двенадцатиперстной кишки у экспериментальных животных [11, 12]. Показана генерация APC и его противовоспалительная защитная роль при инфицировании желудка *H. pylori* [10].

Однако, механизмы противовоспалительных эффектов APC изучены недостаточно, хотя есть данные о вкладе рецепторов EPCR и PAR1 на клетках эндотелия в эти процессы [5, 7, 8]. APC в высоких концентрациях может активировать специфический рецептор тромбина PAR1 на эндотелии [13]. PAR1 рецепторы экспрессируются всеми клетками, участвующими в процессах свертывания крови, воспаления и репарации тканей [10, 14]. Данные о действии APC на тучные клетки отсутствуют. В качестве модели для изучения эффектов APC на клетки нами были выбраны перитонеальные тучные клетки крысы, которые относятся к соединительнотканному типу клеток. Известно, что тучные клетки участвуют в воспалительных ответах организма и выделяют широкий спектр преобразованных (гистамин,  $\beta$ -гексоаминаза, протеиназы и др.) и вновь синтезируемых (цитокины, факторы роста, NO, фактор активации тромбоцитов (PAF)) медиаторов при активации иммунными и неиммунными агонистами [15, 16], в том числе, как показано нами ранее, тромбином и пептидами - агонистами PAR1 [17, 18]. NO может служить регулятором активности перитонеальных тучных клеток (ПТК), стимулируя активацию гуанилатциклазы и как следствие, ингибируя агрегацию тромбоцитов, секрецию гистамина и PAF [19].

Целью настоящей работы было исследовать роль PAR1 тучных клеток в механизме противовоспалительных эффектов активированного протеина С на модели дегрануляции перитонеальных тучных клеток крысы в норме и при их активации в условиях *in vitro*.

**МЕТОДИКА. Материалы.** В работе использовали: активированный протеин С (АРС, HemosIL); синтетический пептид – агонист PAR1 (PAR1-AP, SFLLRN, Российский кардиологический научно-производственный комплекс МЗ РФ, Москва, Россия); дуоденазу (ИБХ РАН, Москва); L-NAME, фенилметилсульфонил фторид (PMSF), хромогенный субстрат для  $\beta$ -гексозаминидазы - *n*-нитрофенил-N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозаминид (Sigma); хромогенный субстрат для АРС - *pyro*Glu-Pro-Arg-p-NA (S-2366, Chromogenix); ADP, фактор активации тромбоцитов (PAF), фикоил-400 (Serva); вещество 48/80 (Biomol); Трис (ICN); раствор Тироде (NaCl 145 mM, HEPES 10 mM, KCl 5 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, глюкоза 5 mM, 0,1% сывороточного альбумина, pH 7,4; буфер Na-HEPES: NaCl 145 mM, HEPES 10 mM, pH 7,4).

**Методы.** Тучные клетки выделяли из перитонеальной полости самцов крыс Вистар весом 250-300 г как было описано ранее [20, 21]. Эксперименты с животными выполняли в соответствии с этическими принципами и нормативными документами, рекомендованными Европейским научным фондом (ESF) и Хельсинской декларацией о гуманном отношении к животным. Эксперименты по определению  $\beta$ -гексозаминидазы тучных клеток проводили по методике, описанной ранее [21, 22]. К аликватам, содержащим  $(1-5) \times 10^5$  тучных клеток, добавляли по 10 мкл АРС или АРС + PMSF, PAR1-AP, вещества 48/80 или раствора Тироде (в контроле) и инкубировали при 37°C в течение 10 мин (в трёх параллельных пробах). Для ингибирования синтеза NO ПТК инкубировали при 37°C в течении 30 мин с 300 мкМ L-NAME, затем добавляли 10 мкл АРС и инкубировали (10 мин, 37°C). Реакцию останавливали ледяным раствором Тироде. Активность  $\beta$ -гексозаминидазы определяли по расщеплению специфического хромогенного субстрата - *n*-нитрофенил-N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозаминида в реакционной смеси, содержащей 4 mM субстрата в 500 мкл 0,04 М цитратного буфера pH 4,5. и вычисляли содержание его по формуле: % секреции =  $A/(A+B) \times 100\%$ , где А – содержание медиатора в супернатанте, В – в осадке. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре Spescord M40 при длине волны  $\lambda = 410$  нм.

Тучные клетки были разделены на две группы, различающиеся по уровню спонтанной активности, определяемой по степени секреции  $\beta$ -гексозаминидазы (группа ПТК с низкой спонтанной активностью - ПТК1 и группа ПТК с высокой спонтанной активностью – ПТК2).

**Десенситизация тромбином PAR рецепторов.** Суспензию тучных клеток ( $5 \times 10^5$ ) инкубировали при 37°C в течение 5 мин, затем добавляли 100 нМ тромбин и инкубировали еще 10 мин [16]. Реакцию останавливали центрифугированием при 400 g и 0°C. Для исключения вклада медиаторов, освобождаемых тромбином, надосадочную жидкость отбрасывали, клетки ресуспендировали в исходном объеме Na-HEPES буфера pH 7,4. Суспензию тучных клеток инкубировали при 37°C в течение 5 мин и к клеткам добавляли вещество 48/80 (400 мкг/мл), АРС или дуоденазу. Далее опыт проводили по схеме, описанной выше.

**Концентрация АРС на фильтрах центрикон.** Для освобождения АРС от примеси солей и концентрации белка раствор препарата АРС в бидистиллированной воде (2000 мкл) центрифугировали в пробирках Центрикон-10 (Centricon) 30 мин при 3000 g и 0°C. При таких условиях за 30 мин через мембрану проходит 1/2 объёма раствора. Процедуру повторяли пятикратно, добавляя к раствору препарата АРС каждый раз по 1000 мкл дистиллята. АРС собирали центрифугированием (с перевернутой вверх мембраной) в течение 10 мин при 3000 g и 0°C. Протеолитическую активность диализованного АРС определяли по отношению к специфическому хромогенному субстрату S2366 (*pyro*Glu-Pro-Arg-p-NA) в стандартных условиях (10 mM трис-HCl, pH 8,0, 37°C). А также биологическим методом - по удлинению частичного тромбопластинового времени (АЧТВ) свертывания плазмы крови.

*Протеолитическую активность APC* блокировали специфическим ингибитором сериновых протеиназ PMSF в течение 180 мин при 25°C и определяли остаточную протеолитическую активность APC по отношению к хромогенному субстрату S2366 (pyroGlu-Pro-Arg-p-NA).

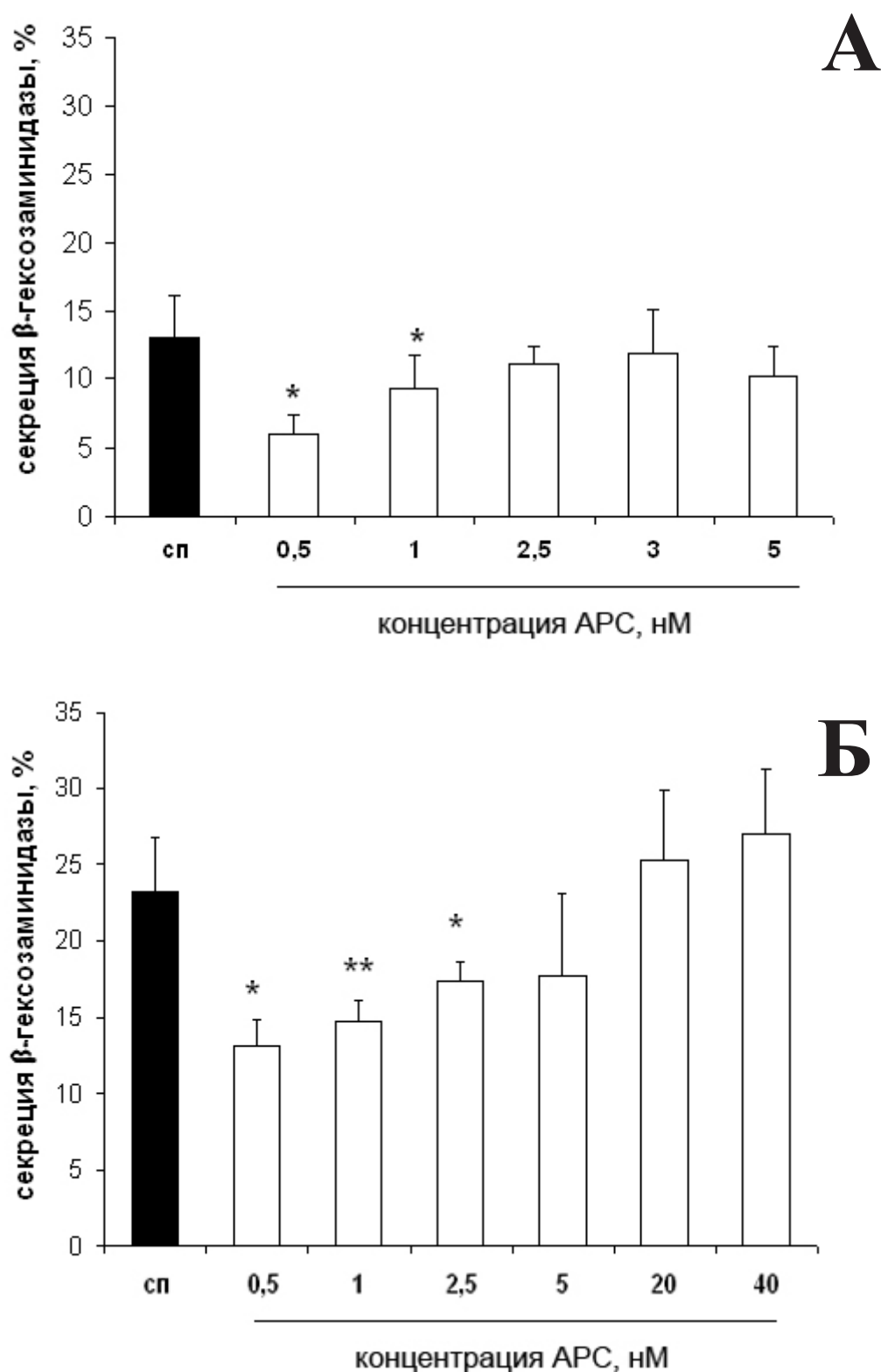
*Агрегацию тромбоцитов определяли* по методу, описанному ранее [17].

Статистическую обработку данных проводили, используя t-критерий Стьюдента. Результаты представлены как средние значения из 4-5 независимых экспериментов  $\pm$  средняя квадратичная ошибка. Различия считали достоверными при значении  $p < 0,05$ .

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Для изучения противовоспалительных эффектов APC были выбраны перитонеальные тучные клетки крысы, которые активно участвуют в воспалительных ответах организма и выделяют как преформированные, так и вновь синтезируемые медиаторы. Так, гистамин,  $\beta$ -гексозаминидаза, протеиназы, гепарин, катепсин G, триптаза и др. относятся к преформированным медиаторам [23]. Секреция  $\beta$ -гексозаминидазы служит маркером дегрануляции тучных клеток и освобождения преформированных провоспалительных медиаторов.

В работе использовали неиммунные стимуляторы секреции медиаторов воспаления ПТК, такие как вещество 48/80 и PAR1-AP. Неиммунная стимуляция тучных клеток опосредуется как рецепторными, так и не рецепторными взаимодействиями либератора с клеточной мембраной. Так, вещество 48/80 не имеет специфических рецепторов на клетках и взаимодействует с С-концевым участком  $\alpha$ -субъединицы G-белка и индуцирует сигнальные пути, приводящие к экзоцитозу и дегрануляции ПТК [24]. Через рецептор PAR1 на тучных клетках действуют специфические агонисты рецептора – тромбин и PAR1-AP [23]. Кроме того, исследовали влияние протеиназы желудочно-кишечного тракта – дуоденазы (26,5 кДа) на секреторную функцию ПТК.

*Влияние APC на дегрануляцию тучных клеток с разной функциональной активностью.* В первой серии экспериментов исследовали влияние APC на секреторную функцию двух групп перитонеальных тучных клеток, различающихся по уровню спонтанной активности, определяемой по степени освобождения  $\beta$ -гексозаминидазы. ПТК, которые освобождали  $13,0 \pm 3,1\%$  медиатора, относили к группе с низкой спонтанной активностью (ПТК1), а ПТК, которые высвобождали  $23,2 \pm 8,0\%$   $\beta$ -гексозаминидазы – к группе с высокой спонтанной активностью (ПТК2) (рис. 1 А, Б). Как видно на рисунке 1 А, в группе ПТК1 активированный протеин С в низких концентрациях (0,5 и 1,0 нМ) вызывал достоверное снижение ( $p < 0,05$ ) секреции  $\beta$ -гексозаминидазы ПТК на 54% и 28,4% соответственно относительно спонтанного уровня секреции ( $13,0 \pm 3,1\%$ ). При концентрациях APC ниже 0,1 нМ (0,05-0,1 нМ) и выше 2,5 нМ (5-40 нМ) не наблюдали достоверного изменения спонтанной секреции клеток. В группе тучных клеток с высокой спонтанной активностью (ПТК2) обнаружили усиление протекторного эффекта низких концентраций APC (0,5, 1,0 и 2,5 нМ) на клетки: достоверное снижение ( $p < 0,05$ ) секреции  $\beta$ -гексозаминидазы ПТК на 43,8%, 36,7% и 25,1% соответственно относительно спонтанного уровня секреции ( $23,2 \pm 8,0\%$ ) (рис. 1, Б). Таким образом, при исследовании влияния APC на спонтанно активированные тучные клетки показано, что APC дозозависимо в узком диапазоне низких концентраций (от 0,5 до 2,5 нМ) блокирует секрецию  $\beta$ -гексозаминидазы в обеих группах клеток. Причем, при действии APC на ПТК с высокой спонтанной активностью наблюдалось усиление протекторного эффекта APC.

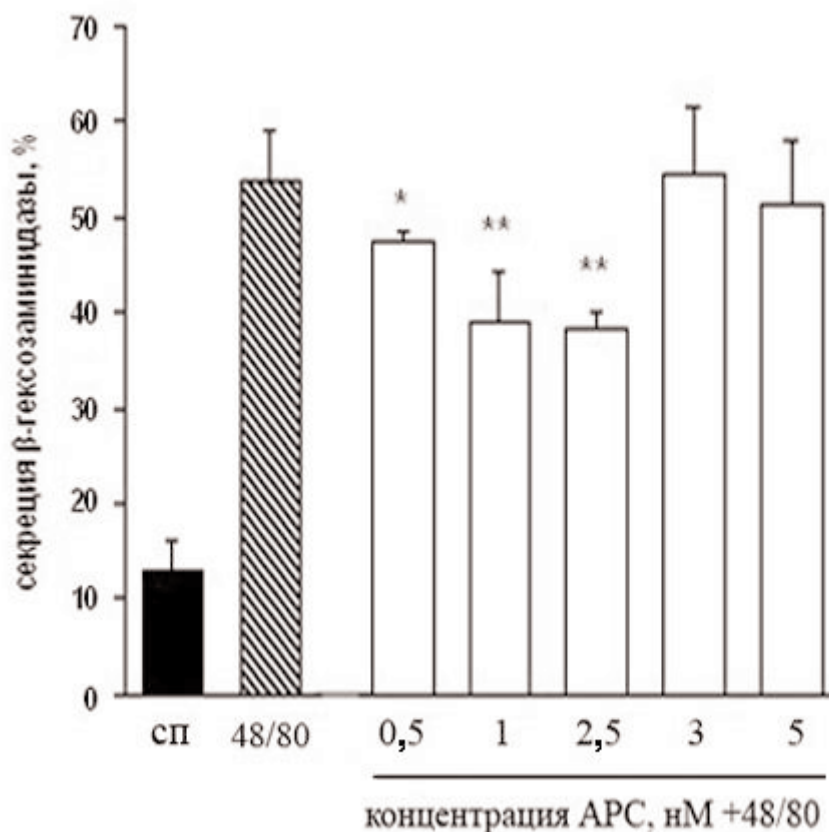


**Рисунок 1.**

Изменение секреции β-гексозаминидазы перитонеальными тучными клетками (ПТК) крысы под действием APC. **А** – ПТК1 (спонтанная секреция  $13,0 \pm 3,1\%$ ), **Б** – ПТК2 (спонтанная секреция  $23,2 \pm 8,0\%$ ). СП - спонтанная секреция β-гексозаминидазы ПТК (контроль), \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$  по отношению к спонтанной секреции,  $n=4$ .

## PAR1 РЕЦЕПТОР И АКТИВАЦИЯ ТУЧНЫХ КЛЕТОК

Во второй серии опытов исследовали влияние APC на секрецию медиатора тучными клетками, активированными дегранулятором - веществом 48/80 [15]. В наших экспериментах вещество 48/80 в концентрации 400 мкг/мл вызвало высокую степень дегрануляции тучных клеток и высвобождение ими  $\beta$ -гексозаминидазы. Под действием вещества 48/80 уровень секреции  $\beta$ -гексозаминидазы составил 53,6% (при спонтанной секреции, равной 13,0%). Установлено, что APC в диапазоне концентраций от 0,5 до 2,5 нМ вызывал достоверное ( $p < 0,01$ ) снижение секреции  $\beta$ -гексозаминидазы тучными клетками, стимулированными веществом 48/80. Более высокие концентрации APC (3 и 5 нМ) не вызывали достоверных изменений индуцированной веществом 48/80 секреции  $\beta$ -гексозаминидазы (рис. 2). Таким образом, APC в узком диапазоне низких концентраций проявляет протекторное действие, снижая секрецию медиатора  $\beta$ -гексозаминидазы тучными клетками, стимулированными веществом 48/80.



**Рисунок 2.**

Изменение вызванной веществом 48/80 секреции  $\beta$ -гексозаминидазы ПТК под действием APC в диапазоне концентраций от 0,5 до 5 нМ (3-7). СП - спонтанная активность ПТК, 48/80 – секреция под действием вещества 48/80 (400 мкг/мл), белые столбцы - прединкубация ПТК с APC в концентрации 0,5, 1, 2,5, 3 и 5 нМ. \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$  по отношению к секреции, вызванной веществом 48/80,  $n=4$ .



Итак, APC регулирует активность тучных клеток, снижая как спонтанную активность ПТК, так и индуцированную либератором - веществом 48/80 активацию клеток. Эффект APC на тучные клетки зависит от их функционального состояния - уровня спонтанной активности. Это свидетельствует о новом аспекте противовоспалительного действия APC – модуляции секреции медиаторов воспаления тучными клетками. В низких концентрациях ( $\leq 1,5$  нМ) APC оказывает защитный эффект на клетки, вызывая снижение секреции  $\beta$ -гексозаминидазы ПТК.

*Влияние десенситизации PAR1 рецепторов тучных клеток на функции APC.* О необходимости протеолитической активности APC для проявления его противовоспалительного действия свидетельствуют эксперименты с APC, ферментативная активность которого была ингибирована PMSF. Блокада с помощью PMSF более 98% протеолитической активности APC по отношению к специфическому хромогенному субстрату S2366 (pyroGlu-Pro-Arg-p-NA) привела к существенному ингибированию способности фермента регулировать секреторную активность тучных клеток. Секреция тучных клеток в ответ на инактивированный APC (1 нМ) составляла  $22,9 \pm 4,9\%$ , что соответствует спонтанной секреции  $\beta$ -гексозаминидазы, равной  $22,8 \pm 3,7\%$ . Активный фермент APC (1 нМ) вызывал достоверное снижение освобождения медиатора до  $14,7 \pm 3,6\%$ . Эти результаты свидетельствуют о том, что действие APC на тучные клетки реализуется благодаря его взаимодействию с протеолитически расщепляемыми рецепторами, по-видимому принадлежащими к подтипу PAR. Эти данные коррелируют с действием APC на эндотелиальные клетки, моноциты и макрофаги [2, 25]. Хотя, следует отметить, что протекторное действие APC на тучные клетки проявляется в значительно меньших концентрациях.

Для выяснения подтипа PAR рецепторов тучных клеток, принимающих участие в реализации эффектов APC, проводили десенситизацию PAR1 тромбином (характерной особенностью рецепторов семейства PAR является их быстрая (минуты) десенситизация после активации протеиназами [26]). Механизм десенситизации хорошо изучен и определяется, с одной стороны, интернализацией активированных рецепторов, а с другой, – толерантностью расщепленных рецепторов к последующим предъявлениям агониста.

Как видно из данных, представленных на рисунке 3, десенситизация PAR1 рецепторов не влияет на стимулированную веществом 48/80 секрецию  $\beta$ -гексозаминидазы. Однако, десенситизация PAR1 тромбином отменяла действие низких концентраций APC на ПТК. Так, если APC в концентрациях 0,6, 1,0 и 1,5 нМ вызывал достоверное ( $p < 0,05$ ) снижение секреции  $\beta$ -гексозаминидазы относительно спонтанного уровня, то после десенситизации PAR1 рецепторов тромбином этот эффект APC отсутствовал (рис. 3). При более высоких ( $> 1,5$  нМ) концентрациях APC не наблюдали достоверного изменения спонтанной секреции клеток и отмены эффекта APC десенситизацией PAR1 рецепторов тромбином, что свидетельствует об опосредованном действии PAR1 только низких концентраций фермента. При высоких концентрациях действие APC реализуется, по-видимому, через другие типы рецепторов. Эти данные могут свидетельствовать о том, что на тучных клетках экспрессированы рецепторы APC с разной афинностью к ферменту, и высокоафинным рецептором APC может служить PAR1.

Таким образом, снижение секреции  $\beta$ -гексозаминидазы под действием APC (0,5-1,5 нМ) на тучные клетки достоверно отменяет десенситизация тромбиновых PAR1 рецепторов, что свидетельствует о PAR1-опосредованном эффекте низких концентраций APC на тучные клетки.

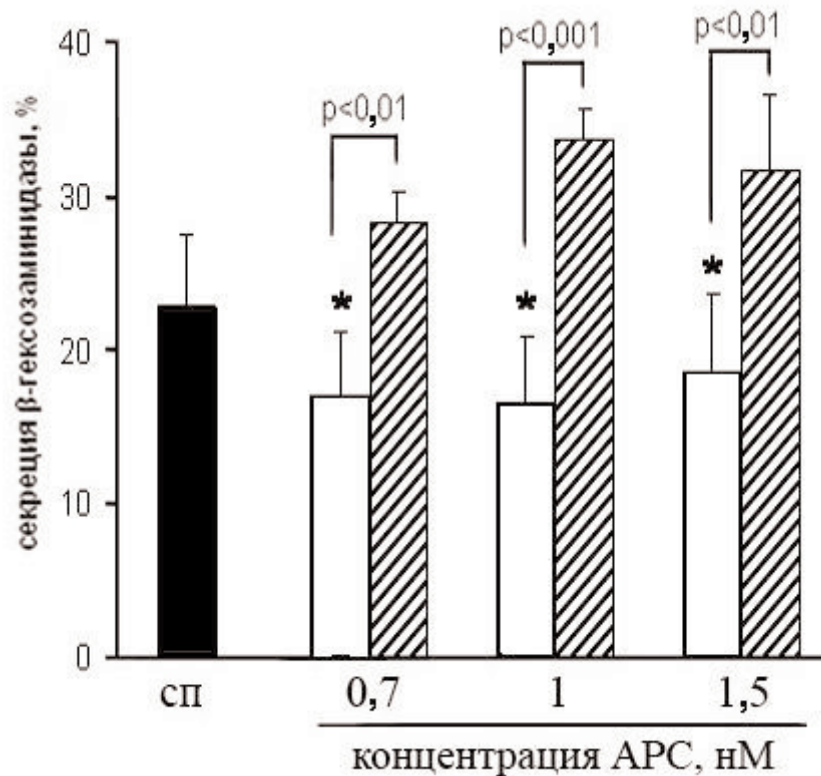


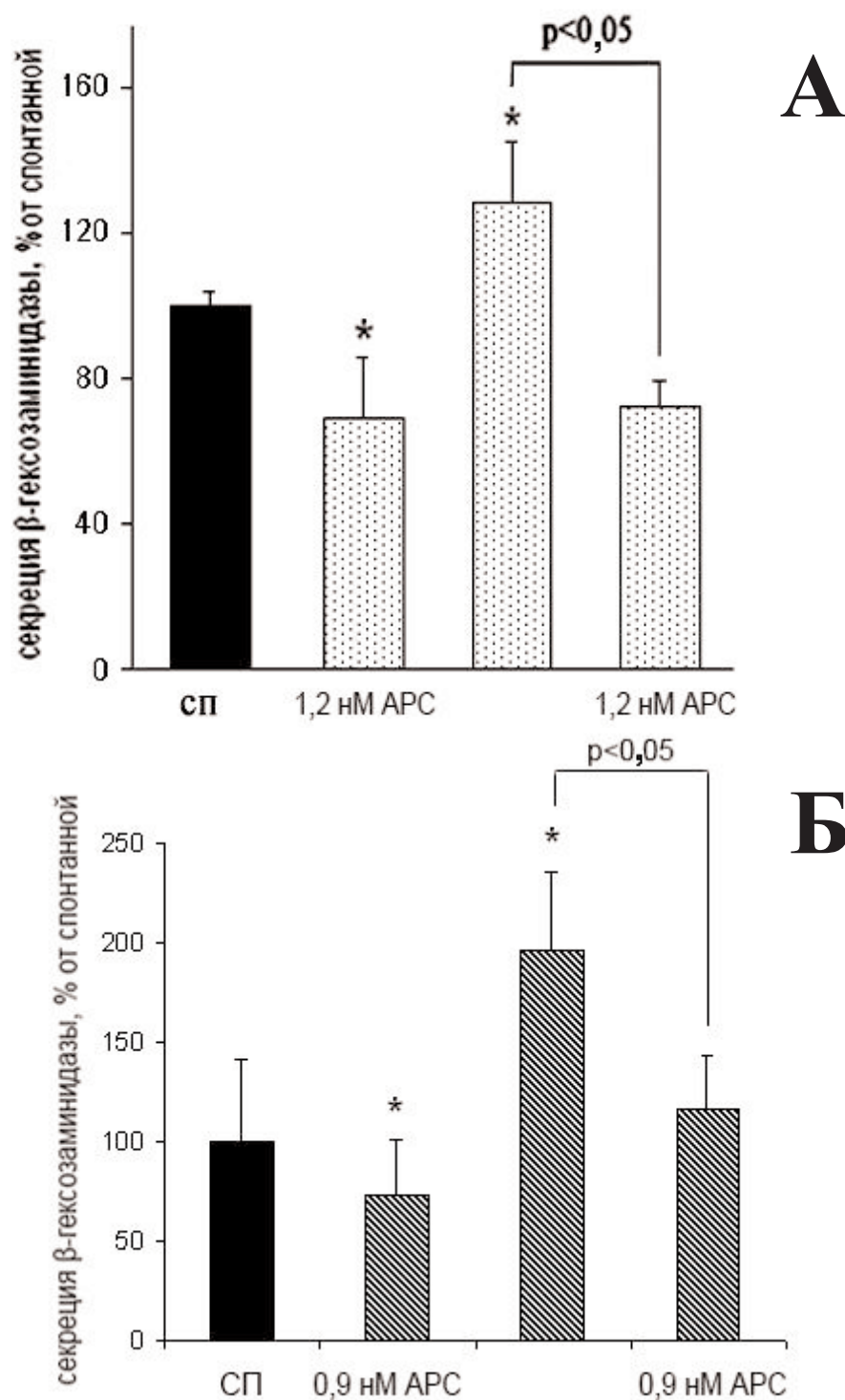
Рисунок 3.

Влияние десенситизации тромбином (100 нМ, 10 мин) PAR1 тучных клеток на вызванную APC секрецию β-гексозаминидазы. Белые столбцы – вызванная APC секреция β-гексозаминидазы без десенситизации, полосатые столбцы – десенситизация PAR1 тромбином. 1 - спонтанная секреция β-гексозаминидазы ПТК (контроль), 2 - вещество 48/80 (400 мкг/мл), 3 – 0,7 нМ, 4 - 1 нМ, 5 - 1,5 нМ, 6 – 3 нМ APC. \* -  $p < 0,05$  по отношению к контролю, # -  $p < 0,05$ , ## -  $p < 0,01$  по отношению к десенсибилизированным ПТК,  $n=4$ .

APC, как регулятор воспалительных процессов, индуцируемых PAR1-AP и дуоденазой. Известно, что при воспалительных заболеваниях желудочно-кишечного тракта повышается экспрессия гена APC и обнаружена экспрессия генов рецепторов EPCR и PAR1 на эпителиальных клетках желудка, вызванная инфицированием *H. pylori* [10].

Для проверки эффекта APC, как регулятора воспалительных процессов, в следующей серии экспериментов мы исследовали провоспалительное действие PAR1-AP и эндогенной сериновой протеиназы двенадцатиперстной кишки – дуоденазы, на тучные клетки. Ранее показано, что PAR1-AP дозозависимо в диапазоне концентраций от 5 до 100 мкМ активирует ПТК, вызывая высвобождение гистамина и β-гексозаминидазы тучными клетками, что свидетельствует о провоспалительных свойствах пептида в этих концентрациях [23]. При исследовании влияния дуоденазы на секреторную активность тучных клеток выявлена положительная дозозависимая корреляция секреции β-гексозаминидазы от концентрации фермента, что так же может указывать на его провоспалительную активность (таблица). Десенситизация тромбиновых рецепторов значительно снижает вызванную дуоденазой секрецию β-гексозаминидазы, что свидетельствует о действии фермента через PAR1 рецептор. На рисунке 4 А, Б видно, что 10-минутная предварительная инкубация ПТК с APC отменяла провоспалительный эффект 50 мкМ PAR1-AP и 80 нМ дуоденазы на тучные клетки, возвращая их к уровню секреции, вызванной APC.





**Рисунок 4.**

Влияние APC на секретацию β-гексозаминидазы перитонеальными тучными клетками (ПТК) крысы, активированными PAR1-АР или дуоденазой.

**А.** 1 - спонтанная секретация β-гексозаминидазы ПТК (принята за 100%), 2 - секретация под действием 50 мкМ PAR1-АР, 3 - секретация под действием 1,2 нМ APC, 4 - влияние предобработки ПТК 1,2 нМ APC на секретацию, вызванную 50 мкМ PAR1-АР.

**Б.** 1 - спонтанная секретация β-гексозаминидазы ПТК (принята за 100%), 2 - секретация под действием 80 нМ дуоденазы, 3 - секретация под действием 0,9 нМ APC, 4 - влияние предобработки ПТК 0,9 нМ APC на секретацию, вызванную 80 нМ дуоденазой.

n=4, # - p<0,05 - по отношению к контролю, \* - p<0,05 - по отношению к секретации, вызванной агонистами.

## PAR1 РЕЦЕПТОР И АКТИВАЦИЯ ТУЧНЫХ КЛЕТОК

Таблица. Изменение секреции  $\beta$ -гексозаминидазы перитонеальными тучными клетками (ПТК) крысы под действием дуоденазы.

Конц. дуоденазы, нМ	секреция $\beta$ -гексозаминидазы, %
0,1	15,1 $\pm$ 1,0
1,0	18,4 $\pm$ 2,6 *
8,0	23,2 $\pm$ 4,0 *
80	36,7 $\pm$ 1,3 **
Спонт. секреция (контроль)	14,1 $\pm$ 2,2

Примечание: \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$  - по отношению к спонтанной секреции (контроль). В каждой серии было по 5 животных.

Вместе с тем, 10-минутная предварительная инкубация ПТК с дуоденазой (8 нМ) отменяла защитный противовоспалительный эффект APC (0,5 нМ) на тучные клетки, возвращая их к уровню спонтанной секреции (рис. 5). Можно предположить, что дуоденаза способна модулировать ответ тучных клеток на APC либо вызывая десенситизацию PAR1-рецепторов, либо гидролиз “привязанного лиганда”, действуя подобно катепсину G [16, 23].

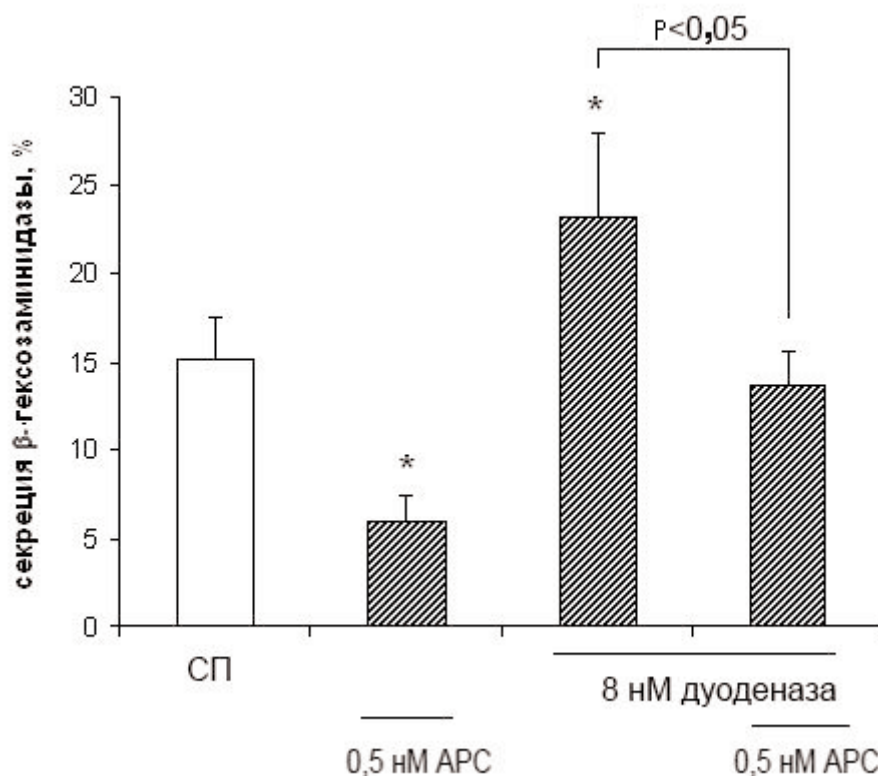


Рисунок 5.

Изменение секреции  $\beta$ -гексозаминидазы ПТК крысы под действием дуоденазы и APC.

1 - спонтанная секреция  $\beta$ -гексозаминидазы ПТК (контроль), 2 - секреция под действием 8 нМ дуоденазы; 3 - секреция под действием APC в концентрации 0,5 нМ. 4 - секреция под действием 0,5 нМ APC после 10-минутной предобработки ПТК 8 нМ дуоденазы; \* -  $p < 0,05$  по отношению к контролю, # -  $p < 0,05$  по отношению к APC,  $n=4$ , где  $n$  - количество животных в эксперименте.

*Вклад оксида азота (NO) в протекторное действие APC на тучные клетки.* Остается неизвестным механизм, лежащий в основе протекторного действия APC на тучные клетки. Известно, что эндогенным регулятором активности ПТК является оксид азота [17, 19], который синтезируется конститутивной и индуцибельной NO-синтазами из аминокислоты L-аргинина [27]. NO активирует растворимую гуанилатциклазу, повышает выработку циклического гуанозинмонофосфата и блокирует секрецию медиаторов воспаления (гистамина и PAF) [28]. Доноры NO и эндогенный NO ингибируют дегрануляцию тучных клеток [29] в ответ на иммунные (IgE) [30, 31] и неиммунные стимулы. Известно, что ингибирование синтеза NO в тучных клетках L-NAME вызывает их дегрануляцию, освобождение гистамина в ответ на вещество 48/80 и усиление проницаемости эндотелия [32], что говорит об увеличении реактивности тучных клеток при блокаде синтеза эндогенного NO [19]. Предварительная обработка тучных клеток относительно низкими концентрациями PAR1-AP до стимуляции их кальциевым ионофором A23187 приводила к снижению агрегации тромбоцитов [33]. Роль протеиназ гемостаза, как регуляторов высвобождения NO клетками, представляется важной при неиммунной активации тучных клеток. Способность NO регулировать освобождение медиаторов из тучных клеток может играть роль во многих патофизиологических условиях. При сосудистых патологиях с дисфункцией синтеза NO (таких как атеросклероз, реперфузионные повреждения) нарушения могут быть частично связаны с повышенной реактивностью тучных клеток.

Мы предположили, что обнаруженное нами снижение секреции  $\beta$ -гексозаминидазы под действием APC может быть обусловлено освобождением тучными клетками эндогенного NO. Для проверки этого предположения ПТК предварительно инкубировали 30 мин с 300 мкМ L-NAME – блокатором NO-синтазы. Действительно, предобработка тучных клеток L-NAME до добавления APC (в диапазоне концентраций от 0,5 нМ до 5 нМ) приводила к достоверному повышению ( $p < 0,01$ ) секреции  $\beta$ -гексозаминидазы относительно индуцированного APC уровня секреции (рис. 6 А, Б). Таким образом, APC модулирует секреторную активность тучных клеток, вызывая освобождение эндогенного NO, блокирующего секрецию медиаторов. Действие APC отменяется предварительной инкубацией ПТК с L-NAME.

Вызванное APC снижение секреции медиатора тучными клетками, обработанными веществом 48/80, также как и в случае действия APC на не активированные ПТК, так же может быть обусловлено освобождением NO. Об этом свидетельствует тот факт, что предварительная 30-минутная инкубация ПТК с L-NAME отменяла эффект снижения секреции  $\beta$ -гексозаминидазы под действием APC на активированные веществом 48/80 тучные клетки [34].

Анализ двух групп тучных клеток, различающихся по уровню спонтанной активности, показал, что только тучные клетки с высокой спонтанной активностью способны высвобождать NO. Предобработка ПТК1 (с низкой спонтанной активностью) L-NAME не влияла на секрецию медиаторов этой группой клеток, что свидетельствует о низком уровне освобождения ими NO (рис. 6 А). ПТК2 (с высокой спонтанной активностью) вырабатывали оксид азота, о чём свидетельствует достоверное ( $p < 0,05$ ) повышение секреции  $\beta$ -гексозаминидазы в присутствии L-NAME в этой группе тучных клеток с 23,25% до 31,59% (рис. 6 Б).

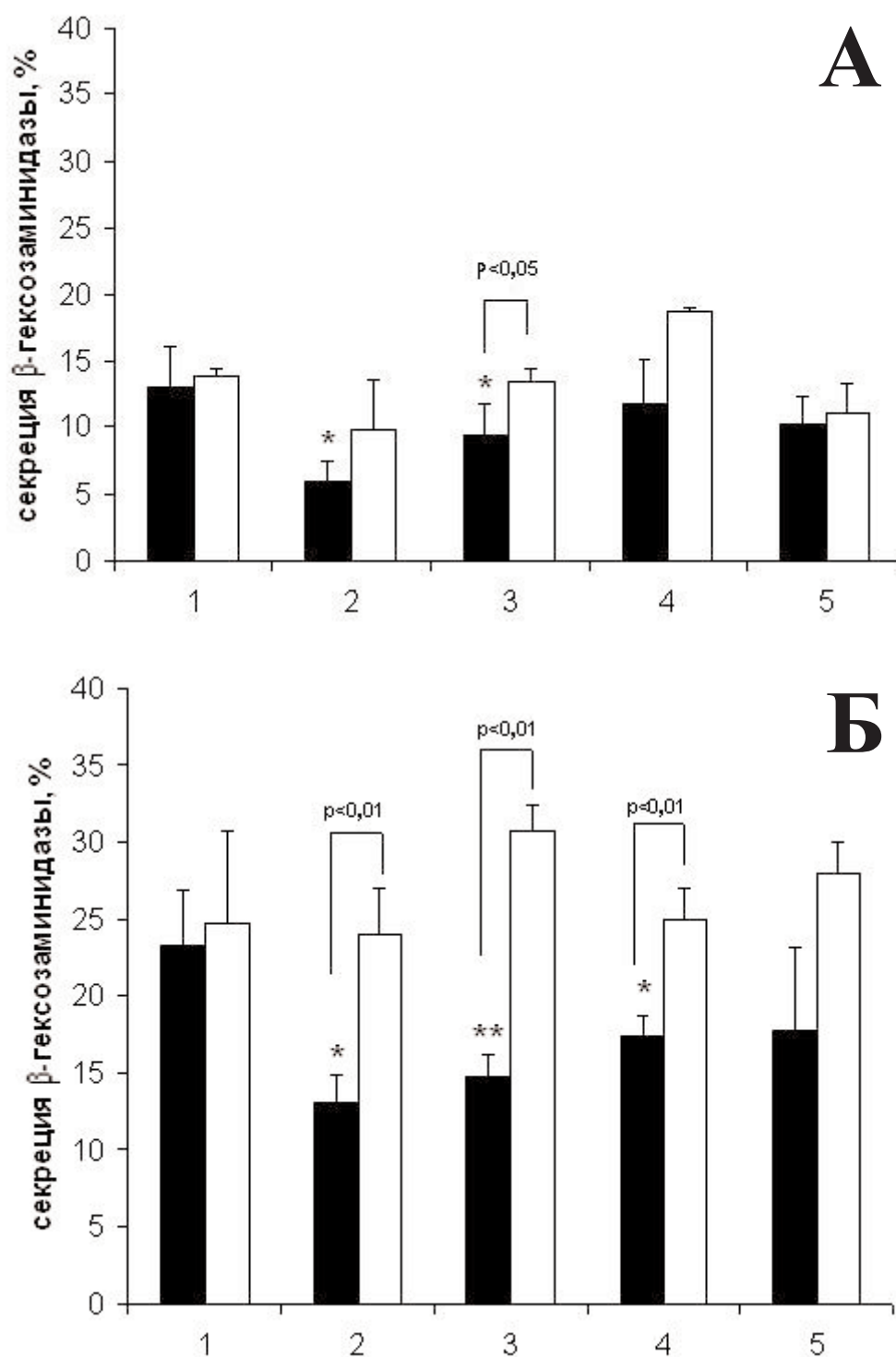


Рисунок 6.

Изменение секреции β-гексозаминидазы перитонеальными тучными клетками (ПТК) крысы под действием APC и влияние 30-минутной прединкубации ПТК с L-NAME (300мкМ) на секрецию β-гексозаминидазы; А – ПТК1 (спонтанная секреция 13,0±3,1%), Б – ПТК2 (спонтанная секреция ПТК 23,2±8,0%). Черные столбцы - действие APC, белые столбцы - прединкубация ПТК с L-NAME и последующее действие APC. 1 - спонтанная секреция β-гексозаминидазы ПТК (контроль), 2 - секреция под действием APC в концентрации 0,5 нМ, 3 – 1 нМ, 4 – 2,5 нМ, 5 – 5 нМ; \* -  $p < 0,05$  по отношению к контролю (1), # -  $p < 0,05$ , ## -  $p < 0,01$  по отношению к действию APC без L-NAME,  $n=4$ .

Эти данные подтверждают эксперименты на модели индуцированной ADP агрегации тромбоцитов в присутствии тучных клеток, т.к. известно, что NO блокирует агрегацию тромбоцитов, а PAF служит мощным ее стимулятором [19]. Так, ПТК1 предварительно проинкубированные с 10 мкМ PAR1-AP вызывали повышение агрегации тромбоцитов и этот эффект сохранялся в течение 15 мин (рис. 7 А). Это свидетельствует об освобождении PAF из ПТК1 в ответ на PAR1-AP, поскольку специфический блокатор рецепторов PAF - гинголид В отменял этот эффект [17]. Обработка группы клеток ПТК2 10 мкМ PAR1-AP приводила к снижению агрегации тромбоцитов (рис. 7 Б), что свидетельствует о продукции ими NO, ингибирующего секрецию тучными клетками PAF и тем самым снижающего агрегацию тромбоцитов.

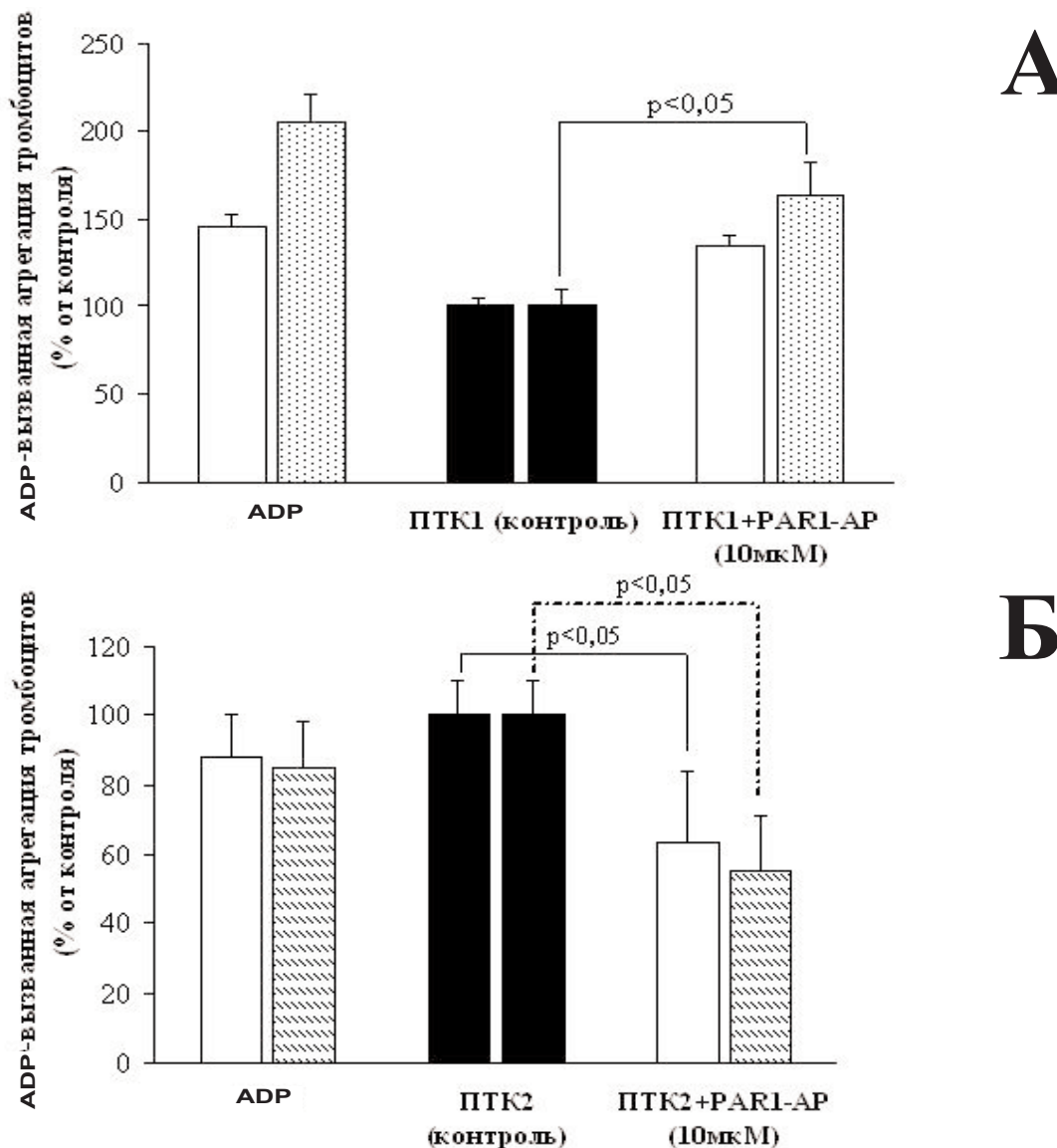


Рисунок 7.

Влияние PAR1-AP (10 мкМ) на индуцированную ADP агрегацию тромбоцитов в присутствии тучных клеток с разной спонтанной активностью. 10 мкл суспензии тучных клеток ( $1-5 \times 10^4$ ), прединкубированных (10 мин, 37°C) с PAR1-AP, помещали в кювету с плазмой (300 мкл), инкубировали в течение 1 мин при 37°C и индуцировали агрегацию добавлением ADP.

А - ПТК1 (спонтанная секреция  $13,0 \pm 3,1\%$ ), Б - ПТК2 (спонтанная секреция ПТК  $23,2 \pm 8,0\%$ ).

Значение агрегации в присутствии ПТК (не обработанных PAR1-AP), принято за 100% (контроль). Белые столбцы - средний радиус агрегатов, штрихованные столбцы - максимальный наклон кривой агрегации,  $n = 4$ .



Таким образом, APC-вызванное снижение секреции спонтанно активированных и активированных веществом 48/80 тучных клеток отменяется предварительной инкубацией их с L-NAME, что свидетельствует об освобождении клетками эндогенного NO в присутствии APC. Эти данные подтверждают эксперименты на модели индуцированной ADP агрегации тромбоцитов.

Мы показали, что в присутствии APC повышается освобождение эндогенного NO, блокирующего высвобождение медиаторов тучными клетками, и этот эффект отменяется предварительной инкубацией ПТК с L-NAME. Таким образом, APC, взаимодействуя с PAR1 рецептором, стимулирует образование NO и служит неиммунным регулятором активности тучных клеток. По-видимому, в присутствии APC происходит стабилизация ПТК, что в свою очередь подтверждает факт противовоспалительного действия APC на клетки.

Полученные данные свидетельствуют о том, что APC в узком диапазоне низких концентраций оказывает противовоспалительное действие, которое реализуется через PAR1 - опосредованную регуляцию активности тучных клеток.

Работа поддержана грантами РФФИ (проекты N04-04-48513, 05-04-48725).

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Bunnett N.W.* (2006) *Semin. Thromb. Hemost.*, **32**, 39-48.
2. *Strukova S.* (2006) *Front. Biosci.*, **11**, 59-80.
3. *Dahlback B., Villoutreix B.O.* (2005) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **25**, 1311-1320.
4. *Esmon C.T.* (2005) *Inflammation and Haemostasis*, **33**, 401-405.
5. *Mosnier L.O., Griffin J.H.* (2006) *Front. Biosci.*, **11**, 2381-2399.
6. *Esmon C.T.* (2003) *Chest*, **124**, 26S-32S.
7. *Riewald M., Ruf W.* (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 19808-19814.
8. *Feistritzer C., Schuepbach R.A., Mosnier L.O., Bush L.A., Di Ceras E., Griffin J.H., Riewald M.* (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 20077-20084.
9. *Струкова С.М.* (2004) *Биохимия*, **69**, 1314-1331.
10. *Nakamura M., Gabazza E.C., Imoto I., Yano Y., Taguchi O., Horiki N., Fukudome K., Suzuki K., Adachi Y.* (2005) *J. Thromb Haemost.*, **3**, 2721-2729.
11. *Faioni E.M., Ferrero S., Fontana G., Gianelli U., Ciulla M.M., Vecchi M., Saibeni S., Biguzzi E., Cordani N., Franchi F., Bosari S., Cattaneo M.* (2004) *Critical Care Medicine*, **32**, 266-270.
12. *Isobe H., Okajima K., Harada N., Liu W., Okabe H.* (2004) *J. Thromb. Haemost.*, **2**, 313-320.
13. *Ludeman M.J., Kataoka H., Srinivasan Y., Esmon N., Esmon C.T., Coughlin S.R.* (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 13122-13128.
14. *Nishikawa H., Kawabata A., Kuroda R., Nishida M., Kawai K.* (2000) *Jap. J. Pharmacol.*, **82**, 74-77.
15. *Metcalfe D.D., Baram D., Mekori Y.A.* (1997) *Physiol. Rev.*, **77**, 1033-1079.
16. *Dugina T.N., Kiseleva E.V., Glusa E., Strukova S.M.* (2003) *Eur. J. Pharmacol.*, **471**, 141-147.
17. *Strukova S.M., Chistov I.V., Umarova B.A., Dugina T.N., Storozhevyykh T.P., Pinelis V.G., Glusa E.* (1999) *Biochemistry*, **64**, 658-664.
18. *Умарова Б.А., Дугина Т.Н., Шестакова Е.В., Глуза Э., Струкова С.М.* (2000) *Бюлл. экспер. биол. мед.*, **5**, 370-373.
19. *Salvemini D., Masini E., Anggard E., Mannaioni P.F., Vane J.R.* (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **169**, 596-601.
20. *Thon I.L., Uvnas B.* (1967) *Acta. Physiol. Scand.*, **71**, 303-315.
21. *Макарова А.М., Замолотчикова Т.С., Руми Л.Д., Струкова С.М.* (2007) *Биоорганическая химия*. (в печати).
22. *Schwartz L.B., Austen K.F., Wasserman S.I.* (1982) *J. Immunol.*, **123**, 1445-1450.

23. Дугина Т.Н., Киселева Е.В., Чистов И.В., Умарова Б.А., Струкова С.М. (2002) Биохимия, **67**, 77-87.
24. Aridor M., Raimilevich G., Beaven M.A., Sagi-Eisenberg R. (1993) Science, **262**(5139), 1569-1572.
25. Ruf W., Dorfleutner A., Riewald M.J. (2003) J. Thromb. Haemost., **1**, 1495-1503.
26. Brass L.F. (1997) Coron Artery Dis., **8**, 49-58.
27. Hogaboam C., Befus A., Wallace J. (1993) J. Immunol., **151**, 3767-3774.
28. Iikira M., Takaishi T., Hirai K., Yamada H., Iida M., Koshino T., Morita Y. (1998) Int. Arch. Allergy Immunol., **115**, 129-136.
29. Koranteng R.D., Dearman R.J., Kimber I., Coleman J.W. (2000) Inflamm. Res., **49**, 240-246.
30. Eastmond N.C., Banks E.M.S., Coleman J.W. (1997) J. Immunol., **159**, 1444-1450.
31. Deschoolmeester M.L., Eastmond N.C., Dearman R.J., Kimber I., Basketter D.A., Coleman J.W. (1999) Immunology, **96**, 138-144.
32. Gaboury J., Woodman R.C., Granger D.N., Reinhardt P., Kubes P. (1993) Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol., **265**, H862-H867.
33. Струкова С.М., Чистов И.В., Умарова Б.А., Дугина Т.Н., Сторожевых Т.П., Пинелис В.Г., Глуза Э. (1999) Биохимия, **64**, 70-78.
34. Макарова А.М., Русанова А.В., Горбачева Л.Р., Умарова Б.А., Струкова С.М. (2006) Бюлл. эксп. биол. мед., **142**, 382-386.

Поступила: 26. 10. 2006.

#### THE ROLE OF PAR1 IN PROTECTIVE ACTION OF ACTIVATED PROTEIN C UNDER NON-IMMUNE MAST CELL ACTIVATION

A.M. Makarova<sup>1</sup>, L.R. Gorbacheva<sup>1</sup>, T.S. Zamolodchikova<sup>2</sup>, L.D. Rumsh<sup>2</sup>, M. Smirnov<sup>3</sup>, S.M. Strukova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Human and Animal Physiology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119992, Russia; tel.: 939-14-16; e-mail: Strukova@mail.ru

<sup>2</sup>Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Miklukho-Maklaya ul., 16/10, Moscow, 117997 Russia.

<sup>3</sup> Instrumentation Lab., Orangeburg, NY, USA

Activated protein C (APC) regulates the functional activity of mast cells by reducing release of  $\beta$ -hexosaminidase, the marker of mast cell degranulation. APC could modulate the cell secretion of both: the rest mast cells and the activated cells with degranulators, such as proteinase-activated receptor agonist peptide (PAR1-AP) and compound 48/80. PAR1 desensitization with thrombin abolishes the effect of low APC concentration ( $\leq 1.5$  nM) on  $\beta$ -hexosaminidase release by mast cells. APC, inactivated with phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), did not mimic the enzyme action on mast cells. The duodenal proteinase, duodenase, activates the peritoneal mast cell via PAR1. APC abolishes the proinflammatory action of duodenase and PAR1-AP by means of reducing release of mast cell mediators. Pretreatment of mast cell with L-NAME abolished these APC effects. Thus, APC-induced decrease of mediator release could be attributed to NO generation by mast cells. Our data indicate that PAR1 takes part in the mechanism of regulatory anti-inflammatory APC action.

**Key words:** activated protein C, duodenase, proteinase activated receptors, mast cells,  $\beta$ -hexosaminidase secretion, nitric oxide, inflammation.