

ВЛИЯНИЕ ОКИСЛЕННЫХ ЛИПОПРОТЕИНОВ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ НА АДФ-ИНДУЦИРОВАННУЮ АГРЕГАЦИЮ ТРОМБОЦИТОВ В ПЛАЗМЕ.

ВЛАСОВА И.И., ВАХРУШЕВА Т.В., АЗИЗОВА О.А., ЛОПУХИН Ю.М.

НИИ физико-химической медицины, М.Пироговская 1а, г. Москва, 119828.

Изучение эффектов окисленных липопротеинов на активность тромбоцитов необходимо для понимания процессов тромбообразования при атеросклерозе. В настоящей работе исследовано влияние липопротеинов низкой плотности (ЛНП) на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов в богатой тромбоцитами плазме (БТП). Показано, что смешивание плазмы с ЛНП сопровождается уменьшением параметров АДФ-индуцированной агрегации клеток по сравнению с контролем (смешивание с буфером). После одного часа инкубации АДФ-агрегация тромбоцитов в смеси, содержащей окисленные ЛНП, превышает агрегацию в контрольной пробе. Охарактеризованы зависимости параметров агрегации от времени инкубации липопротеинов и клеток и от степени окисления ЛНП. Не обнаружено изменений содержания холестерина и фосфолипидов в мембранах тромбоцитов после инкубации клеток с буфером, нативными или окисленными ЛНП. Следовательно, изменение агрегируемости клеток не связано с накоплением избыточного холестерина в мембранах тромбоцитов в результате инкубации БТП с окисленными ЛНП.

Ключевые слова: тромбоциты, агрегация, окисленные липопротеины низкой плотности, холестерин, фосфолипиды.

ВВЕДЕНИЕ. В настоящее время активно изучается роль окисленных липопротеинов в развитии атеросклероза. Было обнаружено, что окисленные ЛНП вызывают повреждение эндотелиальных клеток, индуцируют хемотаксис моноцитов к сосудистой стенке, способствуют превращению моноцитов в макрофаги и макрофагов в пенные клетки [1]. Окисленные липопротеины, находясь в кровотоке, могут взаимодействовать с клетками крови: нейтрофилами, эритроцитами, тромбоцитами. В работах [2,3] показано, что окисленные ЛНП могут стимулировать агрегацию тромбоцитов, тогда как для нативных липопротеинов авторы такого эффекта не наблюдали. Известно, что ЛНП взаимодействуют со специальными рецепторами на поверхности тромбоцитов [4,5], что приводит к запуску механизма активации клеток [6] и возникновению вторичного клеточного ответа - агрегации. Есть противоречия в литературных данных по вопросу о том, какие именно биохимические механизмы клетки включаются при связывании ЛНП с рецептором и как это отражается на состоянии тромбоцитарной мембраны [2,7]. Использование флуоресцентных зондов позволило авторам работы [2] сделать предположение, что ЛНП-активация клеток происходит за счет изменения состояния плазматической мембраны тромбоцитов. Ранее было обнаружено, что агрегируемость тромбоцитов зависит от содержания холестерина в клеточной мембране [8]. Известно также, что агрегируемость тромбоцитов при атеросклерозе повышена, и в их мембранах содержится избыток холестерина [9].

Изучение влияния ЛНП на тромбоциты проводят, главным образом, на изолированных клетках. Это облегчает интерпретацию результатов. Следующим этапом, приближающим к условиям *in vivo*, является изучение влияния липопротеинов на агрегируемость тромбоцитов в богатой тромбоцитами плазме (БТП) [10,11]. В работе [11] авторы обнаружили активирующее воздействие ЛНП на серотонин-стимулированную агрегацию тромбоцитов в плазме. Зарегистрирована активация коллаген-стимулированной агрегации тромбоцитов в плазме микроколичествами окисленных ЛНП и ингибирование агрегации продуктами окисления [12]. С помощью метода фильтрационной агрегометрии удалось обнаружить активирующее воздействие ЛНП на агрегацию тромбоцитов в цельной крови [13].

В наших предыдущих исследованиях было показано, что ЛНП способны стимулировать агрегацию изолированных тромбоцитов в присутствии Ca^{2+} и фибриногена [14]. Получены зависимости параметров агрегации от концентрации нативных и окисленных ЛНП, а также от степени окисления липидов в ЛНП. В настоящей работе исследовано влияние нативных и окисленных ЛНП на свойства тромбоцитов в БТП. В качестве параметров, характеризующих изменение свойств тромбоцитов при их взаимодействии с липопротеинами, были выбраны:

- агрегируемость клеток, измеряемая как изменение светопропускания разбавленной БТП после добавления индуктора - АДФ;
- соотношение содержания холестерина и фосфолипидов (ХС/ФЛ) в клеточных мембранах.

МЕТОДИКА *Выделение ЛНП.* ЛНП выделяли из сыворотки здоровых доноров методом препаративного ультрацентрифугирования [15]. При выделении тех ЛНП, которые использовались в экспериментах как нативные и окисленные в присутствии ионов меди, в среду выделения добавляли 0,01% ЭДТА. ЛНП, подлежащие автоокислению, выделяли без ЭДТА. Полученные ЛНП хранили при температуре 4°C и использовали в течение двух суток. Концентрацию ЛНП характеризовали по содержанию белка в растворе. Белок определяли с помощью микробиуретового метода ($\pm 0,3$ мг/мл) [16]. Оптические спектры регистрировали на спектрофотометре фирмы "Beckman".

Окисление ЛНП. ЛНП диализовали в течение суток в два этапа против 100- и 1000-кратного объема 10мМ трис-НСl буфера, рН 7,4, содержащего 140мМ NaCl и 5мМ KCl. ЛНП, подлежащие окислению, ставили на диализ за двое суток до эксперимента; нативные ЛНП ставили на диализ - за сутки до начала эксперимента. Автоокисление липопротеинов, выделенных без ЭДТА, осуществляли путем их инкубации при 37°C в аэробных условиях в течение разных интервалов времени (от 4 до 18 часов). Автоокисленные до начала эксперимента ЛНП хранились в холодильнике при 4°C не дольше 12 часов. Так как высокие концентрации ЛНП плохо автоокисляются, для получения высоких степеней окисления выделенные в присутствии ЭДТА ЛНП инкубировали при 37°C с 5мкМ CuSO_4 в течение 6 или 12 часов. Степень окисления ЛНП оценивали по накоплению в них продуктов, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой, и характеризовали как нмоль малонового диальдегида (МДА) на 1мг белка ЛНП [17,18]. Нативными липопротеинами мы называем ЛНП в которых концентрация МДА не превышает 0,5нмоль/мг белка. ЛНП, подвергнутые автоокислению, обозначены в тексте статьи как "окЛНП"; ЛНП, окисленные в присутствии ионов Cu^{2+} , - "медь-окисленные ЛНП".

Пробы для определения концентрации ЛНП и степени их окисления отбирали непосредственно перед смешиванием БТП и ЛНП.

Инкубация БТП с буфером или раствором ЛНП. БТП получали из венозной крови здоровых доноров, смешанной с цитратом-Na (130мМ) в соотношении 1:10, с помощью

центрифугирования при 100g в течение 15 минут. Концентрация тромбоцитов в БТП составляла 2×10^8 кл/мл. Концентрация ЛНП в неразбавленной БТП - (0,3-1,2) мг белка/мл при смешивании проб уменьшается). Концентрация добавленных ЛНП должна быть выше этих значений. Исходная концентрация выделенных ЛНП составляла (3.5 ± 1) мг белка/мл. Поэтому к БТП добавляли раствор ЛНП или диализного трис-буфера (в случае контрольной пробы) в объемном соотношении 1:1. Перед смешиванием образцов к раствору липопroteinов или буфера добавляли в объемном соотношении 20:1 буфер следующего состава (мМ): HEPES - 200, $MgCl_2$ - 20, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ - 7,6, глюкоза - 200, pH 7,4 (концентрированный TIRODE без NaCl и KCl). Каждый эксперимент выполнен для разных доноров ЛНП и БТП. Инкубацию БТП с раствором ЛНП проводили при температуре 37°C. Все использованные реактивы — фирмы "Sigma".

Наличие в наших экспериментах контрольной смеси, а также тот факт, что основные результаты получены для окЛНП, позволяет утверждать, что наблюдаемые в статье эффекты являются следствием влияния именно добавленных ЛНП на свойства БТП.

Пробы для инкубации готовили последовательно. Смешивание каждой следующей пробы проводили сразу после измерения активности предыдущей. В каждом эксперименте инкубировали, как правило, три смеси: контроль, БТП с нативными или с окЛНП.

Ограничения на количество проб были следующие:

1. Основные изменения агрегируемости клеток происходят в течение первого часа инкубации, поэтому в этом интервале измерять кривые агрегации для каждой из смесей надо как можно чаще (делали по 1-2 измерения для каждой пробы).
2. Время хранения неразбавленной БТП в процессе последовательного смешивания проб в начале эксперимента должно быть существенно меньше, чем время проведения эксперимента. Время регистрации одной кривой агрегации 3 - 5 мин. Для измерения агрегируемости клеток сразу после смешивания делали 2-3 повтора для каждой пробы.

Измерения АДФ-агрегации в инкубационных смесях осуществляли последовательно через равные промежутки времени, считая от момента приготовления каждой смеси. Образцы для измерения агрегации отбирали из смеси в соответствии со временем, указанным в тексте и рисунках. В течение первых полутора часов инкубации измерения АДФ-агрегации проводили так часто, как это позволяло количество проб. Далее агрегируемость БТП определяли, как правило, через 2,3 и 4 часа инкубации, а для каждого измерения делали не менее трех повторов.

Все основные выводы работы сделаны в предположении, что автоокисленные ЛНП не влияют на окислительные процессы в тромбоцитах благодаря антиоксидантным свойствам плазмы и малым степеням окисления автоокисленных ЛНП.

Измерения агрегации тромбоцитов. В эксперименте регистрировали агрегацию клеток, которая определяется как изменение светопропускания БТП от времени после добавления к ней индуктора агрегации - АДФ в концентрации 5мкМ. Полученные зависимости мы называем кривыми агрегации. Измерения проводили на автоматизированном анализаторе агрегации тромбоцитов (НПФ "Биола", Москва) [19]. Условия измерений: 37°C, скорость перемешивания 800об/мин, объем пробы - 300мкл. В качестве параметров кривой агрегации выбраны:

- Максимальное значение скорости изменения светопропускания суспензии тромбоцитов, которое называем скоростью агрегации - "V". Скорость агрегации определяется тангенсом угла наклона касательной к кривой светопропускания.

- Максимальная амплитуда кривой светопропускания - "A".

Изменения амплитуды кривых светопропускания более наглядны, однако, этот параметр характеризуется большей ошибкой измерений ($\sigma = 25\%$ - среднеквадратичная ошибка для измерений амплитуды, $\sigma = 10\%$ - для скорости светопропускания).

Для характеристики изменений кривых агрегации в результате инкубации использовали следующие величины:

1. $\Delta V(\%)$ - изменения скорости агрегации клеток в смеси через некоторое время инкубации (t) в % относительно скорости агрегации тромбоцитов в этой же смеси в начальный момент времени:

$$\Delta V = \frac{V^t - V^{t=0}}{V^{t=0}} \cdot 100\% \text{ — относительные изменения скорости агрегации,}$$

где V^t — скорость агрегации клеток в пробе через время инкубации t ,

$V^{t=0}$ — скорость агрегации клеток сразу после смешивания БТП с буфером или ЛНП.

Аналогично вводится параметр $\Delta A(\%)$, характеризующий изменения амплитуды кривой агрегации.

2. Эксперименты разных дней сопоставляли, используя параметр ΔV^* :

$$\Delta V^* = (\Delta V_{\text{ЛНП}} / \Delta V_K)^{t=2},$$

где $\Delta V_{\text{ЛНП}}$ - относительные изменения скорости агрегации тромбоцитов в пробе, содержащей ЛНП, через 2 часа инкубации, ΔV_K - аналогичные изменения в контрольной пробе. Иначе говоря, в каждом эксперименте относительное изменение скорости агрегации в контрольной пробе через два часа инкубации (ΔV_K , $t=2\text{ч}$) было принято за "1", изменения параметра в других пробах рассчитывались как доля изменений от контроля. Это оправдано тем, что временные изменения агрегируемости в пробах, в том числе и в контроле, зависят от индивидуальных особенностей клеток и отличаются в разных экспериментах. Поэтому сопоставить результаты разных опытов можно лишь устранив эти индивидуальные особенности за счет нормирования на изменения в контроле.

Измерение ХС/ФЛ индекса тромбоцитарных мембран (отношение содержания холестерина и фосфолипидов в мембранах) проводили согласно методике [20-22] для трехкратно отмытых тромбоцитов. Первую отмывку проводили после добавления к инкубационной смеси АСД (рН 4,5) в объемном соотношении 1:10, 2 мМ ЭДТА и 80ед/мл апиразы. Центрифугирование осуществляли при 350g в течение 10 мин. Клетки ресуспендировали в TIRIDE pH 6.7 ((мМ) - HEPES - 10, NaCl - 138, KCl - 5, MgCl_2 - 1, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 0,38, глюкоза - 10). Две последующие отмывки проводили после добавления к клеточной суспензии PGE1 в концентрации 100мкМ. Отмытые клетки ресуспендировали в TIRIDE того же состава, pH 7.4. Конечная концентрация клеток в суспензии составляла $1-2 \times 10^9$ клеток/мл. Для определения ХС/ФЛ индекса готовили по две независимые пробы для клеток, инкубированных с буфером или ЛНП, добавляя к 0,5мл суспензии клеток 3мл смеси хлороформа и метанола [20]. Значения ХС/ФЛ индекса получены на основе результатов трех независимых экспериментов. Различия в степени окисления ЛНП в пробах разных дней не учитывались при обработке результатов эксперимента.

Для анализа результатов экспериментов использовали t-критерий Стьюдента и корреляционный анализ [23]. Для всех численных значений параметров агрегации рассчитана среднеквадратичная ошибка (σ). Обработку данных осуществляли с помощью программы "Excel" на компьютере IBM PC/AT (386).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. На рис.1 приведены кривые АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов, инкубированных в составе БТП с буфером (контроль), нативными и окисленными ЛНП в течение времени, указанного на рисунках. Это типичный пример влияния нативных, автоокисленных и медь-окисленных ЛНП на параметры АДФ-агрегации клеток.

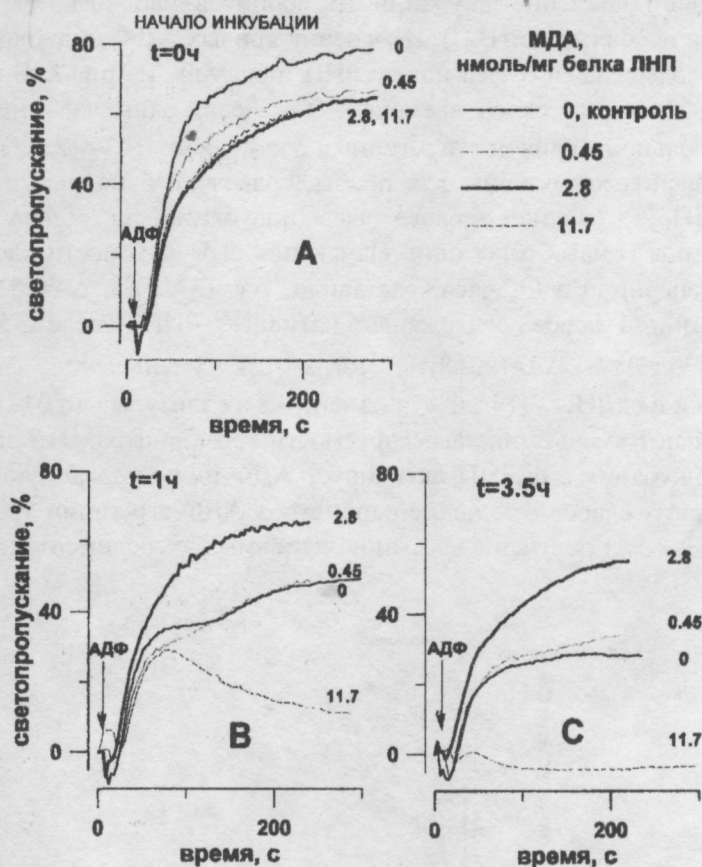


Рисунок 1

Зависимости светопропускания суспензии тромбоцитов от времени (кривые агрегации) после добавления индуктора агрегации - АДФ. Тромбоциты преинкубированы в составе БТП с буфером (контроль) или ЛНП с разными степенями окисления в течение 0 часов (А), 1 часа (В), 3,5 часов (С).

БТП смешивается с раствором ЛНП или буфером как $v:v=1:1$. Исходный раствор ЛНП: 3,6 мг белка/мл в 10мМ трис-НСl, 10мМ TIRODE pH 7.4. Степени окисления ЛНП: 0; 0,45; 2,8; 11,7 (МДА нмоль/мг белка). В БТП 2×10^8 клеток/мл. Температура инкубации и измерений 37°C .

Стрелкой указан момент добавления 5мкМ АДФ.

Сразу после смешивания ОТП с ЛНП происходит существенное уменьшение агрегируемости клеток по сравнению с пробой, к которой добавлен буфер (рис.1А). Этот эффект не зависит от степени окисления ЛНП. Изменения скорости агрегации в пробах, к которым добавлены липопротейны, составляют 15-20% по сравнению с аналогичным параметром, характеризующим контрольную пробу. Величина эффекта не зависит также от концентрации ЛНП в пределах используемых значений. Однако, для нативных ЛНП в диапазоне концентраций от 0 до 0,7мг белка/мл смеси наблюдалась линейная зависимость начального уменьшения параметров кривой агрегации от концентрации ЛНП в суспензии тромбоцитов. Такие концентрации сравнимы с количеством собственных ЛНП в плазме и

мало влияют на активность клеток. Кроме того, обнаружено, что величина эффекта начального уменьшения амплитуды одинакова, если концентрация АДФ составляет 1 мкМ, 2,5 мкМ и 5 мкМ. Следовательно, ЛНП не ингибируют связывание АДФ с рецепторами. Однако, связывание ЛНП на поверхности клеток приводит к таким изменениям клеточной мембраны, при которых АДФ-индуцированный ответ становится меньше.

С увеличением времени инкубации тромбоцитов наблюдаются разные изменения кривых агрегации в пробах, (рис. 1В,С). Изменения кривых АДФ-индуцированной агрегации суспензии клеток, содержащей буфер или окЛНП, показаны на рис.2. В контрольной пробе активность клеток уменьшается со временем. Так через один час инкубации изменения параметров контрольной кривой агрегации составляли: $\Delta V=(23\pm3)\%$, $\Delta A=(38\pm10)\%$. Аналогичные изменения характерны для пробы, содержащей нативные ЛНП. Для пробы, содержащей окЛНП, в течение первого часа инкубации не обнаружено достоверных изменений параметров кривых агрегации. Изменения агрегируемости клеток в контрольной пробе за время эксперимента (3,5 часа) составили: $\Delta V=(37\pm7)\%$, $\Delta A=(62\pm30)\%$. Изменения параметров агрегации в пробе, содержащей нативные ЛНП, после 3.5 часов инкубации следующие: $\Delta V=(34\pm6)\%$, $\Delta A=(20\pm8)\%$, тогда как уменьшение скорости агрегации тромбоцитов в смеси с окЛНП - $(14\pm3)\%$, а изменение амплитуды - $(8.0\pm2)\%$. Таким образом, окЛНП предотвращают уменьшение агрегируемости тромбоцитов. Эти данные свидетельствуют о том, что инкубация с окЛНП активирует АДФ-индуцированную агрегацию клеток. Аналогичный эффект - слабое изменение параметров АДФ-агрегации тромбоцитов в пробе, содержащей окЛНП, - был получен в восьми независимых экспериментах.

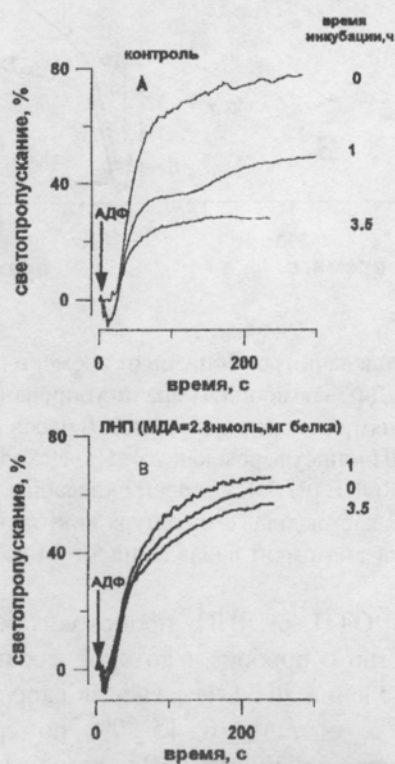


Рисунок 2

Изменения кривых агрегации тромбоцитов в результате инкубации БТП с буфером (А) или автоокисленными ЛНП (В) в течение 0 часов, 1 часа и 3.5 часов. Время инкубации указано возле кривых. Условия аналогичны рис. 1. ЛНП (в смеси): 1.8 мг белка/мл, МДА=2.8 нмоль/мг белка.

На рис.3 приведены изменения скорости агрегации тромбоцитов в зависимости от времени инкубации БТП и ЛНП или буфера. Основные изменения агрегируемости происходят в течение первого часа: агрегируемость клеток в контрольной пробе существенно падает ($\Delta V = (19 \pm 3)\%$, 45 мин. инкубации), параметры АДФ-агрегации суспензии тромбоцитов, содержащей нативные ЛНП, изменяются мало, тогда как агрегируемость клеток в смеси с окЛНП возрастает ($\Delta V = - (19 \pm 3)\%$, 20 мин. инкубации).

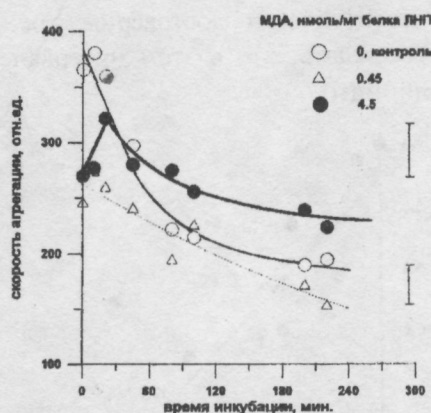


Рисунок 3.

Зависимость скорости агрегации тромбоцитов в БТП, инкубированной с буфером или ЛНП, от времени инкубации. 2×10^8 кл/мл, 5 мкМ АДФ, 37°C . ЛНП (в смеси): 2 мг белка/мл; нативные ЛНП - 0.4 нмоль МДА/мг белка. окисленные - 4.5 нмоль МДА/мг белка.

Эксперимент, представленный на рис.3, выбран для иллюстрации кинетики изменения агрегируемости клеток, так как в этом эксперименте изменения параметров агрегации в течение первого часа инкубации максимально возможные для всех проб. В других экспериментах изменения агрегируемости тромбоцитов в контрольной пробе, как правило, были не такие существенные, а агрегируемость клеток в смеси с окЛНП могла и не изменяться в первый час инкубации. Несмотря на эти различия для всех восьми экспериментов можно выделить общие закономерности:

- в пробе, содержащей окЛНП, не наблюдалось уменьшения агрегируемости тромбоцитов в течение первого часа инкубации;

- по истечении одного часа инкубации агрегируемость клеток в пробе, содержащей окЛНП, всегда была не ниже, чем агрегируемость в контрольной пробе.

Таким образом, после одного часа инкубации становится очевидной активация АДФ-агрегации тромбоцитов в пробах, содержащих автоокисленные ЛНП. К 4 часам инкубации агрегируемость клеток во всех пробах может заметно падать, поэтому дольше четырех часов инкубацию, как правило, не проводили. Исходя из этих временных характеристик, для сопоставления результатов разных экспериментов было выбрано время инкубации два часа. Через два часа инкубации нет резкого падения или роста параметров АДФ-агрегации клеток, характерных для первого часа инкубации. Это позволило при измерении кривых агрегации делать не менее трех повторов и получать статистически достоверные значения параметров. На рис.4 представлены результаты 8 независимых экспериментов: изменения параметра агрегации ΔV^* сопоставлены со степенью окисления ЛНП, проинкубированных с БТП. Сопоставление результатов экспериментов позволяет выявить общую закономерность: изменения параметра АДФ-агрегации тромбоцитов в результате инкубации уменьшаются с увеличением степени окисления добавленных к ним

липопротеинов. Следовательно, изменения кривых АДФ-агрегации за время инкубации зависят от степени окисления липидов в ЛНП. Слабое изменение параметров АДФ-агрегации тромбоцитов характерно для всех проб, содержащих ЛНП для которых $0,5 \text{ нмоль/мг} < \text{МДА} < 8 \text{ нмоль/мг}$. Статистический анализ результатов показал, что на участке от 0 до 4 нмоль МДА/мг белка ЛНП наблюдается обратная линейная зависимость параметра, характеризующего изменения скорости агрегации суспензии тромбоцитов, от степени окисления ЛНП с коэффициентом корреляции $K=0,745$ ($P<0,001$). Для МДА в интервале от 5 до 8 нмоль/мг белка нет статистически достоверных результатов для определения зависимости. Однако, можно утверждать, что в этом интервале степеней окисления ЛНП параметр ΔV^* все еще меньше единицы.

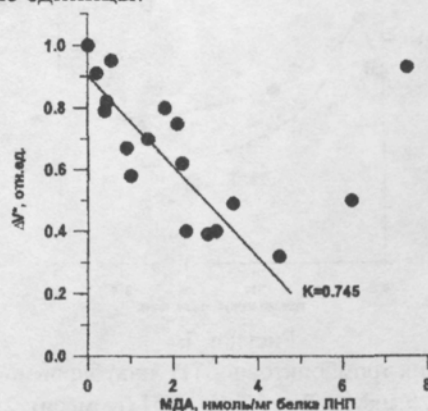


Рисунок 4.

Зависимость параметра ΔV^* от содержания МДА в ЛНП. Параметр ΔV^* характеризует изменение скорости агрегации клеток в результате инкубации БТП и ЛНП относительно аналогичных изменений в контрольной пробе. Приведены результаты восьми независимых экспериментов. К - коэффициент корреляции.

Время инкубации ($2 \pm 0,2$) часа. В смеси: ЛНП ($1,5 \pm 0,5$) мг белка/мл, 2×10^8 клеток/мл; температура инкубации и измерений 37°C . индуктор агрегации - 5 мкМ АДФ.

Все обсуждаемые выше результаты получены для небольших степеней окисления ЛНП, которые получали автоокислением выделенных без ЭДТА липопротеинов. Эксперименты по инкубации клеток с окисленными липопротеинами проводили и для высоких степеней окисления ЛНП ($\text{МДА} > 8 \text{ нмоль/мг}$ белка, медь-катализируемое окисление), (рис.1,5). В этом случае изменение кривых агрегации в начальный момент времени, сразу после смешивания БТП и ЛНП, невелико и не отличается от изменений, полученных для окЛНП (рис.1). Однако, дальнейшая инкубация БТП с медь-окисленными ЛНП приводит к падению агрегируемости клеток, причем время исчезновения АДФ-ответа зависит от степени окисления ЛНП, (рис.5). Аналогичный эффект ингибирования АДФ-агрегации тромбоцитов в суспензии, содержащей медь-окисленные ЛНП, получен в 4 независимых экспериментах. В ряде работ было показано, что продукты перекисного окисления ингибируют агрегацию клеток [3, 12]. Это может быть существенным при исследовании ЛНП с высокими степенями окисления [14, 24]. Повторный диализ раствора медь-окисленных ЛНП не ликвидировал ингибирующий эффект этих ЛНП на агрегацию тромбоцитов в БТП. Так как высокие степени окисления можно получить только инкубируя ЛНП с ионами Cu^{2+} , было специально проверено, что медь в концентрации 5-50 мкМ вызывает незначительное уменьшение активности пробы (на 7%) в течение одного часа по сравнению с контролем. Высокие степени окисления ЛНП не реализуются *in vivo*. Однако, эксперименты *in vitro* часто

проводят для ЛНП, инкубированных с CuSO_4 в течение 12-24 часов. Следует иметь ввиду, что такие ЛНП могут ингибировать агрегацию тромбоцитов.

Возникает вопрос о механизме изменения АДФ-ответа тромбоцитов в присутствии окЛНП. Ранее было показано, что окЛНП обладают способностью переносить свободный холестерин на клеточные мембраны [25]. Поэтому можно полагать, что изменения параметров АДФ-индуцированной агрегации при инкубации БТП с окЛНП могут происходить за счет модификации клеточной мембраны избыточным холестерином. С целью проверки этой гипотезы мы провели сравнение содержания холестерина и фосфолипидов в клетках после инкубации БТП с буфером или ЛНП в течение трех часов (концентрация ЛНП в смеси инкубации (1.5 ± 0.3) мг белка/мл). Значения параметра ХС/ФЛ составили:

- $(0,55 \pm 0,06)$ моль/моль для клеток, инкубированных с буфером;
- $(0,50 \pm 0,08)$ моль/моль для клеток, инкубированных с нативными ЛНП;
- $(0,58 \pm 0,08)$ моль/моль для клеток, инкубированных с окЛНП (и не зависит от степени окисления).

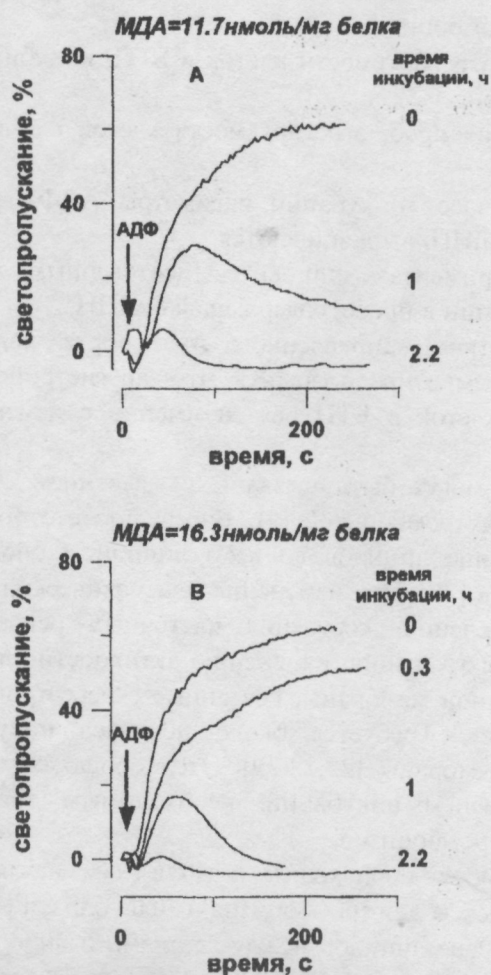


Рисунок 5.

Изменения кривых агрегации тромбоцитов в результате инкубации БТП с ЛНП, окисленными в присутствии ионов меди. Условия аналогичны рис. 1: ЛНП (в смеси): 1.8 мг белка/мл, МДА: 11.7 нмоль/мг белка (А) и 16.3 нмоль/мг белка (В). Время инкубации указано возле кривых

В пределах ошибки измерений можно утверждать, что значения ХС/ФЛ индекса для трех проб достоверно не различаются. Статистический анализ проводили, используя парный t-критерий для числа степеней свободы $k=(6+6-2)=10$ и 5% уровня значимости.

Таким образом, в работе зарегистрирован эффект активации АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов в результате инкубации БТП с автоокисленными ЛНП. Показано, что активация не является результатом переноса холестерина от окЛНП к клеткам.

Совокупность проведенных измерений хорошо согласуется с полученными нами ранее результатами для изолированных тромбоцитов [14]:

1. ЛНП, характеризующиеся малыми степенями окисления, активируют АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов в БТП и индуцируют спонтанную агрегацию изолированных клеток.
2. Нативные ЛНП мало изменяют АДФ-агрегацию клеток в плазме и индуцируют агрегацию изолированных тромбоцитов лишь при высоких концентрациях.
3. Медь-окисленные ЛНП, для которых характерны высокие степени окисления, ингибируют АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов в плазме, и не только не приводят к активации изолированных клеток, но также ингибируют АДФ-индуцированную агрегацию изолированных тромбоцитов.

Кинетика изменения агрегируемости клеток в БТП, инкубированной с ЛНП, имеет следующие закономерности (рис. 1-3):

1. Сразу после смешивания проб, агрегируемость клеток в смесях, содержащих ЛНП ниже, чем в контроле.
2. По истечении $(1 \pm 0,2)$ часов инкубации параметры АДФ-агрегации в контрольной пробе и пробах, содержащих ЛНП, выравниваются.
3. Далее во всех экспериментах становится достоверным превышение параметров АДФ-индуцированной агрегации в пробе, содержащей окЛНП.

Несмотря на отсутствие направленного транспорта холестерина от окЛНП к мембранам тромбоцитов, разумно предположить, что зарегистрированный эффект влияния окЛНП на агрегируемость клеток в БТП связан именно с изменениями плазматической мембраны тромбоцитов:

1. Изменения мембраны могут быть вызваны связыванием ЛНП со специфическими рецепторами на поверхности тромбоцитов [4]. В результате этого взаимодействия может происходить перераспределение липидов во всем липидном бислое, что характерно для активированных тромбоцитов [26]. Эти изменения плазматической мембраны могут, в свою очередь, приводить к изменению состояния клеточных рецепторов [27], изменению количества мембрансвязанного кальция, изменению активности клеточных ферментов [7] и так далее. Изменения клеточной мембраны, связанные с перестройками липидного бислоя, могут проявляться не сразу. Требуется около получаса инкубации для воздействия активатора на параметры мембраны [22,28,29]. Это хорошо согласуется с полученным в наших экспериментах временем инкубации, необходимым для ЛНП-активации АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов.

2. Изменения мембраны могут происходить и за счет обмена липидов между клетками и ЛНП. Поскольку ХС/ФЛ индексы для тромбоцитов и ЛНП близки [7], наши эксперименты не отрицают существование обмена липидов между клетками и липопротеинами. Можно лишь утверждать, что инкубация тромбоцитов с окЛНП не приводит к относительному изменению содержания холестерина в мембранах клеток. Дальнейшие исследования с использованием спектроскопии ЭПР, возможно, позволят зарегистрировать изменения плазматической мембраны тромбоцитов в результате инкубации БТП и ЛНП.

Малые степени окисления ЛНП могут реализоваться *in vivo*, поэтому регистрируемый нами суммарный эффект влияния суспензии автоокисленных ЛНП на АДФ-агрегацию клеток может иметь прямое отношение к процессам, происходящим *in vivo* [3]. Результаты наших исследований позволяют предположить, что увеличение агрегируемости тромбоцитов при атеросклерозе может быть обусловлено их взаимодействием с окисленными ЛНП.

Работа является частью исследований, проведенных в рамках грантов, финансируемых Международным Научным Фондом (MQ 9000, MQ 9300) и Российским фондом фундаментальных исследований (гран №96-04-49449).

ЛИТЕРАТУРА

1. Steinbrecher U.P., Zhang H., Loughheed M. (1990). Free Rad. Biol. & Med. **9**, 155-168.
2. Ardlie N.G., Selley M.L., Simons L.A. (1989). Atherosclerosis. **76**, 117-124.
3. Meraji S., Moore C.E., Skinner V.O., Bruckdorfer K.R. (1992). Platelets, **3**, 155-162.
4. Pedreno J., Castellarnau C., Cullare C., Ortin R., Sanchez J.L., Llopart R., Gonzalez-Sastre (1994). Arteriosclerosis and Thrombosis. **14**, 401-408.
5. Бочков В.Н., Кузьменко Е.С., Резник Т., Ткачук В.А. (1994). Биохимия. **59**, 983-989.
6. Knorr M., Locher R., Vogt E., Vetter W., Bloch L.H., Ferracin F., Lefkovits H., Pletscher A. (1988). Eur. J. Biochem. **172**, 753-759.
7. Malle E., Sattler W. (1994). Platelets. **5**, 70-83.
8. Ишанходжаев Т.М., Бортников В.Т., Зайнутдинов Б.Р., Саатов Т.С. (1990). Биохимия. **55**, 1507-1512.
9. Aviram M., Brook J.G. (1987). Prog. Cardio. Diseases. **XXX** 61-72.
10. Orth M., Luley C., Wieland H. (1995). Thromb. Research. **79**, 297-305.
11. Fetcovska N., Fedelesova V., Dzurik R. (1989). J. Hypertens. **7** (suppl. 6). 164-S165.
12. Aviram M. (1990). Atherosclerosis. **84**, 141-143.
13. Broijersen A., Wallen N.H., Vitols S., Larsson P.T., Hjemdahl P. (1993). Platelets. **4**, 11-15.
14. Азизова О.А., Власова И.И. (1993). Бюл. экспер. биол. мед. **11**, 485-487.
15. Lindgren F.T. (1975). Analysis of Lipids and Lipoproteins. / Ed. E.G.Perkins.- Champaign, pp.204-224.
16. Itzhaki R.F., Gill D.M. (1964). Anal. Biochem. **9**, 401
17. Uchiyama M., Michara M. (1978). Anal. Biochem. **86**, 271
18. Janero D.R. (1990). Free Rad. Biol.&Med. **9**, 515-540.
19. Gabbasov Z.A., Popov E.G., Gavrilov I.Yu., Pozin E.Ya. (1989). Thromb. Reseach. **54**, 215-223.
20. Folch J., Lees M., Sloane-Stanley F.H. (1957). J. Biol. Chem. **226**, 497-509.
21. Vaskovsky V.E., Kostetsky E.J., Vasendin J.M. (1975). J. Chromatography. **114**, 129-141.
22. Abel L.L., Levy B.B., Brodie B.B., Kendall F.E. (1952). J.Biol.Chem. **195**, 357-366.
23. Лакин Г.Ф. (1990). Биометрия. "Высшая школа", М.
24. Aviram M. (1989). Thromb. Research. **53**, 561-567.

25. *Panasenko O.M., Vakhrusheva (Vol'nova) T.V., Azizova O.A., Vladimirov Yu.A.* (1991). *Free Rad. Biol. & Med.* **10**, 137-148.
26. *Basse F., Gaffet P., Rendel F., Bienvenue A.* (1993). *Biochemistry.* **32**, 2337-2344.
27. *Willigen G., Gorter G., Akkerman J.-W.N.* (1994). *Arteriosclerosis and Thrombosis.* **14**, 41-46.
28. *Pales J., Lopez A., Gual A.* (1988). *Bioch. Bioph. Acta.* **944**, 85-89.
29. *Kitagawa S., Kametani F., Tsuchiya K., Sakurai H.* (1990). *Bioch. Bioph. Acta.* **1027**, 123-129.

THE EFFECT OF OXIDIZED LOW DENSITY LIPOPROTEINS ON ADP-INDUCED PLATELET AGGREGATION IN PLASMA.

VLASOVA I.I., VAKHRUSHEVA T.V., AZIZOVA O.A., LOPUKHIN YU.M.

Research Institute for Physico-Chemical Medicine, M.Pirogovskaya 1a, Moscow, 119828.

The investigation of the effect of oxidized lipoproteins on platelet activity is important for the understanding of the plaque formation under atherosclerosis. In the present work, we examined the influence of low density lipoproteins (LDL) on ADP-induced platelet aggregation in the platelet rich plasma. It was demonstrated that mixing of plasma and LDL was accompanied by the decrease of ADP-induced aggregation parameters as compared to control (mixing with buffer). After 1h incubation, platelet ADP-aggregation in the sample containing oxidized LDL (oxLDL) exceeded the ADP-aggregation in the control sample. The dependence of the aggregation parameters on the incubation time and on the degree of LDL oxidation were obtained. No difference in the cholesterol and phospholipid content was observed between cells incubated with buffer, native or oxidized LDL. Therefore, the possible oxLDL-induced accumulation of cholesterol in platelet membranes is excluded as a reason for the increased cell aggregation.

Key words: platelets, aggregation, oxidized low density lipoproteins, cholesterol, phospholipids.