

А.О. Тихомиров, Д.Д. Жерносеков, Я.М. Рока-Мойя, С.І. Діордієва, Т.В. Гриненко

Вплив Lys-форми плазміногену на актиновий цитоскелет тромбоцитів

Досліджено вплив різних форм плазміногену на стан актинового цитоскелета тромбоцитів людини. Як показник реорганізації цитоскелета тромбоцитів використовували співвідношення різних пулів актину, детекцію якого проводили методом імуноблотингу. Показано, що в інтактних тромбоцитах вміст глобулярного (G) актину й актину, що формує мембранний кортекс (MC), становить 56 і 40 % відносно вмісту філаментної (F) форми відповідно. У тромбоцитах, активованих тромбіном або колагеном, актин знаходиться майже виключно у F-формі. Інкубація неактивованих тромбоцитів з Lys-формою плазміногену викликає збільшення вмісту MC-фракції актину до 79 % відносно F-форми. Крім того, Lys-плазміноген інгібує перерозподіл пулів актину, характерний для активованих тромбоцитів. На відміну від Lys-форми, Glu-плазміноген не пригнічує агоністіндуковану агрегацію тромбоцитів і не порушує процес реорганізації їх актинового цитоскелета. Таким чином, наші результати свідчать про залучення цитоскелетних структур тромбоцитів у реалізацію антиагрегативних ефектів Lys-плазміногену.

Ключові слова: плазміноген, тромбоцити, агрегація тромбоцитів, актин, цитоскелет.

ВСТУП

Тромбоцити – без'ядерні клітинні фрагменти, основною функцією яких є формування первинного тромбу у місцях пошкодження судин. Здатність тромбоцитів синтезувати, селективно накопичувати та секретувати цілу низку регуляторних молекул, у тому числі факторів росту клітин, зумовлює їх участь в імунологічних реакціях і регенеративних процесах. Структурно-функціональні порушення тромбоцитів можуть бути причинами різних патологій (тромбоз, геморагія, запальні реакції, ангіогенез, пухлинний ріст тощо) [19]. У зв'язку з цим велике науково-практичне значення має ідентифікація чинників, що впливають на функціональний стан тромбоцитів, а також розкриття молекулярних механізмів дії біологічно активних сполук на ці форменні елементи крові. Протягом останніх двох десятиріч активно досліджується участь компонентів плазміноген–плазмінової системи в регуляції функціонування різних клітин [32]. Плазміноген є неактивним попередником

серинової протеїнази плазміну – ключового ензиму фібринолітичної системи. Нативною формою плазміногену, що циркулює у плазмі, є Glu-плазміноген, який являє собою односторонній глікопротеїн з молекулярною масою близько 92 кДа. Характерною рисою молекулярної структури плазміногену є наявність п'яти петлевих доменів, що отримали назву кринглів. Специфічні ділянки міжмолекулярного розпізнавання, локалізовані у кринглових доменах, зумовлюють функціональні взаємодії плазміногену та плазміну з субстратом (фібрином), активаторами та інгібіторами [18]. На поверхні плазматичної мембрани деяких клітин крові Glu-плазміноген може перетворюватися на плазмін під дією активаторів. Припускається, що таке перетворення зимогену на активну протеїназу відбувається через проміжну стадію утворення частково деградованої форми плазміногену (Lys-плазміноген), яка відрізняється від нативної форми конформаційно [31]. Однак фізіологічне значення Lys-плазміногену і

© А.О. Тихомиров, Д.Д. Жерносеков, Я.М. Рока-Мойя, С.І. Діордієва, Т.В. Гриненко

можливі самостійні функції цього білка залишаються недостатньо дослідженими.

Активовані тромбоцити здатні сорбувати у п'ять разів більшу кількість плазміногену, ніж інтактні клітини, причому афінність Lys-плазміногену до сайтів зв'язування на поверхні тромбоцитів є щонайменше втричі вищою у порівнянні з цією величиною для Glu-форми. Вважається, що плазмін, який утворюється з плазміногену на тромбоцитах, зумовлює профібринолітичні властивості їх поверхні [21, 22]. Разом з тим до недавнього часу у літературі була відсутня інформація відносно впливу різних форм плазміногену на агрегативну активність тромбоцитів. Раніше нами було показано, що Lys-плазміноген, на відміну від нативної форми білка, ефективно інгібує агоністіндуковану агрегацію у препаратах відмитих тромбоцитів людини [24], однак молекулярні механізми, що лежать в основі антиагрегативної активності Lys-плазміногену, потребують детального дослідження.

Під час активації тромбоцити зазнають цілу низку складних морфологічних змін, які здійснюються в результаті реорганізації їх цитоскелета, основними компонентами якого є актинові мікрофіламенти. Актин у тромбоцитах наявний у трьох формах: у складі власне філаментів (F-актин), у вигляді глобул-мономерів (G-актин) та у комплексі з актин-асоційованими білками, формуючи так званий мембранний кортекс (МС). Активація тромбоцитів індукує процес полімеризації G-актину та асоціацію актинового кортексу з філаментним апаратом клітини, тому в активованих тромбоцитах близько 90% усього актину знаходиться у F-формі. Виходячи з цього, співвідношення різних пулів актину використовується як чутливий показник, котрий характеризує стан цитоскелета клітини [10].

Взаємодія МС з інтегриновими рецепторами є умовою для забезпечення міцної адгезії та агрегації тромбоцитів [3]. Інгібування процесів полімеризації актину та реорганізації актинового цитоскелета порушує

адгезивні властивості інтегринів, що призводить до втрати тромбоцитами агрегативної здатності, як це показано в експериментах з використанням цитохалазинів [6]. Інформація про те, що деякі крингльвімісні фрагменти плазміногену (ангіостатини) пригнічують міграцію моноцитів–макрофагів завдяки дезорганізації актинового цитоскелета цих клітин [23], стала додатковим стимулом для проведення цього дослідження. Таким чином, метою нашої роботи було дослідити вплив різних форм плазміногену на стан актинового цитоскелета тромбоцитів, що знаходяться у стані фізіологічного спокою, а також активованих різними індукторами.

МЕТОДИКА

Плазму крові отримували з венозної крові 9 умовно здорових донорів. Для експериментів використовували препарати відмитих тромбоцитів, отриманих за методом Geag та співавт. [11] з модифікаціями. Відмиті тромбоцити одержували поетапним центрифугуванням крові, до якої попередньо був доданий цитратний буфер (100 ммоль/л цитрату натрію, 80 ммоль/л лимонної кислоти, 110 ммоль/л глюкози) як антикоагулянт у співвідношенні кров : буфер – 9 : 1. Збагачену тромбоцитами плазму (ЗТП) отримували після центрифугування крові при 160 g протягом 20 хв за кімнатної температури. Далі її центрифугували (340 g, 20 хв), осад тромбоцитів ресуспендували в буфері для їх відмивки (20 ммоль/л HEPES; рН 6,8, 137 ммоль/л NaCl, 4 ммоль/л KCl, 0,2 ммоль/л MgCl₂ з додаванням 0,2 % глюкози та 0,2 % бичачого сироваткового альбуміну). Суспензію клітин повторно центрифугували за тих самих умов і ресуспендували у буфері, об'єм якого становив 1/2 об'єму ЗТП.

Для дослідження ефектів Glu- і Lys-форм плазміногену на перебудови актинового цитоскелета тромбоцитів, що знаходяться у різних фізіологічних станах, використовували такі групи клітин: 1 – інтактні тромбоцити (контроль); 2 – тромбоцити, активовані тромбіном

(1 одиниця NIH/мл); 3 – тромбоцити, активовані колагеном (1,25 мг/мл); 4 – тромбоцити, інкубовані з Glu- або Lys-плазміногеном (1,2 мкмоль/л); 5 – тромбоцити, преінкубовані з Glu- або Lys-плазміногеном та активовані тромбінном; 6 – тромбоцити, преінкубовані з Glu- або Lys-плазміногеном та активовані колагеном.

Кількість тромбоцитів у пробі становила 300–350 тис./мкл. Процес агрегації реєстрували протягом 5 хв за допомогою оптичного агрегометра SOLAR AT-02 з використанням пакету програм «Агрегометр 2.01» [33]. Перед внесенням стимулятора агрегації проби інкубували з Glu- або Lys-плазміногеном при 37 °С протягом 3 хв для забезпечення зв'язування білків з поверхнею тромбоцитів [20]. Агрегометрію проводили протягом 3 год з моменту забору крові. В експерименті використовували препарати тромбіну і колагену («Sigma Aldrich», США), концентрації активаторів були обрані згідно з рекомендаціями Barkagan та співавт. [2]. Препарати Glu- і Lys-плазміноген були отримані відповідно до описаних методик у праці [1] співробітниками відділу хімії та біохімії ферментів ІБХ НАНУ, вибір їх концентрацій було зроблено згідно з даними, описаними Рока-Моюя та співавт. [24].

Отримання білкових фракцій тромбоцитів, що містять різні пули актину, проводили руйнуванням клітин за допомогою Triton X-100-вмісного буфера та наступного диференціального центрифугування [7]. Відразу після проведення агрегометрії до суспензії тромбоцитів вносили рівний об'єм лізуючого буфера такого складу: 100 ммоль/л тріс-НСІ (рН 7,4), 2% Triton X-100, 10 ммоль/л етиленглікольтетраоцтової кислоти, 2 мкг/мл лейпептину, 100 ммоль/л бензамідину, 2 ммоль/л фенілметилсульфонілфлуориду, 2 ммоль/л ванадату натрію. Після обережного ресуспендування клітин при 4 °С лізати тромбоцитів центрифугували при 15000 g протягом 4 хв. Отриманий осад, нерозчинний у буфері з Triton X-100, містить фракцію F-актину. Для відділення пулів G- і МС-ак-

тину, що залишилися у надосадовій рідині, супернатант центрифугували при 100000 g протягом 2 год. Осад містив фракцію МС-актину. Пул G-актину, солнобілізованого у Triton X-100-вмісному буфері, залишався при цьому у супернатанті. Всі етапи центрифугування проводили при 4 °С.

До осадів, отриманих після низько- та високошвидкісного центрифугувань, вносили тріс-НСІ-буфер (62,5 ммоль/л, рН 6,8), що містив 0,1 % додецилсульфату натрію (DS-Na), 1 % β-меркаптоетанолу, 10% гліцерину та 0,001 % бромфенолового синього, в об'ємі 100 мкл/осад і кип'ятили на водяній бані протягом 15 хв для солнобілізації білків. Проби, що містять G-актин, змішували із зазначеним буфером у співвідношенні проба : буфер – 2:1 і кип'ятили в такому самому режимі. Електрофоретичне розділення білків у пробах проводили у пластині 10%-го поліакриламідного гелю (РААГ) за наявності 0,1% DS-Na за стандартною методикою [17] з урахуванням рекомендацій, описаних у праці Brunso та співавт. [4]. Детекцію актину здійснювали за допомогою імуноблотингу [27]. Для цього білки з РААГ переносили на нітроцелюлозну мембрану («GE Healthcare Amersham», Велика Британія), яку після блокування у 5%-му розчині знежиреного сухого молока («Carnation», США), обробляли кролячими антитілами проти актину («Sigma Aldrich», США) у розведенні 1:400. Далі нітроцелюлозу інкубували зі вторинними антитілами проти імуноглобуліну G кроля, кон'югованими з пероксидазою хрому («Sigma Aldrich», США), взятими у розведенні 1:1500. Візуалізацію комплексу антиген–антитіло (поліпептидна зона 42 кДа) проводили з використанням субстрату пероксидази (0,02% H₂O₂) і хромогену (0,01 % діамінобензидин). Після проведення реакції мембрани промивали, ретельно висушували і сканували для отримання цифрового зображення. Відносний вміст різних пулів актину у тромбоцитах кожної групи оцінювали денситометрично і виражали у відсотках від кількості F-актину у тій самій

групі клітин. Розраховані середні значення представлено на гістограмі у вигляді медіан, для оцінки вірогідності міжгрупової різниці використовували непараметричний U-критерій Манна–Уїтні [13]. Різницю вважали вірогідною при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У нашій роботі вперше отримано експериментальні результати щодо впливу Lys-плазміногену на стан актинового цитоскелета відмитих тромбоцитів людини та порушення агоністіндукованої реорганізації цитоскелетних структур. Результати імуноблотингу (рис. 1, а) та денситометрії (рис. 2), демонструють, що у тромбоцитів, які знаходяться у стані фізіологічного спокою, вміст G-актину й актину, що формує MC, становить 56 і 40 % відносно кількості F-форми відповідно. Інкубація неактивованих тромбоцитів з нативною (Glu-формою) плазміногену істотно не впливала на співвідношення різних пулів

актину. Проте внаслідок дії Lys-плазміногену збільшується вміст актину тромбоцитів, який входить до складу MC (у середньому 79 % відносно F-форми).

Для дослідження стану актинового цитоскелета активованих тромбоцитів та оцінки впливу різних форм плазміногену на реорганізацію філаментного матеріалу в експерименті використовували тромбін і колаген – найбільш потужні фізіологічні індуктори, дія яких викликає незворотну агрегацію тромбоцитів. Активація тромбоцитів як тромбіном, так і колагеном призводить до суттєвого зменшення вмісту G- і MC-актину (див. рис. 1, б). Наші результати узгоджуються з даними Cegecedo та співавт. [5]: активація тромбоцитів індукує інтенсивний фібрилогенез, що супроводжується полімеризацією G-актину з формуванням філаментів і асоціацією MC з актиновими фібрилами. Фібрилогенез вважається однією з ранніх ознак активації тромбоцитів, у цитоплазмі яких вміст F-форми може сягати 90% від загальної

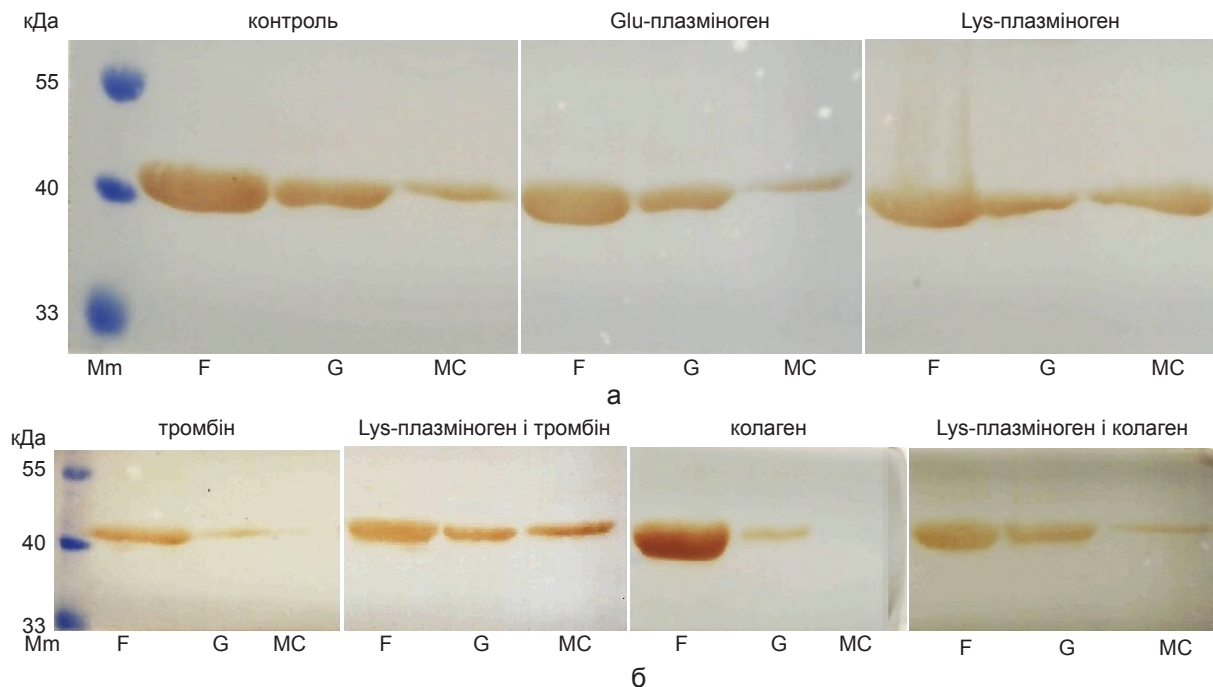


Рис. 1. Вплив Glu- і Lys-форм плазміногену на розподілення різних пулів актину у неактивованих тромбоцитах (а) та клітинах, активованих тромбіном або колагеном (б): Mm – маркери молекулярної маси; F – філаментний актин; G – глобулярний актин; MC – актин мембранного кортексу

кількості актину клітини [30]. Результати кількісного аналізу (див. рис. 2) показують, що вміст фракцій G- і MC-актину становить 17 і 8 % відносно кількості F-форми у тромбоцитах, активованих тромбіном, та 11 і 5 % у колагенактивованих тромбоцитах. Однак після дії індукторів активації на тромбоцити, що були преінкубовані з Lys-плазміногеном, перерозподілу пулів актину, характерного для активованих тромбоцитів, не відбувається (див. рис. 1, б). Денситометричний аналіз імуноблотингу (див. рис. 2) дав змогу встановити, що у тромбоцитах, преінкубованих з Lys-плазміногеном і далі активованих тромбіном, G-форма актину становить 64% відносно кількості F-актину, тоді як на актин MC припадає 62 %. Цей показник для G- і MC-актину тромбоцитів, преінкубованих з Lys-плазміногеном з наступною активацією колагеном, становить 63 і 51 % відповідно.

Результати аналізу різних форм актину у білкових пробах тромбоцитів, які свідчать про порушення Lys-плазміногеном адекватної реорганізації цитоскелета тромбоцитів, корелюють з даними агрегометричного аналізу. Показано зниження ступеня тромбін- і колагеніндукованої агрегації за наявності цієї

форми плазміногену приблизно вдвічі (рис. 3, 4). Натомість, Glu-плазміноген істотно не впливає на індуковану агрегацію тромбоцитів (приклад кривої, що ілюструє відсутність антиагрегативних ефектів Glu-плазміногену, наведено на рис. 4). Також слід зазначити, що жодна з форм плазміногену не викликає агрегацію відмитих тромбоцитів людини [24]. Оскільки Glu-плазміноген, на відміну від Lys-форми, не проявляє антиагрегативну активність і не впливає на стан актинового цитоскелета тромбоцитів, то його ефекти на агоністіндуковану реорганізацію цитоскелета у цьому модельному експерименті не досліджували.

Згідно з класичним уявленням, послідовність біохімічних і клітинних процесів, які складають основу функціонування тромбоцитів у первинному гемостазі, включає чотири стадії: адгезію, активацію, секрецію й агрегацію. Незважаючи на наявність великої кількості активаторів та їх рецепторів, клітина має обмежену кількість сигнальних шляхів та ефекторних механізмів [19]. Зокрема, тромбін активує тромбоцити людини, зв'язуючись зі специфічними PAR (від англ. protease activated receptors) -1 та -4,

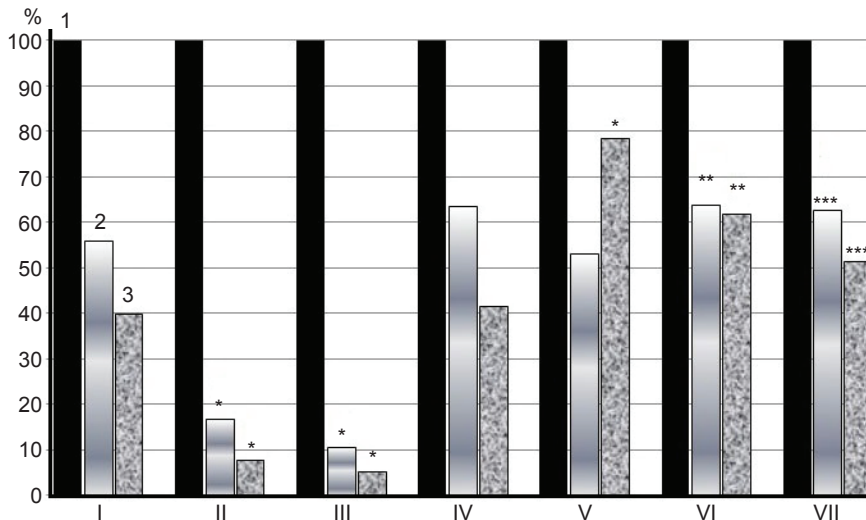


Рис. 2. Відносний вміст різних форм актину тромбоцитів (у відсотках від вмісту F-актину): 1 – F-актин, 2 – G-актин, 3 – актин мембранного кортексу; I – контроль, II – тромбін, III – колаген, IV – Glu-плазміноген, V – Lys-плазміноген, VI – Lys-плазміноген і тромбін, VII – Lys-плазміноген і колаген. *P<0,05 у порівнянні з контролем; **P<0,05 у порівнянні з тромбоцитами, що були активовані тромбіном; ***P<0,05 у порівнянні з тромбоцитами, що були активовані колагеном

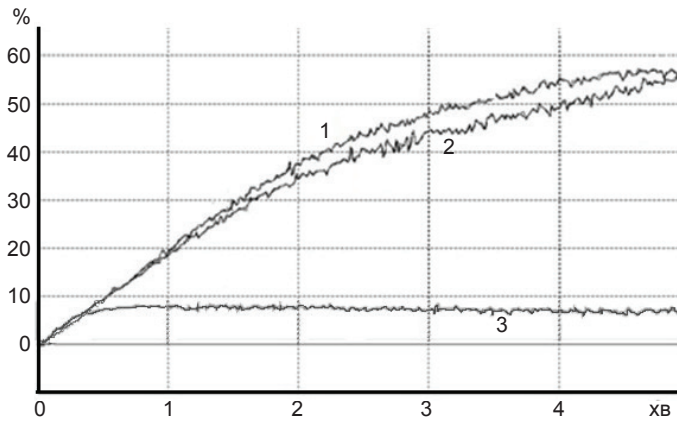


Рис. 3. Вплив Glu- та Lys-форм плазміногену на тромбініндуковану агрегацію відмитих тромбоцитів людини: 1 – тромбін (1 одиниця NIH/мл); 2 – Glu-плазміноген (1,2 мкмоль/л) і тромбін; 3 – Lys-плазміноген (1,2 мкмоль/л) і тромбін

відщеплюючи від них N-кінцеві пептиди. Це викликає активацію рецепторів і передачу сигналу через фосфоліпазу C β , котра, у свою чергу, розщеплюючи фосфатидилінозитол, призводить до утворення інозитол-3-фосфату та діацилгліцеролу. Обидва компоненти, що утворились, є стимуляторами наступних реакцій, кінцевим результатом яких є активація протеїн-тирозинкіназ, що відносяться до родин Src, FAK і Syk, вивільнення Ca²⁺ з ендоплазматичного ретикулуму та реорганізація актинового цитоскелета. У разі колагеніндукованої агрегації активатор зв'язується зі специфічним рецептором GPVI на плазматичній мембрані тромбоцитів. Активованій рецептор передає сигнал на фосфоліпазу C γ ,

а подальший шлях є подібним до описаного вище тромбінзалежного механізму [9, 14, 25]. Особливу роль у процесах активації і агрегації відіграє MC, який формується з коротких актинових філаментів, що знаходяться у комплексі з актинасоційованими білками (спектрином, вінкуліном, таліном, α -актиніном, кіндліном тощо). При активації сигнальних шляхів тромбоцитів актинові фібрили цитоплазми асоціюють з MC з утворенням єдиної філаментної мережі. MC опосередковує взаємодію мембранних рецепторів з цитоскелетом клітини, утворюючи, з одного боку, міцний комплекс з інтегрином GP IIb/IIIa, а з іншого – з філаментами цитоплазми. Передача сигналу через цитоскелетні білки,

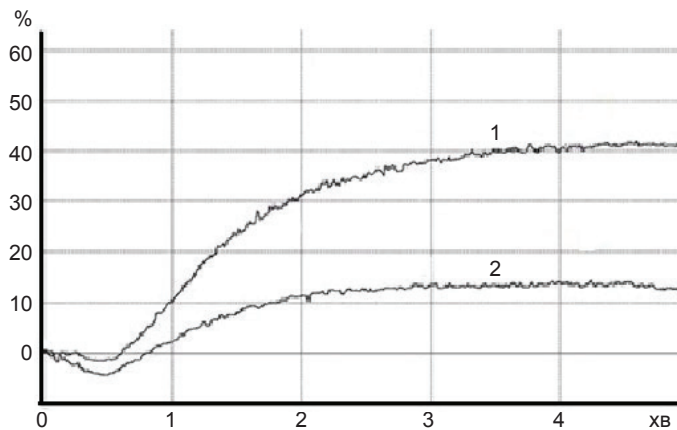


Рис. 4. Вплив Lys-плазміногену на колагеніндуковану агрегацію відмитих тромбоцитів людини: 1 – колаген (1,25 мг/мл); 2 – Lys-плазміноген (1,2 мкмоль/л) і колаген

зв'язані з GP ІІІа (талін, кіндлін), призводять до активації інтегрину, який з більшою афінністю зв'язує адгезивні ліганди (фібриноген, фібронектин, вітронектин, фактор фон Вілебранда), що призводить до агрегації тромбоцитів. Крім того, цитоскелет регулює адгезивні властивості GP ІІІа, філаментні структури також контролюють кластеризацію молекул інтегрину у плазматичній мембрані [26]. В експериментах Diaz-Ricart та співавт. [6] показано, що в результаті обробки тромбоцитів агентами-інгібіторами полімеризації актину (цитохалазін В, латрункулін А), ці клітини втрачають здатність розпізнавати адгезивні ліганди та агрегувати навіть за наявності потужних індукторів. У свою чергу взаємодія GP ІІІа з адгезивними молекулами стабілізує цитоскелет тромбоцитів і сприяє організації філаментів у стрес-фібрили, характерні для фокальних контактів [15].

Раніше висловлювалося припущення про те, що зв'язування Glu- і Lys-плазміногену з тромбоцитами здійснюється завдяки їх взаємодії з адгезивними молекулами (фібриноген, тромбоспондин, вітронектин), які секретуються тромбоцитами під час їх активації, або конкуренції з цими лігандами за сайти зв'язування на мембранних рецепторах активованих тромбоцитів [22]. Показано, що сорбція плазміногену на поверхні тромбінактивованих тромбоцитів забезпечується фібрином, який утворюється з фібриногену внаслідок дії тромбіну. Водночас припускається, що взаємодія плазміногену з неактивованими тромбоцитами не залежить лише від фібрин(оген)у, і потребує наявності додаткових центрів зв'язування [20]. Результати нашої роботи про вплив Lys-плазміногену на цитоскелет неактивованих тромбоцитів також свідчать на користь існування альтернативного механізму взаємодії плазміноген-тромбоцит. Потрібні подальші дослідження для ідентифікації рецепторів Lys-плазміногену на мембрані інтактних і активованих тромбоцитів, активація котрих впливає на

ключові сигнальні шляхи клітини, що регулюють динаміку актинового цитоскелета. Індуковані Lys-плазміногеном зміни можуть призводити до аберантної асоціації МС, запобігаючи інтеграції останнього до єдиної філаментної мережі з цитоплазматичними фібрилами, як це було продемонстровано у досліджах з використанням фрагментів плазміногену, що складаються з декількох кринглових доменів. Ці фрагменти, відомі під назвою ангіостатини, функціонують як регулятори активності ендотеліоцитів, а також деяких клітин крові [16]. Так, було показано, що ангіостатин, який містить у своєму складі перші три крингли (К1-3), ефективно пригнічує міграцію моноцитів-макрофагів через дезорганізацію актинового цитоскелета цих клітин [23]. Автори припускають, що К1-3 може індукувати дисоціацію актинових філаментів внаслідок взаємодії на поверхні моноцитів-макрофагів з білком ангіомотином, який відповідає за формування актинових фібрил і клітинну рухливість. Ще одним білком, який претендує на роль рецептора плазміногену, може бути сам актин, який експонується на поверхні плазматичної мембрани деяких клітин, у тому числі активованих тромбоцитів [12]. Існують дані про те, що поверхневий актин асоційований з філаментним матеріалом цитоплазми. Обговорюється його роль як рецепторної молекули та матриці для зв'язування та активації білків [28]. Зокрема, молекули плазміногену-плазміну розпізнають і зв'язуються з актином з достатньо високою афінністю (за даними різних авторів, величина константи дисоціації комплексу плазміноген – β -актин знаходиться у діапазоні 70–140 нм) [29]. Не виключається, що до зв'язування Lys-плазміногену з поверхнею тромбоцитів задіяний актин, і ця взаємодія генерує сигнал, який призводить до порушення реконструкції внутрішньоклітинної цитоархітектоники. Можливо, що визначений у нашій роботі вплив Lys-плазміногену на цитоскелет є одним з механізмів регуляції клітинної активності,

спільним як для молекули плазміногену, так і для деяких його кринглівмісних фрагментів.

Слід зазначити, що відмиті тромбоцити людини виявилися не чутливими до дії нативної форми плазміногену. Як припускалося раніше [7], відсутність атиагрегативної активності Glu-плазміногену може пояснюватися його більш закритою у порівнянні з Lys-формою конформацією, внаслідок чого центри міжмолекулярного розпізнавання, що знаходяться у кринглових доменах, опиняються недоступними для взаємодії зі специфічними лігандами. Незважаючи на те, що плазміноген циркулює у плазмі тільки у вигляді Glu-форми, фізіологічне значення Lys-плазміногену як регулятора активності клітин не можна виключати [8]. Вірогідно, що Lys-плазміноген здатний утворюватися також на поверхні плазматичної мембрани тромбоцитів і модулювати їх функціональну активність. Таким чином, компоненти системи плазміноген-плазмін відіграють першорядну роль не лише у перебігу фібринолітичних процесів, але й беруть участь у регуляції тромбоцитарного гемостазу.

ВИСНОВКИ

1. Lys-форма плазміногену впливає на стан актинового цитоскелета тромбоцитів людини та індукує зростання відносного вмісту актину мембранного кортексу.

2. Обробка тромбоцитів Lys-плазміногеном перед дією активаторів (тромбіну та колагену) порушує агоністіндуковану реконструкцію актинового цитоскелета.

3. Нативна форма плазміногену (Glu-форма) не впливає на стан актинового цитоскелета тромбоцитів.

4. Отримані результати дають змогу припустити, що актинові компоненти цитоскелета тромбоцитів залучаються до процесів, які зумовлюють антиагрегативну активність Lys-плазміногену.

**А.А. Тихомиров, Д.Д. Жерносеков,
Я.М. Рока-Мойя, С.І. Диордієва, Т.В. Гриненко**

ВЛИЯНИЕ LYS-ФОРМЫ ПЛАЗМИНОГЕНА НА АКТИНОВЫЙ ЦИТОСКЕЛЕТ ТРОМБОЦИТОВ

Изучалось влияние разных форм плазминогена на состояние актинового цитоскелета тромбоцитов человека. В качестве показателя реорганизации цитоскелета тромбоцитов использовали соотношение разных пулов актина, детекции которого проводили методом иммуноблоттинга. Показано, что в интактных тромбоцитах количество глобулярного (G) актина и актина, который формирует мембранный кортекс (MC), составляет 56 и 40% относительно содержания филаментной (F) формы соответственно. В тромбоцитах, активированных тромбином или коллагеном, актин находится почти исключительно в F-форме. Инкубация неактивированных тромбоцитов с Lys-формой плазминогена вызывает увеличение содержания MC-фракции актина до 79% относительно F-формы. Кроме того, Lys-плазминоген ингибирует перераспределение пулов актина, характерное для активированных тромбоцитов. В отличие от Lys-формы, Glu-плазминоген не угнетает агонистиндуцированную агрегацию тромбоцитов и не нарушает процесс реорганизации их актинового цитоскелета. Таким образом, наши результаты свидетельствуют о вовлечении цитоскелетных структур тромбоцитов в реализацию антиагрегативных эффектов Lys-плазминогена. Ключевые слова: плазминоген, тромбоциты, агрегация тромбоцитов, актин, цитоскелет.

**A.A. Tykhomyrov, D.D. Zhernosekov,
Y.M. Roka-Moya, S.I. Diordieva, T.V. Grinenko**

EFFECTS OF LYS-FORM OF PLASMINOGEN ON PLATELET ACTIN CYTOSKELETON

The effects of several forms of plasminogen on the state of actin cytoskeleton of human platelets were studied. A ratio between various actin pools, which were detected by immunoblotting, was taken as indicator of platelet cytoskeleton reorganization. It was revealed that intact platelets contain globular (G) actin and membrane cortex (MC) actin in amounts that are 56 and 40% of filamentous (F) actin level, respectively. In both thrombin- and collagen-activated platelets, actin is almost entirely presented in F-form. Incubation of resting platelets with Lys-plasminogen causes elevation of MC-actin level up to 79% in respect to F-form content. In addition, Lys-plasminogen inhibits reorganization of actin cytoskeleton typical for activated platelets. In contrast to Lys-form, Glu-plasminogen affects neither platelet aggregation nor redistribution of actin pools. Thus, these data indicate that cytoskeletal structures of platelets are involved in realization of anti-aggregating effects of Lys-plasminogen.

Key words: plasminogen, platelets, platelet aggregation, actin, cytoskeleton.

Palladin Institute of Biochemistry of NAS of Ukraine, Kyiv

REFERENCES

1. Asina RB, Mukhametova LI, Gulin DA, Levashov MY, Prisyazhnaya NV, Gershkovich KB, Varfolomeyev SD. Inhibitory effect of angiostatins on activity of the plasminogen/plasmin activator system. *Biochemistry (Moscow)*. 2001;**74**(10):1104-1113.
2. Barkagan ZS, Momot AP. *Diagnostics and controlled therapy of hemostasis disorders*, 3rd ed. Moscow: Newdiamed; 2008.
3. Bodin S, Soulet C, Tronchère H, Sié P, Gachet C, Plan-tavid M, Payrastra B. Integrin-dependent interaction of lipid rafts with the actin cytoskeleton in activated human platelets. *J Cell Sci*. 2005;**118**:759-769.
4. Brunso L, Segura D, Monreal L, Escolar G, White JG, Diaz-Ricart M. The secretory mechanisms in equine platelets are independent of cytoskeletal polymerization and occur through membrane fusion. *Platelets* 2010;**21**(8):658-666.
5. Cerecedo D, González S, Mondragón M, Reyes E, Mondragón R. In-vitro model for the ultrastructural study of the formation of thrombi in human platelets. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2006;**17**(2):161-164.
6. Diaz-Ricart M., Arderiu G, Estebanell E, Pérez-Pujol S, Lozano M, White JG, Escolar G, Ordinas A. Inhibition of cytoskeletal assembly by cytochalasin B prevents signaling through tyrosine phosphorylation and secretion triggered by collagen but not by thrombin. *Am J Pathol*. 2002;**160**(1):329-337.
7. Diaz-Ricart M, Estebanell E, Cases A, Calls J, López-Pedret J, Carretero M, Castillo R, Ordinas A, Escolar G. Abnormal platelet cytoskeletal assembly in hemodialyzed patients results in deficient tyrosine phosphorylation signaling. *Kidney Int*. 2000;**57**(5):1905-1914.
8. Ellis V. Plasminogen activation at the cell surface. *Curr Top Dev Biol*. 2003;**54**:263-312.
9. Farndale RW. Collagen-induced platelet activation. *Blood Cells Mol Dis*. 2006;**36**(2):162-165.
10. Fox JE. The platelet cytoskeleton. *Thromb Haemost*. 1993;**70**(6):884-893.
11. Gear ARL, Suttitanamongkol S, Viisoreanu D, Polanowska-Grabowska RK, Raha S, Camerini D. Adenosine diphosphate strongly potentiates the ability of the chemokines MDC, TARC, and SDF-1 to stimulate platelet function. *Blood* 2001;**97**(4):937-945.
12. George JN, Lyons RM, Morgan RK. Membrane changes associated with platelet activation. Exposure of actin on the platelet surface after thrombin-induced secretion. *J Clin Invest*. 1980;**66**(1):1-9.
13. Hollender M, Wolf D. *Nonparametric statistical methods*. Moscow: Finances and statistics; 1983.
14. Jennings LK, Fox JE, Edwards HH, Phillips DR. Changes in the cytoskeletal structure of human platelets following thrombin activation. *J Biol Chem*. 1981;**256**(13):6927-6932.
15. Jirousková M, Jaiswal JK, Collier BS. Ligand density dramatically affects integrin alpha IIb beta 3-mediated platelet signaling and spreading. *Blood* 2007;**109**(12):5260-5269.
16. Klys' YG, Zajtseva NV, Kizim AI, Verevka SV. Proteolytic derivatives of plasminogen as a factor in malignancy development. *Oncology* 2010;**12**(1):17-21.
17. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;**227**(5259):680-685.
18. Lugovskoi EV, Makogonenko EM, Komisarenko SV. *Molecular mechanisms of formation and degradation of fibrin*. Kyiv: Naukova Dumka; 2013.
19. Michelson AD. *Platelets*, 3rd ed. Academic Press; 2012.
20. Miles LA, Dahlberg CM, Plow EF. The cell-binding domains of plasminogen and their function in plasma. *J Biol Chem*. 1988;**263**(24):11928-11934.
21. Miles LA, Hawley SB, Baik N, Andronicos NM, Castellino FG, Parmer RJ. Plasminogen receptors: the sine qua non of cell surface plasminogen activation. *Front Biosci*. 2005;**1**(10):1754-1762.
22. Miles LA, Plow EF. Binding and activation of plasminogen on the platelet surface. *J Biol Chem*. 1985;**260**(7):4303-4311.
23. Perri SR, Annabi B, Galipeau J. Angiostatin inhibits monocyte/macrophage migration via disruption of actin cytoskeleton. *FASEB J*. 2007;**21**(14):3928-3936.
24. Roka-Moya YM, Zhernosekov DD, Grinenko TV. Plasminogen/plasmin influence on platelet aggregation. *Biopolymers and Cell*. 2012;**28**(5):352-356.
25. Rosado JA, Graves D, Sage SO. Tyrosine kinases activate store-mediated Ca²⁺ entry in human platelets through the reorganization of the actin cytoskeleton. *Biochem J*. 2000;**351**:429-437.
26. Shattil SJ, Newman PJ. Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets. *Blood* 2004;**104**(6):1606-1615.
27. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979;**76**(9):4350-4354.
28. Tykhomyrov AA. Interaction of actin with plasminogen/plasmin system: mechanisms and physiological role. *Biopolymers and Cell*. 2012;**28**(6):413-423.
29. Wang H, Doll JA, Jiang K, Cundiff DL, Czarnecki JS, Wilson M, Ridge KM, Soff GA. Differential binding of plasminogen, plasmin, and angiostatin 4.5 to cell surface beta-actin: implications for cancer-mediated angiogenesis. *Cancer Res*. 2006;**66**(14):7211-7215.
30. White JG. Arrangements of actin filaments in the cytoskeleton of human platelets. *Am J Pathol*. 1984;**117**(2):207-217.
31. Zhang L, Gong Y, Grella DK, Castellino FJ, Miles LA. Endogenous plasmin converts Glu-plasminogen to Lys-plasminogen on the monocytoïd cell surface. *J Thromb Haemost*. 2003;**1**(6):1264-1270.
32. Zhernosekov DD, Iusova EI, Grinenko TV. Role of plasminogen/plasmin in functional activity of blood cells. *Ukr Biokhim Zh*. 2012;**84**(4):5-19.
33. Zubovskaya ET, Svetlitskaya SG. *System of hemostasis. Theoretical backgrounds and research methods*. Minsk: BGUFK; 2010.

Ин-т біохімії ім. А.В. Палладіна НАН України, Київ
E-mail: artem_tykhomyrov@ukr.net

Матеріал надійшов до редакції 04.05.2013