

УДК 577.158+616.379-008.64

ДОСЛІДЖЕННЯ ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ ЦИТОСКЕЛЕТА ТРОМБОЦИТІВ У РАЗІ ІНСУЛІНЗАЛЕЖНОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ

Л.Токарєва, Н.Сибірна

*Львівський національний університет імені Івана Франка,
вул. Грушевського, 4, м. Львів 79005, Україна*

Виконано порівняльне дослідження білкових спектрів лізатів тромбоцитів здорових донорів і людей, хворих на інсулінзалежний цукровий діабет. Уперше з'ясовано, що зміни функціонального стану цитоскелета тромбоцитів у разі досліджуваної патології, які зумовлюють значне зростання агрегаційної здатності цих клітин, супроводжуються перерозподілом вмісту білків контрактильного апарату кров'яних пластинок.

Ключові слова: цитоскелет, тромбоцити, цукровий діабет.

Для характеристики функціонального стану тромбоцитів важливе значення мають дослідження білків цитоскелета кров'яних пластинок. Порушення структури мікротрубочок та апарату контрактильного механізму, який складається з мікрофіламентів і субмембранних філаментів, призводить до значних змін у реакції вивільнення і ретракції кров'яного згустка.

З'ясовано, що мікрофіламенти тромбоцитів мають тромбастенін – контрактильний протеїн, який належить до актоміозинової групи протеїнів і побудований з двох компонентів, подібних до актину та міозину за функціональними властивостями, структурою та складом [1]. Тромбоцитарний актин, молекулярна маса якого 43 кДа, є головним скоротливим білком кров'яних пластинок. Його вміст становить 10% від загального білка цих клітин. Асиметрична молекула міозину тромбоцитів має молекулярну масу 460 кДа і складається з двох „важких” ланцюгів по 200 кДа та двох „легких” ланцюгів із молекулярною масою 19 кДа. Співвідношення актину й міозину в тромбоцитах у нормі становить 10:1. Тромбоцитарний міозин у сполученні з тромбоцитарним актином утворює структурну основу механізму скорочення кров'яних пластинок, який є в основі реакції вивільнення. Під впливом агрегуювальних агентів (у наших дослідженнях використано ADP) у тромбоцитах з'являються субмембранні філаменти, або „стрес-фібрили”. Тромбастенін, який відіграє роль рецептора для ADP, локалізований у цитогелі та на поверхні тромбоцитів. У разі дії на тромбоцити фізіологічного або патологічного подразника

відбувається значне посилення біосинтезу АТР до концентрації, необхідної для розщеплення актоміозинового комплексу на актин і міозин з утворенням лінійних агрегатів. Актин одного тромбоцита з'єднується з міозином іншого, утворюючи актоміозинові містки.

Агрегувальні сполуки спричиняють алостеричні трансформації тромбастеніну, локалізованого на поверхні тромбоцитів. Це призводить до зміни мембранної проникності, переходу цитогелю у розслаблений стан та взаємодії численних цитогелів, які виділилися з інших кров'яних пластинок [7].

Крім мікрофіламентів, до контрактильного апарату тромбоцитів належать і мікротрубочки, які складаються з протофіламентів, побудованих із димерів α - та β -тубуліну; α -тубулін – глобулярний білок молекулярною масою 53 кДа, а β -тубулін – близько споріднений до нього протеїн молекулярною масою 55 кДа.

Мікротрубочки, мікрофіламенти й субмембранні філаменти – це елементи цитоскелета кров'яних пластинок. Периферичні мікротрубочки підтримують дискподібну форму циркулюючих тромбоцитів, беруть участь у переміщенні органел, орієнтуючи рух цитоплазми, зсуваючи грануломер до центра клітини в разі дії агрегувальних агентів. Під агрегації під впливом ADP змінюється функціональний стан мембрани, відбувається деформація та зсув органел, субмембранні філаменти виходять із мікротрубочок у гіалоплазму, беруть участь в утворенні псевдоподій, пронизують корок і сприяють його ретракції.

Метою нашої роботи було порівняльне дослідження білкових спектрів лізатів тромбоцитів здорових донорів і людей, хворих на інсулінозалежний цукровий діабет (ІЗЦД), оскільки за умов цієї патології функціональний стан кров'яних пластинок змінюється і значно зростає їхня агрегаційна здатність [3].

Кров для отримання тромбоцитів збирали в силіконізовані пробірки. Для стабілізації крові використовували 3,8 % цитрат натрію. Спонтанну агрегацію тромбоцитів попереджали додаванням апірази („Sigma”, grade V) у кількості 1,5 од/мл. Проби центрифугували при 500 g 15 хв за кімнатної температури. Обережно відбирали супернатант для отримання збагаченої тромбоцитами плазми. Для осадження тромбоцитів отриману плазму підкислювали цитратом до рН 6,5 і потім центрифугували при 5 000 g упродовж 15 хв. Тромбоцити двічі промивали стократним об'ємом середовища, яке містило 137 ммоль NaCl, 11 ммоль глюкози, 11 ммоль цитрату (рН 6,5), 0,25 % бичачого сироваткового альбуміну („Sigma”, четверта фракція, вільна від вмісту жирних кислот), 0,2 од/мл апірази [5]. Лізис клітин проводили, додаючи однаковий об'єм буфера лізису (10 ммоль Трис HCl, рН 7,4; 150 ммоль NaCl; 1% Тритон X-100; 5 ммоль EDTA; 50 ммоль NaF; 1 ммоль Na_2VO_4 ; 1 ммоль PMSF; 5 ммоль бензамідин; 10 мкг/мл апротиніну, 10 мкг/мл лейпептину; 2 мкг/мл пепстатину), на льоді протягом 30 хв. Лізат центрифугували при 12 000 g 15 хв за температури 4°C. Концентрацію білка в лізатах визначали за методом Петерсона [6].

Електрофорез білків лізатів тромбоцитів виконували в поліакриламідному гелі

(ПААГ) у блоках із градієнтом 5-18 % у буферній системі Леммлі [2,4].

На рис.1 показано електрофореграму розділення білків лізатів тромбоцитів у ПААГ.

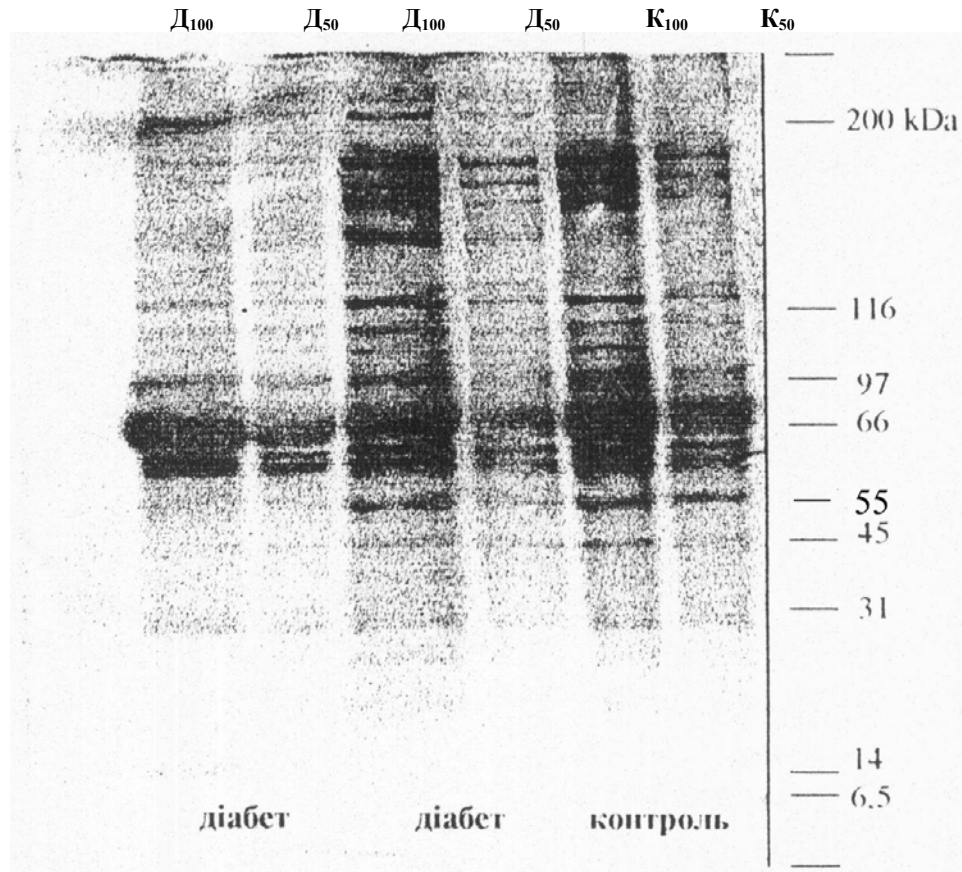


Рис.1. Електрофореграма розділення білків лізатів тромбоцитів: (K₅₀ – лізат тромбоцитів здорових донорів, 50 мкг білка; K₁₀₀ – 100 мкг білка; D₅₀ – лізат тромбоцитів людей, хворих на ІЗЦД, 50 мкг білка; D₁₀₀ – 100 мкг білка.

Після опрацювання електрофореграми виявлено зміни в білкових спектрах у ділянках молекулярної маси 200 кДа (зона важких ланцюгів міозину); 55 кДа (зона тубулінових білків); 45 кДа (зона актину). На рис. 2–4 показано результати комп'ютерного опрацювання вмісту окремих білкових фракцій у лізатах тромбоцитів здорових донорів і за умов ІЗЦД. Смуга, яка за маркерними білками визначена на-

ми зоною міозинових ланцюгів, ліпше виражена в лізатах кров'яних пластинок людей, хворих на діабет. Зворотна картина простежувалася під час аналізу фракцій молекулярними масами 55 та 45 кДа. Абсолютний вміст білка цих фракцій був вищий у здорових донорів.

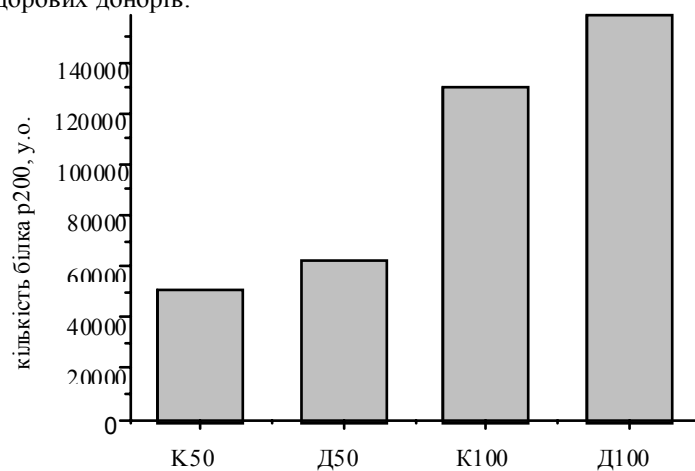


Рис. 2. Перерозподіл вмісту білкової фракції молекулярною масою 200 кДа в електрофореграмах лізатів тромбоцитів здорових донорів (K₅₀ і K₁₀₀) та людей, хворих на ІЗЦД (D₅₀ і D₁₀₀).

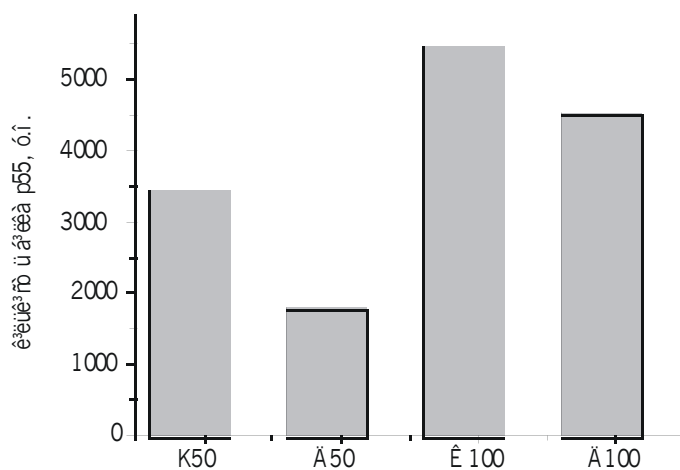


Рис. 3. Перерозподіл вмісту білкової фракції молекулярною масою 55 кДа в електрофореграмах лізатів тромбоцитів здорових донорів (K₅₀ і K₁₀₀) та людей, хворих на ІЗЦД (D₅₀ і D₁₀₀).

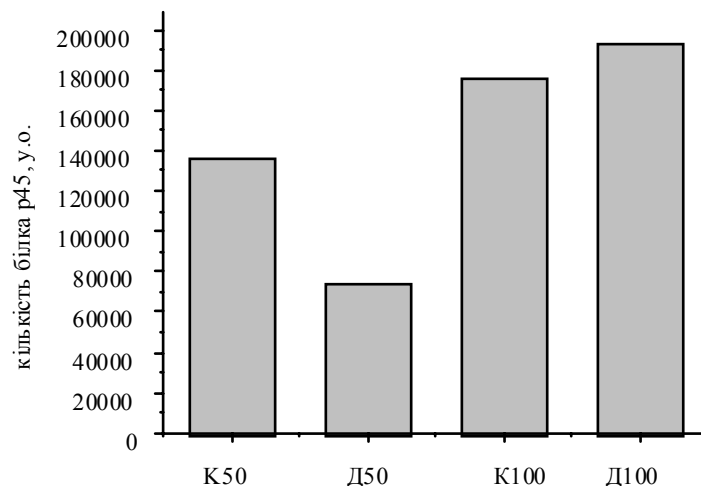


Рис. 4. Перерозподіл вмісту білкової фракції молекулярною масою 45 кДа в електрофореграмах лізатів тромбоцитів здорових донорів (K₅₀ і K₁₀₀) та людей, хворих на ІЗЦД (D₅₀ і D₁₀₀).

Перерозподіл вмісту окремих білкових фракцій лізатів тромбоцитів людей за умов інсулінзалежного цукрового діабету, %

Умови	Молярна маса, кДа		
	200	55	45
Контроль	100	100	100
ІЗЦД	124,5±2,3	66,6±0,7	80,7±0,3

Примітка. Різниця вірогідна порівняно з контролем, $p < 0.05$.

У таблиці наведено дані статистичного опрацювання змін білкових спектрів лізатів досліджуваних клітин по окремих фракціях. Отже, внаслідок проведених досліджень ми вперше довели, що за умов інсулінзалежного цукрового діабету зміна функціонального стану тромбоцитів узалежнена перерозподілом вмісту білків цитоскелету кров'яних пластинок.

Робота виконана за підтримки Гранту Західно-Українського біомедичного дослідницького центру.

1. *Вашкинель В.К., Петров М.Н.* Ультраструктура и функция тромбоцитов человека. – Л.: Наука, 1982. – 87 с.
2. *Остерман Л.А.* Методы исследования белков и нуклеиновых кислот.

- Электрофорез и ультрацентрифугирование. М.: Наука, 1881.
3. *Токарева Л.В., Сибірна Н.О., Великий М.М.* Вплив L-аргініну на агрегаційну функцію тромбоцитів при інсулінзалежному цукровому діабеті// Наук. вісник ЛДАВМ.– 2000. Т.2 (№2).- С.244-248.
 4. *Laemmli U.K.* Cleavage of structural proteins during the assembly oh the head of bacteriophage Vol.4//Nature.1970.227.N5259.-P.680-684.
 5. *Molnar J., Lorand L.* Studies of apyrases// Arch. of biochem. and biophysics. 1993, Vol. 2.-P.353-363.
 6. *Peterson G.L.* A simplification of the protein assay method of Lowry et al//Ann.Biochem.– 1977. Vol.83. N2.-P.346-348.
 7. *Rabini RA, Staffolani R., Fumelli P.* et al. Decreased nitric oxide synthase activity in platelets from IDDM and NIDDM patients// Diabetologia. 41(1):101-4, 1998 Jan.

INVESTIGATION OF THE FUNCTIONAL STATE OF CYTOSKELETON OF THE PLATELETS UNDER THE INSULIN- DEPENDENT DIBETES MELLITUS

L.Tokareva, N.Sybirna

*Ivan Franko National Uuniversity of L'viv,
Hrushevskoho st.,4, L'viv 79005, Ukraine*

At the present study we carried out the investigation of the protein spectrum of lysates of platelets from healthy donors and diabetes patiants. It has been shown that the changes in the functional state of platelets accompanied by changes in the redistribution of the proteins of the cytoskeleton of platelets.

Keywords: cyroskeleton, platelets, insulin-dependent diabetes mellitus.

Стаття надійшла до редколегії 04.07.2001
Прийнята до друку 06.07.2001