

## ДЛЯ ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ НА БІОЛОГІЧНІ ОБ'ЄКТИ

УДК 577.322.7

## ВЛИЯНИЕ ПОЛ И ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА ДЕЗАГРЕГАЦИЮ ТРОМБОЦИТОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ПОЛИПЕПТИДНОГО АНТИБИОТИКА ГРАМИЦИДИНА S

Е.В. Хакл\*, В.П. Берест, Адиб Халаф Фадел Ал-Амуш, С.В. Гаташ

*\*Institute of Cell and Molecular Biology, University of Edinburgh, Edinburgh EH9 3JR, UK;**Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина, пл. Свободы, 4, 61077, Харьков*

Поступила в редакцию 30 декабря 2006 г.

Для изучения механизма взаимодействия циклического полипептидного антибиотика грамицидина S с клеточными мембранами, с использованием метода турбидиметрии было проведено исследование влияния модификации липидного бислоя мембран тромбоцитов на параметры связывания грамицидина S с кровяными пластинками. В работе рассмотрен процесс дезагрегации нативных и  $\gamma$ -облученных дозами 10-250 Гр тромбоцитов при действии грамицидина S, также изучено влияние перекисного окисления липидов мембран и антиоксидантов на характер распада агрегатов тромбоцитов под действием антибиотика при разных температурах в области 8-37°C. Показано, что разрыхление липидного бислоя мембран тромбоцитов продуктами перекисного окисления приводит к облегчению встраивания грамицидина,  $\alpha$ -токоферол оказывает как разупорядочивающее так и конденсирующее действие на мембрану клеток в зависимости от температуры среды.  $\gamma$ -облучение тромбоцитов *in vitro* дозами 3-5 Гр приводит к наибольшему разрыхлению мембран клеток оцениваемому по степени и скорости дезагрегации, вызываемой грамицидином S. Сделан вывод о ведущей роли в механизме связывания грамицидина S с мембраной плотности упаковки липидов в бислое. Результаты данной работы позволяют использовать пептидный антибиотик грамицидин S в качестве индикатора, чувствительного к фазовому состоянию липидов биологических мембран.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** тромбоциты, грамицидин S, агрегация, распад агрегатов, перекисное окисление липидов, ионизирующее излучение, температура.

В предыдущей работе нами было исследовано влияние полипептидного антибиотика грамицидина S (GS) на тромбоциты человека [1]. Мы показали, что характер влияния грамицидина S на тромбоциты зависит от концентрации GS. Добавление GS к тромбоцитам индуцирует два процесса: набухание тромбоцитов, а при увеличении концентрации GS – активацию тромбоцитов. Механизм активации тромбоцитов грамицидином опосредован ионами  $Ca^{2+}$ . Однако, подобная активация тромбоцитов не приводит к агрегации тромбоцитов. После воздействия GS на тромбоциты последние не утрачивают способность к агрегации. Действие GS на клетки носит неспецифический характер.

Добавление грамицидина S к проагрегировавшим тромбоцитам вызывает распад агрегатов тромбоцитов. Степень распада агрегатов тромбоцитов пропорциональна концентрации раствора GS и зависит от температуры [2]. Последнее объясняется различной скоростью взаимодействия молекулы GS с мембраной, которая определяется различной подвижностью липидов при разных температурах. В частности, было показано, что по наличию и величине "лаг-периода" после добавления GS к проагрегировавшим тромбоцитам, можно косвенно судить о подвижности липидов в мембранах тромбоцитов. Естественно, при изменении состояния липидного бислоя будет изменяться и взаимодействие с ним молекулы GS.

Продолжая тему, начатую в нашей предыдущей работе, в этой статье мы попытались установить, как взаимодействие GS с тромбоцитами зависит от состояния липидов мембраны, которое модифицировалось перекисным окислением. Полученные таким образом данные позволяют лучше понять механизм влияния GS на тромбоциты, который до сих пор не обсуждался в литературе. С другой стороны изучение взаимодействия GS с тромбоцитами и факторов, влияющих на это взаимодействие, позволит, в принципе, решать обратную задачу – определять состояние липидов мембран тромбоцитов на основании анализа взаимодействия GS с тромбоцитами и его влияния на дезагрегацию тромбоцитов. Такие исследования удобно проводить совместно с изучением агрегации тромбоцитов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В данной работе использовалась венозная кровь здоровых доноров обоих полов, стабилизированная глюцициром в соотношении 1:4. Обогащенная тромбоцитами плазма (ОТП) выделялась путем центрифугирования цельной крови в течение 10 минут при 146 g при комнатной температуре. Бестромбоцитарная плазма выделялась центрифугированием цельной крови 15 мин при 1100 g. Образцы

ОТП разводились бестромбоцитарной плазмой до концентрации тромбоцитов  $2,5 \times 10^5 \cdot \text{мм}^{-3}$ , при этом, начальная оптическая плотность образца ( $D_0$ ) была в пределах 0,7-0,8 относительных единиц.

В работе использовался стандартный медицинский препарат грамицидина S («Фармахим», Россия). Исходный 2% спиртовой раствор грамицидина S разбавлялся в 30-50 раз 0,15 M NaCl (рН 7,4). В работе также использовались следующие химические реактивы: АДФ и адреналин ("Reanal", Венгрия).

Для изучения влияния перекисного окисления липидов (ПОЛ) мембран на взаимодействие GS с тромбоцитами ОТП преинкубировалась в течение 15 минут с про- (ионы  $\text{Fe}^{2+}$  и аскорбиновая кислота) или антиоксидантами ( $\alpha$ -токоферол) при температуре  $25^\circ\text{C}$ . 20 mM аскорбиновая кислота и 480 mM соль Мора добавлялись по 0,1 мл к 1 мл плазмы, обогащенной тромбоцитами, по методике аскорбат зависимого ПОЛ [3, 9]. В качестве антиоксиданта использовался  $\alpha$ -токоферол (раствор в гексане) в конечной концентрации 1 мкг/мл.

Добавление аскорбиновой кислоты и соли Мора (в указанных концентрациях) к обогащенной тромбоцитами плазме не вызывает агрегации тромбоцитов. Добавление раствора  $\alpha$ -токоферола в гексане в количестве 2% от объема ОТП не вызывает агрегации тромбоцитов. Преинкубация тромбоцитов с про- и антиоксидантами не влияет на начальную оптическую плотность ОТП и количество тромбоцитов в образце.

Агрегация и дезагрегация тромбоцитов исследовались оптическим методом [4, 5]. Оптическая плотность суспензии тромбоцитов измерялась при помощи фотоэлектроколориметра ФЭК-М с зеленым светофильтром (максимум пропускания  $\lambda=540$  нм). К 1 мл ОТП, помещенному в специально разработанную термостабилизированную стеклянную кювету толщиной 3 мм, добавляли 0,1 мл индуктора агрегации (АДФ или адреналин) при постоянном перемешивании. Регистрировали изменение оптической плотности суспензии клеток при помощи потенциометра ЭПП 09. Раствор GS (0,1-0,2 мл) добавляли к ОТП через 9 мин после начала агрегации. Температура образца в кювете измерялась термопарой медь-константан с точностью до  $\pm 0,1^\circ\text{C}$ . По кинетическим кривым оптической плотности ОТП определяли степень и скорость агрегации и дезагрегации тромбоцитов [6].

Образцы ОТП в стеклянных контейнерах облучались (в дозах  $10+250$  Гр) на гамма-установке закрытого типа "Исследователь". Мощность излученной дозы гамма-лучей  $^{60}\text{Co}$  в активной зоне составляла 500 Р/мин.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Добавление грамицидина S к проагрегировавшим под действием индуктора тромбоцитам вызывает увеличение оптической плотности ОТП. Типичные агрегатограммы, иллюстрирующие характер изменения светопропускания, приведены на рис. 1. Для всех использованных в работе [2] индукторов агрегации (АДФ, адреналин,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$ ) общий вид зависимостей оптической плотности образца от времени был одинаков. Подобное увеличение оптической плотности может быть связано с распадом агрегатов тромбоцитов. Исчезновение агрегатов в кювете после добавления GS можно наблюдать и визуально. Степень распада агрегатов тромбоцитов пропорциональна концентрации раствора GS. Дезагрегацию тромбоцитов под действием грамицидина S мы объяснили следующим образом [1]. Молекула GS, встраиваясь в мембрану, нарушает липид-липидные и липид-белковые взаимодействия [10, 11] и, вероятно, вызывает упругое напряжение в мембране. Прочность белковых мостиков, соединяющих тромбоциты в агрегате, гораздо меньше прочности мембраны (так как в мембране действуют сильные гидрофобные силы [12]), поэтому напряжение, вызванное встраиванием молекулы GS в мембрану, может сниматься за счет разрывов именно белковых (фибриногеновых) мостиков. При разрыве этих связей агрегаты будут распадаться, при этом количество рассеивающих центров будет увеличиваться, что должно привести к возрастанию оптической плотности [13].

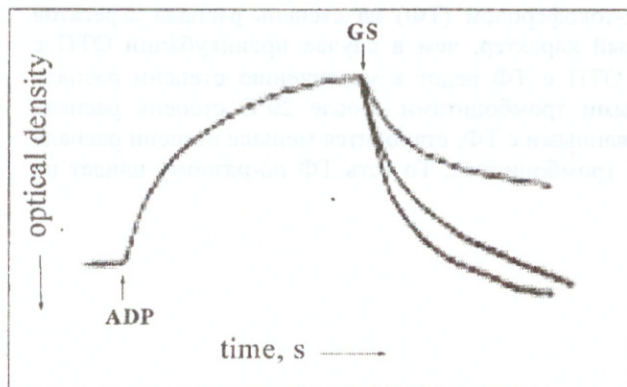


Рис.1. Изменение оптической плотности образца ОТП под действием индуктора агрегации (АДФ) и GS со временем при добавлении GS через 9 мин. после начала АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов. Концентрация GS -  $5 \times 10^{-3} \div 2 \times 10^{-2}$  мг/мл, АДФ - 0.18 мг/мл;  $t=22^\circ\text{C}$ .

Поскольку степень и скорость распада агрегатов тромбоцитов под действием GS зависят от интервала времени между добавлением индуктора агрегации и GS к образцу ОТП [1], в настоящей работе во всех измерениях мы добавляли GS к ОТП через 9 минут после начала агрегации.

Известно, что процесс ПОЛ оказывает значительное влияние на состояние липидного компонента мембран. В частности, прооксиданты разрыхляют липидный бислои, повышая скорость реакций, зависящих от диффузии молекул в липидный бислой. Антиоксиданты, наоборот, укрепляют липидный бислой, понижая скорость таких реакций [7-9]. Для того, чтобы проверить, будет ли взаимодействие GS с мембранами тромбоцитов зависеть от процесса ПОЛ в мембранах, мы изучили влияние преинкубации тромбоцитов с про- (аскорбат и ионы  $Fe^{2+}$  [7]) и антиоксидантами ( $\alpha$ -токоферол [8]) на степень и скорость распада агрегатов тромбоцитов под действием GS (предшествующая агрегация вызывалась добавлением основных физиологических индукторов агрегации тромбоцитов - АДФ или адреналина к образцу ОТП).

Как видно из данных, приведенных на рис. 2, степень распада агрегатов тромбоцитов, преинкубированных с аскорбатом и ионами  $Fe^{2+}$ , увеличивается по сравнению с контролем; скорость распада агрегатов при этом тоже повышалась. Прооксиданты разрыхляют бислой, облегчая встраивание грамицидина S в мембрану.

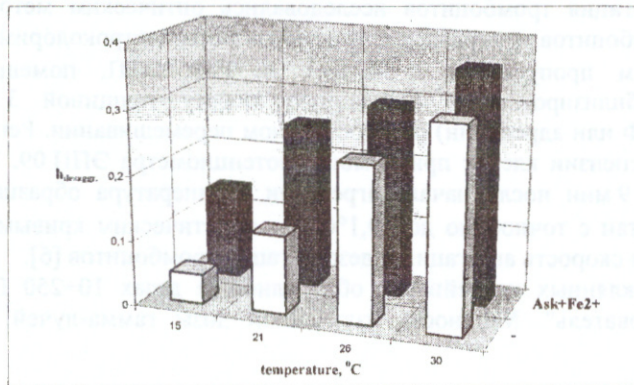


Рис.2. Зависимости степени (h) распада агрегатов тромбоцитов под действием GS от температуры для нативных тромбоцитов и тромбоцитов, преинкубированных в течение 15 минут с про-оксидантом (аскорбат +  $Fe^{2+}$ ). Предшествующая добавлению GS агрегация тромбоцитов вызывалась АДФ ([АДФ]=0,18 мг/мл; [GS]=0,1 мг/мл).

В работе [6] показано, что предварительная инкубация тромбоцитов, в плазме в течение 15 минут с 20 мМ аскорбиновой кислотой и 480 мМ солью Мора приводит к увеличению скорости и степени АДФ-индуцированной агрегации по сравнению с агрегацией интактных тромбоцитов, а преинкубация ОТП в течение 15 минут с  $\alpha$ -токоферолом (конечная концентрация 1 мкг/мл) приводит к снижению этих показателей. Инкубация с аскорбиновой кислотой и солью Мора вызывает смещение максимума степени агрегации в область более высоких температур и его уширение; инкубация с  $\alpha$ -токоферолом - к сужению максимума и смещению его в область более низких по сравнению с контролем (АДФ-индуцированная агрегация интактных тромбоцитов) температур. Аналогичные изменения в положениях максимумов отмечены для скоростей агрегации. Величина (интенсивность) максимума степени агрегации после инкубации с  $\alpha$ -токоферолом падает, а после инкубации с аскорбатом и солью Мора - растёт. Аналогично и для скорости - интенсивность максимума скорости растёт при индукции перекисного окисления липидов и уменьшается при инкубации с  $\alpha$ -токоферолом.

Влияние предварительной инкубации ОТП с  $\alpha$ -токоферолом (ТФ) на степень распада агрегатов тромбоцитов под действием GS носит более сложный характер, чем в случае преинкубации ОТП с прооксидантами (рис. 3). До  $\sim 20^{\circ}C$  преинкубация ОТП с ТФ ведет к увеличению степени распада агрегатов тромбоцитов по сравнению с контрольными тромбоцитами. После  $20^{\circ}C$  степень распада агрегатов, образованных тромбоцитами, преинкубированными с ТФ, становится меньше степени распада агрегатов, образованных нативными (контрольными) тромбоцитами. То есть ТФ по-разному влияет на липиды при  $T > T_{кр}$  и  $T < T_{кр}$ .

## Влияние ПОЛ и ионизирующего излучения на дезагрегацию тромбоцитов...

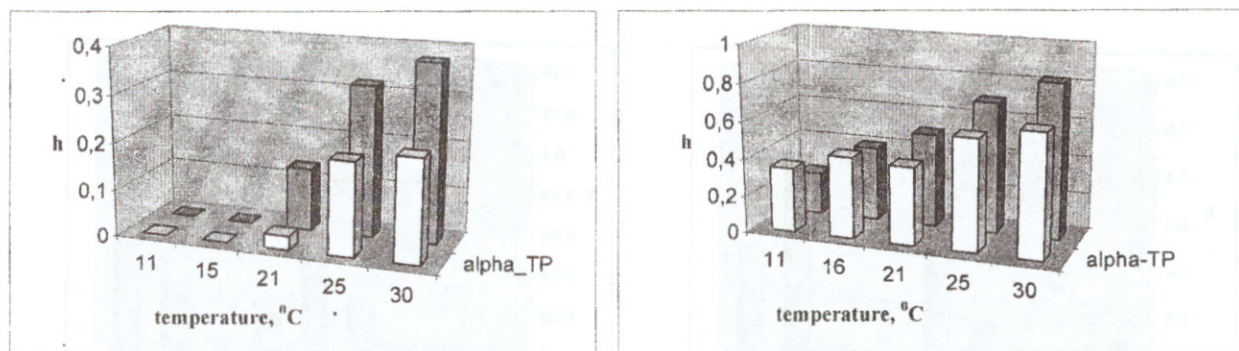


Рис. 3. Зависимости степени (h) распада агрегатов тромбоцитов под действием GS от температуры для нативных тромбоцитов и тромбоцитов, преинкубированных в течение 15 минут с  $\alpha$ -токоферолом. Предшествующая добавлению GS агрегация тромбоцитов вызывалась АДФ в концентрации 0,18 мг/мл. [GS] =  $5 \times 10^{-3}$  мг/мл (слева) и  $10^{-2}$  мг/мл (справа); [ $\alpha$ -токоферол] = 1 мкг/мл

Аналогичное влияние на липидный бислой мембран оказывает холестерин. Встраивание холестерина в фосфолипидный бислой вызывает как нарушение квазикристаллической упаковки жирнокислотных цепей при температуре ниже  $T_{кр}$ , так и уменьшение подвижности (возрастание упорядоченности) цепей при температуре выше  $T_{кр}$ . Интересно отметить, что эффект  $\alpha$ -токоферола на ПОЛ липидов мембран может зависеть не только от температуры, но и от концентрации  $\alpha$ -токоферола, а также от степени насыщенности липидов [14].

Еще одним физическим фактором, оказывающим влияние на подвижность и плотность упаковки липидов мембран, является ионизирующее излучение. Известно, что агрегационная способность тромбоцитов значительно изменяется в зависимости от дозы облучения. При этом, степень агрегации тромбоцитов, облученных в дозах меньше 200 Гр выше чем у необлученных, а при более высоких дозах – ниже. Максимальная агрегация тромбоцитов наблюдается при облучении в дозах 30-50 Гр и выше чем у контроля в 1,2-1,5 раза [15]. При действии ионизирующего излучения в дозах до 50 Гр происходят изменения в структуре мембран тромбоцитов, облегчающие взаимодействия молекул индуктора с мембранными рецепторами и ускоряющие активацию тромбоцитов. Снижение степени агрегации тромбоцитов в интервале доз облучения 50-250 Гр связывают с постепенной дезактивацией рецепторов тромбоцитов. При больших дозах ионизирующего облучения уменьшается степень агрегации тромбоцитов, их концентрация и количество фибриногена в плазме [15].

Мы использовали гамма-облучение ОТП дозами от 1 до 25 кР для модификации мембран клеток и изучили дезагрегацию тромбоцитов под действием грамицидина S при разных температурах в области 4 – 40°C. Было установлено, что агрегаты, образованные облученными тромбоцитами, менее прочны. Дело не только в ускорении встраивания GS в облученные тромбоциты, а именно в ослаблении прочности агрегатов, даже степень распада агрегатов для нативных тромбоцитов значительно меньше (рис. 4 - 5).

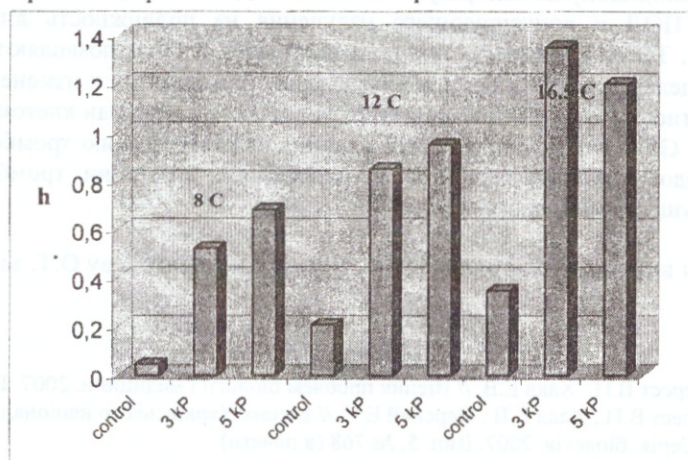


Рис. 4. Влияние температуры на распад агрегатов тромбоцитов под действием GS от температуры для нативных и облученных тромбоцитов в дозе 3 и 5 кР. Предшествующая агрегация тромбоцитов вызывалась АДФ в концентрации 0,18 мг/мл; [GS] =  $10^{-2}$  мг/мл.

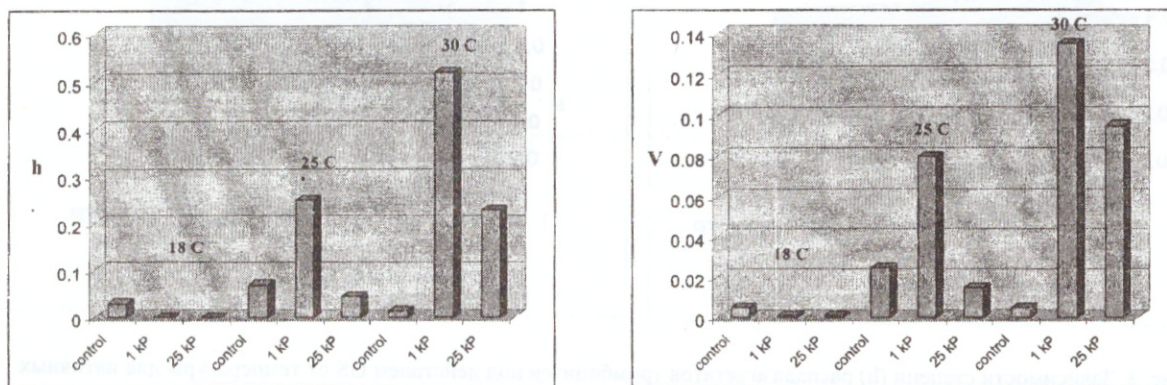


Рис. 5. Зависимости степени (h, слева) и скорости (V, справа) распада агрегатов тромбоцитов под действием GS от температуры для нативных тромбоцитов и тромбоцитов, облученных в дозе 1 и 25 кР. (Условия облучения и регистрации как и на рис. 4).

На кинетических кривых оптической плотности нативной ОТП при дезагрегации наблюдался лаг-период, т.е. задержка между добавлением GS к ОТП и началом распада агрегатов. По мере повышения температуры величина лаг-периода уменьшалась. Для облученных тромбоцитов (как 3, так и 5 кР) лаг-период отсутствовал даже при температуре 8°C. Следовательно, встраивание GS в мембраны облученных тромбоцитов происходит быстрее, чем в мембраны необлученных. Таким образом,  $\gamma$ -облучение ОТП приводит к разрыхлению мембран тромбоцитов (за счет образования дефектов упаковки при образовании продуктов ПОЛ).

Отличия во взаимодействии грамицидина S с облученными и не облученными тромбоцитами более заметны при температурах выше 15-20°C.

Как видно из рисунков 4 и 5, средние дозы облучения (1 - 5 кР) оказывают наиболее сильное разупорядочивающее действие на липиды, высокие дозы облучения в некоторых случаях даже укрепляют липиды. Похожие данные были получены ранее другими методами [15].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты данной работы хорошо согласуются с предыдущими исследованиями: степень и скорость взаимодействия GS с мембранами определяется подвижностью липидов мембраны. Внешние воздействия, модифицирующие липидный бислой, изменяют степень и скорость взаимодействия GS с мембранами тромбоцитов.

В настоящей работе (в дополнение к данным [1,2]) мы привели несколько примеров использования GS для исследования состояния липидов мембран, при этом мы выбирали условия, при которых состояние липидов мембран достаточно хорошо изучено (ПОЛ, воздействие температуры и ионизирующего излучения). Полученные результаты полностью согласуются с данными литературы о влиянии температуры, ПОЛ и ионизирующего излучения на подвижность липидного компонента биологических мембран. Таким образом, результаты настоящей работы позволяют перейти к решению обратной задачи – определения состояния липидов мембран тромбоцитов и изменений, происходящих в липидном бислое (в частности, в результате целого ряда патологий мембран клеток крови) на основании анализа взаимодействия GS с тромбоцитами и его влияния на дезагрегацию тромбоцитов. Возможность проводить такие исследования параллельно с исследованием агрегации тромбоцитов может быть дополнительным преимуществом данного метода.

**Благодарности.** Авторы выражают благодарность к.ф.-м.н., с.н.с. Николу О.Т. за помощь в облучении образцов ОТП.

### ЛИТЕРАТУРА

- 1 Аль Амуш А.Х.Ф., Берест В.П., Хакл Е.В. // Вісник проблем біології і медицини. 2007. Вип. 1. С. 167-172.
- 2 Ал Амуш А.Х.Ф., Берест В.П., Хакл Е.В., Перский Е.С. // Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Серія: біологія. 2007. Вип. 5, № 768 (в печати)
- 3 Берест В.П. Влияние температуры на агрегацию тромбоцитов в норме и при действии гамма-облучения / Дис... канд. физ.-мат. наук. Харьков. 1999. 191 с.
- 4 Born G.V.R. // Nature. 1962. V. 206. P. 927.
- 5 Самаль А.Б., Черенкевич С.Н., Хмара Н.Ф. Агрегация тромбоцитов: методы изучения и механизмы. Минск: Университетское, 1990. 103с.

- 6 Берест В.П., Гаташ С.В. // Физиологичний журнал. 1998. Т.44, № 5-6. С. 89-94.
- 7 Деев А.И., Осис Ю.Г., Формазюк В.Е. и др. // Биофизика. 1983. Т.28, вып. 4. С. 629-631.
- 8 Marsh S.A., Coombes J.S. // Clin. Appl. Thromb. Hemost. 2006. V. 12, n. 2. P. 169-173.
- 9 Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М.: Наука, 1972. 252 с.
- 10 Королев П.Н., Булгакова В.Г., Полин А.Н., Королев Н.П., Мильграм В.Д. // Научные доклады высшей школы, Биологические науки. 1988. № 7. С. 31-35.
- 11 Katsu T., Kobayashi H., Hirota T., Fujita Y., Sato K., Nagai U. // Biochim. Biophys. Acta. 1987. V. 899, N 2. P. 159-170.
- 12 Coorssen J., Rand R.P. // Studia Biophysica. 1988. V.127, N 1-3. P.53-60.
- 13 Latimer P., Wamble F. // Appl. Opt. 1982. V. 21, N 13. P. 2447-2455.
- 14 Болдырев А.А. Введение в биомембранологию. М.: Изд-во МГУ, 1990. 208 с.
- 15 Берест В.П., Гаташ С.В., Воробейчик М.А. // Вісн. Харк. ун-ту. 1999. № 450. Біофізичний. вісн. Вип.4. С. 96-99.