

УДК 577.322.7+591.111.1:57.043

БІОФІЗИКА КЛІТИНИ

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ТЕМПЕРАТУРЫ НА ТРОМБОЦИТЫ ПЛАЗМЫ ЧЕЛОВЕКА

В.П. Берест, Т.Ф. Морозова*, С.В. Гаташ

Харьковский государственный университет, пл. Свободы, 4, 310077; *Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, ул. Переяславская, 23, 310015

Поступила в редакцию 12 октября 1998 г.

Методом УФ-спектрофотометрии исследованы изменения структурного состояния тромбоцитов до и после АДФ-индуцированной агрегации в области температур 6-40°C. Отмечено изменение формы нативных тромбоцитов при температурах 14-18°C при нагревании суспензии клеток, связанное, по-видимому, с реорганизацией микрофиламентов примембранного цитоскелета и полимеризацией актина. Предполагается, что наблюдаемые структурные изменения, по-видимому, мембранных рецепторов АДФ и фибриногена, при 18-20°C и 30-32°C определяют характер зависимости параметров АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов от температуры.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: тромбоциты, агрегация, мембранные рецепторы, температура, ультрафиолетовая спектрофотометрия

В практике трансфузиологии тромбоциты обычно хранятся при 22°C, реже при 4°C, так как температура хранения оказывает значительное влияние на характеристики конечного продукта, в том числе и на поведение тромбоцитов в кровяном русле после трансфузии [1,2]. В частности известно, что тромбоциты, хранившиеся при 4°C в течение 24 часов клинически эффективны сразу же после переливания, тогда как хранившиеся при 22°C в течение тех же 24 часов должны некоторое время циркулировать в кровяном русле реципиента перед тем, как их функциональная активность станет определяемой [3].

Ранее нами было показано, что зависимость функциональной активности тромбоцитов от температуры имеет экстремальный характер [4]. Максимальная АДФ-индуцированная агрегация тромбоцитов наблюдается при 18-22°C, а скорость процессов связанных с образованием агрегатов максимальна при температурах 30-34°C. Показано влияние температуры и на структурно-морфологические характеристики тромбоцитов. Так, по мере снижения температуры, при 12-13°C происходит изменение формы тромбоцитов, обусловленное изменением структуры микротрубочек примембранного слоя, причем данные изменения, по-видимому, обратимы [5].

Роль тромбоцитарного цитоскелета и его структурного состояния в функционировании клетки в области физиологических температур недостаточно ясна, хотя известно, что дискообразная форма интактного тромбоцита без псевдоподий поддерживается кольцом микротрубочек, построенным из максимально полимеризованного тубулина и примембранным поясом микрофиламентов (основу которого составляет актин) [6]. При исследовании тромбоцитов в ряде работ было показано, что методы УФ-спектрофотометрии способны дать информацию о состоянии актина цитоскелета этих клеток [7].

В данной работе проведено спектрофотометрическое исследование спектральных характеристик обогащенной тромбоцитами и бестромбоцитарной плазмы (ОТП и БТП) крови человека, в области температур 6-40°C, до и после агрегации, индуцированной АДФ, с целью выявления вклада структурного состояния белков тромбоцитов в морфо-функциональные изменения кровяных пластинок при действии температуры. Изменения структурного состояния тромбоцитарных белков оценивали по изменению спектров поглощения суспензии клеток в ультрафиолетовом диапазоне длин волн.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обогащенную тромбоцитами плазму (ОТП) выделяли из стабилизированной цитратом натрия крови доноров путем центрифугирования в течение 10 мин при 167g, бестромбоцитарную плазму (БТП) – центрифугированием OTP 15 мин при 1100g [8]. Для исследования спектров поглощения OTP разводили фосфатным буфером (рН 7,2), концентрация тромбоцитов в кювете составляла $(2-3) \cdot 10^5$ кл/мм³. Спектры поглощения БТП, OTP и суспензии клеток после агрегации получали с помощью ультрафиолетового регистрирующего спектрофотометра "PYE UNICAM SP 8000" (Великобритания) в диапазоне 250-350 нм. Запись спектров проводилась через 2°C при нагревании клеточных суспензий от 6 до 40°C. По спектрам поглощения определялись мутность раствора, интенсивность поглощения и интенсивность максимумов первой производной спектров поглощения (ПСП).

Агрегацию тромбоцитов вызывали добавлением $2 \cdot 10^{-5}$ М раствора АДФ ("Реанал") к OTP в объемном отношении 1:9 и перемешиванием в течение 15 мин при скорости вращения мешалки 10 с⁻¹.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ПСП БТП наблюдаются хорошо разрешенные максимумы 287, 292-293 нм, менее интенсивный - 288 нм и пики 280-282, 298 нм.

В 1ПСП ОТП до агрегации регистрируются отрицательные максимумы 287, 292-293 нм, менее интенсивные 288, 291, 295 нм и слабые пики 280-282, 284, 298 нм.

После агрегации изменяется вид 1ПСП. Уменьшается интенсивность указанных выше максимумов. Максимумы 290 нм, 284 нм, 296 нм практически исчезают из 1ПСП, но появляются интенсивные максимумы 286, 288-289, 298 нм и слабые пики 270, 274, 280-281 нм.

Изменение мутности БТП происходит при 16-18°C, в ОТП такое изменение происходит при 14-18°C, а в ОТП после агрегации изменение мутности отмечено около 30°C.

Интенсивность максимумов 1ПСП зависит от температуры, причем изменения спектральных характеристик БТП и ОТП происходят в несовпадающих температурных областях. Так, изменения интенсивности максимумов 1ПСП БТП 281, 292-293, 298 нм отражают существование общего структурного перехода белков плазмы около 20°C, зафиксированного ранее другими методами [9].

Интенсивность основных максимумов 1ПСП ОТП 287 и 292-293 нм практически не изменяется во всем диапазоне температур. Но для некоторых пиков наблюдаются температурные интервалы, в которых интенсивность пиков 1ПСП резко меняется. Так для ОТП наблюдается изменение интенсивности пиков 280 нм при температуре 30-32°C (Рис. 1), 284 нм при 14-16°C (Рис. 2), а при температуре 18-20°C изменяются интенсивности максимумов 1ПСП 288 и пика 298 нм (Рис. 3, 4).

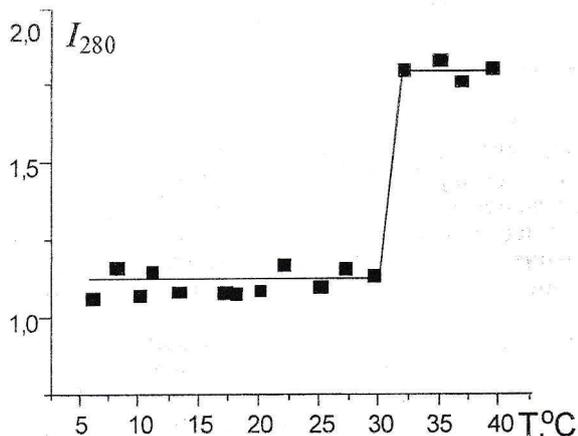


Рис. 1. Зависимость интенсивности пика 1ПСП 281 нм ОТП от температуры.

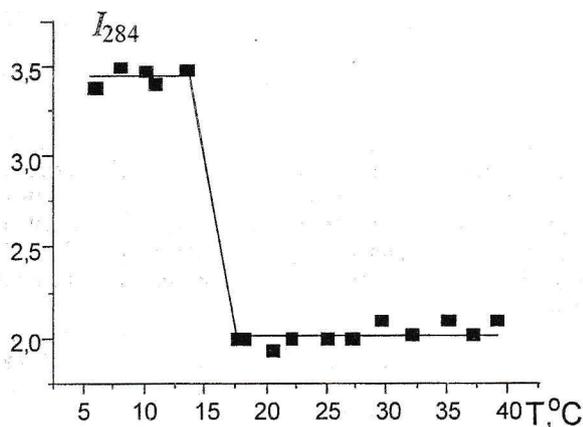


Рис. 2. Зависимость интенсивности максимума 1ПСП 284 нм ОТП от температуры.

После агрегации в 1ПСП суспензии клеток наблюдается изменение системы термопереходов на разных полосах. Изменение интенсивности максимума 298 нм происходит при температуре 30°C, вместо 18°C до агрегации. При температуре около 20°C происходит изменение интенсивности максимума 1ПСП 292-293 нм и пика 280-281 нм.

Мутность суспензии нативных тромбоцитов изменяется при температурах 14-18°C (Рис. 5). В литературе встречаются сведения о том, что при охлаждении при температурах 12-13°C изменяется форма тромбоцитов [5]. При этом наблюдаются изменения в структуре цитоскелета: происходит деполимеризация тубулина, распад микротрубочек и примембранного пояса микрофиламентов [6]. С другой стороны известна обратимость эффектов охлаждения-нагрева тромбоцитов, в частности показано, что нагревание до 37°C стимулирует сборку микротрубочек, а охлаждение до 4°C блокирует этот процесс и вызывает их распад [8]. Поэтому зарегистрированное в работе изменение мутности ОТП при 14-18°C, предположительно, связано с изменением формы клеток от сферы к диску.

Неким подтверждением существования изменения формы тромбоцитов при 14-18°C служит обнаруженный факт температурозависимых изменений интенсивности максимумов 1ПСП ОТП 284 и 288 нм.

Во всем исследованном диапазоне температур интенсивность максимума 1ПСП 288 нм значительно выше у ОТП до агрегации чем у суспензии клеток после агрегации. Максимум 288 нм по-разному ведет себя у нативных и агрегированных тромбоцитов, то есть, по-видимому, имеет отношение к агрегации тромбоцитов.

Изменения интенсивности максимума 1ПСП 288 нм происходят при 18-20°C у ОТП и не наблюдаются для тромбоцитов после агрегации.

Интенсивности максимумов 1ПСП 284 нм, 288 нм, по-видимому, меняются синхронно, но противоположно друг другу.

При нагревании ОТП отмечено уменьшение интенсивности пика 1ПСП 284 нм при температурах 14-16°C, а при 18-20°C - увеличение интенсивности максимума 288 нм (Рис. 2, 3).

В работе [7] показано, что преобладание актина в значительной степени определяет форму спектра суммарного свечения тромбоцитов в коротковолновой области. Из результатов этой работы следует также, что при комнатной температуре полимеризация тромбоцитарного актина, при добавлении к суспензии тромбоцитов CaCl_2 в концентрации 10^{-4}M , сопровождается увеличением интенсивности максимума 1ПСП 288 нм и исчезновением из 1ПСП максимума 284 нм. Из этого, по-видимому, следует, что максимумы 1ПСП суспензии нативных тромбоцитов 284 нм и 288 нм отра-

жают состояние актина микрофиламентов цитоскелета тромбоцитов в мономерной и полимерной форме соответственно.

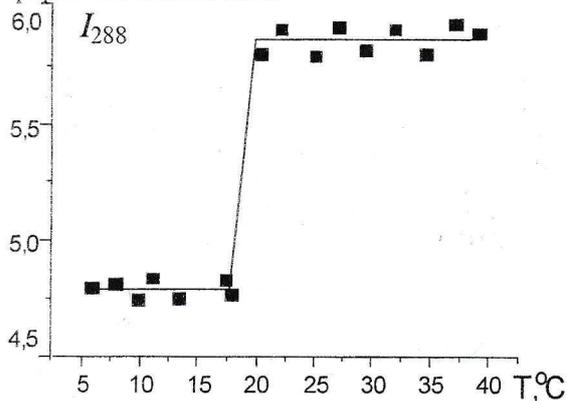


Рис. 3. Зависимость интенсивности максимума 1ПСП 288 нм ОТП от температуры.

Рис. 4. Зависимость интенсивности пика 1ПСП 298 нм ОТП от температуры.

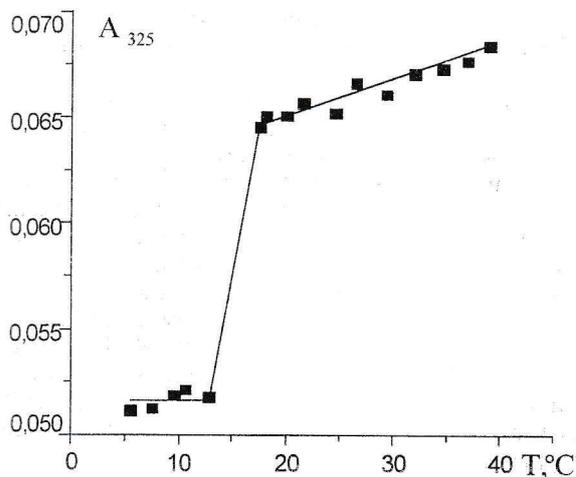
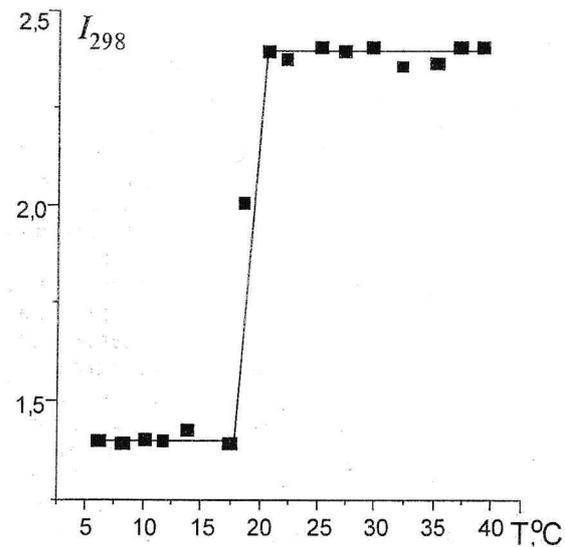


Рис. 5. Зависимость светорассеяния ОТП от температуры.

Поэтому можно предположить, что регистрируемые нами уменьшение интенсивности пика 1ПСП 284 нм при температурах 14-16°C и увеличение интенсивности максимума 288 нм при 18-22°C свидетельствуют о полимеризации актина тромбоцитов в этой области температур. Этот процесс, вероятно, сопровождается наблюдаемое изменение формы клеток при 14-18°C, которое осуществляется благодаря изменению структурного состояния белков и, в частности, актина микрофиламентов примембранного цитоскелета [6].

Так как в БТП и суспензии тромбоцитов после агрегации не наблюдается значительных изменений интенсивности максимумов 1ПСП 284 нм и 288 нм во всем диапазоне температур, можно предположить, что у тромбоцитов после агрегации не происходит дополнительной полимеризации актина при 18-20°C. Вероятно, это

является следствием того, что активация и агрегация клеток сопровождаются реорганизацией всего цитоскелета, полимеризацией актина, при этом депо G-актина полностью истощается [8].

Изменения интенсивности максимума 1ПСП 288 нм происходят около 30°C в БТП.

В 1ПСП ОТП при 18°C наблюдаются изменения интенсивности пика 298 нм, отражающего состояние внутренних гидрофобных (или трансмембранных) участков молекул белков, содержащих остатки триптофана [10].

Температура изменений интенсивности пика 298 нм совпадает с областью температур в которой происходит фазовый переход липидов мембран [11]. После агрегации изменение интенсивности пика 298 нм происходит при 30°C, при этих же температурах отмечено изменение интенсивности пика 270 нм, который определяется поглощением АДФ, и, вероятно, отражает состояние рецепторов АДФ на мембране тромбоцита с которым связан агонист. Вероятно поэтому, изменения интенсивности пика 1ПСП ОТП 298 нм при 18°C отражают изменения состояния тромбоцитарного рецептора АДФ.

Совпадение участков температур, в которых происходит изменение мутности ОТП и интенсивности пика 1ПСП 298 нм, подтверждает предположение о том, что существует связь между мембранными рецепторами АДФ и фибриногена и белками примембранного цитоскелета, а изменения структуры рецепторов и цитоскелета взаимосвязаны.

Изменение интенсивности пика 1ПСП ОТП 280 нм при температурах 30-32°C (Рис.1) говорит, вероятно, об изменении структуры гидрофильных экстрацеллюлярных участков белков, содержащих остатки тирозина [10]. Из литературы известно, что цитоплазматические участки тромбоцитарного рецептора фибриногена комплекса гликопротеинов Pb-IIIa содержат остатки тирозина [12]. Однако рецепторы АДФ также представлены гликопротеинами, в состав которых весьма вероятно входит тирозин [13]. Показано, что изменение скорости АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов происходит при температурах 30-34°C [4]. Совпадение температурных областей, в которых происходят изменения скорости агрегации тромбоцитов и интенсивности пика 1ПСП ОТП 280 нм, вероятно, свидетельствуют о существовании некой взаимосвязи между ними. По-видимому, так как скорость агрегации определяется функциональным состоянием рецепторов, можно предположить, что изме-

нения интенсивности пика 280 нм при 30-32°C свидетельствуют о структурных изменениях тромбоцитарных рецепторов фибриногена и АДФ. Структурные изменения рецепторов при 30-32°C могут лежать в основе уменьшения скорости агрегации тромбоцитов (активации клеток), наблюдаемого при температурах выше 32-34°C [4].

Процессу АДФ-индуцированной агрегации предшествует стадия изменения формы клетки от диска к сфере с дальнейшим образованием псевдоподий. В таких преобразованных формах тромбоциты вступают во взаимодействие друг с другом и образуют агрегаты. Известно, что при изменении формы клетки происходит распад микротрубочек (деполимеризация тубулина), изменяется распределение микрофиламентов и микротрубочек, которое сопровождается быстрой полимеризацией актина [6]. По этой причине, вероятно, отсутствуют особенности в температурной зависимости светорассеяния проагрегировавших тромбоцитов при температурах 10-20°C. Характерно, что при этом не отмечено изменений полос 284, 288 нм.

Наблюдаемое увеличение светорассеяния при температуре 28-30°C суспензии тромбоцитов после агрегации, вероятно связано с изменением формы клеток. Этот процесс, по-видимому, имеет место при дезагрегации и сопровождается дальнейшей рефрактерностью тромбоцитов к действию индукторов [8]. Рефрактерные тромбоциты отличаются от интактных измененным структурным состоянием плазматической мембраны и деструктивными изменениями в системе микротрубочек. В тромбоцитах исчезают псевдоподии, но сохраняется организованный цитоскелет и остается нарушенной система микротрубочек. Авторы [8] предполагают, что рефрактерное состояние тромбоцитов может быть обусловлено тем, что при действии индуктора и активации клеток происходит взаимодействие цитоскелетных структур с гликопротеинами, являющимися рецепторами для АДФ. Исходя из этого можно предположить, что наблюдаемое в работе при 28-30°C увеличение мутности суспензии тромбоцитов после агрегации, по-видимому, обусловлено разрушением связей между рецепторами АДФ плазматической мембраны тромбоцита и микрофиламентами примембранного пояса цитоскелета.

Основываясь на полученных нами результатах можно предположить следующую гипотетическую схему изменения структурно-функционального состояния тромбоцитов в зависимости от температуры. Нагревание от 6°C приводит к изменению формы интактных тромбоцитов при 14-18°C. Этот процесс сопровождается изменениями структуры актина примембранного цитоскелета: при температурах 14-16°C наблюдается уменьшение количества G-актина в тромбоцитах (уменьшение интенсивности пика ПСП 284 нм) и увеличение содержания F-формы актина (что выражается в увеличении интенсивности максимума ПСП 288 нм). В этой же области температур отмечено изменение интенсивности максимума 298 нм, отражающего, по-видимому, состояние прежде всего тромбоцитарного рецептора АДФ. Вероятно эти изменения взаимосвязаны, так как возможность цитоскелета тромбоцитов влиять на состояние рецепторов АДФ была показана в работе [8]. Нельзя исключить и возможность участия рецептора фибриногена в этом процессе. Определенное влияние на изменение структуры рецепторов может оказывать и фазовый переход липидов мембран при 20°C. Возможно, отмеченные структурные изменения рецепторов при 18-20°C определяют изменение зависимости степени агрегации тромбоцитов от температуры при 20°C.

При дальнейшем увеличении температуры изменения структурно-функциональных свойств тромбоцитов, отражающиеся в наблюдаемых ранее изменениях температурной зависимости скорости агрегации от температуры при 30-34°C, также коррелируют с изменением структурных характеристик тромбоцитарных рецепторов.

В суспензии тромбоцитов после агрегации изменения структуры тромбоцитарных рецепторов наблюдаются при 30°C.

ВЫВОДЫ

Изменения морфо-функциональных характеристик тромбоцитов в зависимости от температуры связаны, по-видимому, при температурах ниже 20°C, с изменением структуры примембранного цитоскелета и изменением состояния мембранных рецепторов для индукторов и кофакторов агрегации; а в области температур около 30°C - с изменениями структуры рецепторов плазматической мембраны тромбоцитов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Welch M., Champion A.B. // *Transfusion*. 1985. V.25. P.283-285.
2. Компаниец А.М. Функциональная полноценность тромбоцитов, сохраняемых при различных температурных режимах. Автореф. дис... канд. мед. наук. М. 1980. 22 с.
3. Valeri C.R. // *Transfusion*. 1976. V.16. P. 20-23.
4. Берест В.П., Гаташ С.В. // *Фізіологічний журнал*. 1998. Т.44, № 5-6. С.89-94.
5. Trenchard P.M. // *Journal of Medical Engineering and Technology*. 1988. Vol. 12, № 2. P. 47-53.
6. Ермолаева Т.А. // *Гематология и трансфузиология*. 1989. Т.34, № 2. С. 43-49.
7. Самаль А.Б., Черенкевич С.Н., Хмара Н.Ф. // *Биофизика*. 1983. Т. 28, вып. 2. С. 298-301.
8. Самаль А.Б., Черенкевич С.Н., Хмара Н.Ф. Агрегация тромбоцитов: Методы изучения и механизмы. Минск. Университетское, 1990. 104 с.
9. Липина О.В., Морозова Т.Ф. // *Биофизика*. 1991. Т. 36, вып. 3. С. 509-510.
10. Демченко А.П. Ультрафиолетовая спектрофотометрия и структура белков. Киев. Наук. думка, 1981. 208 с.
11. Ивков В.Г., Берестовский Г.Н. Динамическая структура липидного бислоя. М. Наука, 1981. 296 с.
12. Calvete J.J. In: *Cell Adhesion Molecules*. New York. Plenum Press, 1993. P.63-91.
13. Pawłowska Z., Cierniewski C., Krzesłowska J., Koziolkiewicz W. // *Postępy Biochemii*. 1988. T.34, Zes.3. P.183-207.