

ВЛИЯНИЕ МИКРОЧАСТИЦ ВАТЕРИТА, СУЛЬФАТИРОВАННЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ И МУЦИНА НА АГРЕГАЦИЮ ТРОМБОЦИТОВ

Григорьева Д.В.

*кандидат биологических наук, доцент, доцент кафедры биофизики
Белорусского государственного университета, г. Минск, Беларусь
dargr@tut.by;*

Михальчик Е.В.

*доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела биофизики
ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. ЛОПУХИНА ФМБА России, г. Москва, Россия
lemik2007@yandex.ru;*

Балабушевич Н.Г.

*доктор химических наук, старший научный сотрудник химического
факультета Московского государственного университета
им. М.В. Ломоносова, г. Москва, Россия
nbalab2008@gmail.com;*

Панасенко О.М.

*доктор биологических наук, профессор, член-корр. РАН, заведующий отделом
биофизики ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. ЛОПУХИНА ФМБА России, г. Москва,
Россия
o-panas@mail.ru;*

Соколов А.В.

*доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией
биохимической генетики отдела молекулярной генетики ФГБНУ «Институт
экспериментальной медицины», г. Санкт-Петербург, Россия
biochemsokolov@gmail.com;*

Горудко И.В.

*кандидат биологических наук, доцент, доцент кафедры биофизики
Белорусского государственного университета, г. Минск, Беларусь
irinagorudko@gmail.com*

Аннотация. *Исследовано влияние сульфатированных полисахаридов, муцина и ватерита на агрегационную активность тромбоцитов. Установлено, что фукоидан, гепарин и декстран сульфат (при внесении в обогащенную тромбоцитами плазму) и муцин (при добавлении к изолированным тромбоцитам) индуцировали агрегацию клеток. Пектин дозо-зависимым образом ингибировал АДФ- и тромбин-индуцированную агрегацию, муцин подавлял агрегацию тромбоцитов при действии АДФ, а декстран сульфат и хондроитин сульфат – при действии тромбина. Ватерит в концентрации 500-*

1000 мкг/мл ингибировал агрегацию тромбоцитов при действии АДФ и тромбина.

Ключевые слова: тромбоциты; агрегация; микрочастицы ватерита; сульфатированные полисахариды; муцин

EFFECT OF VATERITE MICROPARTICLES, SULFATED POLYSACCHARIDES AND MUCIN ON PLATELET AGGREGATION

Grigorieva D.V.

*PhD in Biology, Associate Professor, Associate Professor of the Department of Biophysics, Belarusian State University, Minsk, Belarus
dargr@tut.by;*

Mikhalchik E.V

*Doctor of Biology, Leading Researcher of the Department of Biophysics, Lopukhin FRCC PCM, Moscow, Russia
lemik2007@yandex.ru;*

Balabushevich N.G.

*Doctor of Chemistry, Senior Researcher of Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia
nbalab2008@gmail.com;*

Panasenko O.M.

*Doctor of Biology, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Head of Department of Biophysics, Lopukhin FRCC PCM, Moscow, Russia
o-panas@mail.ru;*

Sokolov A.V.

*Doctor of Biology, Professor, Head of the Laboratory of Biochemical Genetics, Department of Molecular Genetics, FSBSI «Institute of Experimental Medicine», Saint Petersburg, Russia
biochemsokolov@gmail.com;*

Gorudko I.V.

*PhD in Biology, Associate Professor, Associate Professor of the Department of Biophysics, Belarusian State University, Minsk, Belarus
irinagorudko@gmail.com*

Annotation. *The effects of sulfated polysaccharides, mucin and vaterite on platelets aggregation activity were studied. It has been established that fucoidan, heparin and dextran sulfate (when added to platelet-rich plasma) and mucin (when added to isolated platelets) induced cell aggregation. Pectin inhibited ADP- and*

thrombin-induced aggregation in a dose-dependent manner, mucin suppressed platelet aggregation under the action of ADP, dextran sulfate and chondroitin sulfate – under the action of thrombin. Vaterite at a concentration of 500-1000 µg/ml inhibited platelet aggregation under the action of ADP and thrombin.

Keywords: *platelets; aggregation; vaterite microparticles; sulfated polysaccharides; mucin*

Разработка новых технологий получения биомедицинских препаратов является актуальной задачей, связанной, в первую очередь, с поиском новых форм доставки лекарственных соединений, позволяющих увеличить их биодоступность и обеспечить целевую направленность. Среди перспективных средств мукозальной доставки можно выделить карбонат кальция в виде микрочастиц ватерита, обладающих идеальными механическими, физическими и химическими свойствами для включения лекарственных препаратов, однако, в то же время, не лишенных недостатков, к которым можно отнести низкую стабильность, небольшое включение и быстрое высвобождение положительно заряженных молекул, а также перекристаллизацию в более динамически устойчивые формы карбоната кальция [1]. Вышеупомянутые недостатки могут быть устранены дополнительным введением в структуру микрочастиц ватерита природных биополимеров, например, полисахаридов, что приведет к возрастанию площади поверхности, пористости и увеличению включения и удерживания катионных молекул, например, секреторных белков нейтрофилов, проявляющих противомикробные и иммунорегуляторные свойства.

При использовании функционализированных полисахаридами микрочастиц ватерита необходимо учитывать их влияние на клетки, участвующие в регуляции иммунных и воспалительных реакций. Не смотря на то, что тромбоциты являются клетками, обеспечивающими, в первую очередь, поддержание гемостаза, они также способны участвовать в иммунных реакциях [2].

В связи с вышесказанным целью данной работы явилось изучение влияния микрочастиц ватерита, муцина и свободных полисахаридов (пектин, фукоидан, гепарин, декстран сульфат, хондроитин сульфат) на основную—функцию тромбоцитов – агрегацию.

Микрочастицы ватерита получали путем смешивания 0,05 М трис-буфера (рН 7,0) и раствора 1 М CaCl₂ как это было описано ранее [3]. В работе использовали фукоидан из *Fucus vesiculosus*, пектин из яблок, хондроитин сульфат А из бычьей трахеи и муцин (тип III) из желудка свиньи фирмы «Sigma-Aldrich»; декстран сульфат фирмы «Fluka» и гепарин фирмы «Spofa». Агрегацию тромбоцитов в обогащенной тромбоцитами плазме (ОТП) при действии АДФ и

агрегацию изолированных тромбоцитов при действии тромбина оценивали турбодиметрическим методом по изменению величины светопропускания суспензии с применением анализатора агрегации AP2110 («СОЛАР», Минск, Беларусь) как это было описано ранее [4].

Установлено, что такие полисахариды как фукоидан, гепарин и декстран сульфат индуцировали агрегацию тромбоцитов в ОТП; пектин, муцин, хондроитин сульфат и микрочастицы ватерита не обладали такой способностью. Наиболее сильным активатором агрегации тромбоцитов в плазме оказался фукоидан (рис. 1 а), при внесении которого в диапазоне концентраций 100-1000 мкг/мл величина светопропускания клеточной суспензии составляла 75 ± 20 %. Гепарин обладал меньшей агрегационной активностью в отношении тромбоцитов (величина светопропускания 40 ± 15 %). Добавление в ОТП декстран сульфата (1000 мкг/мл) приводило к увеличению степени агрегации до 17 ± 4 %. При изучении влияния муцина, пектина, хондроитин сульфата и микрочастиц ватерита на АДФ-индуцированную агрегацию было выявлено, что пектин (рис. 1 б) и муцин концентрационно-зависимым образом ингибировали АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов. На рис.1 в приведена зависимость степени АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов от концентрации тестируемых соединений. Видно, что максимальный эффект регистрировался при внесении препаратов в концентрации 1000 мкг/мл: подавление агрегации на 49 ± 22 % при использовании пектина и на 35 ± 16 % при использовании муцина. Хондроитин сульфат и микрочастицы ватерита в диапазоне концентраций 100-500 мкг/мл не влияли, а в концентрации 1000 мкг/мл снижали ~ на 20 % в случае хондроитин сульфата и ~ на 45 % в случае микрочастиц ватерита АДФ-индуцированную агрегацию клеток.

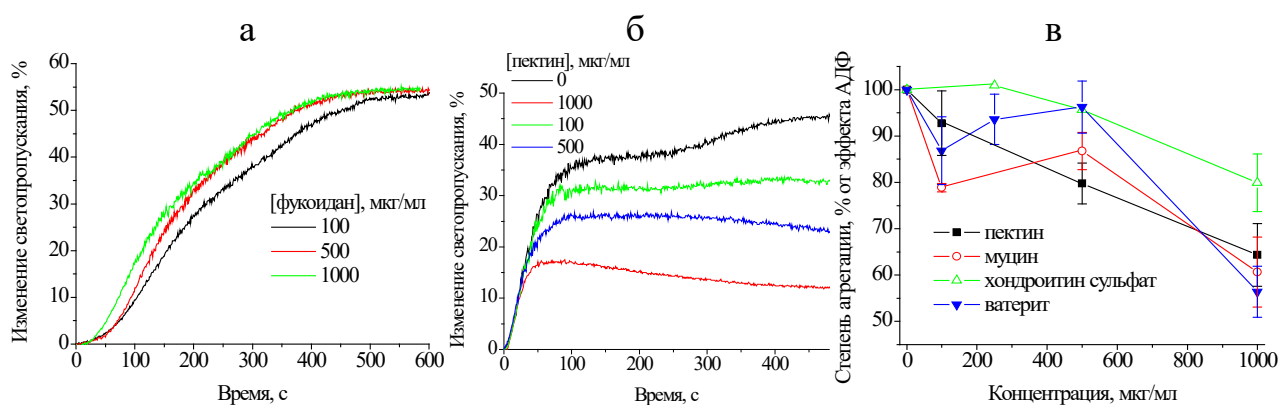


Рисунок 1 – Влияние фукоидана, пектина, муцина, хондроитин сульфата и микрочастиц ватерита на агрегацию тромбоцитов в ОТП: а и б – типичные кинетические кривые агрегации тромбоцитов в ОТП, инициируемой внесением фукоидана в различных концентрациях (а) и АДФ (2,5 мкМ) в присутствии различных концентраций пектина (б); в – зависимость степени АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов от концентрации тестируемых соединений

Показано, что добавление к изолированным тромбоцитам муцина (рис. 2 а), фукоидана (рис. 2 б) и гепарина приводило к их агрегации; хондроитин сульфат, декстран сульфат, пектин и микрочастицы ватерита не вызывали такого эффекта. Установлено, что наиболее сильными индукторами агрегации являлись муцин и фукоидан. Гепарин и муцин (рис. 2 а) вызывали концентрационно-зависимое усиление агрегации тромбоцитов, для фукоидана наблюдалась противоположная зависимость: с увеличением концентрации его способность инициировать агрегацию тромбоцитов снижалась (рис. 2 б). При изучении тромбин-индуцированной агрегации тромбоцитов было выявлено концентрационно-зависимое ингибирующее действие хондроитин сульфата (рис. 2 в), декстран сульфата, пектина и микрочастиц ватерита. Практически 100 %-ое подавление тромбин-индуцированной агрегации клеток регистрировалось при использовании хондроитин сульфата и пектина в концентрации 500 мкг/мл, а декстран сульфата – 250 мкг/мл. В присутствии микрочастиц ватерита в концентрации 500-1000 мкг/мл было выявлено 50 %-ое ингибирование тромбин-индуцированной агрегации тромбоцитов.

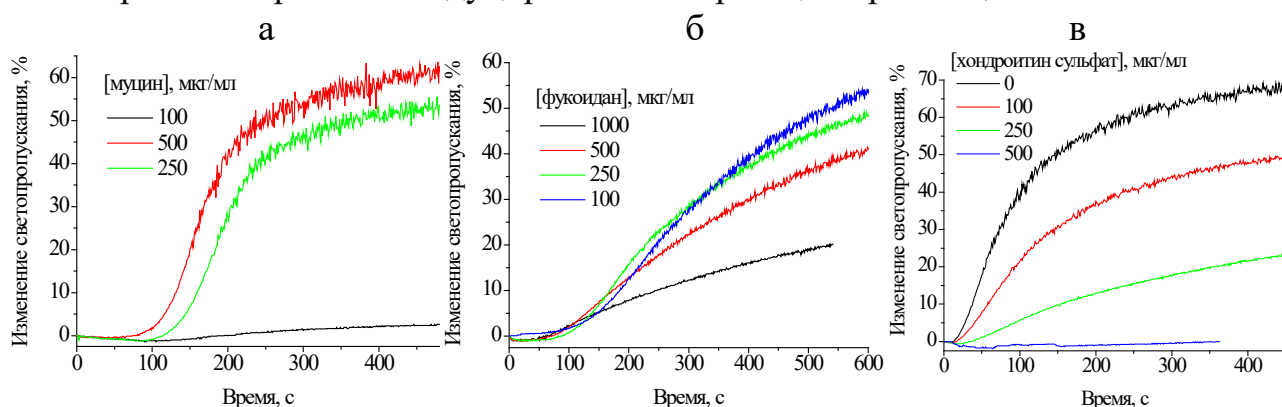


Рисунок 2 – Влияние тестируемых соединений на агрегацию изолированных тромбоцитов: а и б – типичные кинетические кривые агрегации изолированных тромбоцитов, инициируемой внесением муцина (а) и фукоидана (б) в различных концентрациях, а также тромбина (0,25 мкг/мл) в присутствии различных концентраций хондроитин сульфата (в)

Таким образом, можно заключить, что при разработке средств доставки целевых препаратов на основе микрочастиц ватерита, сульфатированных полисахаридов и муцина необходимо учитывать их способность модулировать агрегационную активность тромбоцитов, что может быть полезным при разработке бифункциональных препаратов, дополнительным механизмом действия которых является коррекция функциональных свойств тромбоцитов.

Работа выполнена при финансовой поддержке совместного гранта БРФФИ (Б23РНФ-093) и РНФ (23-45-10026).

Список литературы

1. Trushina, D. B. CaCO₃ vaterite microparticles for biomedical and personal care applications / D. B. Trushina, T. V. Bukreeva, M. V. Kovalchuk, M. N. Antipina // Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl. – 2014. – Vol. 45. – P. 644–658.
2. Kaiser, R. Neutrophil-platelet interactions as novel treatment targets in cardiovascular disease / R. Kaiser, R. Escaig, J. Erber, L. Nicolai // Front. Cardiovasc. Med. – 2022. – Vol. 8. – P. 824112.
3. Balabushevich, N. G. Hybrid mucin-vaterite microspheres for delivery of proteolytic enzyme chymotrypsin / N. G. Balabushevich, E. A. Kovalenko, L. Y. Filatova, E. A. Kirzhanova, E. V. Mikhalchik, D. Volodkin, A. S. Vikulina // Macromol. Biosci. – 2022. – Vol. 22(7). – P. e2200005.
4. Gorudko, I. V. Structure-biological activity relationships of myeloperoxidase to effect on platelet activation / I. V. Gorudko, D. V. Grigorieva, E. V. Shamova, N. P. Gorbunov, A. U. Kokhan, V. A. Kostevich, V. B. Vasilyev, O. M. Panasenko, N. V. Khinevich, H. V. Bandarenka, A. A. Burko, A. V. Sokolov // Arch. Biochem. Biophys. – 2022. – Vol. 728. – P. 109353.