

Роль активации тромбоцитов в генерации тромбина в богатой тромбоцитами плазме.

Научный руководитель – Баландина Анна Николаевна

Петрунина Наталия Андреевна

Выпускник (бакалавр)

Московский физико-технический институт, Москва, Россия

E-mail: nap@purplefront.ru

Система свёртывания крови представляет собой ферментативный каскад реакций, последней стадией которого является превращение фибриногена в фибрин, формирующего структуру сгустка. Эта реакция протекает под действием фермента тромбина, регулирующего и другие реакции каскада системы свёртывания с помощью обратных связей. Также тромбин является одним из основных активаторов тромбоцитов. В организме активированные тромбоциты - основной источник фосфолипидной поверхности, необходимой для образования комплексов белков свертывания крови [1]. Ранее мы показали, что вклад тромбоцитов в генерацию тромбина оказывается неэквивалентен вкладу при добавлении искусственных фосфолипидных микровезикул (ФМ), поэтому в настоящей работе нашей целью было определить роль активации тромбоцитов при генерации тромбина (ГТ) в богатой тромбоцитами плазме.

Исследование ГТ с разной концентрацией тромбоцитов и ФМ (80% фосфатидилхолин + 20% фосфатидилсерин) проводили на анализаторе Тромбодинамика-4D по флуоресценции продукта реакции тромбина с флуорогенным субстратом [2]. Для исследования из крови здоровых добровольцев готовили богатую тромбоцитами или свободную от тромбоцитов плазму, осаждая эритроциты и лейкоциты центрифугированием. Свёртывание активировали добавлением тканевого фактора (5 пМ).

В плазме без тромбоцитов с добавлением ФМ (4 мкМ) наблюдался один пик тромбина (время достижения 8 ± 2 мин, амплитуда 25 ± 9 нМ), при снижении концентрации ФМ амплитуда этого пика снижалась, а время достижения практически не менялось. В плазме с тромбоцитами наблюдалось два пика тромбина. Амплитуда пиков увеличивалась при увеличении концентрации тромбоцитов, положение первого пика при этом не изменялось, а время достижения второго пика укорачивалось. При концентрации тромбоцитов в плазме 200 тыс/мкл пики сливались в один, максимум которого достигался через 10 ± 3 мин от начала активации и имел амплитуду 124 ± 30 нМ.

Добавление в богатую тромбоцитами плазму ингибитора активации тромбоцитов простагландина E1 (100 мкМ) приводило к исчезновению второго пика тромбина и уменьшению площади под экспериментальной кривой ГТ в 1,5-2,5 раза. Для предварительной активации тромбоцитов использовали пептиды TRAP-1 (200 мкМ) и TRAP-4 (550 мкМ), которые активируют тромбоцит через рецепторы к тромбину. В их присутствии второй пик тромбина не наблюдался, но амплитуда первого пика увеличивалась в 2 раза, так что площадь под кривыми в присутствии и отсутствии активаторов тромбоцитов одинакова. Т.е. то же самое количество тромбина в присутствии активаторов тромбоцитов нарабатывалось быстрее.

Полученные результаты показывают, что ГТ в присутствии тромбоцитов происходит в две стадии и появление второго пика тромбина связано именно с переходом тромбоцитов в активированную форму в процессе свёртывания.

Источники и литература

- 1) Пантелеев М.А. и др. Практическая коагулология. М., 2011. С. 192
- 2) A.D. Kuprash, et al, "Sensitivity and Robustness of Spatially Dependent Thrombin Generation and Fibrin Clot Propagation" // Biophys J., 2018, 115(12), 2461