

Залежність агрегації тромбоцитів від температури

Методом светорассеяния изучены особенности влияния температуры (4-44 °C на агрегацию тромбоцитов, индуцированную различными индукторами. Установлено, что зависимость степени и скорости агрегации тромбоцитов от температуры имеет вид кривой с максимумом. Максимум скорости агрегации для каждого индуктора наступает при более высокой температуре, чем максимум степени агрегации. Форма кривой зависимости параметров агрегации от температуры и положения максимумов специфичны по отношению к индуктору агрегации. Активация перекисного окисления липидов в мембранах тромбоцитов приводит к увеличению степени и скорости агрегации, индуцированной АДФ, и смещению положения их максимумов в область более высоких температур, по сравнению с АДФ-индуцированной агрегацией интактных тромбоцитов. Сделано предположение о возможном механизме влияния температуры на агрегацию тромбоцитов.

Вступ

Відомо, що тромбоцити, які зберігалися при 2-6 °C *in vitro*, мають підвищену активність порівняно з активністю свіжовиділених клітин. А для тромбоцитів, які зберігалися при 20-24 °C характерна знижена функціональна активність [3]. Ступінь агрегації тромбоцитів, індукованої АДФ, максимальний при кімнатній температурі. При більш високих температурах виявляється дезагрегація тромбоцитів, а при більш низьких температурах переважає індукована охолодженням зміна форми тромбоцитів [10]. Вплив температури на агрегаційні властивості тромбоцитів деякою мірою визначається в'язкістю мембран тромбоцитів, що модифікується зміною температури [8]. Характеристики флуоресценції зондів, які відображають стан ліпідного бішару мембрани тромбоцитів, змінюються в інтервалах температур 17-21 °C, у яких тромбоцити проявляють підвищену агрегаційну здатність під впливом тромбіну [4].

Метою наших досліджень було визначення залежності ступеня й швидкості агрегації тромбоцитів, індукованої різними агоністами, від температури.

Методика

Дослідження проведені на зразках крові 30 здорових донорів обох статей. Збагачена тромбоцитами плазма (ЗТП) виділялася з крові, стабілізованої глюціциром 4:1, за допомогою центрифугування протягом

10 хв при 167g, а безтромбоцитарна плазма - центрифугуванням ЗТП впродовж 15 хв при 1500g.

Агрегацію тромбоцитів викликали додаванням до 0,9 мл ЗТП 0,1 мл розчину індуктора. Використовували такі індуктори: АДФ (аденозин-5'-дифосфорна кислота динатрієва сіль) у концентраціях $2 \cdot 10^{-5}$ - $2 \cdot 10^{-6}$ моль/л, адреналін ($2 \cdot 10^{-5}$ - $2 \cdot 10^{-6}$ моль/л), ристоміцин (1,2 - 1,5 мг/мл), пероксид водню ($7,1 \cdot 10^{-4}$ моль/л). Агрегацію тромбоцитів досліджували методом світлорозсіювання [1]. Оптичну густину ЗТП перед і після додавання індуктора агрегації вимірювали за допомогою фотоелектроколориметра ФЕК-М (із зеленим світлофільтром), а зміну оптичної густини (ΔD) реєстрували автоматичним потенціометром ЕПП-09М. За кривими зміни оптичної густини визначали ступінь агрегації ($\Delta D_{\max}$), як максимальну величину ΔD , і швидкість агрегації (U) за тангенсом кута нахилу дотичної до кривої на напіввисоті $\Delta D_{\max}/2$. Вимірювання проводили в інтервалі температур 4-44 °C у спеціально розробленій термостабілізованій кюветі. Температуру досліджуваного зразка вимірювали термopарою мідь-константан, з точністю $\pm 0,1$ °C. Для активації неферментативного ПОЛ перед дослідженням агрегації ЗТП інкубували протягом 15 хв із 0,5 ммоль/л аскорбіновою кислотою і 12 мкмоль/л сіллю Мора.

Результати та їх обговорення

Для АДФ- та H_2O_2 -індукованої агрегації тромбоцитів при температурі 20-25 °C і вище після додавання індуктора на кривих агрегації спостерігається незначне збільшення оптичної густини, зумовлене зміною форми тромбоцита [4]. Для обох індукторів час досягнення мінімального світлопропускання зменшується при підвищенні температури. Але при дії АДФ збільшується амплітуда підвищення оптичної густини (рис. 1, а) (у деяких донорів вона має максимум при температурі 37 °C), а при використанні H_2O_2 як індуктора - зменшується (див. рис. 1, з). Відомо, що найбільш ефективно процес зв'язування АДФ з рецепторними ділянками на мембрані тромбоцита відбувається при 37 °C і послаблюється зі зменшенням температури [7]. При температурах 4-11 °C збільшення оптичної густини на початкових стадіях агрегації тромбоцитів, індукованої АДФ та H_2O_2 , не спостерігається (для H_2O_2 спостерігається затримка з відповіддю 1-2 хв). При зменшенні вмісту тромбоцитів у кюветі і постійній температурі, збільшується час досягнення мінімального світлопропускання та зменшується амплітуда підвищення оптичної густини (див. рис. 1, б). При використанні адреналіну як індуктора в усьому діапазоні температур не спостерігається збільшення оптичної густини на початкових стадіях агрегації, яке свідчило б про зміну форми тромбоцитів. У випадку ристоміцинової агрегації на агрегатограмах спостерігається різке підвищення оптичної густини, яке при температурі 2-4 °C сягає половини значення початкової оптичної густини, але не відомо, чи пов'язано це явище зі зміною форми тромбоцитів. Зі збільшенням

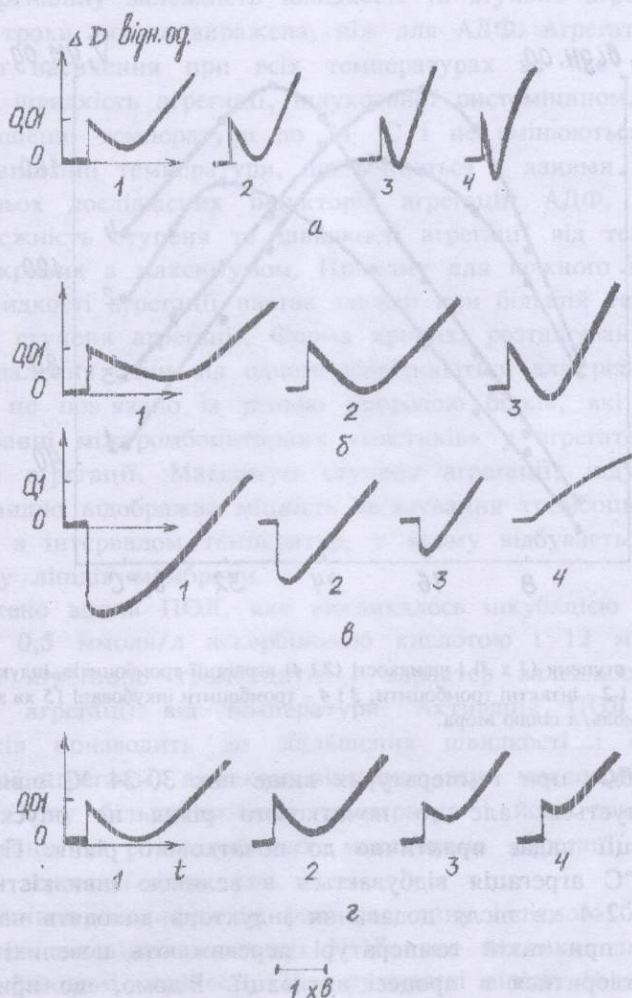


Рис. 1. Вплив температури на агрегацію тромбоцитів (початкові стадії зміни оптичної густини з часом агрегації): а - індуктор АДФ (1 - 20 °С, 2 - 26 °С, 3 - 32 °С, 4 - 38 °С); б - індуктор АДФ: (1 - збагачена тромбоцитами плазма, розведена безтромбоцитарною плазмою у 2 рази, 2 - у 1,5 рази, 3 - нерозведена ЗТП); в - індуктор ристомідин: (1 - 4 °С, 2 - 10 °С, 3 - 16 °С, 4 - 22 °С); г - індуктор Н₂О₂: (1 - 22 °С, 2 - 26 °С, 3 - 30 °С, 4 - 36 °С).

температури величина цього стрибка зменшується і при температурах вище ніж 21-23 °С таких змін не спостерігається (див. рис. 1, в).

Для індукованої агрегації з підвищенням температури збільшується швидкість і ступінь агрегації і при певній температурі ступінь агрегації сягає максимуму і потім зменшується з підвищенням температури, а швидкість агрегації сягає максимального значення при більш високій температурі. Так, для АДФ максимум ступеня агрегації спостерігається при температурі 18-22 °С, швидкості - 30-34 °С (рис. 2).

Зсув максимуму швидкості агрегації в зону високих температур, порівняно з максимумом ступеня агрегації, зберігається при зміні швидкості перемішування суспензії тромбоцитів. Для агрегації,

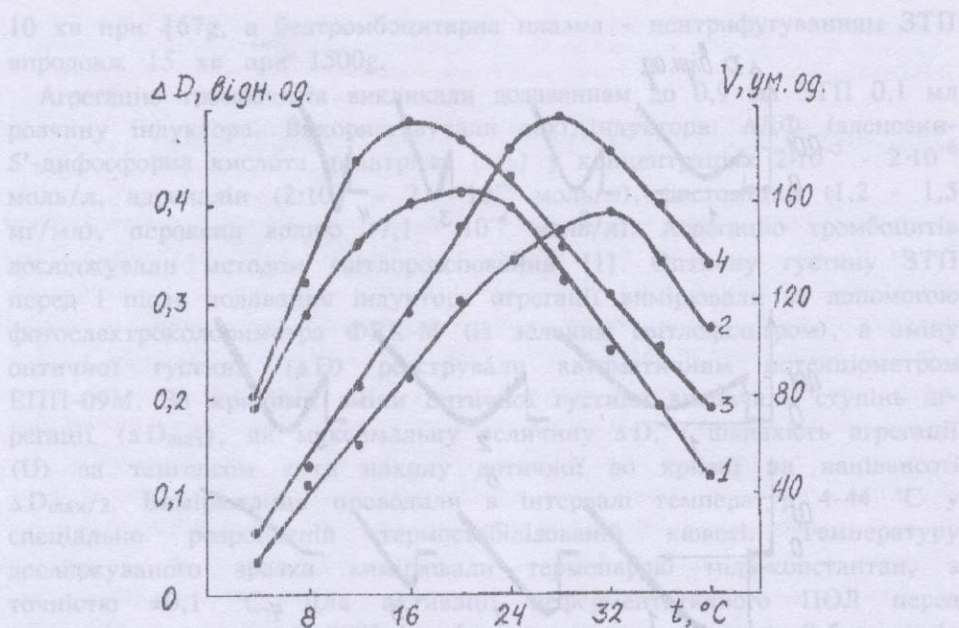


Рис. 2. Залежність ступеня (1 і 3) і швидкості (2 і 4) агрегації тромбоцитів, індукованої АДФ, від температури: 1 і 2 - інтактні тромбоцити, 3 і 4 - тромбоцити інкубовані 15 хв з 0,5 ммоль/л аскорбатом і 12 ммоль/л сіллю Мора.

індукованої АДФ, при температурах вище ніж 30-34 °C швидкість агрегації зменшується, але до початкового рівня не опускається. А ступінь агрегації падає практично до початкового рівня. При температурі 30-40 °C агрегація відбувається з великою швидкістю, агрегатограми через 2-4 хв після додавання індуктора виходять на насичення. Очевидно, при такій температурі переважають невеликі агрегати, які встигли утворитися в процесі активації. Відомо, що при тромбін-індукованій агрегації при високій температурі переважають невеликі за розміром агрегати [4].

Для перекису водню при низьких температурах спостерігається затримка з відповіддю 30-50 с, агрегатограми мають двофазний характер (швидкість другої фази більша). При температурі 20-22 °C, через 3 хв (потім із підвищенням температури цей час зменшується до 45 с) після додавання індуктора крива агрегації виходить на плато. При подальшому підвищенні температури на агрегатограмах спостерігаються невелика дезагрегація і друга хвиля агрегації, що відповідає даним Самаль із співавт. [5].

Максимуми швидкості та ступеня агрегації, індукованої H_2O_2 , зміщені в зону низьких температур, порівняно з АДФ-індукованою агрегацією тромбоцитів того ж донора. Слід також відзначити схожість залежності швидкості та ступеня агрегації тромбоцитів від температури для H_2O_2 і АДФ. Але температурні залежності параметрів, які відображають стадію зміни форми тромбоцитів, мають протилежний характер.

Для адреналіну залежність швидкості та ступеня агрегації від температури трохи менше виражена, ніж для АДФ. Агрегатограми не виходять на насичення при всіх температурах за час спостереження. Ступінь і швидкість агрегації, індукованої ристоміцином, збільшуються при підвищенні температури до 24 °C і не змінюються при подальшому підвищенні температури, що збігається з даними Trenchard [9].

Для трьох досліджених індукторів агрегації: АДФ, адреналіну та H_2O_2 залежність ступеня та швидкості агрегації від температури мають вид кривих з максимумом. Причому для кожного індуктора максимум швидкості агрегації настає завжди при більшій температурі, ніж максимум ступеня агрегації. Форма кривих, розташування максимумів та їх віддалення один від одного відрізняються для різних індукторів. Можливо це пов'язано із різною природою білків, які беруть участь у формуванні міжтромбоцитарних «мостиків» у агрегатах, для різних індукторів агрегації. Максимум ступеня агрегації, індукованої АДФ, який очевидно відображає міцність зв'язування тромбоцитів у агрегаті, збігається з інтервалом температур, у якому відбувається зміна фазового стану ліпідів мембрани.

Досліджено вплив ПОЛ, яке викликалось інкубацією ЗТП протягом 15 хв із 0,5 ммоль/л аскорбіновою кислотою і 12 мкмоль/л сіллю Мора, на агрегацію тромбоцитів і характер залежності ступеня та швидкості агрегації від температури. Активація ПОЛ у мембранах тромбоцитів призводить до збільшення швидкості і ступеня АДФ-індукованої агрегації, а також викликає зсув максимуму ступеня агрегації в зону більш низьких температур і його розширення. Аналогічні зміни в розташуваннях максимумів агрегації виявлені для швидкості агрегації (див. рис. 2).

Таким чином, модифікація фазового стану ліпідного бішару мембран тромбоцитів внаслідок активації ПОЛ, яке викликає зменшення температури фазового переходу [2] і рухомості ліпідів [6], призводить до зміни залежності параметрів агрегації від температури, зокрема зменшується температура, при якій спостерігаються максимум швидкості та ступеня агрегації, індукованої АДФ. Отже, зміна фазового і структурного стану ліпідів мембран тромбоцитів, від яких залежить стан мембранних рецепторів і білок-ліпідні взаємодії в мембрані, зумовлює характер проходження процесу агрегації і залежність його параметрів від температури.

Виходячи з отриманих нами результатів, можна припустити, що очевидно існують два конкуруючі механізми, які зумовлюють такий характер температурної залежності параметрів агрегації від температури. Збільшення швидкості та ступеня агрегації тромбоцитів при підвищенні температури (від 4 °C до кімнатної), очевидно, визначається зменшенням мікрів'язкості ліпідного бішару та збільшенням рухомості тромбоцитарних рецепторів, а зменшення параметрів агрегації при температурі, вищій за кімнатну - фазовими переходами ліпідів мембран.

DEPENDENCE OF PLATELET AGGREGATION UPON TEMPERATURE

The effect of temperature (range of 4-44 °C) upon induced aggregation of platelets from normal subjects was studied. It was shown that temperature dependences of aggregation degree and rate have maxima. A relationship between aggregation agonist kind and some features of the temperature dependence curve of the aggregation parameters is established. It was shown that the limitation of platelet membrane lipids mobility by means of lipids peroxidation leads to the shift of maxima of the temperature dependence curve of platelet aggregation degree and rate. It was concluded that character of aggregation temperature dependence was governed by phase transition in platelet membrane lipids at room temperature.

State University,

Ministry of Education of Ukraine, Kharkiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Балуда В.П., Баркаган З.С., Гольдберг Е.А. Лабораторные методы исследования системы гемостаза. - Томск: Б.и., 1980. - 313 с.
2. Деев А.И., Осис Ю.Г., Формазюк Е.В., Владимиров Ю.А., Ланкин В.З. Увеличение содержания воды в липидной фазе липопротеидов при перекисном окислении // Биофизика. - 1983. - 28, вып. 4. - С. 629-631.
3. Компаниец А.М. Функциональная полноценность тромбоцитов сохраняемых при разных температурных режимах: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. - М., 1980. - 19 с.
4. Самаль А.Б., Черенкевич С.Н., Хмара Н.Ф. Агрегация тромбоцитов: Методы изучения и механизмы. - Минск: Университетское, 1990. - 104 с.
5. Самаль А.Б., Черенкевич С.Н., Хмара Н.Ф. H₂O₂ - индуцированная агрегация и дезагрегация тромбоцитов // Гематология и трансфузиология. - 1989. - 33, № 11. - С. 34-38.
6. Формазюк В.Е., Осис Ю.Г., Деев В.И. и др. Влияние ПОЛ на структуру сыровороточных липопротеидов // Биохимия. - 1983. - 48, вып. 2. - С. 331-338.
7. Pawlowska Z., Cierniewski C., Krzeslowska J., Koziolekiewicz W. Glikoproteiny blony płytkowej i ich rola w aktywności receptorowej płytek krwi // Postepy Biochemii. - 1988. - 34, zes. 3. - S. 183-207.
8. Shattil S.J., Cooper R.A. Membrane microviscosity and human platelet function // Biochemistry. - 1976. - 15, № 22. - P. 4832-4837.
9. Trenchard P.M. Sub-ambient measurement of platelet function: the requirements for modification of a standard platelet aggregometer // J.Med. Eng. Technol. - 1988. - 12. - P. 47-53.
10. Trenchard P.M., Jeffery D.M. Platelet thermophysiology: a new field of investigation dependent upon an improved sub-ambient platelet aggregometer // Clin. Phys. and Physiol. Meas. - 1989. - 10, № 1. - P. 65-74.

Харків. ун-т
М-ва освіти України

Матеріал надійшов
до редакції 00.00.98