

УДК 612.115:577.23

**ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВ ЭЛЕКТРОН-ТРАНСПОРТНОЙ ЦЕПИ НА ПАРАМЕТРЫ
АДФ-ИНДУЦИРОВАННОЙ АГРЕГАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ**

Д.Э. Подольский, В.Т. Чещевик

Полесский государственный университет, Пинск

Аннотация. Установлено значимое влияние ингибиторов электрон-транспортной цепи митохондрий тромбоцитов на процессы АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов, что говорит о том, что митохондрии имеют ключевое значение в процессах агрегации тромбоцитов, вызванных агонистами.

Ключевые слова: митохондрии, электрон-транспортная цепь, АДФ, тромбоциты.

Введение. Функциональной особенностью тромбоцитов является их способность к быстрой активации и агрегации, что приводит к коагуляции и остановке кровотечений [1].

В основе механизмов активации лежит, в первую очередь, действие на тромбоцитарные рецепторы агонистов, которые запускают процесс активации путём двух сигнальных путей: «снаружи-внутри» (дополнительная активация тромбоцитов, вызванная передачей сигналов внутрь клеток благодаря интегринам $\alpha_{IIb}\beta_3$) и «изнутри-наружу» (внутриклеточные события, ведущие к активации интегрина $\alpha_{IIb}\beta_3$) [2]. Среди таких рецепторов можно выделить рецепторы аденозиндифосфата (АДФ) [3]. После стимуляции соответствующих рецепторов активация тромбоцитов генерирует каскад внутриклеточных процессов: дегрануляцию основных депо кальция (гранулы и плотная трубчатая система тромбоцитов), потоки кальция в митохондрии, генерация активных форм кислорода, что по сути является сигнальными путями апоптоза.

В последнее время большое внимание уделяется роли митохондрий в тромбоцитарной активации, так как именно митохондриальный путь активации тромбоцитов приводит к формированию прокоагулянтной популяции тромбоцитов [4]. Несмотря на то, что тромбоциты содержат довольно мало митохондрий (4-6 на клетку), активность данных органелл в процессе активации значительно возрастает [5]. Изучить активность митохондрий в клетках, в том числе тромбоцитах, можно с помощью ингибиторов электрон-транспортной цепи.

Цель работы – оценить влияние ингибиторов дыхательной цепи митохондрий на параметры АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов.

Материалы и методы исследований. Забор крови проводился у добровольцев мужского пола возрастом от 20 до 28 лет без вредных привычек и приёма лекарств в течение 3 дней до забора крови. Доноры выбирались с отсутствием хронических заболеваний и воспалительных процессов в течении 7 дней до забора крови.

Богатую тромбоцитами плазму получали из цельной крови с использованием 3,2% цитрата в качестве антикоагулянта путём центрифугирования при 300g в течение 15 минут. Из полученного супернатанта тромбоциты осаждали центрифугированием при 800g в течении 15 мин.

Для выполнения агрегометрических исследований осадок тромбоцитов ресуспензировали в модифицированном буфере Тирода с глюкозой (134 mM NaCl, 12 mM NaHCO₃, 2,9 mM KCl, 0,34 mM NaH₂PO₄, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 5 mM глюкозы). Агрегометрию проводили с использованием агрегометра Solar AP 2110 (Беларусь). Активацию вызывали агонистом АДФ в конечной концентрации 10 мкМ. В кювету добавляли 2 мл суспензии тромбоцитов с ингибиторами электрон-транспортной цепи митохондрий и инкубировали в течение 15 минут при температуре 37 °C при перемешивании с постоянной скоростью. Агрегационные кривые прописывали 300 сек. Данные агрегометрии представлены тремя показателями: время достижения плато, уровень плато (процент агрегированных тромбоцитов) и скорость агрегации.

В качестве ингибиторов электрон-транспортной цепи митохондрий использовали: ротенон (2 мкМ, ингибитор I комплекса), малонат (25 мкМ, конкурентный ингибитор II комплекса), феноилтрифлуорацетон (ТТФА, 10 мкМ, неконкурентный ингибитор II комплекса), антимицин А (1 мкг/мл, ингибитор III комплекса), азид натрия (10 мМ, неспецифический ингибитор IV комплекса), олигомицин (1 мкг/мл, ингибитор АТФ-синтазы), карбонилцианид m-хлорофенилгидразон (CCCP, 50 мкМ, протонифер).

Для статистической обработки результатов использовали программное обеспечение GraphPad Prism 7.0.

Результаты исследования и их обсуждение. Установлено, что среди ингибиторов наибольшее влияние на агрегацию оказывает ингибитор АТФ-синтазы олигомицин, значительно снижая (на 90%) скорость агрегации, общий процент агрегированных тромбоцитов и время наступления плато, что говорит о необходимости митохондриальной генерации АТФ в активации тромбоцитов (таблица).

Таблица – Влияние ингибиторов электрон-транспортной цепи на параметры агрегации тромбоцитов

Показатель	Время достижения плато (сек)	Уровень агрегации (%)	Скорость агрегации (сек ⁻¹)
<i>Контроль (ДМСО)</i>	177 ± 16	74 ± 8	37,5 ± 3,2
Ротенон	177 ± 15	88 ± 9	23 ± 2,1
Антимицин А	208 ± 19	60 ± 5	16 ± 2*
<i>Контроль (вода)</i>	70 ± 6,9	95 ± 8,9	285 ± 31
Малонат	70 ± 6,2	80 ± 7,7	288 ± 27,9
Азид натрия	81 ± 8	80 ± 7,5	37 ± 3,5*
<i>Контроль (этанол)</i>	218 ± 22	47 ± 5,2	23 ± 2,2
Феноилтрифлуорацетон	160 ± 15*	30 ± 3,3*	14 ± 1,3*
Олигомицин	129 ± 13*	1,4 ± 0,10*	2 ± 0,11*

Ингибиторы II, III и IV комплексов дыхательной цепи митохондрий также оказывали влияние на процесс агрегации тромбоцитов. В частности, феноилтрифлуорацетат, действует таким же образом, снижая скорость агрегации. Антимицин А и азид натрия приводят только к ингибированию скорости агрегации тромбоцитов, не оказывая при этом влияния на уровень агрегации и время достижения плато.

Результаты исследований говорят о том, что митохондрии играют решающую роль в АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов.

Заключение. Исследованиями установлено, что антимицин А (ингибитор III комплекса), азид натрия (ингибитор IV комплекса) влияют только на скорость агрегации, уменьшая её, а феноилтрифлуорацетон (ингибитор II комплекса) и олигомицин (ингибитор АТФ-синтазы) уменьшают все параметры агрегации, что говорит о решающей роли митохондриального аэробного метаболизма для активации тромбоцитов.

Исследования проведены при финансовой поддержке Министерства образования Республики Беларусь (договор № 65 от 05.05.2021) в рамках ГПНИ «Биотехнологии-2» (Рег. № НИР 20241017).

Список использованных источников

1. Бакунович, А.В. Молекулярные механизмы агрегации тромбоцитов / А.В. Бакунович, К.Я. Буланова, Л.М. Лобанок. – Минск: БГУ, 2017. – С. 42.
2. Ma, Y-Q. Platelet integrin alpha(IIb)beta(3): activation mechanisms / Y-Q Ma, J Qin, E. F. Plow // J Thromb Haemost. – № 5(7), 2007. – pp. 1345-1352.
3. Stegner, D. Platelet receptor signaling in thrombus formation / D. Stegner, B. Nieswandt // Journal of Molecular Medicine. – Vol. 89. – № 2, 2011. – pp. 109-121.
4. Jobe, SM. Critical role for the mitochondrial permeability transition pore and cyclophilin D in platelet activation and thrombosis / S.M. Jobe, K.M. Wilson, L. Leo, A. Raimondi, J.D. Molkentin, S.R. Lentz, Di Paola J. // Blood. – № 111. – pp. 1257-1265.
5. Jiang, J. Peroxidation and externalization of phosphatidylserine associated with release of cytochrome c from mitochondria / J. Jiang [and etc.] // Free Radical Biology and Medicine, 2003. – T. 35. – No. 7. – С. 814-825.