

Регистрация обратимого и необратимого связывания интегринов $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ с фибриногеном при активации тромбоцитов

Научный руководитель – Свешникова Анастасия Никитична

Морозова Дарья Сергеевна

Студент (специалист)

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Факультет фундаментальной медицины, Москва, Россия

E-mail: darsmorozova@gmail.com

Введение

Агрегация тромбоцитов - одна из важнейших частей тромбоцитарного гемостаза, необходимая для остановки кровотечений. В этом процессе участвуют белки клеточной адгезии семейства интегринов, преимущественно $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, а также гликопротеин GPIb [1]. Согласно классическим представлениям, агрегация начинается с активации тромбоцита, которая, в свою очередь, ведет к активации интегринов $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$. В активированном состоянии они способны связывать молекулы фибриногена, в избытке присутствующие в плазме крови. Связывание тромбоцитов через молекулы фибриногена и приводит к агрегации клеток, как обратимой, так и необратимой. Известно, что при физиологическом тромбообразовании реализуются и обратимая, и необратимая агрегация [3]. На данный момент механизмы их запуска не ясны [2].

Цель исследования

Изучить обратимое и необратимое связывание тромбоцитарных интегринов $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ с фибриногеном и внутриклеточные сигнальные пути, ведущие к обратимой и необратимой агрегации соответственно.

Материалы и методы

Кровь была получена у здоровых доноров (в рамках Хельсинкской декларации): цельная кровь - с гепарином или цитратом, отмытые тромбоциты - с 17% АСД (лимонная кислота, цитрат натрия, глюкоза; рН=4.4). Обратимое и необратимое связывание фибриногена с тромбоцитами в реальном времени наблюдалось на инвертированном микроскопе Nikon Eclipse Ti A1 в TIRF-режиме (флуоресцентная микроскопия полного внутреннего отражения). Тромбоциты были окрашены флуоресцентными метками, чувствительными к концентрации ионов кальция в цитозоле (Fura-2, Fluo-3 или Calcium Green-1; 2мкМ); иммобилизовались на покровном стекле с фибриногеном или моноклональным антителом к PССАМ-1; активировались различными физиологическими активаторами (40мкМ АДФ, 100нМ тромбина), также эксперименты проводились в присутствии 100нМ вортманнина (ингибитора фосфоинозитид-3-киназы (PI3K) - ключевого участника одного из внутриклеточных путей активации интегринов).

Результаты

При слабой активации одним агонистом наблюдается незначительное связывание с тромбоцитами фибриногена, который при этом смывается буферным раствором. Это демонстрирует обратимое связывание интегринов. При действии тромбина на TIRF-микроскопии наблюдается необратимое связывание фибриногена с тромбоцитами в виде четко различимых кластеров. Образование кластеров - признак необратимого связывания и, вероятно, необратимой агрегации.

Выводы

Необратимая агрегация тромбоцитов является следствием кластеризации $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ интегринов и наблюдается при сильной активации тромбоцитов.

Источники и литература

- 1) Пантелеев М.А., Свешникова А.Н. Тромбоциты и гемостаз. // Онкогематология. 2014. №2. С. 65 - 73.
- 2) Matthias Canault. Human CalDAG-GEFI gene (RASGRP2) mutation affects platelet function and causes severe bleeding. // The Journal of Experimental Medicine. 2014. №7. С. 1349 - 1362.
- 3) Stalker T.J. Hierarchical organization in the hemostatic response and its relationship to the platelet-signaling network. // Blood. 2013. № 121. С. 1875-1885.