ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОТЕЇНІВ ФІБРИНОЛІТИЧОЇ СИСТЕМИ НА ВМІСТ МІКРОЧАСТИНОК

Налбат А. М.[1,2], Харченко С. М.[1], Яценко Т. А.[1]
[1]Інститут біохімії імені О. В. Палладіна НАН України, Київ, Україна
[2]Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна
alenanalbat@gmail.com

Вступ. Мікрочастки клітин – це позаклітинні везикули, що є фрагментами плазматичної мембрани або походять з внутрішньоклітинних мембран, утворюються практично всіма типами клітин, під дією сигнальних молекул або стресових умов, внаслідок активації і апоптозу. Мікрочастками плазми є мембранні везикули розміром від 50 нм до 1 мкм, що вивільняються в кровотік ендотелійними клітинами, клітинами крові, клітинами кісткового мозку та ін. Вони беруть участь в багатьох біологічних і фізіологічних процесах, включаючи гемостаз, міжклітинний сигналінг, регуляцію запалення, ангіогенезу, загоєння ран. Вважається, що мікрочастки плазми крові більшою мірою тромбоцитарного походження і мають прокоагулянтну функцію, однак процеси зсідання крові та фібринолізу є тісно пов'язаними і до певної міри взаєморегульованими, тому дослідження вмісту компонентів фібринолітичної системи в мікрочастках плазми крові дозволить пролити світло на механізми функціонування мікрочасток та їх регуляторної ролі в перемиканні різних ланок гемостазу.

Мета. Підібрати умови одержання мікрочастинок з плазми крові та охарактеризувати їх. Дослідити вміст компонентів фібринолітичної системи (плазміноген, тканинний активатор плазміногену, урокіназа, PAI-1).

Матеріали і методи. Плазму крові людини одержували зі свіжої крові здорових добровольців, змішаної з 3,8 % цитрату натрію (9:1), шляхом центрифугування при 1 тис g 15 хв при 20 °С. Плазму повторно центрифугували при 2,5 тис g протягом 20 хв при 20 °С для видалення можливих агрегатів. Для ізолювання мікрочастинок використовували гель-фільтрацію на Сефарозі-4В. Розмір мікрочасток визначали лазерно-кореляційною спектрометрією. Концентрацію загального протеїну в розчині визначали спектрофотометрично за довжин хвилі 280 і 320 нм. Для оцінки вмісту окремих протеїнів застосовували Вестерн-блот аналіз.

Результати. Виділення мікрочастинок з плазми крові гель-фільтрацією на Сефарозі-4В дозволяє одержати зразки мікрочастинок з високою концентрацією (загальний вміст білку 2–6,5 мг/мл) і низьким рівнем контамінації плазменними протеїнами (вміст фракції часток 1–15 нм <1 %). Показано, що одержані мікрочастинки містять Р-селектин, що вказує на їх походження з тромбоцитів, ендотеліоцитів та мегакаріоцитів. З застосуванням поліклональних антитіл кроля показано, що мікрочастинки плазми містять плазміноген, його фрагменти та високомолекулярні комплекси плазміноген/плазміну, що відповідають молекулярній масі комплексу плазмін-α2-антиплазмін. Також встановлено наявність активаторів плазміногену та PAI-1.

Висновки. Мікрочастки плазми крові містять компоненти фібринолітичної системи і отже можуть залучатись до процесів, опосередкованих протеїнами фібринолітичної системи, а саме плазміногеном, його активаторами та PAI-1.