

МАТЕРИАЛЫ КОНФЕРЕНЦИИ И ШКОЛЫ

ВЛИЯНИЕ РЕЗВЕРАТРОЛА НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ТРОМБОЦИТОВ

© 2020 г. В. С. Шпакова^{1,*}, Н. Аль Араве², С. П. Гамбарян¹, Н. И. Рукояткина¹

¹ ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский государственный университет, Кафедра цитологии и гистологии, Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: spakovavalentina@gmail.com

DOI: 10.31857/S0044452920072644

Введение. Тромбоциты играют важную роль в процессах гемостаза и выполняют ряд других важных функций в организме. Нарушение функционирования тромбоцитов приводит к развитию ряда заболеваний, среди которых тромбозы, ишемическая болезнь сердца, инсульт и др. При этом применение антитромбоцитарной терапии зачастую приводит к развитию серьезных побочных эффектов, главным из которых являются кровотечения. В последнее время популярным становится изучение веществ природного происхождения, обладающих широким спектром полезных свойств и низкой токсичностью. Резвератрол — это природный полифенол, который содержится в некоторых растениях, таких как черника, ежевика, арахис и т. д. Резвератрол обладает противовоспалительным, антимутагенным, противогрибковым, противовоспалительным и антиоксидантным действиями. Существуют данные об ингибирующем действии резвератрола на активацию тромбоцитов, а также показан защитный эффект резвератрола при ишемической болезни сердца. Однако молекулярные механизмы действия резвератрола на тромбоциты неизвестны.

Цель. Целью нашей работы было исследование влияния резвератрола на функциональную активность тромбоцитов.

Методы. Тромбоциты выделялись из крови здоровых доноров. Для оценки активации интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ на тромбоцитах и измерения жизнеспособности тромбоцитов использовался метод проточной цитометрии (Navios™, Beckman Coulter, США). Активацию интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ измеряли по связыванию с меченым фибриногеном (Alexa-647), жизнеспособность тромбоцитов оценивали по степени флуоресценции Calcein-AM, который приобретает флуоресцентные свойства после расщепления внутриклеточными эстеразами. Для определения степени фосфорилирования белков VASP (Vasodilator stimulated protein) и PKB, а также активации каспазы 3 использовался Western blot анализ. Для проведения Western blot анализа в отмытые тромбоциты добавляли буфер, содержащий додецил сульфат натрия (SDS), затем проводили электрофорез в SDS полиакриламидном геле (PAGE).

Выделенные белки переносились на нитроцеллюлозную мембрану. Неспецифическое связывание блокировали 3% раствором обезжиренного молока в Tris буфере, содержащем 0.1% Tween-20. В течение ночи при 4°C белки инкубировали с первичными антителами. Для регистрации хемилюминесценции к пробам добавляли вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена. Данные выражались как среднее арифметическое $\pm$ ошибка среднего. Различия между группами определяли по t-критерию Стьюдента.

Результаты. Резвератрол начиная с 20 μM дозозависимо ингибировал активацию интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$, вызванную CRP (Collagen-related peptide), который является синтетическим аналогом коллагена и активирует рецепторы GPVI на тромбоцитах. При этом резвератрол блокировал фосфорилирование PKB, который является маркером активации тромбоцитов. Основные ингибирующие процессы в тромбоцитах связаны с активацией аденилат- и гуанилатциклазы, которые запускают синтез циклических нуклеотидов, что в последствии приводит к активации протеинкиназ A (PKA) и G (PKG). PKA и PKG ответственны за ингибирование ключевых сигнальных белков, передающих активирующий сигнал в тромбоцитах. Активность PKA и PKG можно измерить по степени фосфорилирования белка VASP, который является известным субстратом данных киназ. Мы показали, что резвератрол не вызывает фосфорилирование VASP, что свидетельствует о PKA/PKG независимом ингибировании активации тромбоцитов. Поскольку снижение активации тромбоцитов может быть связано с их гибелью, было проверено влияние резвератрола на жизнеспособность тромбоцитов. Согласно полученным данным, резвератрол не вызывает каспазозависимый апоптоз тромбоцитов, а также не изменяет флуоресценцию Calcein-AM в тромбоцитах.

Вывод. Резвератрол вызывает дозозависимое снижение активации тромбоцитов, которое не связано с запуском PKA/PKG ингибиторных систем или с гибелью тромбоцитов

Финансирование работы: РФФИ 19-315-90102.