

© 2024 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Поступила 23.10.2023
Принята к печати 16.01.2024



EDN: JNKTSR

Контактная информация:

Миндукшев Игорь Викторович,
д-р биол. наук, заведующий лабораторией
клеточных механизмов гомеостаза крови
Института эволюционной физиологии
и биохимии им. И.М. Сеченова РАН
Адрес: 194223, Санкт-Петербург,
просп. Тореза, 44
E-mail: iv_mindukshev@mail.ru

DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-1-92-98

Влияние температуры на тромбоцитарный гемостаз, индуцированный различными агонистами

И.А. Добрылко, А.А. Волкова, Б.А. Герда, Д.М. Михайлова, С.П. Гамбарян, И.В. Миндукшев

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

Активация, изменение формы (shape change) и агрегация тромбоцитов являются активными процессами, которые могут существенно зависеть от температуры окружающей среды. Однако в литературе данные о влиянии температуры на состояние тромбоцитов крайне противоречивы. В представленной работе методом лазерной дифракции исследовали влияние температуры на реакцию тромбоцитов человека, активированных различными агонистами: ADP, тромбоксаном (миметик U46619), тромбином (TRAP-6), которые действуют через рецепторы, связанные с G-белками, и коллагеном, активирующим иммуноглобулиновый рецептор GPVI. Для агонистов, которые активируют рецепторы, связанные с G-белками, показано, что увеличение температуры вызывает ускорение начальной реакции активации (shape change) и практически не влияет на чувствительность действия агонистов (EC_{50}). В то же время гипотермия при низких дозах агонистов потенцирует агрегацию тромбоцитов, что существенно отличается от действия коллагена, который при увеличении температуры ускоряет ее на всем исследуемом диапазоне. В представленной работе мы показали, что влияние температуры на процессы активации тромбоцитов зависит как от дозы агонистов, так и от активируемых рецепторов. В исследовании принимали участие здоровые добровольцы после подписания информированного согласия. Забор крови проводили в соответствии с рекомендациями Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН и Хельсинкской декларацией. Исследования с использованием эритроцитов человека одобрены этическим комитетом Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН (протоколы №3-03 от 2 марта 2021 г. и №1-04 от 7 апреля 2022 г.).

Ключевые слова: тромбоцитарный гемостаз, температура, лазерная дифракция, ADP, U46619, тромбин, TRAP-6, коллаген

Добрылко И.А. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2024; 23 (1): 92–8. DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-1-92-98

The influence of temperature on platelet hemostasis induced by various agonists

I.A. Dobrylko, A.A. Volkova, B.A. Gerda, D.M. Mikhailova, S.P. Gambaryan, I.V. Mindukshev

The I.M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg

Platelet activation, shape change and aggregation are active processes that can be significantly dependent on the ambient temperature. However, there are conflicting data in the literature regarding the effect of temperature on platelets. In our work, we used a laser diffraction method to investigate the influence of temperature on the reaction of human platelets activated by various agonists: ADP, U46619 (thromboxane mimetic), and thrombin (TRAP-6), that act through G-protein coupled receptors, and collagen, that activates the immunoglobulin receptor GPVI. For agonists that activate G-protein coupled receptors, we showed that an increase in temperature causes an acceleration of the initial platelet activation (shape change) and has no significant effect on agonist sensitivity (EC_{50}). At the same time, hypothermia at low doses of such agonists potentiates platelet aggregation, which differs significantly from the effect of collagen. With increasing temperature, collagen accelerates platelet aggregation over the entire range of temperatures investigated. In this paper, we showed that the effect of temperature on platelet activation processes depends on both the dose of agonists and the type of activated receptors. In our study, we included healthy volunteers after obtaining a written informed consent. Blood samples were taken in accordance with the guidelines of the I.M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences and the Declaration of Helsinki. Studies with human erythrocytes were approved by the Ethics Committee of the I.M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences (Protocol No.3-03 dated 2 March 2021 and Protocol No.1-04 dated 7 April 2022).

Key words: platelet hemostasis, temperature, laser diffraction, ADP, U46619, thrombin, TRAP-6, collagen

Dobrylko I.A., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2024; 23 (1): 92–8. DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-1-92-98

Гемостаз – сложный процесс, включающий первичный (активация тромбоцитов) и вторичный (активация свертывающей системы) гемостаз. Как первичный, так и вторичный гемостаз высокочувствителен к изменениям окружающей среды и температуры тела, тяжелые нарушения

этой системы могут возникать при гипер- и гипотермии и впоследствии вызывать коагулопатию, приводящую к кровоизлияниям или тромботическим явлениям [1–4]. Тем не менее гипер- и гипотермия используются в нескольких клинических ситуациях, например, для охлаждения пациента,

© 2024 by «D. Rogachev NMRCPHO»

Received 23.10.2023

Accepted 16.01.2024

Correspondence:

Igor V. Mindukshev,

Dr. Sci. in Biology, Head of the Laboratory of Cellular Mechanisms of Blood Homeostasis at the I.M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences
Address: 44 Toresa Ave.,
Saint Petersburg 194223, Russia
E-mail: iv_mindukshev@mail.ru

которое обычно применяется в кардиохирургии для защиты органов от ишемии [5]. Локальная гипотермия используется в качестве адъювантной терапии при различных онкологических заболеваниях [6, 7].

В литературе приводятся противоречивые данные о влиянии температуры на состояние тромбоцитов. В большинстве исследований показано, что гипотермия ускоряет активацию и агрегацию тромбоцитов [8–15], но существуют и противоположные данные, показывающие, что тромбоциты гиперактивны при высоких температурах [16, 17]. Молекулярные механизмы, отвечающие за ответ тромбоцитов на изменения температуры окружающей среды, изучены не полностью. Считается, что ADP играет ключевую роль в активации тромбоцитов, вызванной гипотермией [8, 9], и что гипотермия усиливает агрегацию тромбоцитов при низких и средних дозах ADP, тогда как при высоких дозах ADP (10–20 мкм) эффекты были незначительными или даже отсутствовали [11, 12, 15]. Кроме того, активация интегрина $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ тромбоцитов и выход на поверхность P-селектина усиливались при гипотермии. Однако влияние температуры на высвобождение гранул и дозозависимость по агрегации не было однозначным [10, 11, 15]. Эти различия не были связаны с изменениями экспрессии $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ или GPIIb α , а гипотермия не влияла на связывание фактора Виллебранда с тромбоцитами [9, 18]. Также гипотермия не влияла на ADP-индуцированное ингибирование фосфорилирования VASP в тромбоцитах здоровых добровольцев как в контроле, так и при ингибировании P2Y₁₂ рецептора ADP клопидогрилом [12]. В наших исследованиях было показано, что при активации тромбоцитов ADP температура разнонаправленно влияет на кинетику начальных реакций клеточного гемостаза. При гипотермии снижается скорость реакции изменения формы (shape change), но увеличивается скорость агрегации при низких дозах ADP [19]. В рассмотренных работах эффект температуры прослеживался при действии ADP и практически не исследован при действии других агонистов, активирующих тромбоциты в крови, таких как коллаген, тромбосан, тромбин. Именно сравнительный анализ влияния температуры на начальные реакции тромбоцитарного гемостаза при действии различных индукторов является основной целью представленного исследования. Показано, что тромбосан (миметик U46619) и тромбин проявляют сходный с ADP механизм действия: при низких дозах агониста гипотермия потенцирует агрегацию. При действии коллагена такого эффекта гипотермии не наблюдается, увеличение температуры ускоряет агрегацию тромбоцитов на всем исследуемом диапазоне.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы

В работе использовались ADP, TRAP-6, U46619, тромбин, коллаген, полученные из Sigma-Aldrich (Seelze, Германия).

Подготовка тромбоцитов

Человеческую кровь получали от здоровых добровольцев, не принимавших никаких лекарств минимум 10 дней до экспериментов, после подписания информированного согласия. Забор крови проводили в соответствии с рекомендациями Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН и Хельсинкской декларацией. Исследования с использованием эритроцитов человека одобрены этическим комитетом Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН (протоколы №3–03 от 2 марта 2021 г. и №1–04 от 7 апреля 2022 г.). Венозную кровь от доноров собирали в 1/7 объема буфера ACD (2,5% цитрат натрия, 2% D-глюкоза, 1,5% лимонная кислота, 3 mM EGTA, pH 6.7) и центрифугировали при 330g в течение 5 мин. В течение исследований PRP сохраняют при 25°C. При проведении экспериментов в анализаторе «ЛАСКА-ТМ» (или «ЛАСКА-ТМФ») PRP ресуспендировали в буфере HEPES (150 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5 mM D-глюкоза, 10 mM HEPES, pH 7.4) с конечной концентрацией тромбоцитов 1×10^7 клеток/мл.

Лазерная дифракция (малоугловое светорассеяние)

Метод лазерной дифракции реализуется на анализаторе «ЛАСКА-ТМ» («БиоМедСистем», Санкт-Петербург, Россия). Длина волны лазера – 650 нм. Кювета (10 × 10 мм) с кварцевыми стенками и рабочим объемом 1 мл. Мешалка с магнитным приводом и оборотом волчка 1200 об/мин (rpm). Термостатирование кюветного отделения от 10 до 50°C (шаг 0,5°C). Многоканальная система регистрации и записи 32 сигналов, частота дискретизации 10 Гц. Анализатор осуществляет одновременную динамическую регистрацию интенсивности светорассеяния (LSI) в диапазоне углов 0,1–12° (32 фотодиода), что позволяет регистрировать кинетику трансформации клеток (размер, форма, количество) в условиях функционального воздействия. Начальная реакция активации тромбоцитов – shape change – регистрируется по повышению LSI в угле 12° (LSI(12)). Агрегация регистрируется как повышение LSI в угле 1° (LSI(1)) и одновременное снижение LSI(12), соответственно, при дезагрегации эти сигналы инвертируются [19]. Начальная скорость

агрегации оценивается через 20 с после добавления агониста. Агрегация также характеризуется величиной AUC_{agg} как площадь под кривой сигнала LSI(1) за 3 мин.

Анализ данных

Данные лазерной дифракции рассчитывали с использованием оригинального программного обеспечения лазерного анализатора частиц LaSca_32 v.1622 («БиоМедСистем», Санкт-Петербург, Россия). Для анализа данных применяли GraphPad Prism v.9 (GraphPad Software Inc., США). По критерию Шапиро–Уилка данные были нормально распределены, поэтому для групповых сравнений использовался односторонний или двусторонний дисперсионный анализ. Там, где это применимо, статистическую значимость результатов определяли с помощью *t*-критерия Стьюдента. Каждый набор данных представляет собой не менее 5 различных экспериментов на материале, взятом не менее чем от 5 здоровых добровольцев. Данные представлены как среднее значение \pm доверительный интервал ($M \pm m$). Различия между значениями считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние температуры при действии ADP

Первичная стадия активации тромбоцитов связана с shape change, когда клетки из диско-видных сферизуются. При действии основных агонистов реакция shape change реализуется быстро (в течение нескольких секунд) и связана с перестройкой цитоскелета клетки. Методом лазерной дифракции реакция shape change регистрируется по увеличению LSI(12) [11]. Агрегация тромбоцитов является следующей за процессом shape change и обусловлена фибриногеновой связью клеток через активированные интегриновые рецепторы $\alpha IIb\beta 3$. При агрегации поведение сигналов LSI в разных углах разнонаправленное: в близких углах (LSI(1)) наблюдается повышение сигнала, в области дальних углов (LSI(12)) – снижение сигнала [11]. Количественно

изменения реакции тромбоцитов можно охарактеризовать 2 основными параметрами: EC_{50} и изменением максимальной скорости реакции (V_{max}). В таблице 1 приведены значения EC_{50} и V_{max} для этих 2 процессов (shape change и агрегация), оцененных при гипо-, гипертермии и нормальной физиологической температуре (37°C). Скорость реакции (V_{max}) изменения формы увеличивается почти в 3 раза при увеличении температуры от 25 до 37°C. Тогда как чувствительность (EC_{50}) достоверно не меняется и остается в пределах 40–50 нМ. В то же время при агрегации повышение температуры приводит к снижению чувствительности (увеличение величины EC_{50}), а V_{max} агрегации достоверно не меняется (таблица 1).

На рисунке 1 представлена зависимость агрегации тромбоцитов, индуцированных 800 нМ ADP при различных температурах. Повышение температуры, определяемое как уменьшение сигнала LSI(1) и увеличение сигнала LSI(12), вызывает замедление агрегации и усиливает процесс дезагрегации. Для интегральной оценки процессов агрегации и дезагрегации используется такой показатель, как площадь под кривой AUC_{agg} за 3 мин, который характеризует оба эти процесса. Максимальная величина AUC_{agg} наблюдается при 25°C, повышение температуры приводит к снижению AUC_{agg} за счет нарастания процесса дезагрегации.

Влияние температуры при действии U46619 (миметик тромбоксана)

Для оценки тромбоцитарного гемостаза, индуцированного тромбоксаном, был использован стабильный аналог (миметик) U46619. Использовалась доза 300 нМ U46619, при которой начальная скорость агрегации достигает половинной величины от максимальной. Исследование динамики начального процесса изменения формы клеток при различной температуре показало, что скорость реакции резко увеличивается при повышении температуры (рисунок 2А), при этом период полуреакции ($\tau_{1/2}$) увеличивается более чем в 5 раз при снижении температуры с 41 до 10°C (рисунок 2Б).

Таблица 1

Значения EC_{50} и V_{max} , оцененной по скорости реакций shape change (V_{shape}) и агрегации при различных температурах, для ADP

Table 1

EC_{50} and V_{max} values for ADP-induced platelet shape change and aggregation at different temperatures

Температура, °C Temperature, °C	Изменение формы Shape change		Агрегация Aggregation	
	EC_{50} , нМ EC_{50} , nM	V_{max} , %	EC_{50} , нМ EC_{50} , nM	V_{max} , %
25	40,9 \pm 9,9	38,5 \pm 7,5*	96 \pm 16*	82,7 \pm 6,8
37	46,4 \pm 9,1	100,0 \pm 11,8	594 \pm 76	100,0 \pm 5,3
41	49,4 \pm 8,6	132,9 \pm 10,6*	800 \pm 61*	90,2 \pm 6,8

Примечание. Здесь и в табл. 2: * – $p < 0,05$ в сравнении с температурой 37°C. В серии экспериментов за 100% приняты значения V_{max} при температуре 37°C.

Notes. Here and in Table 2: * – $p < 0,05$ when compared with 37°C. In a series of experiments, the maximum values of speed V_{max} at a temperature of 37°C were taken as 100%.

Зависимость агрегации тромбоцитов при активации U46619 (500 нМ) от температуры сходна с процессом, который наблюдается при действии ADP: гипотермия усиливает агрегацию и повышение температуры приводит к ее задержке (рисунки 3А), а зависимость AUC_{agg} от температуры еще более выраженная с максимумом при температуре 25°C (рисунки 3Б).

Влияние температуры при активации тромбином и агонистом тромбинового рецептора PAR-1 (TRAP-6)

Тромбин помимо прямого действия на тромбоциты, обусловленного активацией соответствующих рецепторов, вызывает образование фибрина, что приводит к формированию сгустка (первоначально крупных агрегатов). В этих условиях достаточно сложно отделить 2 процесса: агрегацию с участием интегриновых рецепторов $\alpha IIb\beta 3$ и коагуляцию, при

которой образуются крупные агрегаты, сплетенные фибрином. Например, в условиях гипертермии (41°C) первоначально наблюдается задержка агрегации, но далее через 2–3 мин – резкий агрегационный ответ, по-видимому, обусловленный образованием фибрина, так как на следующей стадии все сигналы снижаются к фоновому уровню [19]. При агрегации, индуцированной тромбином, повышение температуры также вызывает снижение начальной скорости агрегации (рисунки 4А). Максимальная агрегационная активность, оцененная по AUC_{agg} (за 3 мин), наблюдается в диапазоне температур 28–32°C (рисунки 4Б).

Для того чтобы исключить влияние коагуляции, был использован TRAP-6 – агонист тромбинового рецептора PAR-1. Были проведены исследования влияния температуры на 2 процесса индуцированных TRAP-6: shape change и агрегация. На рисунке 5 представлена дозозависимость реакций shape change

Рисунок 1

Зависимость агрегации тромбоцитов, индуцированных 800 нМ ADP, от температуры 15, 20, 25, 32, 37 и 41°C. А – динамика изменения LSI(1) и LSI(12). Масштаб графика для LSI(12) увеличен в 50 раз; Б – зависимость степени агрегации, оцененной по AUC_{agg} , от температуры. В серии экспериментов за 100% принимается значение AUC_{agg} при температуре 37°C. В рамке показана графическая оценка величины AUC_{agg} за 3 мин по динамике LSI(1)

Figure 1

The dependence of platelet aggregation induced by ADP (800 nM) on the temperature: 15 °C, 20 °C, 25 °C, 32 °C, 37 °C, 41 °C. А – changes in the light scattering intensity (LSI) at angles of 1° and 12°: LSI(1) and LSI(12). The scale of the plot for LSI(12) is increased 50-fold; Б – the dependence of the degree of platelet aggregation, assessed by AUC_{agg} , on the temperature. In a series of experiments, the AUC_{agg} value at a temperature of 37°C is taken as 100%. The box shows the AUC_{agg} over 3 minutes representing the sum of measurements of LSI(1)

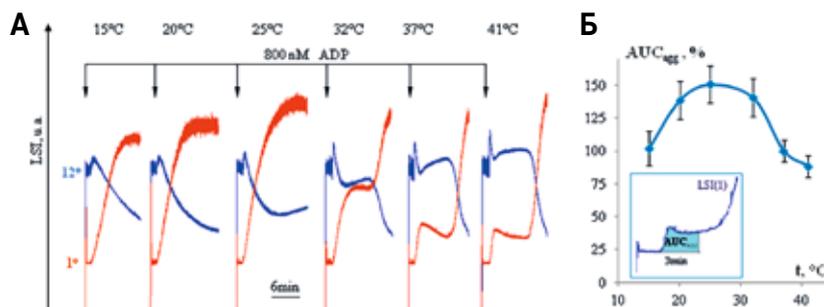


Рисунок 2

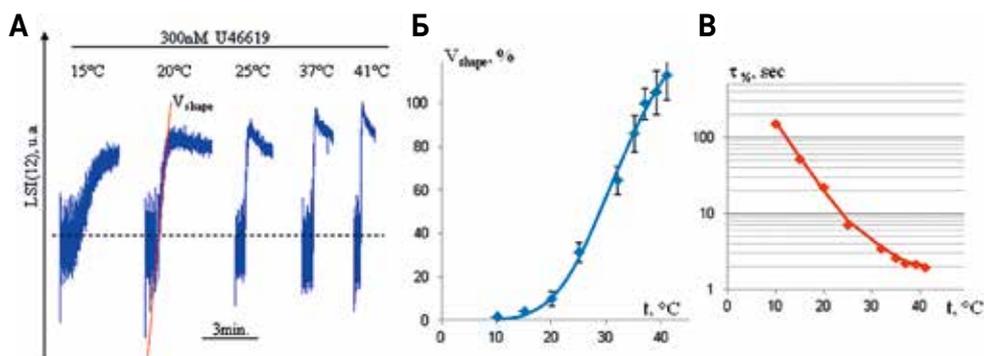
Зависимость реакции shape change тромбоцитов, индуцированных 300 нМ U46619 (миметик тромбоксана), от температуры 15, 20, 25, 37 и 41°C

А – динамика изменения LSI(12). Графически показано определение показателя V_{shape} ; Б – зависимость V_{shape} от температуры. В серии экспериментов за 100% принимается значение скорости при температуре 37°C; В – зависимость периода полуреакции ($\tau_{1/2}$) от температуры

Figure 2

The dependence of platelet shape change reaction induced by U46619 (thromboxane mimetic) at a concentration of 300 nM on the temperature: 15 °C, 20 °C, 25 °C, 37 °C, 41 °C

А – changes in the LSI(12). The determination of the velocity of platelet shape change (V_{shape}) is shown; Б – the dependence of V_{shape} on the temperature. In a series of experiments, velocity at a temperature of 37°C is taken as 100%; В – the dependence of half-reaction time ($\tau_{1/2}$) on the temperature



и агрегации для температуры 25°C и 37°C. Скорость реакции shape change (V_{max}) от температуры 25°C до 37°C увеличивается более чем в 2 раза, в то же время чувствительность (EC_{50}) изменяется незначительно и остается в пределах 200 нм (таблица 2). Для агрегации чувствительность снижается при повышении температуры (как увеличение величины EC_{50}), в то же время максимальная скорость агрегации при повышении

температуры увеличивается (таблица 2). По существу влияние температуры на тромбоцитарный гемостаз, индуцированный TRAP-6, сходно с температурным воздействием на гемостаз, вызванный ADP.

Влияние температуры при действии коллагена

Коллаген в отличие от остальных использованных агонистов (ADP, тромбоксан, тромбин), которые акти-

Рисунок 3

Зависимость агрегации тромбоцитов, индуцированных 500 нм U46619, от температуры 15, 20, 25, 28, 32 и 37°C. А – динамика изменения LSI(1) и LSI(12). Масштаб графика для LSI(12) увеличен в 50 раз; Б – зависимость от температуры степени агрегации, оцененной по AUC_{agg} . Показатель AUC_{agg} оценивается за 3 мин от добавления индуктора. В серии экспериментов за 100% принимается значение AUC_{agg} при температуре 37°C

Figure 3

The dependence of platelet aggregation induced by U46619 at 500 nM on the temperature: 15 °C, 20 °C, 25 °C, 28 °C, 32 °C, 37 °C

А – changes in LSI(1) and LSI(12). The scale of the plot for LSI(12) is increased 50-fold; Б – the dependence of the degree of aggregation estimated by AUC_{agg} on the temperature. The AUC_{agg} is measured over 3 minutes after the addition of the inducer. The AUC_{agg} value at a temperature of 37°C is taken as 100%

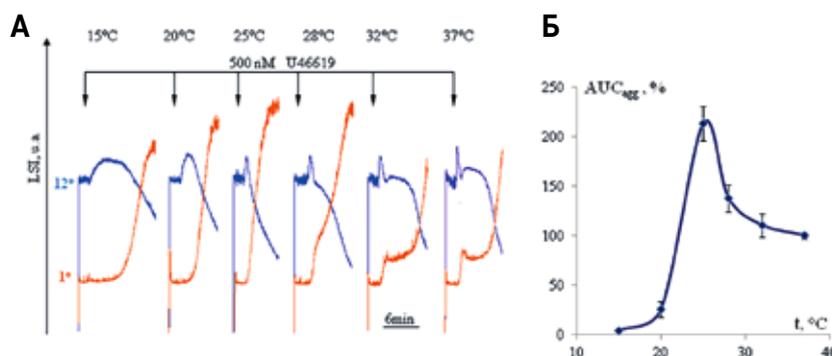


Рисунок 4

Зависимость агрегации тромбоцитов, индуцированных 0,01 Ед/мл тромбина, от температуры 10, 15, 20, 25, 28, 32, 35, 37, 39 и 41°C. А – динамика изменения LSI(1) и LSI(12). Масштаб графика для LSI(12) увеличен в 50 раз; Б – зависимость от температуры степени агрегации, оцененной по AUC_{agg} за 3 мин. В серии экспериментов за 100% принимается значение AUC_{agg} при температуре 37°C

Figure 4

The dependence of platelet aggregation induced by thrombin at a concentration of 0.01 U/mL on the temperature: 10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C, 28 °C, 32 °C, 35 °C, 37 °C, 39 °C, 41 °C

А – changes in LSI(1) and LSI(12). The scale of the plot for LSI(12) is increased 50-fold; Б – the dependence of the degree of aggregation measured by AUC_{agg} over 3 minutes on the temperature. The AUC_{agg} value at a temperature of 37°C is taken as 100%

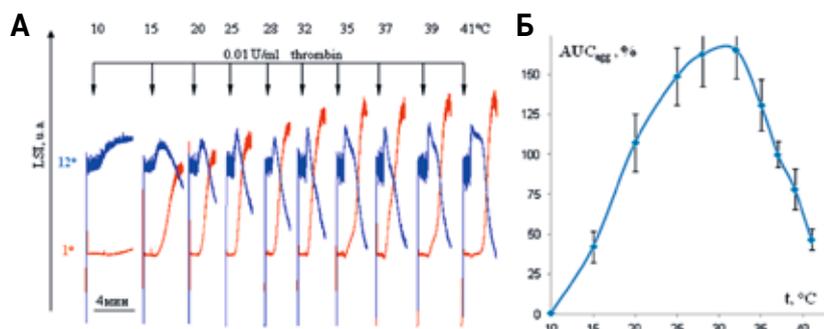


Таблица 2

Значения EC_{50} и V_{max} , оцененной по V_{shape} и агрегации при различных температурах, для TRAP-6

Table 2

EC_{50} and V_{max} values for TRAP-6 induced platelet shape change and aggregation at different temperatures

Температура, °C Temperature, °C	Изменение формы Shape change		Агрегация Aggregation	
	EC_{50} , нм EC_{50} , nM	V_{max} , %	EC_{50} , нм EC_{50} , nM	V_{max} , %
25	186,2 ± 7,4	40,5 ± 10,2*	1854 ± 62*	72,5 ± 7,9*
37	204,0 ± 18,7	100,0 ± 11,8	2267 ± 98	100,0 ± 3,7

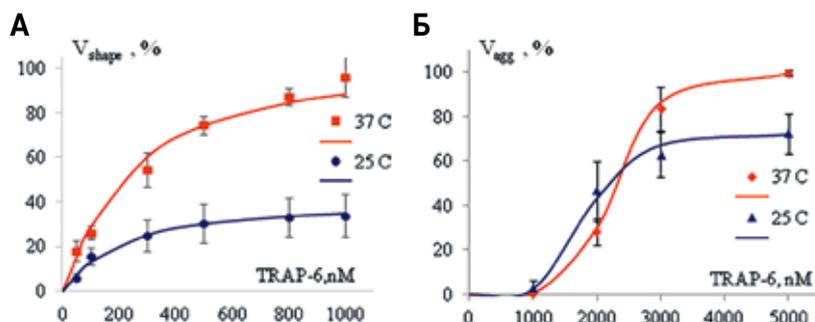
Рисунок 5

Зависимость доза–эффект для реакций трансформации тромбоцитов, индуцированных TRAP-6, для температуры 25°C и 37°C

А – зависимость показателя V_{shape} от TRAP-6. В серии экспериментов за 100% принимается значение V_{shape} при температуре 37°C и дозе 1000 нМ TRAP-6; Б – зависимость начальной V_{agg} от TRAP-6. В серии экспериментов за 100% принимается значение V_{agg} при температуре 37°C и дозе 5000 нМ TRAP-6

Figure 5

Concentration-response relationship for platelet transformation reactions in response to TRAP-6 at temperatures of 25°C and 37°C. А – the dependence of the V_{shape} on the concentration of TRAP-6. In a series of experiments, the V_{shape} value at a temperature of 37°C and a TRAP-6 concentration of 1000 nM is taken as 100%; Б – the dependence of the initial V_{agg} on the concentration of TRAP-6. The V_{agg} value at a temperature of 37°C and a TRAP-6 concentration of 5000 nM is taken as 100%

**Рисунок 6**

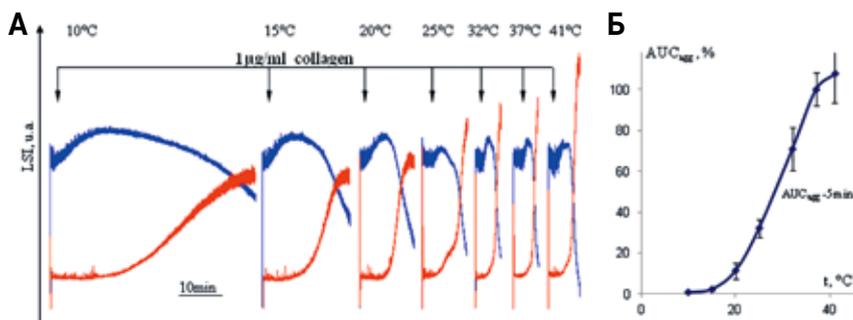
Зависимость агрегации тромбоцитов, индуцированных 1 мкг/мл коллагена, от температуры 10, 15, 20, 25, 32, 37 и 41°C

А – динамика изменения LSI(1) и LSI(12). Масштаб графика для LSI(12) увеличен в 50 раз; Б – зависимость степени агрегации, оцененной по AUC_{agg} за 5 мин, от температуры. В серии экспериментов за 100% принимается значение AUC_{agg} при температуре 37°C

Figure 6

The dependence of platelet aggregation induced by 1 μ g/mL of collagen on the temperature: 10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C, 32 °C, 37 °C, 41 °C

А – changes in LSI(1) and LSI(12). The scale of the plot for LSI(12) is increased 50-fold; Б – the dependence of the degree of aggregation, measured by AUC_{agg} over 5 minutes, on the temperature. The AUC_{agg} value at a temperature of 37°C is taken as 100%



вируют рецепторы, связанные с G-белками (GPCR), активирует иммуноглобулиновый рецептор GPVI (гликопротеин VI). Трансформация тромбоцитов при действии коллагена происходит значительно медленнее, чем при действии других агонистов (ADP, тромбоксан, тромбин) (для сравнения: рисунки 1Б, 3Б, 4 и рисунок 6А). В тромбоцитах, активированных коллагеном, замедляется скорость как начальной активации, так и агрегации, поэтому показатель AUC_{agg} рассчитывали за 5 мин. При действии коллагена наблюдается характерное для ферментативных реакций увеличение скорости как реакции shape change, так и агрегации при повышении температуры от 15 до 41°C (рисунок 6Б). В отличие от других агонистов при активации коллагеном не наблюдается процесса дезагрегации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Образование тромба с участием тромбоцитов – комплексный многостадийный процесс, состоящий из множества согласованных реакций, протекающих как в плазме, так и на поверхности и внутри клетки. Реализация каскада реакций гемостаза приводит к усиливающемуся вовлечению клеток в образование тромба на поврежденной поверхности сосуда. Температура неоднозначным образом воздействует на активирующие и ингибирующие обратимые реакции гемостаза. Однако в литературе нет консенсуса в вопросе о действии температуры на активность тромбоцитов, что может быть связано с применением различных агонистов и методов исследования. В представленной работе мы сравнили

влияние температуры на тромбоциты, активированные GPCR (ADP, тромбоксан, тромбин) и коллагеновым рецептором GPVI. Мы показали, что при активации GPCR повышение температуры однозначно ускоряет реакцию shape change, тогда как на стадии агрегации влияние температуры далеко не так определено. При низких дозах агонистов, вызывающих быструю реакцию shape change, повышение температуры замедляет агрегацию и усиливает процесс дезагрегации. При нормальной температуре (37°C) и гипертермии (41°C) уже активированные тромбоциты (реакция shape change реализована), не получившие достаточного стимула (низкая доза агониста), либо не агрегируют, либо быстро дезагрегируют. В то же время при гипотермии клетки агрегируют уже при низких дозах агониста. Иная картина наблюдается при активации рецептора GPVI коллагеном. При этом повышение температуры однозначно приводит к ускорению активации и агрегации тромбо-

цитов. Таким образом, результаты проделанной работы показали, что влияние температуры на процессы активации тромбоцитов зависит как от дозы агонистов, так и от природы активируемых рецепторов.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование проведено при поддержке гранта Российского научного фонда, проект №23-15-00142.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

Dobrylko I.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5063-3533>

Volkova A.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2978-5118>

Gerda B.A. ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-6096-0350>

Mikhailova D.M. ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-3061-4420>

Gambaryan S.P. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1470-0791>

Mindukshev I.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5978-2105>

Литература

- Gader A., Al-Mashhadani S., Al-Harthy S. Direct activation of platelets by heat is the possible trigger of the coagulopathy of heat stroke. *Br J Haematol* 1990; 74: 86–92. DOI: 10.1111/j.1365-2141.1990.00082.x-i1
- Kheirbek T., Kochanek A.R., Alam H.B. Hypothermia in bleeding trauma: A friend or a foe? *Scand J Trauma Resusc Emerg Med* 2009; 17: 1–15. DOI: 10.1186/1757-7241-17-65
- Martini W.Z., Cortez D.S., Dubick M.A., Park M.S., Holcomb J.B. Thrombelastography is Better Than PT, aPTT, and Activated Clotting Time in Detecting Clinically Relevant Clotting Abnormalities After Hypothermia, Hemorrhagic Shock and Resuscitation in Pigs. *J Trauma Acute Care Surg* 2008; 65: 535–43. DOI: 10.1097/TA.0b013e31818379a6
- Rohrer M.J., Natale A.M. Effect of hypothermia on the coagulation cascade. *Crit Care Med* 1992; 20: 1402–5. DOI: 10.1097/00003246-199210000-00007
- van Poucke S., Stevens K., Marcus A.E., Lance M.D. Hypothermia: Effects on platelet function and hemostasis. *Thromb J* 2014; 12: 31. DOI: 10.1186/s12959-014-0031-z
- Dranichnikov P., Mahteme H., Cashin P.H., Graf W. Coagulopathy and Venous Thromboembolic Events Following Cytoreductive Surgery and Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy. *Ann Surg Oncol* 2021; 28: 7772–82. DOI: 10.1245/s10434-021-09941-9
- Tuovila M., Erkinaro T., Takala H., Savolainen E.-R., Laurila P., Ohtonen P., et al. Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy enhances blood coagulation perioperatively evaluated by thromboelastography: A pilot study. *Int J Hypertherm* 2020; 37: 293–300. DOI: 10.1080/02656736.2020.1742389
- Scharbert G., Kalb M., Marschalek C., Kozek-Langenecker S.A. The Effects of Test Temperature and Storage Temperature on Platelet Aggregation: A Whole Blood *In Vitro* Study. *Anesthesia Analg* 2006; 102: 1280–4. DOI: 10.1213/01.ane.0000199399.04496.6d
- Straub A., Krajewski S., Hohmann J.D., Westein E., Jia F., Bassler N., et al. Evidence of Platelet Activation at Medically Used Hypothermia and Mechanistic Data Indicating ADP as a Key Mediator and Therapeutic Target. *Arter Thromb Vasc Biol* 2011; 31 (7): 1607–16. DOI: 10.1161/ATVBAHA.111.226373
- Straub A., Breuer M., Wendel H.P., Peter K., Dietz K., Ziemer G. Critical temperature ranges of hypothermia-induced platelet activation: Possible implications for cooling patients in cardiac surgery. *Thromb Haemost* 2007; 97 (04): 608–16. DOI: 10.1160/TH06-10-0563
- Faraday N., Rosenfeld B. *In Vitro* Hypothermia Enhances Platelet GPIIb-IIIa Activation and P-Selectin Expression. *Anesthesiology* 1998; 88: 1579–1585. DOI: 10.1097/0000542-199806000-00022
- Högberg C., Erlinge D., Braun O. Mild hypothermia does not attenuate platelet aggregation and may even increase ADP stimulated platelet aggregation after clopidogrel treatment. *Thromb J* 2009; 7: 2. DOI: 10.1186/1477-9560-7-2
- Maurer-Spurej E., Pfeiler G., Maurer N., Lindner H., Glatter O., Devine D.V. Room Temperature Activates Human Blood Platelets. *Lab Invest* 2001; 81: 581–92. DOI: 10.1038/labinvest.3780267
- Scharbert G., Kalb M.L., Essmeister R., Kozek-Langenecker S.A. Mild and moderate hypothermia increases platelet aggregation induced by various agonists: A whole blood *in vitro* study. *Platelets* 2010; 21: 44–8. DOI: 10.3109/09537100903420269
- Xavier R.G., White A.E., Fox S.C., Wilcox R.G., Heptinstall S. Enhanced platelet aggregation and activation under conditions of hypothermia. *Thromb Haemost* 2007; 98: 1266–75. DOI: 10.1160/TH07-03-0189
- Borgman M.A., Zaar M., Aden J.K., Schlader Z.J., Gagnon D., Rivas E., et al. Hemostatic responses to exercise, dehydration, and simulated bleeding in heat-stressed humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2019; 316: R145–56. DOI: 10.1152/ajpregu.00223.2018
- Van Poucke S., Huskens D., van der Speeten K., Roest M., Lauweirens B., Zheng M.-H., et al. Thrombin generation and platelet activation in cytoreductive surgery combined with hyperthermic intraperitoneal chemotherapy – A prospective cohort study. *PLoS One* 2018; 13 (6): e0193657. DOI: 10.1371/journal.pone.0193657
- Krajewski S., Kurz J., Geisler T., Peter K., Wendel H.P., Straub A. Combined blockade of ADP receptors and PI3-kinase p110beta fully prevents platelet and leukocyte activation during hypothermic extracorporeal circulation. *PLoS One* 2012; 7 (6): e38455. DOI: 10.1371/journal.pone.0038455
- Mindukshev I., Fock E., Dobrylko I., Sudnitsyna J., Gambaryan S., Pan-telev M. Platelet Hemostasis Reactions at Different Temperatures Correlate with Intracellular Calcium Concentration. *Int J Mol Sci* 2022; 23 (18): 10667. DOI: 10.3390/ijms231810667