

МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ОБРАТИМОЙ АГРЕГАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ В ОТВЕТ НА АДФ

Филькова А.А., Пантелеев М.А., Свешникова А.Н.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова

ул. Ленинские горы, 1, г. Москва, 119234, РФ; e-mail: aa.filjkova@physics.msu.ru

Поступила в редакцию: 11.07.2018.

Аннотация. При активации тромбоцитов крови *in vitro* слабыми агонистами, например, низкими концентрациями АДФ, наблюдается явление обратимой агрегации, когда через несколько минут после образования агрегатов тромбоцитов происходит их распад. Механизмы данного явления на настоящий момент не ясны. Для исследования механизма обратимой агрегации тромбоцитов в работе использовались экспериментальные и теоретические методы. В экспериментальной части исследования проводились измерения агрегации тромбоцитов по методу Борна на агрегометре Chrono-Log. Для эксперимента использовалась богатая тромбоцитами плазма и отмыемые тромбоциты, выделенные из крови здоровых доноров. Обратимая агрегация тромбоцитов наблюдалась при активации различными концентрациями АДФ (2,5-25 мкМ) при различных условиях. Выяснено, что обратимая агрегация наблюдается при наличии в среде кальция и при концентрации тромбоцитов более 200 тыс/мкл. В рамках данной работы также было проведено математическое моделирование. В модели учтены такие процессы, как активация и дезактивация, агрегация и дезагрегация тромбоцитов. Для приведенных реакций подобраны соответствующие константы, позволяющие описать экспериментальные наблюдения. При анализе модели выяснено, что обратимая агрегация тромбоцитов не может быть описана в предположении об одноступенчатой активации тромбоцитов.

Ключевые слова: агрегометрия, тромбоциты крови, математическое моделирование.

Активация тромбоцитов – важный этап свертывания крови, при котором тромбоциты получают способность к адгезии и агрегации, что лежит в основе формирования тромбоцитарной пробки в месте повреждения. Для оценки функциональной способности тромбоцитов в настоящее время чаще всего используется тест агрегометрии. В основе данного теста заложен эффект изменения светопропускающей способности суспензии тромбоцитов в следствие слипания тромбоцитов друг с другом в обогащенной тромбоцитами плазме пациента после добавления в нее индукторов агрегации, под воздействием которых могут запускаться разные механизмы активации тромбоцитов (рис. 1). Комплексное их применение дает более полную информацию о реакционной способности тромбоцитов и позволяет предположить причину выявленных изменений. Действие каждого из тромбоцитарных активаторов опосредуется через специализированные рецепторы в мембране тромбоцита. Так, коллаген активирует тромбоциты через гликопротеин VI, тромбин имеет 2 главных активируемых протеазами рецептора (PAR1 и PAR4), действие АДФ происходит через пуриnergические рецепторы P2Y₁ и P2Y₁₂. Стимуляция любого из мембранных рецепторов ведет к запуску сложной сети внутриклеточной сигнализации, которые управляют ответом клетки; причем разные рецепторы запускают разные пути.

Одним из основных физиологических индукторов агрегации тромбоцитов является АДФ, появляющийся в кровотоке при разрушении клеток, а также секретлируемый активированными тромбоцитами. Нарушения функциональности тромбоцитов выявляются при отклонении агрегационной кривой от контрольного образца (рис. 1). Однако в настоящее время не ясно, как трактовать такие особенности агрегационной кривой, как, например, возникновение обратимой агрегации при активации тромбоцитов низкими концентрациями АДФ. Известно, что обратимость возникает только при определенных условиях: для этого необходимо наличие ионов кальция в среде [1, 2].

Целью настоящей работы было исследование механизма обратимой агрегации тромбоцитов. Для этого была построена математическая модель, представляющая собой систему обыкновенных дифференциальных уравнений. Параметры модели были подобраны так, чтобы описать экспериментальные данные. Исследование модели показало, что в предположении об активации и дезактивации тромбоцитов математическая модель не может описать наблюдаемую в эксперименте зависимость агрегационной кривой от концентрации тромбоцитов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Данная работа содержит экспериментальную и теоретическую части. В экспериментальной части исследования проводились измерения агрегации тромбоцитов по методу Борна на агрегометре Chrono-Log 490. В экспериментах использовалась богатая тромбоцитами плазма (БТП) или отмыемые тромбоциты, полученные от здоровых доноров. Исследование соответствует требованиям Хельсинкской декларации и одобрено этическим комитетом ЦТП ФХФ РАН, решение № 1 от 01.01.2018 г. При получении БТП и тромбоцитов использовался стандартный протокол [1]. Для выделения тромбоцитов кровь берется в стерильные пробирки, содержащие раствор АСД (аскорбиновая кислота, лимонная кислота, глюкоза, рН 4,4). После центрифугирования 200g 15 мин получается богатая тромбоцитами плазма, к которой добавляется PGI₂ (500 nM) для предотвращения активации

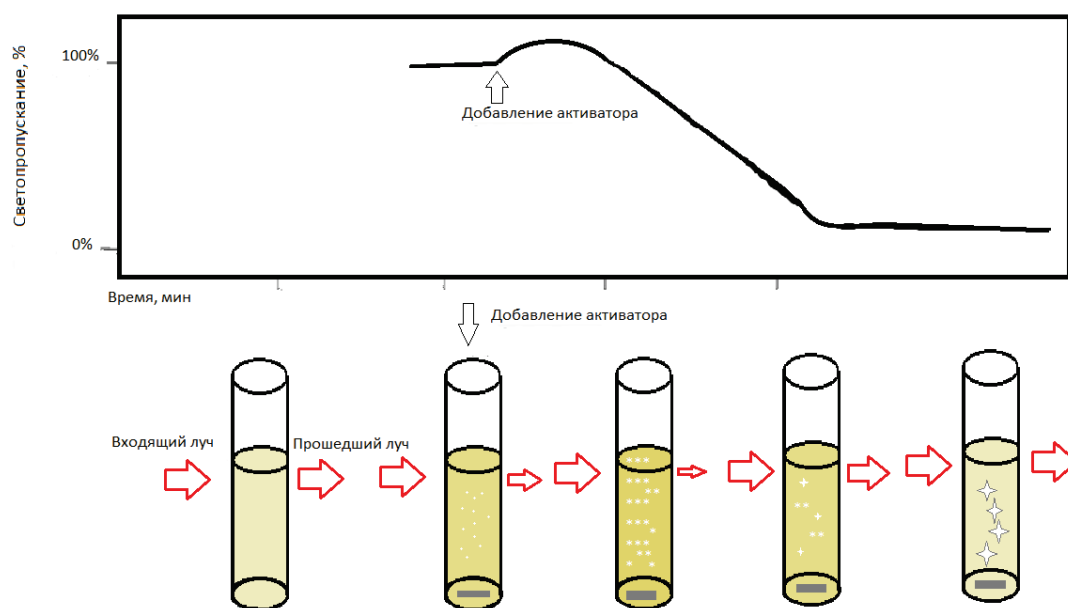


Рисунок 1. Схема исследования агрегации тромбоцитов на оптическом агрегометре. Светорассеяние суспензии тромбоцитов (или богатой тромбоцитами плазмы) пропорционально концентрации рассеивающих частиц. При добавлении активатора тромбоциты слипаются друг с другом и образуют агрегаты, что вызывает снижение концентрации рассеивающих свет частиц и увеличение прозрачности раствора. Зависимость светопропускания раствора от времени при добавлении активатора называется агрегационной кривой

тромбоцитов. После трех дальнейших центрифугирований 1900 g 8 мин образовавшийся осадок ресуспендируется в буфере Тирода, содержащем бычий сывороточный альбумин (0,36 %) и ионы кальция (2 мМ). Активация проводилась различными концентрациями АДФ (2,5-25 мкМ), с предварительным добавлением фибриногена (200 мкг/мл) в суспензию тромбоцитов.

Математическая модель представляет собой систему обыкновенных дифференциальных уравнений, описывающую изменение концентрации светорассеивающих частиц. Интегрирование проводилось в среде COPASI (copasi.org) методом LSODA.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для определения зависимости обратимой агрегации от кальция в среде кровь забиралась на цитрат и гепарин. Ионы цитрата, в отличие от гепарина, связывают ионы кальция, что приводит к ингибированию активации свертывания плазмы крови. Таким образом, в БТП, полученной из крови, взятой на гепарин, сохранялась физиологическая концентрация кальция. При проведении теста агрегометрии на БТП в присутствии и отсутствии кальция было подтверждено, что наличие кальция в среде – необходимое условие возникновения обратимой агрегации (рис. 2).

Для изучения влияния концентрации тромбоцитов в измеряемом образце отмытые от плазмы тромбоциты разбавлялись до необходимых концентраций буфером Тирода. При концентрациях ниже 200 тыс/мкл обратимая агрегация не наблюдается (рис. 3).

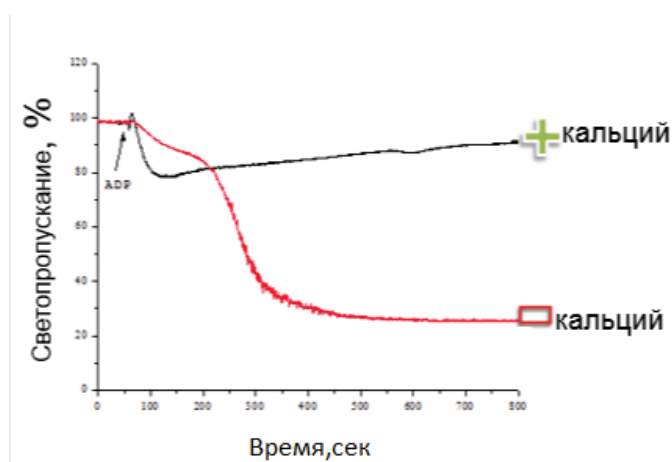


Рисунок 2. Зависимость обратимой агрегации тромбоцитов от наличия ионов кальция в среде. Агрегометрия БТП в ответ на 5мкМ АДФ. Наличие кальция обеспечивалось сбором крови в гепариновые пробирки

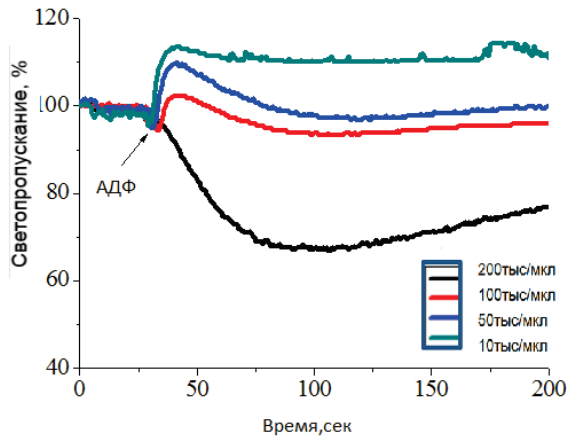


Рисунок 3. Зависимость обратимой агрегации от концентрации тромбоцитов. Эксперимент проводился в отмытых от плазмы тромбоцитах в присутствии кальция и фибриногена (200 мкг/мл). Активация 5мкМ АДФ

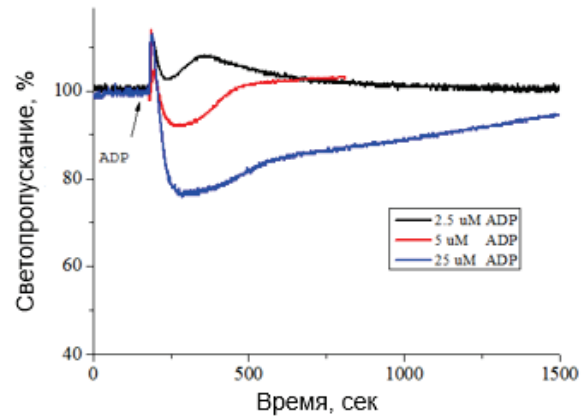


Рисунок 4. Зависимость обратимой агрегации от концентрации АДФ. Эксперимент проводился в отмытых от плазмы тромбоцитах в присутствии кальция и фибриногена (200 мкг/мл)

В результате были подобраны условия возникновения обратимой агрегации отмытых тромбоцитов или БТП: необходимо присутствие кальция в среде (рис. 2), концентрация тромбоцитов более 200 тыс/мкл (рис. 3).

В рамках данной работы также было проведено моделирование обратимой агрегации тромбоцитов в среде COPASI. В модели учтены такие процессы, как активация и дезактивация, агрегация и дезагрегация тромбоцитов. Система уравнений, описывающая данные процессы:

$$\begin{cases} \frac{d([A])}{dt} = -k_{agg}[A][A] + k_{dis}[A] + k_{act}[N][Tr] - k_{deact}[A] \\ \frac{d([N])}{dt} = -k_{act}[N][Tr] \\ \frac{d([M])}{dt} = -k_{deact}[A] \end{cases}$$

где $[A]$ – концентрация активированных тромбоцитов; $[N]$ – концентрация неактивированных тромбоцитов; $[M]$ – концентрация дезагрегировавших тромбоцитов; $[Tr]$ – концентрация активатора; k_{agg} – вероятность агрегации; k_{dis} – вероятность дезагрегации; k_{act} – вероятность активации; k_{deact} – вероятность дезактивации. Зависимость вероятности дезагрегации тромбоцитов от концентрации активатора выражалась формулой, подобранной на основе экспериментальных данных:

$$k_4 = 2^{-[Tr]} - 0.9 \quad (1/c)$$

Для приведенных реакций подобраны следующие константы, описывающие наиболее физиологичное поведение системы:

$$\begin{aligned} k_1 &= 0.3 \quad (\text{мл/мМоль} \cdot \text{с}) \quad \text{активация} \\ k_2 &= 0.1 \quad (\text{мл/мМоль} \cdot \text{с}) \quad \text{агрегация} \\ k_3 &= 0.04 \quad (1/\text{с}) \quad \text{деактивация} \\ k_4 &= 2^{-[Tr]} - 0.9 \quad (1/\text{с}) \quad \text{дезагрегация} \end{aligned}$$

В результате построения теоретической модели наблюдается обратимая агрегация при малых начальных концентрациях активатора в модели (рис. 5) что соответствует поведению системы в эксперименте с индуктором агрегации АДФ (рис. 4).

При варьировании начальной концентрации неактивированных тромбоцитов теоретические агрегационные кривые (рис. 6) не совпадают с экспериментальными значениями (рис. 3).

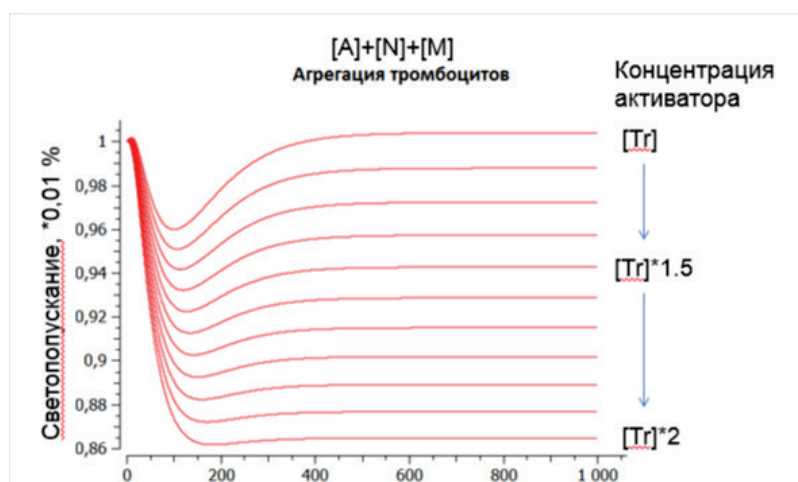


Рисунок 5. Компьютерная симуляция агрегации тромбоцитов в ответ на различные концентрации активатора

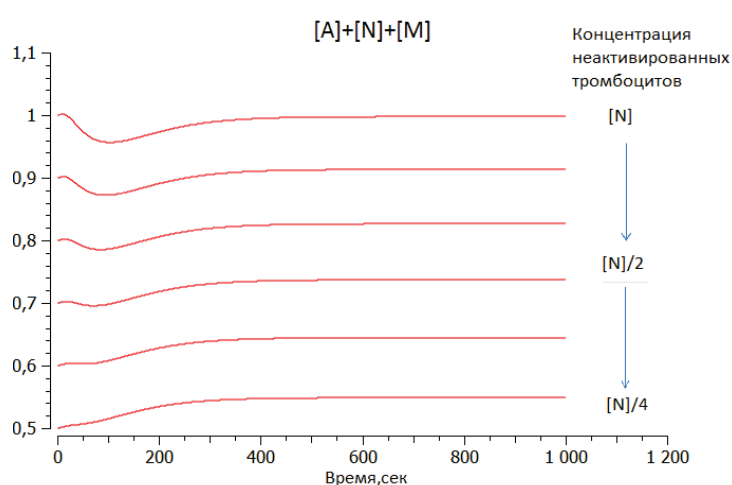


Рисунок 6. Компьютерная симуляция агрегации тромбоцитов при различных начальных концентрациях неактивированных тромбоцитов

В ходе работы были подобраны условия возникновения обратимой агрегации тромбоцитов, которые накладываются на допустимую концентрацию тромбоцитов для наблюдения данного явления, а также на особенности среды. Построена математическая модель обратимой агрегации, основанная на одноступенчатой активации тромбоцитов с дальнейшей возможностью агрегировать или дезагрегировать. В данной модели можно подобрать константы реакций таким образом, чтобы теоретическая кривая описывала данные, получаемые в ходе эксперимента. Однако при варьировании начальной концентрации тромбоцитов модель недостоверно описывает получаемые в эксперименте результаты. Таким образом, показано, что обратимая агрегация тромбоцитов не может быть описана в предположении об одноступенчатой активации тромбоцитов.

Список литературы / References:

1. Cazenave J.-P., Ohlmann P., Cassel D., Eckly A., Hechler B., Gachet C. Preparation of Washed Platelet Suspensions From Human and Rodent Blood. *Methods Mol. Biol.*, 2004, vol. 272, pp. 13-28.
2. Пантелеев М.А., Свешникова А.Н. Тромбоциты и гемостаз. *Онкогематология*, 2014, т. 9, № 2, с. 65-73. [Panteleev M.A., Sveshnikova A.N. Platelets and hemostasis. *Oncohematology*, 2014, vol. 9, no. 2, pp. 65-73. (In Russ.)]

**MATHEMATICAL MODELLING OF THE REVERSIBLE PLATELET AGGREGATION
INDUCED BY ADP****Filkova A.A., Panteleev M.A., Sveshnikova A.N.**

Lomonosov Moscow State University

Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russia; e-mail: aa.filkova@physics.msu.ru

Abstract. On platelets activation in vitro by weak agonists, for example, low concentrations of ADP, a phenomenon of so-called reversible aggregation is observed, when after several minutes the platelet aggregates start to dissolve. The mechanisms underlying this process are not yet clear. Here we utilised experimental and theoretical methods to investigate the mechanism of the reversible platelet aggregation. The experiments were conducted by means of Born's method realized on Chrono-Log aggregometer. In all experiments platelet rich plasma or washed platelet suspension isolated from whole blood of healthy volunteers, were used. The phenomenon of reversible platelet aggregation was observed upon activation by various concentrations of ADP (2.5-25 μM) under various conditions. The reversible aggregation was observed in presence of calcium ions and in case of platelet concentration larger than 200 000/ μl . Here we performed mathematical modelling to investigate further this phenomenon. The model takes into account the processes of activation and deactivation, aggregation and disaggregation of platelets. The model parameters were chosen to simulate the experimental data. Mathematical model analysis revealed that the reversible aggregation of platelets can not be described under the assumption of a single-step activation of platelets.

Key words: *Aggregometry, blood platelets, mathematical modelling.*