УДК 661.635.68:616-005.3

Егреші А.А., Філіппова Д.В., Гордієнко Ю.А.

ПОЛІФОСФАТИ ТА ГЕМОСТАЗ

ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», м. Дніпро

tonyaegreshi01@gmail.com

Молекули поліфосфатів (ПФ) є лінійними полімерами ортофосфорної кислоти, в яких фосфатні залишки пов'язані між собою фосфоангідридними зв'язками. Найбільш ретельно вони вивчені у мікроорганізмів. Довгий час ПФ вважали «викопними» молекулами з незрозумілими функціями. На сучасному етапі крім того, що ПФ слугують накопичувачами енергії та резервним пулом неорганічних фосфатів, доведено їхню роль у модуляції ферментативної активності, регулюванні мітохондріального іонного транспорту і активності дихального ланцюга. З'ясовано, що ПФ діють як гліотрансміттери через астрогліальні пуринергічні рецептори, що призводить до активації фосфоліпази С і вивільнення Ca^{2+} із внутрішньоклітинних депо. Нещодавно були отримані перші дані, які показали, що тромбоцити та тучні клітини ссавців теж синтезують ПФ. Встановлено, що у щільних гранулах тромбоцитів міститься велика кількість ПФ з числом залишків від 60 до 100 у ланцюзі. Під час активації тромбоцити секретують молекули ПФ, які виявляють потужний прокоагулянтний ефект, що характеризується скороченням часу згортання плазми крові за рахунок прискорення активації факторів V, X та XII та посиленням стійкості згустку до дії фібринолітичних ферментів. Проте цей ефект характерний лише для ПФ з кількістю мономерів 65 та 75+. Коротколанцюгові ПФ з числом залишків менш ніж 60 мономерів чинять протилежний вплив і можуть інгібувати контактний шлях активації зсідання крові. Відтак ПФ можуть сприяти розладам у системі гемостазу, провокуючи як виникнення тромботичних ускладнень, так і гіпокоагуляцію у пацієнтів з різними первинними захворюваннями. Проте даних щодо впливу ПФ на систему зсідання крові замало і вони носять неоднозначний характер.

Метою даної роботи було налагодження методики визначення вмісту поліфосфатів у кріопреципітаті плазми крові хворих з гіпер- та гіпокоагуляційними станами у порівнянні зі здоровими донорами.

ПФ циркулюють у кров'яному руслі близько 90 хвилин, потім піддаються дії екзополіфосфатаз. Тож цільну кров хворих з ЕДТА у якості стабілізатора одразу центрифугували при 1500 об/хв впродовж 10 хвилин і відділяли плазму від еритроцитів. Кріопреципітат отримували шляхом однократного заморожування плазми при -80 °С та повільного розморожування при +4 °С з подальшим центрифугуванням та осадженням білків у зразках перхлорною кислотою.

Для роботи використовували хімічно чистий посуд, усі реактиви готували на деіонізованій воді.

Метод визначення ПФ полягає у проведенні лужного гідролізу поліфосфатних ланцюгів у зразках до окремих фосфатних залишків та їх подальшою взаємодією з фосфатним реагентом, що готується шляхом змішування 4,2 % молібдату амонію у 4 М хлоридній кислоті та барвника 0,2 % малахітового зеленого у співвідношенні 1:3. Після ретельного перемішування на магнітній мішалці (30 хвилин) розчин фільтрували. Готовий реагент використовували для досліджень.

Дослідження проводили мікрометодом у 96-лункових планшетах. До зразків додавали 2 М NaOH та інкубували при 55 °С 1 годину. Гідроліз зупиняли 4,7 М HCl. Після охолодження до кімнатної температури додавали фосфатний реагент і витримували 20 хвилин. За присутності фосфатів відбувалась зміна кольору реагента з жовтого на зелений, при цьому інтенсивність забарвлення пропорційна їх кількості. Оптичну густину вимірювали на Humareader при 630 нм.

У результаті проведеної роботи будо побудовано калібрувальну криву із застосовуванням стандартного розчину поліфосфатів з концентрацією 10 мг/мл. Встановлено лінійну залежність концентрації поліфосфатів від оптичної густини до вмісту 250 нг/мл.