

УДК 167.33: 616.155.2

**ВИКОРИСТАННЯ ЧИСТИХ ТРОМБОЦИТІВ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ МОДЕЛІ  
«КЛІТИНА-ЕФЕКТОР» В СИСТЕМІ ГЕМОСТАЗУ**

© Т. І. Галенова, Н. М. Рослова, О. М. Савчук

*Проведено апробацію методу очищення тромбоцитарної фракції методом гель-фільтрації на колонці з сефарозою 4В. Результати цитологічного дослідження та електрофоретичного аналізу показали відсутність інших формених елементів крові та плазмових білків у складі ізольованої клітинної фракції. Доведено, що отримані тромбоцити залишалися морфологічно не змінні та зберігали здатність агрегувати у відповідь на дію АДФ – одного з основних фізіологічних індукторів*

**Ключові слова:** очищення тромбоцитів, гель-фільтрація на сефарозі 4В, агрегація, електрофорез

*Gel filtration on a column of Sepharose 4B was tested as method for separating platelet fraction. The results of cytological and electrophoretic analysis showed absence of other blood cells and plasma proteins in the content of the resulting cell fraction. Obtained platelets were proved to keep morphological stability and retain the ability to aggregate in response to ADP – one of the main physiological inductors*

**Keywords:** platelet purification, gel filtration on Sepharose 4B, aggregation, electrophoresis

**1. Вступ**

Тромбоцити в організмі виконують ряд надзвичайно важливих функцій спрямованих на підтримку різноманітних процесів життєдіяльності [1]. Тому, дослідження функціонального стану даних клітин в нормі та за різних патологічних станів, а також пошук шляхів впливу на перебіг процесів активації, агрегації та агрегації тромбоцитів є надзвичайно важливими та актуальними. Ряд такого типу досліджень передбачають використання чистих тромбоцитів, виділених з плазми крові зі збереженням їх структури та адгезивно-агрегаційної функції.

**2. Огляд літератури**

Тромбоцити (від грец. *thrombos* – згусток крові) – безядерні формени елементи крові, відомі також як кров'яні пластинки та «бляшки Біццоцера» (на честь італійського вченого Джуліо Біццоцера, котрий вперше їх відкрив та описав у 80-х роках XIX ст. [2]), представляють собою дископодібні цитоплазматичні фрагменти мегакаріоцитів кісткового мозку [3]. У здорової людини вміст тромбоцитів в периферичній крові в середньому становить  $250\ 000 \pm 40\ 000$  клітин на  $1\ \text{мм}^3$  [4].

В організмі, як за фізіологічної норми, так і при патології, тромбоцити виконують ряд надзвичайно важливих функцій, ключовою серед яких є підтримання гемостатичного балансу [5]. Так, за умов відсутності кровотечі, тромбоцити в кровотоці перебувають в неактивному стані та виконують ангіотрофічну функцію – підтримують нормальну структуру і функцію судин, їх стійкість до пошкоджуючих чинників, непроникність стосовно еритроцитів [6]; тоді як в місцях пошкодження судин тромбоцити активуються, секретують ряд протромботичних медіаторів, які підтримують спазм пошкодженої судини та сприяють закупоренню пошкодженої ділянки шляхом утворення первинної гемостатичної пробки із маси агрегованих тромбоцитів [7–9]. Ряд тромботичних факторів (фібриноген, фактори V, XIII, фон Віллебранда, високомолекулярний кініноген), що вивільняються в процесі секреції вмісту тромбоцитарних ве-

зикул, взаємодіють не лише з іншими тромбоцитами, залучаючи до процесу нові клітини, але і з елементами коагуляційної системи плазми крові [10, 11]. Порушення однієї з функцій призводить до змін у системі гемостазу й організмі в цілому. На сьогоднішній день гіперактивація тромбоцитів розглядається як один з пускових факторів патологічного тромбоутворення. Розвиток тромбозу веде до порушення кровообігу в тканинах, викликаючи такі патології, як інфаркт міокарда, ішемічний інсульт, тромбофлебіт і інші, а також сприяє ускладненню перебігу будь-якого захворювання [12, 13].

Важливу роль тромбоцити відіграють і у процесах запалення [14]. Їх внутрішньоклітинні везикули є місцем зберігання ряду прозапальних медіаторів, які вивільняються в кров'яне русло після активації клітин [1]. З іншого боку, сам по собі процес агрегації тромбоцитів є додатковим стимулом синтезу ряду потужних маркерів запалення. Серед останніх, наприклад, – тромбін, який залучений до розвитку запалення [15], ангіогенезу [16] та ембріонального розвитку [17]. Також добре відома участь тромбоцитів у розвитку злоякісних новоутворень [18, 19]. Було доведено, що тромбоцити сприяють міграції ракових клітин, збільшуючи ймовірність метастазування [20].

З огляду на вище означене можна без перебільшення стверджувати, що тромбоцити, через свою поліфункціональність, є невід'ємним елементом різноманітних процесів життєдіяльності. Це робить їх цікавим об'єктом як клітин-мішеней для пошуку та створення ефекторів, здатних впливати на патологічні зміни, генез яких пов'язаний з тромбоцитарною дисфункцією. Часто для проведення таких досліджень необхідним є використання чистої клітинної фракції.

**3. Мета та задачі дослідження**

Метою дослідження було апробація й оптимізація підходу отримання чистих тромбоцитів методом гель фільтрації та дослідження структури й агрегаційної функції ізольованих клітин.

Для досягнення поставленої мети були вирішені наступні задачі:

1. Ізолювання чистої тромбоцитарної фракції з плазми крові кроля методом гель-фільтрації.

2. Перевірка чистоти отриманих тромбоцитів цитологічним методом та методом диск-електрофорезу.

3. Дослідження агрегаційної функції очищених тромбоцитів.

#### 4. Матеріали і методи дослідження

Кров для досліджень відбирали з вусної артерії кроля у поліетиленову пробірку з 3,8 % розчином цитрату натрію у співвідношенні 9:1. Плазму збагачену тромбоцитами (ПЗТ) одержували центрифугуванням стабілізованої крові при 300 g протягом 10 хв при кімнатній температурі.

Тромбоцити ізолювали з ПЗТ методом гель-фільтрації на колонці з сефарозою 4В, об'ємом 40 мл (2×13 см). Колонку з хроматографічним носієм попередньо врівноважували нагрітим до 37 °C Tyrode-HEPES буфером, що містив наступні компоненти: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 12 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0,42 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> та 5 mM HEPES-NaOH, pH 7,4, а також 5,5 mM глюкозу. Після чого на неї наносили 2,5 мл отриманої ПЗТ. Фракції, об'ємом 2 мл, збирали у Tyrode-HEPES буфері, pH 7,4, та використовували для визначення екстинції при довжинах хвиль 280 (абсорбція білків) та 520 (абсорбція тромбоцитів) нм. Концентрацію тромбоцитів у фракціях визначали за допомогою агрегометра АТ-02 (Медтех, РФ). Присутність білків у фракціях перевіряли методом диск-електрофорезу у 8 % поліакриламідному гелі за присутності додецилсульфату натрію [21]. Електрофорез проводили за невідновлених умов. Гелі фарбували 2,5 % розчином кумасі G-250 у 25 % ізопропанолі та 10 % оцтової кислоти.

Фракції, що містили найбільшу кількість тромбоцитів об'єднували. Аліквоту відбирали для перевірки чистоти клітинної фракції цитологічним методом; решту використовували для дослідження агрегаційної функції тромбоцитів. Шляхом мікроскопії досліджувалися мазки цільної крові кроля, плазми збагаченої тромбоцитами та чистої тромбоцитарної фракції. Досліджувані зразки забарвлювали за загальноприйнятою методикою за Папегеймом.

Агрегацію тромбоцитів досліджували на фотооптичному агрегометрі АТ-02 (Медтех, РФ). Перед дослідженням до суспензії чистих тромбоцитів додавали СаCl<sub>2</sub> (кінцева концентрація 1мМ) та визначали концентрацію клітин; у разі необхідності суспензію тромбоцитів розводили за допомогою Tyrode-HEPES буферу, pH 7,4, до концентрації 230–250 тис. клітин/мкл. Як індуктор агрегації використовували аденозиндифосфат (НВО «Ренам», РФ, далі АДФ) у кінцевій концентрації 5×10<sup>-6</sup> М. Запис агрегатограм продовжували при 37° протягом 10 хв.

Подальший аналіз агрегаційної кривої містив визначення наступних показників:

1) ступеня агрегації – максимального % світлопропускання суспензії тромбоцитів;

2) часу досягнення максимальної швидкості агрегації – часу досягнення максимального світлопропускання;

3) швидкості агрегації, яку розраховували через 30 секунд після додавання індуктора до суспензії тромбоцитів [22].

#### 5. Результати дослідження

У літературі описано ряд підходів, що дозволяють відокремити тромбоцити з крові, як від інших формених елементів, так і від білків плазми. Метод гель-фільтрації, через простоту виконання та доступність необхідних реактивів, є одним із найпопулярніших сучасних способів ізолювання тромбоцитів зі збереженням їх нативних функцій. Однак, ми звернули увагу що, незважаючи на популярність даного підходу, на сьогоднішній день не існує чіткого протоколу проведення гель-фільтрації: різні автори, мотивуючись різною кінцевою метою, використовують як різні хроматографічні носії так і різні робочі буфери, відрізняються також умови проведення експерименту [23–26]. У зв'язку з цим, ґрунтуючись на вже відомих ключових положеннях методу гель-фільтрації, нами було апробовано власний підхід ізолювання тромбоцитів та оцінено можливість використання такого підходу для дослідження тромбоцитарних функцій.

Для очищення тромбоцитарної фракції як хроматографічний носій нами було обрано сефарозу 4В (GE Healthcare, USA), тоді як ряд інших авторів, для цієї мети, використовували переважно інший аналог сефарозу 2В. Дані агарозні носії відрізняються розміром гранул (40–190 мкм та 60–250 мкм, відповідно), що дає можливість фракціонувати речовини у діапазоні молекулярних мас 3×10<sup>5</sup>–3×10<sup>6</sup> та 2×10<sup>6</sup>–25×10<sup>6</sup>, відповідно. Перед процедурою гель-фільтрації, колонку з хроматографічним носієм врівноважували двома об'ємами Tyrode-HEPES буфера, pH 7,4. Компонентний склад, використаного нами буфера, не є універсальним і у літературі описано ряд можливих його модифікацій.

Хроматограма виділення тромбоцитів з плазми крові кроля представлена на рис. 1. У якості вихідного матеріалу на колонку, наносили плазму збагачену тромбоцитами, яку отримували стандартним методом зі стабілізованої цитратом крові кроля. Фракції, об'ємом 2 мл, збирали у Tyrode-HEPES буфері, pH 7,4 та використовували для дослідження їх оптичних характеристик за довжин хвиль 280 та 520 нм.

Вихід тромбоцитів з колонки контролювали, визначаючи оптичну щільність фракцій при довжині хвилі 520 нм, що відповідає неспецифічній адсорбції клітин. У 5–10 фракціях, що відповідали піку виходу тромбоцитів, було додатково проведено підрахунок клітин з використанням агрегометра. Згідно отриманих результатів підтверджено максимальну концентрацію клітин у фракціях 7 та 8 – 260×10<sup>3</sup> та 131×10<sup>3</sup> тромбоцитів на мікролітр, відповідно. Дані фракції були об'єднані; аліквоти були використані для проведення мікроскопічних і електрофоретичних досліджень, а також дослідження агрегаційної функції тромбоцитів.

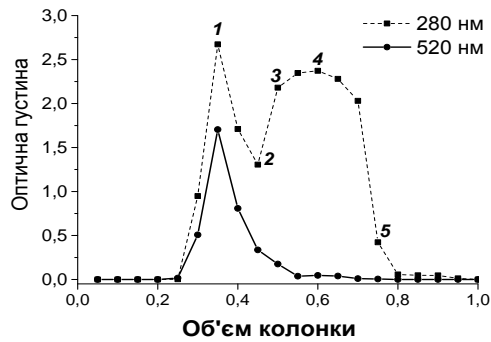


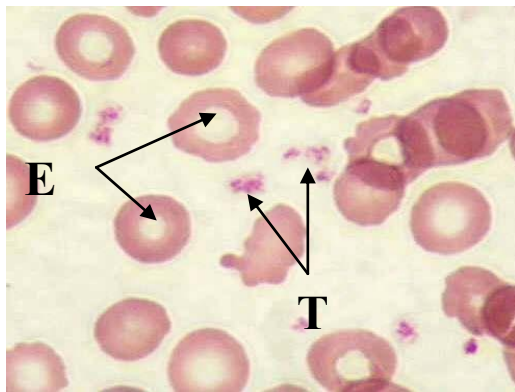
Рис. 1. Хроматограма очищення тромбоцитів від білків плазми крові кроля на колонці з сефарозою 4В. (Примітка: 1–5 – точки відбору матеріалу для проведення електрофоретичного аналізу)

Результати мікроскопічного дослідження наведені на рис. 2. Як видно із мікрофотографій, у плазмі збагаченій тромбоцитами (рис. 2, б), яку отримували шляхом центрифугування стабілізованої крові кроля (рис. 2, а), зустрічаються поодинокі еритроцит-

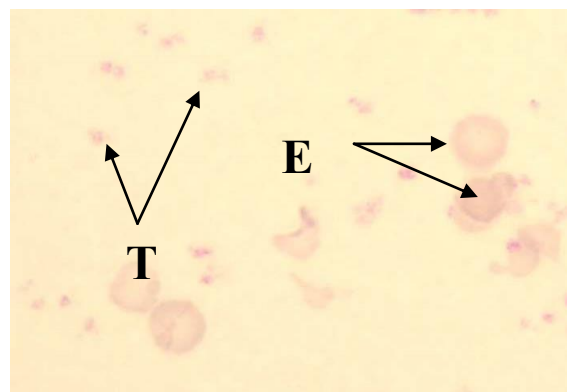
ти. Тоді як подальше доочищення ПЗТ на колонці з сефарозою 4В дає змогу повністю позбавити тромбоцитарну фракцію присутності інших формених елементів крові (рис. 2, в).

Слід також відзначити, що у результаті очищення тромбоцити морфологічно не змінювалися, що може свідчити про високу ефективність та низьку цитотравматичність використаного методу очищення та збагачення тромбоцитарної маси.

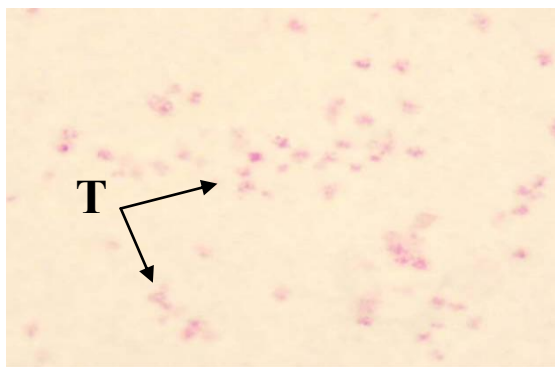
При отриманні чистих тромбоцитів методом гель фільтрації важливим є переконатися у відсутності білків плазми у клітинній фракції. Методом диск електрофорезу, результати якого наведені на рис. 3, нами було підтверджено відсутність плазмових білків у фракції чистих тромбоцитів (рис. 3, трек – Тр). Початок виходу високомолекулярних білків був відмічений для фракції 9, що необхідно враховувати в подальшій роботі. Незважаючи на те що дана фракція містила тромбоцити (концентрація клітин складала –  $51 \times 10^3$  на мікролітр), через присутність білкових молекул, її не слід використовувати в подальших експериментах.



а



б



в

Рис. 2. Результати мікроскопічного дослідження (заб. за Папенгеймом, зб.  $10 \times 100$ ): а – тромбоцити у цільній крові кроля; б – плазма збагачена тромбоцитами; в – тромбоцити після очищення на колонці з сефарозою 4В; Е – еритроцити, Т – тромбоцити

Дослідження агрегаційної функції отриманих тромбоцитів свідчить, що очищені методом гель-фільтрації клітини зберігають здатність до агрегації у відповідь на дію АДФ ( $5 \times 10^{-6}$  М). Агрегатограма за таких умов мала вигляд однофазної кривої. Макси-

мальний ступінь агрегації був відмічений на  $135 \pm 20$  с від моменту внесення в суспензію тромбоцитів індуктора і складав  $40 \pm 3$  %. Швидкість АДФ-індукованої агрегації становила  $28 \pm 2$  %/хв. Необхідно також відмітити, що тромбоцити зберігали здатність до дезаг-

регації, як спостерігалася через 3 хв від моменту внесення індуктора.

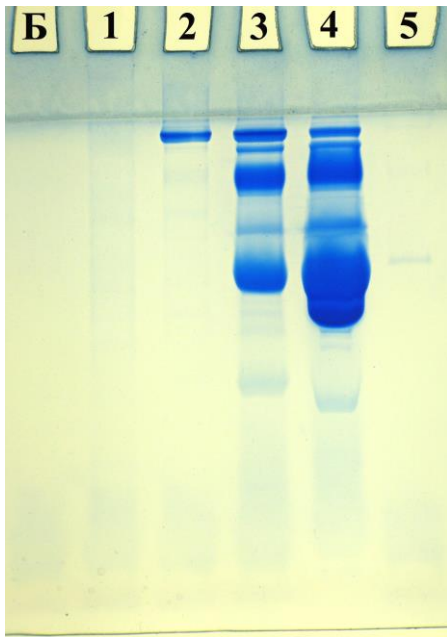


Рис. 3. Результати електрофоретичного аналізу процесу очищення тромбоцитів на колонці з сефарозою 4В. (Примітка: Б – буфер, використаний як «негативний контроль»; 1–5 – точки відбору матеріалу одержаного в результаті хроматографічного розділення на колонці з сефарозою 4В)

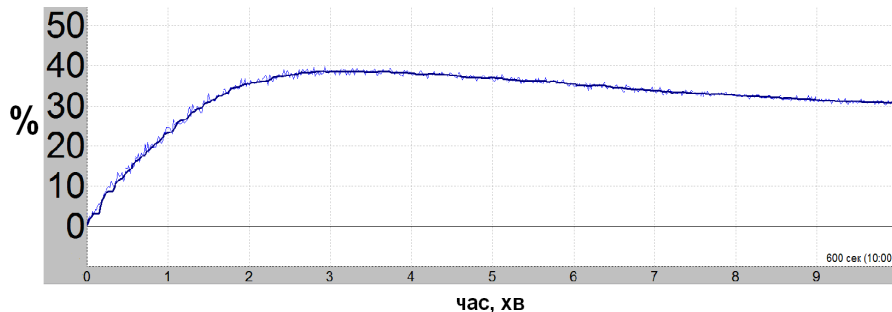


Рис. 4. Типова агрегатограма, що відображає АДФ-залежний процес агрегації тромбоцитів, очищених в результаті хроматографічного розділення на колонці з сефарозою 4В

## 6. Висновки

Таким чином, використаний нами метод гель-фільтрації плазми крові кроля дозволяє отримати чисту тромбоцитарну фракцію. Чистоту отриманих клітин було проаналізовано цитологічним методом та методом диск-електрофорезу, результати яких підтвердили відсутність інших формених елементів крові та плазмових білків у фракції тромбоцитів. Результати мікроскопічного дослідження показали, що структура, очищених методом гель-фільтрації клітин, залишається морфологічно незмінною, зберігається цілісність та гранулярний апарат клітин. Доведено, що очищені тромбоцити зберігають здатність агрегувати у відповідь на дію АДФ – одного з основних фізіологічних індукторів. Даний спосіб очищення тромбоцитів є швидким та простим у виконанні і дозволяє отримати близько 4 мл висококонцентрованої су-

спензії клітин – 210 000 тромбоцитів на мікролітр з 2,5 мл ПЗТ (з вихідною концентрацією тромбоцитів 280 000 клітин на мікролітр). Ефективність даного підходу була підтверджена і знайшла своє відображення в ряді експериментальних робіт щодо дослідження агрегаційної та секреторної функції тромбоцитів за умов дії ефektorів різної природи в нормі та при різних патологічних станах [26, 27].

## Література

- Ghoshal, K. Overview of Platelet Physiology: Its Hemostatic and Nonhemostatic Role in Disease Pathogenesis [Text] / K. Ghoshal, M. Bhattacharyya // The Scientific World Journal. – 2014. – Vol. 2014. – P. 1–16. doi: 10.1155/2014/781857
- Ribatti, D. Giulio Bizzozero and the discovery of platelets [Text] / D. Ribatti, E. Crivellato // Leukemia Research. – 2007. – Vol. 31, Issue 10. – P. 1339–1341. doi: 10.1016/j.leukres.2007.02.008
- Patel, S. R. The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets [Text] / S. R. Patel // Journal of Clinical Investigation. – 2005. – Vol. 115, Issue 12. – P. 3348–3354. doi: 10.1172/jci26891
- Daly, M. E. Determinants of platelet count in humans [Text] / M. E. Daly // Haematologica. – 2011. – Vol. 96, Issue 1. – P. 10–13. doi: 10.3324/haematol.2010.035287
- Packham, M. A. Role of platelets in thrombosis and hemostasis [Text] / M. A. Packham // Canadian Journal of Physiology and Pharmacology. – 1994. – Vol. 72, Issue 3. – P. 278–284. doi: 10.1139/y94-043
- Guyton, A. C. Textbook of Medical Physiology. Chap. 36 [Text] / A. C. Guyton, J. E. Hall // Hemostasis and Blood Coagulation. – 11-th ed. – Elsevier, 2005. – P. 457–467.
- Kauskot, A. Platelet Receptors [Text] / A. Kauskot, M. F. Hoylaerts // Handbook of Experimental Pharmacology. – 2012. – P. 23–57. doi: 10.1007/978-3-642-29423-5\_2
- Munnix, I. C. A. Platelet response heterogeneity in thrombus formation [Text] / I. C. A. Munnix, J. M. E. M. Cosemans, J. M. Auger, J. W. M. Heemskerk // Thrombosis and Haemostasis. – 2009. – Vol. 102, Issue 6. – P. 1149–1156. doi: 10.1160/th09-05-0289
- Steinhubl, S. R. The Role of the Platelet in the Pathogenesis of Atherothrombosis [Text] / S. R. Steinhubl, D. J. Moliterno // American Journal of Cardiovascular Drugs. – 2005. – Vol. 5, Issue 6. – P. 399–408. doi: 10.2165/00129784-200505060-00007
- Heemskerk, J. W. Platelet activation and blood coagulation [Text] / J. W. Heemskerk, E. M. Bevers, T. Lindhout // Thromb. Haemost. – 2002. – Vol. 88, Issue 2. – P. 186–193.
- Flaumenhaft, R. Molecular Basis of Platelet Granule Secretion [Text] / R. Flaumenhaft // Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. – 2003. – Vol. 23, Issue 7. – P. 1152–1160. doi: 10.1161/01.atv.0000075965.88456.48
- Rumbaut, R. E. Platelet-vessel wall interactions in hemostasis and thrombosis. Chap. 5 [Text] / R. E. Rumbaut, P. Thiagarajan // Platelet recruitment and blood coagulation. – Morgan & Claypool, 2010. – P. 29–35.
- Esmon, C. T. Basic mechanisms and pathogenesis of venous thrombosis [Text] / C. T. Esmon // Blood Reviews. –

2009. – Vol. 23, Issue 5. – P. 225–229. doi: 10.1016/j.blre.2009.07.002

14. Cerletti, C. Platelet-leukocyte interactions in thrombosis [Text] / C. Cerletti, C. Tamburrelli, B. Izzi, F. Gianfagna, G. De Gaetano // *Thrombosis Research*. – 2012. – Vol. 129, Issue 3. – P. 263–266. doi: 10.1016/j.thromres.2011.10.010

15. Connolly, A. J. Role of the thrombin receptor in development and evidence for a second receptor [Text] / A. J. Connolly, H. Ishihara, M. L. Kahn, R. V. Farese, S. R. Coughlin // *Nature*. – 1996. – Vol. 381, Issue 6582. – P. 516–519. doi: 10.1038/381516a0

16. Kisucka, J. Platelets and platelet adhesion support angiogenesis while preventing excessive hemorrhage [Text] / J. Kisucka, C. E. Butterfield, D. G. Duda, S. C. Eichenberger, S. Saffaripour, J. Ware et. al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2006. – Vol. 103, Issue 4. – P. 855–860. doi: 10.1073/pnas.0510412103

17. Paidas, M. J. Platelet disorders in pregnancy: implications for mother and fetus [Text] / M. J. Paidas, M. J. Haut, C. J. Lockwood // *Mt. Sinai J. Med.* – 1994. – Vol. 61, Issue 5. – P. 389–403.

18. Belloc, C. The effects of platelets on invasiveness and protease production of human mammary tumor cells [Text] / C. Belloc, H. Lu, C. Soria, R. Fridman, Y. Legrand, S. Menashi // *International Journal of Cancer*. – 1995. – Vol. 60, Issue 3. – P. 413–417. doi: 10.1002/ijc.2910600324

19. Ruf, W. Thrombin generation and the pathogenesis of cancer [Text] / W. Ruf, B. Mueller // *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. – 2006. – Vol. 32, Issue S1. – P. 061–068. doi: 10.1055/s-2006-939555

20. Jain, S. Platelets: linking hemostasis and cancer [Text] / S. Jain, J. Harris, J. Ware // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. – 2010. – Vol. 30, Issue 12. – P. 2362–2367. doi: 10.1161/atvbaha.110.207514

21. Cleveland, D. W. Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis [Text] / D. W. Cleveland // *Journal of Biological Chemistry*. – 1977. – Vol. 252, Issue 3. – P. 1102–1106.

22. Harrison, P. Guidelines for the laboratory investigation of heritable disorders of platelet function [Text] / P. Harrison, I. Mackie, A. Mumford, C. Briggs, R. Liesner, M. Winter // *British Journal of Haematology*. – 2011. – Vol. 155, Issue 1. – P. 30–44. doi: 10.1111/j.1365-2141.2011.08793.x

23. Timmons, S. Isolation of human platelets by albumin gradient and gel filtration [Text] / S. Timmons, J. Hawiger // *Methods in Enzymology*. – 1989. – P. 11–21. doi: 10.1016/0076-6879(89)69046-5

24. Groscurth, S. Effects of Washing and Gel Filtration on the Ultrastructure of Human Platelets [Text] / P. Groscurth, S. Cheng, I. Vollenweider, A. von Felten // *Acta Haematologica*. – 1987. – Vol. 77, Issue 3. – P. 150–155. doi: 10.1159/000205980

25. Jesty, J. Acetylated prothrombin as a substrate in the measurement of the procoagulant activity of platelets: elimination of the feedback activation of platelets by thrombin [Text] / J. Jesty, D. Bluestein // *Analytical Biochemistry*. – 1999. – Vol. 272, Issue 1. – P. 64–70. doi: 10.1006/abio.1999.4148

26. Moran, N. Monitoring modulators of platelet aggregation in a microtiter plate assay [Text] / N. Moran, A. Kiernan, E. Dunne, R. J. Edwards, D. C. Shields, D. Kenny // *Analytical Biochemistry*. – 2006. – Vol. 357, Issue 1. – P. 77–84. doi: 10.1016/j.ab.2006.06.037

27. Katrii, T. B. Influence of IgG Separated from Blood Plasma of Patients with Ischemic Stroke on the Process Platelet's Proteins Secretion [Text] / T. B. Katrii, T. B. Vovk, N. K. Kravchenko, O. M. Savchuk, L. I. Ostapchenko // *Intern. J. Chem. Biomol. Science*. – 2015. – Vol. 1, Issue 4. – P. 278–283.

## References

1. Ghoshal, K., Bhattacharyya, M. (2014). Overview of Platelet Physiology: Its Hemostatic and Nonhemostatic Role in

Disease Pathogenesis. *The Scientific World Journal*, 2014, 1–16. doi: 10.1155/2014/781857

2. Ribatti, D., Crivellato, E. (2007). Giulio Bizzozero and the discovery of platelets. *Leukemia Research*, 31 (10), 1339–1341. doi: 10.1016/j.leukres.2007.02.008

3. Patel, S. R. (2005). The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *Journal of Clinical Investigation*, 115 (12), 3348–3354. doi: 10.1172/jci26891

4. Daly, M. E. (2010). Determinants of platelet count in humans. *Haematologica*, 96 (1), 10–13. doi: 10.3324/haematol.2010.035287

5. Packham, M. A. (1994). Role of platelets in thrombosis and hemostasis. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 72 (3), 278–284. doi: 10.1139/y94-043

6. Guyton, A. C., Hall, J. E. (2005). *Textbook of Medical Physiology*. Chap. 36. Hemostasis and Blood Coagulation. Elsevier, 457–467.

7. Kauskot, A., Hoylaerts, M. F. (2012). Platelet Receptors. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 23–57. doi: 10.1007/978-3-642-29423-5\_2

8. Munnix, I. C. A., Cosemans, J. M. E. M., Auger, J. M., Heemskerk, J. W. M. (2009). Platelet response heterogeneity in thrombus formation. *Thrombosis and Haemostasis*. doi: 10.1160/th09-05-0289

9. Steinhubl, S. R., Moliterno, D. J. (2005). The Role of the Platelet in the Pathogenesis of Atherothrombosis. *American Journal of Cardiovascular Drugs*, 5 (6), 399–408. doi: 10.2165/00129784-200505060-00007

10. Heemskerk, J. W., Bevers, E. M., Lindhout, T. (2002). Platelet activation and blood coagulation. *Thromb. Haemost.*, 88 (2), 186–193.

11. Flaumenhaft, R. (2003). Molecular Basis of Platelet Granule Secretion. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23 (7), 1152–1160. doi: 10.1161/01.atv.0000075965.88456.48

12. Rumbaut, R. E., Thiagarajan, P. (2010). Platelet-vessel wall interactions in hemostasis and thrombosis. Chap. 5. Platelet recruitment and blood coagulation. Morgan & Claypool, 29–35.

13. Esmon, C. T. (2009). Basic mechanisms and pathogenesis of venous thrombosis. *Blood Reviews*, 23 (5), 225–229. doi: 10.1016/j.blre.2009.07.002

14. Cerletti, C., Tamburrelli, C., Izzi, B., Gianfagna, F., De Gaetano, G. (2012). Platelet-leukocyte interactions in thrombosis. *Thrombosis Research*, 129 (3), 263–266. doi: 10.1016/j.thromres.2011.10.010

15. Connolly, A. J., Ishihara, H., Kahn, M. L., Farese, R. V., Coughlin, S. R. (1996). Role of the thrombin receptor in development and evidence for a second receptor. *Nature*, 381 (6582), 516–519. doi: 10.1038/381516a0

16. Kisucka, J., Butterfield, C. E., Duda, D. G., Eichenberger, S. C., Saffaripour, S., Ware, J. et. al. (2006). Platelets and platelet adhesion support angiogenesis while preventing excessive hemorrhage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103 (4), 855–860. doi: 10.1073/pnas.0510412103

17. Paidas, M. J., Haut, M. J., Lockwood, C. J. (1994). Platelet disorders in pregnancy: implications for mother and fetus. *Mt. Sinai J. Med.*, 61 (5), 389–403.

18. Belloc, C., Lu, H., Soria, C., Fridman, R., Legrand, Y., Menashi, S. (1995). The effect of platelets on invasiveness and protease production of human mammary tumor cells. *International Journal of Cancer*, 60 (3), 413–417. doi: 10.1002/ijc.2910600324

19. Ruf, W., Mueller, B. (2006). Thrombin Generation and the Pathogenesis of Cancer. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 32 (S1), 061–068. doi: 10.1055/s-2006-939555

20. Jain, S., Harris, J., Ware, J. (2010). Platelets: Linking Hemostasis and Cancer. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and*

Vascular Biology, 30 (12), 2362–2367. doi: 10.1161/atvbaha.110.207514

21. Cleveland. Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis / Cleveland, Don W. // Journal of Biological Chemistry. – 1977. – 252(3). – P.1102-1106.

22. Harrison, P., Mackie, I., Mumford, A., Briggs, C., Liesner, R., Winter, M., Machin, S. (2011). Guidelines for the laboratory investigation of heritable disorders of platelet function. British Journal of Haematology, 155 (1), 30–44. doi: 10.1111/j.1365-2141.2011.08793.x

23. Timmons, S., Hawiger, J. (1989). Isolation of human platelets by albumin gradient and gel filtration. Platelets: Receptors, Adhesion, Secretion Part A, 11–21. doi: 10.1016/0076-6879(89)69046-5

24. Groscurth, P., Cheng, S., Vollenweider, I., von Felten, A. (2009). Effects of Washing and Gel Filtration on the Ul-

trastructure of Human Platelets. Acta Haematologica, 77 (3), 150–155. doi: 10.1159/000205980

25. Jesty, J., Bluestein, D. (1999). Acetylated Prothrombin as a Substrate in the Measurement of the Procoagulant Activity of Platelets: Elimination of the Feedback Activation of Platelets by Thrombin. Analytical Biochemistry, 272 (1), 64–70. doi: 10.1006/abio.1999.4148

26. Moran, N., Kiernan, A., Dunne, E., Edwards, R. J., Shields, D. C., Kenny, D. (2006). Monitoring modulators of platelet aggregation in a microtiter plate assay. Analytical Biochemistry, 357 (1), 77–84. doi: 10.1016/j.ab.2006.06.037

27. Katrii, T. B., Vovk, T. B., Kravchenko, N. K., Savchuk, O. M., Ostapchenko, L. I. (2015). Influence of IgG Separated from Blood Plasma of Patients with Ischemic Stroke on the Process Platelet's Proteins Secretion. Intern. J. Chem. Biol. Science, 1 (4), 278–283.

Дата надходження рукопису 06.10.2016

**Галенова Тетяна Іванівна**, кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник, кафедра біохімії, Київський національний університет імені Тараса Шевченка, вул. Володимирська, 64/13, м. Київ, Україна, 01601

E-mail: galenovatanya@rambler.ru

**Рослова Наталія Миколаївна**, провідний інженер, Київський національний університет імені Тараса Шевченка, вул. Володимирська, 64/13, м. Київ, Україна, 01601

E-mail: tereska@bimir.net

**Савчук Олексій Миколайович**, доктор біологічних наук, професор, кафедра біохімії, Київський національний університет імені Тараса Шевченка, вул. Володимирська, 64/13, м. Київ, Україна, 01601

E-mail: olexiy.savchuk@yandex.ru;

УДК 582.929.4 : [57.045+581.192.2]

## ВМІСТ ФЛАВОНОЇДІВ У СИРОВИНІ *ISODON JAPONICUS* VAR. *GLAUCOCALYX* (*LAMIACEAE*) НА ФОНІ ВОДНОГО ДЕФІЦИТУ РОСЛИН

© С. М. Ковтун-Водяницька, В. Ф. Левон

*Досліджено сумарний вміст флавоноїдів у Isodon japonicus var. glaucocalyx (Maxim.) H.W. Li за стресових умов зростання. Виявлено, що при наявному водному дефіциті понад 30 % надземна частина рослин містить доволі велику кількість флавоноїдів – 61,79 мг/г. Намагання рослиною призвичаїтися до несприятливих умов таким чином сприяє підвищенню цінності її сировини*

**Ключові слова:** *Isodon, інтродукція, кліматичні умови зростання, водний дефіцит, сировина, сума флавоноїдів*

*The total content of flavonoids in Isodon japonicus var. glaucocalyx (Maxim.) H.W. Li for stressful growing conditions is investigated. It was revealed that in the case of water deficit of more than 30 % the aboveground part of the plant contains a large amount of flavonoids – 61,79 mg/g. Attempts of a plant to adapt to adverse conditions, thus, contributes to its value of raw materials*

**Keywords:** *Isodon, introduction, climatic conditions of growth, water deficit, raw materials, amount of flavonoids*

### 1. Вступ

Володіння інформацією щодо біохімічного складу того чи іншого виду рослин дозволяє більш цілеспрямоване використання їх сировини на практиці. Серед численого переліку біологічно активних сполук та широкого спектру їх дії на організм людини чільне місце займають флавоноїди.

Флавоноїди є біологічно активними поліфенольними сполуками. На даний час їх кількість сягає по-

над 6000 і вони передують за поширеністю серед решти біологічно активних рослинних сполук. Початок дослідження хімічної структури і властивостей флавоноїдів відноситься до початку XIX сторіччя. Флавоноїди можуть бути різних кольорів і відтінків – від безбарвних до жовтих, синіх, червоних тощо та проявляти різноманітну клініко-фармакологічну активність, зумовлену їх природним походженням і впливом на обмінні процеси організму та функцію окремих органів.