



УДК 577.152.3.4.21.05.612.115.12

ТРОМБИН – РЕГУЛЯТОР РЕПАРАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ ПРИ ЗАЖИВЛЕНИИ РАН

© 1998 г. С. М. Струкова[#], Т. Н. Дугина, И. В. Чистов, Е. А. Марквичева*, С. В. Купцова*, Е. Г. Колокольчикова**, Л. Д. Румш*, В. П. Зубов*, Э. Глуза***

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
кафедра физиологии человека и животных, 119899, Москва;

*Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва;

**Институт хирургии им. А.А. Вишневского РАМН, Москва;

***Центр сосудистой биологии и медицины Йенского университета им. Ф. Шиллера, Эрфурт, ФРГ

Поступила в редакцию 08.07.97 г. Принята к печати 19.12.97 г.

Тромбин, взаимодействуя с рецепторами семейства PAR (protease-activated receptor), участвует в заживлении ран, индуцируя процессы репарации и регулируя активность тучных клеток, секретирующих медиаторы воспаления. При использовании для активации тучных клеток крыс TRAP-6 (thrombin receptor agonist peptide) получены доказательства в пользу существования на тучных клетках нескольких рецепторов, в том числе PAR-1. Показано, что TRAP может вызывать повышение концентрации Ca^{2+} в цитоплазме тучных клеток и регулировать дегрануляцию клеток, освобождая окись азота. Установлено, что инкапсулированный в ПВК-Са-Alg-гидрогелевые пленки тромбин стимулирует заживление ран у крыс, о чем свидетельствует ускорение пролиферации фибробластов и неоваскуляризации.

Ключевые слова: тромбин, рецептор, пептиды, тучные клетки, заживление ран.

Тромбин (КФ 3.4.21.5), уникальная сериновая протеиназа семейства трипсина, не только превращает фибриноген крови в фибрин сгустка, но и регулирует свертывающие и противосвертывающие механизмы, сосудистый тонус, участвует в процессах заживления ран [1–6].

Тромбин включается в воспалительную и пролиферативную фазы заживления ран, при этом он стимулирует адгезию кровяных пластинок, полиморфно-ядерных лейкоцитов, моноцитов и Т-лимфоцитов к эндотелиальным клеткам и агрегацию клеток; повышает проницаемость монослоя эндотелиальных клеток и стимулирует пролиферацию клеток эндотелия, фибробластов и Т-лимфоцитов [3, 5, 7]. В первой стадии заживления ран – воспалении – принимают активное участие тучные клетки, которые освобождают медиатор воспаления – гистамин, протеиназы, хемоаттрактанты, гепарин и кофактор основного

фактора роста фибробластов. Тучные клетки синтезируют также фактор роста, который промотирует пролиферацию фибробластов [8]. Нами [9, 10] и авторами работы [11] установлено, что тромбин может вызывать дегрануляцию тучных клеток и освобождение гистамина и гепарина. В процессах репарации тканей участвует не только тромбин, образуемый из протромбина крови, но и тромбин другого происхождения: есть данные о синтезе тромбина в макрофагах, в которых обнаружена мРНК протромбина и протромбиназная активность, необходимая для активации профермента [12].

Тромбин в отличие от трипсина проявляет высокую избирательность действия, обусловленную особенностями структуры его молекулы [13]. Кроме активного центра тромбин имеет экзосайты, которые мы объединяем понятием “центр узнавания специфических субстратов и рецепторов” [13]. Анионсвязывающий экзосайт 1 отвечает за связывание тромбина с комплементарными участками рецепторов клеток, фибриногена и некоторых других специфических субстратов. Анионсвязывающий экзосайт 2 отвечает за связывание тромбина с гепарином и гликокаллицином [3].

Действие тромбина на клетки реализуется вследствие его взаимодействия с мембранными рецепторами. Один из рецепторов, называемый

Сокращения: DIP – диизопропилфосфорил, cGMP – циклический гуанозинмонофосфат; PAR – рецептор, активируемый протеиназой; TRAP – пептид, агонист тромбинового рецептора; ПВК-Са-Alg – поли-N-винилкапролактан-Са-альгинат.

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 939-14-16, факс: (095) 138-09-92, e-mail: strukov@ofefs.phys.msu.su).

PAR-1 (protease-activated receptor), относится к суперсемейству интегральных мембранных белков – семидоменных рецепторов, сопряженных с G-белками [14, 15]. К этому суперсемейству относятся рецепторы катехоламинов, ацетилхолина, серотонина, гистамина, ангиотензинов, тахикининов, фактора активации тромбоцитов, эндотелинов и других агонистов [14, 16]. В отличие от всех вышеупомянутых рецепторов внеклеточный N-концевой фрагмент PAR-1 имеет расщепляемую тромбином пептидную связь Arg41-Ser42 [14]. Укороченный тромбином новый N-концевой фрагмент рецептора человека с последовательностью S⁴²FLLRNPNDKYEPF, который называют “привязанным лигандом” или TRAP-14 (thrombin receptor agonist peptide), активирует рецептор, взаимодействуя с участками его второй внеклеточной петли. В процессе узнавания PAR-1 участвует анионсвязывающий экзосайт 2 тромбина, комплементарный отрицательно заряженному кластеру Y⁵²EPFWEDEE рецептора вблизи расщепляемой тромбином связи [14]. PAR-1 обнаружен на кровяных пластинках, эндотелиальных, гладкомышечных клетках, фибробластах и других клетках. Синтетические пептиды TRAP-14 и его 6-членный N-концевой фрагмент S⁴²FLLRN (TRAP-6) проявляют тромбиноподобное действие на всех названных выше клетках [1, 2, 5].

После открытия расщепляемого тромбинового рецептора (PAR-1) возник вопрос о существовании других рецепторов с подобным механизмом действия. Второй член семейства PAR, именуемый PAR-2, активируется не тромбином, а трипсином и секретируемой тучными клетками триптазой [17–20]. Эти протеиназы расщепляют в PAR-2 мыши связь Arg36-Ser37, а в PAR-2 человека – связь Arg34-Ser35 и освобождают новые N-концевые пептиды SLIGRL и SLIGKV соответственно – агонисты PAR-2. Рецептор PAR-2 продуцируется кератиноцитами, эпителиальными, эндотелиальными и некоторыми формами гладкомышечных клеток [19].

Недавно в лаборатории Коухлин методами генной инженерии выделен и охарактеризован новый тромбиновый рецептор – PAR-3, который продуцируется клетками разных тканей и может опосредовать участие тромбина в воспалительных и пролиферативных процессах [21]. Пептид TFRGAP, агонист рецептора PAR-3, обнажается после расщепления тромбином пептидной связи Lys38-Thr39 в PAR-3.

Существование двух тромбиновых рецепторов (PAR-1 и PAR-3) на клетках, участвующих в репаративных процессах, предполагает важную роль тромбина в стимуляции этих процессов. Однако механизмы рецептор-опосредованных реакций, регулируемых тромбином при заживлении ран, еще не расшифрованы, до последнего времени не

было данных о наличии PAR-1 на тучных клетках. Следует отметить, что характер действия тромбина на клетки может существенно меняться в зависимости от концентрации фермента [10, 22, 23]. Это позволило нам высказать предположение о наличии нескольких рецепторов тромбина на тучных клетках.

Ранее для выяснения структурных основ взаимодействия тромбина с тучными клетками мы исследовали действие на перитонеальные тучные клетки модифицированных форм тромбина: DIP-альфа-тромбина (с сохраненным центром узнавания субстратов и рецепторов, но лишённого протеолитической активности вследствие алкилирования серина активного центра) и протеолитически активного гамма-тромбина (с нарушенной структурой экзосайтов центра узнавания). Используя методы локальной фиксации потенциала (patch-clamp) и измерения внутриклеточного pH (с флуоресцентным pH-чувствительным зондом), мы показали, что как альфа-тромбин, так и DIP-альфа-тромбин вызывают синхронное дозозависимое увеличение емкости и проводимости мембраны тучных клеток, двухфазное изменение внутриклеточного pH и зависимость от протеинкиназы C активацию Na⁺/H⁺-обмена [10, 22]. Гамма-тромбин не активировал Na⁺/H⁺-обмен в тучных клетках. Это позволило сделать заключение, что часть воздействий тромбина на тучные клетки (проявляемых DIP-альфа-тромбином) отражает по существу его гормоноподобную активность. Но оказалось, что протеолитическая активность фермента важна для стимуляции деградации тучных клеток [10, 11]. Эти факты могли бы свидетельствовать о наличии нескольких рецепторов тромбина, в том числе PAR-1, на мембране тучных клеток. И действительно, в последнее время, используя для активации тучных клеток TRAP-6, мы получили доказательства существования на тучных клетках семидоменного рецептора тромбина – PAR-1 [24].

С помощью Ca²⁺-чувствительного флуоресцентного зонда фура-2 [25] мы провели исследование активации тучных клеток альфа-тромбином и пептидом TRAP-6, агонистом PAR-1, имитирующим действие альфа-тромбина на клетки, и обнаружили в обоих случаях повышение внутриклеточной концентрации Ca²⁺. Наблюдаемый эффект был дозозависимым, при этом тромбин проявлял действие в концентрациях на три порядка ниже, чем у TRAP-6 [24]. Поскольку клетки отвечают повышением внутриклеточной концентрации Ca²⁺ на действие агониста рецептора PAR-1, можно заключить, что на тучных клетках существует расщепляемый семидоменный рецептор тромбина.

Вместе с тем существенное различие в эффективных концентрациях тромбина и TRAP-6

указывает на то, что для полноценного ответа клеток на тромбин недостаточно наличия только одного PAR-1. Это свидетельствует в пользу существования на тучных клетках нескольких рецепторов тромбина. Последнее предположение подтверждается приводимыми ниже данными об изменении концентрации cGMP и гистамина в клетках при действии тромбина.

Регуляция секреции клеток может осуществляться cGMP, повышение концентрации которого ведет к стабилизации клетки и уменьшению спонтанной или индуцированной секреции гистамина. Повышение концентрации cGMP в клетке может происходить вследствие активации гуанилатциклазы, в частности окисью азота (NO). NO образуется в клетках в результате окисления гуанидинового азота *L*-Arg в реакциях, катализируемых NO-синтетазами, которые превращают аргинин в *L*-цитруллин и освобождают NO [26]. Возможность существования такого механизма в тучных клетках показана в лаборатории Вэйна [27, 28].

В серии экспериментов мы оценивали влияние тромбина на содержание cGMP в тучных клетках (с помощью иммуноферментного анализа) и на освобождение гистамина этими клетками [10]. Установлено, что тромбин в панолярных концентрациях дозозависимо повышает концентрацию cGMP в клетках; в присутствии метилового эфира нитроаргинина, блокирующего образование NO, повышение концентрации cGMP не происходит. При обработке тучных клеток нитропруссидом натрия (экзогенным источником NO) зарегистрировано повышение концентрации cGMP [10]. Из приведенных данных следует, что низкие концентрации тромбина могут стимулировать образование NO из *L*-аргинина. При низких концентрациях тромбина (повышающих содержание cGMP) мы регистрировали снижение спонтанной секреции гистамина тучными клетками. В микромолярных концентрациях тромбин стимулировал секрецию гистамина [10].

Наши результаты хорошо коррелируют с данными работы [23] о снижении проницаемости монослоя эндотелиальных клеток при действии низких концентраций тромбина, что также может быть обусловлено повышением концентрации cGMP в клетках. Повышение концентрации тромбина приводило к возрастанию проницаемости эндотелиального монослоя [23, 29].

В серии экспериментов нами получены доказательства освобождения NO тучными клетками при действии TRAP-6 [30]. NO регистрировали по снижению индуцированной агрегации кровяных пластинок человека [27]. Тучные клетки, активированные TRAP-6, вызывают резкое снижение индуцируемой агрегации. Вероятно, это обусловлено освобождением NO, так как тучные клетки,

инкубированные с метиловым эфиром нитроаргинина (блокирующим образование NO), не ингибировали индуцируемую агрегацию. Полученные данные по действию TRAP-6 позволяют предполагать, что тромбин в низких концентрациях, взаимодействуя с рецептором PAR-1 на мембране тучных клеток, работает как их регулятор, стабилизируя клетки и проявляя противовоспалительное действие. Тромбин в высоких концентрациях оказывает противовоспалительный эффект, стимулируя освобождение гистамина тучными клетками и повышая проницаемость эндотелия [10, 23].

Тромбин стимулирует пролиферацию клеток эндотелия, фибробластов, активируя неизвестным еще путем митогенактивируемые протеинкиназы, так называемые MAP-киназы, которые стимулируют фосфолипазу A₂ и рост клеток [31]. В процессе активации MAP-киназ вовлекается Ras-зависимая активация raf-киназ. В структуре Ras-родственного белка человека (RAB-3B) компьютерным анализом с помощью пакета программ Genebee выявлен фрагмент S³⁷FLLRYADDTFTP, абсолютно идентичный N-концевому фрагменту TRAP-6 [32]. Имеет ли эта гомология значение при интернализации расщепленного рецептора PAR-1 тромбина, покажут дальнейшие исследования.

Неоднократно предпринимались попытки использовать тромбин и его пептидные фрагменты как факторы роста при заживлении ран [7, 33]. Применение тромбина ограничено из-за его высокой лабильности и противовоспалительного эффекта высоких концентраций. В настоящее время за рубежом нашли широкое применение в качестве гемостатического и ранозаживляющего средства так называемые сиаланты, или фибриновый клей, который представляет собой сгусток фибрина, образуемый непосредственно на поверхности раны при ее обработке свежеприготовленной смесью растворов фибриногена и тромбина (в присутствии ионов кальция, адгезивных белков и ингибиторов фибринолиза) [34, 35]. Препараты фибринового клея очень дорогие, поскольку требуют тщательной очистки. Нами проведено исследование влияния иммобилизованного тромбина на процессе заживления экспериментальных ран у крыс. Для этого был разработан метод включения тромбина в полимерный композиционный поли-N-винилкапролактан-Са-альгинатный (ПВК-Са-Alg) гидрогель [36]. Иммобилизованный тромбин сохранял 30–50% исходной активности. Исследование динамики заживления ран у крыс показало, что размер ран у крыс опытной группы, которым апплицировали гидрогелевые пленки с тромбином, уменьшался быстрее, чем у животных двух контрольных групп с апплицированной пленкой без тромбина и с открытой раной. С помощью анализа меченных [³H]тимидином образцов грануляционной ткани, взятой в разные сроки после операции животных, показана

но возрастание в тканях животных опытной группы числа пролиферирующих фибробластов. У опытных животных отмечали также возрастание (на 30%) числа микрососудов, что свидетельствует об усилении неоваскуляризации в грануляционной ткани.

В опытах с TRAP-6 на модели заживления ран у крыс показано, что агонист PAR-1 так же, как и тромбин, сорбированный в гидрогелевые пленки, может ускорять заживление ран. Наблюдали сокращение размеров ран у крыс опытной группы уже на 3-и сутки опыта по сравнению с контрольной группой. Анализ образцов грануляционной ткани с тритиевой меткой выявил повышение общего числа фибробластов и пролиферирующих клеток в те же сроки опыта. Мы предполагаем, что тромбин или агонист его рецептора – TRAP-6, взаимодействуя с клетками в очаге заживления, могут ускорять процессы репарации тканей. Кроме того, в предварительных экспериментах установлено, что пептид SLIGRL, агонист рецептора PAR-2, исследованный в той же модели заживления ран, также вызывал уменьшение площади раны и повышение числа пролиферирующих клеток.

Наши результаты коррелируют с данными о стимуляции с помощью TRAP митогенеза фибробластов хомяка линии CCL-39 [37], о чем судили по включению меченого тимидина. При этом митогенное действие TRAP усиливалось при добавлении 14-членного фрагмента центра узнавания в тромбине, проявляющего хемотактическую активность, что подтверждает гипотезу о существовании нескольких рецепторов тромбина на клетках. Вместе с тем существует точка зрения, что протеолитическое действие тромбина, эффекты TRAP и гормоноподобное действие фрагмента центра узнавания в тромбине опосредуются одним и тем же рецептором тромбина – PAR-1. Предположение базируется на данных об ингибировании олигонуклеотидным антисенсом к PAR-1 стимуляции пролиферации эндотелиальных клеток пупочной вены человека, вызываемой тромбином, TRAP и фрагментом тромбина. Хотя последний вызывает не все ответы этих эндотелиальных клеток на тромбин [38]. Кроме того, с помощью агониста PAR-2 показано участие этого триптазного и трипсинового рецептора в митогенезе эндотелиальных клеток [39].

Суммируя полученные данные, можно сделать заключение, что тромбин, взаимодействуя с рецепторами семейства PAR в очаге повреждения ткани, участвует в модуляции репаративных процессов. Установлено, что тучные клетки отвечают повышением внутриклеточной концентрации Ca^{2+} на действие TRAP и альфа-тромбина. В то же время TRAP может регулировать дегрануляцию тучных клеток, освобождая NO. Именно NO, ви-

димо, отвечает за повышение концентрации cGMP в клетках, активированных низкими концентрациями альфа-тромбина, стабилизацию клеток и снижение дегрануляции. Активация тромбином тучных клеток, так же как и клеток эндотелия, включает реакции, опосредованные несколькими рецепторами, среди которых, несомненно, присутствует PAR-1. TRAP-6, синтетический агонист PAR-1, воспроизводит действие тромбина на клетки, при этом требуются концентрации TRAP, на несколько порядков превышающие концентрацию тромбина. Мы полагаем, что как PAR-1, активируемый преимущественно тромбином, так и PAR-2, активируемый триптазой тучных клеток и трипсином, по-видимому, включаются в процесс заживления ран. Поэтому инкапсулированные формы тромбина и пептидов, агонистов PAR-1, PAR-2 и, возможно, PAR-3, могут быть перспективными средствами для заживления ран.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Струкова С.М., Куреева Е.Г. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биология. 1995. С. 3–13.
2. Струкова С.М., Куреева Е.Г., Дугина Т.Н. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биология. 1997. С. 8–16.
3. Fenton J.W. II. // *Thromb. Haemostasis*. 1995. V. 74. P. 493–498.
4. McNamara C., Saremback I., Bachhuber B., Staffer G., Ragosta M., Barry W., Gimple L., Powers E., Owen G. // *Thromb. Haemostasis*. 1996. V. 22. P. 139–144.
5. Van Obberghen-Schilling E., Vouret-Craviari V., Chen Y.-H., Grall D., Chambard L.-C., Pouyssegur J. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1995. V. 166. P. 431–441.
6. Glusa E., Paintz M., Bretschneider E. // *Semin. Thromb. Hemost.* 1996. V. 22. P. 261–266.
7. Carney D.H., Redin W., McCroskey L. // *Semin. Thromb. Hemost.* 1992. V. 18. P. 91–103.
8. Baghessian M., Hofbauer R., Kress H. // *Thromb. Haemostasis*. 1997. V. 77. P. 577–584.
9. Умарова Б.А., Хлгатиан С.В., Струкова С.М. // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1989. Т. 107. С. 131–133.
10. Strukova S.M., Dugina T.N., Khlgtian S.V., Redkozuhov A.E., Redkozuhova G.P., Pinelis V.G. // *Semin. Thromb. Hemost.* 1996. V. 22. P. 145–150.
11. Rarin E., Marx G. // *J. Immunol.* 1984. V. 133. P. 3282–3285.
12. Lindahl U., Peiler G., Bozgwald J., Seljelid R. // *Arch. Biochem. Biophys.* 1989. V. 273. P. 180–188.
13. Струкова С.М., Серейская А.А., Осадчук Т.В. // Успехи соврем. биологии. 1989. Т. 107. С. 41–54.
14. Vu T.-K., Hung D., Wheaton V., Coughlin S. // *Cell*. 1991. V. 64. P. 1057–1068.
15. Rasmussen U., Vouret-Craviari V., Jallot S., Schlesinger Y., Pages G., Parirani A., Lecocq J.-P., Pouyssegur J., Van Obberghen-Schilling E. // *FEBS Lett.* 1991. V. 288. P. 123–128.
16. Авдонин П.В., Ткачук В.А. Рецепторы и внутриклеточный кальций. М.: Наука, 1994.

17. Nystedt S., Emilsson K., Wahlestedt C., Sundelin J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. V. 91. P. 9208–9212.
18. Nystedt S., Larsson A., Aberg H., Sundelin J. // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. P. 5950–5955.
19. Nystedt S., Emilsson K., Larsson A. // Eur. J. Biochem. 1995. V. 232. P. 84–89.
20. Molino M., Barnathan E., Numerof R., Clark J., Dreyer M., Cumashi A., Hoxie J., Schechter N., Woolkalis M., Brass L. // J. Biol. Chem. 1997. V. 272. P. 4043–4049.
21. Ishihara H., Connolly A., Zeng D., Kahan M., Zheg Y., Timmons C., Tram T., Coughlin S. // Nature. 1997. V. 386. P. 502–506.
22. Струкова С.М., Хлагатян С.В., Пинелис В.Г., Дугина Т.Н., Кудинов Ю.В., Марков Х.М., Вржец В.М. // Биохимия. 1992. Т. 57. С. 927–936.
23. DeMichele M., Minnear F. // Semin. Thromb. Hemost. 1992. V. 18. P. 287–295.
24. Strukova S., Dugina T., Khlgtian S. // Thromb. Haemostasis. 1997. Suppl. P. 345.
25. Gryniewicz G., Poenie M., Tsien R.Y. // J. Biol. Chem. 1985. V. 260. P. 3440–3450.
26. Moncada S. // Acta Physiol. Scand. 1992. V. 145. P. 201–227.
27. Salvemini D., Masini E., Anggard E., Mannaioni P.F., Vane J. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1990. V. 169. P. 596–601.
28. Masini E., Mannaioni P.F., Pistelli A., Salvemini D., Vane J. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1991. V. 177. P. 1178–1182.
29. Garcia J., Verin A., Schaphorst K. // Semin. Thromb. Hemost. 1996. V. 22. P. 309–315.
30. Strukova S., Chistov I., Dugina T., Umarova B., Storod-gevikh T., Pinelis V., Glusa E. // Atherosclerosis. 1997. V. 134. P. 227.
31. Brass L. // Thromb. Haemostasis. 1995. V. 74. P. 499–505.
32. Strukova S., Dugina T., Rakhmanov S., Brodskiy L. // Fibrinolysis. 1996. V. 22. Suppl. 3. P. 166.
33. Stiernberg J., Redin W., Warner W., Carney D. // Thromb. Haemostasis. 1993. V. 70. P. 158–162.
34. Brennan M. // Blood Rev. 1992. V. 5. P. 240–244.
35. Spotnitz W. // Thromb. Haemostasis. 1995. V. 74. P. 482–485.
36. Markvicheva E., Tkachuk N., Kuptsova S., Dugina T., Strukova S., Kirsh Y., Zubov V., Rumsh L. // Appl. Biochem. Biotechnol. 1996. V. 61. P. 75–84.
37. Hollenberg M., Mokashi S., LebLond L., DiMaio J. // J. Cell Physiol. 1996. V. 169. P. 491–496.
38. Schaeffer P., Riera E., Dupuy E., Herbert J.-M. // Biochem. Pharmacol. 1997. V. 53. P. 487–491.
39. Mirza H., Yatzula V., Bahou W. // J. Clin. Invest. 1996. V. 97. P. 1705–1714.

Thrombin, a Regulator of Reparation Processes in Wound Healing

S. M. Strukova*, T. N. Dugina*, I. V. Chistov*, E. A. Markvicheva, S. V. Kuptsova**,
E. G. Kolokol'chikova***, L. D. Rumsh**, V. P. Zubov**, and E. Gluza******

*Department of Human and Animal Physiology, Moscow State University, Vorob'evy gory, Moscow, 119899 Russia

**Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia

***Vishnevskii Institute of Surgery, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

****Center of Vascular Biology and Medicine, Friedrich Schiller University, Erfurt, Germany

Thrombin, binding to receptors of the protease activated receptor (PAR) family, is involved in wound healing by inducing the reparation processes and regulating the activity of mast cells, which secrete mediators of inflammation. Using thrombin receptor agonist peptide (TRAP-6) for the activation of rat mast cells, effect of several receptors, including PAR-1, on mast cells was demonstrated. It was shown that TRAP increases the concentration of Ca^{2+} in the cytoplasm of mast cells and regulates cell degranulation, while releasing nitrogen oxide. Thrombin encapsulated in poly(N-vinyl caprolactam)–calcium alginate (PVCL–Ca–Alg) hydrogel films promotes wound healing in rats as demonstrated by the acceleration of fibroblast proliferation and neovascularization.

Key words: thrombin, receptor, peptide, mast cells, wound healing