

А.В. Бакунович, О.Д. Бичан, А.А. Криволап, Сидоренко В.Н., Лобанок Л.М., Буланова К.Я.
Изменение кальциевого гомеостаза в тромбоцитах беременных женщин с преэклампсией.//
Материалы VIII Международной научно-практической конференции "Артериальная гипертензия и
профилактика сердечно-сосудистых заболеваний", ВГМУ, Витебск, 21-22 мая 2015 года.
Кардиология в Беларуси (приложение). 2015г. С. 29-31.

АРТЕРИАЛЬНАЯ ГИПЕРТЕНЗИЯ И
ПРОФИЛАКТИКА СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ
ЗАБОЛЕВАНИЙ
ARTERIAL HYPERTENSION AND
CARDIOVASCULAR DISEASE
PREVENTION
VIII МЕЖДУНАРОДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ
VIII INTERNATIONAL CONFERENCE
VITEBSK
2015

2
MINISTRY OF HEALTH OF THE REPUBLIC OF BELRUS
VITEBSK STATE MEDICAL UNIVERSITY
BELARUSIAN HYPERTENSION SOCIETY
**ARTERIAL HYPERTENSION AND
CARDIOVASCULAR DISEASE
PREVENTION**
VIII International Conference
Abstracts
21-22 May 2015
VITEBSK
2015

ИЗМЕНЕНИЕ КАЛЬЦИЕВОГО ГОМЕОСТАЗА В ТРОМБОЦИТАХ БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН С ПРЕЭКЛАМПСИЕЙ

Бакунович А.В.¹, Бичан О.Д.², Криволап А.А.², Сидоренко В.Н.³, Лобанок Л.М.³, Буланова К.Я.¹

¹Международный государственный экологический университет имени А.Д. Сахарова,

Минск, Беларусь

²Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

³Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

Введение

Ионы кальция являются важным внутриклеточным регулятором, и повышение их концентрации в цитоплазме играет ключевую роль в определении функциональной активности тромбоцитов. При преэклампсии у беременных женщин возникающая повышенная агрегационная активность тромбоцитов может вызвать компенсаторное снижение их числа. Затяжные процессы в снижении числа тромбоцитов способны привести к процессам декомпенсации, развитию HELLP-синдрома: жизненно несовместимому падению числа тромбоцитов, снижению агрегационной способности тромбоцитов, приводящих к трудно устранимым кровопотерям [1]. Исследование молекулярных механизмов повышенной агрегационной способности тромбоцитов является необходимым этапом для решения проблем лечения и профилактики гестоза. Агрегационная активность тромбоцитов напрямую связана с повышенным уровнем цитоплазматического кальция, активацией кальмодулина и зависящих от него процессов. В настоящее время показано, что при выраженных симптомах преэклампсии у беременных женщин происходит изменение Ca^{2+} -метаболизма и увеличение внутриклеточной концентрации ионов $[Ca^{2+}]_i$ в эритроцитах, лимфоцитах. Данные о состоянии кальциевого обмена в тромбоцитах достаточно противоречивы. Одни исследователи обнаруживают повышение базального уровня внутриклеточных ионов Ca^{2+} в тромбоцитах у беременных женщин с преэклампсией по сравнению с женщинами с неосложненной беременностью. При этом отмечалась нормализация базального уровня внутриклеточных ионов Ca^{2+} через 6-7 недель после родов. По данным других авторов достоверных различий в уровне цитоплазматического Ca^{2+} альцияк

в тромбоцитах беременных женщин с преэклампсией и с физиологически протекающей беременностью не было выявлено. Также остаются до конца не изученными механизмы регуляции внутриклеточной концентрации ионов и Ca^{2+} -гомеостаза у беременных женщин с преэклампсией. Целью настоящей работы явилось исследование базального уровня цитоплазматических ионов кальция и состояния пассивного и активного его выхода из внутриклеточных депо тромбоцитов у беременных женщин с преэклампсией.

Материалы и методы

Объектом исследования служили тромбоциты крови здоровых беременных женщин, составивших контрольную группу (20 пациенток) и беременных с установленным на 37-39 неделе беременности диагнозом преэклампсии (13 пациенток). Забор крови у пациенток проводили в клинических условиях при обязательном контроле отсутствия в течение месяца приема препаратов, влияющих на агрегацию тромбоцитов. Кровь стабилизировали 3,8% раствором цитрата натрия (9:1 по объему). Внутриклеточную концентрацию ионов кальция в тромбоцитах определяли флуоресцентным методом с использованием кальциевого зонда фура 2-АМ (2 мкмоль/л) на спектрофлуориметре СМ2203 («Солар», Беларусь) [2]. Интенсивность флуоресценции фуры 2-АМ и кинетику изменения флуоресценции регистрировали при 30

длине волны 510 нм и возбуждении при 340 нм и 380 нм. Концентрацию цитоплазматического кальция определяли согласно [3].

Результаты

Находясь в неактивном (покоящемся) состоянии тромбоциты не способны взаимодействовать друг с другом и другими клетками. Агрегант-индуцированный переход тромбоцитов из состояния покоя в активированное состояние происходит посредством Ca^{2+} -сигнализации. В неактивированных тромбоцитах концентрация свободных ионов Ca^{2+} в цитозоле поддерживается на уровне 50-70 нМоль. В настоящее время показано, что гиперактивность тромбоцитов при ряде патологий (гипертония, сахарный диабет и др.) связана с повышением уровня ионов Ca^{2+} в цитозоле. Нами получено, что базальный уровень ионов кальция был выше в группе женщин с преэклампсией ($2882,1 \pm 4,2$) нМоль по сравнению с контрольной группой ($60,6 \pm 3,5$) нМоль. При активации в тромбоцитах увеличение внутриклеточной концентрации свободных ионов Ca^{2+} происходит за счет их выброса из внутриклеточных депо входа снаружи через плазматическую мембрану. В настоящее время, методический прием с использованием бескальциевой среды, в которую добавляют 100 мкМоль ЭГТА для связывания примесных двухвалентных катионов, широко используется для определения вклада каждого из компонентов. В покоящихся тромбоцитах уровень внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} всегда меньше, чем в тромбоцитах, находящихся в Ca^{2+} -содержащей среде. Исследования внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} при помещении тромбоцитов в бескальциевую среду показали, что базальный уровень свободных ионов кальция в покоящихся тромбоцитах беременных женщин с преэклампсией, достоверно не отличался от такового у беременных женщин с физиологически протекающей беременностью ($31,1 \pm 7,4$) нМоль и ($27,6 \pm 2,3$) нМоль, соответственно.

При действии иономицина (50 нМоль) в присутствии тапсигаргина (1 мкМоль), являющегося ингибитором Ca^{2+} -АТФазы эндоплазматического ретикулаума, концентрация ионов кальция в цитоплазме тромбоцитов, суспендированных в бескальциевой среде, здоровых беременных женщин и с преэклампсией, увеличивалась достигая равных, максимальных значений ($592,1 \pm 67,5$) нМоль и ($584,4 \pm 49,2$) нМоль, соответственно. Поскольку при действии иономицина в присутствии тапсигаргина происходит полное опустошение кальциевых депо тромбоцитов, то полученные данные свидетельствуют о том, что количество цитоплазматического Ca^{2+} , аккумулированного во внутриклеточных пулах тромбоцитов, для обеих исследуемых групп было одинаковым. К 5 минуте концентрация $[Ca^{2+}]_i$ в тромбоцитах здоровых беременных и с преэклампсией уменьшилась по сравнению с исходными максимальными значениями до разных уровней: ($84,5 \pm 6,8$) нМоль и ($101,2 \pm 13,9,7$) нМоль, соответственно, свидетельствуя о том, что скорость снижения уровня мобилизованного кальция в цитоплазме за счет его удаления Ca^{2+} -транспортными _____ системами плазматической мембраны, была значительно ниже в группе беременных женщин с преэклампсией по сравнению с контрольной группой. Полученные данные позволяют предположить, что в тромбоцитах беременных женщин с преэклампсией нарушены процессы, регулирующие скорость экстррузии ионов Са

Известно, что в тромбоцитах основной вклад в поддержание низкой концентрации цитоплазматического кальция вносят Ca^{2+} -АТФазы плазматической мембраны и эндоплазматического ретикулаума (ЭР). В условиях ингибирования Ca^{2+} -АТФазы плазматической мембраны снижение уровня мобилизованных ионов Ca^{2+} в цитозоле до базального способны обеспечить Ca^{2+} -АТФазы ЭР. Как известно, в тубулярной системе тромбоцитов, аналогичной эндоплазматическому ретикулуму других клеток, экспрессируется две изоформы Ca^{2+} -АТФазы (SERCA2b и SERCA3) [4, 31

5]. Специфическим ингибитором изоформы SERCA2b Ca^{2+} -АТФазы является тапсигаргин (ТГ). SERCA3 обладает низкой чувствительностью к тапсигаргину, но высокой к 2,5-ди-(терт-бутил)-1,4-гидрохинону (tBHQ) [4]. Добавление ТГ в низкой концентрацией (10 нМоль) приводит к росту концентрации $[Ca^{2+}]_i$ из-за выхода ионов

кальция из плотной тубулярной системы. Концентрация ионов кальция после добавления ТГ был существенно выше у пациенток с преэклампсией ($156,5 \pm 23,2$) нМоль, чем в контрольной группе ($94,1 \pm 7,1$) нМоль. Аналогичные результаты были нами получены при изучении высвобождения ионов кальция из кислотных депо с использованием tBHQ (20 мкМоль), который является ингибитором SERCA3 в тромбоцитах. После добавления tBHQ максимальная концентрация высвободившихся ионов кальция в группе с преэклампсией была ($238,8 \pm 19,4$) нМоль и ($116,8 \pm 12,8$) нМоль в контрольной группе. Полученные данные позволяют предположить, что в тромбоцитах беременных женщин с преэклампсией нарушены процессы, регулирующие снижение уровня мобилизованных ионов Ca^{2+} в цитозоле. Активация тромбоцитов физиологическим индуктором агрегации – АДФ в бескальциевой среде вызывает быстрое поступление в цитоплазму ионов кальция, достигающее более высоких значений у женщин с преэклампсией ($171,8 \pm 27,6$) нмоль/л, по сравнению с контрольной группой ($145,1 \pm 19,7$) нмоль/л. Полученный результат свидетельствует, что агонист-индуцированное высвобождение ионов кальция из внутриклеточных депо, выше у беременных женщин с преэклампсией.

Выводы

Результаты настоящей работы свидетельствуют об изменении процессов регулирования Ca^{2+} -гомеостаза в тромбоцитах беременных женщин с преэклампсией, которое может быть связано с развитием повышенной агрегационной активностью тромбоцитов при данной патологии.

Литература

1. Change in platelet count predicts eventual maternal outcome with syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes and low platelet count / B. Renhart [et al.] // J. Matern. Fetal Med. – 2001. – Vol. 10, № 1 – P. 29–34.
2. Лойко, Е.Н. Влияние H_2O_2 на АДФ-индуцированную агрегацию и Ca^{2+} -ответ тромбоцитов и дезагрегация тромбоцитов / Е.Н. Лойко, А.Б. Самаль // Весці НАН Беларусі. Сер. мед. – біял. навук. – 2003. – № 4. – С. 80–83.
3. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties / G. Grynkiewicz [et al.] // J. Biol. Chem. – 1985. – Vol. 260, № 6. – P. 3440–3450.
4. Cavallini, L. Two classes of agonist-sensitive Ca^{2+} stores in platelets, as identified by their differential sensitivity to 2,5-di-(tert-butyl)-1,4-benzohydroquinone and thapsigargin / L. Cavallini, M. Coassin, A. Alexandre // J. Biochem. – 1995. – Vol. 2. – P. 449–452.
5. Demonstration of two forms of calcium pumps by thapsigargin inhibition and radioimmunoblotting in platelet membrane vesicles / B. Papp [et al.] // J. Biol. Chem. – 1991. – Vol. 266 – P. 14593–14596.
6. Relationship between blood pressure and smooth muscle tone in aortae of hypertensive rats: roles of $[Ca^{2+}]$ / Sasaki F [et al.] // J. Smooth Muscle Res. – 1993. – Vol. 29, № 3. – P. 69–79.