

## ИЗМЕНЕНИЕ КАЛЬЦИЕВОГО ОБМЕНА В ТРОМБОЦИТАХ КРЫС В БЛИЖАЙШИЕ СРОКИ ПОСЛЕ ОБЛУЧЕНИЯ В ДОЗЕ 1 ГР

О. Г. Пархимович, О. Д. Бичан, Т. И. Милевич, К. Я. Буланова,  
Л. М. Лобанок

*Учреждение образования «Международный государственный экологический институт им. А.Д.Сахарова» Белгосуниверситета,  
Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь,  
ГНУ «Институт радиобиологии НАН Беларуси, Гомель, Беларусь,  
bulanova\_home@tut.by*

**Введение.** Современная экологическая физиология и медицина нуждается в использовании новых методов выявления молекулярных маркеров действия ионизирующих излучений в малых дозах, пригодных для широких эпидемиологических исследований, позволяющих избирательно подходить к выбору способов повышения устойчивости организмов, проживающих на территориях, загрязненных радионуклидами.

Кровь относится к одной из наиболее чувствительных систем к действию ионизирующей радиации. Система крови функционально объединяет другие физиологические системы организма, поддерживая постоянство внутренней среды и обеспечивая обмен веществ между тканями и клетками. Важно отметить, что первичные нарушения, возникающие в системе крови, способны привести к последующим изменениям функций ряда органов, что позволяет использовать параметры крови для диагностики пред- и патологических состояний [1]. Поскольку заболевания сердечно-сосудистой системы являются наиболее часто встречающимися последствиями облучения ионизирующей радиацией, то изучение элементов крови и состояния их функций, позволяющих выявлять предпатологические состояния организма, представляет актуальную задачу.

Тромбоциты являются безъядерными форменными элементами крови, основная функция, которых – это участие в процессе гемостаза. Повышение агрегационной активности тромбоцитов является основой внутри сосудистого тромбообразования, выявляемого при инфаркте миокарда, атеросклерозе, хронической ишемической болезни сердца, гипертонической болезни, нарушениях мозгового кровообращения. Снижение агрегационной способности, если не является следствием врожденной патологии тромбоцитов, может свидетельствовать о тромбоцитопатии, характерной при лейкозах, уремии, заболеваниях печени, диссеминированном внутрисосудистом свертывании, при действии антитромбоцитарных антител, иммунных комплексов, некоторых лекарственных средств.

Указанные нарушения агрегационной способности тромбоцитов также могут провоцироваться воздействием ряда факторов риска, в том числе, и ионизирующей радиации и увеличивать риск возникновения патологических состояний организма.

В механизмах повышения и уменьшения агрегационной способности тромбоцитов ведущая роль принадлежит увеличению либо, соответственно, снижению в цитоплазме концентрации свободных катионов кальция.

Целью исследования является изучение особенностей изменений механизмов кальциевого обмена в тромбоцитах крыс на 3 сутки после облучения в дозе 1 Гр.

**Материалы и методы.** Объект исследования – тромбоциты крыс. Животных облучали на гамма-установке «ИГУР» в дозе 1 Гр (мощность дозы 0,62 Гр/мин, в течение 2 мин).

**Получение обогащенной тромбоцитами плазмы.** Обогащенную тромбоцитами плазму (ОТП) получали центрифугированием при 700 g в течении 5 минут. Затем ОТП центрифугировали (745 g, 8 мин), тромбоциты ресуспендировали в *HEPES-буфер без  $Ca^{2+}$*  (рН 6,5), еще раз центрифугировали (745g, 8 мин). После осаждения тромбоциты ресуспендировали *HEPES-буфере без  $Ca^{2+}$*  (рН 7,4) следующего состава:

*HEPES-буфер без  $Ca^{2+}$*  (10 ммоль/л HEPES, 140 ммоль/л NaCl, 5 ммоль/л KCl, 5 ммоль/л  $KH_2PO_4$ , 1 ммоль/л  $MgSO_4$ , 5 ммоль/л D-глюкозы, рН 6,5); *HEPES-буфер с  $Ca^{2+}$*  (10 ммоль/л HEPES, 140 ммоль/л NaCl, 5 ммоль/л KCl, 5 ммоль/л  $KH_2PO_4$ , 1 ммоль/л  $MgSO_4$ , 5 ммоль/л D-глюкозы, 1 ммоль/л  $CaCl_2$ , рН 7,4).

**Количественное определение ионов кальция в тромбоцитах.** Для количественного определения концентрации кальция в тромбоцитах использовали флуоресцентный зонд Fura-2/AM [2]. Полученные тромбоциты инкубировали с Fura-2/AM (конечная концентрация 2,5 мкмоль/л). Тромбоциты осаждали центрифугированием при 745g, 8 мин. Отмытые тромбоциты суспендировали в *HEPES-буфер без  $Ca^{2+}$*  (рН 7,4) и доводили концентрацию клеток до  $2.5 \cdot 10^9$  кл/мл. Исследование кинетики изменения интенсивности флуоресценции нагруженных Fura-2/AM тромбоцитов проводили на длине волны 510 нм при длинах волн возбуждения 340 нм и 380 нм с использованием спектрофлуориметра СМ 2203 «СОЛАР» (Минск, Беларусь). Концентрация  $Ca^{2+}$  рассчитывается на основе измерения флуоресценции при возбуждении этими двумя длинами волн по формуле:

$$[Ca^{2+}] = K_d \frac{R_{\max 380} F - F_{\min}}{R_{\min 380} F_{\max} - F}, \quad (1)$$

где  $K_d$  – константа диссоциации комплекса Fura-2/AM с кальцием;  $F = \frac{R_{340}}{R_{380}}$  – текущее отношение флуоресцентных сигналов;  $F_{\min}$  – то же отношение в растворе с низкой концентрацией  $Ca^{2+}$ ;  $F_{\max}$  – то же отношение в растворе с высокой концентрацией  $Ca^{2+}$  (max и min при добавлении тритона (10%) и ЭГТА (100 мкмоль/л) соответственно).  $K_d$  равняется 224 нмоль/л.

**Результаты и их обсуждение.** В тромбоцитах крыс на 3-и сутки после облучения регистрировали увеличение базального уровня ионов кальция как в бескальциевой (100 мкМ ЭГТА), так и в кальций-содержащей среде (1 мМ).

**Таблица 1 – Изменение базального уровня ионов кальция в цитоплазме тромбоцитов после облучения животных в дозе 1 Гр**

	Контроль нмоль $Ca^{2+}$ /л	После облучения нмоль $Ca^{2+}$ /л
Базальный уровень кальция (100 мкмоль/л ЭГТА)	44,2±4,6	85,9±5,2*
Базальный уровень кальция (1 ммоль/л $CaCl_2$ )	74,9±11,8	181,7±0,5*

Примечание: различия достоверны по отношению к контролю ( $p > 0,05$ ).

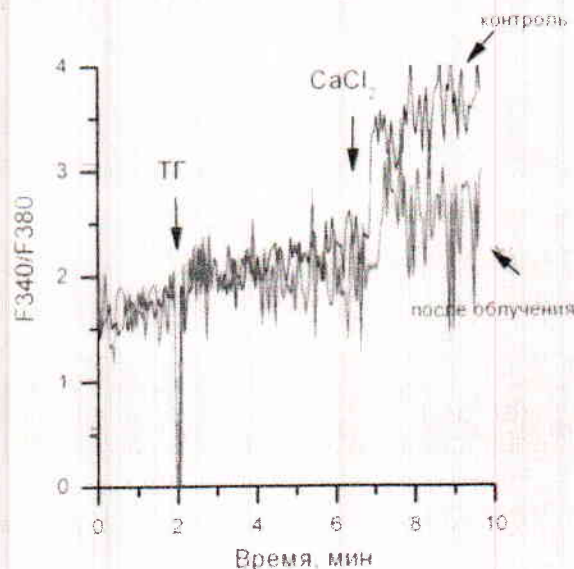
В ответ на действие физиологических индукторов агрегации тромбоцитов – АДФ (20 мкМ) и тромбин (0,2 ед/мл) в присутствии 1 мМСаCl<sub>2</sub>, также регистрировали увеличение концентрации ионов кальция в тромбоцитах облученных крыс.

**Таблица 2 – Изменение поступления ионов кальция в цитоплазму тромбоцитов облученных крыс при действии индукторов агрегации**

Индуктор агрегации	Контроль, нмоль Са <sup>2+</sup> /л	После облучения, нмоль Са <sup>2+</sup> /л
АДФ	111,4±5,8	289,5±11,7*
Тромбин	383,2±15,2	561,9±12,1*

Примечание: различия достоверны по отношению к контролю (p > 0,05).

При действии иономицина (50 нмоль/л) [3] в присутствии тапсигаргина (ТГ, 1 мкмоль/л), являющегося ингибитором Са<sup>2+</sup>-АТФазы эндоплазматического ретикулула, концентрация ионов кальция в цитоплазме тромбоцитов, суспендированных в бескальциевой среде в контрольной группе была ниже, чем в тромбоцитах облученных крыс (498,5 нмоль/л и 657,3 нмоль/л, соответственно). Поскольку при действии иономицина в присутствии ТГ происходит полное опустошение кальциевых депо тромбоцитов, то полученные данные свидетельствуют о том, что количество цитоплазматического Са<sup>2+</sup>, аккумулированного во внутриклеточных пулах тромбоцитов облученных крыс выше, чем в контрольной группе.



**Рисунок – Особенности изменения притока ионов кальция в цитоплазму тромбоцитов в присутствии тапсигаргина после облучения крыс в дозе 1 Гр**

Обнаружено, что в контроле добавление 10 нмоль/л ТГ приводит к более интенсивному росту концентрации [Са<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> из-за выхода ионов кальция из плотной тубулярной системы. Полученные результаты представлены на рисунке.

**Вывод.** На 3 сутки после облучения в дозе 1 Гр обнаружены изменения обмена ионов кальция в тромбоцитах, заключающиеся в увеличении уровня цитозольного кальция при различных функциональных состояниях кровяных пластинок: в отсутствии стимуляции и в присутствии стимуляторов или ингибиторов его обмена.

1. Выявлено увеличение базального уровня ионов кальция в тромбоцитах облученных крыс как в бескальциевой (100 мкМ ЭГТА), так и в кальций-содержащей среде (1 мМ),

2. В ответ на действие физиологических индукторов агрегации тромбоцитов – АДФ (20 мкМ) и тромбин (0,2 ед/мл) в присутствии 1 мМ  $\text{CaCl}_2$ , также регистрировали увеличение концентрации ионов кальция в тромбоцитах облученных крыс в 2,3 и 1,5 раза, соответственно, по сравнению этими же клетками необлученных животных.

3. При действии иономицина (50 нмоль/л) в присутствии тапсигаргина (ТГ, 1 мкмоль/л), являющегося ингибитором  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы эндоплазматического ретикулума, концентрация ионов кальция в цитоплазме тромбоцитов, суспендированных в бескальциевой среде в контрольной группе была ниже, составляя 498,5 нмоль/л, чем в тромбоцитах облученных крыс, где превышение доходило до 657,3 нмоль/л.

Полученные данные свидетельствует о рассогласованности в постлучевой период механизмов, регулирующих приток и отток этих ионов в цитоплазму через наружную мембрану и мембраны внутриклеточных депонирующих органелл. Постлучевые изменения регуляции кальциевых потоков в тромбоцитах, приводящие к повышенному уровню накопления ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме, могут явиться основой для инициации радиационноиндуцированного апоптоза. Изучение нарушений трансмембранных механизмов пассивного и активного переноса ионов кальция позволит определить пути целенаправленной коррекции начальных стадий нарушений в облученном организме.

### Литература

1. Методы исследования и клиническое значение агрегации тромбоцитов. Фокус на спонтанную агрегацию / В. И. Козловский, О. П. Сероухова, И. Н. Детковская и др. // Вестник ВГМУ. – 2013. – № 4. – С. 79–91.

2. Grinkiewicz, G. Poenie, M. Tsien, R.Y. A new generation of  $\text{Ca}^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties // Biological Chemists. – 1985. – Vol.260. – N 6. – P.3440–3450.

3. Calcium signaling in human platelet aggregation mediated by platelet activating factor and calcium ionophore / H. Rasheed, A. H. Tirmizi [at al] // Journal of biological sciences. – 2004. – № 4 (2). – P. 117–121.