
КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ И ФИЗИОЛОГИЯ

CELL BIOLOGY AND PHYSIOLOGY

УДК 57.043

ПОСТЛУЧЕВЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО КАЛЬЦИЯ В ТРОМБОЦИТАХ, АКТИВИРОВАННЫХ АДФ И ТРОМБИНОМ

О. Г. ПАРХИМОВИЧ¹⁾, О. Д. БИЧАН²⁾, К. Я. БУЛАНОВА¹⁾

¹⁾Международный государственный экологический институт им. А. Д. Сахарова БГУ,
ул. Долгобродская, 23/1, 220070, г. Минск, Беларусь

²⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

В ближайшие сроки после облучения в дозе 1 Гр (3-и, 10-е и 30-е сутки) в тромбоцитах отмечается повышенный по сравнению с контрольными значениями базальный уровень ионов кальция в цитоплазме как при наличии, так и при отсутствии ионов кальция во внешней среде. При действии АДФ (20 мкмоль/л) и тромбина (0,02 ЕД/мл) в аналогичных условиях происходит увеличение концентрации ионов кальция в цитоплазме тромбоцитов в постлучевой период. Максимально выраженные радиационно-индуцированные изменения в содержании цитоплазматического кальция в покоящихся и активированных тромбоцитах наблюдаются на 3-и сутки постлучевого периода.

Образец цитирования:

Пархимович ОГ, Бичан ОД, Буланова КЯ. Постлучевые изменения концентрации цитоплазматического кальция в тромбоцитах, активированных АДФ и тромбином. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2023;1:4–13. <https://doi.org/10.33581/2957-5060-2023-1-4-13>

For citation:

Parkhimovich OG, Bichan OD, Bulanova KYa. Post-radiation changes of cytoplasmatic calcium concentration in platelets activated by ADP and thrombin. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2023;1:4–13. Russian. <https://doi.org/10.33581/2957-5060-2023-1-4-13>

Авторы:

Ольга Георгиевна Пархимович – преподаватель кафедры экологической химии и биохимии факультета экологической медицины.

Ольга Дмитриевна Бичан – заведующий учебной лабораторией физического факультета.

Клавдия Яковлевна Буланова – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры экологической химии и биохимии факультета экологической медицины.

Authors:

Olga G. Parkhimovich, lecturer at the department of environmental chemistry and biochemistry, faculty of environmental medicine.

olga_parkhimovich@mail.ru

Olga D. Bichan, head of the educational laboratory, faculty of physics.

bichan@bsu.by

Klavdiya Ya. Bulanova, PhD (biology), docent; associate professor at the department of environmental chemistry and biochemistry, faculty of environmental medicine.

bulanova_home@tut.by

Полученные данные свидетельствуют, что повышенная реактивность (ресенсилизация) рецепторов плазматических мембран в ближайшие сроки после облучения в дозе 1 Гр создает условия для проявления геморрагического синдрома не только при развитии лучевой болезни, но и при облучении даже в малых дозах.

Ключевые слова: тромбоциты; облучение; кальциевый обмен; агрегация; АДФ; тромбин.

POST-RADIATION CHANGES OF CYTOPLASMATIC CALCIUM CONCENTRATION IN PLATELETS ACTIVATED BY ADP AND THROMBIN

O. G. PARKHIMOVICH^a, O. D. BICHAN^b, K. Ya. BULANOVA^a

*^aInternational Sakharov Environmental Institute, Belarusian State University,
23/1 Daŭhabrodskaja Street, Minsk 220070, Belarus*

*^bBelarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus
Corresponding author: O. G. Parkhimovich (olga_parkhimovich@mail.ru)*

In the short term (3rd, 10th and 30th days) after irradiation at a dose of 1 Gy, platelets show an increased basal level of calcium ions in the cytoplasm compared to the control values, both in the presence and in the absence of calcium ions in the external environment. Under the action of ADP (20 $\mu\text{mol/L}$) and thrombin (0.02 U/mL) under similar conditions, there is an increase in the concentration of calcium ions in the cytoplasm of platelets in the post-radiation period. The most pronounced radiation-induced changes in the content of cytoplasmic calcium in resting and activated platelets are typical for the 3rd day of the post-radiation period. The data obtained indicate that the increased reactivity (resensitisation) of plasma membrane receptors in the short term after irradiation at a dose of 1 Gy creates conditions for the manifestation of hemorrhagic syndrome not only with the development of radiation sickness, but even with low-dose irradiation.

Keywords: platelets; irradiation; calcium metabolism; aggregation; ADP; thrombin.

Введение

В патогенезе лучевого поражения наблюдается геморрагический синдром, обусловленный повышением функциональной активности тромбоцитов на ранних стадиях (1-е – 3-и сутки) развития лучевой болезни [1]. Этот факт ориентирует исследования на установление молекулярных механизмов данного феномена в целях выяснения методов коррекции. Нарушения в состоянии агрегационной способности тромбоцитов определяются изменениями сложных механизмов регуляции внутриклеточной концентрации ионов кальция, которые не изучены в достаточной степени для того, чтобы осуществить поиск способов их коррекции.

Цель настоящей работы – изучение молекулярных механизмов рецепторзависимой регуляции содержания цитоплазматического кальция в тромбоцитах животных, облученных в дозе 1 Гр, в различные сроки реабилитационного периода.

Материалы и методы исследования

Объектами исследований являлись тромбоциты крови облученных и необлученных беспородных белых крыс зрелого возраста (6–7 мес.), стадного разведения массой (250 \pm 30) г, содержащихся на стандартном рационе вивария.

Животных подвергали однократному и равномерному облучению γ -квантами ¹³⁷Cs в дозе 1 Гр (мощность дозы 0,62 Гр/мин, длительность воздействия 1,61 мин) на установке ИГУР. Контролем служили необлученные животные соответствующего возраста. Облучение проводилось на базе Института радиобиологии НАН Беларуси. Объемы выборок показателей в экспериментальных и контрольных группах сравнения составляли $n = 15$ и $n = 18$ соответственно.

Перед забором крови крыс наркотизировали тиопенталом натрия (из расчета 45 мг на 1 кг массы животного). Кровь брали пункцией, при этом применяли короткую иглу достаточно большого диаметра с силиконовой трубкой на тупом конце, которые предварительно промывали 15 % раствором ЭДТА. Полученную кровь стабилизировали 3,8 % раствором цитрата натрия в объемном соотношении 9 : 1.

Для исключения контактной активации тромбоцитов во всех экспериментах использовалась только пластиковая или силиконовая посуда.

Тромбоциты для исследования трансмембранных механизмов кальциевого обмена выделяли из обогащенной тромбоцитами плазмы (ОТП), полученной в результате центрифугирования крови при комнатной температуре и ускорении 200 g в течение 5 мин. Для этого ОТП разводили фосфатно-солевым буфером (4,3 ммоль/л K_2HPO_4 , 4,3 ммоль/л Na_2HPO_4 , 22,4 ммоль/л NaH_2PO_4 , 113 ммоль/л NaCl, 10 ммоль/л цитрат натрия, 5 ммоль/л D-глюкоза (pH 6,5)) в объемном соотношении 1 : 1 и наслаивали на фиколл-верографин плотностью $(1,087 \pm 0,005)$ г/мл. После центрифугирования при комнатной температуре и ускорении 250 g в течение 15 мин тромбоциты располагались в широком мутном слое над кольцом мононуклеаров. Слой тромбоцитов переносили в пластиковые пробирки и осаждали центрифугированием при комнатной температуре и ускорении 650 g в течение 5 мин. Осадок после однократного отмывания суспендировали в буферном растворе (pH 6,5), доводя концентрацию тромбоцитов до $2 \cdot 10^8 - 5 \cdot 10^8$ клеток на 1 мл. Далее проводили микроскопический контроль чистоты выделяемых тромбоцитов (присутствия других форменных элементов крови не обнаружено).

Для количественного определения концентрации кальция в тромбоцитах использовали флуоресцентный зонд Fura-2 AM (*ION Biosciences*, США). Полученные тромбоциты инкубировали с Fura-2 AM (конечная концентрация 2,5 мкмоль/л), затем осаждали центрифугированием при ускорении 745 g в течение 8 мин. Отмытые тромбоциты суспендировали в HEPES-буфере без ионов кальция (pH 7,4) и доводили концентрацию тромбоцитов до $2,5 \cdot 10^9$ клеток на 1 мл. Исследование кинетики изменения интенсивности флуоресценции нагруженных Fura-2 AM тромбоцитов проводили на длине волны 510 нм с использованием спектрофлуориметра CM 2203 (*SOLAR*, Беларусь). Длины волн возбуждения составляли 340 и 380 нм. Концентрацию ионов кальция рассчитывали на основе измерения флуоресценции при возбуждении этими двумя длинами волн по формуле

$$[Ca^{2+}]_{цит} = K_d \frac{R_{380, max} F - F_{min}}{R_{380, min} F_{max} - F},$$

где K_d – константа диссоциации комплекса Fura-2 AM с кальцием ($K_d = 224$ нмоль/л); $F = \frac{R_{340}}{R_{380}}$ – теку-

щее отношение флуоресцентных сигналов; F_{min} – то же отношение в растворе с низкой концентрацией ионов кальция (при добавлении 100 мкмоль/л ЭГТА); F_{max} – то же отношение в растворе с высокой концентрацией ионов кальция (при добавлении 10 % тритона); $R_{380, max}$ и $R_{380, min}$ – флуоресцентный сигнал при добавлении тритона и ЭГТА соответственно.

Анализ и статистическую обработку данных проводили на вычислительном комплексе IBM PC/AT с использованием программного обеспечения *GraphPad Prism 9*. Достоверность различий между средними значениями изучаемых параметров оценивали по *t*-критерию Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

По мере совершенствования физиологических, электроно-микроскопических, гематологических, биофизических, биохимических и других методов исследования все более четко обозначается и раскрывается физиологическая роль кровяных пластинок, углубляются представления об их значении в гемостазе, выявляются новые функции тромбоцитов, а также молекулярные механизмы нарушений процессов активации и дезактивации при патологических состояниях организма. Исходя из результатов предыдущих исследований, в инициации повышенной реакции тромбоцитов на индукторы агрегации на 3-и сутки после облучения в дозе 1 Гр, вероятнее всего, ведущая роль принадлежит изменению регуляторных кальций-зависимых механизмов, поскольку число тромбоцитов в этих условиях облучения не изменялось [2].

Функции тромбоцитов в состоянии покоя, а также при активации и дезактивации определяются в основном двумя сбалансированными процессами – поступлением ионов кальция в цитоплазму и их оттоком, в которых участвуют специализированные молекулярные структуры плазматической мембраны и внутриклеточных органелл. Приток и отток ионов кальция в активированных тромбоцитах осуществляются несколькими путями, но какой из них становится мишенью для поражения радиацией, в настоящее время неизвестно. Для определения вклада каждого из регуляторных компонентов в поддержание стабильного уровня ионов кальция в покоящихся тромбоцитах или его изменение в ходе процессов активации применяются специальные методические приемы, в том числе с использованием бескальциевой (100 мкмоль/л ЭГТА) и кальцийсодержащей (1 ммоль/л $CaCl_2$) сред. Отсутствие ионов кальция в среде инкубации позволяет исключить трансмембранный перенос ионов внутрь клетки из межклеточного пространства. Это дает возможность оценить эффективность работы мембраносвязанных Ca^{2+} -АТФаз (одни из них осуществляют депонирование цитозольного кальция во внутриклеточные структуры, другие выполняют перенос ионов кальция из цитоплазмы тромбоцитов во внеклеточную среду). Наличие ионов кальция во внеклеточной жидкости создает условия для экспериментальной оценки роли трансмембранного поступления этих ионов в цитоплазму извне.

Особенности накопления ионов кальция в цитоплазме покоящихся тромбоцитов облученных крыс. При отсутствии ионов кальция во внешней среде базальный уровень свободного кальция в цитоплазме тромбоцитов необлученных животных составил $(34,2 \pm 6,6)$ нмоль/л. После внесения ионов кальция во внеклеточную среду содержание цитоплазматического кальция в покоящихся тромбоцитах возросло на 18,7 нмоль/л (в 1,5 раза) за счет функций систем транспорта ионов через плазматическую мембрану в прямом (в цитоплазму) и обратном (во внеклеточное пространство) направлениях.

На 3-и сутки после облучения в тромбоцитах крыс отмечалось увеличение базального уровня ионов кальция на 49,7 нмоль/л (в 2 раза) в бескальциевой среде и на 120,8 нмоль/л (в 3 раза) в кальцийсодержащей среде. В последующие сроки реабилитационного периода (10-е и 30-е сутки) как в бескальциевой, так и в кальцийсодержащей среде концентрация ионов кальция в цитоплазме покоящихся тромбоцитов постепенно снижалась, приходя к норме на 90-е сутки (см. таблицу).

Изменение базального уровня ионов кальция в цитоплазме тромбоцитов крыс в ближайшие и отдаленные сроки после облучения в дозе 1 Гр, нмоль/л

Changes in the basal level of calcium ions in the platelet cytoplasm of rats in the immediate and long-term periods after irradiation at a dose of 1 Gy, nmol/L

Условия инкубации	Контроль	Сроки после облучения			
		3-и сутки	10-е сутки	30-е сутки	90-е сутки
Бескальциевая среда (100 мкмоль/л ЭГТА)	$34,2 \pm 6,6$	$83,9 \pm 9,2^*$	$49,2 \pm 7,2^*$	$49,6 \pm 3,2^*$	$30,9 \pm 3,0$
Кальцийсодержащая среда (1 ммоль/л CaCl_2)	$52,9 \pm 8,8^\#$	$173,7 \pm 15,5^{*\#}$	$89,4 \pm 12,3^{*\#}$	$79,1 \pm 4,0^{*\#}$	$53,9 \pm 5,1^\#$

Примечание. Знаком * отмечены достоверные различия по отношению к соответствующему контролю, знаком # – достоверные различия по отношению к соответствующим данным бескальциевой среды ($p < 0,05$).

В целом полученные данные показывают, что исходными условиями для формирования острой фазы на 3-и сутки после облучения являются повышенные уровни ионов кальция в цитоплазме покоящихся тромбоцитов. Увеличение концентрации цитоплазматического кальция может быть связано с изменением входа этих ионов из внешнего пространства, нарушением функционирования Ca^{2+} -АТФаз плазматической мембраны, отвечающих за удаление избытка ионов кальция из цитоплазмы во внешнюю среду, и Ca^{2+} -АТФаз тубулярной системы и кислотных органелл, откачивающих ионы кальция из цитоплазмы в эти внутриклеточные депонирующие структуры.

Изменение рецепторзависимых процессов регуляции притока ионов кальция в цитоплазму тромбоцитов облученных животных. Среди факторов, инициирующих активность тромбоцитов, выделяют АДФ, АТФ, адреналин, тромбоксан A_2 (TxA_2), тромбин, фактор активации тромбоцитов (РАФ). Кроме того, активировать тромбоциты могут элементы внеклеточного матрикса, такие как ламинин, фибронектин, коллаген, фактор фон Виллебранда и др. В целом у тромбоцитов выявлено около 50 типов рецепторов, определяющих их физиологическую активность [3].

В настоящем исследовании произведена оценка пострадиационных изменений воздействия АДФ и тромбина на функциональное состояние тромбоцитов. Пуриновые соединения являются наиболее важными активаторами тромбоцитов и играют главенствующую роль в реализации их ответа на повреждение сосудистой стенки, а также в регуляции сосудистого тонуса и воспалительно-репаративного процесса [4]. На поверхности тромбоцитов представлены три варианта пуриновых рецепторов – P2X_1 (катионный канал, активируемый АТФ [5]), P2Y_1 и P2Y_{12} (ассоциированные с G-белками рецепторы, которые активируются АДФ [6]). Рецепторы P2Y_1 и P2Y_{12} считаются абсолютно необходимыми для осуществления агрегации тромбоцитов, индуцированной АДФ. Ответ тромбоцитов на действие АДФ при фармакологическом выключении или генетическом дефиците этих рецепторов полностью отсутствует [7]. На внутриклеточном уровне это проявляется нарушением Ca^{2+} -сигналикации. Для АДФ-индуцированной агрегации необходима совместная активация рецепторов P2Y_1 и P2Y_{12} , изолированное ингибирование одного типа рецепторов ведет к значимому снижению агрегации тромбоцитов.

Известно, что при активации агрегации тромбоцитов под действием АДФ увеличение внутриклеточной концентрации свободных ионов кальция в тромбоцитах происходит за счет их выброса из внутриклеточных депо и входа через плазматическую мембрану [8].

У крыс экспериментальной группы в ответ на действие АДФ (20 мкмоль/л) в присутствии 1 ммоль/л CaCl_2 отмечают более значительное, чем у животных контрольной группы, увеличение концентрации ионов кальция в тромбоцитах в ближайшие сроки после облучения и ее нормализация в отдаленные сроки постлучевого периода (рис. 1).

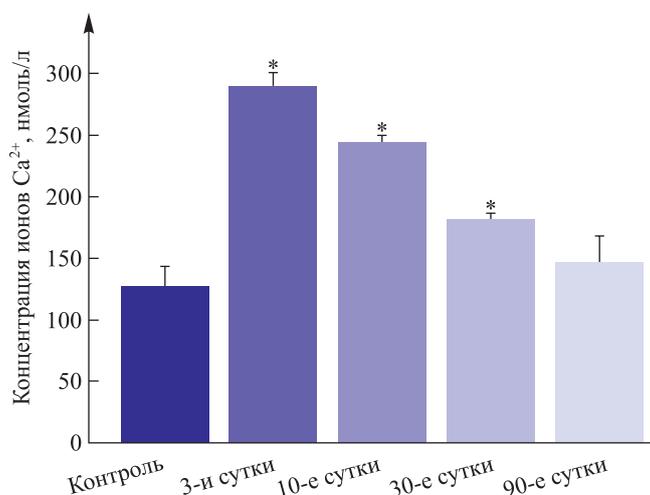


Рис. 1. АДФ-индуцированное высвобождение ионов кальция в тромбоцитах, суспендированных в буфере, содержащем 1 ммоль/л CaCl₂. Знаком * отмечены достоверные различия по отношению к контролю ($p < 0,05$)

Fig. 1. ADP-induced release of calcium ions in platelets suspended in a buffer containing 1 mmol/L CaCl₂. Sign * marked significant differences in relation to control ($p < 0.05$)

Так, содержание цитоплазматического кальция в тромбоцитах облученных животных при добавлении АДФ максимально возрастало (в 2,8 раза) по сравнению с контролем ((127,4 ± 16,1) нмоль/л) на 3-и сутки ((289,5 ± 11,7) нмоль/л), снижаясь к 10-м и 30-м суткам ((244,0 ± 6,0) нмоль/л и (181,6 ± 22,3) нмоль/л соответственно). Только на 90-е сутки после облучения при действии АДФ в кальцийсодержащей среде не выявлено достоверных изменений в концентрации ионов кальция ((145,9 ± 5,8) нмоль/л) по сравнению с контрольным значением ((127,4 ± 16,1) нмоль/л).

В условиях ингибирования входа ионов кальция из внешней среды при добавлении 100 мкмоль/л ЭГТА, связывающей двухвалентные катионы, на 3-и сутки постлучевого периода отмечалось достоверное по сравнению с контролем ((182,1 ± 11,2) нмоль/л) увеличение концентрации цитоплазматического кальция ((223,5 ± 11,2) нмоль/л) (рис. 2) за счет снижения его депонирования во внутриклеточных структурах и выброса через плазматическую мембрану. Содержание цитоплазматического кальция в ответ на действие АДФ на 10-е сутки ((190,4 ± 6,3) нмоль/л), 30-е сутки ((180,6 ± 5,1) нмоль/л) и 90-е сутки ((185,7 ± 9,5) нмоль/л) достоверно не изменялось.

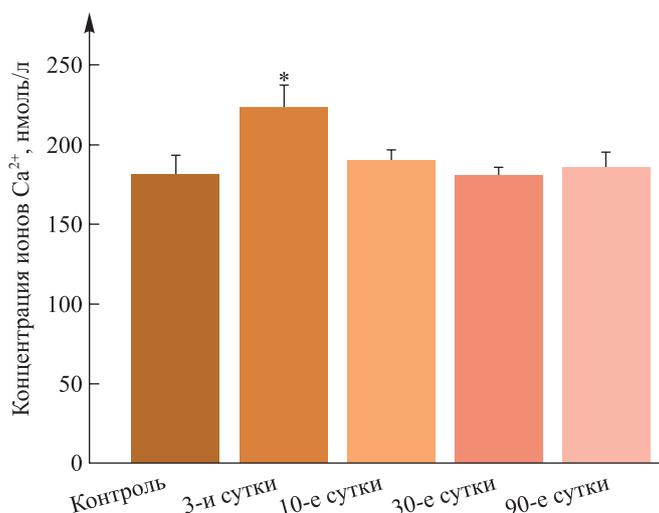


Рис. 2. АДФ-индуцированное высвобождение ионов кальция в тромбоцитах, суспендированных в буфере, содержащем 100 мкмоль/л ЭГТА. Знаком * отмечены достоверные различия по отношению к контролю ($p < 0,05$)

Fig. 2. ADP-induced release of calcium ions in platelets suspended in a buffer containing 100 μmol/L EGTA. Sign * marked significant differences in relation to control ($p < 0.05$)

Таким образом, при наличии ионов кальция во внеклеточной среде АДФ вызывал повышение внутриклеточной концентрации ионов кальция в тромбоцитах облученных животных до 289,5 нмоль/л, а при ингибировании поступления этих ионов извне – до 223,5 нмоль/л. То есть увеличение концентрации на 66 нмоль/л обусловлено постлучевыми нарушениями в содержании цитоплазматического кальция, происходящими в условиях сохранения обмена ионов с внеклеточной средой. При добавлении АДФ постлучевое повышение уровня ионов кальция в цитоплазме тромбоцитов за счет нарушений в системах депонирования составило 42,4 нмоль/л, а за счет входа через мембрану – 23,6 нмоль/л.

Известно, что АДФ активирует два типа рецепторов ($P2Y_1$ и $P2Y_{12}$), но каждый из них имеет специфическое функциональное значение. На мембранной поверхности неактивированных тромбоцитов количество рецепторов $P2Y_1$ невелико, при активации же АДФ происходит их ресенситизация – дополнительная секреция из α -гранул, приводящая к увеличению количества рецепторов на поверхности наружных мембран [9]. Взаимодействуя с рецептором $P2Y_1$, АДФ передает сигнал на G_q -белок, что вызывает активацию фосфолипазы $C\beta$. Это ведет к образованию диацилглицерола (ДАГ) и инозитолтрифосфата (ИФ3). Данные метаболиты активируют протеинкиназу C и увеличивают содержание цитоплазматического кальция вследствие освобождения его из внутриклеточных депо [10]. Можно полагать, что повышенное накопление ионов кальция в цитоплазме тромбоцитов облученных животных под воздействием АДФ обусловлено усилением процессов ресенситизации рецепторов $P2Y_1$, которое, как показывают исследования [11], связано с нарушением механизмов центрального управления.

Взаимодействие АДФ с рецептором $P2Y_{12}$ тромбоцитов активирует G_i -белок, который ингибирует аденилатциклазу, что приводит к снижению концентрации цАМФ в клетке и изменению величины отношения ионов кальция к цАМФ. Таким образом, возникает количественный перевес в сторону пула ионов кальция, это способствует реализации его регуляторных функций в условиях стабильного уровня ионов кальция [12].

Следует учесть, что функция рецепторов $P2Y_{12}$ в тромбоцитах в некоторых условиях может повышаться из-за сопряжения с активированными рецепторами $P2Y_1$, что приводит к стимуляции секреции гранул и выбросу АДФ из тромбоцитов, вызывая тем самым вторичную волну агрегации [13]. Также активация рецепторов $P2Y_{12}$ под действием АДФ запускает G_q -зависимые процессы, что стимулирует активность нерецепторной киназы Src типа Lyn. Это сопровождается не только экскрецией содержимого α -гранул, синтезом TxA_2 , но и активацией сигнального пути PI3K/Akt/mTOR, которая способствует увеличению активности NO-синтазы. Повышение уровня NO в клетке приводит к активации гуанилатциклазы и росту концентрации цГМФ, активирующего цГМФ-зависимую протеинкиназу G. В результате происходят снижение уровня цитоплазматического кальция и ингибирование тромбоцитов [14]. По этой причине действие АДФ характеризуется обратимостью процесса агрегации.

Таким образом, повышение концентрации цитоплазматического кальция в ближайшие сроки после облучения может быть обусловлено постлучевой ресенситизацией аденозиновых рецепторов $P2Y_1$ и стимулирующими воздействиями на сопряженные с ними рецепторы $P2Y_{12}$ тромбоцитов.

В последующих исследованиях эффектов постлучевых нарушений агрегационной способности тромбоцитов было изучено действие тромбина.

Если АДФ является слабым агонистом и индуцирует только обратимую агрегацию вследствие особенностей его расположения на поверхности мембран тромбоцитов и множественности путей реализации сигнала [15], то тромбин выступает самым сильным индуктором агрегации тромбоцитов, причем при низких концентрациях в плазме крови (0,5–2,0 нмоль/л), ввиду воздействия сразу на несколько путей активации тромбоцитов [16]. Взаимодействие протеолитически активного тромбина с тромбоцитами и эндотелиальными клетками играет важную роль при нормальном гемостазе и развитии некоторых патологических состояний [17], что позволяет предполагать возможность его участия в патологических процессах, вызванных действием радиации.

В ходе проведенных исследований влияния тромбина на активность тромбоцитов, определяемого по уровню содержания ионов кальция в цитоплазме, установлено, что радиационно-индуцированные процессы проявляются в разной степени в течение реабилитационного периода. Для выявления радиочувствительности различных механизмов, участвующих в регуляции содержания цитоплазматического кальция в присутствии тромбина, исследования проводились в бескальциевой и кальцийсодержащей средах.

При инкубации в кальцийсодержащей среде в ответ на действие тромбина наблюдалось значительное увеличение внутриклеточной концентрации ионов кальция в тромбоцитах облученных крыс во все рассмотренные сроки постлучевого периода с максимальным эффектом на 3-и сутки (рис. 3).

Как следует из рис. 3, содержание цитоплазматического кальция при добавлении тромбина (0,2 ЕД/мл), действующего через PAR-рецепторы, у необлученных животных достигало ($174,5 \pm 23,6$) нмоль/л. После

облучения этот показатель возрастал до $(561,9 \pm 12,1)$ нмоль/л на 3-и сутки постлучевого периода, постепенно снижаясь до $(374,4 \pm 15,7)$ нмоль/л на 10-е сутки и до $(320,2 \pm 15,1)$ нмоль/л на 30-е сутки. К 90-м суткам постлучевого периода уровень кальция в цитоплазме тромбоцитов все еще превышал контрольное значение на 100 нмоль/л.

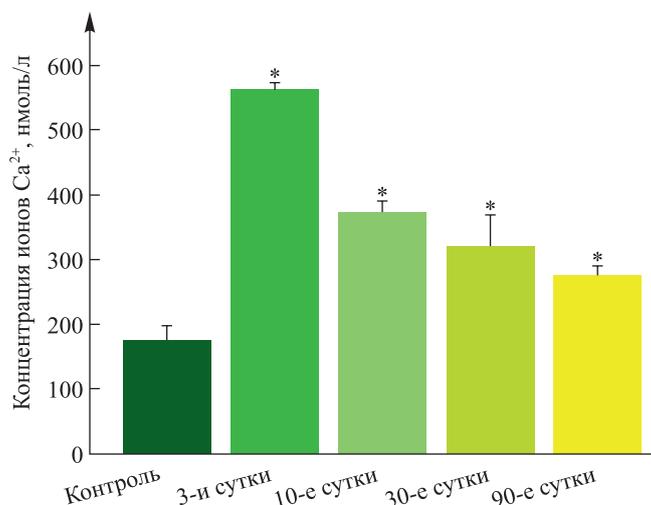


Рис. 3. Индуцированное тромбином высвобождение ионов кальция в тромбоцитах, суспендированных в буфере, содержащем 1 ммоль/л CaCl_2 . Знаком * отмечены достоверные различия по отношению к контролю ($p < 0,05$)

Fig. 3. Thrombin-induced release of calcium ions in platelets suspended in a buffer containing 1 mmol/L CaCl_2 . Sign * marked significant differences in relation to control ($p < 0.05$)

Таким образом, при наличии ионов кальция во внешней среде постлучевое действие тромбина характеризовалось длительным превышением уровня цитоплазматического кальция с максимальным эффектом на 3-и сутки реабилитационного периода.

В бескальциевой среде обусловленные действием тромбина постлучевые изменения содержания ионов кальция в цитоплазме тромбоцитов по сравнению с контролем ($(152,2 \pm 18,3)$ нмоль/л) проявлялись исключительно на 3-и сутки ($(201,8 \pm 10,9)$ нмоль/л) (рис. 4). Уровни цитоплазматического кальция на 10-е сутки ($(168,4 \pm 15,2)$ нмоль/л), 30-е сутки ($(159,2 \pm 13,6)$ нмоль/л) и 90-е сутки ($(146,9 \pm 15,0)$ нмоль/л) после облучения статистически не отличались от значений в контрольной группе.

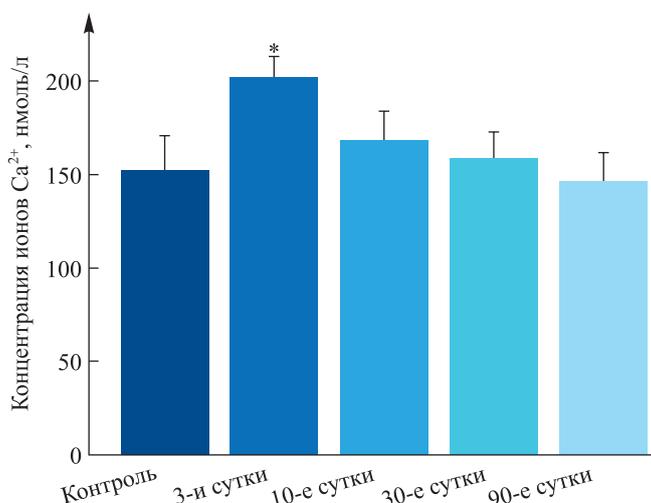


Рис. 4. Индуцированное тромбином изменение уровня цитоплазматического кальция в тромбоцитах, суспендированных в бескальциевом буфере. Знаком * отмечены достоверные различия по отношению к контролю ($p < 0,05$)

Fig. 4. Thrombin-induced change in the level of cytoplasmic calcium in platelets suspended in a calcium-free buffer. Sign * marked significant differences in relation to control ($p < 0.05$)

Известно, что активация тромбоцитов тромбином осуществляется через два типа PAR-рецепторов, сопряженных с G-белками, – PAR1 и PAR4 [18]. В основном она обеспечивается за счет взаимодействия тромбина с высокоаффинным рецептором PAR1. Активация рецепторов этого типа тромбином приводит к ферментативному отщеплению N-концевого фрагмента. В дальнейшем происходит активация фосфолипазы C β , что ведет к расщеплению фосфоинозитидов и образованию ДАГ и ИФ3. Данные метаболиты активируют протеинкиназу C и увеличивают содержание цитоплазматического кальция вследствие освобождения его из внутриклеточных депо. Также после рецепторного взаимодействия тромбина и активации G_{12/13}-белка происходит инициация активности Rho- и RhoA-киназ. Первый фермент обуславливает фосфорилирование легких цепей миозина и конформационные изменения цитоскелета, второй фермент способствует увеличению секреции плотных гранул тромбоцитов [19].

Важно отметить, что рецепторы PAR1 повышают свою аффинность (ресенситизируются) при небольшом увеличении дозы тромбина, поступившего в кровь. Следовательно, повышение концентрации цитоплазматического кальция в тромбоцитах облученных животных в первую очередь может быть обусловлено активизацией механизмов ресенситизации рецепторов PAR1.

Низкоаффинные рецепторы PAR4 вносят свой вклад только в условиях недостаточности PAR1-сигнализации. Особенностью данного типа рецепторов является способность поддерживать активацию тромбоцитов довольно долгое время независимо от изменения интенсивности внешних стимулов, и только при очень высоких концентрациях тромбина рецепторы PAR4 быстро десенситизируются, т. е. снижают или теряют активность [20]. Еще одна особенность рецепторов PAR4 – сопряжение с АДФ-сигнализацией в тромбоцитах, а именно с рецепторами P2Y₁₂. Имеющаяся физическая связь между рецепторами P2Y₁₂ и PAR4 взаимно влияет на их функциональную активность. Было показано, что эффекты сопряжения рецепторов PAR4 с рецепторами P2Y₁₂ особенно выражены в условиях ограничения концентрации кальция во внешней среде [21].

Таким образом, стимулирующее действие тромбина на содержание ионов кальция в цитоплазме на 3-и сутки постлучевого периода при инкубации в бескальциевой среде может быть обусловлено усиленным сопряжением рецепторов PAR4 с активированными рецепторами P2Y₁₂ и проявлением Ca²⁺-стимулирующей функции последних. Активация рецепторов P2Y₁₂ в тромбоцитах облученных животных, вероятнее всего, вызвана сопряжением с активированными рецепторами P2Y₁. То есть в формировании повышенного уровня ионов кальция на 3-и сутки постлучевого периода при действии тромбина в бескальциевой среде участвуют сопряженные с рецепторами PAR4 аденозиновые рецепторы, связь между которыми усиливается, возможно, вследствие постлучевых изменений состава фосфолипидов и белок-липидных взаимодействий.

Известно, что при действии тромбина увеличение содержания цитоплазматического кальция в результате освобождения его из внутриклеточных депо также приводит к экспонированию наружу фосфатидилсерина [22], который сам по себе относится к апоптотическим факторам, но при этом способен вызывать изменение соотношения зарядов на внутренней и внешней сторонах мембранного бислоя, нарушая взаимодействие мембранных структур с ионным окружением и меняя их трансмембранный перенос. При тромбинзависимой активации тромбоцита и переходе заряженного фосфатидилсерина на наружную поверхность создаются условия для дополнительного выхода наружу факторов агрегации V, VIII, IX и X.

Не исключено, что скорость функциональных перестроек липидов в бислое мембран тромбоцитов после облучения затормаживается, что также стимулирует рост содержания цитоплазматического кальция.

Заключение

Динамика эффектов лучевого воздействия на тромбоциты в период реабилитации является результатом нарушения функции мембран и сигнальных путей, регулирующих процессы накопления и элиминации цитоплазматического кальция в тромбоцитах, что в определенной мере может быть связано с ослаблением регуляторных функций центральной нервной системы (ЦНС).

В целом полученные данные позволяют сделать следующие выводы.

1. В ближайшие сроки после облучения в дозе 1 Гр (3-и сутки) в тромбоцитах отмечается повышенный по сравнению с контролем базальный уровень ионов кальция в цитоплазме при инкубации как в бескальциевой, так и в кальцийсодержащей среде. В бескальциевой среде, где отсутствовал приток ионов извне, содержание цитоплазматического кальция увеличилось на 49,7 нмоль/л (в 2 раза), что можно связать с торможением функций Ca²⁺-АТФаз наружных мембран и депонирующих структур. В кальцийсодержащей среде уровень кальция в цитоплазме тромбоцитов облученных животных повысился на 120,8 нмоль/л (в 3 раза) за счет изменений функций систем транспорта ионов через плазматическую мембрану в цитоплазму, происходящих на фоне нарушений депонирования во внутриклеточных депо.

2. На 3-и сутки постлучевого периода при действии АДФ уровень кальция в тромбоцитах облученных животных возрастал в 2,8 раза в кальцийсодержащей среде и в 1,2 раза в бескальциевой среде относительно соответствующего контроля. Это может быть обусловлено постлучевой ресенситизацией аденозиновых рецепторов P2Y₁ и стимулирующими воздействиями на сопряженные с ними рецепторы P2Y₁₂ тромбоцитов. Указанные постлучевые изменения носят обратимый характер: к 90-м суткам наблюдается нормализация содержания ионов кальция в тромбоцитах.

3. При действии тромбина в кальцийсодержащей среде уровень цитоплазматического кальция максимально возрастал (в 3,2 раза) на 3-и сутки реабилитационного периода, постепенно снижаясь к 90-м суткам после облучения, но не достигая уровня контроля. В бескальциевой среде постлучевые изменения в содержании ионов кальция в цитоплазме тромбоцитов при действии тромбина проявлялись исключительно на 3-и сутки (увеличение в 1,3 раза по сравнению с контролем), скорее всего, за счет активации функции аденозиновых рецепторов, сопряженных с рецепторами PAR4 (вероятно, вследствие временного критического изменения липидного микроокружения в эти сроки реабилитационного периода).

Полученные данные свидетельствуют, что повышенная реактивность (ресенситизация) рецепторов плазматических мембран в ближайшие сроки после облучения в дозе 1 Гр создает условия для проявления геморрагического синдрома не только при развитии лучевой болезни, но и при облучении даже в малых дозах. Ресенситизация рецепторов клеток организма – закономерное явление в условиях постлучевого снижения регуляторных функций ЦНС. Можно сделать вывод, что корректирующие препараты, применяемые для нормализации гемостаза, должны иметь разные точки приложения. Опосредованность эффектов, возникающих в рецепторах тромбоцитов облученных животных, предполагает коррекцию работы в первую очередь регуляторных центров ЦНС. Дополнительно может быть рекомендовано применение препаратов для местного снижения повышенной чувствительности рецепторов тромбоцитов у облученных организмов.

Библиографические ссылки

1. Стожаров АН, Квиткевич ЛА, Солодкая ГА, Аветисов АР, Сняжкова ОК, Сычик СИ. *Радиационная медицина*. Стожаров АН, редактор. Минск: МГМИ; 2000. 154 с.
2. Пархимович ОГ, Бичан ОД, Буланова КЯ. Постлучевые изменения содержания в крови тромбоцитов и их функциональной активности. *Журнал Белорусского государственного университета. Экология*. 2022;2:59–65. DOI: 10.46646/2521-683X/2022-2-59-65.
3. Шатурный ВИ, Шахиджанов СС, Свешникова АН, Пантелеев МА. Активаторы, рецепторы и пути внутриклеточной сигнализации в тромбоцитах крови. *Биомедицинская химия*. 2014;60(2):182–200.
4. Загидуллин НШ, Валеева КФ, Гассанов Н, Загидуллин ШЗ. Значение дисфункции эндотелия при сердечно-сосудистых заболеваниях и методы ее медикаментозной коррекции. *Кардиология*. 2010;50(5):54–60.
5. Clifford EE, Parker K, Humphreys BD, Kertesy SB, Dubyak GR. The P2X₁ receptor, an adenosine triphosphate – gated cation channel, is expressed in human platelets but not in human blood leukocytes. *Blood*. 1998;91(9):3172–3181. DOI: 10.1182/blood.V91.9.3172.
6. Offermanns S. Activation of platelet function through G protein – coupled receptors. *Circulation Research*. 2006;99(12):1293–1304. DOI: 10.1161/01.RES.0000251742.71301.16.
7. Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2003;4(7):517–529. DOI: 10.1038/nrm1155.
8. Баринов ЭФ, Сулаева ОН. Роль пуриновых рецепторов тромбоцитов в регуляции гемостаза (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2012;11:30–35.
9. Kennedy C. The discovery and development of P2 receptor subtypes. *Journal of the Autonomic Nervous System*. 2000;81(1–3):158–163. DOI: 10.1016/s0165-1838(00)00133-8.
10. Varga-Szabo D, Braun A, Nieswandt B. Calcium signaling in platelets. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2009;7(7):1057–1066. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2009.03455.x.
11. Léon C, Hechler B, Freund M, Eckly A, Vial C, Ohlmann P, et al. Defective platelet aggregation and increased resistance to thrombosis in purinergic P2Y₁ receptor – null mice. *The Journal of Clinical Investigation*. 1999;104(12):1731–1737. DOI: 10.1172/JCI8399.
12. Remijn JA, Wu Y-P, Jenning EH, Ijsseldijk MJW, van Willigen G, de Groot PG, et al. Role of ADP receptor P2Y₁₂ in platelet adhesion and thrombus formation in flowing blood. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2002;22(4):686–691. DOI: 10.1161/01.atv.0000012805.49079.23.
13. Rozalski M, Nocun M, Watala C. Adenosine diphosphate receptors on blood platelets: potential new targets for antiplatelet therapy. *Acta Biochimica Polonica*. 2005;52(2):411–415. DOI: 10.18388/abp.2005_3453.
14. Rasheed H, Tirmizi AH, Salahuddin F, Rizvi ND, Arshad M, Farooq SZ, et al. Calcium signaling in human platelet aggregation mediated by platelet activating factor and calcium ionophore. *Journal of Biological Sciences*. 2004;4(2):117–121. DOI: 10.3923/jbs.2004.117.121.
15. Foster CJ, Prosser DM, Agans JM, Zhai Y, Smith MD, Lachowicz JE, et al. Molecular identification and characterization of the platelet ADP receptor targeted by thienopyridine antithrombotic drugs. *The Journal of Clinical Investigation*. 2001;107(12):1591–1598. DOI: 10.1172/JCI12242.
16. Brass L, Stalker TJ. Mechanisms of platelet activation. In: Gresele P, Fuster V, López JA, Page CP, Vermeylen J, editors. *Platelets in hematologic and cardiovascular disorders*. Cambridge: Cambridge University Press; 2008. p. 37–52.

17. Stalker TJ, Newman DK, Ma P, Wannemacher KM, Brass LF. Platelet signaling. In: Gresele P, Born GVR, Patrono C, Page CP, editors. *Antiplatelet agents*. Heidelberg: Springer; 2012. p. 59–85 (Handbook of experimental pharmacology; volume 210). DOI: 10.1007/978-3-642-29423-5_3.
18. Kahn ML, Zheng Y-W, Huang W, Bigornia V, Zeng D, Moff S, et al. A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature*. 1998;394(6694):690–694. DOI: 10.1038/29325.
19. De Candia E. Mechanisms of platelet activation by thrombin: a short history. *Thrombosis Research*. 2012;129(3):250–256. DOI: 10.1016/j.thromres.2011.11.001.
20. Власенко ЛП, Якутин МВ. Опосредование воздействия тромбина на тромбоциты рецепторами PAR4 и PAR1. *Международный научно-исследовательский журнал*. 2020;8(часть 2):44–47. DOI: 10.23670/IRJ.2020.98.8.040.
21. Sambrano GR, Weiss EJ, Zheng Y-W, Huang W, Coughlin SR. Role of thrombin signalling in platelets in haemostasis and thrombosis. *Nature*. 2001;413(6851):74–78. DOI: 10.1038/35092573.
22. Sage SO. The Wellcome Prize lecture. Calcium entry mechanisms in human platelets. *Experimental Physiology*. 1997;82(5):807–823. DOI: 10.1113/expphysiol.1997.sp004066.

References

1. Stozharov AN, Kvitkevich LA, Solodkaya GA, Avetisov AR, Sinyakova OK, Sychik SI. *Radiatsionnaya meditsina* [Radiation medicine]. Stozharov AN, editor. Minsk: Minsk State Medical Institute; 2000. 154 p. Russian.
2. Parkhimovich OG, Bichan OD, Bulanova KYa. Post-radiation changes in the content of platelets in the blood and their functional activity. *Journal of the Belarusian State University. Ecology*. 2022;2:59–65. Russian. DOI: 10.46646/2521-683X/2022-2-59-65.
3. Shaturny VI, Shakhidzhanov SS, Sveshnikova AN, Panteleev MA. Activators, receptors and signal transduction pathways of blood platelets. *Biomeditsinskaya khimiya*. 2014;60(2):182–200. Russian.
4. Zagidullin NSh, Valeeva KF, Gassanov N, Zagidullin ShZ. Value of endothelial dysfunction in cardiovascular diseases and methods of its correction with drugs. *Kardiologiya*. 2010;50(5):54–60. Russian.
5. Clifford EE, Parker K, Humphreys BD, Kertesy SB, Dubyak GR. The P2X₁ receptor, an adenosine triphosphate – gated cation channel, is expressed in human platelets but not in human blood leukocytes. *Blood*. 1998;91(9):3172–3181. DOI: 10.1182/blood.V91.9.3172.
6. Offermanns S. Activation of platelet function through G protein – coupled receptors. *Circulation Research*. 2006;99(12):1293–1304. DOI: 10.1161/01.RES.0000251742.71301.16.
7. Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2003;4(7):517–529. DOI: 10.1038/nrm1155.
8. Barinov EF, Sulayeva ON. The role of purine receptors of thrombocytes in regulation of hemostasis. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*. 2012;11:30–35. Russian.
9. Kennedy C. The discovery and development of P2 receptor subtypes. *Journal of the Autonomic Nervous System*. 2000;81(1–3):158–163. DOI: 10.1016/S0165-1838(00)00133-8.
10. Varga-Szabo D, Braun A, Nieswandt B. Calcium signaling in platelets. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2009;7(7):1057–1066. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2009.03455.x.
11. Léon C, Hechler B, Freund M, Eckly A, Vial C, Ohlmann P, et al. Defective platelet aggregation and increased resistance to thrombosis in purinergic P2Y₁ receptor – null mice. *The Journal of Clinical Investigation*. 1999;104(12):1731–1737. DOI: 10.1172/JCI8399.
12. Remijn JA, Wu Y-P, Jenning EH, Ijsseldijk MJW, van Willigen G, de Groot PG, et al. Role of ADP receptor P2Y₁₂ in platelet adhesion and thrombus formation in flowing blood. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2002;22(4):686–691. DOI: 10.1161/01.atv.0000012805.49079.23.
13. Rozalski M, Nocun M, Watala C. Adenosine diphosphate receptors on blood platelets: potential new targets for antiplatelet therapy. *Acta Biochimica Polonica*. 2005;52(2):411–415. DOI: 10.18388/abp.2005_3453.
14. Rasheed H, Tirmizi AH, Salahuddin F, Rizvi ND, Arshad M, Farooq SZ, et al. Calcium signaling in human platelet aggregation mediated by platelet activating factor and calcium ionophore. *Journal of Biological Sciences*. 2004;4(2):117–121. DOI: 10.3923/jbs.2004.117.121.
15. Foster CJ, Prosser DM, Agans JM, Zhai Y, Smith MD, Lachowicz JE, et al. Molecular identification and characterization of the platelet ADP receptor targeted by thienopyridine antithrombotic drugs. *The Journal of Clinical Investigation*. 2001;107(12):1591–1598. DOI: 10.1172/JCI12242.
16. Brass L, Stalker TJ. Mechanisms of platelet activation. In: Gresele P, Fuster V, López JA, Page CP, Vermylen J, editors. *Platelets in hematologic and cardiovascular disorders*. Cambridge: Cambridge University Press; 2008. p. 37–52.
17. Stalker TJ, Newman DK, Ma P, Wannemacher KM, Brass LF. Platelet signaling. In: Gresele P, Born GVR, Patrono C, Page CP, editors. *Antiplatelet agents*. Heidelberg: Springer; 2012. p. 59–85 (Handbook of experimental pharmacology; volume 210). DOI: 10.1007/978-3-642-29423-5_3.
18. Kahn ML, Zheng Y-W, Huang W, Bigornia V, Zeng D, Moff S, et al. A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature*. 1998;394(6694):690–694. DOI: 10.1038/29325.
19. De Candia E. Mechanisms of platelet activation by thrombin: a short history. *Thrombosis Research*. 2012;129(3):250–256. DOI: 10.1016/j.thromres.2011.11.001.
20. Vlasenko LP, Yakutin MV. Mediating the effect of thrombin on platelets by PAR4 and PAR1 receptors. *International Research Journal*. 2020;8(part 2):44–47. Russian. DOI: 10.23670/IRJ.2020.98.8.040.
21. Sambrano GR, Weiss EJ, Zheng Y-W, Huang W, Coughlin SR. Role of thrombin signalling in platelets in haemostasis and thrombosis. *Nature*. 2001;413(6851):74–78. DOI: 10.1038/35092573.
22. Sage SO. The Wellcome Prize lecture. Calcium entry mechanisms in human platelets. *Experimental Physiology*. 1997;82(5):807–823. DOI: 10.1113/expphysiol.1997.sp004066.

Получена 21.08.2022 / исправлена 14.10.2022 / принята 14.10.2022.
Received 21.08.2022 / revised 14.10.2022 / accepted 14.10.2022.