

УДК 57.043

ОСОБЕННОСТИ ПОСТЛУЧЕВЫХ НАРУШЕНИЙ АККУМУЛЯЦИИ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ ВО ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ДЕПО ТРОМБОЦИТОВ В РАЗЛИЧНЫЕ СРОКИ ПОСТЛУЧЕВОГО ПЕРИОДА

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

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

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

Ионы кальция являются важным внутриклеточным регулятором, повышение концентрации которых в цитоплазме играет ключевую роль в определении функциональной активности тромбоцитов, связанной с агрегацией тромбоцитов и реакцией высвобождения. Основным путем уменьшения концентрации свободных ионов кальция в цитоплазме тромбоцита – активация Ca^{2+} -АТФазы внутриклеточных депонирующих структур и плазматической мембраны, уменьшающих цитоплазматическое содержание кальция за счет его обратного захвата в депо (ресеквестрация) и выброса Ca^{2+} из клетки. Тромбоциты экспрессируют две изоформы Ca^{2+} -АТФазы в разных депонирующих структурах (SERCA2b и SERCA3) и две изоформы Ca^{2+} -АТФазы плазматической мембраны (PMCA1b и 4b). Изоформа SERCA2b, являющаяся Ca^{2+} -АТФазой плотной тубулярной системы, ингибируется тапсигаргином. Изоформа SERCA3, представленная

Образец цитирования:

Пархимович ОГ, Бичан ОД, Буланова КЯ. Особенности постлучевых нарушений аккумуляции ионов кальция во внутриклеточных депо тромбоцитов в различные сроки постлучевого периода. *Журнал Белорусского государственного университета. Экология*. 2023;1:51–58.
<https://doi.org/10.46646/2521-683X/2023-1-51-58>

For citation:

Parkhimovich OG, Bichan OD, Bulanova KYa. Features of post-radiation disturbances in the accumulation of calcium ions in intracellular platelet depots at different times of the post-radiation period. *Journal of the Belarusian State University. Ecology*. 2023;1:51–58. Russian.
<https://doi.org/10.46646/2521-683X/2023-1-51-58>

Авторы:

Ольга Георгиевна Пархимович – преподаватель кафедры экологической химии и биохимии.

Ольга Дмитриевна Бичан – заведующая учебной лабораторией физического факультета.

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

Authors:

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

olga_parkhimovich@mail.ru

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

bichan@bsu.by

Klavdiya Ya. Bulanova, PhD (biology), docent; associate professor at the department of environmental chemistry and biochemistry.
bulanova_home@tut.by

в лизосомоподобных органеллах, обладает низкой чувствительностью к тапсигаргину, но высокой к tBHQ (2,5-ди-(трет-бутил)-1,4-гидрохинон). При стимуляции высокими концентрациями тапсигаргина и иономицином, вызывающими полное опустошение кальциевых депо тубулярной системы и лизосомоподобных органелл, в бескальциевой среде обнаруживаются различия в уровнях аккумулированного кальция в норме и в постлучевой период: отмечается повышение концентрации кальция на 3-и сутки в 1,4 раза. В структурах тубулярной системы тромбоцитов при действии низких концентраций тапсигаргина, ингибирующих SERCA2b Ca²⁺-АТФазы тубулярных систем, выявлено изменение в содержании депонированного кальция у облученных животных с повышением на 3-и сутки. В условиях ингибирования Ca²⁺-АТФазы SERCA3 в бескальциевой среде в тромбоцитах на 3-и сутки после облучения в дозе 1 Гр также отмечался более интенсивный выход ионов кальция по сравнению с контролем. На 10, 30, 90-е сутки не наблюдалось статистически значимых различий этих показателей.

В кальцийсодержащей среде наблюдалось более значительное поступление ионов кальция извне в цитоплазму вследствие активизации депо-управляемых механизмов в постлучевой период, особенно, на 3-и и 10-е сутки.

Ключевые слова: тромбоциты; γ -облучение; кальций; Ca²⁺-АТФазы; плотная тубулярная система.

FEATURES OF POST-RADIATION DISTURBANCES IN THE ACCUMULATION OF CALCIUM IONS IN INTRACELLULAR PLATELET DEPOTS AT DIFFERENT TIMES OF THE POST-RADIATION PERIOD

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

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

^bBelarusian State University,

4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

Corresponding author: O. G. Parkhimovich (olga_parkhimovich@mail.ru)

Calcium ions are an important intracellular regulator; an increase in their concentration in the cytoplasm plays a key role in determining the functional activity of platelets associated with platelet aggregation and the release reaction. The main way to reduce the concentration of free calcium ions in the platelet cytoplasm is the activation of Ca²⁺-ATPases of intracellular depositing structures and the plasma membrane, which reduce the cytoplasmic content of calcium due to its reuptake in the depot (resequestration) and the release of Ca²⁺ from the cell. Platelets express two Ca²⁺-ATPase isoforms in different depositor structures (SERCA2b and SERCA3) and two plasma membrane Ca²⁺-ATPase isoforms (PMCA1b and 4b). The SERCA2b isoform, which is Ca²⁺-ATPase of the dense tubular system, is inhibited by thapsigargin. The SERCA3 isoform present in acidic organelles has low sensitivity to thapsigargin, but high sensitivity to tBHQ (2,5-di-(tert-butyl)-1,4-hydroquinone). When stimulated with micromolar concentrations of thapsigargin and ionomycin, which cause complete depletion of the calcium depots of the tubular system and acid organelles, differences in the levels of accumulated calcium in the norm and in the post-radiation period are found in a calcium-free medium: an increase in calcium concentration by 1.4 times is noted on the 3rd day. In the structures of the tubular system of platelets, under the action of nmolar concentrations of thapsigargin, which inhibit SERCA2b Ca²⁺-ATPase of tubular systems, a change in the content of deposited calcium in irradiated animals was revealed with an increase on the 3rd day. Under conditions of inhibition of Ca²⁺-ATPase SERCA3 in a calcium-free medium in platelets on the 3rd day after irradiation at a dose of 1 Gy, a more intense release of calcium ions was also noted compared to the control. On the 10th, 30th, 90th day, there were no statistically significant differences in these indicators. In the calcium-containing medium, a more significant intake of calcium ions from the outside into the cytoplasm was observed due to the activation of depot-controlled mechanisms in the post-radiation period, especially on the 3rd and 10th days.

Keywords: platelets; γ -irradiation; calcium; Ca²⁺-ATPase; endoplasmic reticulum.

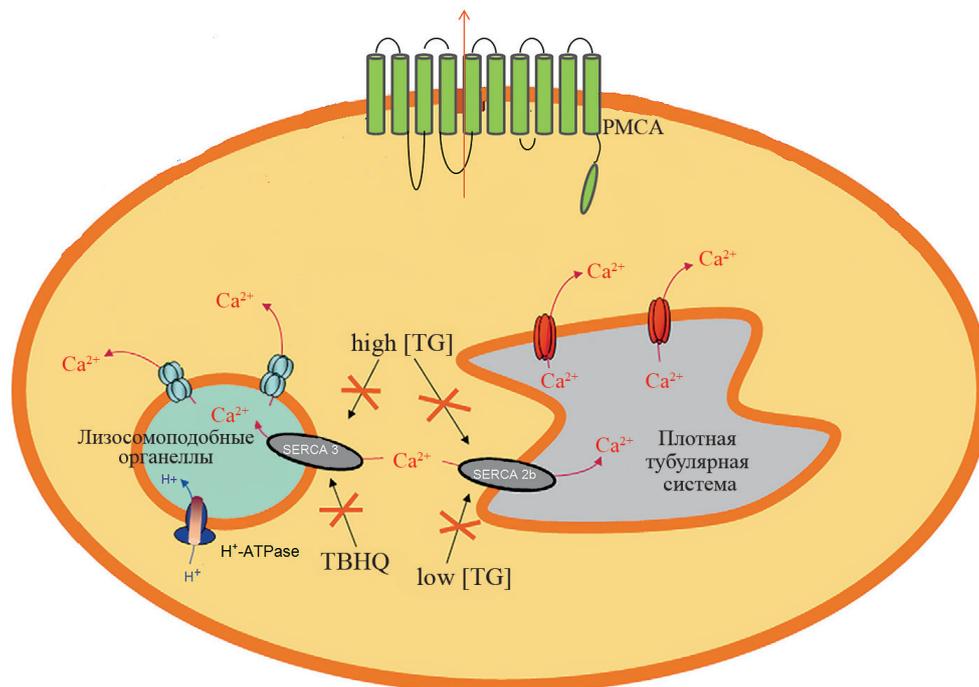
Введение

Общее содержание кальция в тромбоцитах составляет около 60 нмоль/10⁹ клеток. Часть этого кальция (25 %) связана с мембранами тромбоцитов, но значительное его количество содержится в тубулярной системе и плотных гранулах [1; 2].

Концентрация свободных ионов кальция в цитоплазме тромбоцитов (10⁻⁷ моль/л) ниже, чем в плазме (10⁻³ моль/л). Основной вклад в поддержание низкой концентрации цитоплазматического Ca²⁺ в тромбоцитах вносят Ca²⁺-АТФазы депонирующих систем и плазматической мембраны клеток [3]. Еще одной молекулярной системой снижения концентрации Ca²⁺ в тромбоцитах являются Na⁺/Ca²⁺ – обменники (NCX) плазматической мембраны, способные перемещать ионы кальция из цитоплазмы тромбоцитов в обмен на ионы натрия, однако они обладают меньшим средством к кальцию, нежели Ca²⁺-АТФазы [4–6].

Ca^{2+} -АТФазы плазмалеммы (PMCA) переносят Ca^{2+} с цитоплазматической стороны во внешнюю среду, блокируются ортованадатом. PMCA относится к АТФамам Р типа, подтипа II. Структура АТФазы представлена 10 трансмембранными доменами (ТМ) и двумя большими цитоплазматическими доменами между 2 и 3, и 5 ТМ. Ca^{2+} -АТФазы являются молекулярными насосами, использующим для переноса ионов АТФ. Различают две изоформы Ca^{2+} -АТФазы плазматической мембраны (PMCA1b и 4b) [7; 8].

АТФазы тубулярной системы. Тромбоциты экспрессируют две изоформы Ca^{2+} -АТФаз в разных депонирующих структурах (SERCA2b и SERCA3) (рис.). SERCA2b является Ca^{2+} -АТФазой плотной тубулярной системы, изоформа SERCA3 находится в лизосомоподобных органеллах [9]. Однако не столь много известно о способах их регулирования даже в норме, тем более при патологических состояниях различной этиологии, в том числе индуцированных радиацией.



Ca^{2+} -АТФазы депонирующих систем и плазматической мембраны: PMCA – Ca^{2+} -АТФаза плазматической мембраны, SERCA2b – Ca^{2+} -АТФаза плотной тубулярной системы, SERCA3 – Ca^{2+} -АТФаза лизосомоподобных органелл, TG – тапсигаргин, TBHQ – (2,5-ди-(трет-бутил)-1,4-гидрохинон

Выявлено, что после активации тромбоцитов и увеличения уровня $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит.}}$, SERCA насосы возвращают Ca^{2+} во внутриклеточные депо, в то время как PMCA качают его из клетки, являясь механизмами, обеспечивающими поддержание концентрации кальция внутри тромбоцитов на определенном уровне [10, 11]. Использование селективных блокаторов различных Ca^{2+} -АТФаз позволяет определить вклад отдельных АТФаз в поддержание низкого базового уровня ионов кальция в цитоплазме в норме, а также выявить постлучевые изменения функций индивидуальных Ca^{2+} -АТФаз разной локализации, их роль в формировании нарушений агрегационной способности тромбоцитов в разные сроки реабилитационного периода.

Материалы и методы исследования

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

Проведение экспериментов осуществлялось в соответствии с этическими нормами обращения с животными, а также правилами проведения работ с использованием лабораторных животных в научных исследованиях, обоснованными рекомендациями и требованиями «Европейской конвенцией по защите экспериментальных животных» (Директивы 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях от 22 сентября 2010 г.).

Перед забором крови крыс наркотизировали тиопенталом натрия (из расчета 45 мг/кг веса животного). Далее фиксировали на спине, привязывая лапки (петли из скрученного бинта захватывали лапки и привязывали к пластмассовым держателям операционного столика). После вскрытия грудной клетки животных, кровь бралась из левого желудочка (проходя через предсердие) короткой иглой с достаточно большим диаметром

и силиконовой трубкой на тупом конце, предварительно промытой раствором ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота (15 %)). Кровь стабилизировали 3,8 % раствором цитрата натрия (9:1, объем: объем).

Животных облучали (однократно и равномерно) на установке ИГУР γ -квантами ^{137}Cs в дозе 1 Гр (мощность дозы 0,62 Гр/мин, в течение 1,61 мин). Контролем служили животные соответствующего возраста. Облучение животных проведено на базе ГНУ «Институт радиобиологии НАН Беларуси». Объемы выборок показателей в экспериментальных и контрольных группах сравнения составляли $n = 16$ (в опытах) и $n = 18$ (в контролях).

Обогащенную тромбоцитами плазму (ОТП) получали центрифугированием крови при 200 g в течение 5 мин при комнатной температуре, бестромбоцитарную плазму получали в результате осаждения форменных элементов крови из ОТП при 650 g в течение 15 мин. Бестромбоцитарную плазму добавляли в ОТП для достижения количества тромбоцитов в среде до 2×10^8 кл/мл.

Для получения отмытых тромбоцитов ОТП разводили фосфатно-солевым буфером (4,3мМ K_2HPO_4 , 4,3мМ Na_2HPO_4 , 22,4мМ NaH_2PO_4 , 113мМ NaCl , 10мМ цитрат- Na , 5мМ D-глюкоза, pH 6,5) в соотношении 1:1 по объему и насливали на фиколл-верографин с плотностью $1,087 \pm 0,005$ г/мл. После центрифугирования при 250g в течение 15 мин при комнатной температуре тромбоциты располагались в широком мутном слое над кольцом мононуклеаров. Слой тромбоцитов переносили в пластиковые пробирки и осаждали центрифугированием при 650 g в течение 5 мин при комнатной температуре. Осадок после однократного отмывания суспендировали в буферном растворе (pH 6,5), доводя концентрацию клеток до $2-5 \times 10^8$ кл/мл. 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.

Полученные тромбоциты инкубировали с Fura-2/AM (конечная концентрация 2,5 мкмоль/л). Тромбоциты осаждали центрифугированием при 745 g, 8 мин. Отмытые тромбоциты суспендировали в *HEPES-буфер без Ca^{2+}* (pH 7,4) и довели 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+} рассчитывали на основе измерения флуоресценции при возбуждении этими двумя длинами волн по формуле:

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

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 – равно 224 нмоль/л.

Анализ и статистическая обработка данных проводилась на вычислительном комплексе IBM-PC/AT. С использованием программного обеспечения *GraphPad Prism 9* (Сан-Диего, Калифорния, США). Достоверность различий между средними значениями изучаемых параметров оценивалась по t-критерию Стьюдента.

Результаты исследования и их обсуждение

Предварительными исследованиями [12] выявлено, что в ближайшие сроки после облучения (3, 10, 30-е сутки) в дозе 1 Гр в тромбоцитах отмечается повышенный, по сравнению с контролем, базальный уровень ионов кальция в цитоплазме тромбоцитов. В контроле уровень кальция в бескальциевой среде составил $34,2 \pm 6,6$ нмоль/л, в кальцийсодержащей среде – $52,9 \pm 8,8$ нмоль/л. Максимально выраженное радиационно-стимулированное увеличение базального уровня цитоплазматического кальция характерно для 3-их суток постлучевого периода, как при отсутствии ($83,9 \pm 9,2^*$ нмоль/л), так и в присутствии ($173,7 \pm 15,5^*$ нмоль/л) ионов кальция во внешней среде. Повышенный уровень цитоплазматического кальция приводит к увеличению агрегационной активности тромбоцитов, что способствует возрастанию риска тромбообразования и ишемического поражения органов и систем. Важно было установить какую роль в пострadiационном увеличении уровня кальция в тромбоцитах играют изменения функций Ca^{2+} -АТФаз различной локализации.

В условиях отсутствия ионов кальция во внешней среде снижение уровня мобилизованных ионов Ca^{2+} в цитозоле до базального способны обеспечить Ca^{2+} -АТФазы запасующих структур: плотной тубулярной

системы и лизосомоподобных везикул [13; 14]. В тромбоцитах идентифицировано 2 различные изоформы Ca^{2+} -АТФаз: SERCA2b и SERCA3. Специфическим ингибитором изоформы SERCA2b, которая является Ca^{2+} -АТФазой плотной тубулярной системы, является тапсигаргин (ТГ), действующий на нее в наномолярных концентрациях [15]. Изоформа SERCA3, представленная в содержащих кислую фосфатазу органеллах, обладает низкой чувствительностью к ТГ (и ингибируется только при высоких микромолярных концентрациях ТГ), но высокой – к tBHQ (2,5-ди-(трет-бутил)-1,4-гидрохинону) [16]. Используя эти различия в чувствительности разных изоформ внутриклеточных Ca^{2+} -АТФаз к ингибиторам их активности можно избирательно оценивать их роль в формировании постлучевых нарушений функции тромбоцитов.

Чтобы оценить количество ионов Ca^{2+} , которое максимально накапливается в обоих типах внутриклеточных депо (плотной тубулярной системе и лизосомоподобных органеллах), использовался в качестве ингибитора тапсигаргин в высоких концентрациях (1 мкмоль/л), не позволяющий перемещать ионы кальция из цитоплазмы в разные депонирующие структуры. В дополнительных экспериментах использовался также иономицин (50 нмоль/л), способный вызывать перфорацию мембран. Иономицин является кальциевым ионофором, он образует комплекс с Ca^{2+} в соотношении 1:1, обменивая его на ионы водорода. Оба препарата через разные механизмы приводят к полному истощению обоих типов внутриклеточных Ca^{2+} -депо как с высоким, так и низким уровнем скорости утечки ионов Ca^{2+} .

Проведение данного эксперимента в отсутствии ионов кальция в среде инкубации позволяет оценить общее содержание ионов кальция, аккумулированное в тромбоцитах в отсутствии притока данных ионов извне (табл. 1).

Таблица 1

Изменение концентрации ионов кальция в цитоплазме тромбоцитов при действии иономицина (50 нмоль/л) в присутствии тапсигаргина (ТГ, 1 мкмоль/л) в норме и после облучения животных в дозе 1 Гр

Table 1

Changes in the concentration of calcium ions in the cytoplasm of platelets under the action of ionomycin (50 nmol/l) in the presence of thapsigargin (TG, 1 μmol/l) in normal conditions and after irradiation of animals at a dose of 1 Gy

Параметры	Контроль, нмоль/л Ca^{2+}	После облучения			
		3-и сутки, нмоль/л Ca^{2+}	10-е сутки, нмоль/л Ca^{2+}	30-е сутки, нмоль/л Ca^{2+}	90-е сутки, нмоль/л Ca^{2+}
Тапсигаргин + иономицин	463,8 ± 23,5	632,8 ± 29,3*	549,9 ± 76,8	471,5 ± 33,8	476,5 ± 26,4

Примечание. *Различия достоверны по отношению к контролю ($p < 0,05$).

Исследование особенностей функционирования депо-зависимых кальциевых механизмов выявили в ближайшие сроки постлучевого периода, что в тромбоцитах облученных животных отмечалось максимальное увеличение выхода ионов Ca^{2+} из депо после действия тапсигаргина в присутствии иономицина на 3-и сутки постлучевого периода.

На 10-е, 30-е, 90-е сутки после облучения значения концентраций ионов кальция в цитоплазме достоверно не отличалась от таковых показателей контрольной группы (см. табл. 1).

Таким образом, поскольку при действии иономицина в присутствии тапсигаргина происходит полное опустошение кальциевых депо тромбоцитов, то полученные данные свидетельствуют о том, что на 3-и сутки количество цитоплазматического Ca^{2+} , аккумулированного во внутриклеточных пулах тромбоцитов облученных крыс выше, чем в тромбоцитах контрольной группы и в кровяных пластинках на 10-е, 30-е и 90-е сутки после облучения.

Избирательное ингибирование Ca^{2+} -АТФазы (SERCA2b) низкими концентрациями тапсигаргина (ТГ) (10 нмоль/л) приводило к росту концентрации $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ в цитоплазме тромбоцитов из-за возникающего дисбаланса между процессами, контролирующими выход ионов кальция из депо и процессами обратного их поступления в депонирующие структуры. Так, в контрольной группе уровень кальция увеличивался с $34,2 \pm 6,6$ нмоль/л (базальный уровень кальция в тромбоцитах крыс) до $140,1 \pm 26,7$ нмоль/л (уровень кальция при действии тапсигаргина). Максимальный выход ионов кальция из SERCA2b депо наблюдался на 3-и сутки после облучения, превышая в 1,7 раз уровень контроля. После облучения животных повышение концентрации ионов кальция в тромбоцитах крыс после добавления ТГ на 10, 30, 90-е сутки статистически не отличалось от значений, полученных в контрольной группе животных (табл. 2).

При изучении высвобождения ионов кальция в цитоплазму в бескальциевой среде при ингибировании Ca^{2+} -АТФаз (SERCA3) лизосомоподобных органелл тромбоцитов с использованием tBHQ (20 мкмоль/л) выявлено, что максимальная концентрация высвободившихся ионов кальция в цитоплазму тромбоцитов также отмечалась на 3-и сутки – $189,5 \pm 25,7$ нмоль/л, превышая на 28 % уровень контроля. Тогда как

уровень повышения ионов кальция при добавлении tBHQ (20 мкмоль/л) в бескальциевой среде на 10-е, 30-е, 90-е сутки не отличался от значений в контрольной группе (табл. 3).

Таблица 2

Влияние низких концентраций ТГ (10 нмоль/л) на выход ионов кальция из плотной тубулярной системы тромбоцитов в разные сроки постлучевого периода

Table 2

Effect of low concentrations of thapsigargin (10 nmol/l) on the release of calcium ions from the dense tubular system of platelets at different times of the post-radiation period

Параметры	Контроль	После облучения			
		3-и сутки	10-е сутки	30-е сутки	90-е сутки
Концентрация ионов кальция (нмоль/л) в цитоплазме в присутствии 10 нмоль/л ТГ	140,1 ± 26,7	238,5 ± 17,2*	150,2 ± 16,8	148,1 ± 10,6	123,0 ± 12,0

Примечание. *Различия достоверны по отношению к контролю ($p < 0,05$).

Таблица 3

Особенности поступления ионов кальция в цитоплазму тромбоцитов в присутствии tBHQ (20 мкмоль/л) в бескальциевой среде (100 мкмоль/л ЭГТА)

Table 3

Features of the entry of calcium ions into the cytoplasm of platelets in the presence of tBHQ (20 μmol/l) in a calcium-free medium (100 μmol/l EGTA)

Параметры	Контроль	После облучения			
		3-и сутки	10-е сутки	30-е сутки	90-е сутки
Уровень кальция в цитоплазме (нмоль/л) в присутствии tBHQ (20 мкмоль/л) в бескальциевой среде (100 мкмоль/л ЭГТА),	147,3 ± 17,3	189,5 ± 25,7*	148,9 ± 13,2	134,6 ± 9,3	129,8 ± 18,5

Примечание. *Различия достоверны по отношению к контролю ($p < 0,05$).

Однако добавление ионов кальция в среду инкубации приводило к значительному увеличению входа ионов Ca^{2+} в цитоплазму тромбоцитов.

Высвобождение ионов кальция в цитоплазму при наличии $CaCl_2$ во внеклеточной среде способствовало реализации депо-зависимых механизмов входа ионов кальция через плазматическую мембрану, который осуществляется несколькими белками, среди которых STIM1 (stromal interaction molecule 1), Orai1 (calcium-release activated calcium modulator 1) и некоторые TRPC (transient receptor potential channels).

Депо-управляемое поступление ионов кальция (SOCE, store-operated calcium entry) активируется при изменении внутриклеточной концентрации $[Ca^{2+}]_{цит}$. SOCE функционирует за счет молекулы стромального взаимодействия 1 (STIM1) и способствуют притоку кальция из внутренних депо (плотной трубчатой системы и лизосомоподобных органелл) тромбоцитов. STIM1 является Ca^{2+} сенсорной молекулой [17].

STIM1 содержит два N-концевых EF домена в просвете плотной тубулярной системы, способных связывать ионы кальция. После опустошения депо это связывание прекращается, и STIM1 перераспределяет свои функции, открывая SOC каналы в плазматической мембране. SOC каналы находятся на плазматической мембране и способствуют притоку кальция из внеклеточного пространства, вследствие истощения Ca^{2+} во внутриклеточных хранилищах, вызывая стимуляцию поверхностных рецепторов, сопряженных с каналами семейства TRP («Transient Receptor Potential») [18].

Под воздействием STIM1 в плазмолемме происходит открытие Orai1 канала. Он представляет собой белок плазматических мембран с четырьмя предполагаемыми трансмембранными доменами и внутриклеточными C- и N- терминалями. Было показано, что Orai1 является единицей формирования пор депо – контролируемого кальциевого канала, и является основным каналом плазматической мембраны, участвующим в депо-зависимом входе кальция в тромбоцитах [19].

Добавление $CaCl_2$ в среду при использовании ТГ (10 нмоль/л) показало, что эти механизмы увеличивали свою эффективность в тромбоцитах облученных животных в большей мере, чем в контроле (табл. 4). Максимальный вход ионов кальция в цитоплазму тромбоцитов из внешней среды выявлен на 3-и сутки после облучения. На 10-е сутки уровень кальция также был повышен. К 30-м и 90-м суткам интенсивность

входа ионов кальция уменьшалась, и количество цитоплазматического кальция статистически не отличалось от контрольных показателей.

Схожие данные получены и при действии tBHQ (табл. 4). Внесение 1 мМоль CaCl₂ в среду инкубации после действия tBHQ привело к более значительному поступлению ионов кальция извне в цитоплазму вследствие активизации депо-управляемых механизмов. Эффекты трансмембранного входа ионов кальция в наибольшей степени были выражены на 3-и сутки, несколько снижаясь на 10-е сутки. На 30-е и 90-е сутки постлучевого периода показатели соответствовали контрольным значениям.

Таблица 4

Особенности поступления ионов кальция в цитоплазму тромбоцитов в присутствии тапсигаргина (10 нмоль/л) и tBHQ (20 мкмоль/л) в присутствии CaCl₂ (1 мМоль)

Table 4

Features of the entry of calcium ions into the cytoplasm of platelets in the presence of thapsigargin (10 nmol/l) and tBHQ (20 μmol/l) in the presence of CaCl₂ (1 mmol)

Параметры	Контроль	После облучения			
		3-и сутки	10-е сутки	30-е сутки	90-е сутки
Уровень кальция в цитоплазме (нмоль/л) в присутствии ТГ (10 нмоль/л) в кальцийсодержащей среде	353,5 ± 20,1	1500,2 ± 125,6*	608,9 ± 18,3*	405,8 ± 19,9	368,2 ± 22,3
Уровень кальция в цитоплазме (нмоль/л) в присутствии tBHQ (20 мкмоль/л) и CaCl ₂ (1 мМоль)	662,4 ± 54,9	1275,3 ± 95,3*	885,8 ± 83,2*	604,9 ± 63,7	542,8 ± 97,6

Примечание. *Различия достоверны по отношению к контролю ($p < 0,05$).

Полученные данные свидетельствуют, что в ближайшие сроки после облучения (3-и и 10-е сутки) в тромбоцитах крыс наблюдается рассогласованность в функционировании систем, отвечающих за поступление кальция из внеклеточного пространства и закачку во внутриклеточные депо.

Заключение

При внесении в среду инкубации иономицина (50 нмоль/л) и высоких концентраций тапсигаргина (1 мкмоль/л), вызывающими полное опустошение кальциевых депо тубулярной системы и лизосомоподобных органелл тромбоцитов, в бескальциевой среде обнаруживается увеличение в 1,36 раз уровня аккумулированного кальция на 3-и сутки постлучевого периода по сравнению с контролем.

В бескальциевой среде при действии низких концентраций тапсигаргина (10 нмоль/л), как ингибирующих SERCA2b Ca²⁺-АТФазы тубулярной системы, так и при действии tBHQ (20 мкмоль/л), ингибирующего Ca²⁺-АТФазы SERCA3, в тромбоцитах крыс наблюдается увеличение уровня кальция на 3-и сутки постлучевого периода по сравнению с контрольной группой.

В постлучевом периоде как при наличии ионов кальция в инкубационной среде при действии ТГ, так и tBHQ наблюдается более значительное поступление ионов кальция в цитоплазму тромбоцитов извне на 3-и и 10-е сутки вследствие активизации депо-управляемых механизмов.

Библиографические ссылки

- Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodeling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2003;7:517–529. DOI: 10.1038/nrm1155.
- Martin V, Bredoux R, Corvazier E. Platelet Ca²⁺ATPases. *Hypertension*. 2000;35:91–102. DOI:10.1161/01.HYP.35.1.91.
- Wuytack F, Papp B, Verboomen H. A sarcoendoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase 3-type Ca²⁺ pump is expressed in platelets, in lymphoid cells, and in mast cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1994;2:1410–1416. DOI: 10.1016/S0021-9258(17)42273-3.
- Dean WL. Role of platelet plasma membrane Ca²⁺-ATPase in health and disease. *World Journal of Biological Chemistry*. 2010; 1(9):265-270. DOI:10.4331/wjbc.v1.i9.265.
- Flaumenhaft R. SERCA navigating calcium signaling in platelets. *Blood*. 2016;128(8):1034–1035. DOI: 10.1182/blood-2016-07-723965.
- Martin V, Bredoux R, Corvazier E. Three novel sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) 3 isoforms. Expression, regulation, and function of the membranes of the SERCA3 family. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(27):24442–24452. DOI: 10.1074/jbc.M202011200.
- Varga-Szabo D, Braun A, Nieswandt B. Calcium signaling in platelets. *Journal of thrombosis and haemostasis*. 2009;7:1057–1066. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2009.03455.x.
- Berrolcal M, Mata AM. The plasma membrane Ca²⁺-ATPase, a molecular target for Tau-induced cytosolic calcium dysregulation. *Neuroscience*. 2022. S0306-4522(22)00198-1. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2022.04.016.

9. Dean WL. Role of platelet plasma membrane Ca²⁺-ATPase in health and disease. *World Journal of Biological Chemistry*. 2010;1(9): 265–270. DOI:10.4331/wjbc.v1.i9.265.
10. Feng M, Elaïb Z, Borgel D. NAADP/SERCA3-dependent Ca²⁺ stores pathway specifically controls early autocrine ADP secretion potentiating platelet activation. *Circulation Research*. 2020;127(7):166–183. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.119.316090.
11. Redondo PC, Rosado JA, Pariente JA. Collaborative effect of SERCA and PMCA in cytosolic calcium homeostasis in human platelets. *Journal of Physiology and Biochemistry*. 2005;61:507–516. DOI: 10.1007/BF03168376.
12. Пархимович О. Г., Бичан О. Д., Буланова К. Я. Постлучевые изменения регуляции цитоплазматического кальция в тромбоцитах, активированных АДФ и тромбином. *Журнал Белорусского государственного университета. Экспериментальная биология и биотехнология*. 2023;1:56–61.
13. Васильева Е. Ф., Брусов О. С. Тромбоциты, гемостаз и психические расстройства. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2019;119:103–108. DOI:10.17116/jnevro2019119111103.
14. Stafford N, Wilson C, Oceandy D. The plasma membrane calcium ATPases and their role as major new players in human disease. *Physiological Reviews*. 2017;97(3):1089–1125. DOI: 10.1152/physrev.00028.201.
15. Kovács T, Felföldi F, Papp B. All three splice variants of the human sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 3 gene are translated to proteins: a study of their co-expression in platelets and lymphoid cells. *Biochemical Journal*. 2001;358(3):559–568. DOI: 10.1042/0264-6021:3580559.
16. Bobe R, Bredoux R, Wuytack F. The rat platelet 97-kDa Ca²⁺ATPase isoform is the sarcoendoplasmic reticulum Ca²⁺ATPase 3 protein. *Journal of biological chemistry*. 1994;2:1417–1424.
17. López JJ, Jardín I, Bobe R. STIM1 regulates acidic Ca²⁺ store refilling by interaction with SERCA3 in human platelets. *Biochemical Pharmacology*. 2008;75(11):2157–2164. DOI: 10.1016/j.bcp.2008.03.010.
18. Oh-Hora M, Yamashita M, Hogan PG. Dual functions for the endoplasmic reticulum calcium sensors STIM1 and STIM2 in T cell activation and tolerance. *Nature Immunology*. 2008;9(4):432–443. DOI: 10.1038/ni1574.
19. Stathopoulos PB, Ikura M. Store operated calcium entry: From concept to structural mechanisms. *Cell Calcium*. 2017;63:3–7. DOI: 10.1016/j.ceca.2016.11.005.

References

1. Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodeling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2003;7:517–529. DOI: 10.1038/nrm1155.
2. Martin V, Bredoux R, Corvazier E. Platelet Ca²⁺ATPases. *Hypertension*. 2000;35:91–102. DOI:10.1161/01.HYP.35.1.91.
3. Wuytack F, Papp B, Verboomen H. A sarcoendoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase 3-type Ca²⁺ pump is expressed in platelets, in lymphoid cells, and in mast cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1994;2:1410–1416. DOI: 10.1016/S0021-9258(17)42273-3.
4. Dean WL. Role of platelet plasma membrane Ca²⁺-ATPase in health and disease. *World Journal of Biological Chemistry*. 2010; 1(9):265-270. DOI:10.4331/wjbc.v1.i9.265.
5. Flaumenhaft R. SERCA navigating calcium signaling in platelets. *Blood*. 2016;128(8):1034–1035. DOI: 10.1182/blood-2016-07-723965.
6. Martin V, Bredoux R, Corvazier E. Three novel sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) 3 isoforms. Expression, regulation, and function of the membranes of the SERCA3 family. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(27):24442–24452. DOI: 10.1074/jbc.M202011200.
7. Varga-Szabo D, Braun A, Nieswandt B. Calcium signaling in platelets. *Journal of thrombosis and haemostasis*. 2009;7:1057–1066. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2009.03455.x.
8. Berrocal M, Mata AM. The plasma membrane Ca²⁺-ATPase, a molecular target for Tau-induced cytosolic calcium dysregulation. *Neuroscience*. 2022. S0306-4522(22)00198-1. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2022.04.016.
9. Dean WL. Role of platelet plasma membrane Ca²⁺-ATPase in health and disease. *World Journal of Biological Chemistry*. 2010;1(9): 265–270. DOI:10.4331/wjbc.v1.i9.265.
10. Feng M, Elaïb Z, Borgel D. NAADP/SERCA3-dependent Ca²⁺ stores pathway specifically controls early autocrine ADP secretion potentiating platelet activation. *Circulation Research*. 2020;127(7):166–183. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.119.316090.
11. Redondo PC, Rosado JA, Pariente JA. Collaborative effect of SERCA and PMCA in cytosolic calcium homeostasis in human platelets. *Journal of Physiology and Biochemistry*. 2005;61:507–516. DOI: 10.1007/BF03168376.
12. Parkhimovich OG, Bichan OD, Bulanova KYa. Postluchevyye izmeneniya regulyatsii tsitoplazmaticheskogo kal'tsiya v trombotsitakh, aktivirovannykh ADF i trombinom [Post-radiation changes in the regulation of cytoplasmic calcium in platelets activated by ADP and thrombin]. *Zhurnal Belorusskogo gosudarstvennogo universiteta. Eksperimental'naya biologiya i biotekhnologiya*. 2023;1: 56–61. Russian.
13. Vasil'yeva YeF, Brusov OS. Trombotsity, gemostaz i psikhicheskiye rasstroystva. [Platelets, hemostasis and mental disorders]. *Zhurnal neurologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova*. 2019;119:103–108. Russian. DOI:10.17116/jnevro2019119111103.
14. Stafford N, Wilson C, Oceandy D. The plasma membrane calcium ATPases and their role as major new players in human disease. *Physiological Reviews*. 2017;97(3):1089–1125. DOI: 10.1152/physrev.00028.201.
15. Kovács T, Felföldi F, Papp B. All three splice variants of the human sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 3 gene are translated to proteins: a study of their co-expression in platelets and lymphoid cells. *Biochemical Journal*. 2001;358(3):559–568. DOI: 10.1042/0264-6021:3580559.
16. Bobe R, Bredoux R, Wuytack F. The rat platelet 97-kDa Ca²⁺ATPase isoform is the sarcoendoplasmic reticulum Ca²⁺ATPase 3 protein. *Journal of biological chemistry*. 1994;2:1417–1424.
17. López JJ, Jardín I, Bobe R. STIM1 regulates acidic Ca²⁺ store refilling by interaction with SERCA3 in human platelets. *Biochemical Pharmacology*. 2008;75(11):2157–2164. DOI: 10.1016/j.bcp.2008.03.010.
18. Oh-Hora M, Yamashita M, Hogan PG. Dual functions for the endoplasmic reticulum calcium sensors STIM1 and STIM2 in T cell activation and tolerance. *Nature Immunology*. 2008;9(4):432–443. DOI: 10.1038/ni1574.
19. Stathopoulos PB, Ikura M. Store operated calcium entry: From concept to structural mechanisms. *Cell Calcium*. 2017;63:3–7. DOI: 10.1016/j.ceca.2016.11.005.