

# ВЛИЯНИЕ ИОННОЙ ПРОВОДИМОСТИ ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ ТРОМБОЦИТОВ НА ИХ АГРЕГАЦИОННУЮ АКТИВНОСТЬ

А. А. Грудский

*Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4,  
220030, г. Минск, Беларусь, alexandergruds@gmail.com  
Научный руководитель — Е. В. Шамова, кандидат биологических наук*

В данной работе рассмотрено влияние состава внеклеточной среды и регуляторов ионной активности на агрегационную активность тромбоцитов. Показано, что деполяризация плазматической мембраны тромбоцитов в растворах с превалирующим содержанием  $K^+$  приводила к потенцированию АДФ-индуцированной агрегации, тогда как блокировка калиевой проводимости не вызывала достоверных изменений. Активация или ингибирование механочувствительного канала Piezo 1 не влияла на агрегационную активность тромбоцитов, тогда как ингибирование канала  $K_{Ca} 1.1$  приводило к ее потенцированию. При ингибировании каналов группы  $K_v 1$  наблюдалась тенденция к снижению АДФ-индуцированной агрегации. Данные результаты могут помочь в разработке подходов к корректровке патологий тромбоцитарного звена гемостаза.

**Ключевые слова:** тромбоциты; клеточная регуляция; АДФ-индуцированная агрегация; ионные каналы.

Тромбоциты представляют собой безъядерные клетки крови, обеспечивающие образование первичной пробки в области повреждения сосуда. Их ключевая роль в организме состоит в процессе свёртывания крови и образования тромбов. Агрегация представляет собой стадию "слипания" тромбоцитов за счёт взаимодействия белка плазмы фибриногена и рецептора тромбоцитов интегрина  $\alpha IIb\beta 3$  [1]. Однако, агрегация тромбоцитов также может привести к патологическому образованию тромбов, наблюдающиеся при сердечно-сосудистых заболеваниях, таких как ишемическая болезнь сердца, острый коронарный синдром [2]. По современным данным, ионная проводимость мембраны тромбоцитов непосредственно связана с их агрегационной активностью. Воздействуя на ионные каналы тромбоцитов можно достигнуть регуляции их активности. Поэтому изучение влияния ионной проводимости на агрегацию тромбоцитов может помочь в понимании механизмов тромбообразования и разработке новых подходов к его регуляции. В связи с этим, цель данной работы заключается в исследовании влияния ионной проводимости плазматической мембраны и регуляторов ионных каналов на агрегационную активность тромбоцитов.

Агрегацию тромбоцитов исследовали с применением анализатора агрегации SOLAR2110 («СОЛАР», Беларусь). Тромбоциты выделяли методом

последовательного центрифугирования. При изучении влияния изменения ионного состава среды на процесс АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов использованы буферы Тироде с превалирующим содержанием ионов  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{KAsp}$ ,  $\text{Cs}$ , состав которых представлен в таблице.

#### Ионный состав буферов

<p><b>Буфер Тироде-NaCl:</b>  <math>\text{NaCl}</math> 137 мМ; <math>\text{KCl}</math> 2,7 мМ;  <math>\text{NaHCO}_3</math> 11,9 мМ;  <math>\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}</math> 0,43 мМ;            Нерес 5 мМ; БСА 3,5 г/л (0,35%);            D-глюкоза 5,5 мМ.</p>	<p><b>Буфер Тироде-KCl:</b>  <math>\text{KCl}</math> 137 мМ; <math>\text{NaHCO}_3</math> 11,9 мМ;  <math>\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}</math> 0,43 мМ;            Нерес 5 мМ; БСА 3,5 г/л (0,35%);            D-глюкоза 5,5 мМ.</p>
<p><b>Буфер Тироде-CsCl:</b>  <math>\text{KCl}</math> 2,7 мМ; <math>\text{CsCl}</math> 137 мМ;  <math>\text{NaHCO}_3</math> 11,9 мМ;  <math>\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}</math> 0,43 мМ;            Нерес 5 мМ; БСА 3,5 г/л (0,35%);            D-глюкоза 5,5 мМ.</p>	<p><b>Буфер Тироде-KAsp:</b>  <math>\text{KCl}</math> 2,7 мМ; <math>\text{KAsp}</math> 137 мМ;  <math>\text{NaHCO}_3</math> 11,9 мМ;  <math>\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}</math> 0,43 мМ;            Нерес 5 мМ; БСА 3,5 г/л (0,35%);            D-глюкоза 5,5 мМ.</p>

В кювету агрегометра вносили 300 мкл буферного раствора. Далее, в кювету добавляли суспензию отмывтых тромбоцитов до получения светопропускания 45–48% (концентрация клеток около 250000/мкл), после чего вносили фибриноген в концентрации 1 мг/мл. Для изучения влияния регуляторов ионных каналов на процесс АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов были выбраны: Yoda 1 (активатор механочувствительного канала Piezo 1), 4AP (ингибитор канала  $\text{K}_v$ ), Penitrem A (ингибитор канала  $\text{K}_{\text{Ca}1.1}$  канала), GsMTx4 (ингибитор механочувствительного канала Piezo 1).

На рисунке 1а показаны типичные кинетические кривые АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов при разных составах внеклеточной среды. Степень АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов с превалирующим содержанием ионов  $\text{K}^+$  и  $\text{KAsp}$  была выше чем у контроля (буфер с превалирующим содержанием  $\text{NaCl}$ ). В тоже время АДФ-индуцированная агрегация тромбоцитов с превалирующим содержанием ионов  $\text{Cs}$  была ниже, чем контроль.

На рис. 1б представлены результаты статистического анализа АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов во внеклеточном растворе с различным ионным составом. Полученные в результате выполнения работы данные свидетельствуют о влиянии внеклеточной среды на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов. Так, увеличение содержание ионов  $\text{K}^+$  и  $\text{KAsp}$  во внеклеточной среде приводило к потенцированию АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов, что ассоциировано с деполяризацией их плазматической мембраны и активацией  $\text{K}_v$  каналов [3].

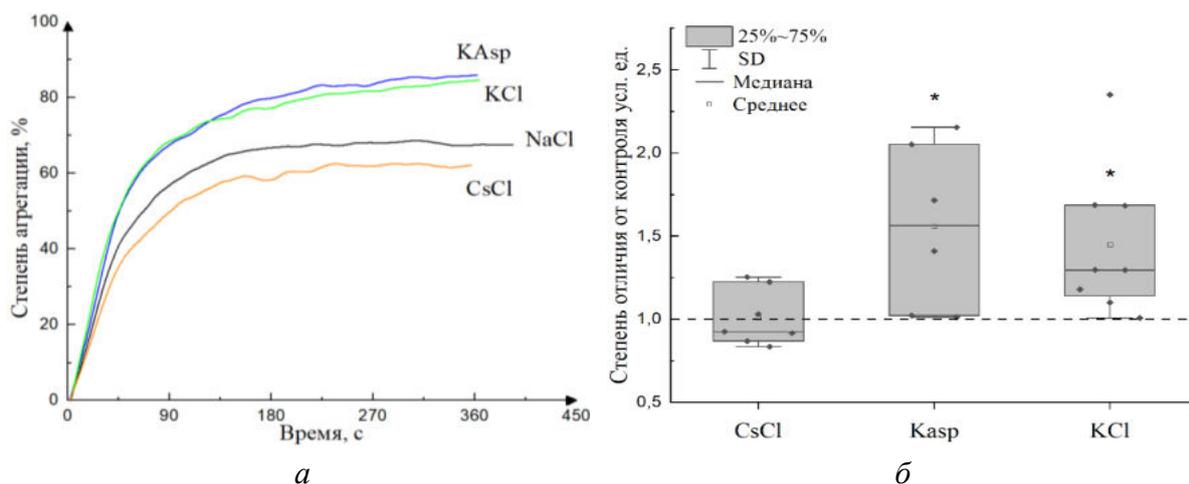


Рис. 1. АДФ-индуцированная агрегация тромбоцитов в буферных растворах с различным ионным составом: а – Типичные кинетические кривые АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов; б – Результаты статистического анализа АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов.  $P < 0.05$  относительно контроля ( $n=5-8$ , критерий Манна-Уитни)

На рис. 2а представлены типичные кинетические кривые агрегации тромбоцитов, индуцированной АДФ, при добавлении различных регуляторов ионных каналов. Как видно из кинетических кривых, степень АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов при наличии ингибитора канала  $K_{Ca} 1.1$  (Penitrem A) была выше относительно контроля. Степень АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов при наличии ингибитора канала  $K_v$  (4AP) была ниже относительно контроля (буфер с превалирующим содержанием NaCl). В тоже время, степень АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов при наличии регуляторов механочувствительных каналов Piezo 1 (Yoda1 и GsMTX4) не изменялась.

На рис. 2б представлены результаты статистического анализа данных по АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов в присутствии регуляторов ионных каналов. Полученные в результате выполнения работы данные свидетельствуют, о том что добавление ингибитора канала  $K_{Ca} 1.1$  (Penitrem A) приводило к достоверному потенцированию агрегации, индуцированной АДФ, что, возможно, связано с формированием прокоагулянтной популяции тромбоцитов [4]. Так же при использовании ингибитора канала  $K_v$  (4AP) наблюдалась тенденция к снижению АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов, что согласуется с данными по агрегации тромбоцитов в буферных растворах с превалирующим содержанием ионов  $K^+$  и KAsp [3].

В результате исследования было установлено, что агрегация тромбоцитов, индуцированная АДФ, зависит от ионного состава внеклеточной среды.

При исследовании агрегации тромбоцитов во внеклеточных растворах с превалярующим содержанием ионов  $K^+$ , наблюдалось потенцирование АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов, что ассоциировано с деполяризацией их плазматической мембраны и активацией  $K_v$  каналов [3].

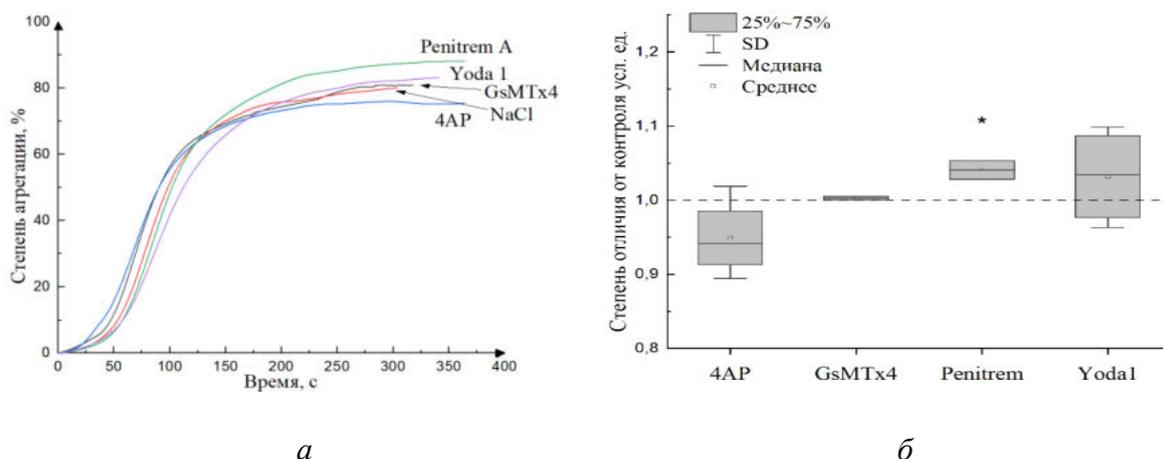


Рис. 2. АДФ-индуцированная агрегация тромбоцитов в присутствии регуляторов ионных каналов: *а* – Типичные кинетические кривые АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов; *б* – Результаты статистического анализа АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов.  $P < 0.05$  относительно контроля ( $n = 3-6$ , критерий Манна-Уитни)

Присутствие регуляторов механочувствительного канала Piezo 1 (Yoda 1, GsMTx4) не влияло на АДФ индуцированную агрегацию тромбоцитов. В присутствии ингибитора канала  $K_{Ca1.1}$  (Penitrem A) наблюдалось достоверное потенцирование АДФ-индуцированной агрегации, что, возможно, связано с увеличением содержания ионов  $Ca^{2+}$  во внутриклеточной среде при работе данных каналов, что в свою очередь приводит к формированию прокоагулянтной популяции тромбоцитов [4]. При использовании ингибитора канала  $K_v$  (4AP) наблюдалась тенденция к снижению АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов.

Полученные результаты, а также более глубокое изучение влияния ионной проводимости плазматической мембраны тромбоцитов на их агрегационную активность может помочь в разработке новых методов диагностики патологий сердечно сосудистых заболеваний и новых методов их коррекции [2].

### Библиографические ссылки

1. Rumbaut R.E., Thiagarajan P. Platelet-vessel wall interactions in hemostasis and thrombosis: Morgan & Claypool Life Sciences, 2010.

2. *Мирзаев К. Б., Андреев Д. А., Сычев Д. А.* Оценка агрегации тромбоцитов в клинической практике // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. 2015. Т. 11, № 1. С. 85-91.
3. Patch-clamp technique for studying ion channels in activated platelets / A. Kokhan [et al.] // SBPR. 2021. Vol. 1, № 1. P. 3–11.
4. *Обыденный С.И.* Динамика и механизмы образования прокоагулянтной субпопуляции тромбоцитов: дис. канд. биол. наук. 03.01.02 – М, 2020. – 105 с.