

# **Кальциевые осцилляции в тромбоцитах рыб**

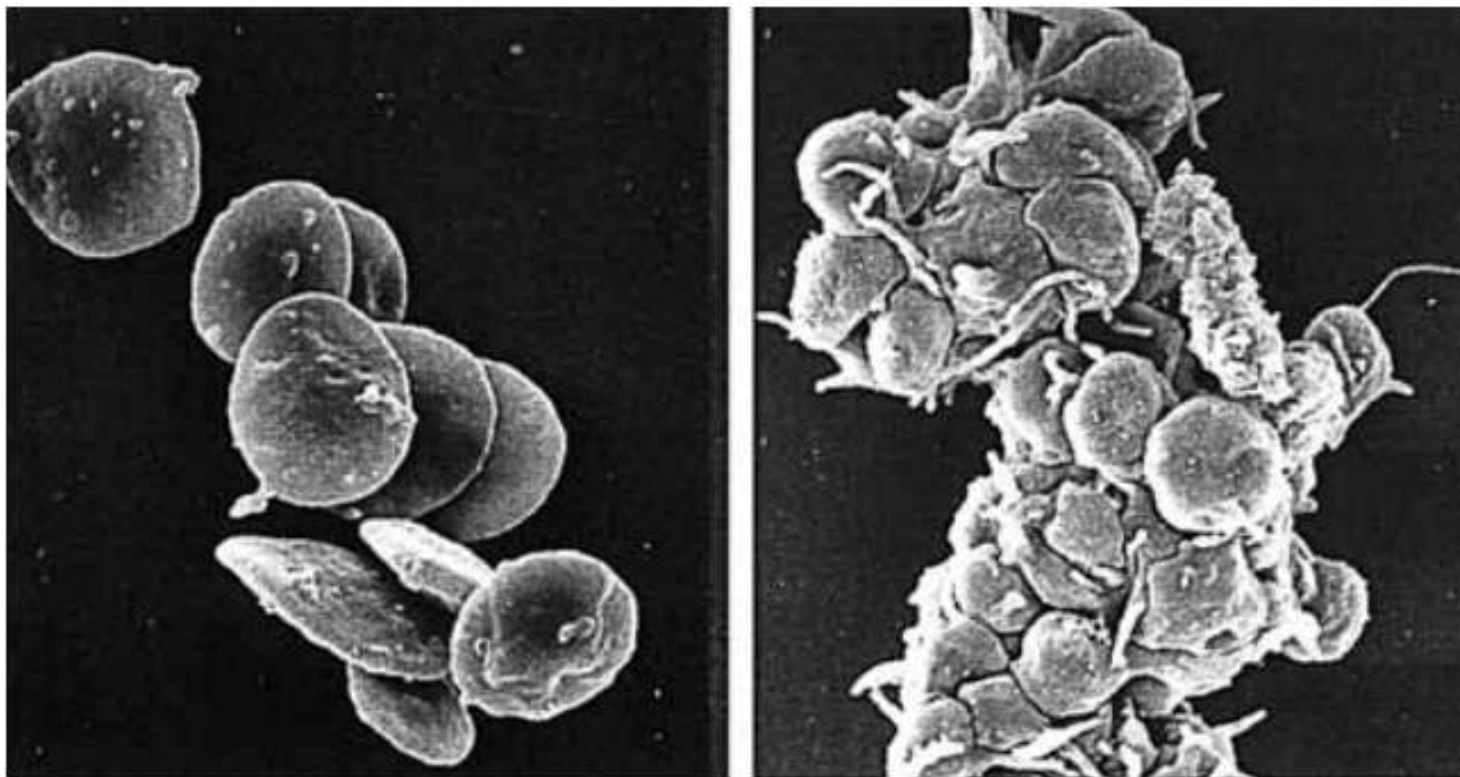
Ногина Дарья

СУНЦ МГУ имени М. В. Ломоносова

Научный руководитель - Свешникова Анастасия  
Никитична

МГУ имени М. В. Ломоносова, физический факультет,  
кафедра биофизики

# Что такое тромбоциты?

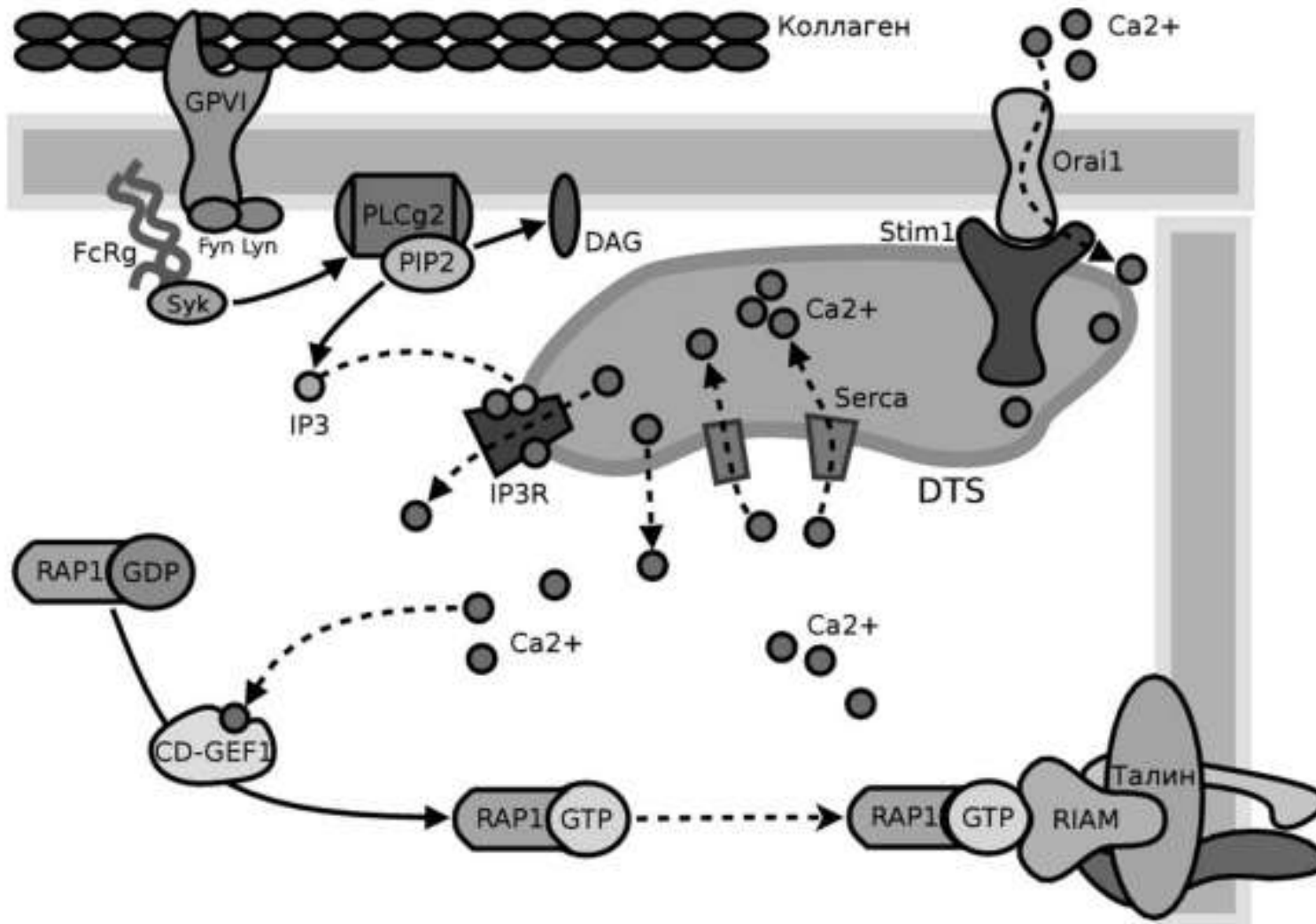


Слева: неактивированные тромбоциты, сохраняющие дисковидную форму, справа: активированные АДФ тромбоциты в агрегате

Тромбоциты участвуют в свёртывании крови: формируют пробку-агрегат

«Тромбоциты и гемостаз» М. А. Пантелеев, А. Н. Свешникова, Фундаментальные исследования в практической медицине на современном этапе

# Роль кальция в активации тромбоцита

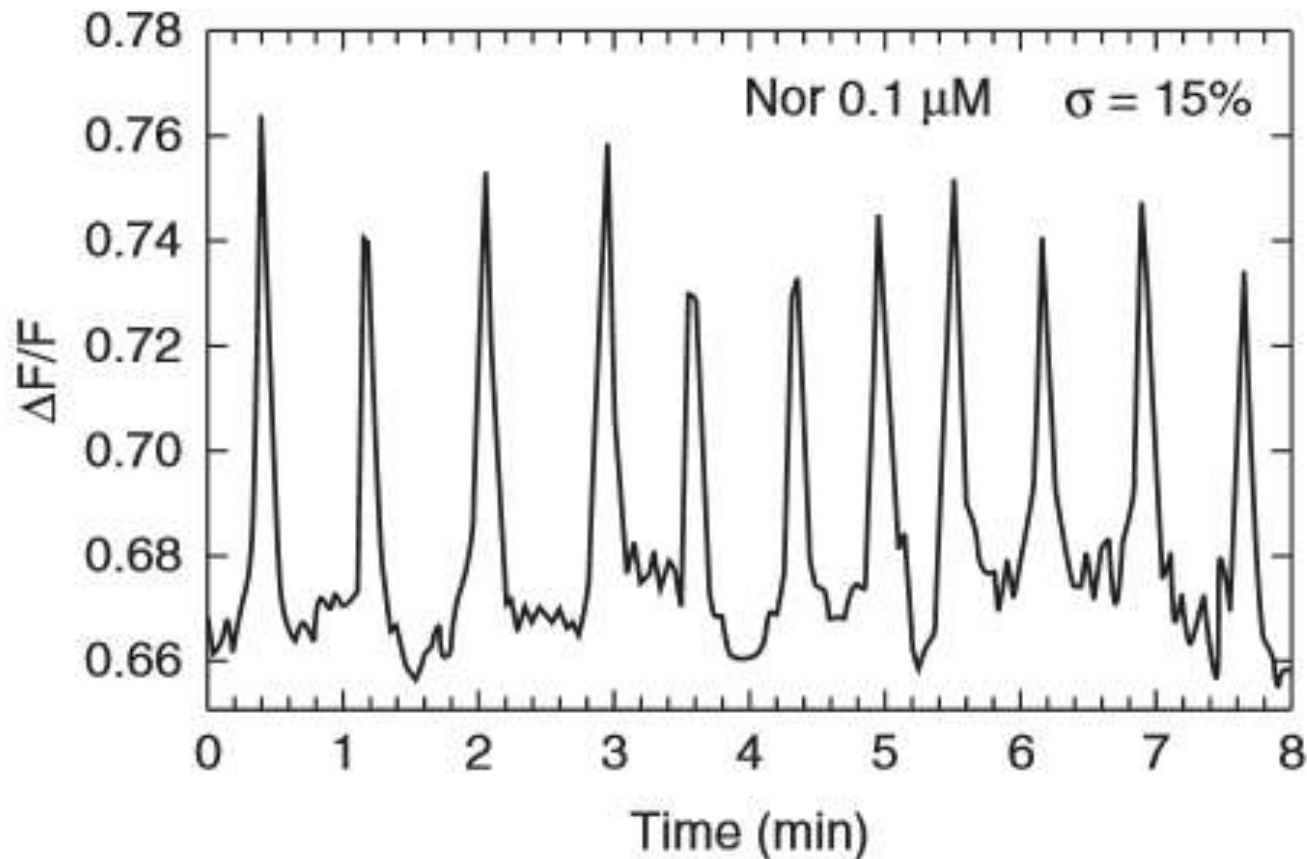


1. Активация интегрина  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ , как следствие агрегация тромбоцитов посредством фибриногена
2. Активация гельсолина, фосфорилирование лёгких цепей миозина, распластывание тромбоцита

«Активаторы, рецепторы и пути внутриклеточной сигнализации в тромбоцитах крови» В. И. Шатурный, С. С. Шахиджанов, А. Н. Свешникова, М. А. Пантелеев. Биомедицинская химия, 2014, т. 60, вып. 2, с. 182-200

# Природа кальциевых осцилляций

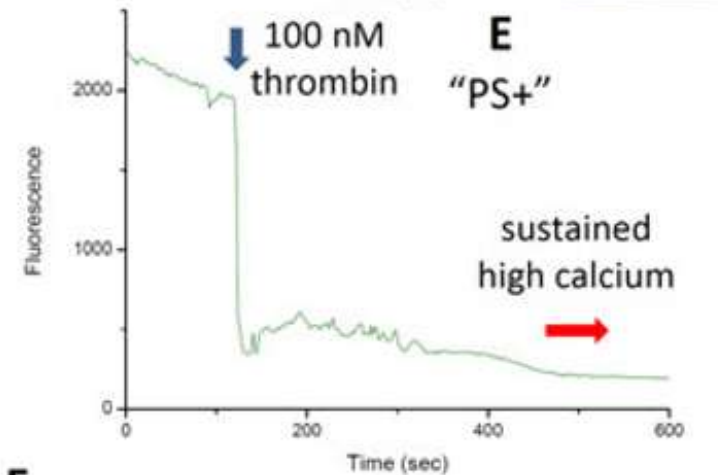
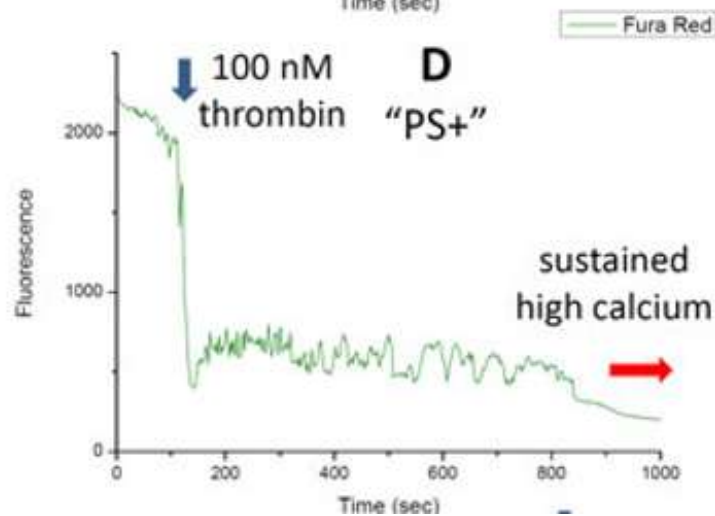
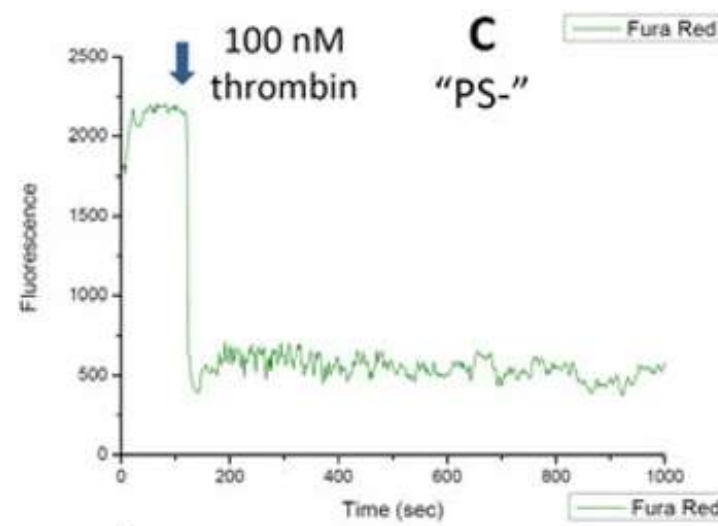
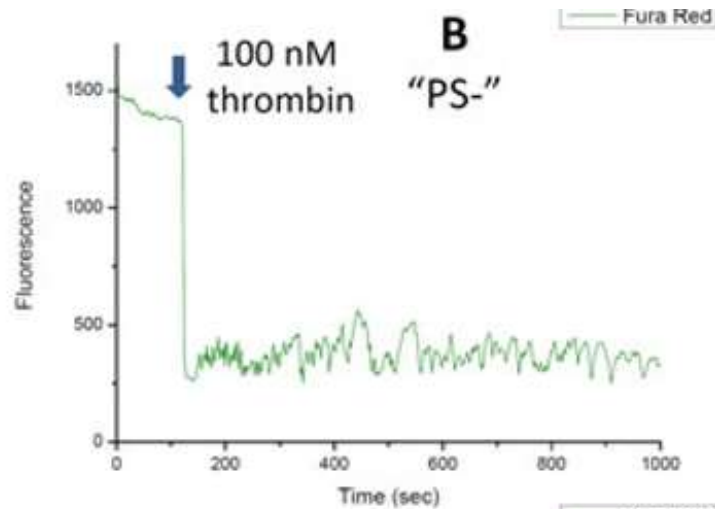
- Кальциевые осцилляции – колебания внутриклеточной концентрации ионов кальция.



Осцилляции, вызванные норадреналином в гепатоцитах

«Calcium Oscillations» Genevieve Dupont, Laurent Combettes, Gary S. Bird, and James W. Putney

# В тромбоцитах человека наблюдаются кальциевые осцилляции



Из-за размера тромбоцита человека, в нём нет кальциевых волн

«Dynamics of calcium spiking, mitochondrial collapse and phosphatidylserine exposure in platelet subpopulations during activation»  
S. I. Obydenny, A. N. Sveshnikova, F. I. Ataulakhanov, Mikhail A. Panteleev

# Почему мы хотим работать с тромбоцитами рыб?

- Средняя величина тромбоцитов рыб - 0,5-0,75 мкм
- Тромбоциты рыб – удобная модель для изучения механизма кальциевых осцилляций из-за их размера.

# Цели и задачи

- Цель: регистрация кальциевых осцилляций в тромбоцитах рыб
- Задачи:
  - Наладка протокола выделения и активации тромбоцитов рыб
  - Постановка эксперимента по наблюдению кальциевых осцилляций в тромбоцитах рыб, наблюдение под флуоресцентным микроскопом

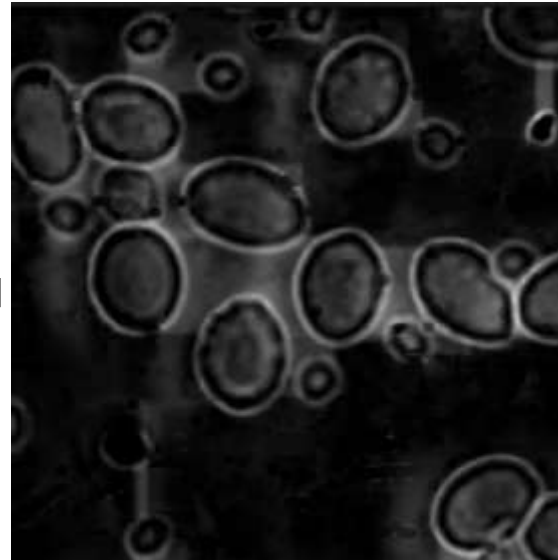
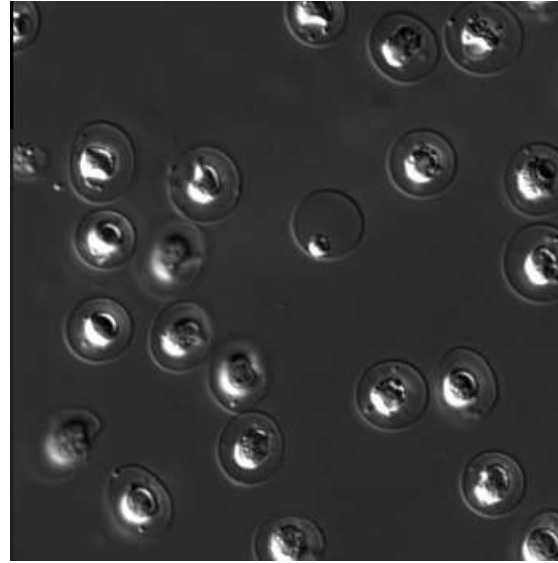
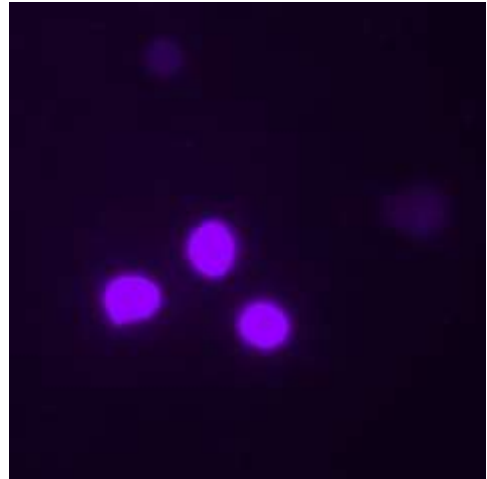
# Методы: микроскопия

- TIRF

позволяет увидеть флуоресценцию клеток, расположенных при поверхности покровного стекла

- DIC

использует двухлучевую интерференцию, которая преобразует локальные градиенты оптической плотности образца в контрастные области изображения объекта



Nikon Eclipse Ti

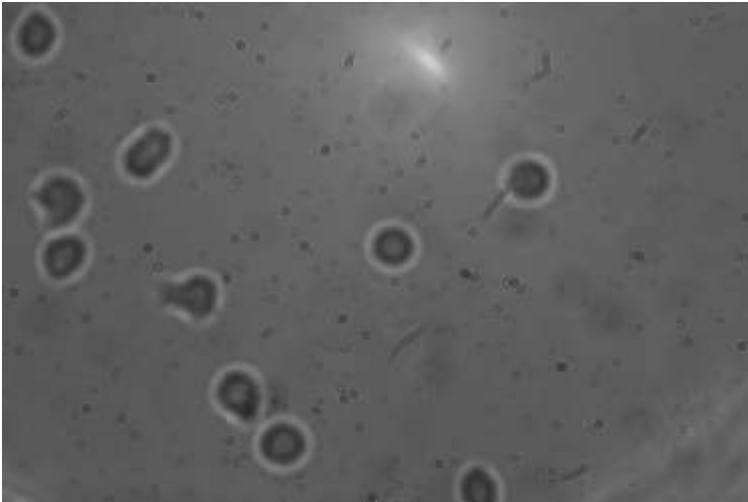


Leica 301

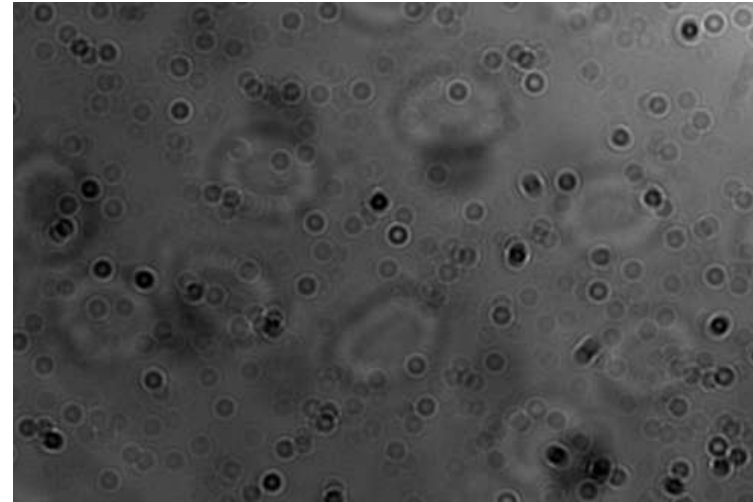




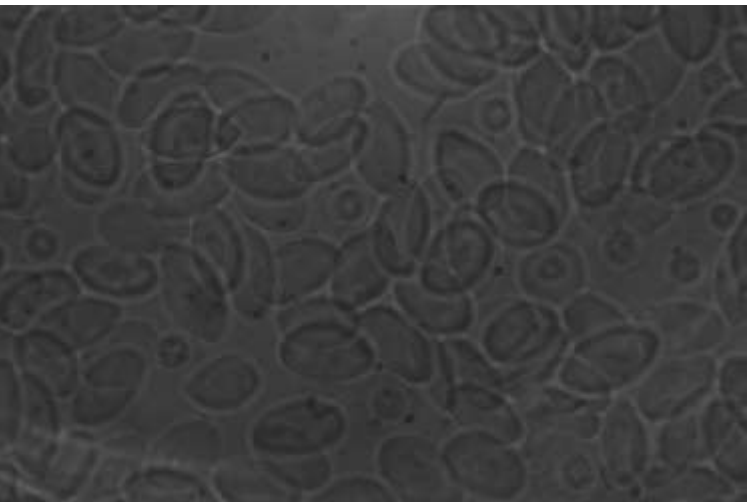
# Методы: протокол выделения крови



центрифугирование  
с центробежным  
ускорением 100 g в  
течение 2 минут



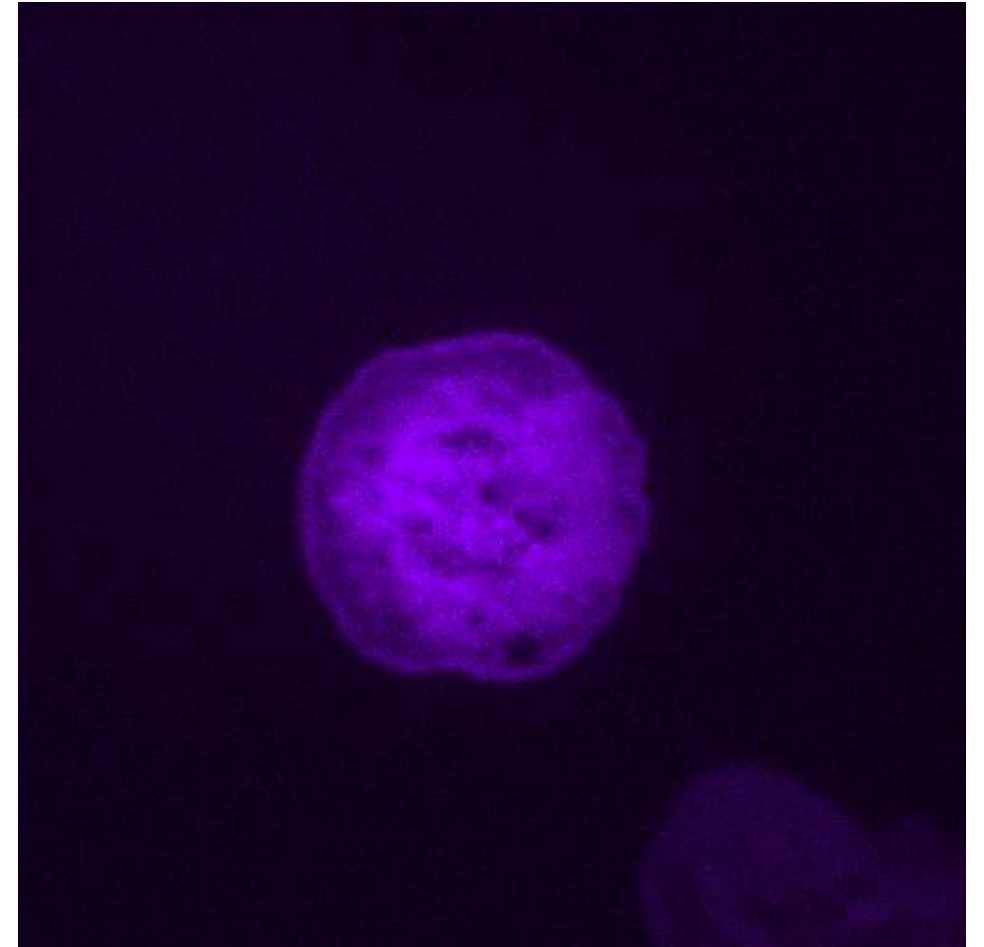
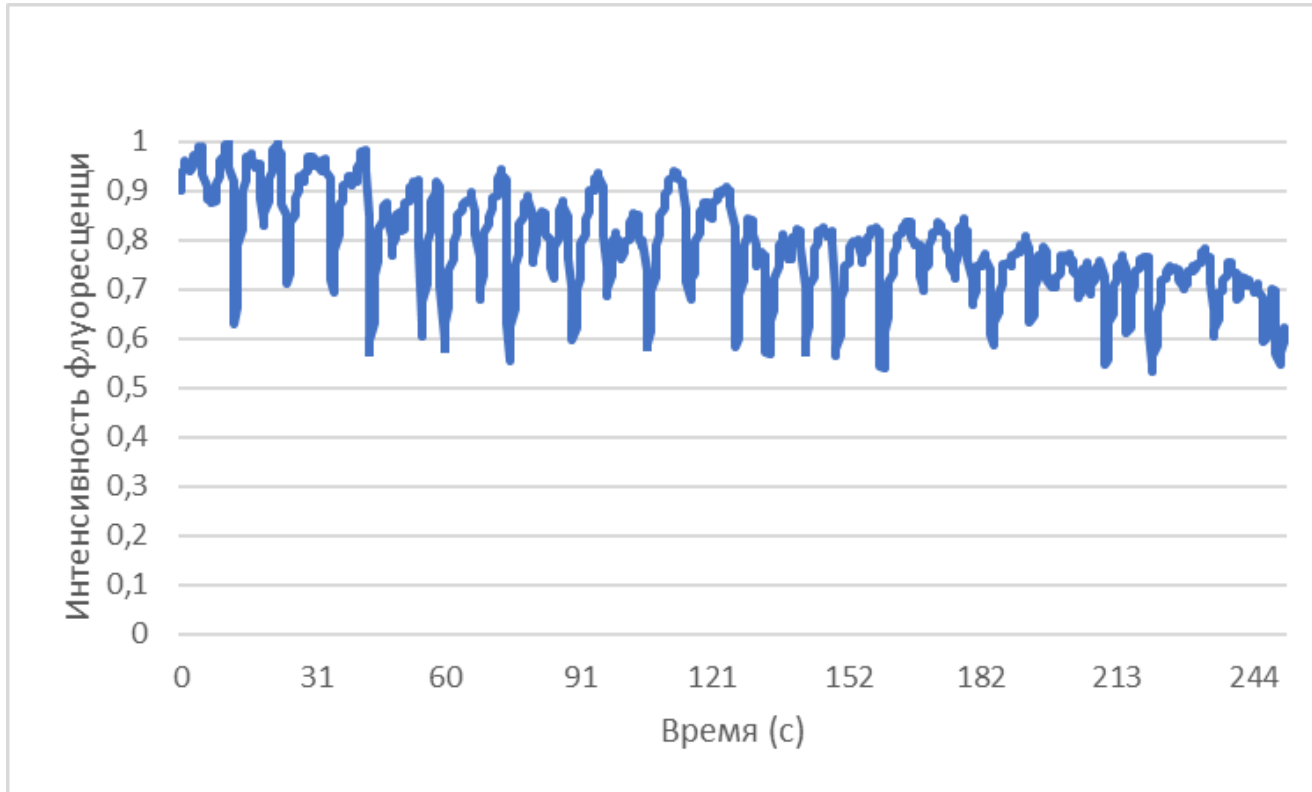
кровь  
отстаивалась в  
течение 20 мин  
при комнатной  
температуре



кровь отстаивалась  
в течение 30 минут  
при комнатной  
температуре

- Оптимальным методом выделения фракции тромбоцитов оказалось отстаивание образца в течение 20 мин при комнатной температуре

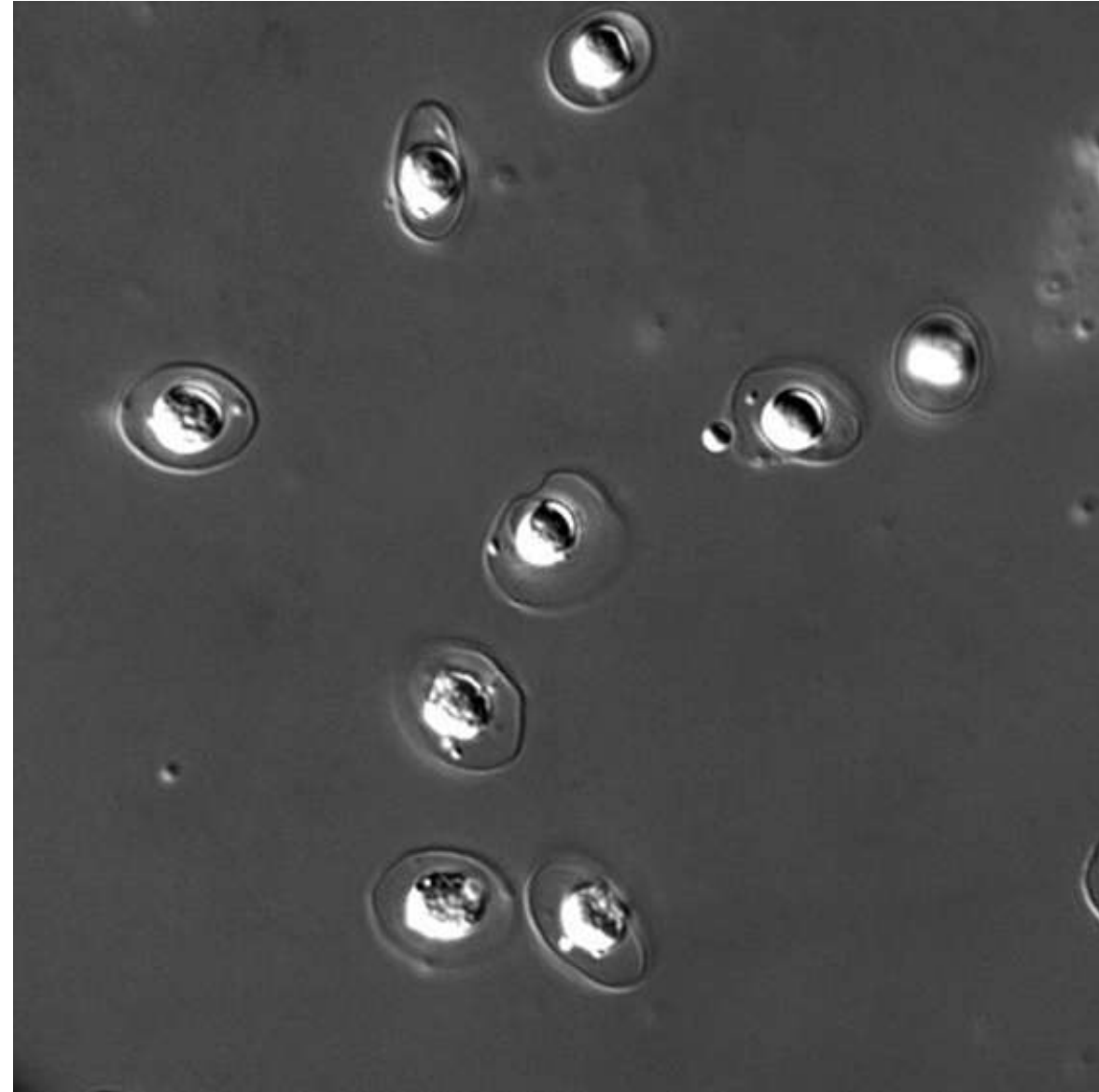
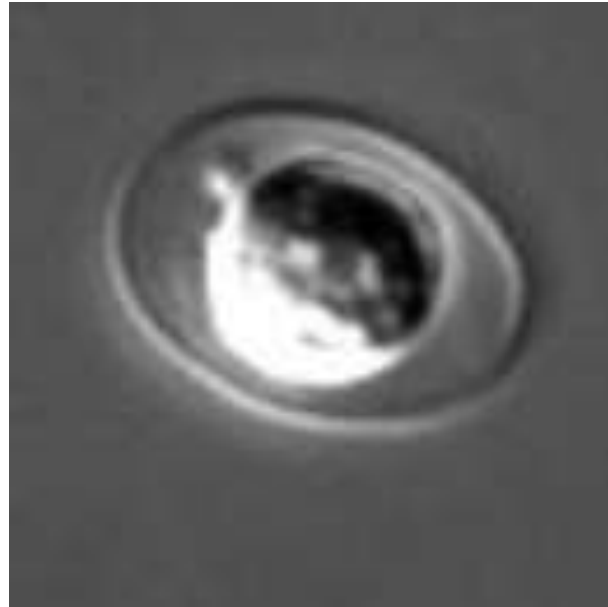
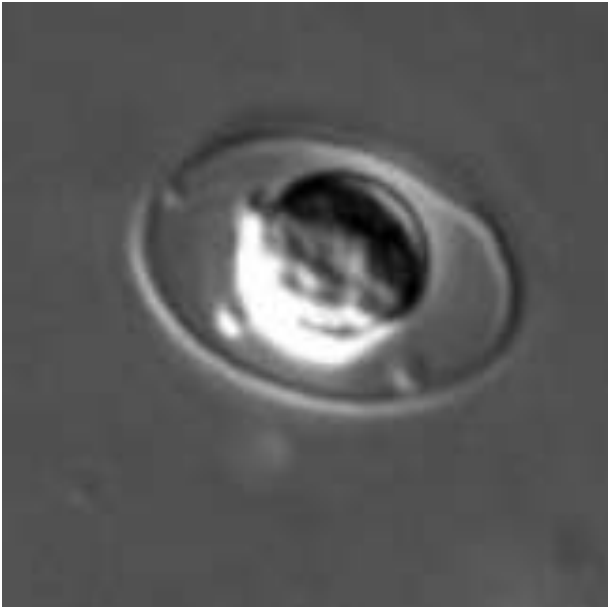
# Кальциевые волны в аномально большом тромбоците человека



У одного из трёх исследованных пациентов с аномально большими тромбоцитами были выявлены кальциевые осцилляции

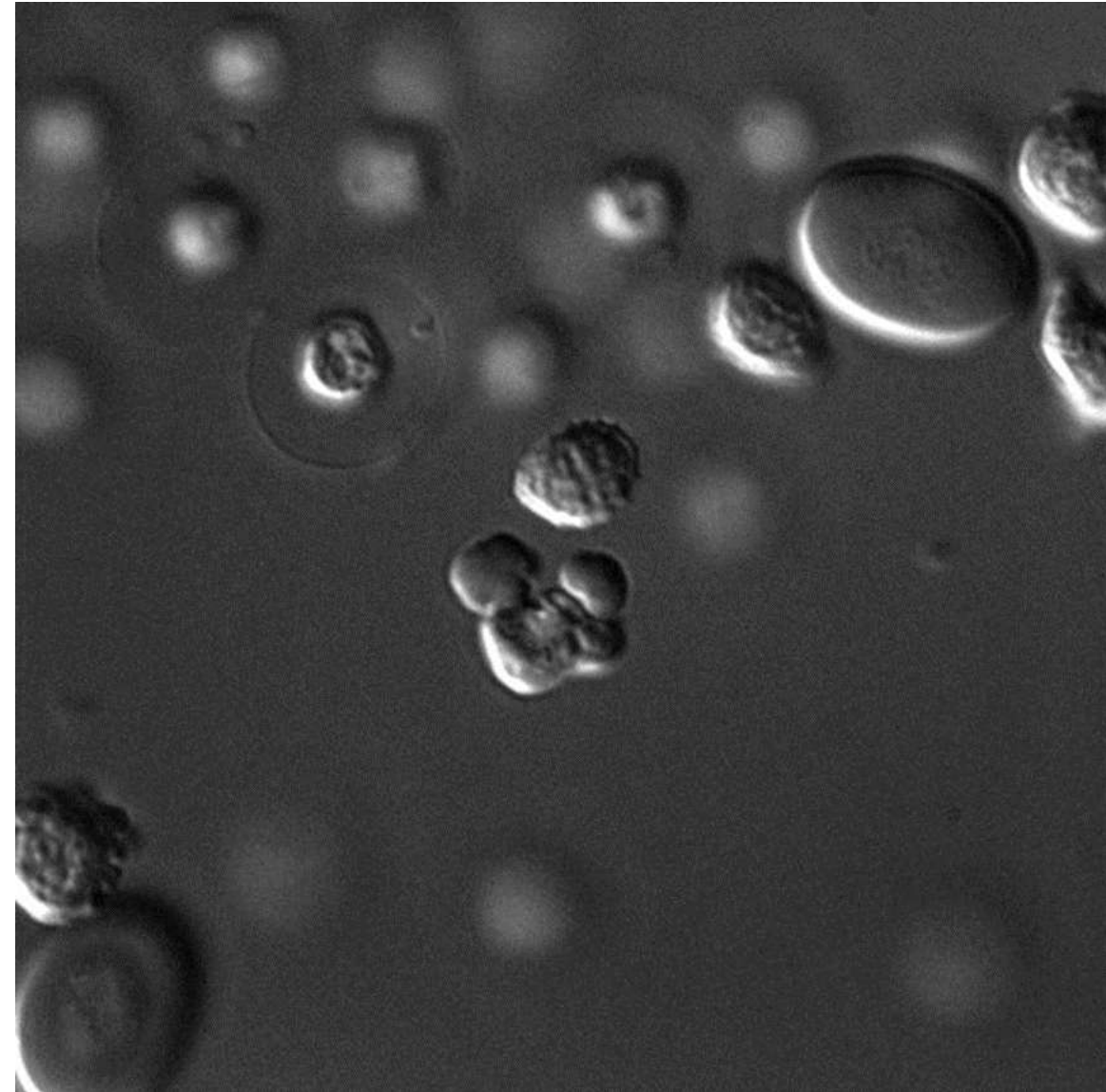
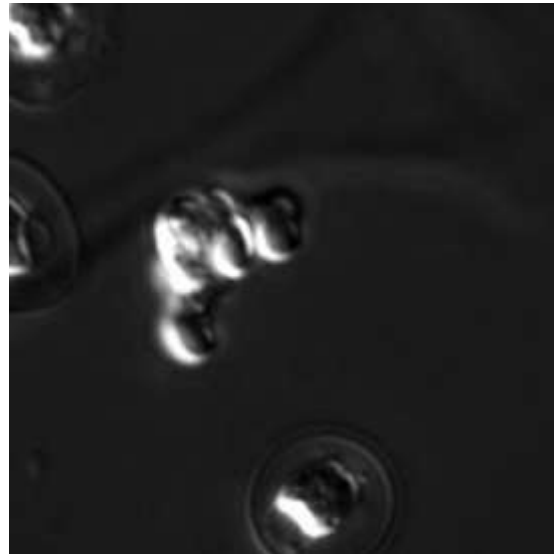
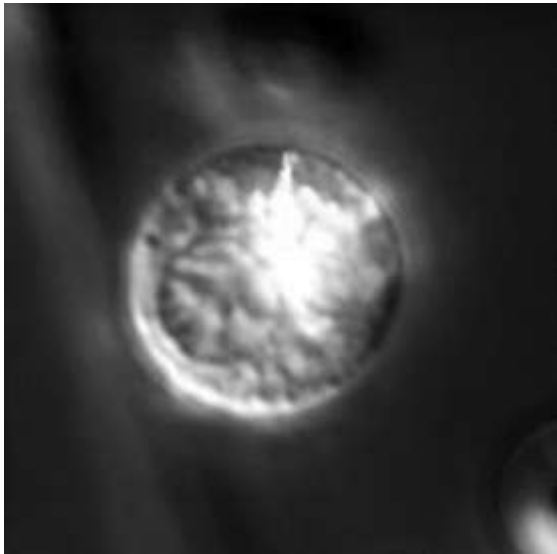
# Эритроциты

- Овальная форма
- Сферическое ядро
- Быстро перемещающиеся везикулы



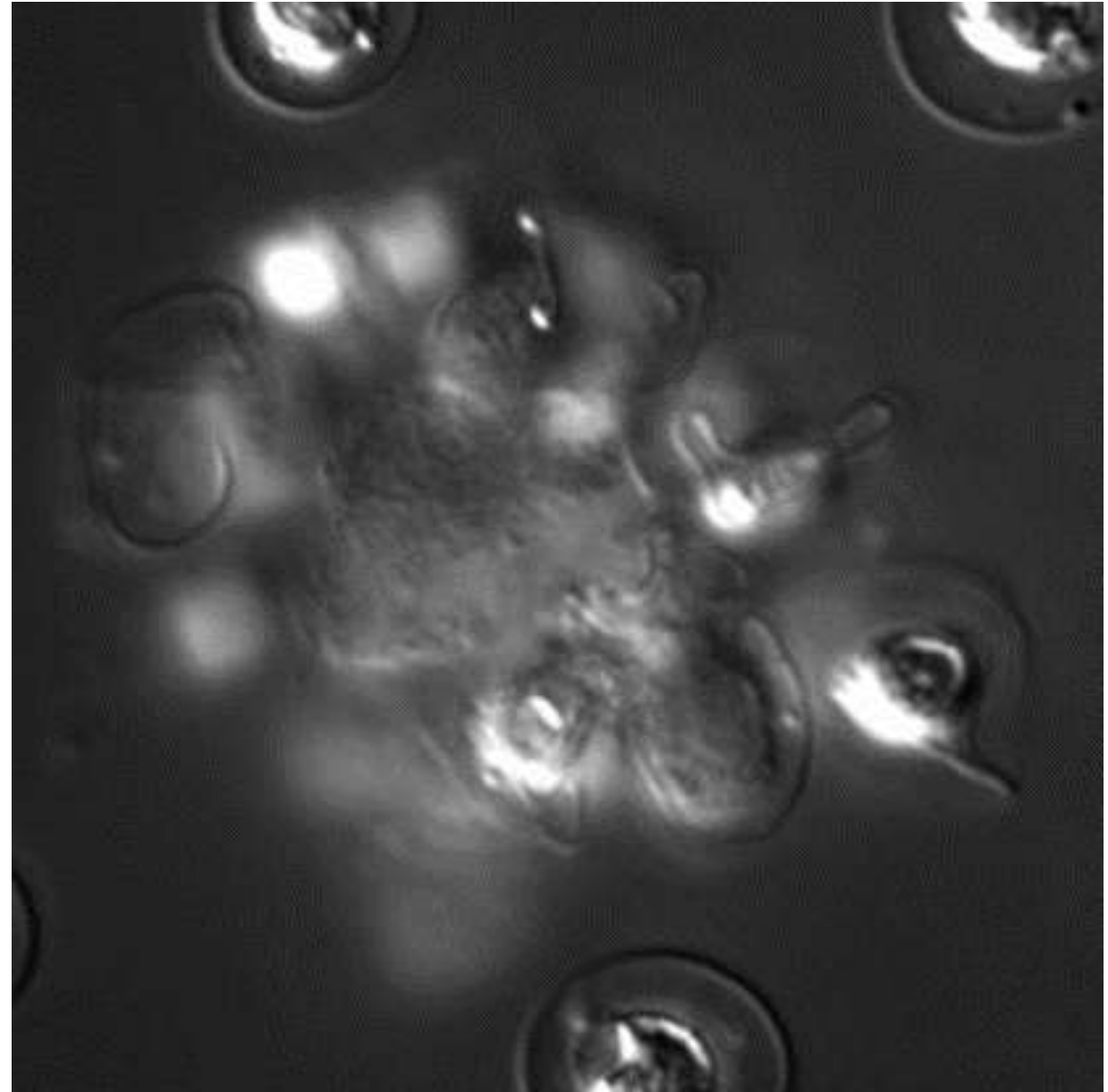
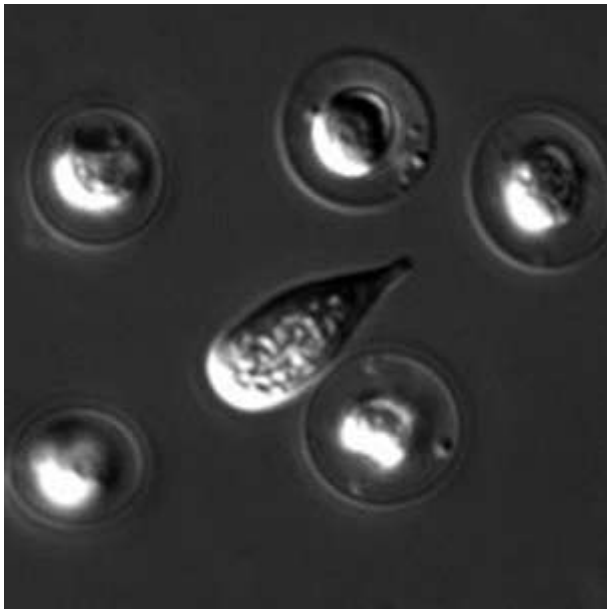
# Иммунные клетки

- Разнообразны по форме
- Некоторые разновидности окрашиваются краской на кальций
- Макрофаги при активации образуют псевдоподии

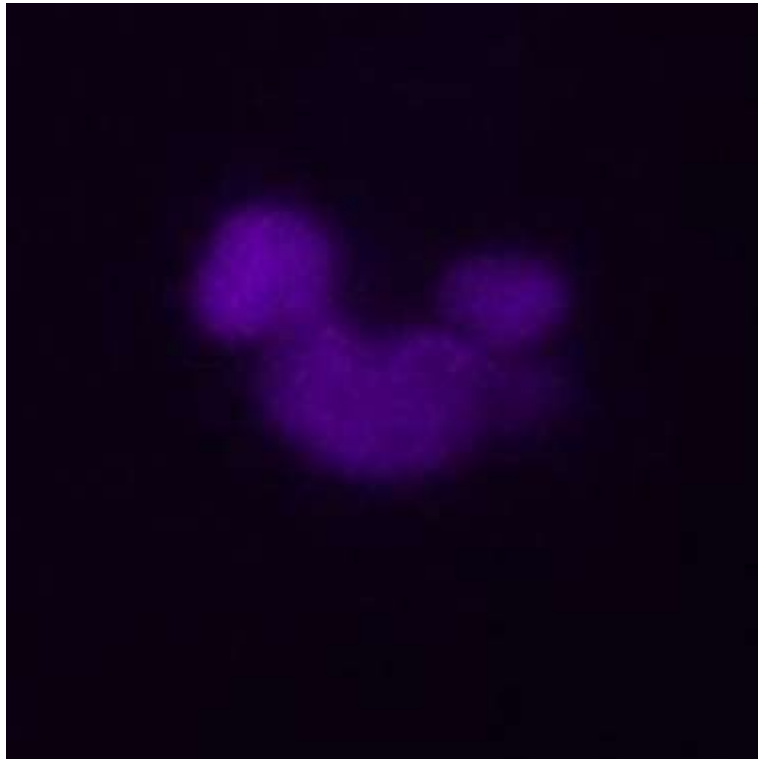


# Тромбоциты

- Веретенообразные
- Овальное ядро
- Способны формировать агрегаты



# Пример активированных клеток *Cyprinus carpio*

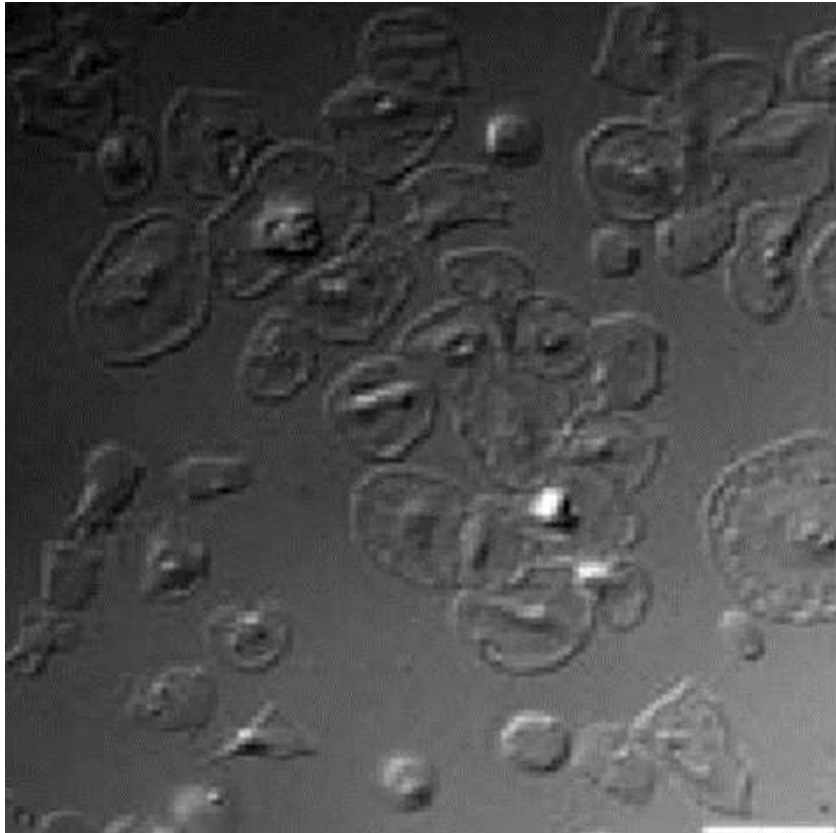


Макрофаг

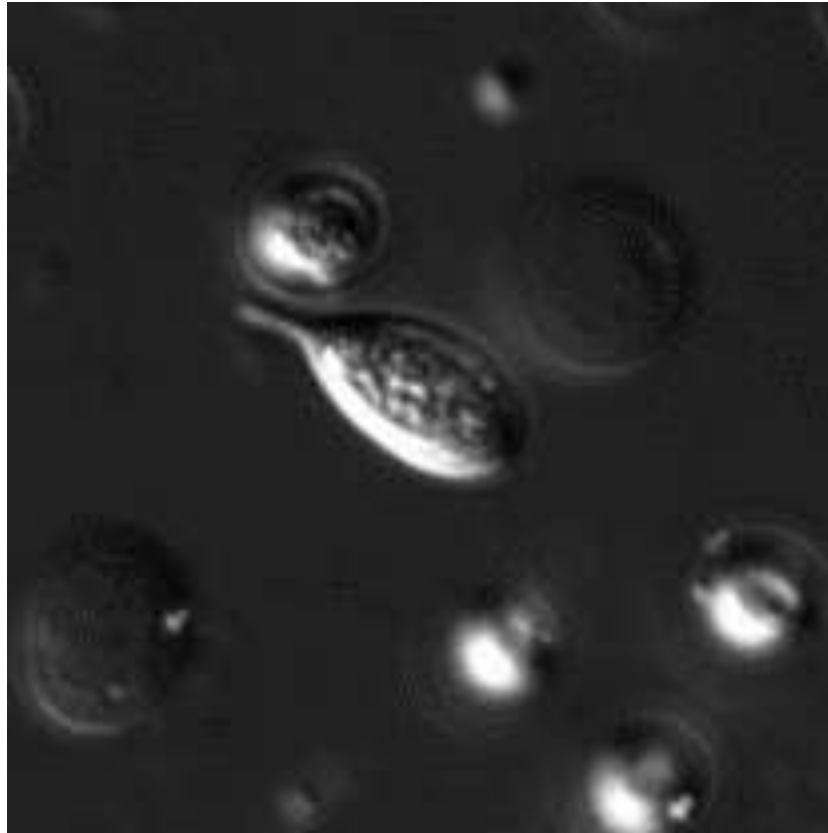


Тромбоцит

# Особенности изменения цитоскелета тромбоцита *Syprinus carpio* при активации



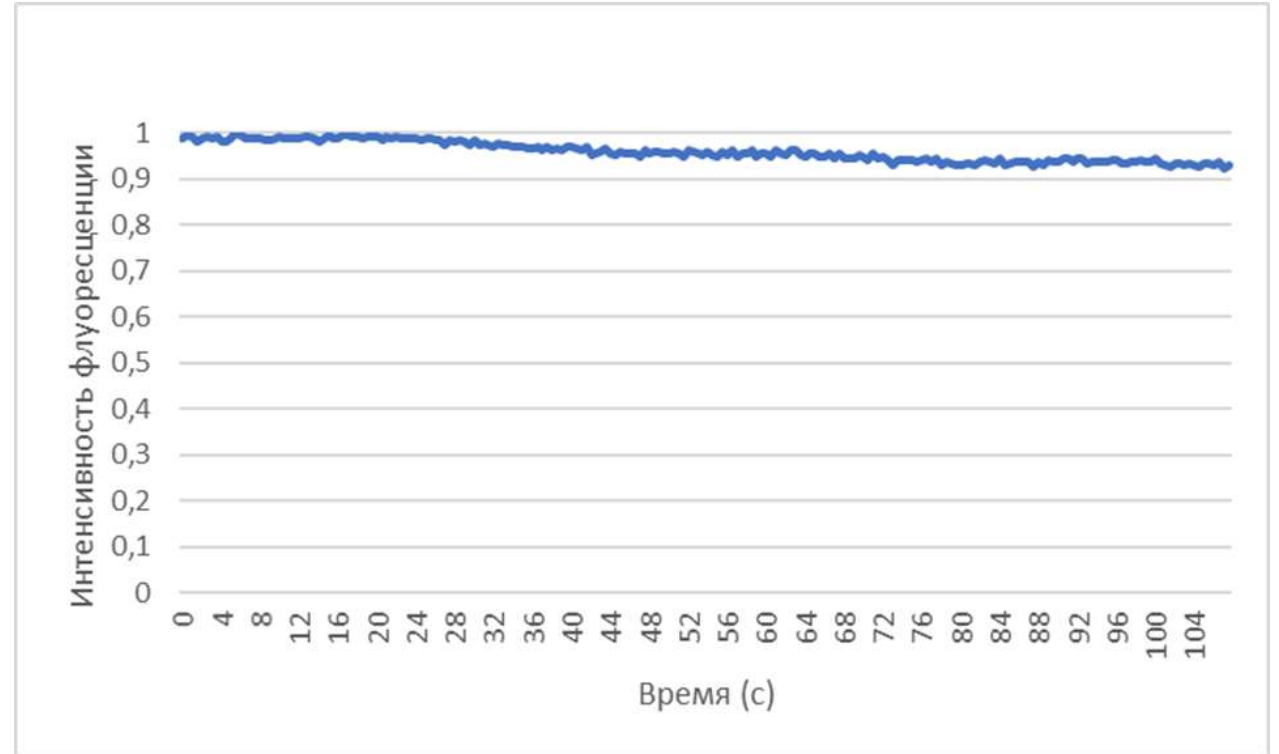
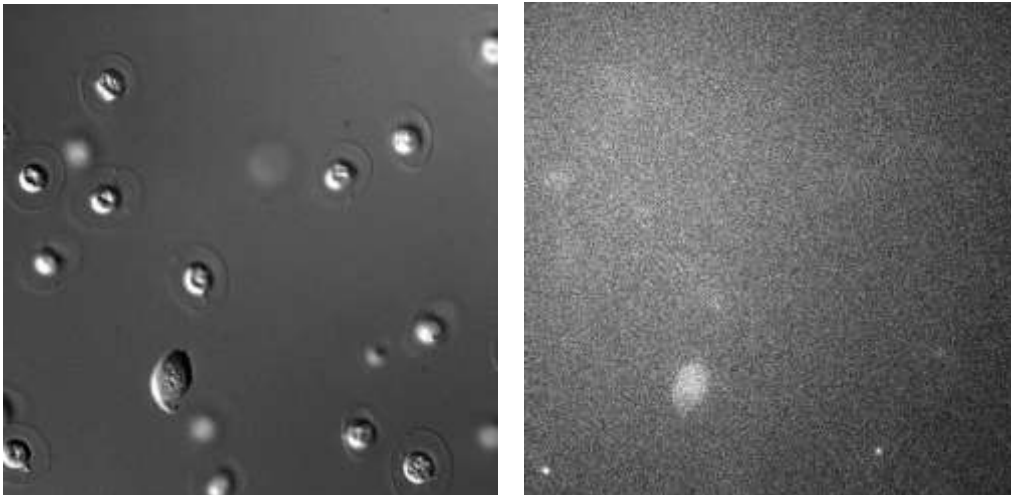
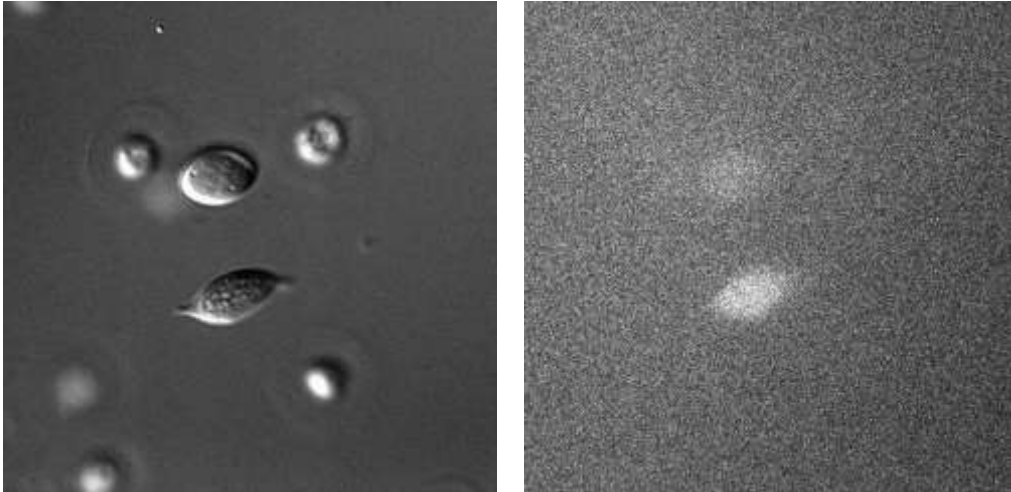
Активированные  
тромбоциты человека



Активированный тромбоцит  
*Syprinus carpio*

В отличие от  
человеческих,  
тромбоциты  
*Syprinus carpio* не  
распластывались  
при активации АДФ  
или коллагеном.

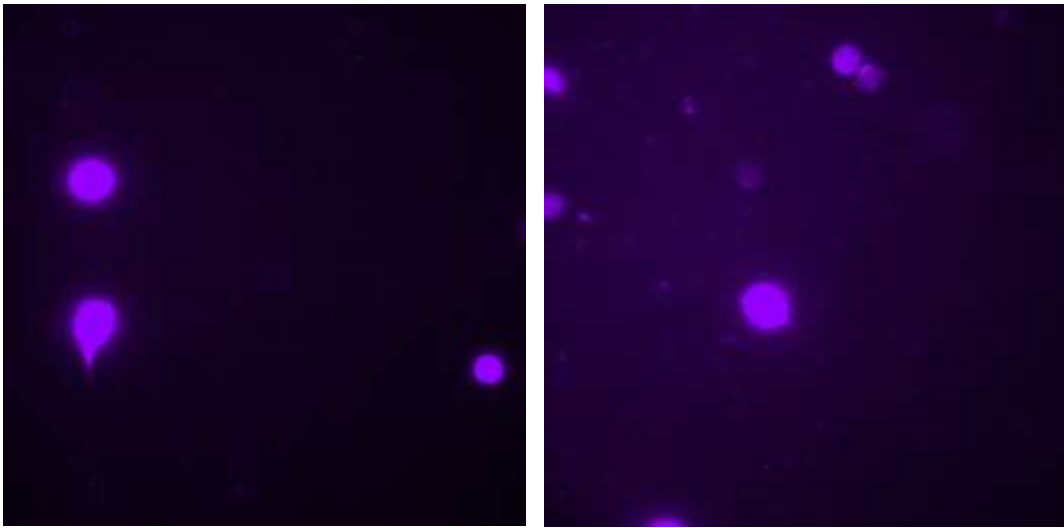
# Активация тромбоцитов при добавлении АДФ



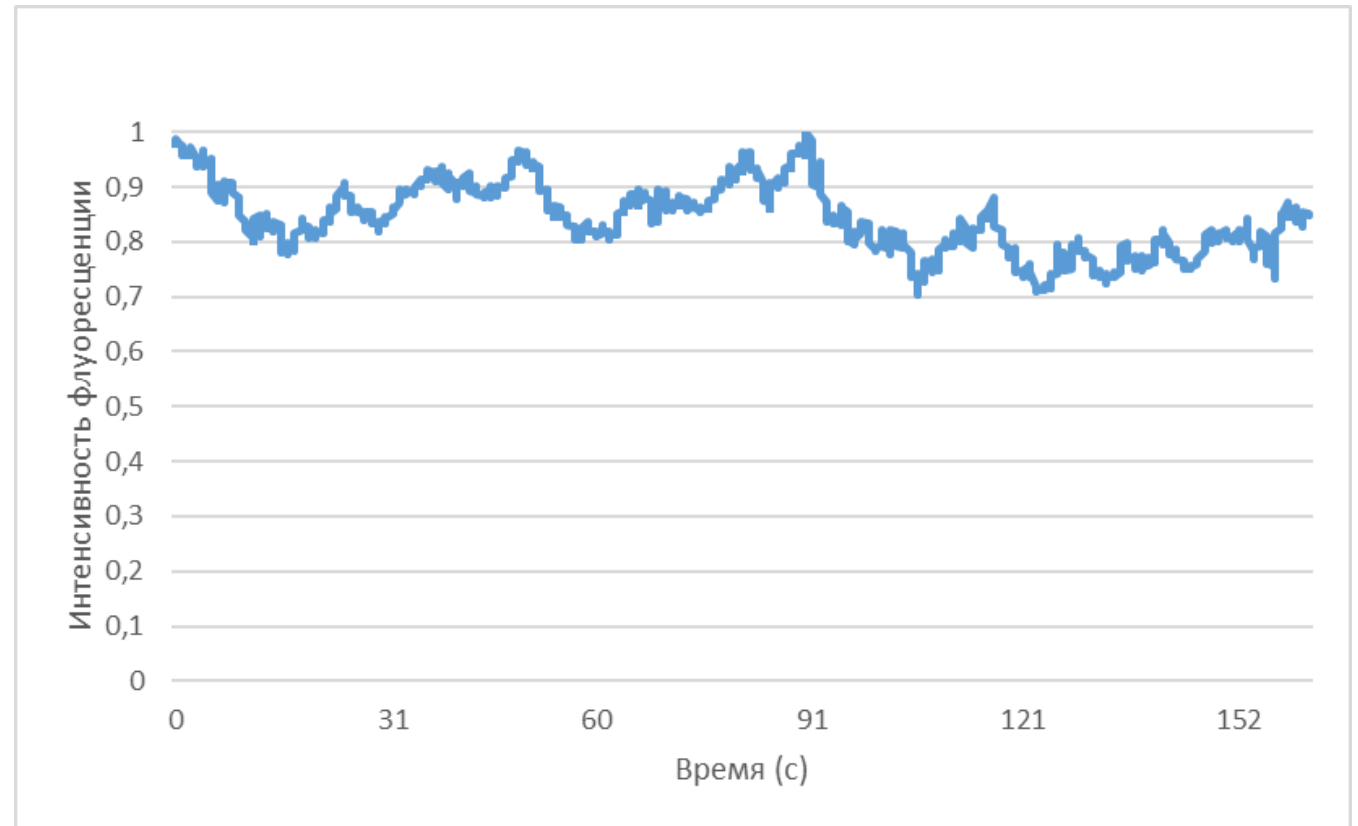
- Осцилляций кальция не наблюдается



# Активация тромбоцитов при их адгезии к коллагену



- Видны небольшие колебания с периодом около 40 секунд.
- Данные колебания не могут рассматриваться как осцилляции из-за низкой частоты и интенсивности.



# Выводы

1. Тромбоциты *Cyprinus carpio* имеют характерную веретенообразную форму;
2. активация тромбоцитов *Cyprinus carpio* не оказывает существенного влияния на цитоскелет;
3. тромбоциты *Cyprinus carpio* активируются под воздействием таких активаторов, как АДФ и коллаген;
4. каскады, вызываемые АДФ в тромбоцитах *Cyprinus carpio*, в меньшей степени зависят от динамики концентрации кальция, чем человеческие тромбоциты;
5. при адгезии тромбоцитов *Cyprinus carpio* к коллагену наблюдаются периодические изменения концентрации кальция, которые не могут быть названы осцилляциями;
6. наличие кальциевых осцилляций и ярко выраженных волн кальция не зависит от размера тромбоцита;
7. тромбоциты *Cyprinus carpio* представляют собой перспективный объект фундаментальных исследований, так как механизмы их активации принципиально отличаются от уже известных моделей.

# Благодарности

Автор выражает благодарность своему научному руководителю Свешниковой А.Н. за профессиональные советы и руководство проектом, а также Балабину Ф.А. за неоценимую помощь в экспериментальной работе.

