

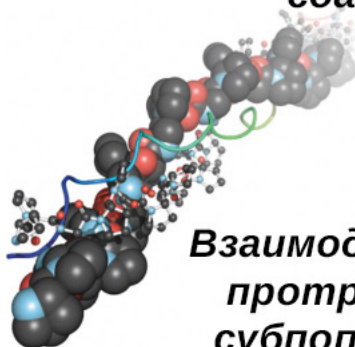


Системная биология физиология

Июнь 2024 №1

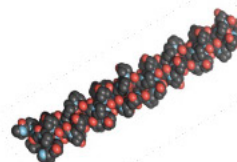
Кальциевая сигнализация
регулирует ретракцию
ламеллиподий в хемотак-
тирующих нейтрофилах
человека

Коробкина Ю.Д.Д. и
соавторы
3-8



Взаимодействие
протромбина с
субпопуляциями
активированных
тромбоцитов
Соловьева П.А. и
соавторы
19-25

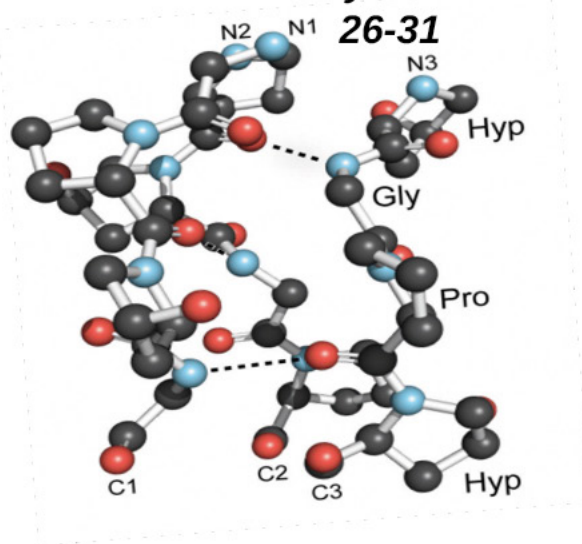
Моделирование
светорассеяния
на одиночном
тромбоците и их
агрегатах
Свидельская Г.С. и
соавторы
32-38



Имитация
внеклеточного
матрикса на основе
полимеров для
создания модели
микроокружения
опухоли

Мамонова О.В. и соавторы
9-18

Характеризация
подкожной *in vivo* модели
почечно-клеточного
рака Rensa у мышей
линии BALB/c
Мишуков А.А.



Содержание

1. Ю.Д.Д. Коробкина, А.Н. Свешникова Кальциевая сигнализация регулирует ретракцию ламеллиподий в хемотактирующих нейтрофилах человека3
2. О.В. Мамонова, Д.К. Симакина, Е.В. Терновая, Э.А. Ткаченко, М.Ю. Славина, Е.В. Ивановская Имитация внеклеточного матрикса на основе полимеров для создания модели микроокружения опухоли.....9
3. П.А. Соловьева, С.И. Обыденный Взаимодействие протромбина с субпопуляциями активированных тромбоцитов19
4. А.А. Мишуков Характеризация подкожной *in vivo* модели почечно-клеточного рака Rensa у мышей линии BALB/c.....26
5. Г.С. Свидельская, Г.А. Быков Моделирование светорассеяния на одиночном тромбоците и их агрегатах32

Кальциевая сигнализация регулирует ретракцию ламеллиподий в хемотактирующих нейтрофилах человека.

Calcium signaling regulates lamellipodium retraction in human chemotactic neutrophils.

Ю. Д. Коробкина^{1#}, А. Н. Свешникова^{1,2,3}.

J. D. Korobkina^{1#}, A. N. Sveshnikova^{1,2,3}.

1. ФГБУН центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, ул. Средняя Калитниковская 30, Москва, Россия, 109029
2. Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия
3. ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева, ул. Саморы Машела, 1, Москва, Россия, 117997

Автор для переписки: juliajessika@gmail.com

1. Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology Russian Academy of Sciences Moscow, 109029, Russia
2. Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia
3. National Medical Research Centre of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitry Rogachev Moscow, 117198, Russia

Получено: 28.02.2024

Принято к публикации: 24.03.2024

Опубликовано: 30.06.2024

EDN: FHEOGY

Аннотация

Нейтрофилы – ключевые клетки врожденного иммунитета, которые первыми рекрутируются в зону воспаления. Их направленная миграция осуществляется по градиенту хемоаттрактантов, взаимодействующих с внеклеточным матриксом. Важным регулятором перестройки цитоскелета при движении клеток является внутриклеточная кальциевая сигнализация, однако ее роль в управлении направленным движением нейтрофилов человека остается дискуссионной. В данной работе исследована динамика концентрации кальция в цитоплазме нейтрофилов человека, движущихся вблизи растущего тромба. С помощью флуоресцентного индикатора Fura-Red проанализированы характеристики кальциевого сигнала и его связь со скоростью миграции клеток. Полученные результаты демонстрируют существование двух субпопуляций нейтрофилов: быстро движущихся клеток с постоянным низким уровнем кальция и клеток с выраженными кальциевыми колебаниями, демонстрирующих медленный “поисковый” тип миграции. Установлено, что спайки концентрации кальция не коррелируют со скоростью движения, но статистически значимо совпадают с моментами ретракции ламеллиподий, что указывает на их роль в ремоделировании цитоскелета. Выявленные закономерности свидетельствуют о том, что кальциевые сигналы преимущественно регулируют локальные перестройки цитоскелета, тогда как направленный хемотаксис может происходить и при недетектируемых изменениях уровня внутриклеточного кальция.

Ключевые слова: Кальциевая сигнализация,

Нейтрофилы, Хемотаксис, Конфокальная микроскопия

Annotation

Neutrophils are key cells of the innate immune system, which are the first to be recruited to the inflammatory zone. Their directed migration is carried out along a gradient of chemoattractants interacting with the extracellular matrix. Intracellular calcium signaling is an important regulator of cytoskeletal rearrangement during cell movement, but its role in controlling the directional movement of human neutrophils remains controversial. In this work, the dynamics of calcium concentration in the cytoplasm of human neutrophils moving near a growing blood clot is investigated. The characteristics of the calcium signal and its relationship to the rate of cell migration were analyzed using the Fura-Red fluorescent indicator. The results demonstrate the existence of two subpopulations of neutrophils: fast-moving cells with constant low levels of calcium and cells with pronounced calcium fluctuations, demonstrating a slow “search” type of migration. It was found that calcium concentration spikes do not correlate with the speed of movement, but statistically significantly coincide with the moments of lamellipodium retraction, which indicates their role in cytoskeletal remodeling. The revealed patterns indicate that calcium signals predominantly regulate local rearrangements of the cytoskeleton, whereas directional chemotaxis can occur with undetectable changes in intracellular calcium levels.

Key words: Calcium signaling, Neutrophils, Chemotaxis, Confocal microscopy

Введение

Нейтрофилы – первый тип иммунных клеток, рекрутирующийся в места воспаления. Эти клетки представляют собой самую многочисленную популяцию лейкоцитов в крови человека [1]. Для эффективной защиты организма во время воспалительного процесса нейтрофилам необходимо быстро достигать очагов воспаления. [1,2].

Хемотаксис – это управляемое движение клеток, которое происходит в ответ на химические сигналы, исходящие от места повреждения или воспаления – хемоаттрактанты. За пределами сосудистого русла хемоаттрактанты могут ассоциироваться с внеклеточным матриксом и направлять миграцию нейтрофилов к очагам поражения. [3][4].

Нейтрофилы являются основными участниками процесса тромбовоспаления — взаимодействия между системой свертывания крови, иммунной системы и эндотелием [5]. Тромбовоспаление присутствует в различных патофизиологических ситуациях, таких как бактериальная инфекция или рак [6].

Когда тромбоциты активируются на месте повреждения или воспаления, они секретируют гранулы, содержащие такие хемоаттрактанты, как IL-8 [7,8], что привлекает нейтрофилы к месту повреждения. Ранее было показано, что движение нейтрофилов вокруг растущего тромба обусловлено хемотаксисом [9,10].

При миграции по градиентам хемоаттрактанта лейкоцит вступает в повторяющиеся циклы деформации. Сначала происходит рост ламеллиподии на переднем крае клетки с последующей интегрин и селектин-опосредованной адгезией к подложке. Формирование ламеллиподии на переднем крае зависит от полимеризации и ветвления актина и малых GTP-аз [11,12]. Затем происходит опосредованное актомиозиновыми волокнами сокращение тела клетки и разрыв ранее сформированных сайтов адгезии с продвижением нейтрофила вперед [13].

Все этапы реакции нейтрофилов на воспаление или патогенные микроорганизмы (роллинг, адгезия, хемотаксис и образование внеклеточных ДНК-ловушек (NETоз)) имеют общую особенность: они регулируются кальциевой сигнализацией [14,15].

Также известно, что колебания $[Ca^{2+}]$ в нейтрофиле могут влиять на организацию цитоскелета, а, значит, и на направленное движение клетки [16–18]. Считается, что кальциевая сигнализация не только необходима для запуска миграции, но и тонко модулирует динамику полимеризации и деполимеризации

актина. Наряду с этим, существует и точка зрения, что в определённых условиях нейтрофилам не всегда требуется значимая мобилизация кальция для направленной миграции [19].

Известно, что в нейтрофилах мыши хемотаксис к таким хемоаттрактантам, как LPS, CXCL₂, H₂O₂ и C5a, опосредован поднятием концентрации кальция на переднем конце клетки [20]. Такие регуляторы движения нейтрофилов, как PI3K, Rac и Lyp, влияют на хемотаксис путем модуляции амплитуды осцилляций кальция [20,21]. Внутриклеточные импульсы кальция являются универсальными регуляторами подвижности в нейтрофилах мыши, определяя будущее направление формирования псевдоподий [20].

При этом имеющиеся данные по регуляции хемотаксиса нейтрофилов человека ионами кальция противоречивы [15,19]. Также было показано, что нейтрофилы очень чувствительны к сдвиговому напряжению и центрифугированию [22]. При этом большинство распространенных анализов используют выделенные из цельной крови нейтрофилы.

Целью данной работы является наблюдение кальциевой сигнализации в одиночных нейтрофилах человека в процессе миграции в окрестности растущего тромба.

Материалы и Методы

Материалы

Следующие реагенты использовались в работе: Fura RED-AM. Molecular Probes (Eugene, OR, USA); бычий сывороточный альбумин (БСА) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO); фибриллярный коллаген I типа (Chrono- Log Corporation; Havertown; USA).

Методы

Плоско-параллельные проточные камеры собирались, как было описано ранее [23]. Параметры каналов были следующими: 0,2 x 18 x 0,20 мм. Покровные стекла покрывались фибриллярным коллагеном I типа (0,2 мг/мл) в течение 1 ч 30 мин при 37°C, промывались дистиллированной водой, блокировались 2% w/v БСА и затем вставлялись в проточные камеры (Рис. 1Б).

Кровь бралась у здоровых взрослых добровольцев (n=3, мужчины и женщины 18-35 лет) в вакуумные пробирки Sarstedt-Monovette® с гирудином (525 АТЕ/мл крови). Исследование проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией и одобрено этическим комитетом ЦТП ФХФ РАН (решение №2 от 06.04.2021 г.). От всех доноров получено письменное информированное согласие на исследование.

Для наблюдения кальциевого ответа в нейтрофилах, хемотактирующих около растущего тромба, использовался флуоресцентный маркер Fura RED. Для оценки уровня кальция в нейтрофилах использовалось соотношение F_{405}/F_{488} – отношение интенсивности флуоресценции при возбуждении лазером с длиной волны $\lambda=405$ нм и регистрацией на длинах волн 500-550 нм (связавшейся с кальцием краски) к интенсивности флуоресценции при возбуждении $\lambda=488$ нм и регистрацией на длинах волн 560-850 нм (не связавшейся с кальцием краски). Кровь преинкубировалась с Fura RED в концентрации 2 μM в течение 40 минут при 37°C° и перфузировалась через плоско-параллельные проточные камеры, покрытые коллагеном, при скорости сдвига 100 с^{-1} . На фибриллярном коллагене I типа наблюдались рост тромбов и адгезия нейтрофилов к растущему тромбу и подложке, а также движение нейтрофилов вокруг растущего тромба. Детали метода даны

в [10]. Ранее нами было показано, что для такой постановки наблюдаемые подвижные клетки являются исключительно нейтрофилами [10], а также что такое движение является преимущественно хемотаксисом [9]. Наблюдение кальциевого ответа в хемотактирующих нейтрофилах производилось с помощью инвертированного микроскопа Nikon Eclipse Ti2 AX в режиме конфокальной съемки. Средняя частота съемки составляла 0.05 с^{-1} .

Измерение скорости движения нейтрофилов и роста ламеллиподий производилось с помощью плагина Manual Tracking программного пакета ImageJ. Измерения проводились только для движущихся нейтрофилов. Линейную скорость роста ламеллиподии измеряли по координатам края движущейся клетки аналогично работе [24] (рис. 1А). Измерения уровня флуоресценции Fura RED производилось с помощью ImageJ вручную (рис. 1В,Г). Для каждого кадра, область измерений представляла собой круг диаметром 4 μm в

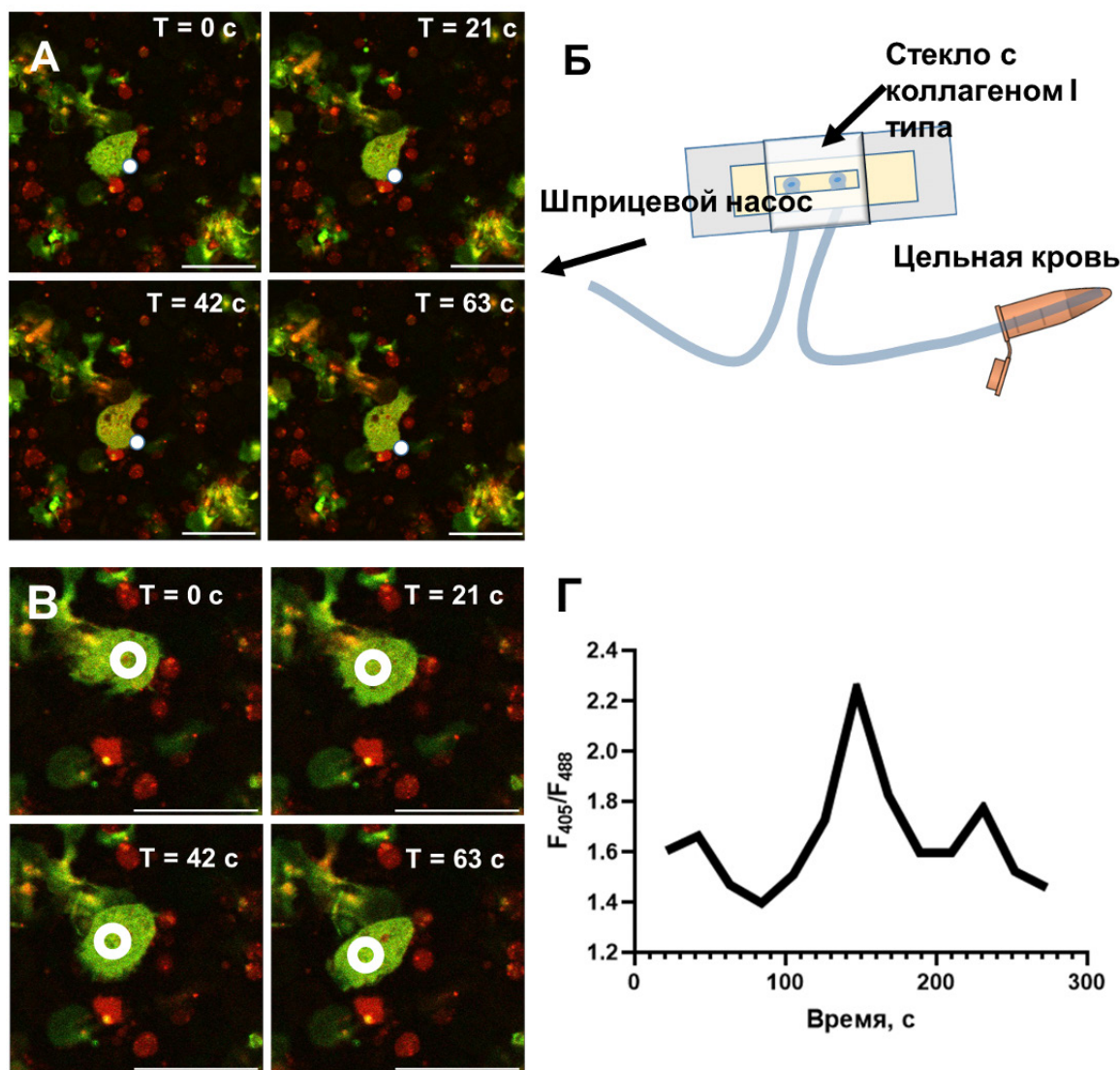


Рисунок 1. Методы наблюдения кальциевой сигнализации в нейтрофилах, движущихся вокруг растущего тромба. Си(А) Типичное изображение растущей ламеллиподии нейтрофила. Белой точкой показан край растущей ламеллиподии. Шкала 20 μm . (Б) Схема эксперимента: цельная кровь, окрашенная флуоресцентной меткой Fura RED, прокачивалась через плоско-параллельную проточную камеру в течение 30 минут. (В) Пример области, в котором измерялась флуоресценция Fura RED (белый круг). Шкала 20 μm . (Г) Типичный вид динамики концентрации кальция (F_{405}/F_{488}) для одиночного нейтрофила.

геометрическом центре клетки и выбиралась вручную (Рис. 1В, Видео S1).

Для исключения влияния выхода клетки из фокальной плоскости на результат измерений, вместо флуоресценции Fura RED для оценки концентрации кальция использовалось отношение флуоресценции связанной с кальцием краски к флуоресценции свободной Fura RED, F_{405}/F_{488} .

Результаты

Нами были проанализирована кальциевая динамика в подвижных нейтрофилах человека,двигающихся вокруг растущего тромба, для

21 подвижной клетки для трех здоровых добровольцев.

Динамический кальциевый ответ в виде кальциевых осцилляций и одиночных кальциевых пиков был продемонстрирован для 12 из 21 наблюдаемых подвижных нейтрофилов. Типичный динамический ответ (Рис. 2А) представлял из себя нерегулярные кальциевые спайки.

При этом скорость движения для клеток, демонстрирующих динамический ответ, была значительно медленнее, чем для клеток, в которых концентрация кальция была постоянной (рис

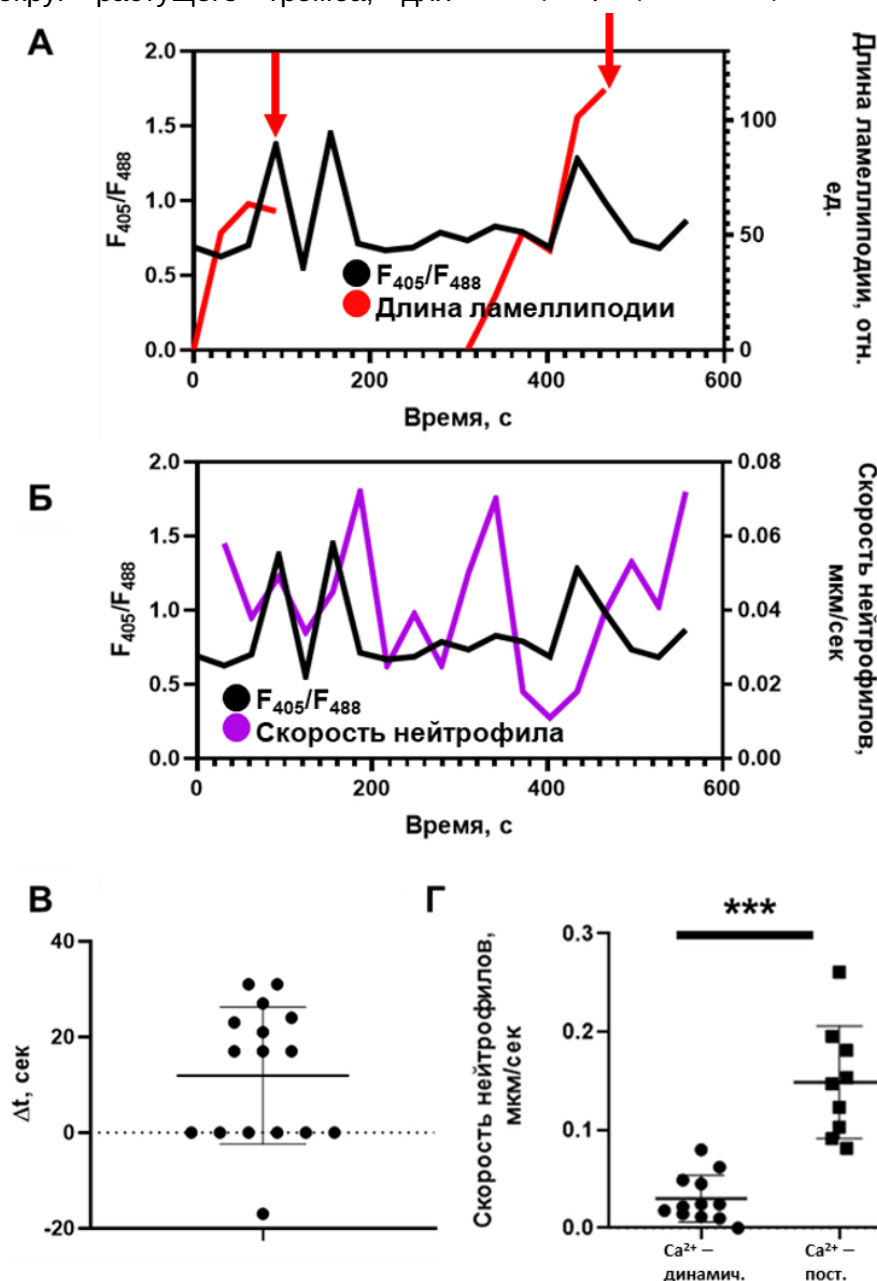


Рисунок 2. Экспериментально наблюдаемый кальциевый ответ в нейтрофилах не влияет на подвижность клеток, но регулирует ретракцию ламеллиподий. А. Типичный кальциевый ответ в движущемся нейтрофиле. Ретракция ламеллиподий (красная стрелка) совпадает по времени с пиком концентрации кальция. На графике представлен типичный ответ из $N = 16$ событий ретракции ламеллиподий из 12 проанализированных клеток для 3 здоровых доноров. Б. В типичном нейтрофиле кальциевый ответ не коррелирует с подвижностью нейтрофила. На графике представлен типичный ответ из $N = 12$ проанализированных клеток для 3 здоровых доноров. В. Временная задержка между ретракцией ламеллиподий и ближайшим по времени кальциевым пиком. С помощью критерия Уилкоксона ($p = 0,03$) показано, что временная задержка не распределена нормально со средним $\Delta t = 0$ сек. Г. Скорости нейтрофилов, в которых уровень кальция постоянен, значительно выше, чем в клетках, в которых наблюдается динамический кальциевый ответ.

Проанализировано $N = 21$ клеток для 3 здоровых доноров. *** - $p < 0,001$. Статистическая значимость рассчитана с помощью теста Манна-Уитни.

2). Наличие двух субпопуляций скоростей нейтрофилов согласуется с данными из [25], где было показано, что хемотаксис нейтрофилов можно разделить на два этапа – медленное движение и поисковое поведение и быстрое движение после определения направления движения.

Далее нами была проанализирована связь типа кальциевого ответа в нейтрофиле с характеристиками его движения. При одновременном измерении скоростей нейтрофилов и концентрации кальция в клетках было показано, что абсолютные концентрации кальция в нейтрофиле не коррелируют со скоростью переднего края клетки для 9 из 12 проанализированных клеток с кальциевым сигналом (корреляции были проанализированы с помощью критерия Спирмана $p > 0,05$). Типичный вид зависимости показан на рисунке 2Б. Аналогичные результаты были получены для корреляции событий выставления ламеллиподий с моментами кальциевых пиков (данные не показаны). Для 16 проанализированных событий, в 13 из 16 случаев, корреляции отсутствовали (корреляции были проанализированы с помощью критерия Спирмана, $p > 0,05$).

При этом, для нейтрофилов, в которых наблюдалось выставление нескольких ламеллиподий и ретракция некоторых из них, пики концентрации кальция в нейтрофилах совпадали с моментом ретракции ламеллиподии, либо отличались не более, чем на один кадр видео, что, скорее всего, связано с недостаточной частотой съемки (Рис. 2Б,В). Также низкая частота съемки не позволяла оценивать пространственную динамику концентрации кальция в нейтрофиле.

С помощью критерия Уилкоксона мы проанализировали разницу между моментом ретракции ламеллиподии и ближайшим пиком концентрации кальция. В случае, если бы данные события являлись независимыми, наблюдалось бы нормальное распределение временных задержек со средней величиной задержки 0 секунд. В реальных экспериментальных данных Δt почти всегда была положительной величиной, и нулевая гипотеза отвергалась ($p=0,02$), что указывает на то, что пик концентрации кальция и ретракция ламеллиподий связаны (Рис. 2В).

Обсуждение результатов

Полученные результаты позволяют выделить два типа поведения нейтрофилов, отличающихся как динамикой кальциевых сигналов, так и скоростью миграции. Первая подгруппа клеток, демонстрировала сравнительно медленное движение и выраженные кальциевые колебания, при которых клетка, по-видимому, более интенсивно «сканирует» пространство в

поисках оптимального направления движения. В то же время, другая часть клеток, у которых концентрация кальция оставалась практически постоянной, двигалась быстрее и, вероятно, уже реализовывала «устойчивый» хемотаксис в выбранном направлении. Это согласуется с ранее описанными двумя этапами «поискового» поведения нейтрофилов [25].

При анализе связи между скоростью движения и величиной (или характером) кальциевого ответа оказалось, что прямой зависимости не прослеживается. Быстрое продвижение нейтрофилов во время хемотаксиса может сохраняться при минимальных колебаниях внутриклеточного кальция; это согласуется с точкой зрения, что в определённых условиях нейтрофилам не всегда требуется существенная активация Ca^{2+} -зависимых путей для поддержания направленной миграции [19]. Однако, судя по нашим данным, временное повышение концентрации Ca^{2+} имеет ключевое значение для локальных событий в клетке, в частности для ретракции отдельных ламеллиподий, что согласуется с данными о модулировании кальция механизмов, ответственных за полимеризацию и деполимеризацию актина в нейтрофилах [20,21]. Известно, что в других типах клеток кальциевый сигнал также может служить триггером для ремоделирования цитоскелета: локальные выбросы Ca^{2+} активируют внутриклеточные пути, связанные с сократительной активностью актомиозина и деполимеризацией актинового каркаса, что приводит к сворачиванию (ретракции) избыточных псевдоподий [16–18].

В целом, наши данные указывают на то, что кальциевые сигналы в подвижных нейтрофилах преимущественно регулируют локальные ремоделирующие процессы (в частности, ретракцию ламеллиподий), но при этом могут не оказывать прямого влияния на общую скорость миграции клетки., а также подтверждает идею о том, что наличие или отсутствие выраженных кальциевых колебаний отражает различные стадии и способы поведения нейтрофилов при хемотаксисе.

Финансирование

Работа выполнялась при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук (1022040700681-7-3.1.8).

Список литературы

1. Summers C, Rankin SM, Condliffe AM, Singh N, Peters AM, Chilvers ER. Neutrophil kinetics in health and disease. Trends in Immunology 2010;31:318–24. <https://doi.org/10.1016/j.ti.2010.05.001>

- it.2010.05.006.
2. Lu H, Um K, Tartakovsky DM. Hybrid models of chemotaxis with application to leukocyte migration. *Journal of Mathematical Biology* 2021;82:23. <https://doi.org/10.1007/s00285-021-01581-7>.
3. Iglesias PA, Devreotes PN. Navigating through models of chemotaxis. *Current Opinion in Cell Biology* 2008;20:35–40. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2007.11.011>.
4. El-Daher SS, Patel Y, Siddiqua A, Hassock S, Edmunds S, Maddison B, et al. Distinct localization and function of (1,4,5)IP(3) receptor subtypes and the (1,3,4,5)IP(4) receptor GAP1(IP4BP) in highly purified human platelet membranes. *Blood* 2000;95:3412–22.
5. Norgauer J, Krutmann J, Dobos GJ, Traynor-Kaplan AE, Oades ZG, Schraufstatter IU. Actin polymerization, calcium-transients, and phospholipid metabolism in human neutrophils after stimulation with interleukin-8 and N-formyl peptide. *J Invest Dermatol* 1994;102:310–4. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12371788>.
6. Schattner M, Jenne CN, Negrotto S, Ho-Tin-Noe B. Editorial: Platelets and Immune Responses During Thromboinflammation. *Front Immunol* 2020;11:1079. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01079>.
7. Italiano Jr. JE, Battinelli EM. Selective sorting of alpha-granule proteins. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2009;7:173–6. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2009.03387.x>.
8. Szatmary AC, Nossal R, Parent CA, Majumdar R. Modeling neutrophil migration in dynamic chemoattractant gradients: assessing the role of exosomes during signal relay. *Molecular Biology of the Cell* 2017;28:3457–70. <https://doi.org/10.1091/mbc.e17-05-0298>.
9. Korobkin J-JD, Deordieva EA, Tesakov IP, Adamanskaya E-IA, Boldova AE, Boldyreva AA, et al. Dissecting thrombus-directed chemotaxis and random movement in neutrophil near-thrombus motion in flow chambers. *BMC Biol* 2024;22:115. <https://doi.org/10.1186/s12915-024-01912-2>.
10. Morozova DS, Martyanov AA, Obydennyi SI, Korobkin J-JD, Sokolov AV, Shamova EV, et al. Ex vivo observation of granulocyte activity during thrombus formation. *BMC Biol* 2022;20:32. <https://doi.org/10.1186/s12915-022-01238-x>.
11. Krause M, Gautreau A. Steering cell migration: lamellipodium dynamics and the regulation of directional persistence. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15:577–90. <https://doi.org/10.1038/nrm3861>.
12. Ridley AJ. Rho GTPases and cell migration. *Journal of Cell Science* 2001;114:2713–22. <https://doi.org/10.1242/jcs.114.15.2713>.
13. Shin ME, He Y, Li D, Na S, Chowdhury F, Poh Y-C, et al. Spatiotemporal organization, regulation, and functions of tractions during neutrophil chemotaxis. *Blood* 2010;116:3297–310. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-12-260851>.
14. Hann J, Bueb J-L, Tolle F, Brécard S. Calcium signaling and regulation of neutrophil functions: Still a long way to go. *Journal of Leukocyte Biology* 2020;107:285–97. <https://doi.org/10.1002/JLB.3RU0719-241R>.
15. Boucek MM, Snyderman R. Calcium Influx Requirement for Human Neutrophil Chemotaxis: Inhibition by Lanthanum Chloride. *Science* 1976;193:905–7. <https://doi.org/10.1126/science.948752>.
16. Tsai F-C, Seki A, Yang HW, Hayer A, Carrasco S, Malmersjö S, et al. A polarized Ca²⁺, diacylglycerol and STIM1 signalling system regulates directed cell migration. *Nat Cell Biol* 2014;16:133–44. <https://doi.org/10.1038/ncb2906>.
17. Dixit N, Simon SI. Chemokines, selectins and intracellular calcium flux: temporal and spatial cues for leukocyte arrest. *Front Immunol* 2012;3. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00188>.
18. Khazen R, Corre B, Garcia Z, Lemaître F, Bachellier-Bassi S, d'Enfert C, et al. Spatiotemporal dynamics of calcium signals during neutrophil cluster formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2022;119:e2203855119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2203855119>.
19. Francis EA, Heinrich V. Extension of chemotactic pseudopods by nonadherent human neutrophils does not require or cause calcium bursts. *Sci Signal* 2018;11:eaal4289. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aal4289>.
20. Morad H, Luqman S, Tan C-H, Swann V, McNaughton PA. TRPM2 ion channels steer neutrophils towards a source of hydrogen peroxide. *Sci Rep* 2021;11:9339. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88224-5>.
21. Yoo SK, Starnes TW, Deng Q, Huttenlocher A. Lyn is a redox sensor that mediates leukocyte wound attraction in vivo. *Nature* 2011;480:109–12. <https://doi.org/10.1038/nature10632>.
22. Hundhammer T, Gruber M, Wittmann S. Paralytic Impact of Centrifugation on Human Neutrophils. *Biomedicines* 2022;10:2896. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10112896>.
23. Nechipurenko DY, Receveur N, Yakimenko AO, Shepelyuk TO, Yakusheva AA, Kerimov RR, et al. Clot Contraction Drives the Translocation of Procoagulant Platelets to Thrombus Surface. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2019;39:37–47. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.118.311390>.
24. Korobkin J, Garcia A, Sveshnikova A. A minimal mathematical model of neutrophil pseudopodium formation during chemotaxis. *SBPR* 2021;1:6–12. <https://doi.org/10.52455/sbpr.01.202103012>.
25. Stopp J, Sixt M. Plan your trip before you leave: The neutrophils' search-and-run journey. *J Cell Biol* 2022;221:e202206127. <https://doi.org/10.1083/jcb.202206127>.

Имитация внеклеточного матрикса на основе полимеров для создания модели микроокружения опухоли.

Polymer-based simulation of extracellular matrix to create a tumor microenvironment model.

О. В. Мамонова^{1,2#}, Д. К. Симакина^{1,2}, Е. В. Терновская^{1,2}, Э. А. Ткаченко¹, М. Ю. Славина^{1,2}, Е. В. Ивановская^{1,2}.

Olga V. Mamonova^{1,2}, Daria K. Simakina^{1,2}, Elizaveta V. Ternovskaya^{1,2}, Elina A. Tkachenko¹, Maria Y. Slavina^{1,2}, Ekaterina V. Ivanovskaya^{1,2}

1. Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Миусская пл., 9, Москва, Россия, 125047
2. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук, Средняя Калитниковская, д. 30, Москва, Россия, 109029

Автор для переписки: mamonovaolha@yandex.ru

1. D.I. Mendeleev Russian University of Chemical Technology, Miusskaya pl., 9, Moscow, Russia, 125047
2. Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology Russian Academy of Sciences Moscow, 109029, Russia

Получено: 10.03.2024

Принято к публикации: 24.03.2024

Опубликовано: 30.06.2024

EDN: ZRQEJA

Аннотация

Способность раковых клеток отделяться от исходного опухолевого очага и образовывать метастазы связана с их влиянием на внеклеточный матрикс. Важным структурным компонентом является коллаген, способный видоизменяться под действием биохимических сигналов злокачественных клеток. В данной обзорной статье рассматриваются оптимальные биосовместимые полимеры, которые могут быть использованы при создании искусственного внеклеточного матрикса, а также требования, которым они должны соответствовать. Разработка имитации внеклеточного матрикса поможет в исследовании механизма эпителиально-мезенхимального перехода, а также позволит создать модель для тестирования противоопухолевых препаратов in vitro. Самыми подходящими для данной задачи стали сшитые полимеры, например, метакрилат желатина, сшитая гиалуроновая кислота, а также коллаген. Для имитации микроокружения опухоли применяют различные технологии сокультивации, которые также зависят от свойств полимерных каркасов.

Ключевые слова: Внеклеточный матрикс, Коллаген, Сокультивация, Метастазы, Полимерный каркас, Метакрилат желатина.

Annotation

The cancer cells ability to separate from the original tumor site and form metastases is associated with their effect on the extracellular matrix. An important structural component of extracellular

matrix is collagen, which can be modified by the biochemical signals of malignant cells. This review article discusses the optimal biocompatible polymers that can be used to create an artificial extracellular matrix, as well as the requirements they must meet. The development of an extracellular matrix simulation will help in the study of the mechanism of the epithelial-mesenchymal transition, and also will be helpful in creation of a model for testing antitumor drugs in vitro. Crosslinked polymers, such as gelatin methacrylate, crosslinked hyaluronic acid, and collagen, have become the most suitable for this task. Various co-cultivation technologies are used to simulate the tumor microenvironment, which also depend on the properties of polymer scaffolds.

Key words: Extracellular matrix, Collagen, Co-cultivation, Metastases, Polymer framework, Gelatin methacrylate.

Введение

Внеклеточный матрикс (ВКМ) представляет собой не клеточную трехмерную макромолекулярную сеть, состоящую из коллагена, протеогликанов/гликозаминогликанов, эластина, фибронектина, ламининов и нескольких других гликопротеинов. В этой сложной сети, образованной с помощью рецепторов клеточной адгезии, находятся клетки всех тканей и органов, а также происходят процессы их пролиферации, миграции и дифференцировки. ВКМ постоянно ремоделируется в результате взаимодействия с ферментами в нормальных условиях и при патологии, в том числе старении, травмах,

онкологических и генетических заболеваний [1,2]. Воссоздание ВКМ искусственным путем является сложной задачей в связи с необходимостью точной передачи физико-химических, реологических, биохимических свойств естественного матрикса определенной ткани. Ранее считалось, что на поведение клеток во внеклеточном матриксе влияют исключительно физические факторы, однако сейчас признано, что вклад молекулярного окружения не менее важен [3]. Поэтому, помимо всего прочего, модель внеклеточного матрикса не должна препятствовать взаимодействиям между цитоскелетом, рецептором клетки и самим матриксом, поддерживая при этом клеточную адгезию.

Искусственный ВКМ может применяться в различных областях: в науке при изучении клеточных сигналов, в тканевой инженерии, в медицине и косметологии. Наиболее подходящим для использования является Матригель - солюбилизированный экстракт, полученный из клеток мышины саркомы Энгельброта-Холма-Сворма. Его преимуществами являются биологическая активность, подходящие свойства для образования ацинарных сфероидов, возможность контроля за поведением и морфологией опухолевых клеток [4]. Его изготавливают путем измельчения мышины саркомы, затем ее очищают от растворимых и нерастворимых белков, центрифугируют, промывают трис-буферным физиологическим раствором с pH 7,4 при пониженной температуре и при 37°C гель застывает [5]. Основными недостатками Матригеля является его вариабельность от партии к партии (непостоянство физико-химических и биохимических свойств продукта) и неконтролируемая деградация, которая является ограничивающим фактором при изучении метастазирования рака. Искусственные ВКМ, синтезируемые на основе различных полимеров, лишены этих недостатков. Помимо этого, такие каркасы возможно «настраивать» под требуемые условия, изменяя состав, молекулярную массу, сшивающий агент, плотность сшивки и метод полимеризации [6].

Еще очень важная часть исследований строения и функций ВКМ посвящена процессу заживления ран и предотвращения признаков старения. На данный момент число стареющих людей среди населения становится все больше из-за увеличения продолжительности жизни человека в целом. С возрастом у людей возникает ряд проблем, связанных с изменением структуры ВКМ различных тканей [7]. Поэтому необходимо понимать, как отдельный компонент ВКМ влияет на деформацию всей ткани.

Цель данной статьи заключается в обзоре актуальных источников литературы и их анализе

для выявления оптимальных полимерных гелей, которые могут быть использованы в качестве имитации внеклеточного матрикса.

Строение и состав естественного внеклеточного матрикса

ВКМ состоит из двух составных частей: базовой мембраны (БМ) и интерстициального матрикса (ИМ). В здоровых тканях БМ - структурированная мембрана, которая покрывает эпителиальные и эндотелиальные клетки, а также отделяет их от интерстициального. ИМ же в свою очередь обеспечивает структурную поддержку нижележащих клеток и регулирует механизмы миграции клеток, клеточной адгезии, ангиогенез, развития и восстановления тканей. Помимо формообразующих элементов, таких как коллаген, фибронектин и эластин, в состав ВКМ входят протеогликаны, гликопротеиды, гиалуроновая кислота и интегрины, обеспечивающие передачу сигналов между клетками, а также другие белки, например, металлопротеиназы, тенасцины и факторы роста, поддерживающие гомеостаз и участвующие в заживлении ран [7,8].

Коллаген является главным компонентом ВКМ и составляет около 30% от общей массы белков в человеческом теле. Существует около 28 типов коллагена, которые в свою очередь делятся на так называемые фибриллярно-образующие коллагены и сетеобразующие коллагены [8]. Сама молекула коллагена является тримерной α -цепью, способной сплетаться в тройную спираль, как показано на рисунках 1a и 1b.

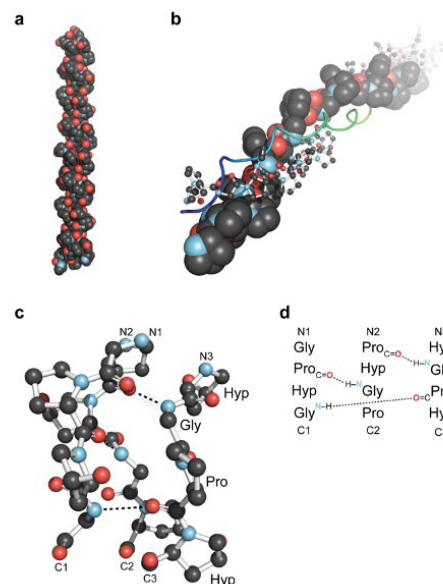


Рисунок 1. Обзор тройной спирали коллагена. (a) Первая кристаллическая структура высокого разрешения тройной спирали коллагена, образованной из (ProHypGly)₄-(ProHypAla)₁-(ProHypGly)₁. (b) Вид по оси тройной спирали (ProProGly) с тремя нитями, изображенными в виде заполнения пространства, шара и палочки, а также ленты. (c) Изображение сегмента тройной спирали коллагена в виде шарика и палочки, подчеркивающее лестницу межнитевых водородных связей. (d) Поэтапное расположение трех нитей в сегменте на панели с [9].

Причиной такой структуры является наличие глицина (Gly) в каждом третьем остатке (т. е. повторяющихся пептидных триплетов Gly-X-Y). В этом триплете X часто является пролином, а Y – гидроксипролином (рис. 1с, 1d). Функционирование коллагена зависит от правильной надмолекулярной сборки молекул в агрегат, который включается в матрикс [10]. Фибриллообразующие коллагены составляют большую часть основной массы матрикса – стромы. Коллаген I типа является наиболее распространенным фибриллярным коллагеном и обычно является гетеротримерным (состоит из двух цепей $\alpha 1(I)$ и одной $\alpha 2(I)$); однако было обнаружено, что некоторыми злокачественными клетками вырабатывается изоформа $\alpha 1(I)$, которая устойчива к протеолизу [11].

Во время прогрессирования онкологии гомеостаз ВКМ нарушается, и в зависимости от типа рака меняется структура коллагеновых волокон, эпителиальные клетки оказываются заключенными в строма, богатой коллагеном. Происходит ремодуляция коллагена, которая приводит к нарушению системы передачи биохимических сигналов. Под действием мутировавших генов-супрессоров в раковых клетках регулируется формирование коллагенового пучка, приводящее к наклону волокон от 60° до 90° относительно границы опухоли. Например, клетки рака молочной железы мигрируют *in vivo* вдоль линейаризованных коллагеновых волокон, выстроенных перпендикулярно границе «строма - опухоль». Такая организация волокон увеличивает устойчивость миграции злокачественных клеток, ограничивает доступ Т-клеток к опухоли, повышает плотность ткани вдоль продольной оси, что приводит к понижению прочности на разрыв. При увеличении плотности стромы и давления внутриопухолевой жидкости образуется структура, препятствующая транспортировке терапевтических средств к месту локализации опухоли [11,12].

Помимо изменения структуры ВКМ происходит также его разрушение под действием матриксных металлопротеиназ (ММП). Эти процессы могут происходить как при естественных процессах развития, морфогенеза, ремодуляции и деградации ткани, так и при патологии. ММП относятся к группе эндопептидаз, ферментативная активность которых определяется ионами Ca^{2+} и Zn^{2+} . Они экспрессируются в клетках соединительной ткани, в первую очередь в фибробластах, а также в нейтрофилах, моноцитах, макрофагах и эндотелиальных клетках. Экспрессия ММП поддерживается на постоянном низком уровне и регулируется факторами роста, цитокинами, различными гормонами,

взаимодействиями между клетками и ВКМ, а также физическими факторами, такими как УФ-излучение [13]. Матриксные металлопротеиназы можно разделить на 6 групп: коллагеназы (ММП-1, ММП-8, ММП-13), желатиназы (ММП-2, ММП-9), стромелизины (ММП-3, ММП-10, ММП-11), матрилизины (ММП-7, ММП-26), ММП мембранного типа (ММП-14, ММП-15, ММП-16) и другие неклассифицированные ММП [14,15].

Другим важным составляющим ВКМ являются протеогликаны, обеспечивающие гидратацию тканей, связывание факторов роста, защиту от инфицирования и формирование каркаса [16]. Протеогликаны можно разделить на несколько семейств. Все они имеют белковое ядро, которое покрыто гликозаминогликанами. Первое семейство составляют галектаны (лектиканы), белковое ядро которых имеет N-концевой глобулярный домен, взаимодействующий с гиалуроновой кислотой, и C-концевой домен, который связывает лектины. К этой группе относятся агрекан, версикан, нейрокан и бревикан. Второе семейство протеогликанов характеризуется наличием белкового ядра, состоящего из богатых лейцином повторов. Они создают подковообразную структуру, которая способствует белок-белковым взаимодействиям. Таким образом, данное семейство протеогликанов активно участвует в фибриллогенезе, клеточном росте, апоптозе и ремоделировании тканей. Типичными представителями являются декорин, бигликан, фибромодулин и кератокан [17,18].

Гиалуроновая кислота (ГК) - неотъемлемая часть ВКМ, она является неразветвленным гликозаминогликаном, состоящим из линейно повторяющихся дисахаридов: D-глюкуроновой кислоты и N-ацетил-D-глюкозамина, соединенных β -(1-3) гликозидной связью. ГК естественным образом синтезируется классом интегральных мембранных белков, называемых ГК-синтазами, и разрушается семейством ферментов, называемых гиалуронидазами. ГК выполняет роль каркаса, связывая другие молекулы матрикса. Было установлено, что молекула ГК в зависимости от гидродинамических условий, биохимического окружения и присутствия биополимеров, специфически связывающихся с ГК, может принимать различные структуры *in vivo*. Она участвует в ряде важных биологических процессов, таких как клеточная адгезия, клеточная подвижность, дифференцировка и пролиферация клеток, ангиогенез, заживление ран, митоз, миграция клеток, прогрессия и метастазирование опухолей, воспаление, механическая поддержка тканей, поддержание эластичности соединительных тканей, контроль гидратации тканей и транспорта воды [19].

Ламинины, также входящие в состав

ВКМ, представляют собой гетеротримеры, состоящие цепей α , β и γ [20]. Одной из общих и наиболее важных функций ламининов является взаимодействие с рецепторами, закрепленными в плазматической мембране клеток, регулирующее множество клеточных действий и сигнальных путей. Изоформы ламинина синтезируются самыми разными клетками в зависимости от специфичности ткани, это могут быть эпителиальные, эндотелиальные клетки, нервы, клетки костного мозга, а также гладкие, скелетные и сердечные мышцы [21].

Помимо перечисленных компонентов для ВКМ также важны эластин и фибронектин – белки, поддерживающие эластичность и прочность ткани, а также обеспечивающие пролиферацию, миграцию и дифференцирование клеток. Фибронектин (ФН) структурно представляет собой белковый димер, в котором два почти идентичных мономера соединены парой С-концевых дисульфидных связей, а каждая субъединица ФН состоит из гомологичных повторов трех типов модулей (FNI, FNII, FNIII). Эластин, обеспечивающий механическую прочность тканей, состоит из матрицы сшитого тропоэластина, на долю которого приходится 80% гидрофобных участков, например, общая повторяющаяся последовательность валина, пролина, глицина, аланина [22].

Нерастворимый эластин трудно использовать в качестве биоматериала, поскольку его структура содержит широкий спектр сшитых доменов. Однако эластин-подобные полипептиды (ELPs) представляют собой класс пептидных полимеров, полученных из гидрофобных остатков человеческого тропоэластина, и могут применяться в биоинженерии. ELPs не только демонстрируют биосовместимость, включая удовлетворяющие механические и вязкоупругие свойства, но и улучшают адгезию, пролиферацию и дифференциацию клеток [23].

Требования к искусственному ВКМ

Для того, чтобы культуры клеток, попадая в искусственный ВКМ, могли прикрепляться, расти и дифференцировать, полимерные каркасы должны обладать определенной прочностью, размером пор и правильными физико-химическими свойствами поверхности. Полимеры должны быть совместимы с культурами клеток, а также со средой для культивирования, не обладать цитотоксичностью. Для каждой ткани механические и физико-химические свойства ВКМ разные и определяются продуктами, выделяющимися в результате жизнедеятельности клеток. На искусственных матриксах выращивают клетки печени, костную и хрящевую ткань, кожу и мезенхимальные стромальные клетки (МСК) [24].

В отличие от децеллюляризованного ВКМ,

полимерные каркасы имеют относительное постоянство физико-химических показателей, таких как вязкость, размер пор, химический состав, скорость деградации. При соблюдении определенных условий (температура, влажность, интенсивность УФ-излучения в случае фотополимеризации) постоянными при проведении реакций полимеризации возможно достичь минимальные отклонения в структуре искусственного ВКМ, что дает возможность использовать его в качестве платформы для тестирования лекарственных препаратов [25].

При анализе источников литературы были выявлены основные реологические характеристики, которые следует учитывать при приготовлении искусственного ВКМ. Ключевыми параметрами при приготовлении каркаса являются вязкость, которая может оцениваться с помощью определения скорости сдвига [26,27], и модуль упругости, определяющийся путем испытаний на релаксацию при сжатии в ограниченном пространстве. Для этого используют прибор с параллельно компрессионными пластинами [26,28]. Для различных тканей существуют определенные реологические показатели. Например, для рассматриваемого ранее рака молочной железы, вязкоупругость тканей должна составлять 0.167–29 кПа, что достигается при использовании гелей на основе метакрилата желатина (GelMA) в 10% концентрации – результаты испытания на сжатие были в диапазоне 0,36–1,42 кПа [28,29].

Вязкость полимерного матрикса зависит от множества факторов, таких как температура, при которой проводилась полимеризация, концентрация полимера и его молекулярная масса. Также было выдвинуто предположение, что низкая вязкость приводит к более мелкой структуре пор геля [30]. Поры в геле должны быть связаны между собой, а их объем не препятствовать миграции и пролиферации клеток. Крупнопористые каркасы обеспечивают лучший доступ питательных веществ к клеткам, диффузию газов и удаление метаболитов, но могут приводить к слабой адгезии клеток. Мелкопористые структуры не препятствуют взаимодействию клеток с матриксом, поэтому обычно используются в тканевой инженерии в целях васкуляризации. Для фибробластов большой размер пор геля (от 50 до 90 мкм) не является препятствием для пролиферации, так как их распространение идет путем перемычек, в то время как для клеток эндотелия более предпочтителен меньший размер пор (5–40 мкм) [31]. При использовании желатина, сшитого с помощью генипина (натурального сшивающего агента), и варьировании температуры порообразования, удалось получить аналог

хрящевой ткани [32].

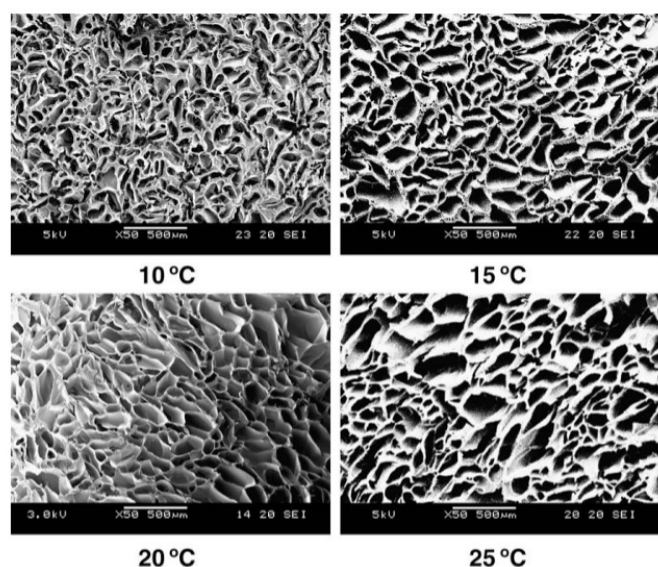


Рисунок 2. SEM-структура скаффолдов, сшитых при разных температурах. Зависимость размера пор от температуры образования: при увеличении температуры полимеризации растер размер пор [32].

На рисунке 2 показано как зависит размер пор от температуры порообразования. При увеличении температуры полимеризации растет и размер пор.

Способность к набуханию полимера также является важным параметром для имитации ВКМ. Она способствует транспортировке питательных веществ и метаболитов. Способность к поглощению также влияет на поддержание прочности каркаса. Скорость набухания можно рассчитать по формуле:

$$Swelling\ rate = \frac{W_{wet} - W_{dry}}{W_{dry}} * 100\%$$

где W_{wet} , W_{dry} – вес влажного и сухого скаффолда соответственно.

Биодеградация скаффолдов тоже важная характеристика, которая позволяет сравнить искусственный ВКМ с естественным и тем самым подобрать оптимальные концентрации полимера и сшивающего агента. Скорость деградации каркаса должна быть сопоставима с установленным временем культивирования так, чтобы структура матрикса оставалась целостной необходимый период [33]. Для оценки скорости деградации можно использовать ферменты, разрушающие полимер, из которого изготовлен ВКМ. Например, для скаффолда из коллагена используют раствор коллагеназы в фосфатном буфере: сначала измеряют вес высушенных коллагеновых матриксов (W_0), затем оставляют их в инкубаторе при 37 °C на 7 дней в растворе фермента, а после промывают и высушивают. Массы скаффолдов после реакции с ферментом и сушки (W) оцениваются каждый день с момента инкубации [34]. Рассчитывается скорость

деградации по формуле:

$$Degradation\ rate = \frac{W_0 - W}{W} * 100\%$$

Культивирование клеток на ВКМ с искусственным полимерным каркасом обеспечивается при использовании среды для культивирования. Для различных клеточных линий следует использовать подходящие для них среды [35]. Однако в контексте рака молочной железы, который не раз уже упоминался в данном обзоре, как для обычного культивирования раковых клеток, так и для со-культивации с фибробластами можно использовать среду DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS - fetal bovine serum) и 1% антибиотика [36,37].
Наиболее подходящие полимеры для имитирования ВКМ

Основными требованиями к искусственному ВКМ являются биосовместимость и нетоксичность полимера, из которого будет изготовлен каркас. Под данные условия подходят природные полимеры, такие как гиалуроновая кислота, коллаген, желатин, хитозан, фибрин, полигидроксиалканоат, альгиновая кислота [38]. Для придания полимерам требуемые для 3D культивирования механические и физико-химические свойства применяют сшивающие агенты.

Одним из часто используемых природных полимеров, который применяется для создания каркаса искусственного ВКМ, является желатин – гидролизированный коллаген. В число его преимуществ входит дешевизна и простота в применении. Для химической сшивки полимера могут быть использованы EDC-NHS (1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид гидрохлорид в сочетании с N-гидроксисукцинимидом), скваровая кислота (СК) и диальдегидный крахмал (ДАК). Данные сшивающие агенты обладают малой цитотоксичностью и биосовместимы. Также может быть использован генипин, однако его применяют редко из-за высокой стоимости [39]. Применение сшивающих агентов повышает температуру плавления и механическую прочность геля желатина, тем самым приближая его свойства к свойствам естественной ткани [40].

Метакрилат желатина или GelMA, полученный путем фотосшивания желатина с метакриловым ангидридом, широко используется для биопечати тканевой инженерии благодаря своей устойчивости и биосовместимости. Его можно по-разному модифицировать, добавляя другие сшивающие агенты или сшивая с другими полимерами, например, с гиалуроновой кислотой [41]. Особенность работы с гелями, для отверждения которых требуется УФ-излучение, заключается

в наличии малых долей непрореагировавших радикалов, которые обладают цитотоксичностью. Для предотвращения негативных условий для культивирования интенсивность УФ-излучения, время его воздействия и концентрацию фотоинициатора тщательно рассчитывают. Наиболее биосовместимыми и неиммуногенными фотоинициаторами являются 2-гидрокси-40-(2-гидроксиэтокси)-2-метилпропиофенон (IC-2959) и литийфенил-2,4,6-триметилбензоилфосфинат (LAP) [42].

Гиалуроновая кислота является перспективным полисахаридом, используемым для тканевой инженерии, регенерации ткани и ее увлажнения. Гидрогели на ее основе могут применяться в инженерии нервной ткани и тканей мозга, так как не препятствуют миграции стволовых нервных клеток и обеспечивают передачу сигналов между ними. Важным является то, что данный гидрогель должен быть дополнен ламинином, так как нервные клетки не способны к адгезии на гиалуроновой кислоте [43]. Для улучшения клеточной адгезии для гидрогелей ГК возможно также использование аргинилглициласпарагиновой кислоты (RGD – последовательность), фибриногена и других белков адгезии [44].

Как было сказано ранее, огромную роль в структурообразовании внеклеточного матрикса играет фибриллярный коллаген первого типа. Естественный коллаген обладает высокой прочностью на разрыв и протеолитической устойчивостью благодаря межмолекулярным водородным связям, что делает его подходящим полимером для 3D культивирования. Однако, как и другие белки, со временем коллаген теряет свои механические свойства и бесконтрольно разрушается. Поэтому для создания искусственных матриксов используют сшивающие агенты [45]. Если рассматривать химическое сшивание, то для обеспечения биосовместимости используются агенты, которые в результате реакции не оставляют цитотоксичного электрофильного вещества и не выделяют его при деградации. Например, добавление хитозана в реакцию коллагена с глутаровым альдегидом увеличивает эффективность сшивки, тем самым снижая цитотоксичность конечного продукта [46].

Требуемую структуру внеклеточного матрикса можно обеспечить и при помощи физических методов, например, электроспиннинга коллагеновых волокон. За счет воздействия электромагнитного поля на волокна, структуру внеклеточного матрикса можно контролировать, делая ее специфичной для каждой ткани, а также делать ее более стабильной на счет физической сшивки полимерных нитей [47,48]. Биопринтинг 3D матриксов на основе коллагена первого

типа также применяется в инженерии тканей и позволяет создавать более сложные структуры [49].

Среди рассмотренных биополимеров наиболее подходящими для 3D культивирования являются коллаген и желатин, так как наиболее похожи по структуре и составу на естественный ВКМ. Из-за отсутствия тримерных цепей желатин уступает в своей способности проводить клеточные сигналы и обеспечивать взаимодействия клеток с матриксом коллагену. Правда, сшитые метакриловым ангидридом данные полимеры хорошо проявили себя в обеспечении пролиферации культивируемых на них клеток [50,51]. Так как данные гидрогели часто используются в биопринтинге, GelMA стал наиболее востребованным благодаря его стабильности, дешевизне и биосовместимости. Метакрилат коллагена, созданный по аналогии с GelMA, менее устойчив к механическому воздействию и более токсичен за счет низкой конверсии метакрилового ангидрида, однако, данные недостатки были нивелированы за счет снижения температуры синтеза до 4 °C и подкисления растворителя. В результате полученный гель обеспечил лучшую экспрессию генов и пролиферацию клеток, чем метакрилат желатина, однако, механические свойства гидрогеля еще требуют усовершенствования [52].

Методы и способы применения ВКМ для со-культивации

Для того, чтобы выращивать одновременно две культуры используют различные методы образования сфероидов клеток для воссоздания естественного положения опухоли в ткани. Образование сфероидов может осуществляться разными методами. Один из них - метод висячей капли (рис. 3а), основанный на поверхностном натяжении. В ходе данного опыта требуется внести аликвоту клеточной суспензии в лунку планшета, а затем перевернуть его так, чтобы образовалась висячая капля с клетками. Этот метод является самым ранним из представленных и самым простым, так как требует меньше вспомогательных веществ. Однако [53]. Другой метод - forced floating method (рис.3б), является более затратным и основан на применении сосуда со стенками, к которым клетки не способны прикрепляться. Также можно использовать агенты, препятствующие адгезии, например, среду для культивирования с добавлением метилцеллюлозы [54]. Данные агенты не ограничивают возможность клеток образовывать агрегаты, а в дальнейшем и сфероиды. Размер сфероидов может контролироваться за счет изменения количества внесенных клеток. Также существует похожий метод - агрегационный (рис.3с), основанный на перемешивании суспензии

клеток в аппарате с не адгезионными стенками. В данном методе размеры сфероидов варьируются за счет спонтанной агрегации и столкновения клеток, что в перспективе тестирования лекарственных средств будет негативно влиять на воспроизводимость экспериментов [55].

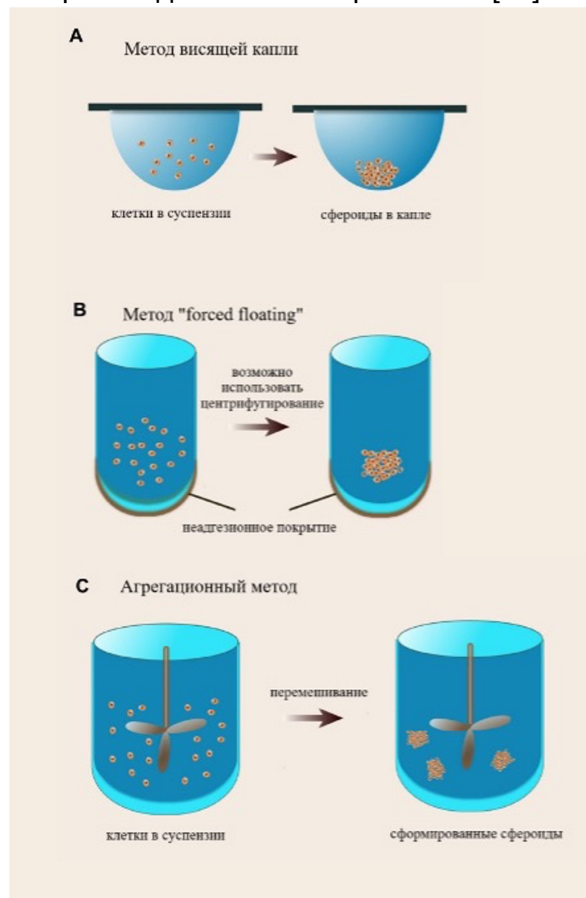


Рисунок 3. Методы формирования клеточных сфероидов [56].

Формирование клеточных сфероидов необходимо в случае культивирования на 3D матрице опухолевых клеток и МСК. Если же требуется внести в матрикс фибробласты или макрофаги, то их изначально требуется смешать с раствором несшитого полимера, а затем подвергнуть фотосшиванию. После формирования геля сверху вносится суспензия опухолевых клеток [56].

В естественном ВКМ, как было описано ранее, содержатся необходимые белки, обеспечивающие адгезию, пролиферацию, дифференцировку, экспрессию генов и передачу сигналов. При со-культивации с другими клеточными линиями, например, с фибробластами, которые синтезируют множество необходимых элементов ВКМ, клетки опухоли смогут взаимодействовать со своим микроокружением [57].

Со-культивация на гидрогеле из GelMA клеток меланомы и фибробластов была приведена в статье Миаобэна Ву [58]. В раствор-предшественник метакрилата желатина (до фотосшивания), содержащий среду для культивирования, вносилась

суспензия фибробластов, после чего гель подвергался отверждению УФ-излучением (405 нм). Получающийся в лунках цилиндр из GelMA и фибробластов далее вносили в 24 луночный планшет, где находилась среда для культивирования. Сверху наносилась суспензия с клетками меланомы. Результаты показали, что скорость пролиферации клеток меланомы в со-культивации с фибробластами оказалась выше, чем в GelMA без фибробластов. Также были обнаружены маркеры эпителиально-мезенхимального перехода, что является признаком преобладания миграционных и инвазивных свойств. Были сделаны выводы о взаимном влиянии клеток меланомы и фибробластов.

Закключение

В ходе обзора литературы были подробно изучены основные компоненты ВКМ: коллаген, матриксные металлопротеиназы, протеогликаны, эластин, фибронектин, ламинин, гиалуроновая кислота. Было выявлено, что структура коллагена изменяется при прогрессировании онкологии. Под действием мутировавших генов в раковых клетках коллагеновые волокна выстраиваются перпендикулярно границе опухоли и уплотняются, тем самым обеспечивая устойчивость к миграции злокачественных клеток. Такая линейаризация коллагена ограничивает доступ Т-клеток к опухоли и препятствует связыванию лекарственного средства с мишенью. Для имитации ВКМ возможно применение как свободных природных полимеров, например, коллаген, так и сшитых специальными агентами, например, метакрилат желатина (GelMA), сшитая гиалуроновая кислота, метакрилат коллагена. Важно, чтобы матрицы на основе полимеров совпадали по вязкоупругим свойствам, прочности на сжатие и на разрыв с естественными реологическими показателями ткани, а размеры пор гидрогелей не препятствовали клеточной пролиферации и адгезии. Применение искусственного ВКМ на основе сшитых полимеров при со-культивации культур опухолевых клеток и фибробластов является перспективной задачей. Если удастся получить сшитый полимерный гель, способный к контролируемой деградации и обеспечивающий передачу сигналов между клетками, то появится возможность тестировать противоопухолевые препараты на модели естественного микроокружения опухоли.

Список литературы

1. Theocharis AD, Skandalis SS, Gialeli C, Karamanos NK. Extracellular matrix structure. *Adv Drug Deliv Rev* 2016;97:4–27. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.11.001>.
2. Cheong S, Peng Y, Lu F, He Y. Structural extracellular matrix-mediated molecular signaling

- in wound repair and tissue regeneration. *Biochimie* 2024;S030090842400230X. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2024.10.003>.
3. Bandzerewicz A, Gadomska-Gajadur A. Into the Tissues: Extracellular Matrix and Its Artificial Substitutes: Cell Signalling Mechanisms. *Cells* 2022;11:914. <https://doi.org/10.3390/cells11050914>.
 4. Tamayo-Angorrilla M, López De Andrés J, Jiménez G, Marchal JA. The biomimetic extracellular matrix: a therapeutic tool for breast cancer research. *Transl Res* 2022;247:117–36. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2021.11.008>.
 5. Passaniti A, Kleinman HK, Martin GR. Matrigel history/background, uses, and future applications. *J Cell Commun Signal* 2022;16:621–6. <https://doi.org/10.1007/s12079-021-00643-1>.
 6. Aisenbrey EA, Murphy WL. Synthetic alternatives to Matrigel. *Nat Rev Mater* 2020;5:539–51. <https://doi.org/10.1038/s41578-020-0199-8>.
 7. Kular JK, Basu S, Sharma RI. The extracellular matrix: Structure, composition, age-related differences, tools for analysis and applications for tissue engineering. *J Tissue Eng* 2014;5:2041731414557112. <https://doi.org/10.1177/2041731414557112>.
 8. Nissen NI, Karsdal M, Willumsen N. Collagens and Cancer associated fibroblasts in the reactive stroma and its relation to Cancer biology. *J Exp Clin Cancer Res* 2019;38:115. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1110-6>.
 9. Shoulders MD, Raines RT. Collagen Structure and Stability. *Annu Rev Biochem* 2009;78:929–58. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833>.
 10. Gordon MK, Hahn RA. Collagens. *Cell Tissue Res* 2010;339:247–57. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0844-4>.
 11. Ouellette JN, Drifka CR, Pointer KB, Liu Y, Lieberthal TJ, Kao WJ, et al. Navigating the Collagen Jungle: The Biomedical Potential of Fiber Organization in Cancer. *Bioengineering* 2021;8:17. <https://doi.org/10.3390/bioengineering8020017>.
 12. Xu S, Xu H, Wang W, Li S, Li H, Li T, et al. The role of collagen in cancer: from bench to bedside. *J Transl Med* 2019;17:309. <https://doi.org/10.1186/s12967-019-2058-1>.
 13. Jabłońska-Trypuć A, Matejczyk M, Rosochacki S. Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2016;31:177–83. <https://doi.org/10.3109/14756366.2016.1161620>.
 14. Goodarzi K, Rao SS. Structurally decoupled hyaluronic acid hydrogels for studying matrix metalloproteinase-mediated invasion of metastatic breast cancer cells. *Int J Biol Macromol* 2024;277:134493. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.134493>.
 15. Kwon MJ. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets in breast cancer. *Front Oncol* 2023;12:1108695. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.1108695>.
 16. Iozzo RV, Schaefer L. Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. *Matrix Biol* 2015;42:11–55. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2015.02.003>.
 17. Bosman FT, Stamenkovic I. Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J Pathol* 2003;200:423–8. <https://doi.org/10.1002/path.1437>.
 18. Suhovskih AV, Grigorieva EV. Proteoglycans in normal physiology and carcinogenesis. *Adv Mol Oncol* 2018;5:8–25. <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2018-5-1-8-25>.
 19. Al-Khateeb R, Prpic J. Hyaluronic Acid: The Reason for Its Variety of Physiological and Biochemical Functional Properties. *Appl Clin Res Clin Trials Regul Aff* 2019;6:112–59. <https://doi.org/10.2174/2213476X06666190405094637>.
 20. Hohenester E, Yurchenco PD. Laminins in basement membrane assembly. *Cell Adhes Migr* 2013;7:56–63. <https://doi.org/10.4161/cam.21831>.
 21. Aumailley M. The laminin family. *Cell Adhes Migr* 2013;7:48–55. <https://doi.org/10.4161/cam.22826>.
 22. Park B-H, Jeong E-S, Lee S, Jang J-H. Bio-functionalization and in-vitro evaluation of titanium surface with recombinant fibronectin and elastin fragment in human mesenchymal stem cell. *PLOS ONE* 2021;16:e0260760. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260760>.
 23. Wen Q, Mithieux SM, Weiss AS. Elastin Biomaterials in Dermal Repair. *Trends Biotechnol* 2020;38:280–91. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.08.005>.
 24. Porwal S, Sridhar SB, Talath S, Wali AF, Warsi MH, Malviya R. 3D printable sustainable hydrogel formulations for tissue engineering applications. *J Drug Deliv Sci Technol* 2024;101:106308. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2024.106308>.
 25. Kaemmerer E, Melchels FPW, Holzapfel BM, Meckel T, Huttmacher DW, Loessner D. Gelatine methacrylamide-based hydrogels: An alternative three-dimensional cancer cell culture system. *Acta Biomater* 2014;10:2551–62. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.02.035>.
 26. Silva-Correia J, Gloria A, Oliveira MB, Mano JF, Oliveira JM, Ambrosio L, et al. Rheological and mechanical properties of acellular and cell-laden methacrylated gellan gum hydrogels. *J Biomed Mater Res A* 2013;101:3438–46. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34650>.
 27. Kardas P, Astasov-Frauenhoffer M, Braissant O, Bornstein MM, Walimo T. Bacterial extracellular polymeric substances as potential saliva substitute. *FEMS Microbiol Lett* 2022;369:fnac028. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnac028>.
 28. Arya AD, Hallur PM, Karkisaval AG, Gudipati A, Rajendiran S, Dhavale V, et al. Gelatin Methacrylate Hydrogels as Biomimetic Three-Dimensional Matrixes for Modeling Breast Cancer Invasion and Chemoresponse in Vitro. *ACS Appl Mater Interfaces* 2016;8:22005–17. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b06309>.

29. McKee CT, Last JA, Russell P, Murphy CJ. Indentation Versus Tensile Measurements of Young's Modulus for Soft Biological Tissues. *Tissue Eng Part B Rev* 2011;17:155–64. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2010.0520>.
30. Florczyk SJ, Kim D, Wood DL, Zhang M. Influence of processing parameters on pore structure of 3D porous chitosan–alginate polyelectrolyte complex scaffolds. *J Biomed Mater Res A* 2011;98A:614–20. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.33153>.
31. Carletti E, Motta A, Migliaresi C. Scaffolds for Tissue Engineering and 3D Cell Culture. In: Haycock JW, editor. *3D Cell Cult.*, vol. 695, Totowa, NJ: Humana Press; 2011, p. 17–39. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-984-0_2.
32. Lien S-M, Ko L-Y, Huang T-J. Effect of pore size on ECM secretion and cell growth in gelatin scaffold for articular cartilage tissue engineering. *Acta Biomater* 2009;5:670–9. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.09.020>.
33. Milojević M, Harih G, Vihar B, Vajda J, Gradišnik L, Zidarič T, et al. Hybrid 3D Printing of Advanced Hydrogel-Based Wound Dressings with Tailorable Properties. *Pharmaceutics* 2021;13:564. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13040564>.
34. Kaczmarek-Szczepańska B, Polkowska I, Małek M, Kluczyński J, Paździor-Czapula K, Wekwejt M, et al. The characterization of collagen-based scaffolds modified with phenolic acids for tissue engineering application. *Sci Rep* 2023;13:9966. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-37161-6>.
35. Freshney RI. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*. 1st ed. Wiley; 2010. <https://doi.org/10.1002/9780470649367>.
36. Chiew GGY, Wei N, Sultania S, Lim S, Luo KQ. Bioengineered three-dimensional co-culture of cancer cells and endothelial cells: A model system for dual analysis of tumor growth and angiogenesis. *Biotechnol Bioeng* 2017;114:1865–77. <https://doi.org/10.1002/bit.26297>.
37. Sung H-W, Huang D-M, Chang W-H, Huang R-N, Hsu J-C. Evaluation of gelatin hydrogel crosslinked with various crosslinking agents as bioadhesives: In vitro study. *J Biomed Mater Res* 1999;46:520–30. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(19990915\)46:4<520::AID-JBM10>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(19990915)46:4<520::AID-JBM10>3.0.CO;2-9).
38. Kim B-S, Park I-K, Hoshiba T, Jiang H-L, Choi Y-J, Akaike T, et al. Design of artificial extracellular matrices for tissue engineering. *Prog Polym Sci* 2011;36:238–68. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2010.10.001>.
39. Skopinska-Wisniewska J, Tuszyńska M, Olewnik-Kruszkowska E. Comparative Study of Gelatin Hydrogels Modified by Various Cross-Linking Agents. *Materials* 2021;14:396. <https://doi.org/10.3390/ma14020396>.
40. Kuijpers AJ, Engbers GHM, Krijgsveld J, Zaat SAJ, Dankert J, Feijen J. Cross-linking and characterisation of gelatin matrices for biomedical applications. *J Biomater Sci Polym Ed* 2000;11:225–43. <https://doi.org/10.1163/156856200743670>.
41. Duchi S, Onofrillo C, O'Connell CD, Blanchard R, Augustine C, Quigley AF, et al. Handheld Co-Axial Bioprinting: Application to in situ surgical cartilage repair. *Sci Rep* 2017;7:5837. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05699-x>.
42. Kurian AG, Singh RK, Patel KD, Lee J-H, Kim H-W. Multifunctional GelMA platforms with nanomaterials for advanced tissue therapeutics. *Bioact Mater* 2022;8:267–95. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.06.027>.
43. Nelson DW, Gilbert RJ. Extracellular Matrix-Mimetic Hydrogels for Treating Neural Tissue Injury: A Focus on Fibrin, Hyaluronic Acid, and Elastin-Like Polypeptide Hydrogels. *Adv Healthc Mater* 2021;10:2101329. <https://doi.org/10.1002/adhm.202101329>.
44. Zaviskova K, Tukmachev D, Dubisova J, Vackova I, Hejcl A, Bystronova J, et al. Injectable hydroxyphenyl derivative of hyaluronic acid hydrogel modified with RGD as scaffold for spinal cord injury repair. *J Biomed Mater Res A* 2018;106:1129–40. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36311>.
45. Chattopadhyay S, Raines RT. Collagen-based biomaterials for wound healing. *Biopolymers* 2014;101:821–33. <https://doi.org/10.1002/bip.22486>.
46. Gorham SD, Light ND, Diamond AM, Willins MJ, Bailey AJ, Wess TJ, et al. Effect of chemical modifications on the susceptibility of collagen to proteolysis. II. Dehydrothermal crosslinking. *Int J Biol Macromol* 1992;14:129–38. [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(05\)80002-9](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(05)80002-9).
47. Blackstone BN, Gallentine SC, Powell HM. Collagen-Based Electrospun Materials for Tissue Engineering: A Systematic Review. *Bioengineering* 2021;8:39. <https://doi.org/10.3390/bioengineering8030039>.
48. Matthews JA, Wnek GE, Simpson DG, Bowlin GL. Electrospinning of Collagen Nanofibers. *Biomacromolecules* 2002;3:232–8. <https://doi.org/10.1021/bm015533u>.
49. Osidak EO, Kozhukhov VI, Osidak MS, Domogatsky SP. Collagen as Bioink for Bioprinting: A Comprehensive Review. *Int J Bioprinting* 2024;6:270. <https://doi.org/10.18063/ijb.v6i3.270>.
50. Xiao S, Zhao T, Wang J, Wang C, Du J, Ying L, et al. Gelatin Methacrylate (GelMA)-Based Hydrogels for Cell Transplantation: an Effective Strategy for Tissue Engineering. *Stem Cell Rev Rep* 2019;15:664–79. <https://doi.org/10.1007/s12015-019-09893-4>.
51. Khan OF, Sefton MV. Patterning Collagen/Poloxamine-Methacrylate Hydrogels for Tissue-Engineering-Inspired Microfluidic and Laser Lithography Applications. *J Biomater Sci Polym Ed* 2011;22:2499–514. <https://doi.org/10.1163/092050610X540693>.
52. Shi H, Li Y, Xu K, Yin J. Advantages of photocurable collagen-based cell-laden bioinks compared to methacrylated gelatin (GelMA) in digital light processing (DLP) and extrusion bioprinting. *Mater Today Bio* 2023;23:100799.

<https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2023.100799>.

53. Stadler M, Walter S, Walzl A, Kramer N, Unger C, Scherzer M, et al. Increased complexity in carcinomas: Analyzing and modeling the interaction of human cancer cells with their microenvironment. *Semin Cancer Biol* 2015;35:107–24. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.08.007>.
54. Leung BM, Leshner-Perez SC, Matsuoka T, Moraes C, Takayama S. Media additives to promote spheroid circularity and compactness in hanging drop platform. *Biomater Sci* 2015;3:336–44. <https://doi.org/10.1039/C4BM00319E>.
55. Rodday B, Hirschhaeuser F, Walenta S, Mueller-Klieser W. Semiautomatic Growth Analysis of Multicellular Tumor Spheroids. *SLAS Discov* 2011;16:1119–24. <https://doi.org/10.1177/1087057111419501>.
56. He J, Xiong L, Li Q, Lin L, Miao X, Yan S, et al. 3D modeling of cancer stem cell niche. *Oncotarget* 2018;9:1326–45. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19847>.
57. Tibbitt MW, Anseth KS. Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. *Biotechnol Bioeng* 2009;103:655–63. <https://doi.org/10.1002/bit.22361>.
58. Wu M, Yu E, Ye K, Huang Y, Ren T, Guo M, et al. Evaluation of the Effect of Fibroblasts on Melanoma Metastasis Using a Biomimetic Co-Culture Model. *ACS Biomater Sci Eng* 2023;9:2347–61. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.2c01186>.

Взаимодействие протромбина с субпопуляциями активированных тромбоцитов.

The prothrombin interaction to subpopulations of activated platelets.

П.А. Соловьева^{1,2}, С.И. Обыденный^{1,3}, Н. А. Подоплелова^{1,3,*}.

P.A. Solovyova^{1,2}, S.I. Ordinary^{1,3}, N. A. Podoplelova^{1,3,*}

1. ФГБУН «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии» РАН, Москва
2. Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)»
3. ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

Автор для переписки: podoplelovan@yandex.ru

1. Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology Russian Academy of Sciences Moscow, 109029, Russia
2. Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education "Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University)"
3. National Medical Research Centre of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitry Rogachev Moscow, 117198, Russia

Получено: 01.03.2024

Принято к публикации: 26.03.2024

Опубликовано: 30.06.2024

EDN: BXLQLD

Аннотация

Одной из основных реакций свертывания крови является мембранозависимая активация протромбина комплексом протромбиназой. Существует по крайней мере две субпопуляции активированных тромбоцитов отличающиеся по способности взаимодействовать с факторами свертывания и участвовать в мембранных реакциях. Систематические кинетические исследования связывания протромбина с мембранами активированных тромбоцитов с учетом их деления на субпопуляции отсутствуют.

В рамках данной работы было количественно охарактеризовано взаимодействие протромбина с активированными тромбоцитами. Показано, что протромбин преимущественно связывался с фосфатидилсерин-положительной субпопуляцией тромбоцитов. Полученные параметры связывания протромбина с ФС-положительными тромбоцитами: $K_d = 1,4 \pm 0,4$ мкМ (среднее $\pm$ SD, $n = 3$) и 8500 ± 2500 сайтов связывания на тромбоцит. Константу прямой реакции k_+ из полученных данных рассчитать невозможно. Константа обратной реакции $k_- = 0,8 \pm 0,2$ с⁻¹ (среднее $\pm$ SD, $n = 4$).

Ключевые слова: Мембранозависимые реакции; Тромбоциты; Свертывание крови; Протромбин; Фосфатидилсерин.

Annotation

One of the main reactions of blood coagulation is membrane-dependent activation of prothrombin by the prothrombinase complex. There are at least two subpopulations of activated platelets that differ in their

ability to interact with clotting factors and participate in membrane reactions. There are no systematic kinetic studies of the binding of prothrombin to the membranes of activated platelets, taking into account their division into subpopulations.

In this work, the interaction of prothrombin with activated platelets was quantified. It was shown that prothrombin was predominantly bound to the phosphatidylserine-positive platelet subpopulation. Additional parameters for communication with software components: $K_d = 1.4 \pm 0.4$ μ M (average $\pm$ SD, $n = 3$) and 8500 ± 2500 binding sites on the platelet. It is impossible to calculate the the direct reaction constant k_+ from the received data. The the feedback constant is $k_- = 0,8 \pm 0,2$ s⁻¹ (average $\pm$ SD, $n = 4$).

Key words: Membrane-dependent reactions; Platelets; Blood coagulation; Prothrombin; Phosphatidylserine.

Введение

Свертывание крови представляет собой каскад ферментативных реакций, регулирующих образование фибриновой сети и остановку кровотечения в результате повреждения сосудов. Однако только незначительная часть реакций свертывания происходит в самой плазме крови. Все основные процессы на самом деле являются двумерными реакциями, локализованными на мембранах активированных тромбоцитов, эндотелиальных клеток или поврежденного субэндотелия, либо микрочастиц, выделяемых этими клетками [1, 2].

Стимуляция тромбоцитов мощными

агонистами, такими как тромбин или коллаген, приводит к выставлению фосфатидилсерина на внешний слой клеточной мембраны у части тромбоцитов [3, 4]. По-видимому, основной функцией фосфатидилсерин-положительных тромбоцитов является поддержание реакции плазменного свертывания. В ряде работ было показано, что факторы свертывания преимущественно связываются именно с фосфатидилсерин-положительными тромбоцитами [3, 5–8]. И именно на поверхности этих тромбоцитов происходят основные реакции плазменного свертывания. До сих пор до конца не ясно, чем обусловлена такая сильная зависимость большинства реакций свертывания от фосфолипидных мембран. Одним из возможных объяснений может быть ускорение мембранных реакций за счет того, что связывание факторов на фосфолипидной мембране приводит к увеличению их локальной концентрации за счет перехода из трехмерного в двумерное пространство. Есть указания, что скорость работы комплексов теназы и протромбиназы ограничена не каталитической активностью фермента, а скоростью диффузии субстрата к мембране. Возможно, что концентрирование факторов на мембране позволяет ускорять эти реакции выше диффузионного предела для реакций с растворимыми ферментами [1, 2]. Еще одно объяснение заключается в том, что белки свертывания в связанном с тромбоцитами состоянии не вымываются из тромбоцитарного тромба и не уносятся потоком крови [9].

Первый наиболее важный шаг любой мембранной реакции – это непосредственно связывание белка с мембраной. В нескольких исследованиях сообщалось о скоростях и параметрах связывания для ассоциации протромбина с очищенными фосфолипидными мембранами [10–12]. Тем не менее, механизм этого связывания, как это ни парадоксально, никогда не изучался подробно, а данные о связывании с естественными активированными мембранами тромбоцитов ограничены.

В рамках данной работы было исследовано взаимодействие протромбина с мембранами субпопуляций активированных тромбоцитов с использованием проточной цитометрии и конфокальной микроскопии.

Материалы и Методы

Материалы

В работе были использованы следующие реагенты: пробирки вакуумные VACUETTE с натрия цитратом 3,2% (Greiner Bio-One, Кремс-мюнстер, Австрия); простагландин E1

(PGE1) (MP Biochemicals, Ирвин, США); тромбин (Haematologic Technologies, Колчестер, США); кальциевый зонд Fura Red; краситель кальцеин; краситель Alexa647 (Molecular Probes, США); протромбин (Enzyme Research Laboratories, Саут-Бенд, Индиана, США). Если не указано иного, то был использован реагент производства Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США.

Методы

Выделение тромбоцитов из цельной крови.

Цельную кровь у здоровых доноров набирали в вакуумные пробирки Vacuette, содержащие 3,2% цитрат натрия. В кровь добавляли простагландин E₁ (PGE₁) (1 мкМ) и апиразу (3 ед./мл) после чего центрифугировали при комнатной температуре при 100g в течение 8 минут. После завершения центрифугирования цельной крови отбирали богатую тромбоцитами плазму, в которую, для предотвращения агрегации клеток, добавляли раствор цитрата натрия (106 мМ, pH 5.5) в соотношении плазма: цитрат – 3:1. Затем, плазму центрифугировали при комнатной температуре при 400g в течение 5 минут. Супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в 300 мкл буфера Тироде (20 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl, 1 мМ MgCl₂, 0.4 мМ NaH₂PO₄, 5 мМ глюкозы, 0.5% бычий сывороточный альбумин, pH 7.4). Очистку тромбоцитов от белков плазмы проводили методом гель-хроматографии на сефарозе CL-2B. Для экспериментов, включающих определение внутриклеточной концентрации Ca²⁺, тромбоциты перед хроматографией инкубировали с красителем Fura Red (2 мкМ) 30 минут при комнатной температуре в присутствии простагландина E₁ (3 мкМ). Активацию клеток проводили тромбином (100 нМ здесь и далее указана концентрация активных сайтов фермента) в течение 15 минут при комнатной температуре в присутствии CaCl₂ (2,5 мМ).

Конъюгирование протромбина с флуоресцентной меткой.

Перед конъюгацией с флуоресцентным красителем проводили диализ протромбина при +40°C в течение 2 часов против фосфатного буфера (pH 7,3-7,4) с использованием диализных мембран с размером пор 3,5 кДа. В качестве флуоресцентной метки использовали краситель Alexa647. Реакцию проводили в бикарбонатном буфере (0,1 М; pH 9,0) при +40°C в течение 2 часов при постоянном перемешивании. Молярное отношение красителя к белку в реакционной смеси составляло 5. Реакцию останавливали добавлением избытка гидроксилламингидрохлорида (30 мМ, pH 8,5). Очистку от непрореагировавшей флуоресцентной метки проводили гель-хроматографией на Сефадексе G-25. Во всех полученных конъюгатах молярное соотношение краситель/белок

составляло 2-3 к 1. Оценку активности полученных конъюгатов проводили с помощью клоттинговых тестов. Во всех случаях активность протромбина была более 80%.

Оценка образования агрегатов в процессе активации тромбоцитов.

Для исключения агрегатов из анализа связывания протромбина с активированными тромбоцитами, тромбоциты перед проведением гель-хроматографии были разделены на два образца. Один образец тромбоцитов перед хроматографией инкубировали с красителем Fura Red (2 мкМ) 30 минут при комнатной температуре в присутствии простагландина E1 (3 мкМ). Второй образец инкубировали с красителем кальцеин-AM (50 нМ) 30 минут при 37°C в присутствии простагландина E1 (3 мкМ). После инкубации с красителями проводили гель-хроматографию полученных образцов на сефарозе CL-2B. Затем образцы тромбоцитов, загруженные Fura Red и кальцеином –AM смешивали в соотношении 1:1, активировали тромбином (100 нМ) и использовали для исследования связывания протромбина. Агрегаты определяли, как двойные позитивные события по Fura Red и кальцеин-AM (рисунок 1В, агрегаты выделены синим), и исключали из дальнейшего рассмотрения.

Равновесное связывание протромбина с активированными тромбоцитами.

Активированные тромбином (100нМ) тромбоциты (5×10^4 кл. /мкл) в присутствии CaCl_2 (2.5 мМ) инкубировали в течение 20 минут с флуоресцентно меченым протромбином (Alexa647-ФII) в различных концентрациях. Затем суспензию клеток анализировали с помощью проточного цитометра Accuri C6 (BD Bioscience, Сан-Хосе, Калифорния, США). Две субпопуляции активированных тромбоцитов отличаются по концентрации внутриклеточного кальция, которую можно визуализировать с помощью красителя Fura Red. Субпопуляция с высокой концентрацией внутриклеточного кальция, что соответствует низкому сигналу флуоресценции красителя Fura Red, экспонирует фосфатидилсерин на внешнем слое мембраны [13]. Поэтому в данной работе регион ФС-положительных тромбоцитов выделяли по флуоресценции Fura Red.

Средние параметры связывания рассчитывали из трех независимых экспериментов. Кривые связывания для отдельных экспериментов аппроксимировали стандартной односайтовой моделью связывания. Пересчет интенсивности флуоресценции в количество молекул протромбина на тромбоцит было проведено согласно методике, описанной в [14].

Исследование кинетики взаимодействия протромбина с активированными тромбоцитами.

К активированным тромбином (100нМ) тромбоцитам (5×10^4 кл. /мкл) добавляли Alexa647-ФII (1400 нМ). Суспензию клеток анализировали с помощью проточного цитометра Accuri C6 (BD Bioscience, Сан-Хосе, Калифорния, США) в моменты времени 0; 1; 2; 5; 10; 15; 20 минут после добавления фактора. После этого образцы разводили в 20 раз буфером А, содержащим CaCl_2 (2,5 мМ) и анализировали с помощью проточного цитометра. Индивидуальные кривые ассоциации и диссоциации аппроксимировали экспоненциальной моделью.

Микроскопическое исследование распределения протромбина на мембране активированных тромбоцитов.

Очищенные покровные стекла (24×24 мм, Heinz Herenz) инкубировали в течение 40 минут при комнатной температуре во влажной камере с раствором фибриногена (20 мг/мл). Не связавшийся со стеклами белок удаляли промывкой в дистиллированной воде, а стекла сушили при 37°C. Тромбоциты (5×10^4 кл. /мкл), выделенные из крови доноров с использованием гель-фильтрации для очистки от белков плазмы крови, активировали тромбином (100 нМ) в присутствии CaCl_2 2,5 мМ в течение 10 минут при комнатной температуре. Затем, активированные тромбоциты инкубировали с Alexa647-ФII (60 нМ) в присутствии CaCl_2 2,5 мМ в течение 5 минут. Суспензию тромбоцитов инкубировали в течение 5 минут с покровными стеклами с иммобилизованным на них фибриногеном. Микрофотографии тромбоцитов были получены с помощью конфокального микроскопа Axio Observer Z1 (Carl Zeiss).

Результаты

Суспензию активированных тромбином (100 нМ) тромбоцитов анализировали с помощью проточного цитометра Accuri C6 (BD Bioscience, Сан-Хосе, Калифорния, США). Тромбоциты отделяли от возможно присутствующих в суспензии других клеток крови и микровезикул по параметрам прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния, характеризующим размер клеток и их гранулярность (Рисунок 1А). Как видно из рисунка 1Б после активации тромбином (100 нМ) можно выделить две субпопуляции тромбоцитов, отличающиеся по концентрации внутриклеточного кальция (визуализирована с помощью красителя FuraRed) и по способности связывать факторы свертывания, в частности протромбин. ФС-положительная субпопуляция тромбоцитов (показана зеленым на рисунке 1Б) характеризуется высокой внутриклеточной концентрацией Ca^{2+} , что соответствует низкой флуоресценции FuraRed (краситель FuraRed является инвертированным). Следует отметить, что в регионе, соответствующем ФС-

отрицательной субпопуляции тромбоцитов (показан красным на рисунке 1Б), наблюдается небольшая популяция клеток с довольно высоким связыванием протромбина (показана синим на рисунке 1Б). Так как даже такое небольшое количество клеток в регионе ФС-отрицательных тромбоцитов может существенно исказить результаты была предпринята попытка разобраться в причине такого высокого связывания протромбина.

В первую очередь была проверена гипотеза, что данные события с высоким связыванием протромбина соответствуют агрегатам ФС-положительных и ФС-отрицательных тромбоцитов. Для этого часть тромбоцитов как описано выше была загружена красителем FuraRed, а часть тромбоцитов загружена кальцеином. Затем тромбоциты с FuraRed и кальцеином были смешаны в соотношении 1:1, активированы тромбином (100 нМ) и проинкубированы с Alexa647-ФII. На рисунке 1В красным показана популяция тромбоцитов, окрашенных только красителем FuraRed, зеленым – популяция тромбоцитов, окрашенных только кальцеином. Как видно из рисунка есть небольшая популяция событий, окрашенных сразу обоими красителями (показано синим рисунок 1В), это указывает на то, что данные события соответствуют агрегатам ФС-положительных и ФС-отрицательных тромбоцитов и они должны быть исключены из анализа связывания протромбина с субпопуляцией ФС-отрицательных тромбоцитов. Как видно на рисунке 1Г исключение из рассмотрения событий, окрашенных кальцеином, снижает количество событий, с высоким связыванием протромбина, в регионе ФС-отрицательных тромбоцитов.

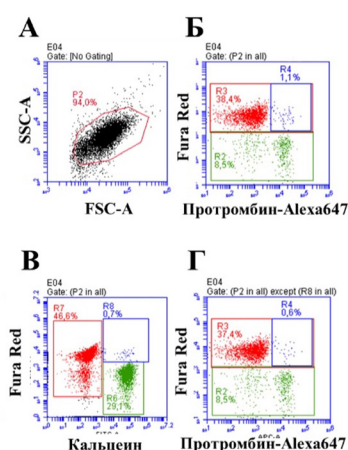


Рисунок 1. Связывание протромбина с субпопуляцией активированных тромбоцитов. На рисунке приведены типичные точечные диаграммы. А – выделение региона тромбоцитов по прямому и боковому светорассеянию. Б- связывание протромбина с популяциями активированных тромбоцитов до исключения из рассмотрения агрегатов ФС-положительных и ФС-отрицательных тромбоцитов. Зеленым показана субпопуляция ФС-положительных тромбоцитов, красным - ФС-отрицательных тромбоцитов, синим – события с высоким связыванием протромбина в

регионе ФС-отрицательных тромбоцитов. В- выделение агрегатов ФС-положительных и ФС-отрицательных тромбоцитов. Зеленым показаны тромбоциты, окрашенные кальцеином, красным – окрашенные FuraRed, синим – события окрашенные и кальцеином, и FuraRed. Г - связывание протромбина с популяциями активированных тромбоцитов после исключения из рассмотрения агрегатов ФС-положительных и ФС-отрицательных тромбоцитов. Зеленым показана субпопуляция ФС-положительных тромбоцитов, красным - ФС-отрицательных тромбоцитов, синим – события с высоким связыванием протромбина в регионе ФС-отрицательных тромбоцитов. Представлены результаты типичного эксперимента из трех, проведенных с кровью разных доноров.

Из литературы известно, что связывание витамин К-зависимых факторов свертывания с ФС-положительными тромбоцитами зависит от Ca^{2+} и невозможно в его отсутствии. Однако, при добавлении хелатирующего агента ЭДТА часть фактора остается связанным с тромбоцитами. Связывание с ФС-отрицательной субпопуляцией тромбоцитов, обычно не зависит от Ca^{2+} и сопоставимо с количеством фактора, оставшегося на мембране тромбоцитов в присутствии ЭДТА. Было сделано предположение, что Ca^{2+} -независимое связывание факторов свертывания с активированными тромбоцитами обусловлено взаимодействием флуорофора, а не самого фактора с мембраной тромбоцитов. Для проверки данной гипотезы был проведен эксперимент с активированными тромбоцитами, когда вместо Alexa647-ФII был добавлен только флуорофор Alexa647 в концентрациях, соответствующих концентрациям в пробе с Alexa647-ФII. На рисунке 2 видно, что сигнал от Alexa647-ФII, связавшегося с тромбоцитами в присутствии ЭДТА сопоставим с сигналом от чистого флуорофора. Это подтверждает нашу гипотезу, что связывание протромбина с активированными тромбоцитами в присутствии ЭДТА обусловлено флуорофором. В дальнейшем сигнал от связывания протромбина в присутствии ЭДТА вычитался из общей интенсивности флуоресценции Alexa647-ФII, связанного с тромбоцитами.

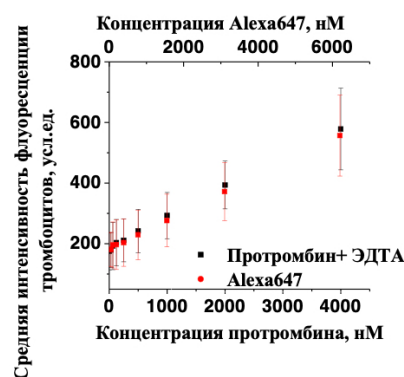


Рисунок 2. Неспецифическое взаимодействие флуорофора с активированными тромбоцитами. Черным цветом показано связывание протромбина-Alexa647 с активированными тромбоцитами в присутствии ЭДТА. Красным показано взаимодействие флуорофора Alexa647 активированными тромбоцитами.

Как видно из рисунка 3А, субпопуляции тромбоцитов сильно отличаются по своей способности связывать Alexa647-ФII. Весь протромбин связывается с ФС-положительной субпопуляцией, а связывание с ФС-отрицательной находится на фоновом уровне. Средние параметры связывания рассчитывали из трех независимых экспериментов. Кривые связывания для отдельных экспериментов аппроксимировали стандартной односайтовой моделью связывания. Полученные параметры связывания протромбина с ФС-положительными тромбоцитами: $K_d = 1,4 \pm 0,4$ мкМ (среднее $\pm$ SD, $n = 3$) и 8500 ± 2500 сайтов связывания на тромбоцит.

Исследование кинетики связывания протромбина с активированными тромбоцитами проводили при концентрации 1,4 мкМ. Как видно из рисунка 3Б после добавления Alexa647-ФII происходит резкое увеличение флуоресценции тромбоцитов, что свидетельствует о связывании факторов с мембраной. Это связывание достигает своего насыщения уже через 5 минут после добавления протромбина. Экспериментальные данные были аппроксимированы использованием нелинейного метода наименьших квадратов в предположении экспоненциальной зависимости. Константу прямой реакции k_+ из полученных данных рассчитать невозможно. Константа обратной реакции $k_- = 0,8 \pm 0,2$ с⁻¹ (среднее $\pm$ SD, $n = 4$).

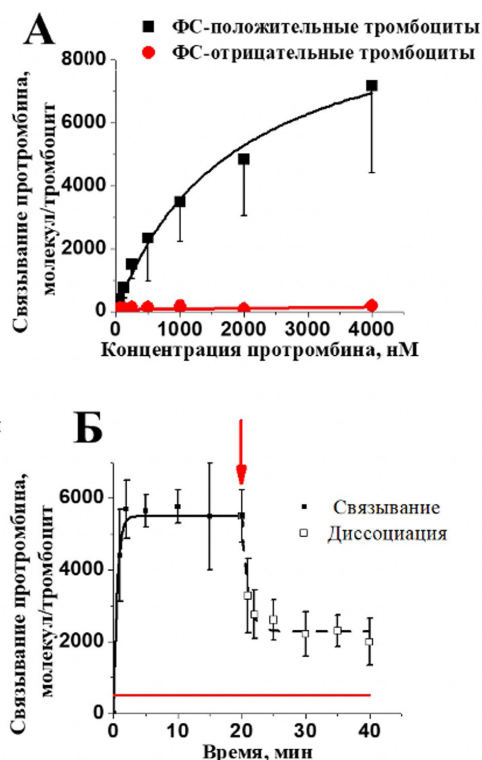


Рисунок 3. Связывание протромбина с субпопуляцией активированных тромбоцитов. А — равновесное связывание с ФС-положительными (черная кривая) и ФС-отрицательными (красная кривая) тромбоцитами. Связывание оценивали методом проточной цитометрии. На графике приведены средние $\pm$ SD ($n=3$). Б — кинетика

связывания и диссоциации протромбина-Alexa647 с фосфатидилсерин положительными тромбоцитами. Связывание протромбина-Alexa647 анализировали с помощью проточного цитометра в моменты времени: 0; 1; 2; 5; 10; 15; 20 минут после добавления белка. После достижения насыщения, образцы разводили в 20 раз буфером Тироде с CaCl_2 (2,5 мМ), для анализа диссоциации белка. На графиках приведены средние $\pm$ SD ($n=4$).

Следует отметить, что наблюдаемая после разбавления в 20 раз диссоциация протромбина с мембраны тромбоцитов представляет собой двухступенчатый процесс. Первая стадия процесса протекает достаточно быстро, буквально в первые пять минут, при этом с мембраны диссоциирует 30 – 50 % связавшегося белка. Вторая стадия медленная, диссоциирует значительно меньшее количество протромбина. При этом, как видно из рисунка 3Б, достигается плато, которое находится значительно выше, чем можно было бы предположить из экспериментов по равновесному связыванию с той же концентрацией свободного фактора (красная прямая на рисунке 3Б).

Нами было изучено распределение Alexa647-ФII на мембранах активированных тромбоцитов. Как видно на рисунке 4 ФС-отрицательные тромбоциты, не связывающие Alexa647-ФII, образуют ламеллиподии и распластываются по поверхности покровного стекла, покрытого фибриногеном. В то же время ФС-положительные тромбоциты, связывающие Alexa647-ФII, характеризуются шарообразной формой.

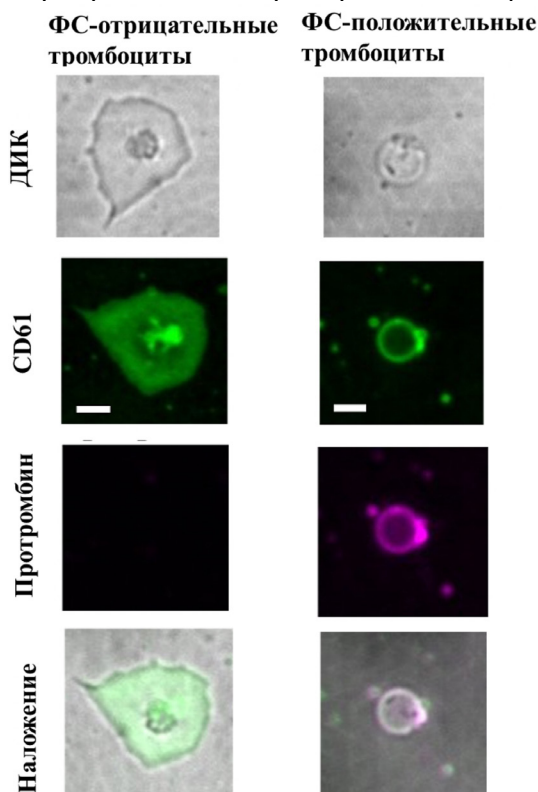


Рисунок 4. Распределение флуоресцентно меченного протромбина на мембране активированных тромбоцитов. Типичные микрофотографии активированных тромбоцитов. Зеленым показана флуоресценция CD61-ФИТЦ, пурпурным — флуоресценция Alexa647-ФII. В первом ряду показаны ФС-отрицательные тромбоциты, во втором

ФС-положительные. Приведенный масштаб соответствует 3 мкм. средние $\pm$ SD (n=3). Б - кинетика

При этом на поверхности ФС-положительных тромбоцитов выделяется небольшая область, с которой связывается в несколько раз больше протромбина, чем со всей остальной мембраной тромбоцита [9, 15].

Обсуждение результатов

Одним из главных результатов данного исследования является то, что связывание протромбина с фосфолипидными мембранами является сложным процессом, что следует из неполной диссоциации протромбина с мембраны ФС-положительных тромбоцитов. Ранее уже сообщалось о сложной кинетике ассоциации и диссоциации протромбина с искусственными фосфолипидными мембранами [16, 17]. Авторы этих работ объясняют двухступенчатую диссоциацию белка с фосфолипидной мембраны возможными конформационными изменениями в молекуле протромбина, которые приводят к более плотному связыванию с мембраной и изменению константы диссоциации [18–20]. Мы не можем исключить конформационные изменения в молекуле протромбина, как одну из причин сложной кинетики ассоциации и диссоциации. Однако, основываясь на своих предыдущих данных по связыванию факторов X, Ха и IXa [7, 8] предлагаем в качестве объяснения неполной диссоциации протромбина его возможную олигомеризацию при взаимодействии с фосфолипидной мембраной. Тем более для протромбина напрямую показана такая возможность [21].

Кроме рассмотренных выше данных в литературе есть данные о двухступенчатой диссоциации фактора VIII с фосфолипидной мембраны [22, 23]. Интересно, что связанный с мембраной фактор VIII также может представлять собой димер [24]. Также было показано, что есть две фракции мембраносвязанного аннексина V, что обусловлено его олигомеризацией на мембране [25, 26]. Однако стоит помнить, что аннексин V не является фактором свертывания крови.

Таким образом, существует две фракции связанного с мембраной протромбина, отличающиеся по своей способности к диссоциации. В реальных тромбах это явление может предотвращать вымывание белка потоком. Стоит отметить, что необходимы дальнейшие исследования механизмов взаимодействия протромбина с субпопуляции активированных тромбоцитов и, возможно, искусственными фосфолипидными везикулами для того, чтобы более полно охарактеризовать данный феномен. В ходе данной работы показана важная роль субпопуляции фосфатидилсерин-положительных

тромбоцитов в поддержании реакций свертывания крови. А значит, ее ингибирование может иметь важное терапевтическое значение.

Вклад авторов

ПАС эксперименты, редактирование. СИО эксперименты. НАП эксперименты, обработка данных, написание и редактирование. Все авторы прочитали и согласились с опубликованной версией рукописи».

Финансирование

Работа поддержана грантом РНФ № 23-75-10120.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

1. Hoffman M, Monroe DM. A cell-based model of hemostasis. *Thromb. Haemost.* 2001;85:958–65.
2. Roberts HR, Hoffman M, Monroe DM. A cell-based model of thrombin generation. *Semin. Thromb. Hemost.* 2006;32 Suppl 1:32–38.10.1055/s-2006-939552.
3. Panteleev MA, Ananyeva NM, Greco NJ, Ataullakhanov FI, Saenko EL. Two subpopulations of thrombin-activated platelets differ in their binding of the components of the intrinsic factor X-activating complex. *J. Thromb. Haemost.* 2005;3:2545–53.10.1111/j.1538-7836.2005.01616.x.
4. Kempton CL, Hoffman M, Roberts HR, Monroe DM, Kalafatis M, Swords NA, et al. Platelet heterogeneity: variation in coagulation complexes on platelet subpopulations. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 2005;25:861–66.10.1161/01.ATV.0000155987.26583.9b.
5. London FS, Marcinkiewicz M, Walsh PN. A subpopulation of platelets responds to thrombin- or SFLRN-stimulation with binding sites for factor IXa. *J. Biol. Chem.* 2004;279:19854–59.10.1074/jbc.M310624200.
6. Kempton CL, Hoffman M, Roberts HR, Monroe DM. Platelet heterogeneity: variation in coagulation complexes on platelet subpopulations. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005;25:861–66.10.1161/01.ATV.0000155987.26583.9b.
7. Podoplelova NA, Sveshnikova AN, Kurasawa JH, et al. Hysteresis-like binding of coagulation factors X/Xa to procoagulant activated platelets and phospholipids results from multistep association and membrane-dependent multimerization. *Biochim. Biophys. Acta.* 2016;1858:1216–27.10.1016/j.bbamem.2016.02.008.
8. Soloveva PA, Podoplelova NA, Panteleev MA. Binding of coagulation factor IXa to procoagulant platelets revisited: Low affinity and interactions with other factors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2024;720:150099.10.1016/J.BBRC.2024.150099.
9. Podoplelova NA, Sveshnikova AN, Kotova YN, Eckly A, Receveur N, Nechipurenko DY, et al. Coagulation factors bound to procoagulant

- platelets concentrate in cap structures to promote clotting. *Blood*. 2016;128:1745–5510.1182/blood-2016-02-696898.
10. Lu Y, Nelsestuen GL. Dynamic features of prothrombin interaction with phospholipid vesicles of different size and composition: Implications for protein-membrane contact. *Biochemistry*. 1996;35:8193–20010.1021/BI960280O.
 11. Lu Y, Nelsestuen GL. The Prothrombinase Reaction: “Mechanism Switching” between Michaelis–Menten and Non-Michaelis–Menten Behaviors†. *Biochemistry*. 1996;35:8201–0910.1021/BI960281G.
 12. Kuharsky AL, Fogelson AL. Surface-mediated control of blood coagulation: The role of binding site densities and platelet deposition. *Biophys. J.* 2001;80:1050–7410.1016/S0006-3495(01)76085-7/ASSET/7F902F68-A160-411B-A648-CE16A3B759A0/MAIN.ASSETS/GR12.GIF.
 13. Obydennyy SI, Sveshnikova AN, Ataullakhanov FI, Panteleev MA. Dynamics of calcium spiking, mitochondrial collapse and phosphatidylserine exposure in platelet subpopulations during activation. *J. Thromb. Haemost.* 2016;14:1867–8110.1111/jth.13395.
 14. Podoplelova N, Soloveva P, Dasgupta AG, Filkova A, Panteleev M. Analyzing the Interaction of Fluorescent-Labeled Proteins with Artificial Phospholipid Microvesicles using Quantitative Flow Cytometry. *J. Vis. Exp.* 202210.3791/63459.
 15. Abaeva AA, Canault M, Kotova YN, Obydennyy SI, Yakimenko AO, Podoplelova NA, et al. Procoagulant Platelets Form an alpha-Granule Protein-covered ‘Cap’ on Their Surface That Promotes Their Attachment to Aggregates. *J. Biol. Chem.* 2013;288:29621–3210.1074/jbc.M113.474163.
 16. Smith E, Vekaria R, Brown KA, Longstaff C. Kinetic regulation of the binding of prothrombin to phospholipid membranes. *Mol. Cell. Biochem.* 2013;382:193–20110.1007/S11010-013-1735-2/FIGURES/4.
 17. Houston DF, Timson DJ. Interaction of prothrombin with a phospholipid surface: Evidence for a membrane-induced conformational change. *Mol. Cell. Biochem.* 2011;348:109–1510.1007/S11010-010-0644-X/FIGURES/4.
 18. Wu JR, Lentz BR. Fourier transform infrared spectroscopic study of Ca²⁺ and membrane-induced secondary structural changes in bovine prothrombin and prothrombin fragment 1. 10.1016/S0006-3495(91)82031-8.
 19. Hof M. Picosecond tryptophan fluorescence of membrane-bound prothrombin fragment 1. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1998;1388:143–5310.1016/S0167-4838(98)00174-5.
 20. Wu JR, Lentz BR. Phospholipid-specific conformational changes in human prothrombin upon binding to procoagulant acidic lipid membranes. *Thromb. Haemost.* 1994;71:596–60410.1055/S-0038-1642489/ID/JR_7/BIB.
 21. Anderson PJ. A dimeric form of prothrombin on membrane surfaces. *Biochem. J.* 1998;336 (Pt 3):631–3810.1042/BJ3360631.
 22. Gilbert GE, Furie BC, Furie B. Binding of human factor VIII to phospholipid vesicles. *J. Biol. Chem.* 1990;265:815–22.
 23. Bardelle C, Furie B, Furie BC, Gilbert GE. Membrane binding kinetics of factor VIII indicate a complex binding process. *J. Biol. Chem.* 1993;268:8815–24.
 24. Dalm D, Galaz-Montoya JG, Miller JL, Grushin K, Villalobos A, Koyfman AY, et al. Dimeric Organization of Blood Coagulation Factor VIII bound to Lipid Nanotubes. *Sci. Rep.* 2015;5:1121210.1038/srep11212.
 25. Oling F, Bergsma-Schutter W, Brisson A. Trimers, dimers of trimers, and trimers of trimers are common building blocks of annexin a5 two-dimensional crystals. *J. Struct. Biol.* 2001;133:55–6310.1006/jsbi.2000.4337.
 26. Richter RP, Him JLK, Tessier B, Tessier C, Brisson AR. On the kinetics of adsorption and two-dimensional self-assembly of annexin A5 on supported lipid bilayers. *Biophys. J.* 2005;89:3372–8510.1529/biophysj.105.064337.

Характеризация подкожной *in vivo* модели почечно-клеточного рака Rensa у мышей линии BALB/c.

Characterization of a subcutaneous *in vivo* model of renal cell carcinoma Rensa in BALB/c mic

А. А. Мишуков^{1,*}.

A. A. Mishukov^{1,*}.

1. ФГБУН центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, ул. Средняя Калитниковская 30, Москва, Россия, 109029

Автор для переписки: artem.mishukov1999@gmail.com

1. Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology Russian Academy of Sciences Moscow, 109029, Russia

Получено: 30.03.2024

Принято к публикации: 14.04.2024

Опубликовано: 30.06.2024

EDN: NQYVUM

Аннотация

Почечно-клеточный рак (ПКР) — агрессивное онкологическое заболевание, часто диагностируемое на стадии метастазирования, что значительно снижает выживаемость пациентов. Активное участие в процессах метастазирования рака почки играет система гемостаза, что делает актуальным разработку *in vivo* животных моделей для исследования механизмов взаимодействия опухолей с системой свертывания и тромбоцитами. Среди них сингенная модель Rensa у мышей линии BALB/c отличается низкой стоимостью, сохранением нативного иммунитета и высокой скоростью развития туморогенеза. В настоящей работе охарактеризована подкожная сингенная модель ПКР Rensa у мышей линии BALB/c. Проведенные эксперименты выявили значительные ограничения: низкая воспроизводимость роста опухолей, большая вариабельность между животными, отсутствие метастазов в органы-мишени, высокий уровень дистресса у мышей. Предлагается использовать ортотопическую модель ПКР Rensa, Ортотопическая инокуляция клеток Rensa является перспективной методикой, позволяющую достичь метастазирования, являющееся необходимым условием для изучения механизмов взаимодействия опухоли с системой гемостаза, хотя и требует дополнительных подходов для мониторинга опухолевого роста. Введение новых сингенных моделей ПКР, учитывающих молекулярно-генетическую гетерогенность данного вида онкологии, станет важным шагом для прогресса в области онкологии.

Ключевые слова: Почечно-клеточный рак, Ортотопическая модель Rensa, Гемостаз

Annotation

Renal cell carcinoma (RCC) is an aggressive oncological disease that is often diagnosed at the stage of metastasis, which significantly reduces patient survival. The hemostasis system plays an active role in the processes of kidney cancer metastasis, which makes it relevant to develop *in vivo* animal models for studying the mechanisms of interaction of tumors with the coagulation system and platelets. Among them, the syngeneic Rensa model in BALB/c mice is characterized by low cost, preservation of native immunity, and a high rate of tumorigenesis. In this work, a subcutaneous syngeneic model of Rensa RCC in BALB/c mice is characterized. The experiments revealed significant limitations: low reproducibility of tumor growth, high variability between animals, absence of metastases in target organs, high level of distress in mice. It is proposed to use the orthotopic Rensa RCC model. Orthotopic inoculation of Rensa cells is a promising technique that allows achieving metastasis, which is a prerequisite for studying the mechanisms of tumor interaction with the hemostasis system, although it requires additional approaches for monitoring tumor growth. The introduction of new syngeneic RCC models that take into account the molecular genetic heterogeneity of this type of oncology will be an important step for progress in the field of oncology.

Key words: Renal cell carcinoma, Orthotopic Rensa model, Hemostasis

Введение

Рак почки (почечно-клеточный рак, ПКР) является одним из наиболее агрессивных форм злокачественных новообразований. Во всем мире ежегодно регистрируется более 400000 новых случаев рака почки [1]. К тому же ПКР часто диагностируется уже на стадии возникновения метастатических очагов: у 20-30% первичных пациентов диагноз ставится на стадии метастазирования опухоли [2]. При метастатическом заболевании 5-летняя

выживаемость составляет всего 12% [1].

Наиболее распространенным типом метастазирования является метастазирование через кровеносную систему. Существует общепринятая модель каскада метастазирования, которая включает несколько этапов: трансформация опухолевых клеток (эпителиально-мезенхимальный переход), интравазация опухолевых клеток в кровоток, циркуляция в кровотоке, экстравазация в дистальном сайте, формирование пре-метастатической ниши и, наконец, формирование дистальных метастаз [3]. Одним из ключевых игроков в данном механизме метастазирования является система гемостаза. На сегодняшний день убедительно показано, что тромбоциты крови принимают участие как в росте и развитии опухолей, так и в процессе метастазирования [4].

In vivo моделирование туморогенеза является одной из основ современных исследований в области онкологии. С помощью in vivo моделей исследуются фундаментальные аспекты развития опухолей, а также решаются прикладные задачи по тестированию новых лекарственных препаратов. Наиболее распространенными организмами для in vivo моделирования рака являются лабораторные мыши [5]. Основное разнообразие in vivo моделей рака почки у лабораторных мышей составляют GEM-модели [6], однако такие модели отличаются большой себестоимостью, низкой частотой метастазирования и высоким риском побочных эффектов у животных. Ксенографтные (PDX и CDX) in vivo модели позволяют использовать клеточные линии почечно-клеточного рака человека или же образцы опухоли конкретных пациентов, но такие модели также дорогостоящи [6]. Для исследований взаимодействий почечно-клеточного рака и системы гемостаза наиболее адекватными представляются сингенные in vivo модели. Ключевыми достоинствами сингенных моделей являются: наличие нативного иммунитета у лабораторных животных (в отличие от PDX и CDX-моделей рака, где используются животные с подавленным иммунитетом), сравнительно низкая стоимость проведения эксперимента, простота инокуляции опухолевого материала, быстрота индукции туморогенеза и быстрый ход туморогенеза [5]. Из ключевых недостатков сингенных моделей можно выделить отсутствие генетической гетерогенности в растущей опухоли, а также сложности с трансляцией результатов на организм человека. Однако, в контексте изучения механизмов взаимодействия системы гемостаза с солидными опухолями недостатки сингенных моделей рака не являются критичными. К сожалению, существует лишь одна клеточная линия почечно-клеточного рака почки мыши – Rensa [6], что в совокупности с высокой

молекулярно-генетической гетерогенностью рака почки делает актуальным создание новых культивируемых клеточных линий и сингенных in vivo моделей рака почки мыши.

Сингенные in vivo модели делятся на эктопические и ортотопические. Эктопические модели подразумевают инокуляцию суспензии опухолевых клеток подкожно. Такая модель отличается хорошей воспроизводимостью, простотой инокуляции опухолевого материала и наблюдения развития опухоли [6]. Однако подкожная модель Rensa, как и другие подкожные сингенные модели рака не отличается высокой частотой спонтанного метастазирования [6, 7].

Ортотопическая модель рака почки Rensa осуществляется путем инокуляции суспензии клеток в почку. Существует два подхода к ортотопической инокуляции: субкапсулярное введение [8, 9], или же прямое введение клеток в почку [10]. При обоих подходах ортотопической инокуляции первичная опухолевая масса постепенно растет в почке, после чего образует спонтанные метастазы. Легочные метастазы можно обнаружить на 15–20 день после субкапсулярной имплантации [11]. В модели «прямой инокуляции» микро-метастазы в легких формируются к 7 дню после имплантации, а на 23-й день в легких наблюдаются макromетастазы [10]. Значительным недостатком ортотопической модели рака почки является невозможность отслеживания динамики роста опухоли простыми методами (измерением линейных размеров штангенциркулем). Поэтому при создании ортотопической модели почки основными критериями, на которые можно полагаться для определения длительности эксперимента, являются состояние животных (индекс боль/дистресс). Оценку метастазирования опухоли в легкие можно проводить с помощью методики, описанной в [12]. С другой стороны, использование генетически-модифицированных клеток Rensa, обладающих способностью к биолюминесценции, позволяет осуществлять неинвазивный мониторинг роста опухоли с помощью соответствующих систем визуализации [13].

В настоящей работе мы использовали подкожную сингенную модель почечно-клеточного рака Rensa у мышей линии BALB/c для характеристики и оценки применимости модели для исследования взаимодействий системы гемостаза и опухоли.

Целью данной работы является наблюдение кальциевой сигнализации в одиночных нейтрофилах человека в процессе миграции в окрестности растущего тромба.

Клеточная культура

Культура почечно-клеточного рака Rensa была приобретена в РОНЦ Н.Н. им. Блохина (Москва, Россия) и поддерживалась *in vitro* в среде RPMI-1640 в клеточном инкубаторе при 37°C и атмосфере 95/5% воздух/углекислый газ. Для инокуляции клеток EMT-6 мышам производилась рутинная трипсинизация *in vitro* культуры и ресуспендирование клеток в растворе солей Хэнкса (HBSS) в концентрации 107 клеток/мл, дополнительно жизнеспособность клеточной культуры определялась с помощью трипанового голубого, для инокуляции использовались культура Rensa с жизнеспособностью более 90%.

In vivo модель рака почки Rensa

Для *in vivo* модели рака почки Rensa использовались 8-9 недельные самки мышей линии BALB/c (Питомник лабораторных животных "Пушино", г. Пушино, Россия). Животные содержались в помещении временного содержания животных ЦТП ФХФ РАН при 12-часовом цикле день/ночь, в условиях постоянной влажности и температуры 22±2°C в клетках типа T2 по 5-6 особей на клетку. Питание и доступ к питьевой воде *ad libitum*. За неделю до инокуляции осуществлялся хэндлинг мышей. Для подкожной инокуляции клеток Rensa мышь вводилась в наркоз с помощью изофлурана (ИзоНик, Vetpharma Animal Health, Испания) по «nose-cone» методике. При достижении глубокого наркоза, определяемого как отсутствие болевого рефлекса при сильном нажатии на заднюю лапку, брюхо животного смачивалось 70% раствором медицинского спирта для лучшей визуализации кожи. Затем под кожу в правую часть живота вводился шприц с иглой 26 ½ G, и 100 мкл суспензии клеток Rensa (107 клеток/мл) вводилось под кожу. После инокуляции животное выводилось из наркоза и помещалось в чистую клетку. Далее 3 раза в неделю осуществлялся мониторинг состояния животных и оценка развития опухоли. С помощью штангенциркуля измерялась длина (L) и ширина опухоли (W), объем опухоли рассчитывался по формуле $V = L \cdot W^2 / 2$. На 36-38 день после инокуляции животные подвергались гуманной эвтаназии путем цервикальной дислокации, и производилась оценка наличия поверхностных метастаз в легкие и в печень. Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями и были одобрены независимым этическим комитетом по биоэтике Института теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН (Протоколы № 1 от 17.01.2023 г. и № 1 от 25.01.2024 г.).

Результаты

Мы провели два эксперимента по моделированию почечно-клеточного рака Rensa у самок мышей линии BALB/c (Рисунок 1). По результатам двух экспериментов модель Rensa показала низкую воспроизводимость во времени возникновения пальпируемых подкожных опухолей: 5-6 день для эксперимента №1 и 22-26 день для эксперимента №2, а также большую вариабельность между животными внутри эксперимента (Рис. 1А, 1Б). В эксперименте №1 у 4 мышей опухоли возникли на 5-6 день и развивались относительно однородно, у 1 мыши опухоль возникла только на 25 день. В эксперименте №2 опухоли возникли только у 4 из 6 мышей в группе. В дополнение к этому, средний размер опухолей на 33 день после инокуляции отличался в 2,5 раза для эксперимента №1 (558±289 мм³) и эксперимента №2 (225±164 мм³) (Рис. 1В, 1Г). Однако, в обоих экспериментах наблюдалось снижение массы животных с момента достижения опухолью размеров 50-100 мм³, и потеря веса происходила до окончания проведения эксперимента. В эксперименте №1 животные потеряли 17 ± 8 %, в эксперименте №2 – 19 ± 12 % от изначальной массы. Значительно отличались кинетики изменения скорости роста опухолей между экспериментами. В эксперименте №1 скорость роста опухолей экспоненциально увеличивалась, достигнув максимума в 125 мм³/день на 35 день эксперимента, в эксперименте №2 также наблюдался экспоненциальный рост скорости, но максимум составил 22 мм³/день на 35 день эксперимента (Рис. 1Д, 1Е). Также по ходу эксперимента значительно ухудшалось состояние животных, что выражалось в увеличении индекса боль/дистресс (Рис. 1Д, 1Е). Опухоли изъязвлялись, кровоточили, у животных наблюдались выраженные мимические признаки боли/дистресса, одно животное погибло в ходе проведения эксперимента №2. При некропсии дистальные метастазы в печень или легкие не были обнаружены.

Обсуждение результатов

ПоВ нашей работе мы использовали клеточную культуру Rensa для создания модели почечно-клеточного рака у мышей линии BALB/c. Сравнивая с аналогичными подкожными моделями Rensa в опубликованной литературе, наша модель Rensa показывает более медленную кинетику роста опухолей. Так, в публикации Tao et. al. подкожные опухоли Rensa достигли размеров 600 мм³ к 18 дню после инокуляции [14], в статье Jeon et. al. опухоли выросли до 600 мм³ за 27 дней [15], в работе Reese et. al. – до 900 мм³ за 20 дней [16], в наших же экспериментах опухоли достигли среднего размера ~670 мм³ (эксперимент #1, Рис. 1В) и

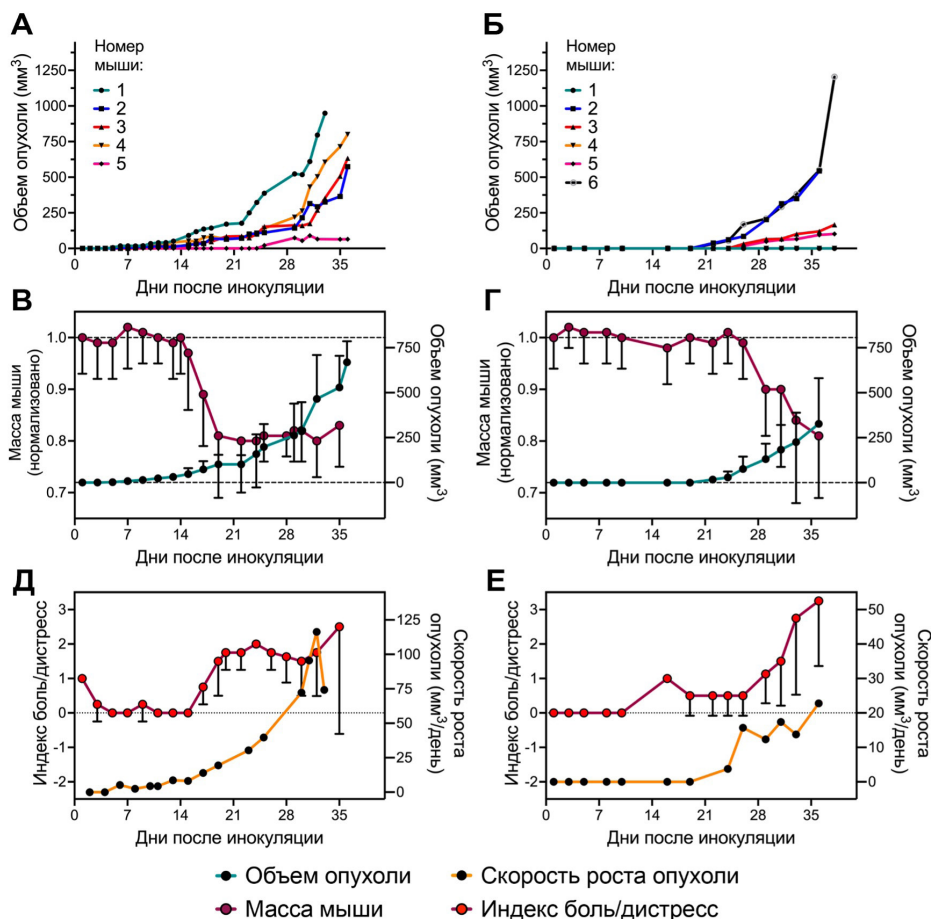


Рисунок 1. Подкожная *in vivo* модель рака почки Rensa у мышей BALB/c. Кинетики роста опухолей у отдельных мышей в эксперименте #1 (А) и #2 (Б); Кинетики усредненного роста опухолей и изменения средней массы мышей в эксперименте #1 (В) и #2 (Г); Кинетики изменения среднего индекса боль/дистресс и средней скорости роста опухолей в эксперименте #1 (Д) и #2 (Е). Средние значения $\pm$ SD, для усреднения взяты мыши 1-4 в эксперименте #1 и мыши 2,3,4,6 в эксперименте #2.

~330 мм³ (эксперимент #2, Рис. 1Г) через 36-37 дней после инокуляции клеток. Возможно, более медленный рост опухолей в наших экспериментах связан с происхождением клеточной линии. В приведенных выше публикациях клеточная линия Rensa была получена от банка клеточных культур ATCC (American Type Culture Collection, США), в то время как мы приобрели линию Rensa в РОНЦ Н.Н. им. Блохина (Россия). Проблема отличий одних и тех же клеточных линий между источниками давно известна, и необходимо проводить дополнительное фенотипирование для точной идентификации типа клеток [17].

Высокая вариабельность роста опухолей внутри одной группы животных зависит от множества факторов. Ключевым является уровень навыков экспериментатора, который осуществляет инокуляцию опухолевого материала. От навыков экспериментатора зависит точность инокуляции опухолевого материала: сколько клеток инокулируется каждому животному и точность сайта инокуляции. Вторым важным фактором является жизнеспособность инокулируемых клеток, которая зависит от техники культивирования *in vitro*, а также от выживаемости клеток после инокуляции. Причем, понижение жизнеспособности культуры клеток

in vitro снижает выживаемость клеток после инокуляции и дополнительно увеличивает вариабельность количества выживших клеток. Показано, что в подкожных моделях количество выживших опухолевых клеток после инокуляции может значительно отличаться, что вносит существенный вклад в вариабельность роста опухолей внутри одной группы животных [18]. Для повышения выживаемости инокулируемых опухолевых клеток, а также снижения вариабельности в количестве жизнеспособных клеток, можно использовать различные имитаторы внеклеточного матрикса опухолей (например, Matrigel®) [19].

Стоит отметить высокую тяжесть протекания туморогенеза у самих мышей. Снижение массы тела на 20 % является признаком высокого уровня дистресса у мышей [20]. С развитием опухоли наблюдались также выраженные мимические признаки боли [21]. Примечательно, что резкое снижение массы тела животных в обоих экспериментах происходило, когда опухоли достигали объема 50-100 мм³, что дает основания полагать, что данная клеточная линия Rensa «агрессивна» по отношению к животным. Внезапная гибель одного животного в эксперименте #2 вполне согласуется с

опубликованными данными о том, что в модели Rensa возможна спонтанная гибель животных через 3-4 недели после инокуляции опухолевых клеток [22].

Таким образом низкая воспроизводимость роста опухолей между экспериментами, высокая вариабельность роста опухолей между животными, тяжесть протекания туморогенеза и отсутствие метастаз в легких делают подкожную модель Rensa не пригодной для исследования механизмов взаимодействия системы гемостаза с опухолями.

Заключение

Несмотря на большое разнообразие *in vivo* моделей рака почки на сегодняшний день наиболее адекватной с точки зрения изучения механизмов метастазирования являются классические старые сингенные модели. Поскольку лабораторные мыши являются золотым стандартом в *in vivo* моделировании рака, но при этом для рака почки по сути существует только одна сингенная модель (Rensa), актуальной задачей является разработка новых сингенных моделей рака почки, в которых будут использоваться другие линии почечно-клеточного рака, с отличными от Rensa молекулярно-генетическими и морфологическими признаками.

Вклад авторов

А.А.М. – проведение экспериментов, написание статьи.

Благодарности

Автор выражает благодарность Колесниковой И.С. за помощь в культивировании клеточной линии Rensa.

Финансирование

Это исследование финансировалось Российским Научным Фондом, номер гранта 23-45-10039.

Конфликт интересов

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A (2018) Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA A Cancer J Clinicians* 68:394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
2. Jonasch E, Gao J, Rathmell WK (2014) Renal cell carcinoma. *BMJ* 349:g4797–g4797. <https://doi.org/10.1136/bmj.g4797>
3. Lambert AW, Pattabiraman DR, Weinberg RA (2017) Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell* 168:670–691. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.037>
4. Sveshnikova AN, Tesakov IP, Kuznetsova SA, Shamova EM (2024) Role of Platelet Activation in the Development and Metastasis of Solid Tumors. *J Evol Biochem Phys* 60:211–227. <https://doi.org/10.1134/S0022093024010150>
5. Bokova UA, Tretyakova MS, Schegoleva AA, Denisov EV (2023) In vivo models in cancer research. *Usp mol onkol* 10:8–16. <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2023-10-2-8-16>
6. Sobczuk P, Brodziak A, Khan MI, Chhabra S, Fiedorowicz M, Wełniak-Kamińska M, Synoradzki K, Bartnik E, Cudnoch-Jędrzejewska A, Czarnecka AM (2020) Choosing The Right Animal Model for Renal Cancer Research. *Translational Oncology* 13:100745. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2020.100745>
7. Khanna C (2004) Modeling metastasis in vivo. *Carcinogenesis* 26:513–523. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgh261>
8. Matin SF, Sharma P, Gill IS, Tannenbaum C, Hobart MG, Novick AC, Finke JH (2010) Immunological Response to Renal Cryoablation in an In Vivo Orthotopic Renal Cell Carcinoma Murine Model. *Journal of Urology* 183:333–338. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2009.08.110>
9. Braga MDS, Chaves KB, Chammas R, Schor N, Bellini MH (2012) Endostatin neoadjuvant gene therapy extends survival in an orthotopic metastatic mouse model of renal cell carcinoma. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 66:237–241. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2011.11.002>
10. Murphy KA, James BR, Wilber A, Griffith TS (2017) A Syngeneic Mouse Model of Metastatic Renal Cell Carcinoma for Quantitative and Longitudinal Assessment of Preclinical Therapies. *JoVE* 55080. <https://doi.org/10.3791/55080>
11. Dybal EJ, Haas GP, Maughan RL, Sud S, Pontes JE, Hillman GG (1992) Synergy of Radiation Therapy and Immunotherapy in Murine Renal Cell Carcinoma. *Journal of Urology* 148:1331–1337. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(17\)36903-3](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(17)36903-3)
12. Mendoza A, Gharpure R, Dennis J, Webster JD, Smedley J, Khanna C (2013) A novel noninvasive method for evaluating experimental lung metastasis in mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 52:584–589
13. Ding J, Wang C, Chang X (2018) Establishment of a bioluminescent Renca cell line for renal carcinoma research. *Int Urol Nephrol* 50:55–61. <https://doi.org/10.1007/s11255-017-1707-7>
14. Tao R, Niu W, Dou P, Ni S, Yu Y, Cai L, Wang X, Li S, Zhang C, Luo Z (2020) Nucleobindin-2 enhances the epithelial-mesenchymal transition in renal cell carcinoma. *Oncol Lett*. <https://doi.org/10.3892/ol.2020.11526>
15. Jeon Y, Kang H, Yang Y, Park D, Choi B, Kim J, Kim J, Nam K (2022) A Novel Selective Axl/Mer/CSF1R Kinase Inhibitor as a Cancer Immunotherapeutic Agent Targeting Both Immune and Tumor Cells in the Tumor Microenvironment. *Cancers* 14:4821. <https://doi.org/10.3390/cancers14194821>
16. Reese B, Silwal A, Daugherty E, Daugherty M, Arabi M, Daly P, Paterson Y, Woolford L, Christie A, Elias R, Brugarolas J, Wang T, Karbowiczek M, Markiewski MM (2020) Complement as

Prognostic Biomarker and Potential Therapeutic Target in Renal Cell Carcinoma. *The Journal of Immunology* 205:3218–3229. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2000511>

17. Souren NY, Fusenig NE, Heck S, Dirks WG, Capes-Davis A, Bianchini F, Plass C (2022) Cell line authentication: a necessity for reproducible biomedical research. *The EMBO Journal* 41:e111307. <https://doi.org/10.15252/emboj.2022111307>
18. Hoffmann B, Lange T, Labitzky V, Riecken K, Wree A, Schumacher U, Wedemann G (2020) The initial engraftment of tumor cells is critical for the future growth pattern: a mathematical study based on simulations and animal experiments. *BMC Cancer* 20:524. <https://doi.org/10.1186/s12885-020-07015-9>
19. Fridman R, Benton G, Aranoutova I, Kleinman HK, Bonfil RD (2012) Increased initiation and growth of tumor cell lines, cancer stem cells and biopsy material in mice using basement membrane matrix protein (Cultrex or Matrigel) co-injection. *Nat Protoc* 7:1138–1144. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.053>
20. Talbot SR, Biernot S, Bleich A, Van Dijk RM, Ernst L, Häger C, Helgers SOA, Koegel B, Koska I, Kuhla A, Miljanovic N, Müller-Graff F-T, Schwabe K, Tolba R, Vollmar B, Weegh N, Wölk T, Wolf F, Wree A, Ziegłowski L, Potschka H, Zechner D (2020) Defining body-weight reduction as a humane endpoint: a critical appraisal. *Lab Anim* 54:99–110. <https://doi.org/10.1177/0023677219883319>
21. Langford DJ, Bailey AL, Chanda ML, Clarke SE, Drummond TE, Echols S, Glick S, Ingrao J, Klassen-Ross T, LaCroix-Fralish ML, Matsumiya L, Sorge RE, Sotocinal SG, Tabaka JM, Wong D, Van Den Maagdenberg AMJM, Ferrari MD, Craig KD, Mogil JS (2010) Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nat Methods* 7:447–449. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1455>
22. Salup RR, Herberman RB, Wiltout RH (1985) Role of Natural Killer Activity in Development of Spontaneous Metastases in Murine Renal Cancer. *Journal of Urology* 134:1236–1241. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(17\)47702-0](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(17)47702-0)

Моделирование светорассеяния на одиночном тромбоците и их агрегатах.

Modeling of light scattering on a single platelet and their aggregates.

Г. С. Свидельская^{1,2,3#}, Г.А. Быков¹

Galina S. Svidelskaya^{1,2,3#}, Georgii A. Bykov¹

1. Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН Россия, 109029, г. Москва, ул. Средняя Калитниковская, д. 30
2. ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России Россия, 117997, г. Москва, ГСП-7, ул. Саморы Машела, д. 1
3. Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, физический факультет, кафедра медицинской физики, Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 2

Автор для переписки: galina.svidelskaya@gmail.com

1. Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology Russian Academy of Sciences Moscow, 109029, Russia
2. National Medical Research Centre of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitry Rogachev Moscow, 117198, Russia
3. Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University, 1/2 Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russia.

Correspondence: galina.svidelskaya@gmail.com; Tel.: 8-906-702-91-84

Получено: 01.03.2024

Принято к публикации: 29.03.2024

Опубликовано: 30.06.2024

EDN: BEIDSE

Аннотация

Агрегация тромбоцитов – важнейший этап формирования тромбоцитарной пробки для закупоривания места повреждения сосуда. Одним из методов оценки агрегации тромбоцитов является метод малоуглового светорассеяния. При математическом моделировании рассеяния электромагнитного излучения на тромбоците преимущественно рассматривается задача рассеяния света на тромбоците в состоянии покоя. Целью данной работы является разработка математической модели и анализ рассеяния лазерного излучения на тромбоците в состоянии покоя, а также при активации и агрегации тромбоцитов. Параметры модели подбирались автоматически по ранее опубликованным экспериментальным данным. В результате исследования получены индикатрисы рассеяния как на тромбоцитах в состоянии покоя, так и на активированных тромбоцитах, а также на их агрегатах. Обнаружено, что в условиях рассеяния света в буфере, содержащем тромбоциты (вне зависимости от статуса их активации) или их агрегаты, рассеяние преимущественно происходит вперед, что согласуется с литературными данными.

Ключевые слова: Моделирование; Светорассеяние; Лазерное излучение; Тромбоцит; Агрегация тромбоцитов

Annotation

Platelet aggregation is the most important stage in the formation of a platelet clot at the site of damage in the vessel. One of the methods for assessing platelet aggregation is the small-angle light scattering method. In mathematical modeling of electromagnetic radiation scattering on a platelet, the problem to consider is the light scattering on a platelet at rest. The purpose of this work is to develop a mathematical model and analyze the scattering of laser radiation on a platelet at rest, as well as during platelet activation and aggregation. The model parameters were selected automatically based on previously published experimental data. As a result of the study, scattering indicatrices were obtained on both platelets at rest and activated platelets, as well as on their aggregates. It was found that under conditions of light scattering in a buffer containing platelets (regardless of their activation status) or their aggregates, scattering mainly occurs forward, which is consistent with the literature data.

Key words: Modeling; Light scattering; Laser radiation; Platelet; Platelet aggregation

Введение

Тромбоциты – самые мелкие безъядерные форменные элементы крови [4], имеющие форму дисков диаметром 2-4 мкм и толщиной 0.5 мкм [1]. Повреждение сосуда и нарушение его эндотелиальной выстилки сопровождается

появлением в этом участке сосудистого русла биологически активных соединений, способных активировать тромбоциты. Эти соединения называют агонистами или индукторами, и их действие направлено на стимуляцию протромбогенных реакций тромбоцитов [3]. Активация тромбоцитов в результате действия растворимых агонистов или адгезии к активному субстрату сопровождается быстрым изменением их формы – превращением дисков в частицы сферической формы, образованием выростов и псевдоподий, распластыванием при прикреплении к поверхности [6].

В 1998 г. для исследования активации и агрегации тромбоцитов был предложен новый метод оценки динамического светорассеяния [2], реализованный на приборе ЛАСКА-ТМ. Этот метод, основанный на явлении лазерной малоугловой дифракции света, предоставляет информацию об агрегации и изменении формы тромбоцитов.

Моделирование светорассеяния для валидации данных анализатора ЛАСКА-ТМ впервые было реализовано разработчиками оборудования. Миндукшев И.В. и соавторы продемонстрировали оригинальные кривые зависимости интенсивности света от угла рассеяния (индикатрисы) при активации тромбоцитов слабым агонистом [7]. При агрегации интенсивность светорассеяния увеличивается в диапазоне 1° – 5° и уменьшается в диапазоне 8° – 12° . Эти результаты находились в согласии с результатами, полученными при моделировании процесса. Помимо этого, этим же коллективом представлена зависимость (полученная экспериментально) интенсивности светорассеяния и светопропускания от концентрации тромбоцитов человека. В диапазоне концентрации тромбоцитов от 0 до 10 тысяч тромбоцитов/мкл интенсивность светорассеяния на 1° увеличивается, в то время как светопропускание убывает. В статье [8] приведены данные по количественному распределению АДФ-индуцированных агрегатов тромбоцитов по размерам в процессе агрегации. Авторы статьи показали, что АДФ в низких (100 нМ) концентрациях индуцировал образование небольших агрегатов, содержащих в основном 2–5 клеток. Увеличение концентрации АДФ вызывало постепенное увеличение количества крупных агрегатов.

Однако данные по индикатрисам рассеяния тромбоцитами лазерного излучения на разных этапах их активации пока скудны. Остается неясным, есть ли отличия в индикатрисах рассеяния света неактивированным и активированным тромбоцитом, а также влияет ли ориентация тромбоцита по отношению к

падающему лучу на диаграммы направленности.

Целью текущей работы стало моделирование рассеяния лазерного излучения на тромбоцитах и их агрегатах для валидации данных, получаемых с помощью метода малоуглового светорассеяния. Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи: расчёт индикатрис рассеяния на неактивированном и активированном тромбоците, а также их агрегатах; моделирование индикатрис рассеяния в образцах содержащих различную концентрацию тромбоцитов; моделирование рассеяния поляризованного и неполяризованного света на тромбоците.

Материалы и Методы

Анализ данных полученных с помощью лазерного анализатора ЛАСКА-ТМ проводился с помощью программного обеспечения ЛАСКА-32. Для расчетов использовалось оригинальное программное обеспечение LaSca_32 (ООО «БиоМедСистемы», Санкт-Петербург, Россия). Численное решение волнового уравнение для электрического поля проводилось с помощью среды Comsol Multiphysics v6.2. Для расчёта светорассеяния согласно теории Ми использовали программу MiePlot v4.6.21 [Philip Laven MiePlot. Доступно онлайн: <http://www.philiplaven.com/mieplot.htm>]

Результаты

Первой задачей данной работы являлось моделирование светорассеяния на одиночном тромбоците. Для решения этой задачи были использованы следующие допущения: 1) изначально тромбоцит имеет форму эллипсоида с полуосями 1 мкм, 3 мкм, 3 мкм. Тромбоцит является однородной средой относительно показателя преломления.

- При активации тромбоцит принимает форму шара. Из предположения, что объём клетки при этом остаётся постоянным, следует, что радиус этого шара составит 2.08 мкм.

- После ошаривания тромбоцита из него вырастают филоподии, таким образом, что тромбоцит принимает форму шара с восьмью выростами. Допускается, что форма выростов эллипсоидальная. В предположении, что при активации объём тромбоцита такой же как и в состоянии покоя, радиус тромбоцита в активированном состоянии равен 1.67 мкм. Длина большой полуоси эллипсоида составляет 1.8 радиусов шара, две малые полуоси эллипсоида составляют треть от радиуса шара.

- Затем тромбоциты слипаются и образуют агрегат из 6 клеточных фрагментов.

На рисунке 1 представлены трехмерные

модели тромбоцитов, использованные для получения диаграмм направленности. Чтобы изложенную выше задачу можно было решить с помощью ограниченных вычислительных мощностей, от соответствующих трёхмерных фигур отрезалась четверть, на неё накладывались условия симметрии, и уже в таком виде решалась задача рассеяния.

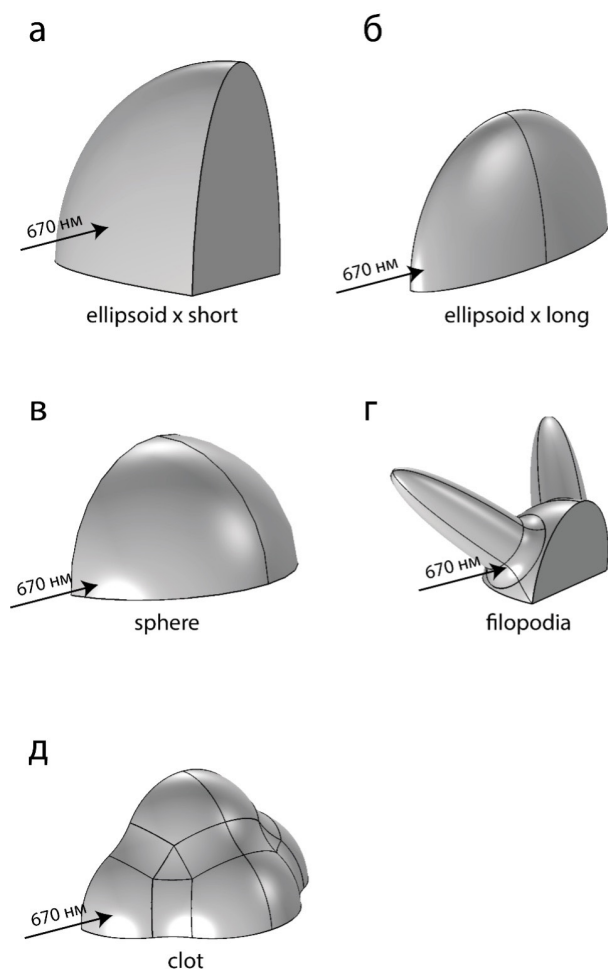


Рисунок 1. Четверти трёхмерных моделей тромбоцита/тромба. (А) ellipsoid x short – тромбоцит находится в состоянии покоя. Луч света от источника параллелен короткой оси тромбоцита. (Б) ellipsoid x long – тромбоцит находится в состоянии покоя. Луч света от источника параллелен длинной оси тромбоцита. Случаи (а) и (б) отличаются только ориентацией объекта в пространстве, клетка повернута на 90 градусов. (В) sphere – тромбоцит начал активацию и стал шаром. (Г) filopodia – тромбоцит, выпустивший филоподии. (Д) clot – агрегат из 6 клеток.

При моделировании использованы следующие параметры:

- Длина волны излучения равна 670 нм.
- Показатель преломления тромбоцита равен 1.38 [9]
- Показатель преломления раствора (буфера), в котором он находится такой же, как и у воды и составляет 1.33.

С помощью среды Comsol Multiphysics v6.2

решается численно волновое уравнение для электрического поля:

$$\nabla * (\nabla * E) - k_0^2 n^2 E = 0 \quad (1)$$

где E – электрическое поле, В/м, n – показатель преломления, $k_0 = \omega/c_0$ – волновое число раствора, ω – угловая частота падающего излучения, c_0 – скорость света в вакууме.

Решением данного уравнения являются диаграммы направленности излучения в дальнем поле (электрическое поле) представленные на рисунке 2. На рис. 2 показано, что вне зависимости от ориентации тромбоцита по отношению к направлению лазерного излучения, а также вне зависимости от статуса активации/агрегации тромбоцитов, максимальная интенсивность света на малых углах приходится на 0° . В интервале от 0° до 7° интенсивность светорассеяния нелинейно уменьшается. Для одиночных тромбоцитов максимум второго порядка приходится на 10.5° и 11.5° соответственно для излучения, направленного параллельно короткой и длинной оси тромбоцита.

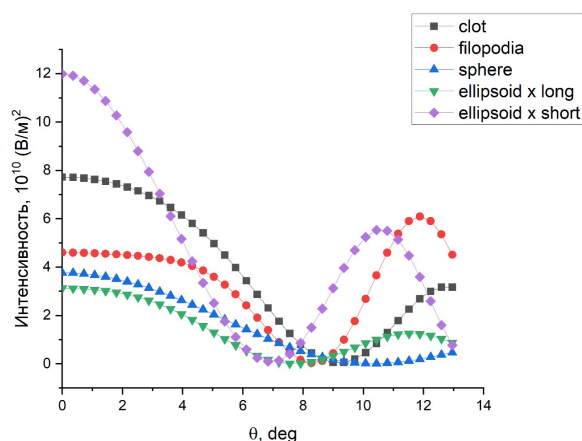


Рисунок 2. Диаграммы направленности дальнего электрического поля при малых углах для агрегата (черная линия, clot), ошаренного тромбоцита (синяя линия, sphere), тромбоцита выпустившего филоподии (красная линия, filopodia), неактивированного тромбоцита в форме эллипсоида, когда луч света направлен параллельно длинной (зеленая линия, ellipsoid x long) или короткой оси (фиолетовая линия, ellipsoid x short)

Для неактивированного тромбоцита максимум проходящего света через частицу приходится на 0° вне зависимости от ориентации клетки по отношению к направлению падающего света (параллельно длинной оси тромбоцита или короткой). На рисунке 3 представлены диаграммы рассеяния в полярных координатах для данного случая. Превалирует рассеяние вперед. Под углами от 90° до 180° свет не рассеивается.

боковое рассеяние, сигнал светорассеяния в диапазоне от 90 до 180° пренебрежимо мал по сравнению с сигналом на 0°.

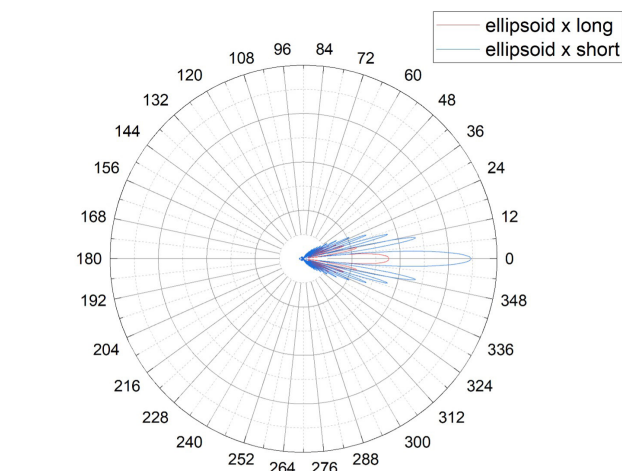


Рисунок 3. Диаграммы направленности для двух ориентаций покоящегося тромбоцита: свет направлен параллельно короткой (синяя линия, ellipsoid x short) или длинной (красная линия, ellipsoid x long) оси эллипсоида.

На рис. 4 представлены диаграммы рассеяния для тромбоцита выпустившего филоподии и ошаренного активированного тромбоцита. В случае активированного тромбоцита в форме сферы превалирует рассеяние перед, рассеяние назад отсутствует или пренебрежимо мало по сравнению с боковым. Максимум светорассеяния приходится на 0°. В случае тромбоцита выпустившего филоподии максимальный уровень светорассеяния приходится на 12°, а на 0° приходится локальный максимум.

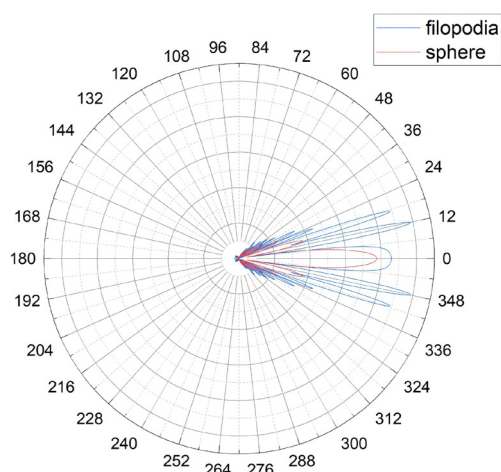


Рисунок 4. Диаграммы направленности для двух активированных состояний тромбоцита: выпустившего филоподии (обозначено синим цветом, filopodia) или ошаренного (обозначенного красным цветом, sphere)

На рисунке 5 представлена диаграмма направленности для агрегата из шести тромбоцитов. Максимальный сигнал светорассеяния приходится на 0°, в интервале от 0 до 6° уровень светорассеяния убывает, а в диапазоне от 6 до 12° функция является возрастающей. Как и в случае с диаграммой направленности для активированного тромбоцита для агрегата превалирует рассеяние вперед и

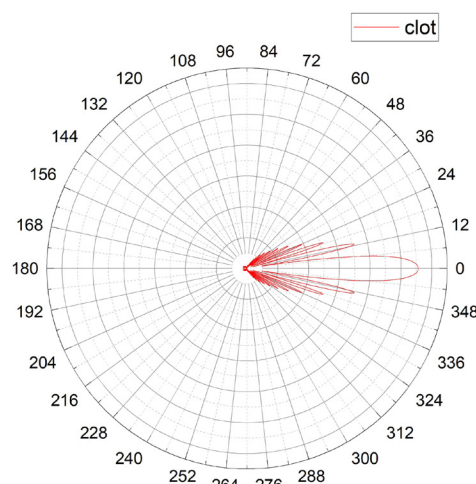


Рисунок 5. Диаграммы направленности для агрегата из тромбоцитов (гексамера, красная линия, clot). Максимальный уровень светорассеяния приходится на 0°

Расчет индикатрис рассеяния на сферическом объекте размера порядка 2 мкм

Зависимость интенсивности рассеяния света от угла, рассчитанная по теории Ми (или приближению Фраунгофера), представлена угловой диаграммой (рис. 6). Для расчета угловой диаграммы использовалась программа MiePlot v4.6.21 (www.philiplaven.com), которая позволяет рассчитывать полимодальные функции распределения частиц по размерам.

На рис. 6 видно, что максимальная интенсивность светорассеяния приходится на 0°, ближайший локальный максимум – на 12°. Характер кривых для перпендикулярно и параллельно поляризованного света сходный: интенсивность света не является монотонной зависимостью от угла рассеяния, но в целом, является убывающей от 0° до 180°. Превалирует рассеяние вперед.

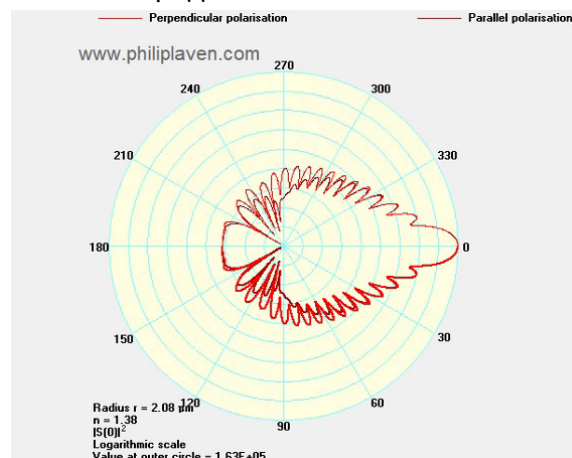


Рисунок 6. Зависимость интенсивности светорассеяния от угла в полярных координатах для перпендикулярно (обозначено красным) и параллельно (обозначено бордовым) поляризованного света. Угловое разрешение - 0.1, радиус сферы 2.08 мкм. Показатель преломления объекта - 1.38. Показатель преломления среды 1.33.

На рис. 7 приведен график зависимости интенсивности светорассеяния для гексамера из тромбоцитов (агрегат из 6 форменных элементов). Радиус сферы, которая будет покрывать 6 таких тромбоцитов будет равен 3.12 мкм. На рис. 7 видно, что максимальная интенсивность светорассеяния приходится на 0°, ближайший локальный максимум приходится на 8°. Характер кривых для перпендикулярно и параллельно поляризованного света сходный: функция интенсивности рассеяния от угла не является монотонной, но имеет убывающий тренд. Превалирует рассеяние вперед. На интервале от 0° до 100° имеет 20 максимумов для перпендикулярно поляризованного света.

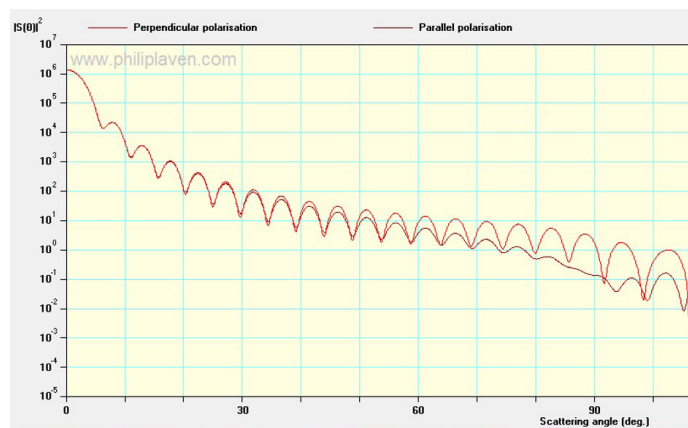


Рисунок 7. Зависимость интенсивности светорассеяния от угла в полярных координатах для перпендикулярно (обозначено красным) и параллельно (обозначено бордовым) поляризованного света. Угловое разрешение - 0.1, радиус сферы 3.12 мкм. Показатель преломления объекта -1.38. Показатель преломления среды 1.33

Зависимость интенсивности светорассеяния от количества частиц

Для выявления зависимости интенсивности светорассеяния от количества частиц на оптическом пути был проведен численный расчет индикатрис рассеяния. Численно интенсивность равна усредненной за период колебаний волны мощности излучения, проходящей через единичную площадку, расположенную перпендикулярно направлению распространения энергии:

$$I = \langle S \rangle_t \quad (2)$$

При мощности лазера P равной 5мВт и диаметре пучка на выходе d_1 равным 1 мм, интенсивность падающего света I_0 равна

$$I_0 = \frac{P}{S_0} = \frac{5 \text{ мВт}}{0.79 \text{ мм}^2} = 6366 \frac{\text{Вт}}{\text{м}^2} \quad (3)$$

при условии, что площадь пучка S_0 равна $(\pi \cdot (1\text{мм})^2)/4 = 0.79\text{мм}^2$.

Пусть радиус активированного тромбоцита r_2 равен 1.5 мкм, тогда поперечная площадь тромбоцита S рассчитывается по формуле $\pi \cdot r_2^2$ и составит 7.07 мкм². Положим, что N – концентрация тромбоцитов в единице освещенного объема.

Концентрация тромбоцитов в кювете равна 10 000 тромбоцитов/мкл или 10 000 тромбоцитов в одном кубическом миллиметре. Освещается цилиндр диаметром 1 мм, длиной 10 мм (длина оптического пути). Объем такого цилиндра 0.79 мм³. В данном объеме будет находиться 78 540 тромбоцитов, общей площадью 0.56 мм² (рис. 8).

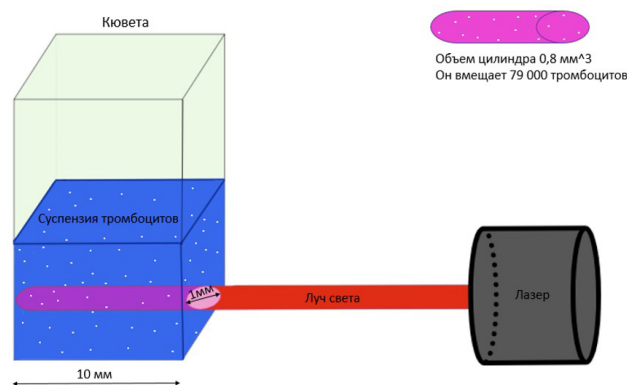


Рисунок 8. Лазер освещает цилиндрический сегмент объемом 0.8 мм³, в котором расположено 79 000 одиночных тромбоцитов.

Если I_0 – интенсивность падающего света, тогда интенсивность прошедшего сквозь кювету света I_p будет изменяться по закону:

$$I_p = I_0 * \left(1 - \frac{N * S}{S_0}\right) + N * I(\beta) \quad (4)$$

где первое слагаемое отражает часть нерассеянного света ($\beta=0$), а второе слагаемое соответствует рассеивающему члену. Интенсивность рассеянного света от каждой частицы $I(\beta)$ равна

$$I(\beta) = \frac{I_0 x^4}{2k^2 a^2} \left(\frac{J_1(x \sin \beta)}{x \sin \beta} \right)^2 \quad (5)$$

где k – волновое число равное $2\pi/\lambda$ (λ – длина волны света), a – расстояние от рассеивающего объекта до детектора, x представляет собой безразмерный параметр размера равный $\pi \cdot d/\lambda$, (d – диаметр частицы), J_1 – сферическая функция Бесселя первого порядка. Формула заимствована из [7].

Рассмотрим ряд случаев для расчёта интенсивности светорассеяния при направлении лазерного излучения на измерительную кювету:

1. Буфер в кварцевой кювете

Если рассеивающих объектов нет, т.е. кювета не содержит тромбоцитов, тогда интенсивность падающего света равна интенсивности прошедшего насквозь пучка:

$$I_p = I_0 = 6366 \frac{\text{Вт}}{\text{м}^2} \quad (6)$$

2. Взвесь активированных тромбоцитов в буфере

Введем переменную γ равную $x \cdot \sin \beta$, тогда сферическая функция Бесселя первого порядка

определяется выражением:

$$J_1(\gamma) = \frac{\sin \gamma}{\gamma^2} - \frac{\cos \gamma}{\gamma} \quad (7)$$

Если $\beta=0$, то $\gamma=0$ и для $J_1(\gamma)/\gamma$ возникает неопределенность типа 0/0. По этой причине проведение расчета индикатрисы рассеяния по формуле (1) затруднено с помощью редактора Visual Code. В виду этого интенсивность светорассеяния рассчитывалась для углов от 0.25° до 12.5° с шагом в 0.25°. График зависимости интенсивности светорассеяния от угла рассеяния в интервале от 0° до 12° представлен на рисунке 9 (черная кривая). При β равном 0.25° интенсивность света составляет около 32 кВт/м². Если $\beta=1^\circ$, то исходя из расчетов $I_p=2$ кВт/м². Значит, интенсивность рассеяния на 0° больше чем на 1°. Также на основании этого графика можно предположить, что при устремлении угла рассеяния к 0° интенсивность светорассеяния устремляется к максимальному значению. С увеличением угла от 1° до 12° интенсивность светорассеяния падает, при этом в интервале от 2° до 12° зависимость слабая.

3. Активированные тромбоциты в агрегате

Если агрегат представляет собой гексамер (агрегат из шести сфер диаметром 3мкм), то радиус такой сферы будет равен 4.5 мкм, диаметр 9 мкм. Количество таких агрегатов в выделенном объеме составит 13 090 штук.

Выполнив подстановку соответствующих параметров в формулу (1) получено, что интенсивность нерассеянного света I_p ($\beta=0.25$) = 8400 Вт/м²

Таким образом, при увеличении размеров рассеивателей в несколько раз интенсивность светорассеяния под углом 0.25° снижается в 4 раза.

Исходя из расчетов, $I_p(\beta=1^\circ)$ равна 3385.94 Вт/м². Интенсивность светорассеяния на 1° для рассеяния агрегатами из сфер меньше чем на 0°. При увеличении угла в интервале от 1° до 12° интенсивность светорассеяния агрегатами падает (рис. 9, красная кривая), в этом интервале зависимость слабая.

Помимо прочего была проанализирована зависимость интенсивности светорассеяния на одном градусе от концентрации частиц в растворе. В роли частиц выступили одиночные тромбоциты и их агрегаты, гексамеры. Графики зависимости представлены на рисунке 10. Было обнаружено, что интенсивность светорассеяния на 1° линейно убывает с увеличением частиц в кювете вне зависимости от размера частиц (мономеры тромбоцитов или гексамеры).

Таким образом, в ходе моделирования процесса рассеяния лазерного излучения на частице размера порядка микрометра было

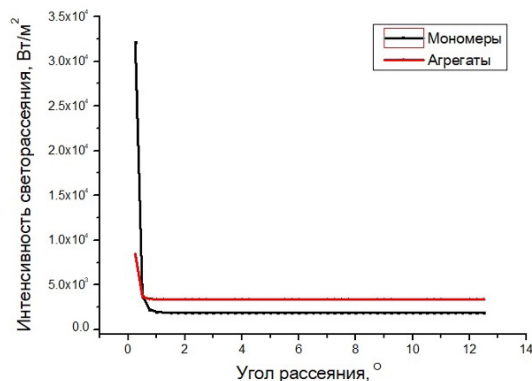


Рисунок 9. Индикатриса рассеяния в среде, содержащей суспензию тромбоцитов (черная кривая) и агрегатов тромбоцитов (красная кривая), рассчитанная аналитически с помощью среды Visual Studio Code v1.85.2 (Microsoft Corporation).

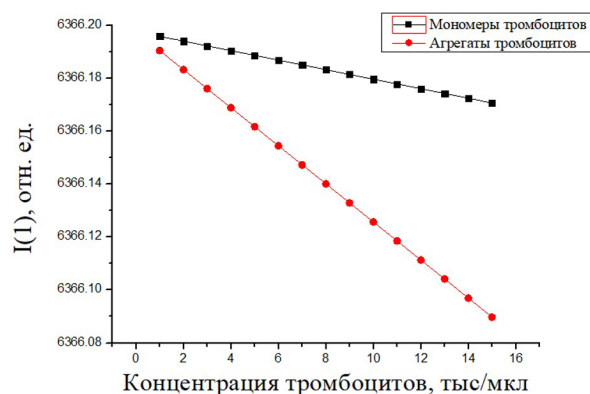


Рисунок 10. Интенсивность светорассеяния на 1° линейно убывает с увеличением концентрации рассеивающих объектов. Черная линия отображает зависимость для тромбоцитов-мономеров, красная – для агрегатов. Индикатриса рассеяния в среде, содержащей суспензию агрегатов тромбоцитов, рассчитана аналитически с помощью среды Visual Studio Code v1.85.2 (Microsoft Corporation).

получено, что рассеяние преимущественно происходит вперед и вбок и имеет центральный максимум на 0°. Зависимости для кривых полученных на 1° и 12° могут предоставлять дополнительную информацию об изменении формы одной частицы (с эллипсоидальной на сфероидальную), а также и об изменении размера частиц (например, при их агрегации).

Обсуждение результатов

Моделирование светорассеяния на тромбоцитах важно по нескольким причинам, охватывающим как фундаментальные научные исследования, так и клиническую диагностику. Данная работа продолжает исследования рассеяния лазерного излучения на тромбоцитах [5], [10]. Она посвящена изучению диаграмм направленности электромагнитного излучения при рассеянии света на тромбоците или их агрегатах.

В рамках данной работы впервые разработана математическая модель, описывающая диаграммы направленности электромагнитного поля, рассеянного на неактивированной тромбоците, а также тромбоците, выпустившем

филопдии. А также приведены диаграммы рассеяния поляризованного и неполяризованного света на тромбоците и/или их агрегатах. Данная модель учитывает размер тромбоцита, показатель преломления как внешней среды, так и внутренней. Полученные результаты согласуются с существующими литературными данными [7]. В ходе работы было показано, что интенсивность светорассеяния на 1° линейно убывает с увеличением концентрации частиц вне зависимости от их размера.

Тем не менее, построенная модель не свободна от ограничений. Модель не учитывает сложность формы тромбоцита, строго говоря, этот клеточный фрагмент не является эллипсоидом. Модель также не предусматривает, что показатель преломления не является постоянной величиной: у цитоплазмы, мембраны и органелл тромбоцита он разный.

В перспективе дальнейшей работы планируется учесть вышеописанные факторы, а также расширить данные на пациентов с большими (макротромбоцитопения) и маленькими (микротромбоцитопения) тромбоцитами и, таким образом, оценить вклад размера тромбоцита при рассеянии лазерного излучения. В будущем исследование планируется дополнить сопоставлением полученных результатов с экспериментальными данными.

В заключение, моделирование светорассеяния на тромбоцитах является важным инструментом для углубленного понимания биологии тромбоцитов, разработки новых диагностических методов и оптимизации существующих технологий в гематологии.

Вклад авторов

Б.Г.А. выполнял моделирование процессов, анализировал данные, писал и редактировал текст статьи; С.Г.С. руководила проектом, планировала исследования, анализировала данные, писала и редактировала текст статьи.

Благодарности

Авторы статьи выражают глубокую признательность коллективу лаборатории молекулярных механизмов гемостаза ЦТП ФХФ РАН за конструктивную критику и поддержку работы на общеинститутских семинарах.

Финансирование

Это исследование не получало внешнего финансирования

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

1. Васильев С. А. и др. Клинико-лабораторная диагностика нарушений функций тромбоцитов

// 2013.

2. Деркачев Э. Ф. и др. Способ исследования активации и агрегации тромбоцитов: Патент RU 2108579 C1 6 G01 N 33/49.—1998 // БИ № 10 (II).
3. Мазуров А. В. Физиология и патология тромбоцитов. : Литтерра, 2011.
4. Пономаренко Е. А. Исследование функциональной активности тромбоцитов при стимуляции АДФ методом проточной цитометрии : диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук // 2023.
5. Lattmer P., Born G. V. R., Michal F. Application of light-scattering theory to the optical effects associated with the morphology of blood platelets // Archives of Biochemistry and Biophysics. 1977. Т. 180. № 1. С. 151–159.
6. Linden M. D. Platelet physiology. // Methods Mol Biol. 2013. Т. 992. С. 13–30.
7. Mindukshev I. и др. Low angle light scattering analysis: a novel quantitative method for functional characterization of human and murine platelet receptors. // Clin Chem Lab Med. 2012. Т. 50. № 7. С. 1253–1262.
8. Mindukshev I. и др. Platelet Hemostasis Reactions at Different Temperatures Correlate with Intracellular Calcium Concentration. // Int J Mol Sci. 2022. Т. 23. № 18.
9. Moskalensky A. E. и др. Accurate measurement of volume and shape of resting and activated blood platelets from light scattering. // J Biomed Opt. 2013. Т. 18. № 1. С. 17001.
10. Strokotov D. I. и др. Polarized light-scattering profile-advanced characterization of nonspherical particles with scanning flow cytometry. // Cytometry A. 2011. Т. 79. № 7. С. 570–579.