



Математическая модель
рецептора 3 типа к
инозитол-3-фосфату
(IP_3R3).

сс 3-10

А. Е. Болдова и соавторы

Преимущество
применения
лактадгерина для
оценки экспонирования
фосфатидилсерина в
тромбоцитах).

сс 11-13

С. И. Обыденный

Оценка функциональной
активности нейтрофилов
с применением красителей
феноксазинового ряда.

сс 14-19

В. Е. Реут и соавторы

Метод регистрации
мембранного
потенциала
тромбоцитов с
использованием пэтч-
клампа в конфигурации
перфорированная
«целая клетка».

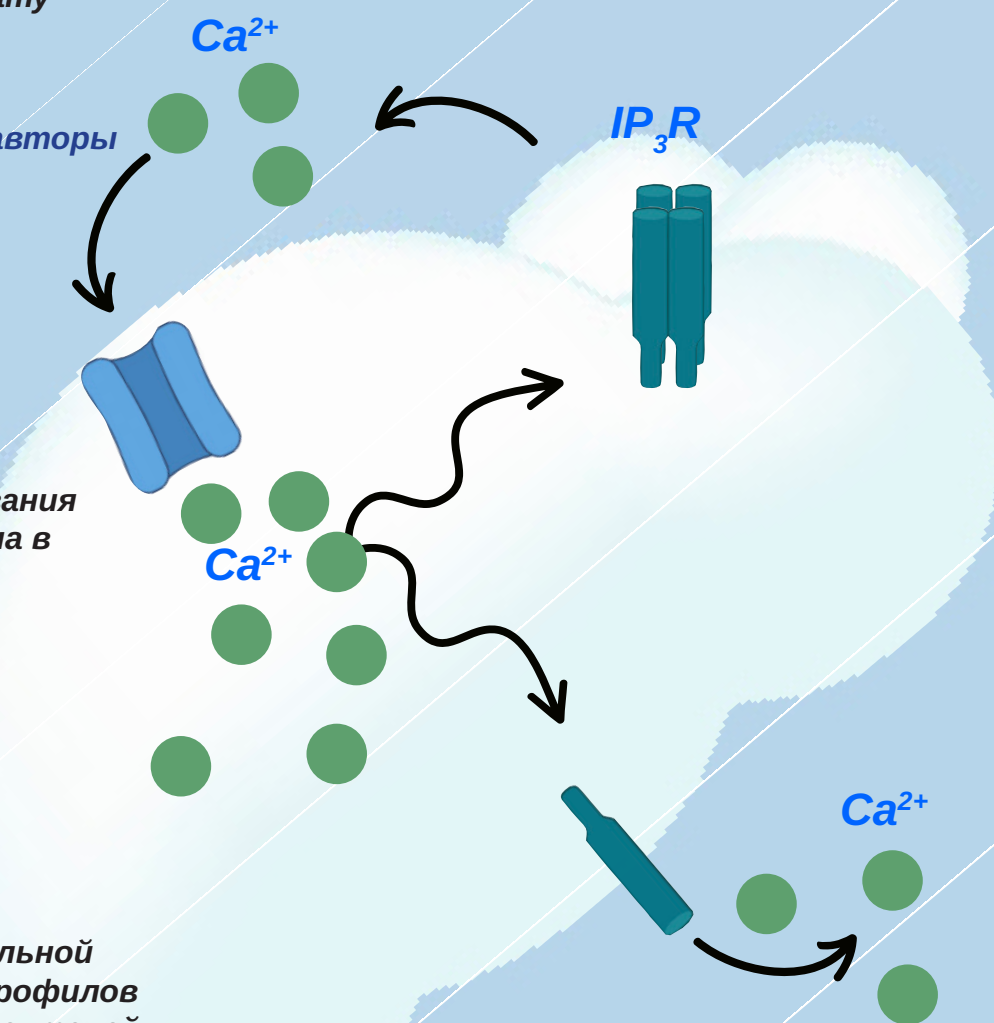
сс 20-26

А. Ю. Кохан и соавторы

Изучение стабильности
белка с помощью
проточной
цитофлуорометрии
и вестерн блота:
сравнительное
исследование.

сс 27-31

Е. И. Николаева и
соавторы



Содержание

1. А. Е. Болдова, В. Д. Василевская, А. Н. Свешникова Математическая модель рецептора 3 типа к инозитол-3-фосфату (IP_3R3).....3
2. С.И. Обыденный Преимущество применения лактадггерина для оценки экспонирования фосфатидилсерина в тромбоцитах.....11
3. В.Е. Реут, Д.В. Григорьева, А.В. Соколов, А.М. Панасенко, И.В. Горудко Оценка функциональной активности нейтрофилов с применением красителей феноксазинового ряда.....14
4. А. Ю. Кохан, И. И. Прокофьев, С. О. Зданевич, Л. М. Лукьяненко, Е. В. Шамова Метод регистрации мембранного потенциала тромбоцитов с использованием пэтч-клампа в конфигурации перфорированная «целая клетка».....20
5. Е. И. Николаева, Н. Колчин, З. Нестеренко, Е. Кольцова, М. Пантелеев, К. Р. Бутов Изучение стабильности белка с помощью проточной цитофлуорометрии и вестерн блота: сравнительное исследование.....27

Математическая модель рецептора 3 типа к инозитол-3-фосфату (IP_3R3).

А. Е. Болдова¹, В. Д. Василевская², А. Н. Свешникова^{1,2,3#}.

1. Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, 109029, Москва, ул. Средняя Калитниковская, 30
2. Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1
3. Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева, 117997, Москва, ул. Саморы Машела, д.1

Автор для переписки: a.sveshnikova@physics.msu.ru

Получено: 08.05.2023

Принято к публикации: 28.06.2023

Опубликовано: 30.06.2023

EDN: DGOFDM

Аннотация

Рецептор к инозитол-1,4,5-трифосфату (IP_3 -рецептор) играет важную роль в кальциевой сигнализации клеток. При математическом моделировании преимущественно рассматривается IP_3 -рецептор 2 типа, а модель IP_3 -рецептора 3 типа, учитывающая динамические свойства данного канала, не предложена. Целью настоящей работы является разработка достоверной математической модели IP_3 -рецептора 3 типа, учитывающей нелинейный характер зависимости активности рецептора от концентрации кальция и IP_3 в цитозоле.

В работе предлагается система из шести независимых обыкновенных дифференциальных уравнений для описания развития кальциевого ответа на выраженную концентрацией IP_3 активацию в системе с IP_3 -рецептором 3 типа и кальциевой АТФ-азой SERCA2b. Параметры модели подбирались автоматически по ранее опубликованным экспериментальным данным.

В результате исследования показано, что в системе IP_3R3 -SERCA2b не наблюдается осцилляций в широком диапазоне параметров. Наиболее часто возникающим режимом функционирования системы является ответ «все-или-ничего», при котором в зависимости от концентрации IP_3 либо не наблюдается мобилизации кальция, либо происходит полное опустошение кальциевых депо.

Таким образом, мы заключаем, что в условиях простейшей модели IP_3R3 не демонстрирует способности к поддержанию кальциевых осцилляций, что согласуется с его предполагаемой ролью основного кальциевого канала сайтов контакта митохондрий с эндоплазматическим ретикуломом.

Ключевые слова: Кальциевая сигнализация, Инозитол-1,4,5-трифосфат, Рецептор к инозитол-1,4,5-трифосфату 3 типа, Компьютерное моделирование

Введение

Подъем концентрации свободных ионов кальция ($[Ca^{2+}]$) в цитозоле клетки является одним из важнейших путей внутриклеточной сигнализации, регулирующим такие физиологические процессы как экспрессия генов, секреция везикул, изменение формы, пролиферация, дифференцировка и клеточная гибель [1–5]. Одним из ключевых событий в кальциевой сигнализации является открытие канала-рецептора к инозитол-1,4,5-трифосфату (IP_3 , IP_3R), находящегося в мембране эндоплазматического ретикула (внутренняя мембрана, ВМ) и/или на плазматической мембране клетки (ПМ). Через открытые каналы ионы кальция проходят в цитозоль клетки по градиенту концентрации. В клетках возбудимых тканей также присутствует другой канал для ионов кальция – рианодиновый рецептор, принципы работы которого описаны в многочисленных обзорах [6,7]. Так как ионы кальция токсичны для клетки, при попадании в цитозоль они сразу «выкачиваются» наружу или «закачиваются» во внутриклеточные хранилища специальными кальциевыми помпами – АТФ-азами SERCA (sarcoendoplasmic reticulum calcium - ATPase) [8] и PMCA (plasma membrane calcium ATPase) [9,10]. Комбинация каналов и помп для кальция создает характерные временные паттерны кальциевой сигнализации – осцилляции, «кодирующие» внешний сигнал [11].

IP_3R представляет собой семейство больших (гомотетрамер) катионных каналов, преимущественно расположенных в мембране эндоплазматического ретикула (ЭПР) [12–15]. В литературе IP_3R называют как каналом, так и рецептором, однако, в действительности, он представляет собой селективный катионный канал, регулируемый агонистами [12,16,17]. Открытие канала управляется концентрацией IP_3 в цитозоле клетки ($[IP_3]$), а модулируется цитозольной концентрацией ионов кальция

([Ca²⁺]). Характер кальциевой модуляции открытия IP₃R зависит от типа рецептора (всего выделяют 3 типа), а также от их пространственного распределения в клетке [18]. Одиночные рецепторы способны вызывать лишь небольшое локальное увеличение концентрации кальция в клетке, в то время как обширные кластеры IP₃R приводят к образованию так называемых кальциевых «пуфов», когда ионы Ca²⁺, прошедшие через единичные открытые каналы, начинают активировать соседние рецепторы, в результате наблюдается локализованный в пространстве рост [Ca²⁺] [19].

В основе способности IP₃R обеспечивать кальциевые осцилляции лежит его бифазная регуляция, осуществляемая ионами кальция [14,16,20]. Так, при отсутствии ионов Ca²⁺ в среде данный канал является закрытым даже при очень больших [IP₃] [21,22]. При увеличении [Ca²⁺] наблюдается постепенный рост вероятности открытия рецепторов с последующим выходом на максимум, а при дальнейшем увеличении [Ca²⁺] происходит связывание кальция с ингибиторным сайтом и закрытие канала [22]. Такой сложный механизм работы может свидетельствовать о наличии у рецептора нескольких сайтов для связывания ионов кальция [20]. И, действительно, методами криоэлектронной микроскопии было показано, что в закрытом состоянии каждая субъединица IP₃R связывает два иона кальция – один из них расположен на периферии цитоплазматического домена, в то время как второй принадлежит примембранной области (ПМ). Некоторые исследователи предполагают, что связывание с ионом кальция вызывает поворот ПМ и, как следствие, открытие проводящей поры [12,16].

На сегодняшний день существует довольно большое число математических моделей IP₃R различных типов [23–25], позволяющих имитировать те или иные свойства данного белка в системах кальциевой сигнализации [26–29]. Вероятно, одной из наиболее известных является модель De Young - Keizer [20], в которой предполагается, что связывание рецептора с ионом кальция происходит по закону действующих масс, а аффинность к IP₃ при связывании с ионом кальция не изменяется. Альтернативная модель была предложена в работе Sneyd - Dufour [23] для описания кинетики работы IP₃R типа 2. В этой модели также аффинность к IP₃ не зависит от [Ca²⁺], однако, аффинность ингибиторного сайта к [Ca²⁺] зависит от [IP₃].

Сравнительно недавно стало очевидно, что свойства IP₃R определяют скорость прямой передачи кальция из ER в митохондрии и регуляцию активности митохондрий через сайты IP₃R-Grp75-VDAC [30]. При этом IP₃R3 рассматривался как

маркер контактных сайтов ЭПР-митохондрии [31], хотя в более поздних работах было показано, что ведущую роль в передаче кальция играет IP₃R2 [32]. Роль IP₃R3 в кальциевой сигнализации вне митохондриальных сайтов неясна, так как тканей, в которых этот тип является единственным типом кальциевых каналов, неизвестно. Тем не менее на чистых системах было показано, что зависимость вероятности открытия IP₃R3 от [IP₃] носит нелинейный характер [22,33,34] и не может быть описана законом действующих масс, при этом связывание молекул IP₃ и рецептора является кооперативным [33,34]. В настоящей работе мы разработали математическую модель кинетики открытия IP₃R3 и показали возможные моды его функционирования в кальциевой сигнализации.

Материалы и Методы

Математическая модель кинетики IP₃R3 представляет собой систему обыкновенных дифференциальных уравнений, построенных на основе модели Sneyd - Dufour [23], состоящей из шести дифференциальных уравнений, каждое из которых отражает возможное состояние одной из четырех субъединиц рецептора (Рис. 1): N – нейтральное состояние готовности к работе; O – открытое состояние, при котором канал обладает ненулевой проводимостью для ионов кальция; A – активированное состояние, при котором проводимость выше, чем в состоянии O; I₁, I₂ – ингибированные состояния, в которых канал закрыт и которые достигаются связыванием иона кальция в ингибиторном сайте; S – закрытое состояние. При отсутствии в среде ионов Ca²⁺ и молекул IP₃ субъединица рецептора находится в состоянии N. При связывании иона Ca²⁺ происходит переход в ингибированное состояние I₁. Добавление IP₃ в систему вызывает переход из нейтрального состояния N в состояние O. Далее возможны следующие исходы: из состояния O субъединица может перейти в закрытое состояние S (при этом связывание дополнительного кальция не происходит), или же, связав дополнительный ион Ca²⁺ перейти в активированное состояние. При избытке ионов Ca²⁺ в среде субъединица из активированного состояния может перейти в ингибированное состояние I₂. Система уравнений оригинальной модели [23] может быть представлена следующим образом:

$$\frac{d[N]}{dt} = -\frac{m_1[Ca_{cyt}^{2+}][N]}{n_1 + [Ca_{cyt}^{2+}]} + \varphi_2[I_1] - \frac{(m_2 + n_2[Ca_{cyt}^{2+}])[N]}{n_1 + [Ca_{cyt}^{2+}]} * [IP_3] + \frac{(m_2 + n_2[Ca_{cyt}^{2+}])[O]}{n_1 + [Ca_{cyt}^{2+}]}, (1)$$

$$\frac{d[I_1]}{dt} = \frac{m_1[Ca_{cyt}^{2+}][N]}{n_1 + [Ca_{cyt}^{2+}]} - \varphi_2[I_1], (2)$$

$$\frac{d[O]}{dt} = \frac{(m_2 + n_2[Ca_{cyt}^{2+}])[N]}{n_1 + [Ca_{cyt}^{2+}]} * [IP_3] - \frac{(m_2 + n_2[Ca_{cyt}^{2+}])[O]}{n_2 + [Ca_{cyt}^{2+}]} - \frac{m_3[O]}{n_3 + [Ca_{cyt}^{2+}]} + \varphi_4[S] - \frac{m_4[O][Ca_{cyt}^{2+}]}{n_4 + [Ca_{cyt}^{2+}]} + \frac{m_4[A]}{n_4 + [Ca_{cyt}^{2+}]}, (3)$$

$$\frac{d[A]}{dt} = \frac{m_4[O][Ca_{cyt}^{2+}]}{n_4 + [Ca_{cyt}^{2+}]} - \frac{m_4[A]}{n_4 + [Ca_{cyt}^{2+}]} - \frac{m_5[A]}{n_5 + [Ca_{cyt}^{2+}]} + \varphi_6[I_2], (4)$$

$$\frac{d[I_2]}{dt} = \frac{m_5[A]}{n_5 + [Ca_{cyt}^{2+}]} - \varphi_6[I_2], (5)$$

$$\frac{d[S]}{dt} = \frac{m_3[O]}{n_3 + [Ca_{cyt}^{2+}]} - \varphi_4[S], (6)$$

где [] обозначают объемную концентрацию вещества, $[Ca_{cyt}^{2+}]$ – концентрация свободных ионов кальция в цитозоле клетки, n_i , m_i и φ_i – параметры модели [23]. Начальные значения переменных приведены в таблице Д1, значения параметров приведены в таблице Д2.

В модели [23] предполагается, что вероятность открытия рецептора (P_0) может быть представлена следующей формулой:

$$P_0 = \left(\frac{P_1[O]}{[IP_3R]} + \frac{P_2[A]}{[IP_3R]} \right)^4, (7)$$

где $[IP_3R]$ – общая концентрация всех субъединиц рецептора:

$$[IP_3R] = [N] + [O] + [A] + [S] + [I_1] + [I_2].$$

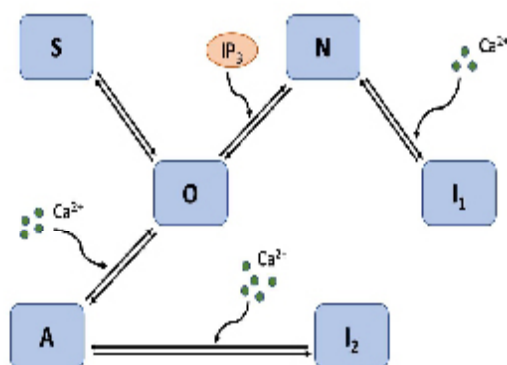


Рисунок 1. Упрощенная схема реакций, лежащих в основе математической модели IP_3R_3 , построенная на основе [23]. Из нейтрального состояния (N) субъединица может перейти в открытое состояние (O), связав IP_3 , или в заингибированное состояние (I_1) посредством связывания с ионами кальция (Ca^{2+}). Из открытого состояния субъединица может с течением времени достигнуть закрытого состояния (S) или перейти в активированное состояние (A) при повышении концентрации кальция в цитозоле. Дальнейшее связывание субъединицы рецептора вызывает переход в состояние (I_2) и ее инактивацию.

При моделировании кинетики IP_3R_3 мы предполагали, что параметры чувствительности ингибиторного сайта ($n1$, $n5$, $\varphi6$), параметры чувствительности сайта IP_3 к $[Ca^{2+}]$ ($m2$, $n3$), время жизни закрытого состояния ($\varphi4$) и параметры чувствительности активаторного сайта ($m4$)

для IP_3R_3 отличаются от IP_3R_2 , поэтому мы использовали методы подбора параметров для их определения по экспериментальным данным для IP_3R_3 [22]. Нормированные значения параметров чувствительности приведены в таблице Д4. Кинетические параметры модели были взяты из литературы или оценены на основе существующих литературных данных. Интегрирование системы уравнений проводилось методом LSODA [35]. Исследование модели включает в себя поиск стационарных состояний, осуществляемый методом Ньютона [36], а также анализ чувствительности [36–39] и автоматический подбор параметров методом Evolution Strategy (SRES) [40]. Все расчеты производились с помощью программного обеспечения COPASI (<http://www.copasi.org>) [41].

Результаты и Обсуждение

Построение модели IP_3R_3

Как было упомянуто ранее, модель IP_3R_3 была построена на основе модели Sneyd-Dufour [23]. Для корректного описания эффекта кооперативности [33,34] было введено предположение о наличии второго сайта связывания для IP_3 у рецептора и форма зависимости скорости реакции $N \rightarrow O$ от $[IP_3]$ была изменена в соответствии с [34] следующим образом:

$$J_{N \rightarrow O} = \frac{(m_2 + n_2[Ca_{cyt}^{2+}])[N]}{n_1 + [Ca_{cyt}^{2+}]} * \frac{K_p[IP_3] + 2aK_p^2[IP_3]^2 + 3a^2bK_p^3[IP_3]^3 + a^3b^2cK_p^4[IP_3]^4}{1 + 4K_p[IP_3] + 6aK_p^2[IP_3]^2 + 4a^2bK_p^3[IP_3]^3 + a^3b^2cK_p^4[IP_3]^4}, (8)$$

где K_p – константа диссоциации IP_3 от второго сайта, а коэффициенты a , b , c являются поправочными факторами и описывают кооперативность [34]. Значения параметров приведены в Таблице Д2.

Как было показано ранее, ток через IP_3R может осуществляться, если хотя бы три субъединицы рецептора находятся в открытом состоянии [14,20]. Для описания этой возможности, мы модифицировали выражение для вероятности

открытия рецептора следующим образом:

$$P_0 = \frac{\sigma \left(\frac{P_1 [O]}{[IP_3 R]} + \frac{P_2 [A]}{[IP_3 R]} \right)^3 + (1-\sigma) \left(\frac{Q_1 [O]}{[IP_3 R]} + \frac{Q_2 [A]}{[IP_3 R]} \right)^4}{k} \quad (9)$$

где σ – доля тока через каналы с тремя открытыми субъединицами, k – нормировочный коэффициент.

Для описания вероятности открытия IP_3R в зависимости от $[Ca^{2+}]$ и $[IP_3]$ [22], мы подбирали параметры модели (отмеченные соответственно в таблице Д2) методом SRES [40] (рис. 2). Параметры, оказывающие наибольшее влияние на результат работы модели, определялись посредством анализа чувствительности. Было обнаружено, что наибольший эффект на вероятность открытия P_0 оказывают нормировочный коэффициент k и параметры, регулирующие скорости переходов в закрытое состояние S ($m3$ и $\phi4$) и открытое состояние A ($m4$, $m-4$), а также управляющие чувствительностью ингибиторного сайта $I_2(n5)$. Все результаты анализа чувствительности приведены в таблице Д4. Достоверность полученных значений оценивалась по критерию согласия Пирсона (p -value > 0.05, что говорит о малом различии между экспериментальными данными и результатами модели). Как обсуждалось ранее, влияние $[Ca^{2+}]$ на вероятность открытия канала носит бифазный характер благодаря двум модулирующим сайтам для кальция, и может быть описана колоколообразной функцией с максимумом, зависящим от $[IP_3]$. В результате расчетов получилось, что зависимость вероятности открытия канала от $[IP_3]$ носит сигмоидальный характер, что соответствует представлениям о кооперативном связывании молекул IP_3 (рис. 2Б).

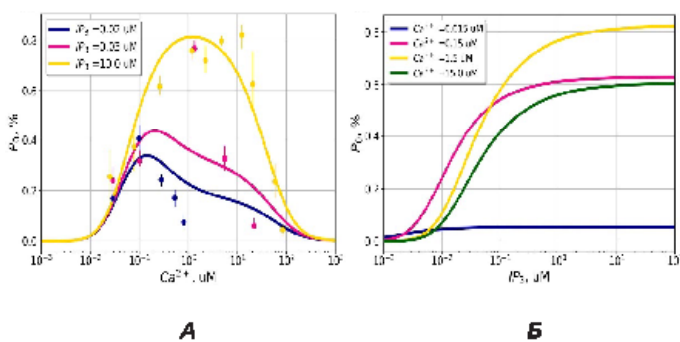


Рисунок 2. Расчетные зависимости вероятности открытия IP_3R в стационарном состоянии. (А) от $[Ca^{2+}]$ и (Б) $[IP_3]$. Параметры модели, подобранные по экспериментальным данным (А, [22]): $n1=3,10$ мкМ, $m2=1056,85$ мкМ $\cdot$ с $^{-1}$, $n3=40,30$ мкМ, $\phi4=7,45$ с $^{-1}$, $n5=999,97$ мкМ, $\phi6=27,89$ с $^{-1}$, $\sigma=0,009$, $k=0,67$.

Модель кальцевой сигнализации с участием IP_3R

Для оценки влияния IP_3R на кальцевую сигнализацию нами была разработана минимальная математическая модель кальцевой сигнализации (рис. 3). Данная модель

представляет собой систему из семи независимых дифференциальных уравнений, описывающих концентрацию ионов кальция в цитозоле ($[Ca^{2+}_{cyt}]$) и в ЭПР ($[Ca^{2+}_{er}]$) клетки и указанные выше шесть состояний рецептора. В состоянии покоя $[IP_3] = 0$ мкМ, $[Ca^{2+}_{cyt}] = 0$ мкМ в отсутствие тока утечки. При активации клетки происходит повышение $[IP_3]$, что приводит к выходу кальция из ЭПР и развитию кальцевого ответа системы. В рамках данной модели мы не рассматриваем обмен ионами кальция с внешней средой. В дополнение к уравнениям (1)-(9) в модель вводятся следующие уравнения:

$$\frac{d[Ca^{2+}_{cyt}]}{dt} = \beta \left(Y_{IP3R} P_0 [IP_3 R] \ln \left(\frac{[Ca^{2+}_{er}]}{[Ca^{2+}_{cyt}]} \right) + Y_{leak} \ln \left(\frac{[Ca^{2+}_{er}]}{[Ca^{2+}_{cyt}]} \right) - \frac{V_{serca} \cdot [Ca^{2+}_{cyt}]^n}{K_{serca} + [Ca^{2+}_{cyt}]^n} \right) \quad (10)$$

где β -отношение объемов двух компартментов (ЭПР и цитозоля); Y_{IP3R} – проводимость IP_3R для кальция; P_0 – вероятность открытия IP_3R , полученная из уравнения (9); Y_{leak} – ток утечки ионов Ca^{2+} из ЭПР в цитозоль; V_{serca} – активность SERCA; K_{serca} – константа полуактивации SERCA; n – коэффициент кооперативности для SERCA; $[Ca^{2+}_{er}] = [Ca^{2+}_{er}]_0 - 1/\beta [Ca^{2+}_{cyt}]$ – концентрация ионов кальция в ЭПР. Значения параметров приведены в Таблице Д3.

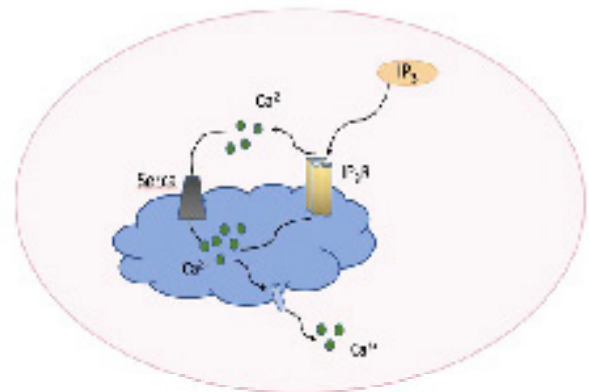


Рисунок 3. Схема модели кальцевой сигнализации (10)-(11). При активации клетки происходит повышение концентрации инозитол-1,4,5-трисфосфата (IP_3) в цитозоле клетки (обозначен розовым). IP_3 инициирует открытие канала-рецептора IP_3R типа 3 в мембране ЭПР (обозначен синим), что приводит к выходу ионов кальция (зеленый кружок, Ca^{2+}) из ЭПР в цитозоль. Кальцевая АТФаза (SERCA) катализирует обратный ток ионов Ca^{2+} из цитозоля в ЭПР. Голубой прямоугольник обозначает спонтанную утечку кальция из ЭПР в цитозоль.

Результаты численного интегрирования модели при различных $[IP_3]$ представлены на рисунке 4. Кальцевый ответ клетки на различный уровень активации носит триггерный характер: при малых $[IP_3]$ уровень Ca^{2+} изменяется слабо (в пределах 10 нМ), однако при достижении пороговых значений $[IP_3]$ наблюдается резкий скачок Ca^{2+} и выход на стационарное состояние, определяемое суммарным количеством кальция в системе, но не $[IP_3]$. Зависимость динамики $[Ca^{2+}]$ от $[IP_3]$ наблюдается только в узком диапазоне

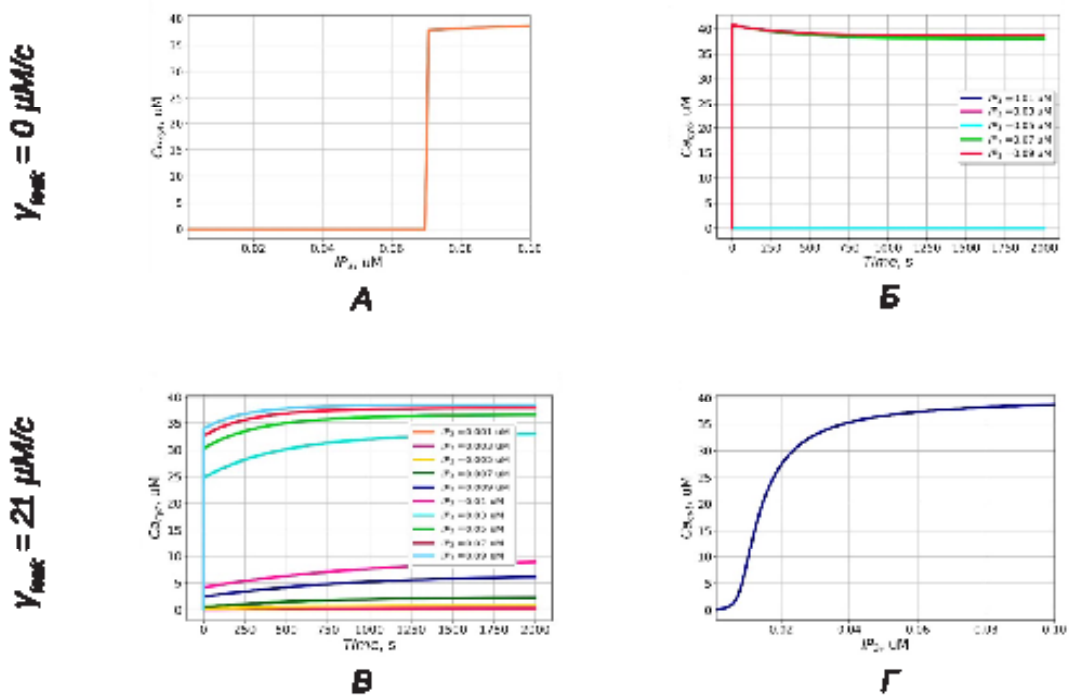


Рисунок 4. Результаты численного интегрирования модели кальциевой сигнализации (1)-(10). Симуляция зависимости $[Ca^{2+}]$ от времени в отсутствие (А) и в присутствии (В) тока утечки ионов кальция через мембрану ЭПР (Y_{leak}). Зависимость $[Ca^{2+}]$ при $t = 2000$ с от $[IP_3]$ в отсутствие (Б) и в присутствии (Г) тока утечки ионов кальция через мембрану ЭПР (Y_{leak}). Расчеты проводились при следующих параметрах: $\beta=0,1$, $V_{serca}=60000$ мкМ/с, $K_{serca}=0,27$ мкМ, $n=1,7$, $Y_{IP_3}=4,2 \cdot 10^5$ с $^{-1}$, $[IP_3 R_3] = 0,5$ мкМ, $Ca_e = 500$ мкМ.

концентраций (рис. 4Б).

В кальциевой сигнализации утечка кальция из ЭПР играет роль трения в колебательной системе и сужает диапазон параметров, при которых наблюдается осцилляторный ответ [26]. Как видно из рисунка 4, добавление в систему тока утечки (Y_{leak}) позволяет увеличить чувствительность системы к активатору, а также расширить

диапазон, при котором уровень кальция в цитозоле зависит от $[IP_3]$. Благодаря утечке ионов из ЭПР уровень кальция в покое поддерживается постоянным (≈ 100 нМ) независимо от количества активатора. Если же дополнительный поток Ca^{2+} отсутствует, уровень цитозольного кальция может быть заметно снижен.

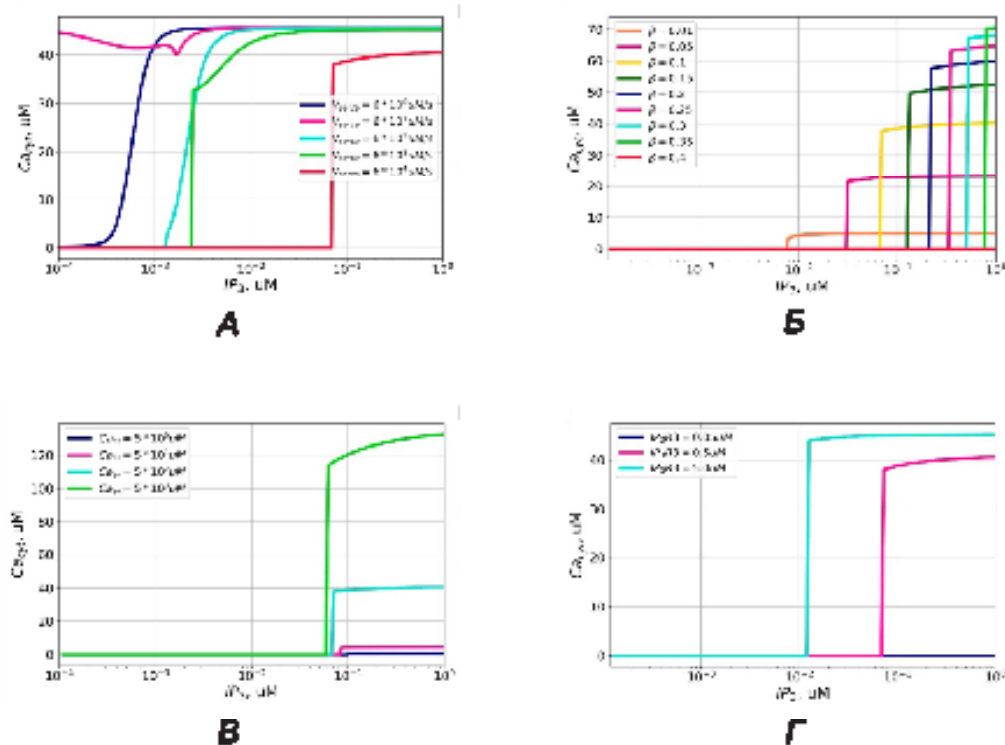


Рисунок 5. Исследование влияния параметров модели кальциевой сигнализации на зависимость $[Ca^{2+}]$ при $t = 2000$ с от $[IP_3]$. Влияние активности SERCA (А); отношения объемов ЭПР и цитозоля, $\beta = V_{ЭПР}/V_{цит}$ (Б); начальной концентрации ионов кальция в ЭПР, Ca_{er} (В); суммарной $[IP_3R]$ (Г).

Для того, чтобы определить возможные варианты кальциевого ответа, которые могут наблюдаться в системе с IP_3R3 , в широком диапазоне варьировались такие параметры модели, как отношение объемов цитозоля и ЭПР - β , активность SERCA - V_{serca} , концентрация кальция в ЭПР – Ca^{2+}_{er} , а также количество самих IP_3 -рецепторов – IP_3R3 (рис. 5).

Тем не менее, путем изменения всех приведенных величин в данной системе не удалось наблюдать осцилляции $[Ca^{2+}]$. В то же время, при низких значениях $[IP_3]$ влияние V_{serca} не является монотонным (рис. 5А), а именно, при активности SERCA порядка единиц и сотен мкМ/с уровень кальция через 2000 с не превышает 1мкМ, в то время как при $V_{serca} \approx 10-100$ мкМ/с $[Ca^{2+}]$ достигает 40 мкМ. Данный эффект связан с возникновением одиночного кальциевого пика при малой активности SERCA. Чем приведенная величина меньше, тем короче продолжительность подъема $[Ca^{2+}]$ (рис. Д1).

Заключение

В рамках данной работы впервые разработана математическая модель, описывающая кинетику работы рецептора 3 типа к инозитол-1,4,5-трисфосфату. Данная модель учитывает не только бифазную регуляцию открытия рецептора, осуществляемую ионами Ca^{2+} , но и нелинейный характер зависимости вероятности открытия рецептора от концентрации IP_3 . Полученные результаты согласуются с существующими литературными данными [22].

При численном интегрировании минимальной модели кальциевой сигнализации, обеспечиваемой IP_3R3 , в системе не было обнаружено осцилляторного режима. Это противоречит существующему в литературе представлению о том, что «колоколообразная» форма зависимости вероятности открытия канала от концентрации кальция обеспечивает осцилляции в системе [11]. С другой стороны, в работах J. Keizer ранее было показано, что в процессе осцилляций поведение рецептора в стационарном состоянии играет менее важную роль, нежели его ответ на изменения уровня кальция в цитозоле [24,42]. Стоит отметить, что существование кальциевых осцилляций в клетке не всегда определяется работой непосредственно IP_3 -рецепторов. Данное поведение системы может быть вызвано широким кругом факторов, включающих активность кальциевых АТФ-аз, обмен кальцием с внешней среды, колебания концентрации IP_3 , а также другие специфические кальциевые каналы (например, рианодиновый рецептор -RyR)[24]. Наилучшим способом оценить вклад того или иного типа рецепторов в возникновение осцилляций в системе можно,

если последовательно «выключать» каждый рецептор. Так, экспериментально было показано, что удаление IP_3 -рецептора 3 типа усиливает осцилляции (частота осцилляций увеличивается, появляется возможность детектировать отдельные пики) при разных концентрациях активатора, в качестве которого использовался АДФ [43]. Вклад IP_3 -рецепторов 3 типа исследовался на разных клетках (Hela, COS-7), обладающих различным уровнем экспрессии данного белка. Опираясь на полученные данные, можно предположить, что данный канал выполняет анти-осцилляторную функцию [43]. Влияние разных подтипов IP_3 -рецепторов исследовалось и на клетках линии CHO [31]. В присутствии всех трех типов каналов в большинстве клеток (более 80%) возникают устойчивые кальциевые осцилляции в ответ на АДФ, выход на плато или кратковременный кальциевый пик наблюдаются довольно редко (менее 10%). При «выключении» канала 3 типа возрастает доля клеток, в которых уровень кальция, напротив, выходит на плато (более 25%) или осциллирует (68%). К сожалению, данная работа не позволяет однозначно судить о роли рецептора 3 типа в кальциевой сигнализации, поскольку начальный уровень экспрессии рецепторов в клетке изначально достаточно сильно отличался, а концентрация активатора не варьировалась [31]. Тем не менее, стоит отметить, что при нокауте именно рецепторов 3 типа доля клеток, отвечающих на АДФ посредством осцилляций кальция была наибольшей по сравнению с нокаутами других типов рецепторов [31]. Данное наблюдение может говорить о том, что при заданных условиях (концентрация АДФ, уровень производимого IP_3 , общее количество рецепторов) каналы 3 типа вносят наименьший вклад в возникновение и поддержание колебаний в системе. При анализе влияния рецептора в том или ином типе клеток не стоит забывать про видовую специфичность и возможные отличия в механизмах работы белков у представителей разных видов.

Отсутствие осцилляций в системе с разработанной моделью рецептора 3 типа может быть вызвано тем, что Са-зависимое ингибирование рецептора происходит при очень высоких концентрациях кальция в цитозоле (10-1000 мкМ). Кроме того, открытие рецептора требует очень малых концентраций активатора. Можно предположить, что при физиологических значениях IP_3 (10 нМ-1.8 мкМ) [44] рецептор 3 типа всегда находится в открытом состоянии и позволяет поддерживать постоянную концентрацию цитозольного кальция в покоем состоянии клетки. В целом, результаты настоящей работы соответствуют предположению, что IP_3R3 «настроены» для переноса кальция в митохондрии

в местах контактов ЭПР-митохондрия, где могут наблюдаться очень высокие концентрации кальция и нет необходимости в осцилляторном режиме.

Следует отметить, что в построенной модели присутствует ряд ограничений. Так, здесь не учитывается зависимость активности рецептора от уровня АТФ [21,45]. Данный фактор может не сильно повлиять на моделирование кальциевой сигнализации клеток с участием IP_3 -рецептора 3 типа, поскольку в них зачастую не рассматривается изменение концентрации АТФ. Тем не менее, отсутствие зависимости от данного параметра ограничивает возможности использования экспериментальных данных для валидации модели, если они получены при сильно отличающихся условиях.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование

Работа поддержана грантом РНФ 23-44-00082.

Список литературы

1. Celsi F, Pizzo P, Brini M, Leo S, Fotino C, Pinton P, и др. Mitochondria, calcium and cell death: A deadly triad in neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta*. май 2009 г.;1787(5):335–44.
2. El-Jouni W, Jang B, Haun S, Machaca K. Calcium signaling differentiation during *Xenopus* oocyte maturation. *Dev Biol*. 15 декабрь 2005 г.;288(2):514–25.
3. Gunter TE, Yule DI, Gunter KK, Eliseev RA, Salter JD. Calcium and mitochondria. *FEBS Lett*. 1 июнь 2004 г.;567(1):96–102.
4. Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B. Calcium and mitochondria in the regulation of cell death. *Biochem Biophys Res Commun*. 24 апрель 2015 г.;460(1):72–81.
5. Scharenberg AM, Humphries LA, Rawlings DJ. Calcium signalling and cell-fate choice in B cells. *Nat Rev Immunol*. октябрь 2007 г.;7(10):778–89.
6. Woll KA, Van Petegem F. Calcium-release channels: structure and function of IP_3 receptors and ryanodine receptors. *Physiol Rev*. январь 2022 г.;102(1):209–68.
7. Gong D, Yan N, Ledford HA. Structural Basis for the Modulation of Ryanodine Receptors. *Trends Biochem Sci*. 1 июнь 2021 г.;46(6):489–501.
8. Aguayo-Ortiz R, Espinoza-Fonseca LM. Linking Biochemical and Structural States of SERCA: Achievements, Challenges, and New Opportunities. *Int J Mol Sci*. январь 2020 г.;21(11):4146.
9. Boczek T, Sobolczyk M, Mackiewicz J, Lisek M, Ferenc B, Guo F, и др. Crosstalk among Calcium

- ATPases: PMCA, SERCA and SPCA in Mental Diseases. *Int J Mol Sci*. январь 2021 г.;22(6):2785.
10. Bruce JIE. Metabolic regulation of the PMCA: Role in cell death and survival. *Cell Calcium*. 1 январь 2018 г.;69:28–36.
 11. Шахиджанов СС, Балабин ФА, Обыденный СИ, Атауллаханов ФИ, Свешникова АН. Кальциевые осцилляции в тромбоцитах крови и их возможная роль в «интерпретации» клеткой информации из внешнего мира. *Успехи Физических Наук*. 1 июль 2019 г.;189(7):703–19.
 12. Paknejad N, Hite RK. Structural basis for the regulation of inositol trisphosphate receptors by Ca^{2+} and IP_3 . *Nat Struct Mol Biol*. 2018 г.;25(8):660–8.
 13. Boulware MJ, Marchant JS. IP_3 Receptor Activity Is Differentially Regulated in Endoplasmic Reticulum Subdomains during Oocyte Maturation. *Curr Biol*. 26 апрель 2005 г.;15(8):765–70.
 14. Bezprozvanny L, Watras J, Ehrlich BE. Bell-shaped calcium-response curves of $Ins(1,4,5)P_3$ - and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum. *Nature*. июнь 1991 г.;351(6329):751–4.
 15. Kania E, Roest G, Vervliet T, Parys JB, Bultynck G. IP_3 Receptor-Mediated Calcium Signaling and Its Role in Autophagy in Cancer. *Front Oncol*. 5 июль 2017 г.;7:140.
 16. Schmitz EA, Takahashi H, Karakas E. Structural basis for activation and gating of IP_3 receptors. *Nat Commun*. 17 март 2022 г.;13(1):1408.
 17. Yamazaki H, Mikoshiba K. Structure of IP_3 Receptor. В: Lajtha A, Mikoshiba K, редакторы. *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology: Neural Signaling Mechanisms*. Boston, MA: Springer US; 2009. с. 441–61.
 18. Shuai J, Rose HJ, Parker I. The Number and Spatial Distribution of IP_3 Receptors Underlying Calcium Puffs in *Xenopus* Oocytes. *Biophys J*. 1 декабрь 2006 г.;91(11):4033–44.
 19. Lock JT, Alzayady KJ, Yule DI, Parker I. All three IP_3 receptor isoforms generate Ca^{2+} puffs that display similar characteristics. *Sci Signal*. 18 декабрь 2018 г.;11(561):eaau0344.
 20. De Young GW, Keizer J. A single-pool inositol 1,4,5-trisphosphate-receptor-based model for agonist-stimulated oscillations in Ca^{2+} concentration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 15 октябрь 1992 г.;89(20):9895–9.
 21. Mak DOD, McBride S, Foskett JK. Atp Regulation of Recombinant Type 3 Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Gating. *J Gen Physiol*. 30 апрель 2001 г.;117(5):447–56.
 22. Mak DO, McBride S, Foskett JK. Regulation by Ca^{2+} and inositol 1,4,5-trisphosphate ($InsP_3$) of single recombinant type 3 $InsP_3$ receptor channels. Ca^{2+} activation uniquely distinguishes types 1 and 3 $insp_3$ receptors. *J Gen Physiol*. май 2001 г.;117(5):435–46.
 23. Sneyd J, Dufour JF. A dynamic model of the type-2 inositol trisphosphate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 г.;99(4):2398–403.
 24. Sneyd J, Falcke M. Models of the inositol

- triphosphate receptor. *Prog Biophys Mol Biol.* ноябрь 2005 г.;89(3):207–45.
25. Gin E, Falcke M, Wagner LE, Yule DI, Sneyd J. Markov chain Monte Carlo fitting of single-channel data from inositol triphosphate receptors. *J Theor Biol.* 7 апрель 2009 г.;257(3):460–74.
 26. Sveshnikova AN, Ataullakhanov FI, Panteleev MA. Compartmentalized calcium signaling triggers subpopulation formation upon platelet activation through PAR1. *Mol Biosyst.* 17 март 2015 г.;11(4):1052–60.
 27. Korobkin J, Balabin FA, Yakovenko SA, Simonenko EY, Sveshnikova AN. Occurrence of Calcium Oscillations in Human Spermatozoa Is Based on Spatial Signaling Enzymes Distribution. *Int J Mol Sci.* январь 2021 г.;22(15):8018.
 28. Martyanov AA, Balabin FA, Dunster JL, Panteleev MA, Gibbins JM, Sveshnikova AN. Control of Platelet CLEC-2-Mediated Activation by Receptor Clustering and Tyrosine Kinase Signaling. *Biophys J.* 2 июнь 2020 г.;118(11):2641–55.
 29. Shakhidzhanov SS, Shaturny VI, Panteleev MA, Sveshnikova AN. Modulation and pre-amplification of PAR1 signaling by ADP acting via the P2Y12 receptor during platelet subpopulation formation. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj.* 1 декабрь 2015 г.;1850(12):2518–29.
 30. Tubbs E, Rieusset J. Metabolic signaling functions of ER–mitochondria contact sites: role in metabolic diseases. *J Mol Endocrinol.* 1 февраль 2017 г.;58(2):R87–106.
 31. Mendes CCP, Gomes DA, Thompson M, Souto NC, Goes TS, Goes AM, и др. The Type III Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Preferentially Transmits Apoptotic Ca²⁺ Signals into Mitochondria *. *J Biol Chem.* 9 декабрь 2005 г.;280(49):40892–900.
 32. Bartok A, Weaver D, Golenár T, Nichtova Z, Katona M, Bánsághi S, и др. IP3 receptor isoforms differently regulate ER-mitochondrial contacts and local calcium transfer. *Nat Commun.* 19 август 2019 г.;10(1):3726.
 33. Iwai M, Michikawa T, Bosanac I, Ikura M, Mikoshiba K. Molecular basis of the isoform-specific ligand-binding affinity of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *J Biol Chem.* 27 апрель 2007 г.;282(17):12755–64.
 34. Iwai M, Tateishi Y, Hattori M, Mizutani A, Nakamura T, Futatsugi A, и др. Molecular cloning of mouse type 2 and type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and identification of a novel type 2 receptor splice variant. *J Biol Chem.* 18 март 2005 г.;280(11):10305–17.
 35. Petzold L, Hindmarsh A. LSODA (Livermore solver of ordinary differential equations). *Comput Math Res Div Lawrence Livermore Natl Lab Livermore CA.* 1997 г.;24.
 36. Bergmann FT, Hoops S, Klahn B, Kummer U, Mendes P, Pahle J, и др. COPASI and its Applications in Biotechnology. *J Biotechnol.* 10 ноябрь 2017 г.;261:215–20.
 37. Marino S, Hogue IB, Ray CJ, Kirschner DE. A methodology for performing global uncertainty and sensitivity analysis in systems biology. *J Theor Biol.* 7 сентябрь 2008 г.;254(1):178–96.
 38. Saltelli A, Ratto M, Tarantola S, Campolongo F. Sensitivity Analysis for Chemical Models. *Chem Rev.* 1 июль 2005 г.;105(7):2811–28.
 39. Turányi T. Sensitivity analysis of complex kinetic systems. Tools and applications. *J Math Chem.* 1 сентябрь 1990 г.;5(3):203–48.
 40. Moles CG, Mendes P, Banga JR. Parameter Estimation in Biochemical Pathways: A Comparison of Global Optimization Methods. *Genome Res.* 11 январь 2003 г.;13(11):2467–74.
 41. Hoops S, Sahle S, Gauges R, Lee C, Pahle J, Simus N, и др. COPASI—a COmplex PATHway Simulator. *Bioinformatics.* 15 декабрь 2006 г.;22(24):3067–74.
 42. Sneyd J, Keizer J, Sanderson MJ. Mechanisms of calcium oscillations and waves: a quantitative analysis. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* ноябрь 1995 г.;9(14):1463–72.
 43. Hattori M, Suzuki AZ, Higo T, Miyauchi H, Michikawa T, Nakamura T, и др. Distinct roles of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor types 1 and 3 in Ca²⁺ signaling. *J Biol Chem.* 19 март 2004 г.;279(12):11967–75.
 44. Luzzi V, Sims CE, Souhayer JS, Allbritton NL. The physiologic concentration of inositol 1,4,5-trisphosphate in the oocytes of *Xenopus laevis*. *J Biol Chem.* 30 октябрь 1998 г.;273(44):28657–62.
 45. Hagar RE, Ehrlich BE. Regulation of the Type III InsP3 Receptor by InsP3 and ATP. *Biophys J.* 1 июль 2000 г.;79(1):271–8.

Преимущество применения лактадгерина для оценки экспонирования фосфатидилсерина в тромбоцитах

С.И. Обыденный^{1,2#}

1. Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН
2. Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева

Автор для переписки: obydennyj@physics.msu.ru

Получено: 04.05.2023
EDN: MISCQA

Принято к публикации: 13.05.2023

Опубликовано: 30.06.2023

Аннотация

В данном сообщении проводится сравнение 2 зондов для определения экспонированного фосфатидилсерина – аннексина V и лактадгерина. На примере тромбоцитов показано, что лактадгерин является более перспективным за счет большей чувствительности, и его применение, особенно в микроскопии, имеет преимущество в исследовании взаимосвязей сигнальных процессов при образовании прокоагулянтной субпопуляции тромбоцитов.

Ключевые слова: Тромбоцит, Фосфатидилсерин, Лактадгерин, Аннексин V

Введение

Тромбоциты – безъядерные клетки, циркулирующие в крови в неактивном состоянии. Их главная функция – формирование тромбов в месте повреждения сосудов. При стимуляции тромбоциты переходят в активированное состояние и разделяются на две субпопуляции, отличающиеся по морфологии, белковым покровам и функциям [1, 2]:

1) проагрегатные тромбоциты – клетки с активированными интегринами $\alpha IIb\beta 3$, за счет которых тромбоциты способны агрегировать друг с другом. Охарактеризованы физиологически низким уровнем внутриклеточного кальция, не обладают свойством ускорять процессы свёртывания (прокоагулянтной активностью);

2) прокоагулянтные тромбоциты – обладают покровом из альфа-гранулярных белков, таких как фактор XIIIa, фактор V, фибриноген, тканевая трансглутаминаза [3, 4] и др. и имеют свойство ускорять реакции свертывания крови посредством экспонированных наружу отрицательно заряженных фосфолипидов [5]. По современному представлению эта субпопуляция состоит из погибших клеток, у них деградирован цитоскелет, нарушена целостность мембраны,

митохондрии не функционируют, концентрация внутриклеточного кальция высокая [6].

Соотношение субпопуляций тромбоцитов при активации зависит от концентрации активаторов и исходного состояния тромбоцитов. Ранее было показано, что клетки с большим начальным уровнем кальция и меньшим числом митохондрий имеют повышенную склонность к переходу в прокоагулянтное состояние [6, 7].

Сердечно-сосудистые заболевания являются самой распространенной причиной смертности в мире. Роль прокоагулянтной субпопуляции тромбоцитов в процессе тромбообразования и развитии различных патологических ситуаций до сих пор точно не определена, хотя и существуют различные гипотезы [8]. В последнее десятилетие Prodan C. и Dale G. активно ведут исследования связей прокоагулянтной субпопуляции с сердечно-сосудистыми заболеваниями и их последствиями. Таким образом, понимание механизмов формирования субпопуляций является важной физиологической задачей.

Одним из удобных и широко применяемых способов определения погибших клеток являются маркеры на фосфатидилсерин, такие как Аннексин V и лактадгерин. Они детектируют фосфатидилсерин, расположенный на внешней мембране клетки. Фосфатидилсерин является основным отрицательно-заряженным фосфолипидом, входящим в состав клеточных мембран, и его содержание в мембране достигает 10%. В живой клетке такие фосфолипиды находятся на цитоплазматической поверхности мембраны (повернутой внутрь клетки), и в случае гибели клетки, за счет остановки работы флиппаз/флиппаз и активации кальций-зависимых скрамблаз, распределение фосфолипидов на мембране выравнивается. Аннексин V начали применять раньше, чем лактадгерин, и за счет этого он использовался в большинстве работ по изучению сигнальных процессов, происходящих при разделении тромбоцитов на субпопуляции

как при помощи цитометрии, так и микроскопии. С появлением лактадгерина, было показано, что он обладает большей чувствительностью, чем аннексин V [9], в данной работе было исследовано это преимущество при помощи микроскопии.

Материалы и Методы

Тромбоциты были выделены из цельной крови при помощи центрифугирования, затем осаждались 20 минут на подготовленные покровные стекла с нанесенным на них фибриногеном в отсутствии/присутствии 200 нМ тетраметилпродамина для определения потенциала митохондриальной мембраны, далее отмывались от краски, и после инкубировались с флуоресцентно-меченным лактадгерином-ФИТЦ и/или аннексином V-Алекса 647 в течение 30 минут. В конце проводилась съемка флуоресцентных зондов при помощи конфокального микроскопа. Подробно методы описаны в статье [7].

Результаты и Обсуждение

В результате экспериментов с совместным применением лактадгерина и аннексина V было установлено, что тромбоциты после инкубации на подложке могут быть положительными или отрицательными по обоим маркерам, или положительными по лактадгерину и отрицательными по аннексину V, но не наоборот (рис. 1А). Во-первых, это подтверждает более высокую чувствительность лактадгерина, что согласуется с ранее опубликованными цитометрическими работами, использовавшими лактадгерин [9]. Во-вторых, особый интерес представляет состояние тромбоцита, показанное при помощи эксперимента с оценкой работоспособности митохондрий на рисунке 1Б - с наличием митохондриального потенциала и положительной окраской по лактадгерину.

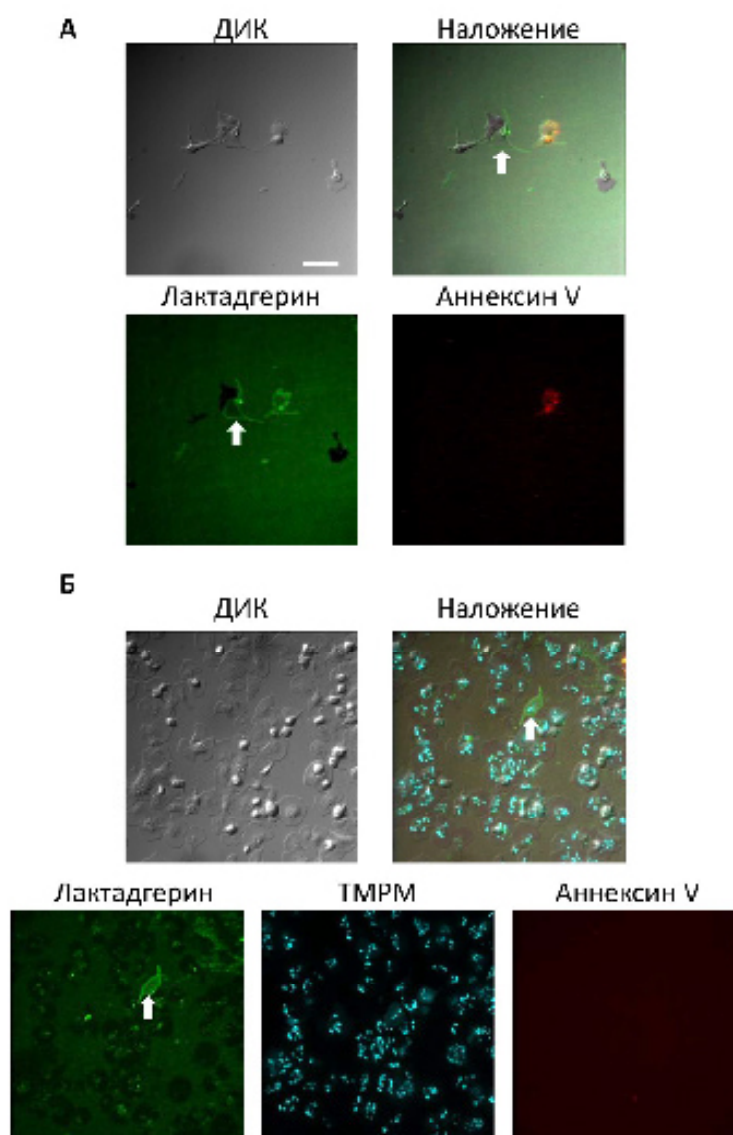


Рисунок 1. Иллюстрация тромбоцитов, положительных по лактадгерину, но отрицательных по аннексину V (отмечены стрелками). (А) сравнение с аннексин V положительным тромбоцитом, (Б) тромбоцит с функционирующими митохондриями (TMPM+) и связыванием с лактадгерином (помечен стрелкой). ДИК – дифференциально-интерференционный контраст. Длина масштабного отрезка 10 мкм.

Ранее мы проводили исследования по параллельному измерению внутриклеточного кальция, изменению потенциала митохондриальной мембраны и выхода фосфатидилсерина при помощи аннексина V, но сходное состояние никогда не наблюдали (аннексин V+ и TMPM+), все наблюдаемые клетки были либо аннексин V+/TMPM-, либо аннексин V-/TMPM- [6, 7]. Наблюдаемое на рисунке 1Б состояние тромбоцита не могло быть обнаружено при помощи аннексина V.

С учётом этих новых данных, можно описать 3 состояния выхода фосфатидилсерина:

1) совсем нет на поверхности (аннексина V-/лактадгерин-);

2) очень маленький выход на поверхность с сохранением жизнеспособности клетки (аннексин V-/лактадгерин+);

3) максимальный выход фосфатидилсерина (аннексин V+/лактадгерин+), связанный с клеточной смертью и переходом в прокоагулянтную субпопуляцию в её классическом на данный момент представлении.

Эти результаты поднимают новые вопросы для будущих исследований физиологии тромбоцитов, например, есть ли тромбоциты с низким выходом фосфатидилсерина в тромбе и каков их вклад в процессы свертывания по сравнению с прокоагулянтной субпопуляцией. Кроме того, в данной работе мы не исследовали активацию тромбоцитов агонистами. Ответы на эти и многие другие вопросы еще предстоит получить.

Вклад авторов

СИО: проведение экспериментов, анализ данных, написание статьи.

Конфликт интересов

Конфликт интересов отсутствует.

Финансирование

Исследование было поддержано грантом Российского научного фонда (РНФ) № 21-75-00109 и грантом МК-4997.2022.1.4.

Список литературы

1. Dale G. Coated-platelets: an emerging component of the procoagulant response. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2005;3(10):2185-92.
2. Heemskerk J, Mattheij N, Cosemans J. Platelet-based coagulation: different populations, different functions. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2013;11(1):2-16.

3. Abaeva AA, Canault M, Kotova YN, Obydennyi SI, Yakimenko AO, Podoplelova NA, et al. Procoagulant platelets form an α -granule protein-covered "cap" on their surface that promotes their attachment to aggregates. *Journal of Biological Chemistry*. 2013;288(41):29621-32.
4. Kotova YN, Podoplelova NA, Obydennyi SI, Kostanova EA, Ryabykh AA, Demyanova AS, et al. Binding of coagulation factor XIII zymogen to activated platelet subpopulations: roles of integrin α IIb β 3 and fibrinogen. *Thrombosis and Haemostasis*. 2019;119(06):906-15.
5. Rosing J, Tans G, Govers-Riemslog JW, Zwaal R, Hemker HC. The role of phospholipids and factor Va in the prothrombinase complex. *Journal of Biological Chemistry*. 1980;255(1):274-83.
6. Obydennyi SI, Sveshnikova AN, Ataullakhanov FI, Panteleev MA. Dynamics of calcium spiking, mitochondrial collapse and phosphatidylserine exposure in platelet subpopulations during activation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2016;14(9):1867-81.
7. Obydennyi SI, Artemenko EO, Sveshnikova AN, Ignatova AA, Varlamova TV, Gambaryan S, et al. Mechanisms of increased mitochondria-dependent necrosis in Wiskott-Aldrich syndrome platelets. *Haematologica*. 2020;105(4):1095-106.
8. 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(1):37-47.
9. Albanyan AM, Murphy MF, Rasmussen JT, Heegaard CW, Harrison P. Measurement of phosphatidylserine exposure during storage of platelet concentrates using the novel probe lactadherin: a comparison study with annexin V. *Transfusion*. 2009;49(1):99-107.

Оценка функциональной активности нейтрофилов с применением красителей феноксазинового ряда

Реут В.Е.^{1#}, Григорьева Д.В.¹, Соколов А.В.², Панасенко А.М.³, Горудко И.В.¹

1. Белорусский государственный университет, пр. Независимости 4, Минск, Беларусь, 220030
2. ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», ул. Академика Павлова, д. 12, Санкт-Петербург, Россия, 197022
3. ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России, ул. Малая Пироговская, д. 1а, Москва, Россия, 119435

Автор для переписки: ReutVE@bsu.by

Получено: 14.06.2023
EDN: PDEYIW

Принято к публикации: 26.06.2023

Опубликовано: 30.06.2023

Аннотация

Нейтрофилы – основные лейкоциты крови, осуществляющие для защиты организма от патогенов фагоцитоз, образование нейтрофильных внеклеточных ловушек, дегрануляцию, а также генерацию активных форм кислорода (АФК), азота (АФА) и галогенов (АФГ). Хлорноватистая кислота (НОСІ) образуется в биологических системах в присутствии пероксида водорода и хлорид-аниона в каталитическом цикле преимущественно фермента азурофильных гранул нейтрофилов – миелопероксидазы (МПО). НОСІ играет важную роль в физиологических и патологических процессах, однако регистрация этого высокореакционного соединения затруднена в том числе из-за наличия многочисленных других АФК, АФА и АФГ, генерируемых клетками. В данной работе предложен комплексный подход исследования продукции АФК и АФГ нейтрофилами флуоресцентным методом с использованием феноксазиновых красителей целестинового синего В (СВ) и галлоцианина (GC). Показано, что использование GC и СВ позволяет оценить функциональный ответ нейтрофилов на стимулы различной природы (форболовый эфир РМА, компонент клеточной стенки бактерий fMLP, лектины растений).

Ключевые слова: Активные формы кислорода, Активные формы галогенов, Флуоресцентные зонды, Феноксазиновые красители

Введение

Нейтрофилы используют широкий спектр возможностей для элиминации патогенов: фагоцитоз, образование нейтрофильных внеклеточных ловушек, дегрануляцию, а также генерацию активных форм кислорода (АФК), азота (АФА) и галогенов (АФГ) [1]. Образование этих высокореакционных соединений начинается со сборки НАДФН-

оксидазного комплекса в плазматической или фагосомальной мембране нейтрофилов, что ведет к продукции супероксидного анион-радикала ($O_2^{\bullet-}$) [2]. $O_2^{\bullet-}$ – короткоживущий радикал, который самопроизвольно и/или при участии супероксиддисмутазы (СОД) дисмутирует до пероксида водорода (H_2O_2) [3]. H_2O_2 затем используется ферментом азурофильных гранул нейтрофилов – миелопероксидазой (МПО) для образования хлорноватистой (НОСІ), бромноватистой (НОBr) и других высокореакционных гипогалоидных кислот [4]. Причем при физиологических концентрациях хлорид-аниона, НОСІ является основным продуктом цикла галогенирования МПО [5].

НОСІ реагирует с широким спектром биологических мишеней, включая белки, липиды, ДНК/РНК, углеводы, приводя к их деструкции или модификации [6]. При этом повышение концентрации/активности МПО, а также маркеров хлорирования (3-хлортирозин, 5-хлорурацил, α -хлоральдегиды, хлорированные белки и др.) отмечено при развитии окислительного/галогенирующего стресса. Такое состояние сопутствует воспалительному процессу при инфаркте миокарда, атеросклерозе, ревматоидном артрите, почечной недостаточности, муковисцидозе, сепсисе, раке, астме, болезни Альцгеймера и др. [7–9].

Ввиду исключительной роли НОСІ как в защите организма от патогенов, так и в развитии заболеваний, исследование пространственной локализации НОСІ и галогенированных продуктов, определение ее концентрации в местах воспаления, а также регуляция каталитической активности МПО являются как фундаментальными, так и прикладными задачами, решение которых направлено на контроль за течением заболеваний, ассоциированных с воспалением, а также скрининг возможных лекарственных препаратов для лечения пациентов с вышеупомянутыми патологиями.

HOCl является высокореакционным соединением и быстро взаимодействует с различными биологическими мишенями (константы скоростей реакций HOCl с некоторыми низкомолекулярными соединениями и функциональными группами биополимеров превышает $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) [10,11]. При активации нейтрофилов следует учитывать и образование многочисленных других АФК, АФГ и АФА, что в совокупности затрудняет детектирование HOCl. На преодоление этих трудностей нацелено множество исследований, в которых для регистрации HOCl используются преимущественно флуоресцентные зонды [12–14]. Несмотря на то, что в последние годы синтезирован ряд зондов для регистрации HOCl и других АФК, АФА и АФГ, многие из них не лишены недостатков: обладают низкой стабильностью, подвержены фотообесцвечиванию, неэффективны вблизи физиологических значений pH [15].

В виду своих уникальных физико-химических свойств феноксазины нашли применение во многих сферах: в материаловедении, органических светодиодах, фотоокислительно-восстановительных катализаторах, солнечных элементах, сенсibilизированных красителях и др. Помимо этого, данный класс соединений обладает хорошей биосовместимостью [16–19]. Ранее нами было показано, что галлоцианин (GC) может использоваться в качестве флуоресцентного зонда для регистрации образования $\text{O}_2^{\bullet-}$ [20], а целестиновый синий В (CB) – для регистрации образования АФГ [21]. В данной работе была исследована возможность использования обоих красителей в качестве альтернативы менее избирательным флуоресцентным зондам – скополетину (SP) и аминифенил флуоресцеину (APF) для регистрации АФК и АФГ нейтрофилами.

Материалы и Методы

В работе использовали следующие реактивы: цитрат натрия, N-формил-метионил-лейцил-фенилаланин (fMLP), цитохалазин В (cyt В), гипохлорит натрия (NaOCl), таурин (Tau), форбол 12-миристенат 13-ацетат (PMA), SP, GC, CB, APF и гистопак (1,077 г/мл) – фирмы «Sigma-Aldrich» (США); декстран Т70 – фирмы «Roth» (Германия); пероксидаза хрена и азид натрия – фирмы «Nyscomed» (Норвегия); лектины растений – фирмы «Лектинотест» (Львов, Украина). Остальные реактивы от заводов «Реахим» (Россия) и «Белмедпрепараты» (Беларусь).

Нейтрофилы выделяли из донорской крови, стабилизированной 109 мМ раствором цитрата

натрия (9:1, v/v), путем центрифугирования при 450 g с использованием декстрана Т70 и гистопак с плотностью 1,077 г/мл как описано в [22]. Исследования проводились в соответствии с Хельсинской Декларацией и одобрены этическим комитетом ГУ «РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий» (решение №1 от 10.04.2022 г., г. Минск, Беларусь).

Продукцию АФК и АФГ в клеточной суспензии оценивали флуоресцентным методом с использованием соответствующих зондов. Продукцию H_2O_2 оценивали флуоресцентным методом с использованием SP в качестве субстрата пероксидазной реакции ($\lambda_{\text{ex}}=350 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{em}}=460 \text{ нм}$) [23]. При проведении измерений к 1 мл фосфатно-солевого буфера (ФСБ: 10 мМ $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, 137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl (pH 7,35)), содержащему 1 мМ CaCl_2 и 0,5 мМ MgCl_2 , добавляли 50 мкл смеси, содержащей водные растворы SP (0,2 мМ), пероксидазы хрена (2 г/л) и азид натрия (0,1 М) в пропорции 1:2:2. Затем вносили клетки (1×10^6 кл/мл), а после 2 мин инкубации при 37 °С и постоянном перемешивании – активаторы.

Образование HOCl и ее производных в суспензии нейтрофилов регистрировали флуоресцентным методом с применением CB ($\lambda_{\text{ex}}=460 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{em}}=590 \text{ нм}$) или APF ($\lambda_{\text{ex}}=490 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{em}}=520 \text{ нм}$) как было описано ранее [21]. К 1 мл ФСБ, содержащему 1 мМ CaCl_2 и 0,5 мМ MgCl_2 (для СВ-теста ФСБ также содержал 20 мМ таурин), добавляли нейтрофилы (1×10^6 кл/мл), 20 мкМ СВ или 2 мкМ APF, при необходимости – cyt В (5 мг/л), инкубировали 2–3 мин при 37 °С и постоянном перемешивании, а затем добавляли активатор.

Продукцию $\text{O}_2^{\bullet-}$ в суспензии нейтрофилов оценивали флуоресцентным методом с использованием GC ($\lambda_{\text{ex}}=360 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{em}}=480 \text{ нм}$) как было описано ранее [24]. К 1 мл ФСБ, содержащему 1 мМ CaCl_2 и 0,5 мМ MgCl_2 , добавляли нейтрофилы (1×10^6 кл/мл), 5 мкМ GC, инкубировали 2–3 мин при 37 °С и постоянном перемешивании, а затем добавляли активатор.

Регистрацию изменения интенсивности флуоресценции проводили в кинетическом режиме (периодичность – 1 с) на спектрофлуориметре Solar CM 2203 (Минск, Беларусь) при 37 °С и непрерывном перемешивании.

В качестве параметра, характеризующего продукцию АФК или АФГ в суспензии нейтрофилов, использовали скорость изменения интенсивности флуоресценции соответствующих зондов, которую рассчитывали как тангенс угла наклона линейного участка кинетической кривой изменения интенсивности флуоресценции.

Внутриклеточную продукцию АФГ нейтрофилами исследовали методом проточной

цитометрии. Для этого нейтрофилы (1×10^6 кл/мл) в ФСБ, содержащем 1 mM CaCl_2 и 0,5 mM MgCl_2 , инкубировали с СВ (20 мкМ) или APF (2 мкМ) в течение 15 мин при комнатной температуре в темноте, после чего клетки инкубировали с активаторами в течение 15 мин при 37 °С. Далее клеточная суспензия разводилась в 4 раза ФСБ и анализировалась на проточном цитометре CytoFLEX (Beckman Coulter, США). Область, содержащую нейтрофилы, выбирали по соотношению прямого и бокового светорассеяния. Для возбуждения флуоресценции СВ и APF использовали лазер с длиной волны 488 нм, для регистрации – фильтр 525 ± 40 нм (FITC канал). В каждом образце анализировалось не менее 10000 нейтрофилов. В выбранной популяции нейтрофилов анализировали процент клеток, в которых интенсивность флуоресценции зондов составляла выше 10^3 отн. ед., а также медиану интенсивности флуоресценции красителей в субпопуляции СВ/APF-положительных нейтрофилов. Результаты экспериментов обработаны с использованием программного обеспечения CytExpert 2.4.

В качестве активаторов нейтрофилов использовали различные стимуляторы: хемотаксический пептид fMLP (100 нМ), форболовый эфир PMA (100 нМ), а также растительные лектины с различной углеводной специфичностью: WGA (*Triticum vulgaris* агглютинин), специфичный к остаткам GlcNAc

и NeuNAc, и маннозо-специфичный Con A (*Canavalia ensiformis* агглютинин) (50 мг/л).

Статистическая обработка данных выполнена в пакете программ OriginPro 2016. Данные на рисунках представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение среднего. Статистические различия между выборками рассчитывали по парному критерию Стьюдента. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и Обсуждение

Регистрация продукции АФК и АФГ в суспензии нейтрофилов

На рисунке 1 приведены данные о влиянии агонистов различной природы (fMLP, PMA, Con A и WGA) на скорость продукции H_2O_2 (тест со SP), $\text{O}_2^{\bullet-}$ (тест с GC), HOCl и ее производных (APF и СВ) нейтрофилами. Из рисунка 1 (б,г) видно, что все используемые стимулы вызывали увеличение продукции АФК по сравнению с контролем (тест с GC и SP). Интересно отметить, что скорость изменения интенсивности флуоресценции при регистрации АФК (при использовании GC и SP) различна у разных активаторов. Используемые стимулы по выраженности флуоресцентного ответа можно расположить в последовательности: $\text{PMA} > \text{fMLP} > \text{WGA} \approx \text{Con A}$. Данный факт является дополнительным косвенным подтверждением того, что GC в клеточной суспензии является зондом, взаимодействующим в первую очередь

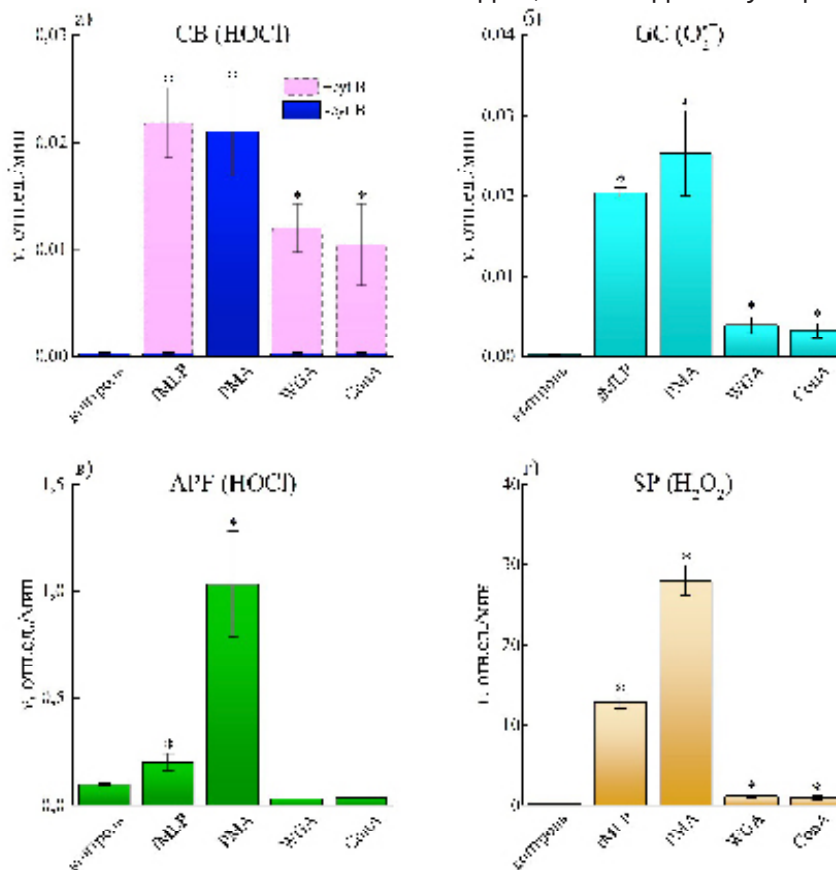


Рисунок 1. Скорость изменения интенсивности флуоресценции зондов в суспензии активированных нейтрофилов.

* $p < 0,05$ относительно контроля

с $O_2^{\bullet-}$, который затем, дисмутируя, превращается в H_2O_2 , используемый пероксидазой хрена в SP-тесте.

Лектины растений не вызывали увеличение продукции АФГ нейтрофилами, регистрируемой при помощи СВ и APF (рисунок 1 (а,в)). Известно, что для экзоцитоза содержимого азурофильных гранул и, следовательно, продукции АФГ нейтрофилами, при активации этих клеток по рецептор-зависимому механизму (лектинами растений, fMLP), необходима предварительная инкубация клеток с сывороткой В, который препятствует полимеризации фибриллярного актина цитоскелета [25]. PMA, являясь липофильным соединением, легко проникает в клетки и инициирует респираторный взрыв и дегрануляцию нейтрофилов [26] и без помощи сыворотки В. Из рисунка 1 (а) видно, что в присутствии сыворотки В наблюдалась продукция АФГ нейтрофилами, активированными fMLP, WGA и Con A (тест с СВ). Интересно отметить, что отличительной особенностью APF

является наличие флуоресцентного сигнала при активации нейтрофилов fMLP в отсутствие сыворотки В (рисунок 1(в)). Данный эффект может быть связан с внутриклеточной продукцией HOCl или вкладом гидроксильного радикала или пероксинитрита, которые также могут влиять на изменение интенсивности флуоресценции APF [27].

Таким образом, на основании полученных данных можно заключить, что GC и СВ могут применяться в качестве альтернативы известным зондам SP и APF для регистрации образования АФК/АФГ нейтрофилами. Стоит отметить, что данный подход имеет несколько важных преимуществ. Во-первых, GC и СВ являются зондами типа «включения» и не требуют присутствия дополнительных компонентов, например, пероксидазы хрена, для реакции с АФК/АФГ. Данное обстоятельство дает преимущество по сравнению со SP. Во-вторых, GC и СВ обладают большей избирательностью по сравнению со SP и APF. В-третьих, способность СВ реагировать

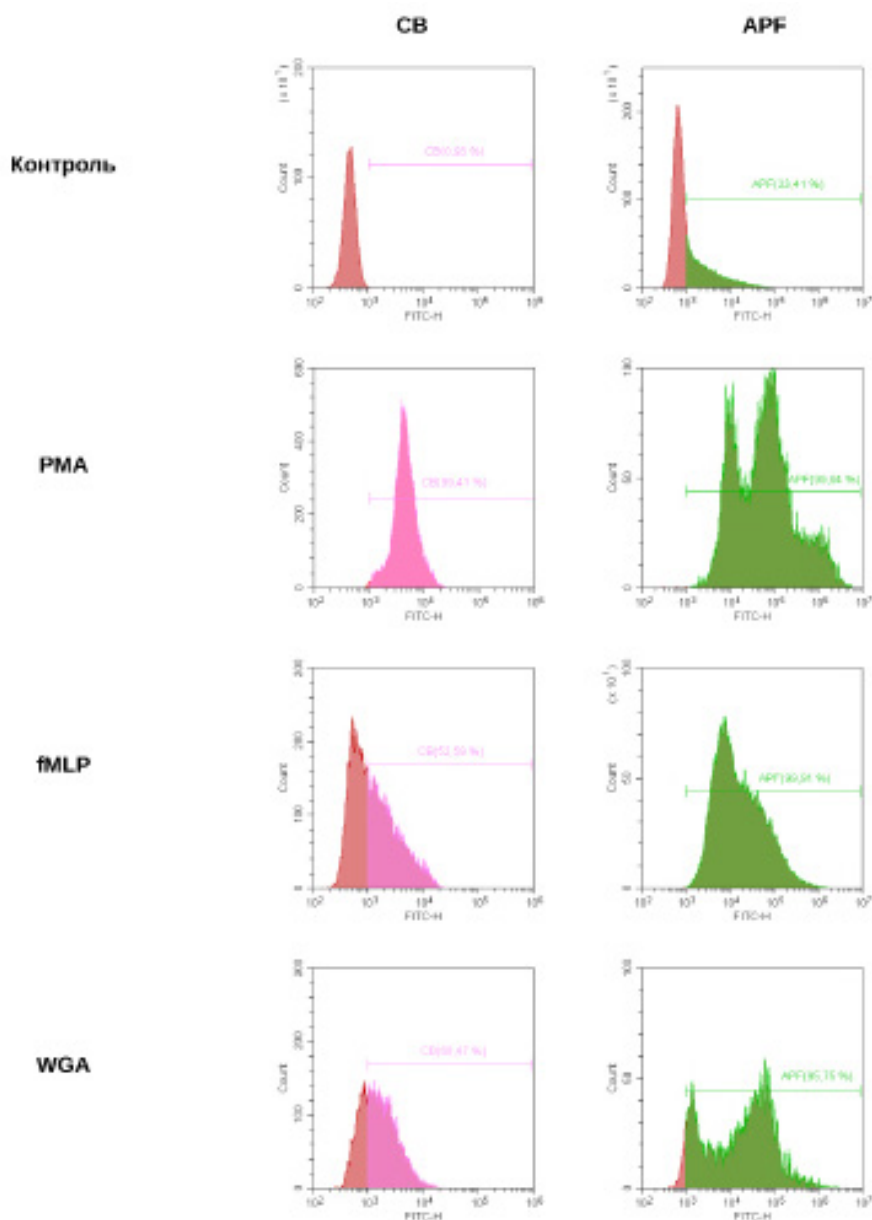


Рисунок 2. Типичные гистограммы распределения интенсивности флуоресценции нейтрофилов при загрузке клеток СВ или APF и активации различными агонистами.

не только с HOCl, но и хлораминами таурина, позволяет избежать «утечки» этой АФГ. Наконец, в-четвертых, стоимость GC и CB значительно ниже стоимости APF.

Регистрация продукции АФГ методом проточной цитометрии

Метод проточной цитометрии — современный, удобный и информативный метод идентификации и количественного определения как экспрессии поверхностных маркеров клеток, так и оценки их функциональной активности [28]. Исследование внутриклеточной продукции АФГ нейтрофилами является важным критерием оценки их функционального состояния, поэтому нами была изучена возможность регистрации внутриклеточной продукции АФГ методом проточной цитометрии с применением СВ, а также сравнение возможности использования для этих целей широко применяемого APF и СВ.

В качестве агонистов, стимулирующих продукцию АФГ нейтрофилами, использовали PMA, fMLP и WGA. Типичные гистограммы распределения нейтрофилов по интенсивности флуоресценции в случае загрузки клеток СВ и APF представлены на рисунке 2. Как видно из рисунка, все исследуемые агонисты вызывали увеличение числа СВ- и APF-положительных событий, а также медианы распределения числа клеток по интенсивности флуоресценции как для СВ, так и для APF (данные не представлены). Таким образом, показано, что СВ может быть использован в качестве альтернативы APF для исследования внутриклеточной продукции АФГ нейтрофилами.

Заключение

Продукция АФК и АФГ нейтрофилами является важным критерием оценки функционального состояния этих клеток, однако поиск коммерчески доступных, чувствительных и избирательных флуоресцентных зондов для решения этой задачи остается по-прежнему актуальным. Данной проблематике в последние годы посвящено множество работ, в том числе по разработке флуоресцентных зондов на основе феноксазинового каркаса [16–18].

В данной работе был предложен комплексный подход с применением флуоресцентных зондов феноксазинового ряда для регистрации образования АФК и АФГ нейтрофилами, активированными агонистами различной природы. Установлено, что GC и СВ могут быть успешно применены для регистрации образования соответственно АФК и АФГ в суспензиях активированных нейтрофилов. Показано, что СВ может быть использован в качестве коммерческого флуоресцентного зонда для регистрации внутриклеточной продукции АФГ

нейтрофилами методом проточной цитометрии.

Вклад авторов

Вклад В.Е.Р. в работу был определяющим (выполнение эксперимента, анализ данных, написание и редактирование текста статьи); Д.В.Г. выполняла эксперименты, анализировала данные и редактировала текст статьи; О.М.П. анализировал данные; вклад А.В.С. и И.В.Г. заключался в постановке задачи исследования и обсуждении результатов.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта БРФФИ (Ф22М-042), а также совместного гранта БРФФИ (Б23РНФ-093) и РНФ (23-45-10026).

Список литературы

1. Ulfig A, Leichert LI. The effects of neutrophil-generated hypochlorous acid and other hypohalous acids on host and pathogens. *Cell Mol Life Sci* 2021;78:385–414. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03591-y>.
2. Nathan C, Cunningham-Bussell A. Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. *Nature Reviews Immunology* 2013;13:349–61. <https://doi.org/10.1038/nri3423>.
3. Rosen H, Klebanoff SJ. Bactericidal activity of a superoxide anion-generating system. A model for the polymorphonuclear leukocyte. *The Journal of Experimental Medicine* 1979;149:27–39. <https://doi.org/10.1084/jem.149.1.27>.
4. San Gabriel P, Liu Y, Schroder A, Zoellner H, Chami B. The role of thiocyanate in modulating myeloperoxidase activity during disease. *IJMS* 2020;21:6450–67. <https://doi.org/10.3390/ijms21176450>.
5. Arnhold J, Malle E. Halogenation activity of mammalian heme peroxidases. *Antioxidants* 2022;11:890–917. <https://doi.org/10.3390/antiox11050890>.
6. Hawkins CL, Davies MJ. Role of myeloperoxidase and oxidant formation in the extracellular environment in inflammation-induced tissue damage. *Free Radical Biology and Medicine* 2021;172:633–51. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.07.007>.
7. Gammasy TMA, Abushady NM, Hamza MT, Shaker R. Increased myeloperoxidase activity as an indicator of neutrophil-induced inflammation and sepsis in neonates. *Egyptian Journal of Pediatric Allergy and Immunology (The)* 2015;13:15–20. <https://doi.org/10.4314/ejpai.v13i1>.
8. Khan A, Alsahli M, Rahmani A. Myeloperoxidase as an active disease biomarker: recent biochemical and pathological perspectives. *Medical Sciences* 2018;6:33–53. <https://doi.org/10.1016/j.msbs.2018.03.001>.

org/10.3390/medsci6020033.

9. Панасенко ОМ, Горудко ИВ, Соколов АВ. Хлорноватистая кислота как предшественник свободных радикалов в живых системах. Успехи Биологической Химии 2013;53:195–244.
10. Zhang L, Wang X, Cueto R, Effi C, Zhang Y, Tan H, et al. Biochemical basis and metabolic interplay of redox regulation. Redox Biology 2019;26:101284:1-16. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101284>.
11. Pattison DI, Davies MJ. Absolute rate constants for the reaction of hypochlorous acid with protein side chains and peptide bonds. Chemical Research in Toxicology 2001;14:1453–64. <https://doi.org/10.1021/tx0155451>.
12. Freitas M, Lima JLFC, Fernandes E. Optical probes for detection and quantification of neutrophils' oxidative burst. A review. Analytica Chimica Acta 2009;649:8–23. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.06.063>.
13. Thomas JA. Optical imaging probes for biomolecules: an introductory perspective. Chem Soc Rev 2015;44:4494–500. <https://doi.org/10.1039/C5CS00070J>.
14. Huang J, Milton A, Arnold RD, Huang H, Smith F, Panizzi JR, et al. Methods for measuring myeloperoxidase activity toward assessing inhibitor efficacy in living systems. Journal of Leukocyte Biology 2016;99:541–8. <https://doi.org/10.1189/jlb.3RU0615-256R>.
15. Реут ВЕ, Горудко ИВ, Григорьева ДВ, Соколов АВ, Панасенко ОМ. Флуоресцентные зонды для обнаружения хлорноватистой кислоты в живых клетках. Биоорганическая Химия 2022;48:415–41. <https://doi.org/10.31857/S0132342322030162>.
16. Yang J, Yao Y, Shen Y, Xu Y, Lv G, Li C. A novel phenoxazine-based fluorescent probe for the detection of HOCl in living cells. Zeitschrift Für Anorganische Und Allgemeine Chemie 2020;646:431–6. <https://doi.org/10.1002/zaac.202000127>.
17. Yang J, Zheng W, Shen Y, Xu Y, Lv G, Li C. A novel near-infrared fluorescent probe based on phenoxazine for the specific detection of HOCl. Journal of Luminescence 2020;226:117460:1-7. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2020.117460>.
18. Zheng W, Yang J, Shen Y, Yao Y, Lv G, Hao S, et al. The near-infrared fluorescent probes based on phenoxazine for the rapid detection of hypochlorous acid. Dyes and Pigments 2020;179:108404:1-7. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2020.108404>.
19. Sadhu C, Mitra AK. Synthetic, biological and optoelectronic properties of phenoxazine and its derivatives: a state of the art review. Mol Divers 2023. <https://doi.org/10.1007/s11030-023-10619-5>.
20. Панасенко ОМ, Реут ВЕ, Бородина ИВ, Матюшкина ДС, Иванов ВА, Григорьева ДВ, et al. Галлоцианин как флуороген для выявления NADPH-зависимой продукции супероксидного анион-радикала клетками крови. Биоорганическая химия 2021;47:153–61. <https://doi.org/10.31857/S0132342321010176>.
21. Reut VE, Kozlov SO, Kudryavtsev IV, Grudinina NA, Kostevich VA, Gorbunov NP, et al. New Application of the Commercially Available Dye Celestine Blue B as a Sensitive and Selective Fluorescent “Turn-On” Probe for Endogenous Detection of HOCl and Reactive Halogenated Species. Antioxidants 2022;11:1719. <https://doi.org/10.3390/antiox11091719>.
22. Grigorieva DV, Gorudko IV, Grudinina NA, Panasencko OM, Semak IV, Sokolov AV, et al. Lactoferrin modified by hypohalous acids: Partial loss in activation of human neutrophils. International Journal of Biological Macromolecules 2022;195:30–40. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.11.165>.
23. Gorudko IV, Mukhortava AV, Caraher B, Ren M, Cherenkevich SN, Kelly GM, et al. Lectin-induced activation of plasma membrane NADPH oxidase in cholesterol-depleted human neutrophils. Archives of Biochemistry and Biophysics 2011;516:173–81. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2011.10.013>.
24. Реут ВЕ, Григорьева ДВ, Горудко ИВ, Соколов АВ, Панасенко ОМ. Применение целестинового синего В и галлоцианина для исследования влияния лекарственных препаратов на продукцию активных форм кислорода и галогенов нейтрофилами. Журнал прикладной спектроскопии 2020;87:637–45.
25. Jog NR, Rane MJ, Lominadze G, Luerman GC, Ward RA, McLeish KR. The actin cytoskeleton regulates exocytosis of all neutrophil granule subsets. American Journal of Physiology-Cell Physiology 2007;292:C1690–700. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00384.2006>.
26. Nagaji J. The Role of Protein Kinase C and [Ca²⁺]_i in Superoxide Anion Synthesis and Myeloperoxidase Degranulation of Human Neutrophils. The Kurume Medical Journal 1999;46:157–62. <https://doi.org/10.2739/ikumemedj.46.157>.
27. Setsukinai K, Urano Y, Kakinuma K, Majima HJ, Nagano T. Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species. Journal of Biological Chemistry 2003;278:3170–5. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209264200>.
28. Трусков ГА, Чапленко АА, Семенова ИС, Мельникова ЕВ, Олефир ЮВ. Применение проточной цитометрии для оценки качества биомедицинских клеточных продуктов. БИОпрепараты Профилактика, диагностика, лечение 2018;18:16–24. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-1-16-24>.

Метод регистрации мембранного потенциала тромбоцитов с использованием пэтч-клампа в конфигурации перфорированная «целая клетка»

А. Ю. Кохан^{1#}, И. И. Прокофьев^{1,2}, С. О. Зданевич^{1,2}, Л. М. Лукьяненко¹, Е. В. Шамова^{1,2}

1. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь
2. Кафедра биофизики, Белорусский Государственный Университет, Минск, Республика Беларусь

Автор для переписки: rrchypp@gmail.com

Получено: 15.06.2023
EDN: QVXWVM

Принято к публикации: 28.06.2023

Опубликовано: 30.06.2023

Аннотация

В данной работе рассмотрены подходы к регистрации мембранного потенциала тромбоцитов с использованием пэтч-клампа в конфигурации перфорированная «целая клетка». Проведены записи мембранного потенциала с использованием порообразующих агентов нистатина и сапонина и выбраны оптимальные условия, позволяющие регистрировать мембранный потенциал без нарушения гомеостатического контакта и влияния на функциональную активность тромбоцита. Показана возможность регистрации осцилляций мембранного потенциала тромбоцита. Предложенный подход регистрации мембранного потенциала будет полезен при исследовании роли мембранного потенциала и механизмов его регуляции в функциональных ответах тромбоцитов.

Ключевые слова: Тромбоциты, Пэтч-кламп, Нистатин, Сапонин, Мембранный потенциал

Введение

Тромбоциты человека - небольшие безъядерные клетки крови, образующиеся в костном мозге из мегакариоцитов. Их малый размер, а также высокая лабильность значительно затрудняют изучение их функциональных свойств на уровне одиночной клетки, в особенности это касается области исследования электрофизиологических свойств.

На данный момент показано, что функционирование ионных каналов в тромбоцитах является важным аспектом их физиологии. Известно о примерно 20 типах ионных каналов в тромбоцитах, играющих разнообразные роли. Калиевые кальций-управляемые ионные каналы средней проводимости (KCa 3.1, IK), участвуют в образовании прокоагулянтной субпопуляции, и потенциально участвуют в регуляции их объема [1]. Кальций- и потенциал-управляемый калиевый

канал большой проводимости (KCa 1.1, BK), участвует в процессе тромбоцитопоза и адгезии, при этом агонисты данного канала приводят к уменьшению наблюдаемых эффектов в ответ на действие АДФ [2]. Единственный калиевый канал семейства Kv (KV 1.3) в тромбоцитах в основном отвечает за регуляцию стационарного потенциала покоя мембраны на уровне -60 мВ, но также участвует в процессах тромбоцитопоза [3,4]. Каналы Orai1 участвуют в депо-зависимом входе ионов кальция [5], тогда как каналы TRPC3/6 считают одним из путей депо-независимого поступления кальция в клетку [6]. Пуринорецептор P2X1, активируемый АТФ, является одним из самых быстрых путей поступления кальция в тромбоцит при его активации, и участвует во множестве функциональных ответов [7,8].

Несомненно, ионные каналы играют огромную роль в тромбоцитах. Их функциональная активность неразрывно связана с еще одним важным фактором регуляции функциональной активности клеток – мембранным потенциалом, о роли которого в тромбоцитах известно недостаточно. Существуют предположения, что гиперполяризация приводит к увеличению движущей силы для ионов кальция, тем самым усиливая функциональный ответ тромбоцитов, например, при активации канала KCa 3.1 [9]. При этом остается не ясным, почему точно такая же гиперполяризация, вызванная открытием KCa 1.1, приводит к ингибированию ответа тромбоцитов на действие АДФ [2]. Также установлена роль мембранного потенциала в модулировании активности рецепторов, связанных с G-белками. Так, для мегакариоцитов и тромбоцитов показано, что деполяризация мембраны приводит к потенцированию либо активации пуринорецепторов P2Y, а гиперполяризация – наоборот ингибирует их активность [10,11]. В то же время, деполяризация мембраны тромбоцитов, вызванная дефицитом в мембране каналов KV 1.3, сопровождается

ингибированием функциональных ответов клеток [4]. Все вышеназванное свидетельствует о сложных механизмах регуляции функциональной активности тромбоцитов с участием мембранного потенциала и необходимости установления его роли в функциональном ответе данных клеток.

До разработки метода пэтч-кламп – являющегося на данный момент основным методом изучения электрофизиологических свойств клеток – исследователи использовали подходы, основанные на радиоактивных изотопах [12] или флуоресцентных потенциал-чувствительных зондах [13], однако эти методы имеют ряд ограничений, главные из которых – низкое разрешение и невозможность измерения быстрой динамики мембранного потенциала на уровне одиночной клетки.

Разработка метода пэтч-кламп открыла возможность изучения ионной проводимости как одиночных каналов, так и целой мембраны при различных условиях. И, конечно, появилась возможность точного измерения мембранного потенциала в одиночных клетках. Для измерения мембранного потенциала важно получить доступ внутрь клетки. Этого можно достигнуть двумя путями – переходом в конфигурацию «целая клетка» с разрывом мембраны под пипеткой, или формированием ион-неспецифичных пор в мембране под пипеткой, то есть получением конфигурации перфорированная «целая клетка». Для тромбоцитов первый подход используется редко, однако благодаря ему удалось получить характеристики ионного канала KV 1.3 и точно измерить потенциал покоя мембраны [14]. Использование конфигурации перфорированная «целая клетка», полученной с применением нистатина, позволило показать наличие каналов KCa 3.1 [15] и токов, ассоциированных с активацией тромбоцитов АДФ (АТФ) [7]. Однако измерение мембранного потенциала с использованием данных подходов проводили лишь для мегакариоцитов, благодаря чему была показана возможность появления осцилляций потенциала, ассоциированных с осцилляциями концентрации кальция [16]. Также был предложен подход для измерения мембранного потенциала при использовании конфигурации «на клетке» [17]. Однако данный подход требует особых условий: высокого сопротивления контакта, а также низкого входного сопротивления мембраны под пипеткой, что возможно достичь при наличии достаточного количества ионных каналов под пипеткой. В противном случае, реализация данного подхода может привести к появлению артефактов в зарегистрированном сигнале [18]. Незученным остается применение других порообразующих соединений, таких как сапонины, для реализации конфигурации перфорированная «целая клетка»,

а также вопрос влияния данных соединений на функциональную активность тромбоцитов.

По этой причине актуальным является изучение возможности применения конфигурации перфорированная «целая клетка» для исследования мембранного потенциала в одиночных тромбоцитах человека.

Материалы и Методы

Реагенты

Цитрат натрия, HEPES, глюкоза, апираза и сапонин из коры квиллайи (quillaja bark) были приобретены в Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). PGI₂ был приобретен в Santa Cruz (Dallas, USA), нистатин был приобретен в HPC Standarts GmbH (Cunnersdorf, Germany), антитела к CD42b, меченные PerCP, было приобретено в BioLegend (San Diego, USA), антитела к CD62P, меченные APC, и антитела к PAC1, меченные FITC, были приобретены в EXBIO (Vestec, Czech Republic).

Растворы

Внеклеточный буферный раствор с превалирующим содержанием NaCl (внеклеточный буферный раствор) содержал 145 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM HEPES, 10 mM глюкозы, pH 7.35 (титрование проводилось с помощью NaOH). Пипеточный раствор с превалирующим содержанием KCl (пипеточный буферный раствор) содержал 150 mM KCl, 10 mM HEPES, 2 mM MgCl₂, 0.1 mM EGTA, pH 7.2 (титрование проводилось с помощью KOH). Осмолярность используемых растворов составляла около 310 мОсм для внеклеточного и 300 мОсм для пипеточного буферного раствора. Все растворы были приготовлены с использованием воды третьей степени очистки (MilliQ) и были профильтрованы перед использованием через шприцевой фильтр (размер пор 0.22 мкм).

Выделение клеток

Венозную донорскую кровь собирали в шприц объемом 20 мл, содержащий 3.8 % (в/о) цитрата натрия (в соотношении 9 к 1), после чего к крови добавляли 0.5 мкМ PGI₂, 0.3 ед/мл апиразы, и затем центрифугировали при 150 g в течение 7 минут. Далее, 250 мкл обогащенной тромбоцитами плазмы смешивали с 1.25 мл внеклеточного буферного раствора, 0.5 мл цитрата натрия (pH 5.5), 0.5 мкМ PGI₂, 0.3 ед/мл апиразы и центрифугировали при 400 g в течение 5 минут. Клетки ресуспендировали внеклеточным буферным раствором с превалирующим содержанием NaCl. Все действия выполнялись в соответствии с Хельсинской Декларацией.

Пипетки для пэтч-клампа изготавливали из боросиликатного стекла (внутренний диаметр 0.86 мм, внешний диаметр 1.5 мм) (НЕКА Instruments) на пуллере Sutter Instruments Brown P-97. Полировку пипеток производили нагреванием на том же пуллере в соответствии с рекомендациями изготовителя. Сопротивление заполненных буферным раствором пипеток составляло 7-15 МОм.

Регистрацию проводили в конфигурациях «на клетке» и перфорированная «целая клетка» с использованием режимов фиксации тока и потенциала усилителя НЕКА EPS8 (НЕКА Elektronik GmbH). Пипетки заполняли раствором с превалирующим содержанием KCl с добавлением нистатина или сапонина. Нистатин растворяли в ДМСО в концентрации 20 мг/мл, и использовали в течение 2 часов после приготовления, чтобы исключить снижение его активности. Перемещение пипетки осуществляли при помощи манипулятора Sutter MP-225. Чашку Петри располагали на предметном столе микроскопа Olympus IX51WI (Tokyo, Japan) с общим увеличением 400х. Гигаомный контакт с клеткой получали путем подведения пипетки к плавающей недалеко от дна чашки Петри клетки, и прикладывания небольшого отрицательного давления. Гигаомный контакт в большинстве случаев наступал мгновенно, и достигал значений 20-30 ГОм. Снижение сопротивления до значений ниже 5 ГОм свидетельствовало о потере гигаомного контакта. Фильтрацию данных производили с помощью встроенного фильтра Бесселя нижних частот с частотой отсечки 0.7 кГц, оцифровку данных производили на компьютере при помощи ЦАП/АЦП В-381. Запись данных на жесткий диск осуществляли с частотой 1 кГц с использованием написанной на Matlab 2004 (The MathWorks, Inc.) программы. Полученные данные анализировали с помощью Origin 16.0 (Origin Lab, Northampton, Massachusetts, USA).

Проточная цитометрия

Для исследования функциональной активности тромбоцитов в ответ на действие порообразующих соединений методом проточной цитометрии, разбавленную суспензию тромбоцитов активировали в течение 10 минут добавлением нистатина или сапонина в указанной концентрации. Активированные тромбоциты далее инкубировали со смесью антител к CD42b, PAC-1 и CD62P в течение 10 минут. Реакцию останавливали разбавлением суспензии в 10 раз и анализировали на проточном цитометре Beckman Coulter CytoFlex. В качестве контроля выступала суспензия тромбоцитов без активации.

Результаты анализировали в программе FlowJo 10.4 (FlowJo, LLC, Oregon, USA).

Результаты и Обсуждение

Как было описано выше, получение конфигурации «целая клетка» для тромбоцитов важно для изучения динамики мембранного потенциала. Однако получение классической формы данной конфигурации затруднено из-за лабильности тромбоцитов, к тому же классическая конфигурации «целая клетка» может привести к диализу внутриклеточного содержимого, и может затруднить получение достоверных результатов. Использование порообразующих агентов, подобных нистатину, является одним из вариантов решения данной проблемы.

Чтобы оценить эффективность реализации конфигурации перфорированная «целая клетка», проводили записи кинетики мембранного потенциала в режиме фиксации тока (ток фиксирован на уровне 0 пА) сразу после получения гигаомного контакта с клеткой. Более низкие значения регистрируемого потенциала, приближающиеся к физиологическому значению для тромбоцитов (-50 - -60 мВ) говорят о более полном перфорировании мембраны под пипеткой.

Было обнаружено, что при заполнении всей пипетки раствором с добавлением нистатина, получение гигаомного контакта затруднено. Поэтому кончик пипетки заполнялся раствором, не содержащим нистатин, и только после этого раствор с нистатином добавляли в оставшийся объем пипетки. Данный подход не затруднял получения гигаомного контакта, однако увеличивал время, необходимое для получения конфигурации перфорированная «целая клетка» из-за диффузии нистатина к мембране. Исходя из имеющихся литературных данных [19], было решено проверить активность низких концентраций нистатина – от 10 до 50 мкг/мл. Несмотря на то, что в литературе описано использование концентраций нистатина от 100 до 400 мкг/мл, в наших условиях такие добавки приводили к практически моментальной потере гигаомного контакта пипетки с клеткой (n=5).

Использование нистатина в концентрации 10 мкг/мл не давало значительного эффекта (рисунок 1, А) (n=12). Использование нистатина в концентрации 50 мкг/мл приводило к снижению регистрируемого сигнала (n=7), что свидетельствовало о получении доступа внутрь клетки, однако, во всех случаях через некоторое время происходила потеря гигаомного контакта (рисунок 1, В), что сопровождалось снижением регистрируемого сопротивления пипетки. Наиболее стабильные результаты наблюдались при использовании нистатина в концентрации 30 мкг/мл (рисунок 1, Б) (n=12), однако такая добавка

порообразующего агента приводила к регистрации более высокого уровня мембранного потенциала, чем ожидалось, что может быть связано с неполной перфорацией мембраны под пипеткой. Использование поверхностно-активного агента Pluronic F-127, который, как сообщалось в работе [20], способен ускорять процесс перфорации мембраны, не приводило к значимым изменениям (данные не представлены).

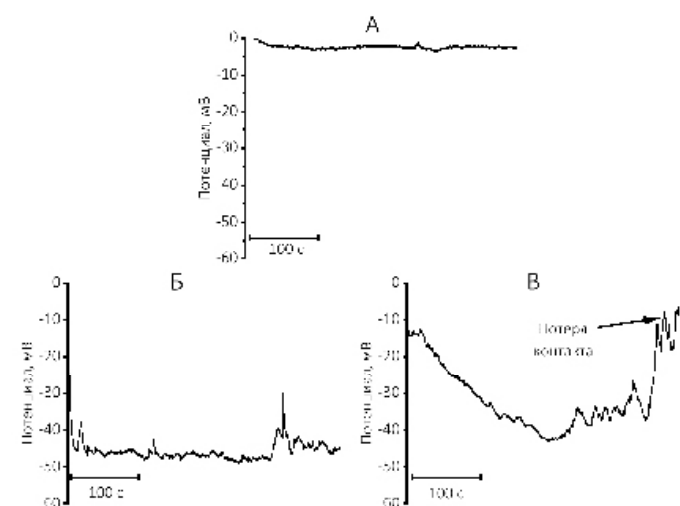


Рисунок 1. Примеры кинетик мембранного потенциала одиночных тромбоцитов при добавлении в пипеточный раствор: (А) 10 мкг/мл нистатина, (Б) 30 мкг/мл нистатина и (В) 50 мкг/мл нистатина. Стрелками отмечены моменты потери гигаомного контакта с клеткой.

В качестве альтернативного перфорирующего мембрану агента для получения конфигурации перфорированная «целая клетка» исследовали также сапонин, который широко применяется при перфорации мембран клеток с целью загрузки в цитозоль различных соединений. Однако использование даже небольших концентраций сапонины (10 мкМ) приводило к потере гигаомного контакта (рисунок 2) ($n=9$).

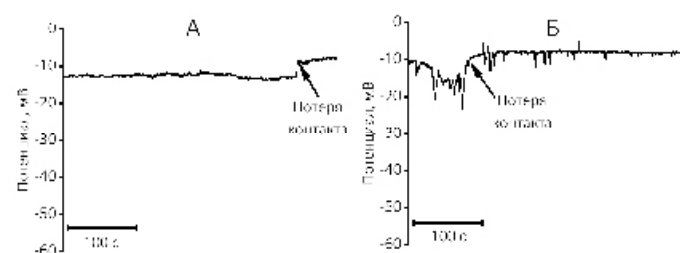


Рисунок 2. Примеры кинетик мембранного потенциала одиночных тромбоцитов при добавлении в пипеточный раствор: (А) 10 мкМ сапонины, (Б) 50 мкМ сапонины. Стрелкой отмечен момент потери гигаомного контакта с клеткой.

Интересным является поведение кинетики потенциала при добавлении в пипеточный раствор сапонины в концентрации 50 мкМ (рисунок 2, Б). Известно, что при стимуляции тромбоцитов пики осцилляций концентрации кальция могут сливаться [21]. Учитывая, что за осцилляции потенциала в тромбоцитах вероятнее всего отвечает открытие калиевых каналов, управляемых кальцием [16], можно предположить, что наблюдаемое на рисунке 2Б изменение потенциала связано с переходом из режима со слившимися пиками концентрации кальция в режим с одиночными пиками. Однако данное предположение требует дополнительного подтверждения.

В некоторых случаях (примерно 20% всех экспериментов) после получения конфигурации перфорированная «целая клетка» с применением нистатина или сапонины наблюдались осцилляции мембранного потенциала, вероятно связанные с преактивацией клетки вследствие механического растяжения ее мембраны в процессе реализации гигаомного контакта, (рисунок 3, А), или же действия самого порообразующего вещества (рисунок 2, Б). Наибольшая амплитуда осцилляций наблюдалась в случаях добавления в пипеточный раствор нистатина в концентрации 30 мкг/мл (рисунок 3, Б). Осцилляции в основном направлены в сторону уменьшения значения потенциала, что может быть объяснено открытием калиевых кальций-чувствительных ионных каналов [16]. В некоторых случаях (рисунок 2, Б) можно наблюдать аналогичные по форме, но противоположные по направлению осцилляции. Можно предположить, что данный эффект связан с открытием ионных каналов натриевой проводимости, управляемых кальцием. Однако в тромбоцитах таких каналов на данный момент не обнаружено [9], поэтому обсуждаемый эффект требует дополнительных исследований.

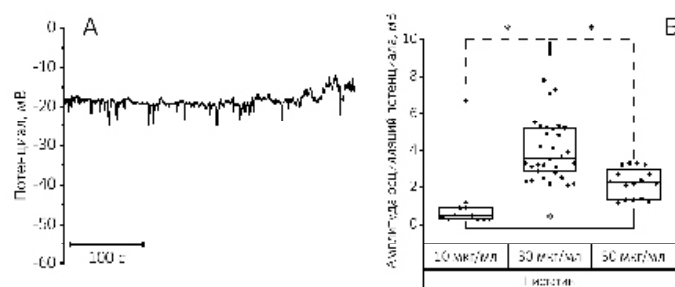


Рисунок 3. Осцилляции мембранного потенциала, зарегистрированные в конфигурации перфорированная «целая клетка». (А) Пример кинетики мембранного потенциала при добавлении в пипеточный раствор 30 мкг/мл нистатина. (Б) Зависимость амплитуды осцилляций потенциала от концентрации нистатина в пипеточном растворе. Статистическая достоверность проверена непараметрическим тестом Манна-Уитни, * – $p<0.05$.

Таким образом получено, что использование нистатина в концентрации 30 мкг/мл дает возможность регистрации изменений мембранного потенциала с минимальным нарушением гигаомного контакта.

Следующим этапом данного исследования стал анализ влияния используемых соединений на функциональную активность тромбоцитов, чтобы исключить нежелательное воздействие на процессы внутриклеточной сигнализации и активации в процессе записи кинетик мембранного потенциала.

Функциональную активность тромбоцитов исследовали методом проточной цитометрии. Тромбоциты определяли как события, положительные по маркеру CD42b - гликопротеин Ib (рисунок 4, Б), активацию оценивали по

связыванию антител к маркеру дегрануляции α -гранул Р-селектину - CD62P (рисунок 4, В) и к эпитопу активированной формы интегрина α IIb β 3 – PAC-1 (рисунок 4, Г).

В результате было показано, что нистатин в концентрации 30 мкг/мл не вызывает значимой дегрануляции и активации интегрина α IIb β 3, в то время как действие сапонины приводит к значительной активации тромбоцитов. Данные результаты могут объяснить наблюдаемую быструю потерю гигаомного контакта при использовании в пипеточном растворе сапонины даже в малых концентрациях. Сапонины образуют поры в мембране благодаря взаимодействию с находящимся в ней холестерином с последующим мицеллообразованием. Известно, что поры, образуемые сапонином, имеют характерный

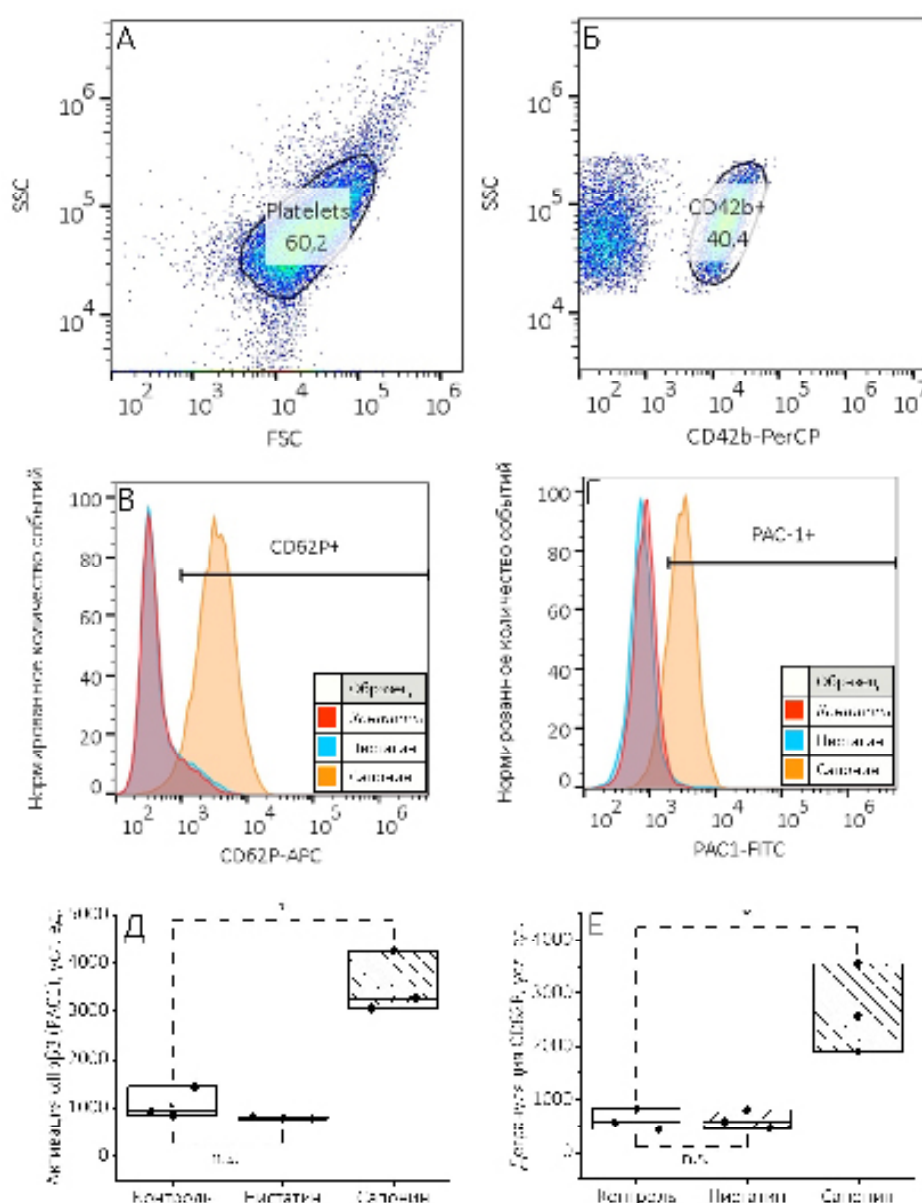


Рисунок 4. Анализ влияния сапонины и нистатина на функциональный ответ тромбоцитов. (А) Выделение популяции тромбоцитов (platelets) на диаграмме прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния. (Б) Выделение популяции тромбоцитов, положительных по маркеру CD42b-PerCP. (В, Г) Примеры гистограмм распределения интенсивности флуоресценции в популяции CD42b+ тромбоцитов для маркеров CD62P (В) и PAC1 (Г) в контроле и при действии нистатина и сапонины. (Д, Е) Результаты анализа активации α IIb β 3 (PAC-1) и дегрануляции альфа гранул (CD62P) при действии сапонины и нистатина на тромбоциты (оценивали по интенсивности флуоресценции соответствующих маркеров). Статистическая достоверность проверена непараметрическим тестом Муды. * – $p < 0.05$, n.s. – нет достоверных отличий.

размер в несколько нанометров [22], тогда как поры, образуемые нистатином, проницаемы лишь для одновалентных ионов [19]. Можно предположить, что поры, образующиеся посредством действия сапонины, не задерживают сами молекулы сапонины в пипетке, что приводит к их диффузии внутрь клетки и нарушению целостности мембраны, что отрицательно влияет на мембранный потенциал и установление плотного контакта с пипеткой. В то же время практически полное отсутствие активации тромбоцитов при их взаимодействии с нистатином свидетельствует в пользу оптимальности его использования для реализации конфигурации перфорированная «целая клетка» для регистрации мембранного потенциала.

Заключение

Мембранный потенциал является важнейшим игроком в процессах внутриклеточной сигнализации и функционирования всех типов клеток, от возбудимых клеток нервной системы до клеток крови. Разработка новых подходов для исследования механизмов изменения мембранного потенциала, а также его роли, на уровне одиночных клеток, является важным и перспективным направлением. Рассмотренные в настоящей работе особенности применения метода пэтч-кламп в конфигурации перфорированная «целая клетка» к тромбоцитам человека позволяют расширить наше понимание данных процессов, и дадут возможность установить ранее не выявленные механизмы участия мембранного потенциала в функциональном ответе тромбоцитов.

Вклад авторов

А.Ю.К. выполнял эксперименты, анализировал данные, писал и редактировал текст статьи; И.И.П. и С.О.З. выполняли эксперименты, анализировали данные и редактировали текст статьи; Л.М.Л. и С.А.Н. анализировали данные и редактировали текст статьи; Е.В.Ш. руководила проектом, планировала исследования, анализировала данные и редактировала текст статьи.

Конфликт интересов

Все авторы подтверждают отсутствие конфликта интересов.

Финансирование

Работа частично поддержана Белорусским Республиканским Фондом Фундаментальных Исследований (грант Б23РНФ-162).

Список литературы

1. Wright JR, Mahaut-Smith MP. Why do

platelets express K⁺ channels? *Platelets* 2021;32:872–9. <https://doi.org/10.1080/09537104.2021.1904135>.

2. Balduini A, Fava C, Di Buduo CA, Abbonante V, Meneguzzi A, Soprano PM, et al. Expression and functional characterization of the large-conductance calcium and voltage-activated potassium channel K_{Ca} 1.1 in megakaryocytes and platelets. *J Thromb Haemost* 2021;19:1558–71. <https://doi.org/10.1111/jth.15269>.
3. Mahaut-Smith MP, Rink TJ, Collins SC, Sage SO. Voltage-gated potassium channels and the control of membrane potential in human platelets. *The Journal of Physiology* 1990;428:723–35. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1990.sp018237>.
4. McCloskey C, Jones S, Amisten S, Snowden RT, Kaczmarek LK, Erlinge D, et al. Kv1.3 is the exclusive voltage-gated K⁺ channel of platelets and megakaryocytes: roles in membrane potential, Ca²⁺ signalling and platelet count: Kv1.3 in the platelet and megakaryocyte. *The Journal of Physiology* 2010;588:1399–406. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.188136>.
5. Braun A, Varga-Szabo D, Kleinschnitz C, Pleines I, Bender M, Austinat M, et al. Orai1 (CRACM1) is the platelet SOC channel and essential for pathological thrombus formation. *Blood* 2009;113:2056–63. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-171611>.
6. Mahaut-Smith MP. A Role for Platelet TRPC Channels in the Ca²⁺ Response That Induces Procoagulant Activity. *Science Signaling* 2013;6:pe23–pe23. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2004399>.
7. Mahaut-Smith MP, Sage SO, Rink TJ. Rapid ADP-evoked currents in human platelets recorded with the nystatin permeabilized patch technique. *Journal of Biological Chemistry* 1992;267:3060–5. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)50694-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)50694-9).
8. Hechler B, Lenain N, Marchese P, Vial C, Heim V, Freund M, et al. A Role of the Fast ATP-gated P2X1 Cation Channel in Thrombosis of Small Arteries In Vivo. *Journal of Experimental Medicine* 2003;198:661–7. <https://doi.org/10.1084/jem.20030144>.
9. Mahaut-Smith MP. The unique contribution of ion channels to platelet and megakaryocyte function: Platelet and megakaryocyte ion channels. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2012;10:1722–32. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2012.04837.x>.
10. Mahaut-Smith MP, Martinez-Pinna J, Gurung IS. A role for membrane potential in regulating

- GPCRs? Trends in Pharmacological Sciences 2008;29:421–9. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2008.05.007>.
11. Martinez-Pinna J, Gurung IS, Vial C, Leon C, Gachet C, Evans RJ, et al. Direct voltage control of signaling via P2Y1 and other Gαq-coupled receptors. Journal of Biological Chemistry 2005;280:1490–8. <https://doi.org/10.1074/jbc.M407783200>.
 12. Garty H, Rudy B, Karlsh SJ. A simple and sensitive procedure for measuring isotope fluxes through ion-specific channels in heterogenous populations of membrane vesicles. Journal of Biological Chemistry 1983;258:13094–9. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)44085-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)44085-3).
 13. Felix JP, Williams BS, Priest BT, Brochu RM, Dick IE, Warren VA, et al. Functional Assay of Voltage-Gated Sodium Channels Using Membrane Potential-Sensitive Dyes. ASSAY and Drug Development Technologies 2004;2:260–8. <https://doi.org/10.1089/1540658041410696>.
 14. Maruyama Y. A patch-clamp study of mammalian platelets and their voltage-gated potassium current. The Journal of Physiology 1987;391:467–85. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1987.sp016750>.
 15. Mahaut-Smith MP. Calcium-activated potassium channels in human platelets. The Journal of Physiology 1995;484:15–24. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1995.sp020644>.
 16. Mason MJ, Hussain JF, Mahaut-Smith MP. A novel role for membrane potential in the modulation of intracellular Ca²⁺ oscillations in rat megakaryocytes. The Journal of Physiology 2000;524:437–46. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.00437.x>.
 17. Mason MJ, Simpson AK, Mahaut-Smith MP, Robinson HPC. The Interpretation of Current-Clamp Recordings in the Cell-Attached Patch-Clamp Configuration. Biophysical Journal 2005;88:739–50. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.049866>.
 18. Kokhan A, Zdanevich S, Prokofev I, Gorudko I, Shamova E. Patch-clamp technique for studying ion channels in activated platelets. SBPR 2021;1:3–11. <https://doi.org/10.52455/sbpr.01.202101012>.
 19. Akaike N, Harata N. Nystatin perforated patch recording and its applications to analyses of intracellular mechanisms. The Japanese Journal of Physiology 1994;44:433–73. <https://doi.org/10.2170/jjphysiol.44.433>.
 20. Lucero MT, Pappone PA. Membrane responses to norepinephrine in cultured brown fat cells. Journal of General Physiology 1990;95:523–44. <https://doi.org/10.1085/jgp.95.3.523>.
 21. Heemskerk JW, George M, Rook MB, Sage SO. Ragged spiking of free calcium in ADP-stimulated human platelets: regulation of puff-like calcium signals in vitro and ex vivo. The Journal of Physiology 2001;535:625–35. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.00625.x>.
 22. Zheng X, Gallot G. Dynamics of cell membrane permeabilization by saponins using terahertz attenuated total reflection. Biophysical Journal 2020;119:749–55. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2020.05.040>.

Изучение стабильности белка с помощью проточной цитофлуорометрии и вестерн блота: сравнительное исследование

Е. И. Николаева^{1#}, Н. Колчин^{1, 3}, Нестеренко¹, Е. Кольцова^{1,2}, М. Пантелеев^{1,2}, К. Р. Бутов^{1,3}

1. Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева Минздрава РФ
2. Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН
3. Медико-биологический факультет, Российский Национальный Исследовательский Медицинский Университет им. Н.И. Пирогова

Автор для переписки: nikolaevaelena@inbox.ru

Получено: 09.07.2023

Принято к публикации: 28.06.2023

Опубликовано: 30.06.2023

EDN: VBMFAD

Аннотация

Анализ влияния мутаций на функцию белка является важной задачей как для генетической диагностики наследственных заболеваний, так и для изучения функционально и структурно плохо описанных белков. Одним из предполагаемых влияний мутации на белок является изменение его времени полужизни. Для оценки стабильности белков существует стандартный метод циклогексимидного "пульса", который заключается в добавлении к клеткам ингибитора трансляции - циклогексимида, и дальнейшей оценке количества белка в различные временные точки. Данный метод можно использовать на коммерческих клеточных культурах, в которых предварительно сверхэкспрессирован исследуемый белок со специфической меткой. Для валидации метода, мы трансфецировали НЕК293Т конструктами TurboGFP-dest1, кодирующими белок с коротким и известным временем полужизни. Для оценки количества белка чаще всего используется метод Вестерн блота как наиболее специфичный метод для таких задач. Однако, данный метод требует длительной пробоподготовки и наличия специфических антител. Альтернативным методом детекции является создание конструкторов целевого белка с флуоресцентным репортером и измерение флуоресценции методом проточной цитофлуорометрии. Данный подход значительно упрощает пробоподготовку и не требует специфических антител. Мы сравнили данные методы, и интересно, что кинетики деградации белка и время полужизни, полученные с помощью проточной цитофлуорометрии практически не отличаются от результатов, полученных методом Вестерн блота. Однако, время полужизни белка, измеренное методом цитофлуорометрии немного больше, чем измеренное методом Вестерн блота, что можно объяснить кинетикой созревания флуорофора GFP.

Ключевые слова: Проточная цитофлуорометрия, Стабильность белка, Патогенность мутаций

Введение

Определение функциональной значимости миссенс мутаций в кодирующих частях генов - одна из главных задач при генетической диагностике наследственных заболеваний [1]. Однако, *in silico* методы предсказания эффектов аминокислотных замен на свойства белка достоверны только для нарушений в уже хорошо описанных белковых структурах. В случае малоизученных белков или мутаций вне известных белковых доменов точность предсказательных моделей значительно снижается. Кроме того, некоторые мутации могут приводить к изменениям во взаимодействии с другими белками, которые находятся в комплексе и/или модифицируют изучаемый белок. Для подтверждения патогенности таких вариантов белков необходимо использовать *in vitro* клеточные модели.

Изучение стабильности белка или времени его полужизни является одним из рутинных методов в клеточной и молекулярной биологии. Наиболее часто используется метод циклогексимидного "пульса", основанный на ингибировании трансляции при добавлении циклогексимида [2]. В основе метода лежит создание генетического конструктора для экспрессии целевого белка с определенным "тагом" мишенью для антител. Для детекции результатов чаще всего используется метод Вестерн блота. Это связано с высокой чувствительностью и специфичностью метода, а также потенциально позволяет детектировать изменения в посттрансляционной модификации белка, приводящие к изменению молекулярной массы. Однако, этот метод не всегда подходит для рутинной диагностики в связи с его трудоемкостью и длительной пробоподготовкой. Альтернативным методом детекции является создание конструкторов

целевого белка с флуоресцентным репортером и измерение флуоресценции методом проточной цитометрии в различные временные точки. Данный подход значительно упрощает пробоподготовку, позволяет одновременно анализировать большое количество образцов и не требует специфических антител.

Целью данного исследования было сравнение методов проточной цитометрии и Вестерн блота для оценки времени полужизни белка в клеточных моделях. Для сравнения была использована хорошо охарактеризованная короткоживущая форма GFP с дестабилизирующим доменом из мышинной орнитиндекарбоксилазы (MODC) (аминокислотные остатки 422-461). Область MODC содержит аминокислотную последовательность PEST, которая нацеливает белок на деградацию [3].

Полученные результаты показывают, что время полужизни белка измеренное методом проточной цитометрии и Вестерн-блотом не имеют значимых различий. Наблюдаемая тенденция большей стабильности белка при измерении методом проточной цитофлуориметрии скорее всего связана с кинетикой созревания флуорофора GFP. Несмотря на это, проточная цитометрия является актуальным методом для сравнения времени полужизни нормальных и мутантных вариантов недостаточно хорошо изученных белков, особенно при значительных изменениях их вторичной и/или третичной структур.

Материалы и Методы

Клеточные культуры

Клеточная линия HEK293T культивировалась согласно рекомендациям ATCC. Кратко, для ведения линии использовалась культуральная среда DMEM с высоким содержанием глюкозы, с добавлением стабилизированного глутамина (Gibco) и пенициллин-стрептомицина. Подсчет клеток осуществлялся с помощью окраски в растворе трипановым синим в автоматическом счетике клеток Luna II.

Трансфекция и циклогексимидный "пульс"

Векторы для экспрессии reTurboGFP-dest1 (Евроген, Москва) были трансфицированы в HEK293T с помощью липофекции с jetOPTIMUS DNA Transfection Reagent (Polyplus, France) в 24-луночных планшетах. Через 24 часа клетки были отмыты от среды с помощью dPBS (фосфатно-солевой раствор Дульбекко; Панэко) и откреплены с помощью трипсина/эдта (Stemcell).

Через 24 часа после трансфекции к клеткам добавлялся раствор циклогексимид (abcam) в ДМСО до финальной концентрации 50 мкг/

мл. В различные временные точки (0 часов, 1 час, 3 часа) после добавления циклогексимид проводились нижеописанные исследования.

Проточная цитометрия

Образцы анализировались с помощью проточного цитометра Agilent Novocyt. Перед измерением флуоресценции GFP, образцы окрашивались AnnexinA5-Alexa647 (Sony Biotechnology) (5 мкл/100000 клеток). На графиках представлены данные по одиночным AnnexinA5-отрицательным событиям. Анализ производился с помощью программного пакета FlowJo. Данные представлены как средняя интенсивность флуоресценции.

Вестерн блот

Перед лизисом клетки были отмыты 1 раз в dPBS и подвергнуты лизису в буфере RIPA с добавлением коктейля ингибиторов протеаз и фосфатаз и ЭДТА. Для уменьшения вязкости лизатов за счет свободной ДНК, образцы были несколько раз пропущены через иглу диаметром 25G для физической фрагментации ДНК и отцентрифугированы при 10000g в течение 5 минут. Концентрация белка в лизатах была измерена с помощью Pierce BCA (ThermoFisher Scientific) набора согласно рекомендации производителя. Полученные лизаты хранились при -80°C. Перед денатурирующим полиакриламидным гелем электрофорезом лизаты смешивались с 4-кратным буфером Laemmli (Bio-Rad) с бета-меркаптоэтанолом и нагревались при 95°C в течение 5 минут. Одинаковое количества белка было нанесено на 12.5% трис-глициновый полиакриламидный гель с предокрашенными белковыми маркерами Protein Plus WesternC Standards (Bio-Rad). Разделенные белки перенесены на нитроцеллюлозную мембрану. Эффективность переноса оценивалась с помощью детекции Stain-Free флуоресценции мембраны (Bio-Rad). Далее мембраны блокировались в присутствии 5% обезжиренного молока 1 час и окрашивались в течение 12 часов при 4°C первичными анти-TurboGFP антителами в разведении 1:2000 (Евроген, Москва). После отмывки мембрана была инкубирована с вторичными антителами к иммуноглобулинам кролика, конъюгированными с Alexa647 Plus (ThermoFisher Scientific), и Fab фрагментом, специфичным к GAPDH, конъюгированным с родамином (Bio-Rad), в течение 1 часа при комнатной температуре. Специфичный сигнал был детектирован в канале Alexa647 и Rhodamine соответственно, с помощью ChemiDoc MP (Bio-Rad).

Обработка полученных данных

Обработку полученных данных проводили с помощью программных пакетов GraphPad Prism 7.0.

Для проточной цитометрии за 0% принималась средняя интенсивность одиночных AnnexinV-

$$\frac{(MFI_{t(time)} - MFI_{n(0)}) \times 100\%}{MFI_{n(0)}}$$

отрицательных событий с контрольного образца, использовалась следующая формула:

где $MFI_{t(time)}$ - средняя интенсивность флуоресценции трансфицированных клеток в определенную временную точку, $MFI_{n(0)}$ - средняя интенсивность флуоресценции не трансфицированных клеток.

Время полужизни определялось с помощью функции экспоненциальной регрессии. Значимость полученных результатов оценивали с применением непараметрического U-критерия Манна-Уитни. Результаты считали достоверными при $p < 0.05$.

Результаты и Обсуждение

Вестерн блот лизатов полученных из HEK293T трансфицированных reTurboGFP-dest1 показал высокую экспрессию белка с соответствующей молекулярной массой (Рис.1 А). Анализ нескольких временных точек (0, 1, 3 часа) после добавления циклогексимида демонстрирует значительное снижение количества TurboGFP-dest1 на протяжении эксперимента. Однако, уровень относительной флуоресценции GAPDH

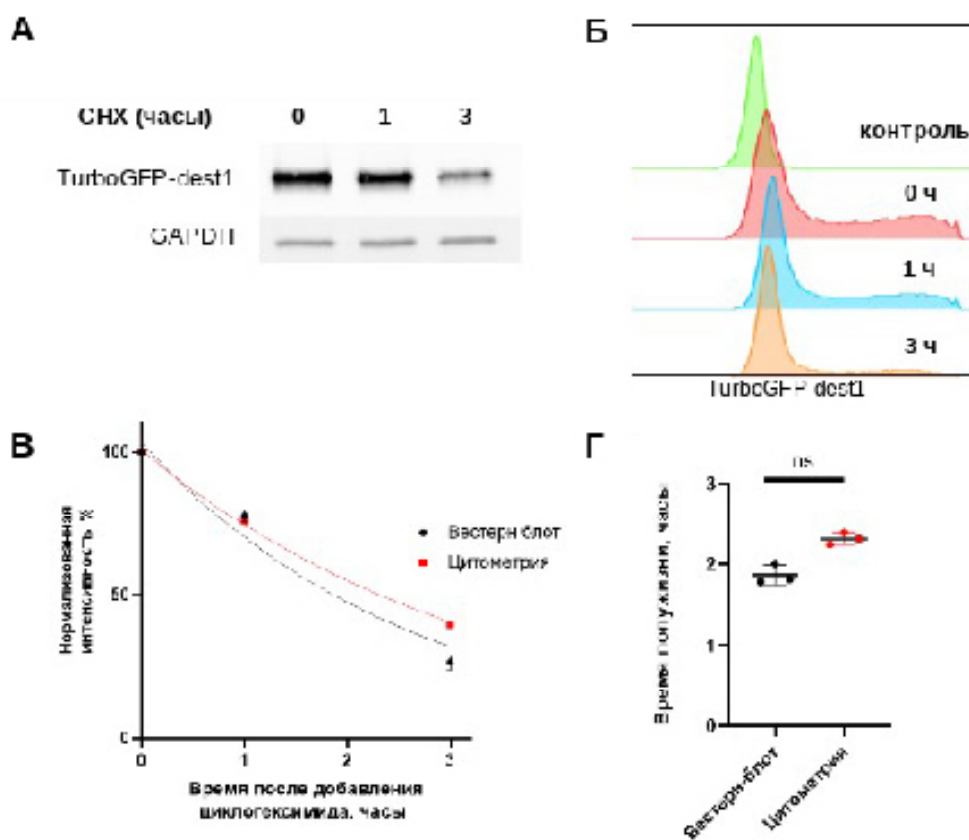


Рисунок 1. (А) Вестерн блот лизатов HEK293T, трансфицированных reTurboGFP-dest1, полученных через 0, 1 и 3 часов после добавления циклогексимида (50 мкг/мл). TurboGFP-dest1 - белок с известным временем полужизни. GAPDH - белок домашнего хозяйства для нормализации полученных результатов. Эксперимент повторялся трижды; представлены репрезентативные результаты.

(Б) Результаты анализа проточной цитофлуориметрии HEK293T, трансфицированных reTurboGFP-dest1. Контроль – результаты анализа проточной цитофлуориметрии HEK293T без трансфекции. Цитометрия проводилась в различные временные точки (0, 1, 3 часа) после добавления к клеткам циклогексимида (50 мкг/мл). На графиках представлены данные по одиночным AnnexinA5-отрицательным событиям. Ось y - количество событий. Ось x - относительная интенсивность флуоресценции TurboGFP-dest1. Анализ производился с помощью программного пакета FlowJo. Эксперимент повторялся трижды; представлены репрезентативные результаты.

(В) Изменение среднего значения нормализованной интенсивности TurboGFP-dest1 во времени. Кинетики деградации TurboGFP-dest1, полученные методами проточной цитометрии и Вестерн блота. Для Вестерн блота результаты нормализовались на GAPDH, относительная интенсивность в точке 0 часов приравнивалась к 100%. Для проточной цитометрии за 0% принималась средняя интенсивность одиночных AnnexinV-отрицательных событий с контрольного образца. Относительная интенсивность в точке 0 часов так же приравнивалась к 100%. Рисунок включает данные из трех повторов для каждого метода (среднее значение; SD). Непрерывные линии представляют собой результат фиттинга экспериментальных данных при помощи модели экспоненциальной регрессии.

(Г) Сравнение времени полужизни TurboGFP-dest1, измеренного с помощью методов Вестерн блота (среднее значение=1,87 часа, SD=0,12, N=3) и проточной цитометрии (среднее значение=2,3, SD=0,07, N=3). Значимость полученных результатов оценивали с применением непараметрического U-критерия Манна-Уитни ($p=0,01$).

в образцах не показал значительных изменений. Таким образом, после нормализации экспрессии TurboGFP-dest1, измеренное время полужизни белка было 1,87 часа ($SD=0,12$, $N=3$). Полученные данные соответствуют опубликованным данным о стабильности данного белкового конструктора.

Аналогично, проточная цитометрия показала примерно 50% клеток, флуоресцирующих в канале FITC (Рис.1 Б). Специфичность флуоресценции была подтверждена с помощью конфокальной микроскопии. Анализ данных также показал существенное снижение флуоресценции в течение 3 часов. Время полужизни белка, основанное на флуоресценции, составило 2,3 часа ($SD=0,07$, $N=3$).

При сравнении времени полужизни и кинетики изменений количества целевого белка между двумя методами можно обнаружить, что время полужизни TurboGFP-dest1 значимо не отличается ($p=0,1$) (Рис.1 В, Г). Однако, имеется тенденция к более увеличенному времени полужизни белка при его определении методом проточной цитометрии.

Несмотря на отсутствие статистически достоверных различий, интересна причина увеличенного времени полужизни белка, определенного методом проточной цитометрии по сравнению с определенным методом Вестерн блота. Так же следует указать, что в зависимости от стратегии гейтирования при анализе данных, полученных методом проточной цитофлуориметрии можно получить различные результаты. Однако, при изолировании только популяции клеток, флуоресцирующих в канале FITC, время полужизни также будет завышено в отличие от сравнения средней флуоресценции всей популяции. Тенденция к большему времени полужизни, полученному из результатов анализа проточной цитометрии, может быть связана с особенностями флуоресценции GFP. Так, известно, что даже при ингибировании трансляции циклогексимином происходит фоновое созревание хромофора, что может влиять на измеряемое время полужизни. При измерении количества белка в различные временные точки методом проточной цитофлуориметрии детектируется флуоресцентный сигнал непосредственно от TurboGFP-dest1. Таким образом, если время созревания флуорофора меньше или сравнимо с временем полужизни белка, стабильность белка может оцениваться как более высокая, чем есть в реальности. При этом, при использовании метода Вестерн блота детектируется сигнал от антител, связанных с имеющимся в клетке TurboGFP-dest1, что никак не зависит от степени созревания флуорофора.

Соответственно, метод проточной цитометрии менее чувствительный по сравнению с методом

Вестерн блота для оценки стабильности белков с временем полужизни сравнимым со скоростью созревания флуорофора. Для преодоления этих ограничений можно использовать фотоактивируемые флуоресцентные белки. Для такой системы флуоресцентный сигнал будет зависеть только от скорости деградации белка. Однако, большая часть доступных на данный момент фотоактивируемых белков оптимизирована преимущественно для микроскопии. Соответственно такие белки имеют эмиссию неоптимальную для детекции с стандартными оптическими конфигурациями проточных цитометров, а также имеют достаточно низкую яркость.

Еще одним ограничением исследования является потенциальное влияние GFP в составе химерного белка, поскольку данная модификация может влиять на время полужизни целевого белка. Например, при создании генетического конструктора исследуемого белка с флуоресцентной меткой важно учитывать, на каком конце будет расположен флуоресцентный белок. Чаще всего, влияние расположения флуоресцентного белка на стабильность всего химерного белка можно предсказать, если N-концевой и C-концевой участки исследуемого белка структурно и функционально описаны. Однако, перечень таких белков достаточно узок, и влияние расположения флуоресцентного белка в химерном белке иногда может быть проверено только экспериментально. Также необходимо, чтобы генетический конструктор включал в себя последовательность для инициации трансляции, предшествующую старт кодону (примером может служить консенсусная последовательность Козак) и линкер (2-10 аминокислот: чаще всего глицин с повторами серина) между последовательностями генов сливаемых белков для обеспечения гибкости между ними. Одним из самых важных решений при создании химерного белка для исследований стабильности белка является выбор флуоресцентного белка. Например, флуоресцентный белок может быть слишком большим и препятствовать включению исследуемого белка в какой-либо стабилизирующий его белковый комплекс [4]. Необходимо также учитывать, какие методы будут использоваться для детекции белка (Вестерн блот, проточная цитофлуориметрия). При исследовании ранее не изученных белков, стоит использовать несколько вариантов конструкторов для более репрезентативных результатов: N и C-концевое расположение гена флуоресцентного белка, несколько вариантов линкера, конструкторы с различными флуоресцентными белками.

Несмотря на довольно трудоемкий процесс создания конструктора для исследования

стабильности белков, возможность использования метода проточной цитофлуориметрии упрощает выбор наиболее подходящего конструкта за счет быстрой и простой детекции химерного белка. Метод проточной цитометрии показывает сравнимые результаты с методом Вестерн блота. Кинетика деградации белка, полученная с помощью цитометрии, также достаточно соответствуют кинетике, полученной с помощью Вестерн блота. Таким образом, метод проточной цитометрии подходит для быстрой оценки стабильности белков и налаживания методики циклогексимидного “пульса” в лаборатории. Так же, остается неизвестным как покажет себя данный метод при использовании других флуоресцентных белков, например, с меньшим временем созревания флуорофора или большим временем полужизни.

Список литературы

1. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. Genet Med. 2015;17(5).
2. Kao S-H, Wang W-L, Chen C-Y, Chang Y-L, Wu Y-Y, Wang Y-T, et al. Analysis of Protein Stability by the Cycloheximide Chase Assay. BIO-PROTOCOL. 2015;5(1).
3. Li X, Zhao X, Fang Y, Jiang X, Duong T, Fan C, et al. Generation of destabilized green fluorescent protein as a transcription reporter. J Biol Chem. 1998;273(52).
4. Snapp E. Design and use of fluorescent fusion proteins in cell biology. Curr Protoc Cell Biol. 2005;27(1).