

УДК 576

ПОДХОД ДЛЯ АНАЛИЗА ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ МАРКЕРОВ В ФОСФАТИДИЛСЕРИН-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ ТРОМБОЦИТАХ

© 2025 г. Е. О. Артеменко^{a, b, *}, С. И. Обыденный^{a, b}, М. А. Пантелеев^{a, b, c}

^aЦентр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, Москва, 109029 Россия

^bНациональный медицинский исследовательский центр детской онкологии, гематологии и иммунологии
им. Дмитрия Рогачева, Москва, 117997 Россия

^cМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, физический факультет, Москва, 119991 Россия

*e-mail: lartemenko@yandex.ru

Поступила в редакцию 22.05.2024

После доработки 12.07.2024

Принята к печати 15.07.2024

Фосфатидилсерин (ФС)-положительные тромбоциты играют важную роль в тромбозе и гемостазе. Они имеют высокую прокоагулянтную активность, способность к везикуляции и могут агрегировать с активированными ФС-отрицательными тромбоцитами. Они обнаруживаются в растущем тромбе *in vitro*, однако остается ряд загадок, связанных с ними. В частности, внутриклеточная сигнализация и реорганизация цитоскелета в этих тромбоцитах исследованы очень слабо, поскольку они разрушаются при пермеабиллизации, необходимой для проникновения антител к внутриклеточным маркерам. В данной работе мы предлагаем подход, который позволяет анализировать внутриклеточные маркеры в индуцированных кальциевым ионофором A23187 ФС-положительных тромбоцитах с помощью проточной цитометрии или конфокальной микроскопии. Мы использовали наиболее мягкую пермеабиллизацию фиксированных ФС-положительных тромбоцитов с помощью сапонины и показали, что такая пермеабиллизация позволяет в значительной мере сохранить ФС-положительные тромбоциты. Для примера мы проанализировали состояние полимеризованной формы актина в ФС-положительных тромбоцитах и показали, что несмотря на значительную перестройку цитоскелета, происходящую при активации в таких тромбоцитах, актин в них частично представлен в полимеризованной форме.

Ключевые слова: гемостаз, тромбоциты, фосфатидилсерин, проточная цитометрия, конфокальная микроскопия

DOI: 10.31857/S0233475525010058, **EDN:** utyoys

ВВЕДЕНИЕ

Тромбоциты — мелкие безъядерные клетки крови, одной из основных функций которых является участие в процессе свертывания крови. Фосфатидилсерин (ФС)-положительные тромбоциты образуются при действии на клетки кальциевого ионофора A23187 [1] или активации тромбоцитов сильными агонистами, такими как коллаген (или коллаген-подобные пептиды), тромбин (или PAR1- и PAR4-активирующие пептиды) в высокой концентрации [2, 3]. ФС-положительные тромбоциты обладают высокой прокоагулянтной активностью [4], интенсивно образуют прокоагулянтные микровезикулы [5] и способны образовывать гетероагрегаты с активированными ФС-отрицательными

тромбоцитами [6]. Они обнаруживаются в тромбе *in vitro* [7], однако их функция на данный момент все же недостаточно ясна.

Исследование внутриклеточной сигнализации в ФС-положительных тромбоцитах сильно ограничено тем, что параллельно с экспозицией ФС в них происходит интенсивная перестройка цитоскелета [8], в результате чего ряд цитоскелетных белков (миозин, филамин, талин) протеолитически деградирует в результате кальций-индуцированной активации протеазы кальпаина [9, 10] и, возможно, как следствие этого, поскольку этот процесс ингибируется с помощью ингибиторов кальпаина, такие тромбоциты размываются при обработке их после фиксации раствором неионного детергента, такого как

Тритон X-100 [10], который наиболее широко используется для пермеабиллизации мембраны при анализе внутриклеточной сигнализации различных клеток.

В данной работе мы разработали протокол пермеабиллизации ФС-положительных тромбоцитов, полученных обработкой ионофором A23187, с использованием одного из наиболее слабых детергентов сапонины. Мы показали, что, в отличие от Тритона X-100, сапонин в значительно меньшей степени размывает фиксированные ФС-положительные тромбоциты и позволяет проанализировать их внутриклеточное содержимое. Мы использовали в качестве примера флуоресцентно-модифицированный фаллоидин, который специфически связывается с актином в полимеризованной форме, так называемым F-актином, и показали с помощью проточной цитометрии и конфокальной микроскопии, что в ФС-положительных тромбоцитах актин частично представлен в полимеризованной форме.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. Все реактивы были квалификации не ниже х. ч. (получены из Sigma, США).

Выделение, активация, фиксация, пермеабиллизация и окраска тромбоцитов. Кровь забирали на 3.8% цитрат натрия (9:1). После этого получали богатую тромбоцитами плазму центрифугированием крови при 120g в течение 10 мин. После отбора богатой тромбоцитами плазмы выделяли из нее тромбоциты центрифугированием при 500g в течение 5 мин. Полученные тромбоциты ресуспендировали в буфере А, рН 7.4 (150 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0.4 mM NaH₂PO₄, 20 mM HEPES, 5 mM глюкоза, 0.5% бычий сывороточный альбумин), разводили до концентрации 100 тыс/мкл и окрашивали CD61-Алекса Флуор 647 (BioLegend, США).

Тромбоциты активировали 10 мкМ кальциевого ионофора A23187 в присутствии 2.5 мкМ хлорида кальция 10 мин. Затем тромбоциты фиксировали добавлением свежеприготовленного раствора формальдегида из параформальдегида до 1% в течение 45 мин. После этого тромбоциты пермеабиллизовывали добавлением детергента Тритона X-100 (Sigma, США) или сапонины (Merck, Германия) до 0.1% в течение 10 мин. Для гашения непрореагировавшего формальдегида и предотвращения его неспецифического реагирования с добавляемыми внутриклеточными метками фиксированные пермеабиллизованные

тромбоциты инкубировали с 50 mM раствором глицина в буфере А в течение 30 мин при постоянном перемешивании. Затем центрифугировали тромбоциты при 1000g в течение 10 мин, удаляли супернатант и после этого окрашивали тромбоциты ресуспендированием осадка в 100 мкл буфера А с фаллоидином-ФИТЦ в течение 10 мин (конечная концентрация фаллоидина-ФИТЦ — 2.5 мкг/мл для проточной цитометрии и 5 мкг/мл для конфокальной микроскопии). Заметного осадка после центрифугирования в случае фиксированных пермеабиллизованных Тритоном X-100 тромбоцитов не было, а в случае пермеабиллизации сапонином был совсем небольшой осадок.

Проточная цитометрия. Окрашенные тромбоциты разбавляли буфером А в 20 раз до конечного объема 2 мл, инкубировали 15 мин при перемешивании и затем анализировали на проточном цитометре Accuri C6 (Accuri Cytometers, США). Данные были обработаны с помощью программы CFlow (Accuri Cytometers).

Конфокальная микроскопия. Окрашенные тромбоциты разбавляли буфером А до конечного объема 1 мл, тщательно перемешивали и центрифугировали при 1000g в течение 10 мин для удаления несвязавшегося красителя, после этого образец ресуспендировали в 50 мкл буфера А и анализировали на конфокальном микроскопе Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Германия). Данные были обработаны с помощью программы ImageJ.

Статистика. Данные приведены в виде среднего значения \pm ошибка среднего. Данные сравнивали с помощью критерия Манна–Уитни и считали различие значимым при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Мы проанализировали обработку фиксированных ФС-положительных тромбоцитов двумя детергентами, такими как Тритон X-100 и сапонин, отличающихся механизмом действия на мембрану при пермеабиллизации клеток. Как Тритон X-100, так и сапонин хорошо пермеабиллизуют неактивированные тромбоциты (рис. 1а–г). Мы регистрировали заметное (почти в 8 раз, рис. 1г) уменьшение числа событий в регионе тромбоцитов при использовании Тритона X-100 для пермеабиллизации ФС-положительных тромбоцитов ($p < 0.05$, $n = 3$), индуцированных активацией кальциевым ионофором A23187, в то же время мы отмечали уменьшение числа событий в гораздо меньшей степени (примерно в 1.8 раз, рис. 1г) при пермеабиллизации таких

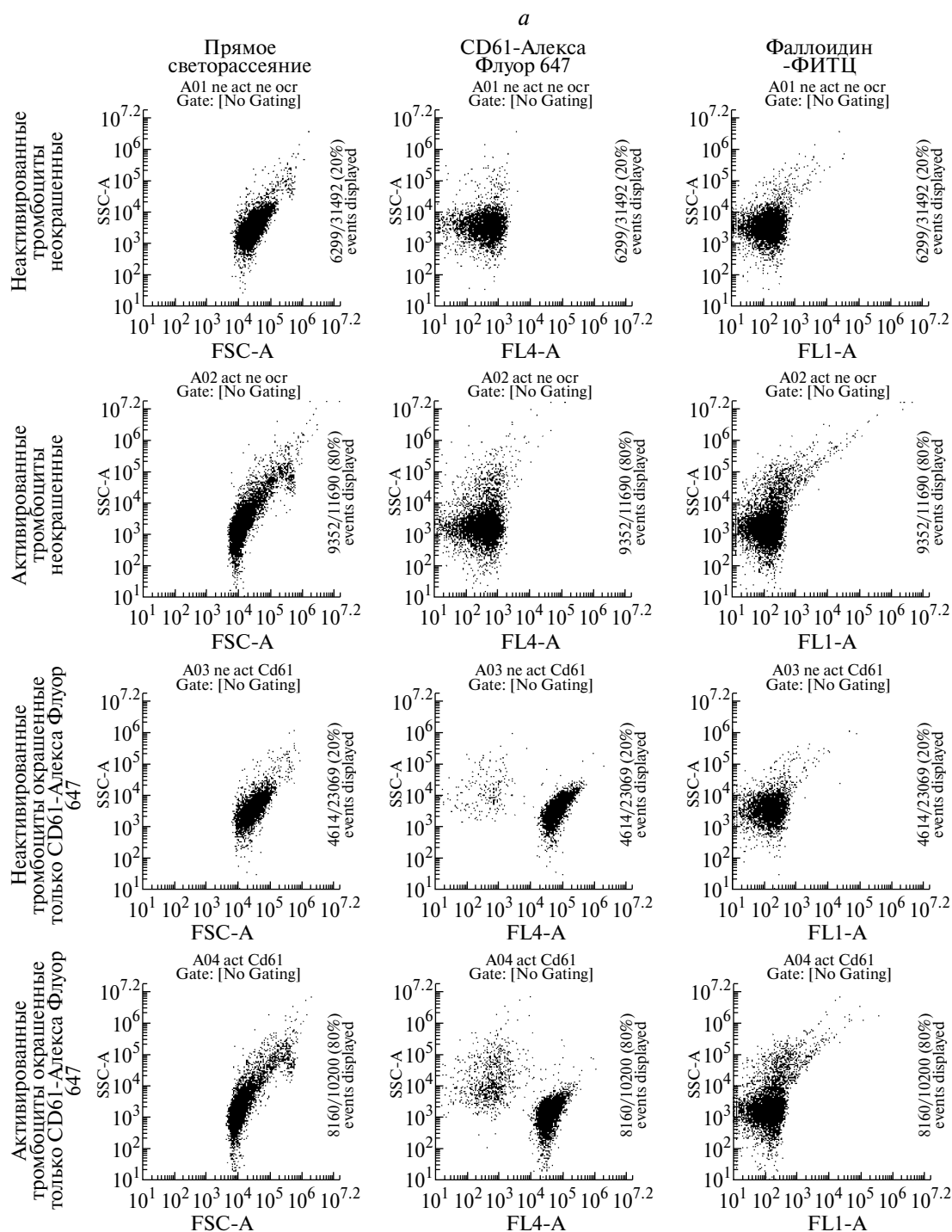


Рис. 1. Проточная цитометрия для неактивированных и активированных A23187 тромбоцитов (н/а – неактивированные, A23187 – активированные ФС-положительные). *a–в* – Приведены дот-плоты типичных экспериментов ($n = 3$). Первый столбец показывает FSC – прямое светорассеяние, второй столбец FL4-A – флуоресценция CD61-Алекса Флуор 647, третий столбец FL1-A – флуоресценция фаллоидина-ФИТЦ; SSC – боковое светорассеяние. *г* – Приведены усредненные данные по трем донорам, количество тромбоцитов без обработки их детергентом взято за 1. *д* – Приведены относительные значения флуоресценции окрашивания фаллоидином-ФИТЦ фиксированных тромбоцитов после их пермеабиллизации ($n = 3$).

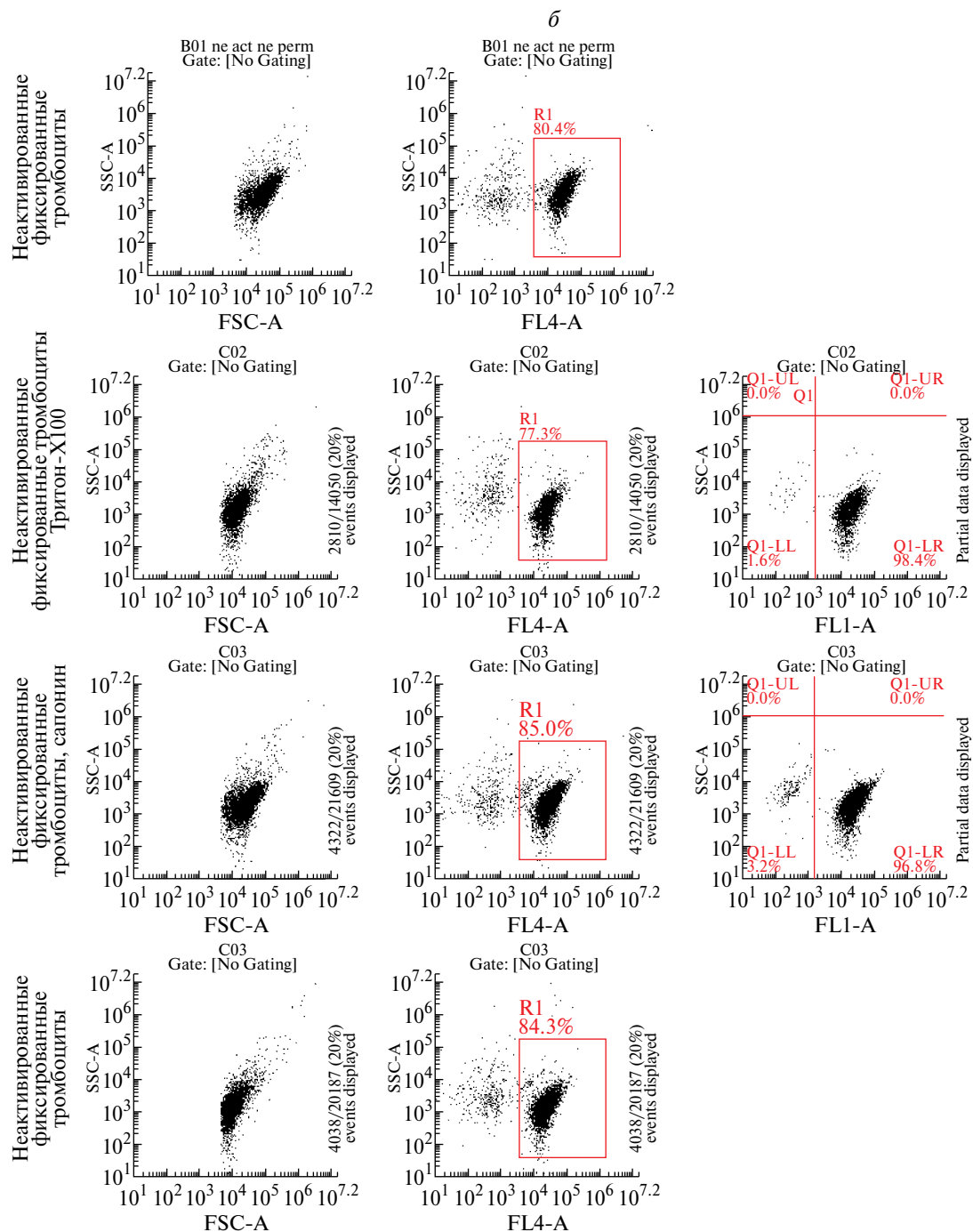


Рис. 1. Продолжение.

тромбоцитов сапонином ($p > 0.05$, $n = 3$). Наши результаты показывают, что для пермеабилзации неактивированных тромбоцитов подходят оба использованных нами детергента, в то время как для пермеабилзации ФС-положительных тромбоцитов гораздо более предпочтителен сапонин, чем Тритон X-100 (рис. 1а–1г), хотя сапонин также приводит к снижению количества

пермеабилзованных фиксированных тромбоцитов, однако далеко не в такой значительной степени как Тритон X-100.

В качестве внутриклеточного маркера мы использовали флуоресцентно-меченный фаллоидин, который связывается с полимеризованной формой актина, так называемым F-актином. Из наших результатов (рис. 1д) видно, что не только

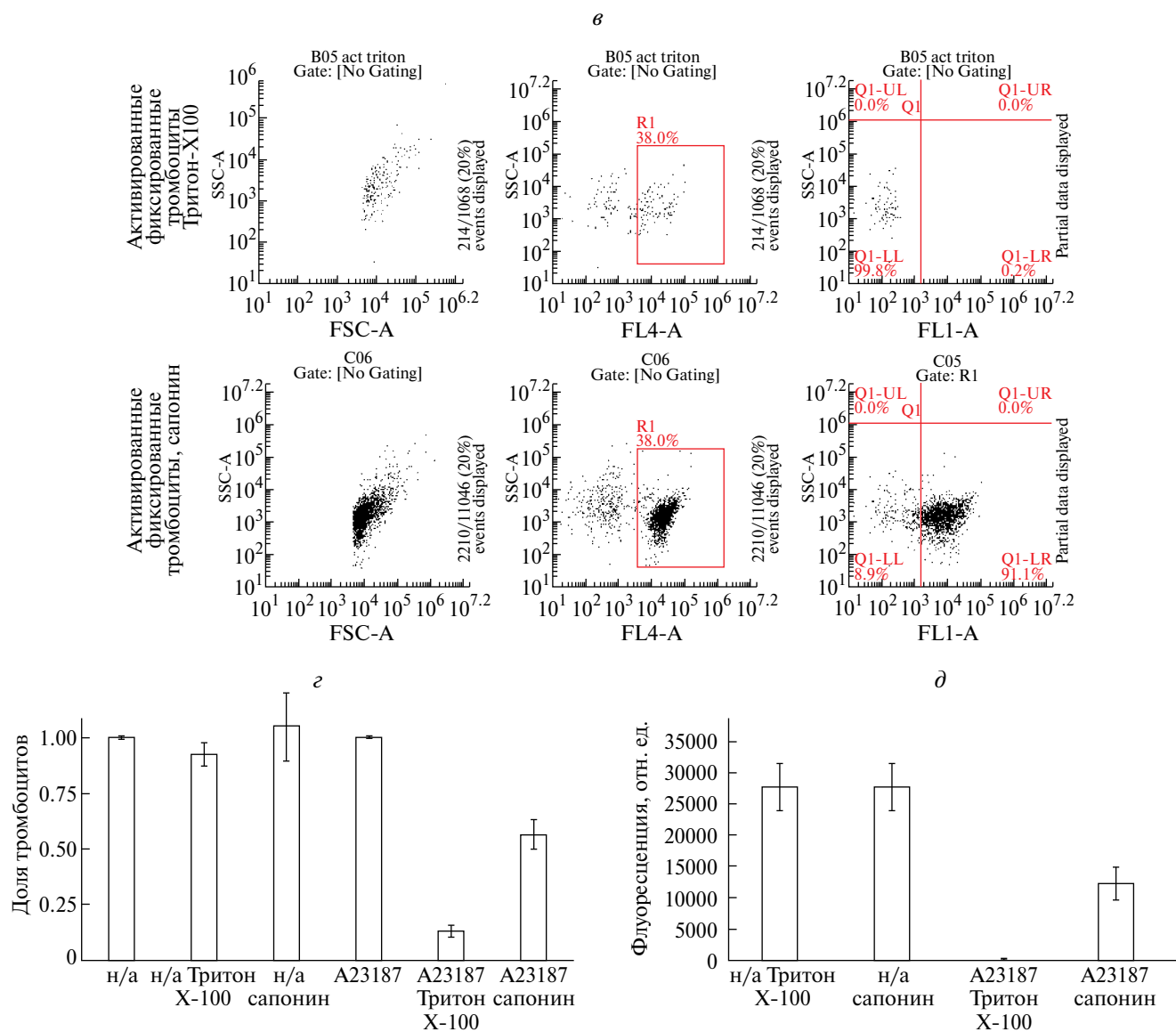


Рис. 1. Продолжение.

неактивированные, но и ФС-положительные тромбоциты, полученные активацией кальциевым ионофором A23187, хорошо окрашиваются с помощью фаллоидин-ФИТЦ. Это предполагает, что несмотря на значительную перестройку цитоскелета в таких тромбоцитах, они также содержат актин в полимеризованной форме, хотя и в меньшем количестве, чем неактивированные тромбоциты.

В качестве дополнительного контроля состояния фиксированных ФС-положительных тромбоцитов, полученных активацией кальциевым ионофором A23187, после их пермеабиллизации сапонином мы использовали конфокальную микроскопию для их визуализации (рис. 2).

Из полученных данных видно, что пермеабиллизация сапонином не влияет заметным образом на визуализирующуюся конфокальной микроскопией структуру таких тромбоцитов (рис. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе мы проанализировали действие двух различных детергентов на пермеабиллизацию предварительно фиксированных ФС-положительных тромбоцитов. Мы показали, что использование такого детергента, как сапонин, позволяет в значительной степени сохранить структуру тромбоцита, в то время как использование такого широко известного детергента,

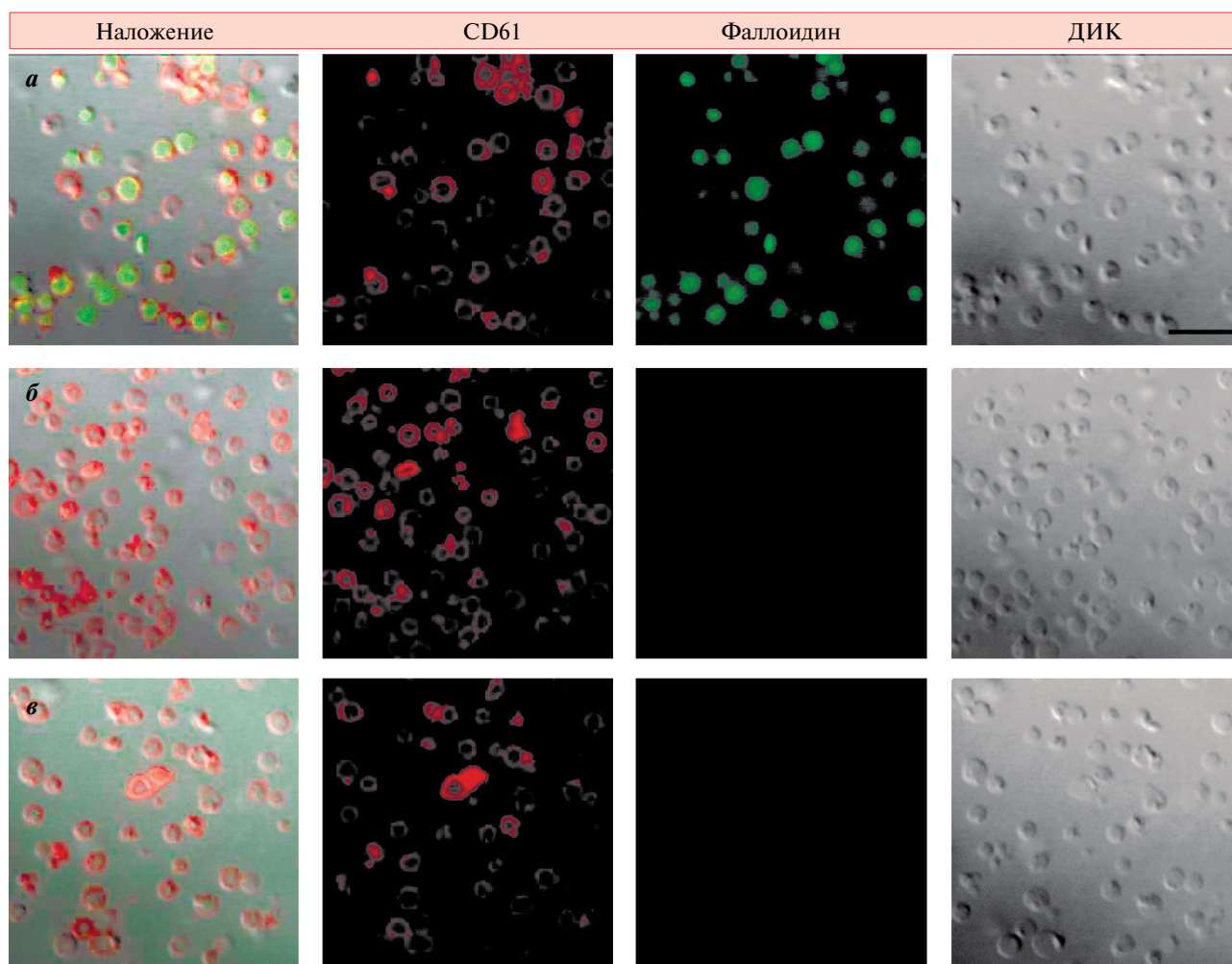


Рис. 2. Исследование структуры ФС-положительных тромбоцитов, полученных активацией ионофором A23187, с помощью конфокальной микроскопии. *а* – Фиксированные ФС-положительные тромбоциты, пермеабилizованные сапонином, окрашенные CD61-Алекса Флуор 647 и фаллоидином-ФИТЦ. *б* – Фиксированные ФС-положительные тромбоциты, непермеабилizованные, окрашенные только CD61-Алекса Флуор 647. *в* – Фиксированные ФС-положительные тромбоциты, пермеабилizованные сапонином, окрашенные только CD61-Алекса Флуор 647. ДИК – дифференциальный интерференционный контраст. Шкала равна 10 мкм.

как Тритон X-100, для пермеабилizации в значительной степени разрушает фиксированный ФС-положительный тромбоцит. Мы на примере внутриклеточного актина показали, что в ФС-положительных тромбоцитах актин хотя бы частично содержится в полимеризованной форме, что до сегодняшнего дня не было исследовано. Данный результат интересен в контексте анализа внутриклеточной структуры ФС-положительных тромбоцитов, которая до настоящего времени остается малоисследованной. Мы предполагаем также, что наш подход может быть использован в дальнейшем для пермеабилizации ФС-положительных тромбоцитов и для анализа внутриклеточной сигнализации в таких тромбоцитах, которая остается относительно малоизученной

именно в результате отсутствия простых методик, позволяющих анализировать состояние белков в таких тромбоцитах.

ФС-положительные тромбоциты были открыты в 2002 году [11] и после этого неуклонно привлекали интерес исследователей своим существованием. Была сделана одна попытка изучить внутриклеточную сигнализацию в таких тромбоцитах [12], однако предложенная для исследования методика выделения ФС-положительных тромбоцитов была крайне трудоемкой и не гарантировала сохранение целостности такого тромбоцита. Несколько позже была предложена методика анализа фиксированных ФС-положительных тромбоцитов [13], однако пермеабилizация для них до сих пор не была разработана.

Согласно имеющимся данным, такой детергент, как Тритон X-100, неселективно вымывает липиды из клеточных мембран [14] и вместе с ними частично может вымывать белковые комплексы, в то время как сапонин, как полагают, экстрагирует из мембран преимущественно холестерин, что приводит к формированию пор в мембране [14]. Разница в подобных механизмах предполагает, что использование этих двух детергентов может давать совершенно разный результат при иммуноокрашивании и их применение зависит от анализируемого внутриклеточного белка. Наши данные показывают, что при использовании Тритона X-100 для пермеабилзации фиксированных ФС-положительных тромбоцитов они в значительной степени размываются (рис. 1), вероятно, за счет вымывания белковых комплексов вместе с экстрагируемыми липидами, в то время как при использовании сапонины такого значительного размывания не происходит (рис. 1, 2).

В качестве анализируемого внутриклеточного маркера мы выбрали полимеризованный актин, с которым специфически связывается использованный нами флуоресцентно-меченный фаллоидин. Наши результаты, полученные как проточной цитометрией, так и конфокальной микроскопией, показывают, что ФС-положительные тромбоциты довольно интенсивно окрашиваются ФИТЦ-фаллоидином (рис. 1, 2), что предполагает, что в таких тромбоцитах актин находится в полимеризованной форме, несмотря на происходящую при их формировании интенсивную перестройку цитоскелета. Это допускает возможность использования такой мягкой пермеабилзации фиксированных ФС-положительных тромбоцитов сапонином для анализа и других внутриклеточных маркеров в ФС-положительных тромбоцитах, в том числе и сигнальных молекул, по крайней мере, в ассоциированной с цитоскелетом фракции, поскольку цитоскелет при такой пермеабилзации заметно не размывается.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы предполагаем, что предложенный нами подход позволит анализировать внутриклеточные маркеры, как структурные, так и сигнальные, ассоциированные с цитоскелетом, в фосфатидилсерин-положительных тромбоцитах с помощью проточной цитометрии и/или конфокальной микроскопии и поможет значительно расширить наши представления о структуре и сигнализации в таких тромбоцитах.

Вклад авторов. Е.О. Артеменко — проведение экспериментов на проточном цитометре, написание текста, С.И. Обыденный — проведение экспериментов на конфокальном микроскопе, М.А. Пантелеев — концепция и руководство работой.

Источники финансирования. Работа была поддержана грантом Российского научного фонда 23-75-10120.

Конфликт интересов. Авторы не имеют конфликта интересов.

Соответствие принципам этики. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием людей, соответствуют этическим стандартам национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bevers E.M., Tilly R.H., Senden J.M., Comfurius P., Zwaal R.F. 1989. Exposure of endogenous phosphatidylserine at the outer surface of stimulated platelets is reversed by restoration of aminophospholipid translocase activity. *Biochemistry*. **28** (6), 2382–2387. doi 10.1021/bi00432a007
2. Kotova Y.N., Ataullakhanov F.I., Panteleev M.A. 2008. Formation of coated platelets is regulated by the dense granule secretion of adenosine 5'diphosphate acting via the P2Y₁₂ receptor. *J. Thromb. Haemost.* **6** (9), 1603–1605. doi 10.1111/j.1538-7836.2008.03052.x
3. Podoplelova N.A., Nechipurenko D.Y., Ignatova A.A., Sveshnikova A.N., Panteleev M.A. 2021. Procoagulant platelets: Mechanisms of generation and action. *Hamostaseologie*. **41** (2), 146–153. doi 10.1055/a-1401-2706
4. Dale G.L. 2005. Coated-platelets: An emerging component of the procoagulant response. *J. Thromb. Haemost.* **3** (10), 2185–2192. doi 10.1111/j.1538-7836.2005.01274.x
5. Sinauridze E.I., Kireev D.A., Popenko N.Y., Pichugin A.V., Panteleev M.A., Krymskaya O.V., Ataullakhanov F.I. 2007. Platelet microparticle membranes have 50- to 100-fold higher specific procoagulant activity than activated platelets. *Thromb. Haemost.* **97** (3), 425–434.
6. Yakimenko A.O., Verholomova F.Y., Kotova Y.N., Ataullakhanov F.I., Panteleev M.A. 2012. Identification of different proaggregatory abilities of activated platelet subpopulations. *Biophys. J.* **102** (10), 2261–2269. doi 10.1016/j.bpj.2012.04.004.

7. Nechipurenko D.Y., Receveur N., Yakimenko A.O., Shepelyuk T.O., Yakusheva A.A., Kerimov R.R., Obydennyi S.I., Eckly A., Léon C., Gachet C., Grishchuk E.L., Ataulakhanov F.I., Mangin P.H., Panteleev M.A. 2019. Clot contraction drives the translocation of procoagulant platelets to thrombus surface. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **39** (1), 37–47. doi 10.1161/ATVBAHA.118.311390
8. Gaffet P., Bettache N., Bienvenüe A. 1995. Phosphatidylserine exposure on the platelet plasma membrane during A23187-induced activation is independent of cytoskeleton reorganization. *Eur. J. Cell Biol.* **67** (4), 336–345.
9. Verhallen P.F., Bevers E.M., Comfurius P., Zwaal R.F. 1987. Correlation between calpain-mediated cytoskeletal degradation and expression of platelet procoagulant activity. A role for the platelet membrane-skeleton in the regulation of membrane lipid asymmetry? *Biochim. Biophys. Acta.* **903** (1), 206–217. doi 10.1016/0005-2736(87)90170-2
10. Artemenko E.O., Yakimenko A.O., Pichugin A.V., Ataulakhanov F.I., Panteleev M.A. 2016. Calpain-controlled detachment of major glycoproteins from the cytoskeleton regulates adhesive properties of activated phosphatidylserine-positive platelets. *Biochem. J.* **473** (4), 435–448. doi 10.1042/BJ20150779
11. Dale G.L., Friese P., Batar P., Hamilton S.F., Reed G.L., Jackson K.W., Clemetson K.J., Alberio L. 2002. Stimulated platelets use serotonin to enhance their retention of procoagulant proteins on the cell surface. *Nature.* **415** (6868), 175–179. doi 10.1038/415175a.
12. Pasquet J.M., Dachary-Prigent J., Nurden A.T. 1998. Microvesicle release is associated with extensive protein tyrosine dephosphorylation in platelets stimulated by A23187 or a mixture of thrombin and collagen. *Biochem. J.* **333** (Pt 3), 591–599. doi 10.1042/bj3330591
13. Rochat S., Alberio L. 2015. Formaldehyde-fixation of platelets for flow cytometric measurement of phosphatidylserine exposure is feasible. *Cytometry A.* **87** (1), 32–36. doi 10.1002/cyto.a.22567
14. Jamur M.C., Oliver C. 2010. Permeabilization of cell membranes. *Methods Mol. Biol.* **588**, 63–66. doi 10.1007/978-1-59745-324-0_9

Approach for Analysis of Intracellular Markers in Phosphatidylserine-Positive Platelets

E. O. Artemenko^{1, 2, *}, S. I. Obydennyi^{1, 2}, M. A. Panteleev^{1, 2, 3}

¹Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology, Moscow, 109029 Russia

²National Scientific and Practical Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, 117997 Russia

³Moscow Lomonosov State University, Faculty of Physics, Moscow, 119991 Russia

Phosphatidylserine (PS)-positive platelets play an important role in thrombosis and hemostasis. They have high procoagulant activity, the ability to vesiculate, and can aggregate with activated PS-negative platelets. They are found in growing thrombus *in vitro*, but there remain a number of mysteries associated with them. In particular, intracellular signaling and cytoskeletal reorganization in these platelets is very poorly studied, because they are destroyed upon permeabilization, which is necessary for antibodies to intracellular markers to penetrate the cell. In this work, we propose an approach that allows the analysis of intracellular signaling in calcium ionophore A23187-induced PS-positive platelets using flow cytometry or confocal microscopy. We used the mildest permeabilization of fixed PS-positive platelets using saponin and showed that such permeabilization allows us to preserve PS-positive platelets. As an example, we analyzed the state of the polymerized form of actin in PS-positive platelets and showed that, despite the significant rearrangement of the cytoskeleton that occurs upon activation in such platelets, actin in them is partially presented in a polymerized form.

Keywords: hemostasis, platelets, phosphatidylserine, flow cytometry, confocal microscopy