

На правах рукописи

Обыденный Сергей Иванович

**ДИНАМИКА И МЕХАНИЗМЫ ОБРАЗОВАНИЯ
ПРОКОАГУЛЯНТНОЙ СУБПОПУЛЯЦИИ ТРОМБОЦИТОВ**

03.01.02 – биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва

2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Центре теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук

Научный руководитель:

Пантелеев Михаил Александрович

Доктор физико-математических наук, профессор, ВРИО директора Федерального государственного бюджетного учреждения науки Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН

Официальные оппоненты:

Зинченко Валерий Петрович

Доктор биологических наук, Заведующий лабораторией внутриклеточной сигнализации Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биофизики клетки РАН

Горудко Ирина Владимировна

Кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории биофизики и биотехнологии физического факультета Белорусского государственного университета

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение "Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального Медико-биологического Агентства"

Защита диссертации состоится «__» февраля 2020 года в __ часов __ минут на заседании Диссертационного совета Д 002.039.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук по адресу: 119334, Москва, ул. Косыгина, д. 4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук по адресу: 119991, г. Москва, Ленинский проспект, дом 38 и на сайте: https://ibcp.chph.ras.ru/docs/Dissertatsia_Obydennyi.pdf

Автореферат разослан «__» _____ 2019 года

Ученый секретарь
Диссертационного совета,
кандидат химических наук

Д 002.039.01,
Л.И.Мазалецкая

Актуальность темы

Система гемостаза человека, состоящая из плазменного и тромбоцитарно-сосудистого звена, играет ключевую роль в поддержании целостности сосудистой системы, репарации тканей, ангиогенезе и иммунитете. Нарушения в её работе могут привести к кровотечениям или тромбозам; в совокупности, они являются ведущей причиной смертности и инвалидности в современном мире. Тромбоциты – безъядерные клетки крови, циркулирующие в крови в неактивном состоянии, в ответ на действие физиологических активаторов, таких как тромбин и коллаген, переходят в активное состояние и разделяются на две субпопуляции, отличающиеся по составу белков на поверхности, морфологии и свойствам: одна из субпопуляций значительно ускоряет свертывание крови – обладает прокоагулянтной активностью. То есть можно говорить о трех состояниях: неактивированные и два активных состояния/субпопуляции, означающие «выбор» клетками специализации. Различают следующие субпопуляции: 1) активированные, но не-прокоагулянтные тромбоциты – не обладают свойством ускорять процессы свёртывания, но содержат активированные интегрин (трансмембранные белки взаимодействия клетки с межклеточным матриксом), за счёт которых они способны к агрегации; 2) прокоагулянтные тромбоциты – обладают свойством ускорять свертывание крови до пяти порядков посредством отрицательно заряженных фосфолипидов, выступающих в роли площадок на поверхности клеток «собирающих» комплексы из факторов свертывания: внутреннюю теназу и протромбиназу. Такие клетки не агрегируют сами по себе, но имеют на своей поверхности белки из альфа-гранул и их цитоскелет деградирован. В клинических исследованиях показано, что количество прокоагулянтных тромбоцитов коррелирует с некоторыми патологиями. Это значит, что они могут играть роль причин или следствий в патологических процессах и в связи с этим имеют перспективы использоваться как факторы лечения или диагностики. Именно с этим связан практический интерес к феномену субпопуляций тромбоцитов. Понимание механизмов образования субпопуляций тромбоцитов позволит в конечном счете либо найти новые способы лечения заболеваний, связанных с опасными для жизни кровотечениями или тромбозами или усовершенствовать способы диагностики.

Субпопуляции тромбоцитов не являются predetermined, а зависят от степени активации: разное число тромбоцитов может стать прокоагулянтными. Имеются противоречивые гипотезы, что на распределение тромбоцитов по субпопуляциям при активации влияют динамика цитоплазматического кальция (стабильно высокий уровень кальция после стимуляции) в активированных тромбоцитах и состояние митохондрий (формирование митохондриальной поры), но взаимосвязь этих процессов в клетке при формировании субпопуляций практически не изучена. Для разрешения этих противоречий требуется одновременно изучить динамику цитоплазматического кальция и состояние митохондрий отдельных тромбоцитов в процессе активации и формирования прокоагулянтной субпопуляции.

Цель и задачи исследования

Целью исследования было выявление механизмов формирования прокоагулянтной субпопуляции активированных тромбоцитов и анализ распределения альфа-гранулярных белков по их поверхности.

В данной работе поставлен ряд научных задач:

1. Разработать методику для одновременного измерения концентрации цитоплазматического кальция, кальция в митохондриях, потенциала митохондриальной мембраны и выхода фосфатидилсерина в субпопуляциях тромбоцитов.
2. Исследовать динамику и связь этих показателей при активации тромбоцитов тромбином и пептидом, стимулирующим тромбиновый рецептор PAR1.
3. Выявить свойства индивидуальных тромбоцитов, предрасполагающие к переходу в прокоагулянтное состояние.
4. Охарактеризовать распределение альфа-гранулярных белков на поверхности прокоагулянтной субпопуляции тромбоцитов.

Научная новизна

Впервые были получены одновременные динамики концентрации цитоплазматического кальция, потенциала митохондриальной мембраны и выхода фосфатидилсерина на внешнюю сторону мембраны для индивидуальных тромбоцитов при активации. Все три процесса были тесно связаны друг с другом по времени и занимали десятки секунд. Был установлен предрасполагающий к переходу в прокоагулянтное состояние фактор – уровень цитоплазматического кальция в тромбоците до активации: тромбоциты с более высоким кальцием чаще становятся прокоагулянтными в ответ на активацию. Обнаружено, что альфа-гранулярные белки распределены не по всей поверхности тромбоцита, как считалось ранее, а сосредоточены в небольшой выпуклой структуре, названной "шапкой", в которой присутствуют фибриноген, тканевая трансглутаминаза, фактор XIIIa, тромбоспондин. Показано, что именно эта структура отвечает за адгезионные свойства прокоагулянтных тромбоцитов.

Научно-практическое значение

Пациенты с синдромом Скотта, редким генетическим заболеванием, не имеющие прокоагулянтной субпопуляции тромбоцитов, подвержены длительным кровотечениям при повреждении сосудов. Доля прокоагулянтной субпопуляции имеет корреляцию с риском различных сердечно-сосудистых заболеваний. Все эти данные свидетельствуют о значимости прокоагулянтной субпопуляции тромбоцитов в тромбообразовании и свёртывании крови. Понимание процессов, ведущих к образованию прокоагулянтной субпопуляции тромбоцитов, в перспективе позволит найти точки фармакологического воздействия для увеличения или уменьшения доли этой субпопуляции тромбоцитов, с целью снижения рисков возникновения патологических ситуаций в работе сердечно-сосудистой системы.

Методология и методы исследования

Для наблюдения за динамиками внутриклеточных процессов использовался конфокальный микроскоп Zeiss Cell Observer Z1 с диском Нипкова и флуоресцентные зонды на внутриклеточный кальций (Fura Red, Fluo-3), митохондриальный потенциал и кальций (TMRM, Rhod-2) и индикатор выхода фосфатидилсерина (аннексин V). Для исследования локализации альфа-гранулярных белков на поверхности тромбоцитов использовались меченные флуоресцентными белками антитела к конкретным белкам: фибрин(оген)у, фактору XIIIa, тромбоспондину, тканевой трансглутаминазе и т. д. с последующей визуализацией при помощи конфокальной микроскопии. Для анализа полученных данных применялось программное обеспечение ImageJ и AxioVision (Zeiss). Морфология «шапки» прокоагулянтной субпопуляции тромбоцитов исследовалась методами электронной просвечивающей микроскопии.

Положения, выносимые на защиту

1. Разработана методика по одновременному измерению внутриклеточного кальция, потенциала митохондриальной мембраны, митохондриального кальция и выхода фосфатидилсерина в активированных тромбоцитах.
2. Выявлена последовательность внутриклеточных процессов, ведущих тромбоцит к смерти: активация тромбоцита запускает в нем кальциевые осцилляции, способствующие накоплению кальция в митохондриях, затем происходит коллапс митохондрий, повышается уровень внутриклеточного кальция, и следом происходит экспонирование фосфатидилсерина. Стабильно высокий уровень цитоплазматического кальция не является первичной причиной формирования прокоагулянтной субпопуляции тромбоцитов.
3. Тромбоциты с меньшим числом митохондрий и большей концентрацией цитоплазматического кальция в покое имеют большую вероятность стать прокоагулянтными в ответ на активацию в рамках настоящей экспериментальной модели.
4. Показано существование мембранной субклеточной структуры прокоагулянтных тромбоцитов, названной «шапкой» и представляющей из себя небольшую выпуклую область, содержащую остатки органелл и богатую прокоагулянтными белками, через которую опосредована агрегация прокоагулянтных клеток с другими тромбоцитами.

Личный вклад автора

Все представленные в работе результаты и их анализ получены лично автором диссертации. Автор принимал непосредственное участие в написании статей, их публикации и представлении работ на российских и международных конференциях.

Достоверность и обоснованность результатов

В работе использовалось высокоточное современное оборудование и методы. Для проверки достоверности и обоснованности микроскопических экспериментов

производились контроли, подтверждающие наблюдаемый эффект. Для сравнения числовых данных использовались методы статистической обработки: критерий Стьюдента, непараметрический критерий Манна-Уитни.

Апробация работы

Результаты диссертации были представлены на следующих конференциях: 1) IV Съезд биофизиков России. 20-26 августа 2012 г. Нижний Новгород, Россия; 2) 1st EUPLAN Platelet Conference, Maastricht, September 2012. - Maastricht; 3) VI Всероссийская конференция «Клиническая гемостазиология и гемореология в сердечно-сосудистой хирургии» 2013 Москва, Россия; 4) The XXIV congress of the ISTH 2013, Amsterdam, Netherlands; 5) 38th FEBS Congress, Saint Petersburg, Russia, July 6–11, 2013; 6) 47th Nordic Coagulation Meeting, Visby, Sweden 10-12 September 2014; 7) The XXV congress of the ISTH 2015, Toronto, Canada; 8) V Съезд биофизиков России 2015, Ростов-на-Дону; 9) The ISTH's Scientific and Standardization Committee 2016, Montpellier, France; 10) III Конгресса гематологов России. Гематология и трансфузиология. 2016; 11) V съезд физиологов СНГ. V съезд биохимиков России, 2016, Сочи, Россия 4–8 октября; 12) Реабилитация и профилактика–2016, Москва, Россия; 13) The XXVI congress of the ISTH 2017, Berlin, Germany; 14) VI съезд физиологов СНГ, 2017, Воронеж, Россия. По результатам работы опубликовано 29 публикаций. Статей в рецензируемых журналах – 10; тезисов конференций – 19.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из 105 страниц, содержит разделы: введение, обзор литературы, методы и материалы, результаты, обсуждение, заключение, выводы, список сокращений, список цитированных источников (93 библиографические ссылки). Количество рисунков 41.

Основное содержание работы

Во «Введении» раскрыта актуальность исследования, обозначены цель и задачи, и дана характеристика работы. Глава 1 посвящена описанию тромбоцитов и их функций в свертывании крови. Рассматриваются морфология, рецепторы и агонисты, приводящие к активации тромбоцитов и формированию исследуемых субпопуляций тромбоцитов: прокоагулянтной и проагрегантной (непрокоагулянтной). Описана кальциевая сигнализация тромбоцитов в ответ на активацию. Изложены известные факты и свойства субпопуляций в соответствии с текущим состоянием мировой науки в этой области, а также представлены существующие гипотезы о механизмах формирования прокоагулянтной субпопуляции тромбоцитов. Глава 2 состоит из перечня материалов и описания применяемых в работе техник и методов. Забор крови производился у здоровых доноров в вакуумные пробирки с 3.8% цитрата натрия. Тромбоциты выделялись путем последовательного центрифугирования цельной крови и затем отобранной богатой тромбоцитами плазмы. Основным инструментом данного исследования - конфокальный микроскоп Zeiss Cell Observer Z1 с конфокальным

модулем на основе диска Нипкова, позволяющим при помощи флуоресцентных зондов снимать образец в нескольких флуоресцентных каналах с высокой частотой. Для детекции кальциевой сигнализации использовались кальциевые индикаторы Fura Red, Fluo-3, Rhod-2; для оценки митохондрий – TMRM (индикатор потенциала митохондриальной мембраны), NAO (метка на кардиолипин); для определения момента выхода фосфатидилсерина – меченный флуоресцентными метками аннексин V, для определения локализации фибри(оген)а, тромбоспондина, тканевого фактора, фактора XIIIa, П-селектина – соответствующие им антитела. Электронная микроскопия использовалась для исследования ультраструктуры субпопуляций активированных тромбоцитов. Глава 3 содержит основные результаты, полученные в ходе исследования, и их обсуждение.

Локализация альфа-гранулярных белков и трансглутаминаз на поверхности прокоагулянтной субпопуляции тромбоцитов

Очищенные на гель-хроматографической колонке от плазматических белков тромбоциты крови человека активировались при помощи тромбина в течение 15 минут и затем окрашивались антителами к фибрин(оген)у и аннексином V для определения прокоагулянтных тромбоцитов. Было установлено, что фибрин(оген) распределён не по всей поверхности прокоагулянтных тромбоцитов, а локализован в небольшой области на клетке (рисунок 1).

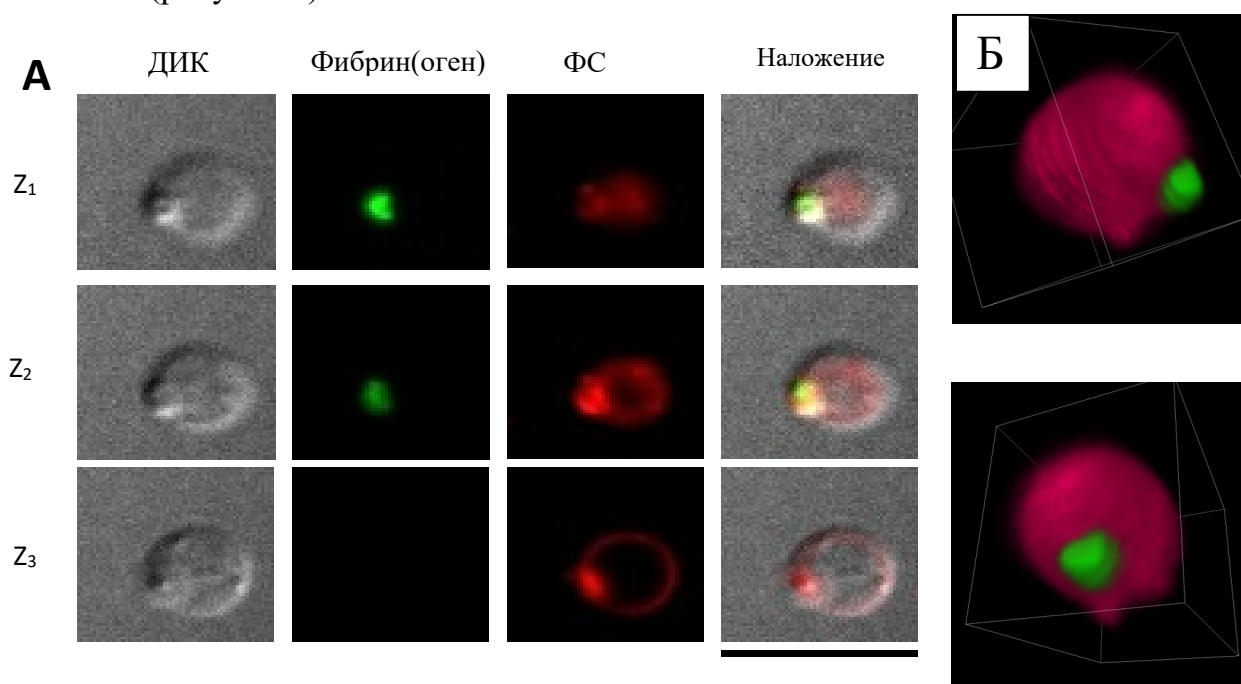


Рисунок 1. А - Локализация фибрина на поверхности укутанного тромбоцита. Конфокальная микроскопия. Z_1 , Z_2 и Z_3 – оптические срезы клетки. ФС – фосфатидилсерин, ДИК – дифференциально-интерференционный контраст. Масштабный отрезок 10 мкм. Б - 3d реконструкция этой клетки: фосфатидилсерин – красный, фибрин(оген) – зеленый.

Изучение локализации тромбоспондина, фактора XIIIa и тканевой трансглутаминазы на тромбоцитах показало, что они так же локализованы в небольшой области на прокоагулянтных тромбоцитах и их положение полностью совпадает с

локализацией фибриногена (рисунок 2). Было введено обозначение этой области - альфа-гранулярная шапка прокоагулянтного тромбоцита (сокр. шапка). По микрофотографиям было установлено, что альфа-гранулярная шапка прокоагулянтных тромбоцитов представляет собой структуру, отличающуюся от остальной части клетки (рисунки 1,2)

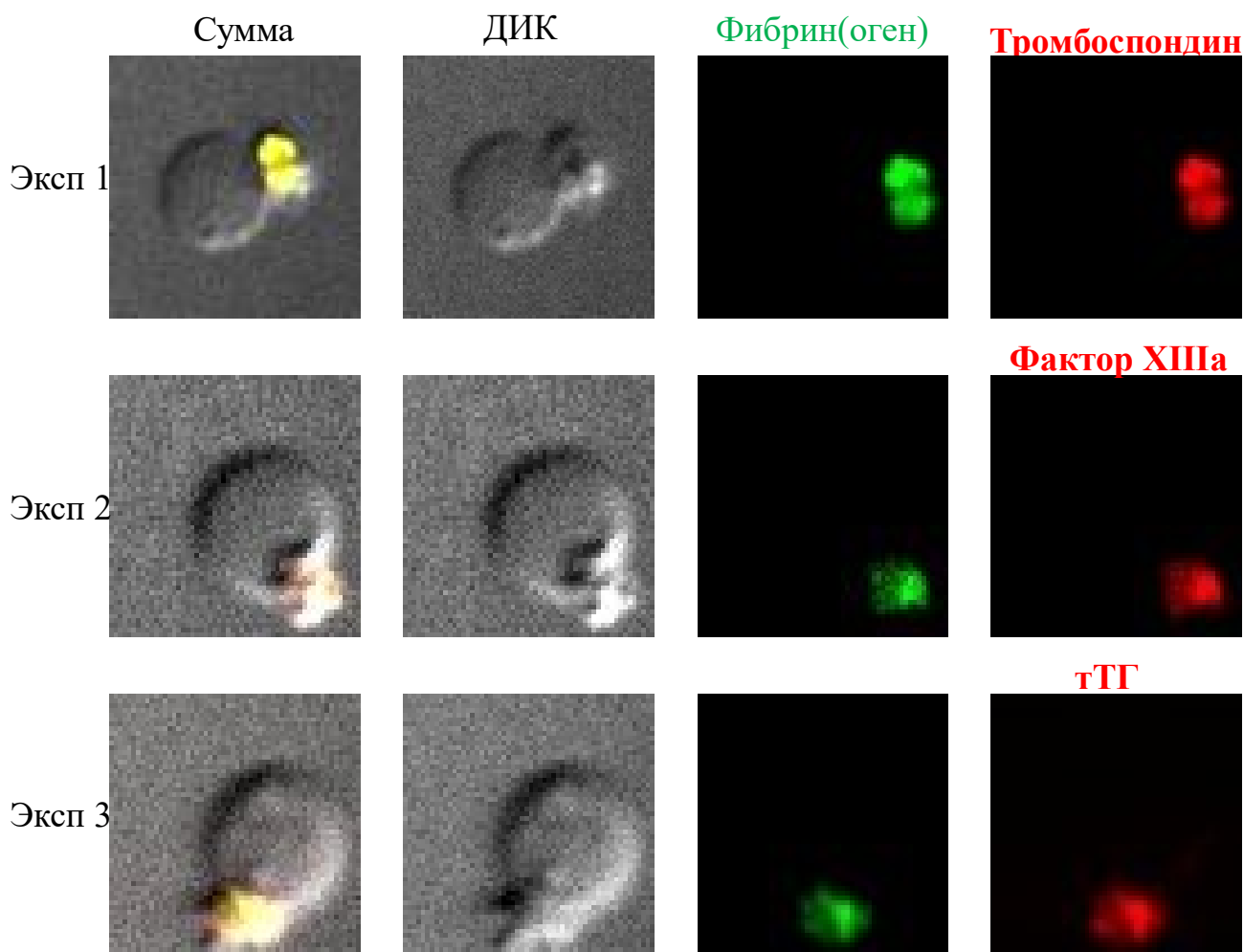


Рисунок 2. Эксп 1: колокализация фибрин(оген)а с тромбоспондином; Эксп 2: колокализация фибрин(оген)а с активной формой фактора XIIIa; Эксп 3: колокализация фибрин(оген)а с тканевой трансглутаминазой (tTG). Конфокальная микроскопия.

Отдельный интерес для изучения составляли агрегаты активированных тромбоцитов с участием прокоагулянтной субпопуляции. В проведенных экспериментах было показано, что в агрегатах, состоящих только из прокоагулянтных клеток, а так же из обеих субпопуляций, прокоагулянтные клетки были соединены с любыми другими исключительно через альфа-гранулярную шапку, как показано на трёхмерной реконструкции (рисунок 3).

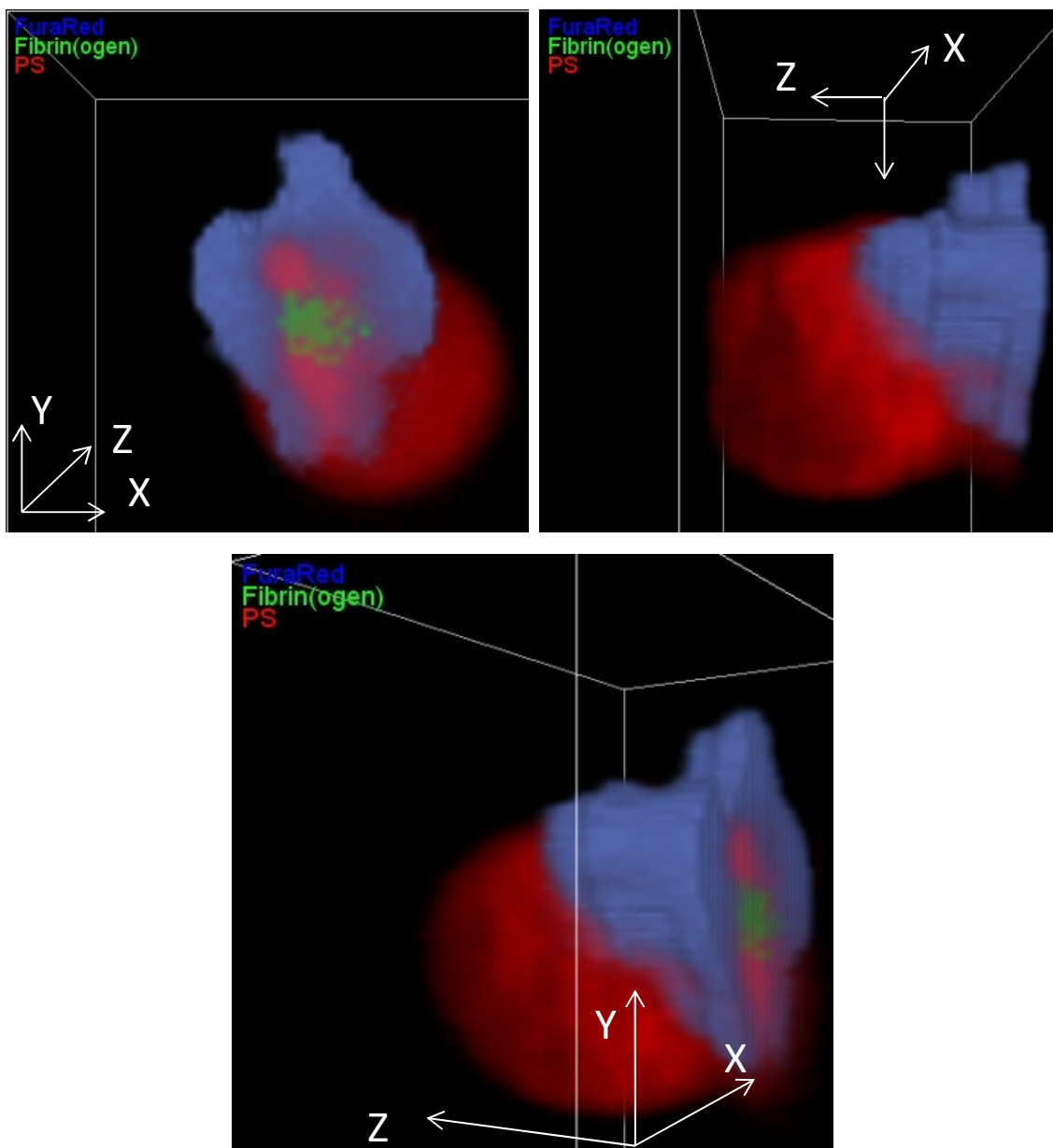


Рисунок 3. Трехмерная реконструкция агрегата, состоящего из двух клеток разных субпопуляций. Красный – фосфатидилсерин, зеленый – фибрин(оген), синий – краска Fura Red на Ca^{2+} . Прокоагулянтный тромбоцит окрашен красным и прикреплен к непрокоагулянтному – синему – через шапку фибрин(оген)а – зелёная. Длина и ширина плоскости XY составляют по 9.1 мкм, полная высота 5.4 мкм по оси Z.

Ультраструктура прокоагулянтных тромбоцитов

Электронная просвечивающая микроскопия применялась для исследования ультраструктуры альфа-гранулярной шапки прокоагулянтных тромбоцитов. Активированные 100 нМ раствором тромбина и 20мкг/мл коллаген-ассоциированным пептидом тромбоциты фиксировались 2.5% глутаровым альдегидом, постфиксировались 1% тетраоксидом осмия, дегитратировались, заливались в эпоксидную смолу Epon 812, нарезались на ультрамикротоме, контрастировались уранилацетатом и цитратом свинца и затем исследовались на электронном микроскопе.

Прокоагулянтные тромбоциты представляли собой шарообразные клетки с редко встречающимися органеллами и содержимым более низкой плотности, относительно непрокоагулянтных тромбоцитов.

Плотность шапки была выше, чем содержимое шарообразной части клетки, но менее плотной (рисунок 4), чем непрокоагулянтные тромбоциты (рисунок 5). Так же шапка имела более сложное строение, нежели круглая часть клетки - в неоднородности не различим внешний контур мембран, а структура имеет губчатое строение со складками мембран и везикул, а так же запутавшимися в этой сети некоторыми органеллами, такими как митохондрии. Такое строение, очевидно, способно связать большое количество факторов свёртывания и способствовать прохождению мембранозависимых реакций, а так же оказать защитное действие против вымывания продуктов этих реакций потоком крови, в котором происходит формирование тромба.

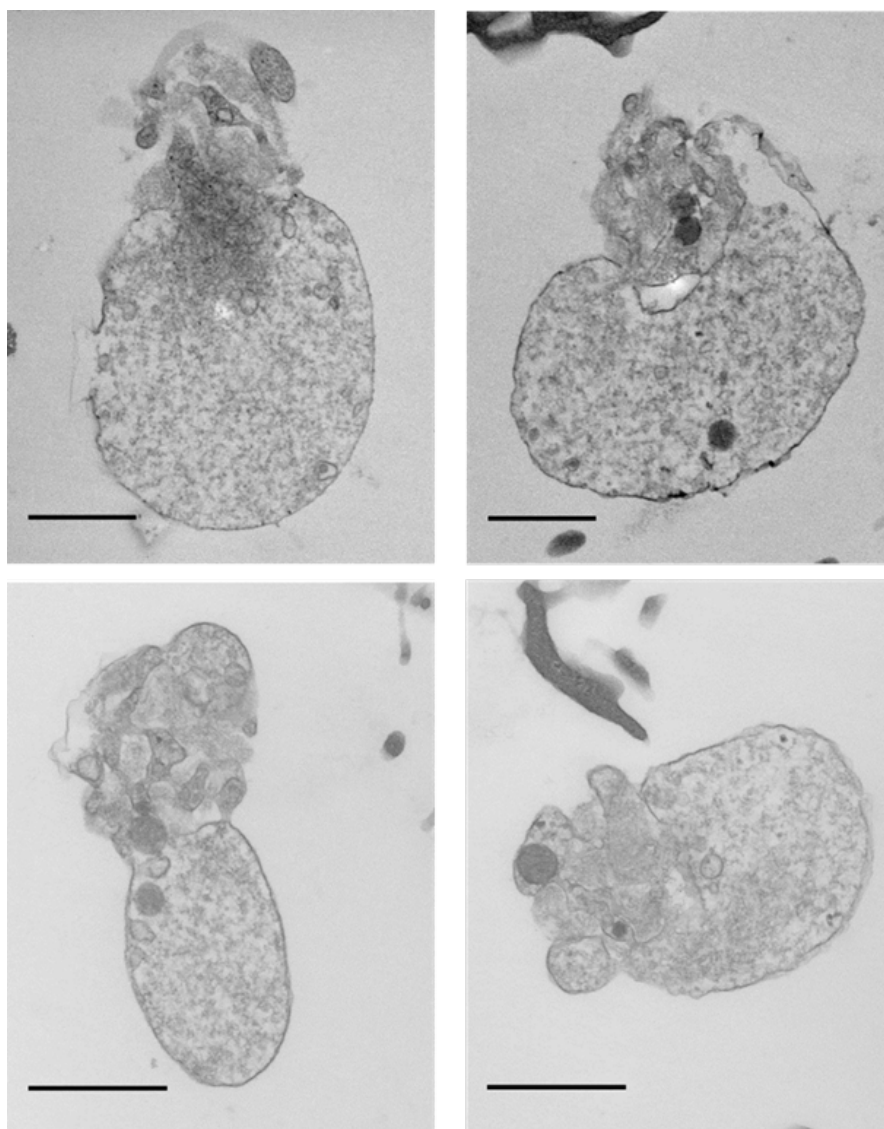


Рисунок 4. Прокоагулянтные тромбоциты с шапкой. Активация 100 нМ тромбина и 20 мкг/мл CRP. Масштабный отрезок 1 мкм. Просвечивающая электронная микроскопия.

В соответствии с данными конфокальной микроскопии, агрегаты из тромбоцитов обеих субпопуляций были соединены исключительно через шапку (рисунок 5).

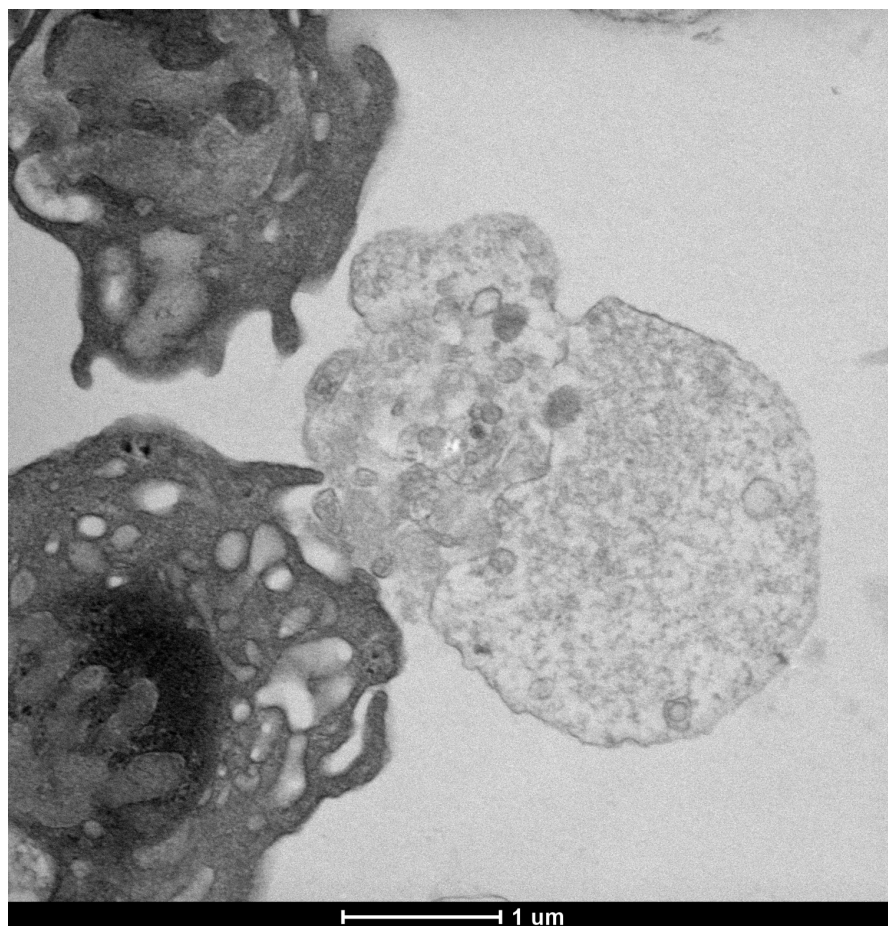


Рисунок 5. Агрегат из тромбоцитов «ФС+» и «ФС-» субпопуляций. Активация 100 нМ тромбина и 20 мкг/мл CRP. Просвечивающая электронная микроскопия.

Динамика внутриклеточного кальция и выход фосфатидилсерина в тромбоцитах

В качестве основного инструмента для наблюдения динамики внутриклеточного кальция использовалась инвертированная флуоресцентная краска Fura Red и прямая краска Fiuo-3 в качестве контроля. Была получена динамика изменений цитоплазматического кальция в тромбоцитах, активированных сильным физиологическим агонистом тромбином и в присутствии аннексина V для определения момента выхода фосфатидилсерина (рисунок 6-7). Сразу после добавления стимулирующей смеси, цитоплазматический кальций увеличивался (флуоресценция Fura Red в клетках уменьшалась), после чего в клетках запускалась серия кальциевых осцилляций. Все клетки в экспериментах можно было разделить на две субпопуляции:

1) клетки, связавшие Аннексин V (ФС+), кальциевые колебания отсутствуют, флуоресценция Fura Red на минимальном уровне – кальций зашел в цитоплазму;

2) клетки без Аннексина V (ФС–), наличие кальциевых колебаний.

Производя анализ динамики формирования «ФС+» субпопуляции по проведенным экспериментам было выявлено, что процесс выхода фосфатидилсерина происходил после повышения цитоплазматического кальция. У некоторых клеток фосфатидилсерин выходил сразу после активации (рисунок 7 Ё,З,И), а у других после длительной серии колебаний (рисунок 7 Д,Е,Ж).

Таким образом в данном разделе работы было получено, что активация тромбоцитов запускает в тромбоцитах кальциевые осцилляции, в результате чего у некоторых тромбоцитов происходит повышение цитоплазматического кальция и выход фосфатидилсерина (клетка переходит в прокоагулянтное состояние), а остальные клетки остаются непрокоагулянтными и с колеблющимся цитоплазматическим кальцием. Порог перехода индивидуален для каждой клетки. Кальциевый ответ тромбоцитов зависит от вида активатора и его концентрации.

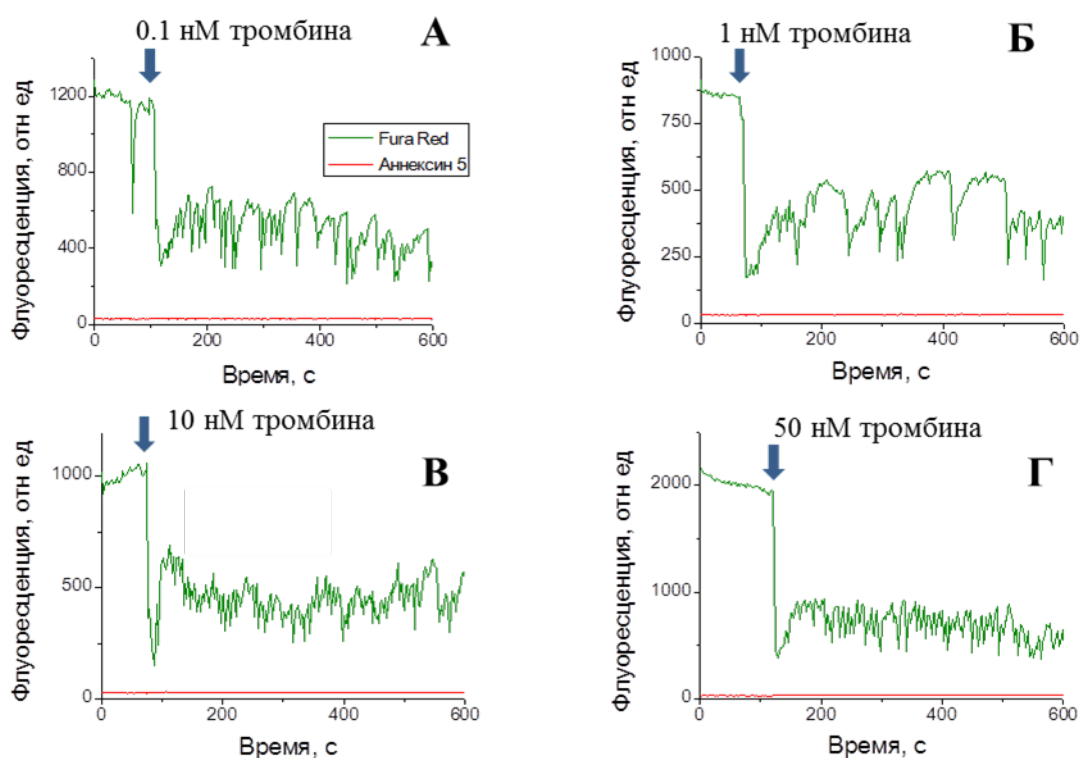


Рисунок 6. Зависимость кальциевого ответа от концентрации тромбина. Красный – Аннексин V, зеленый – Fura Red (большая флуоресценция соответствует меньшей концентрации кальция). А-Г – непрокоагулянтные тромбоциты;

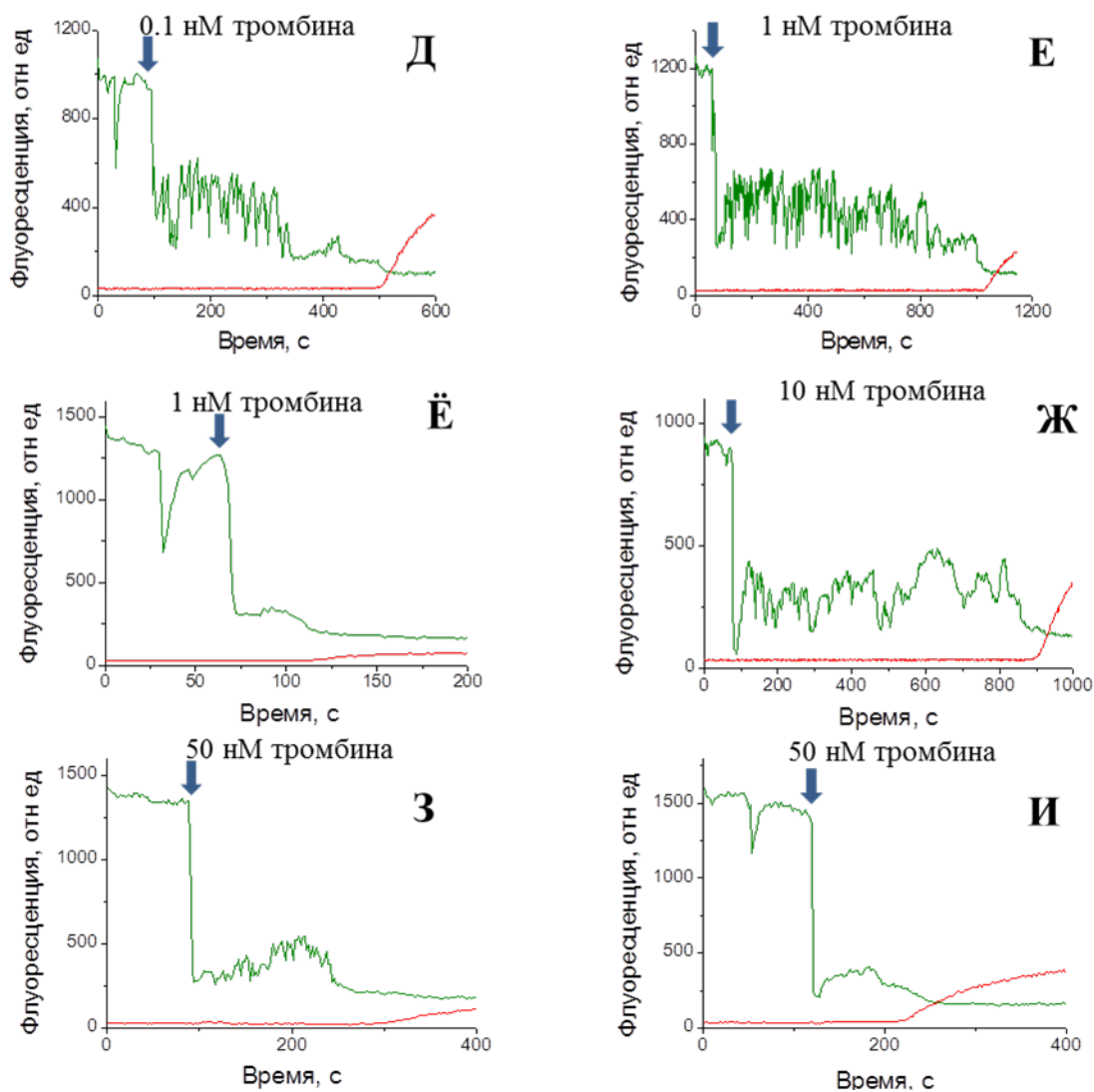


Рисунок 7. Зависимость кальциевого ответа от концентрации тромбина. Красный – Annexin V, зеленый – Fura Red. Д-И – прокоагулянтные тромбоциты.

Митохондрии в процессе формирования прокоагулянтных тромбоцитов

Для изучения роли митохондрий в процессе формирования прокоагулянтных тромбоцитов были использованы флуоресцентные индикаторы тетраметилродамин для измерения потенциала митохондриальной мембраны и родамин-2, показывающий уровень митохондриального кальция. При активации тромбоцитов митохондриальный кальций резко возростал с последующим слабым ростом (рисунок 8).

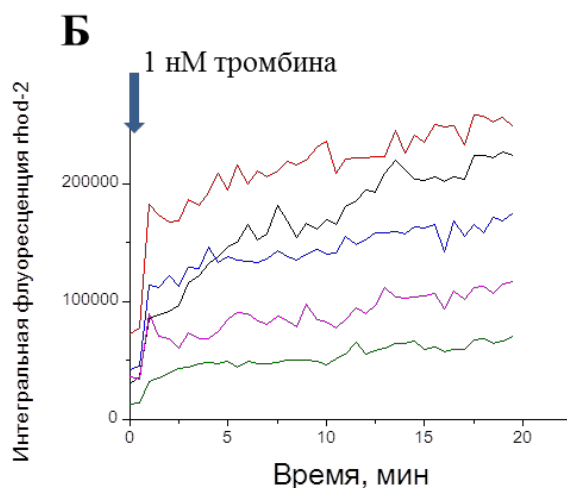
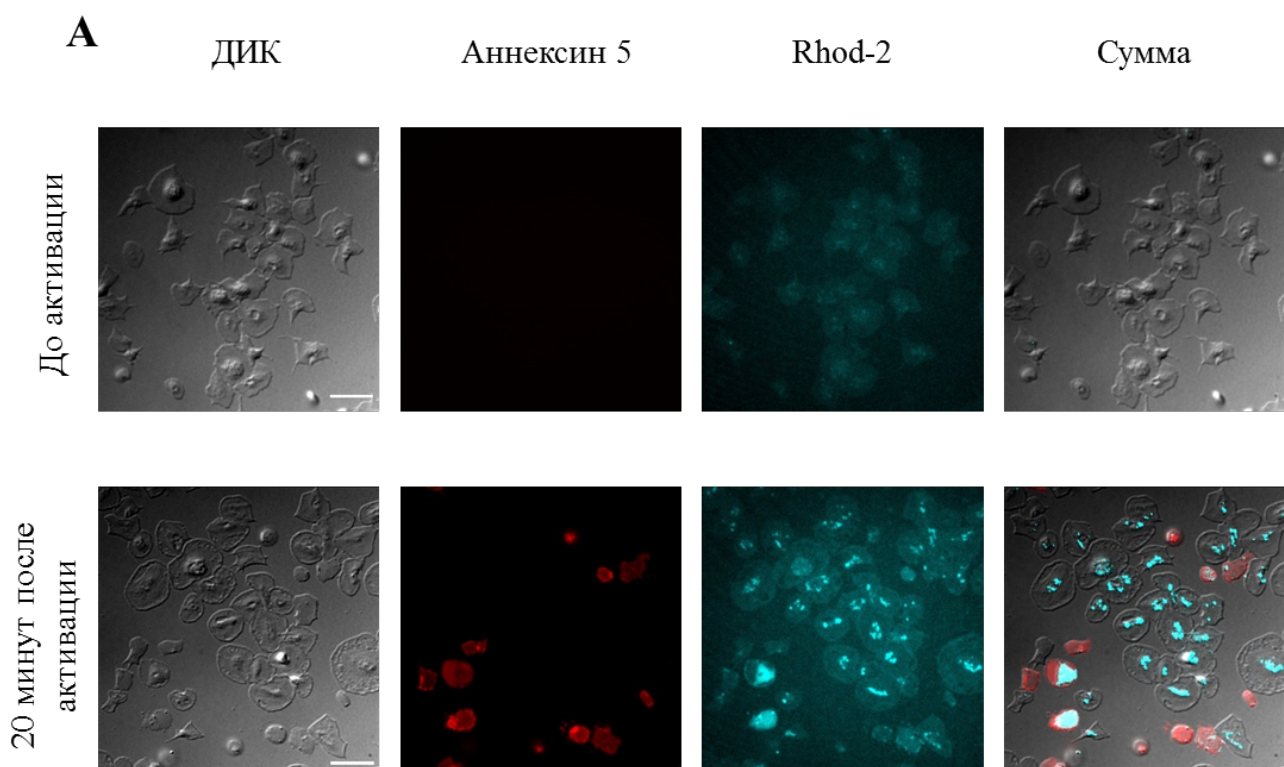


Рисунок 8. Активация тромбоцитов приводит к увеличению митохондриального кальция. (А) конфокальная микроскопия до и после активации: ДИК – дифференциально-интерференционный контраст, красный – Аннексин V, бирюзовый – Rhod-2; масштабный отрезок 10 мкм. (Б) Рост митохондриального кальция в 5 разных тромбоцитах в ответ на активацию 1 нМ тромбина.

Исследование динамики митохондриального потенциала показали, что у всех прокоагулянтных тромбоцитов митохондрии не имели разности потенциалов на мембране.

При формировании этой субпопуляции, в клетках происходило 3 перекрывающихся друг с другом процесса – подъем уровня цитоплазматического кальция, падение митохондриального потенциала и выход фосфатидилсерина (рисунок 9). Тетраметилродамин применялся в концентрации 200 нМ, при которой он агрегирует

в митохондриях, вызывая гашение флуоресценции. При увеличении проницаемости митохондриальной мембраны, тетраметилродамин способен выходить из митохондрий, тем самым увеличивая флуоресценцию во всем объёме клетки. В некоторых клетках наблюдалось временное увеличение проницаемости мембраны митохондрии (формирование поры), сопровождаемое увеличением флуоресценции TMPM и понижением флуоресценции Fura Red (повышением внутриклеточного кальция).

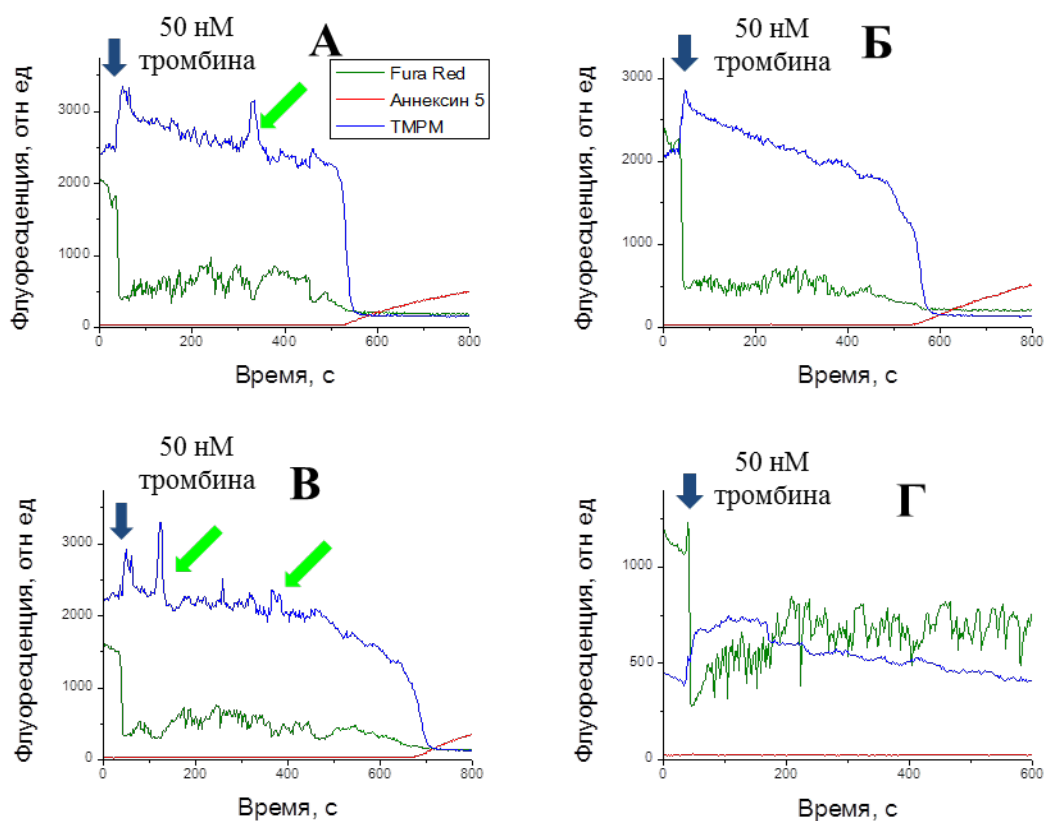


Рисунок 9. Динамика потенциала митохондриальной мембраны тромбоцитов в ответ на активацию. А-В «ФС+» тромбоциты, Г «ФС-» тромбоцит. Зелёные стрелки указывают моменты увеличения проницаемости митохондриальной мембраны. Зеленая кривая – динамика флуоресценции Fura Red, синяя кривая – динамика флуоресценции TMPM.

Наблюдение за интегральным сигналом TMPM не позволяет определить, какую очерёдность занимает процесс деполяризации митохондрий в формировании прокоагулянтных тромбоцитов. Благодаря оценке состояния индивидуальных митохондрий перед выходом фосфатидилсерина удалось установить, что первым начинается процесс падения потенциала в отдельных митохондриях, который может закончиться гибелью (он не причина) всех остальных (рисунок 10 А); (рисунок 10 Б, В). Так на рисунке 3.13 видно, что скачки проницаемости митохондриальной мембраны, то есть открытие поры имеет вид сигналов (дельта-функций), одного или нескольких, и предшествует всем остальным этапам перехода в прокоагулянтное состояние. Процесс гибели митохондрий в других клетках в связи с нарушением проницаемости ее мембраны хорошо изучен для случая перегрузки митохондрий кальцием или разрушения ATP/ADP-антипортера активными формами кислорода. Этот путь к смерти

не зависит от каспаз, поэтому имеет некротический характер. В нашем случае тромбоцитов, проницаемость митохондриальной мембраны вызывается кальцием. Митохондрия не может долго существовать при открытой митохондриальной поре – нарушается осмотический баланс между матриксом и межмембранным пространством митохондрии, исчезает мембранный потенциал, разбавляется матрикс, происходит разрыв мембран, митохондрия теряет кофакторы NAD⁺ и NADP⁺, необходимые для ее работы. Вслед за деполяризацией митохондрий начинал повышаться цитоплазматический кальций, а уже затем экспонировался фосфатидилсерин. Интересно, что митохондрии иногда теряли потенциал на время всего эксперимента, а иногда восстанавливали потенциал через какой-то срок.

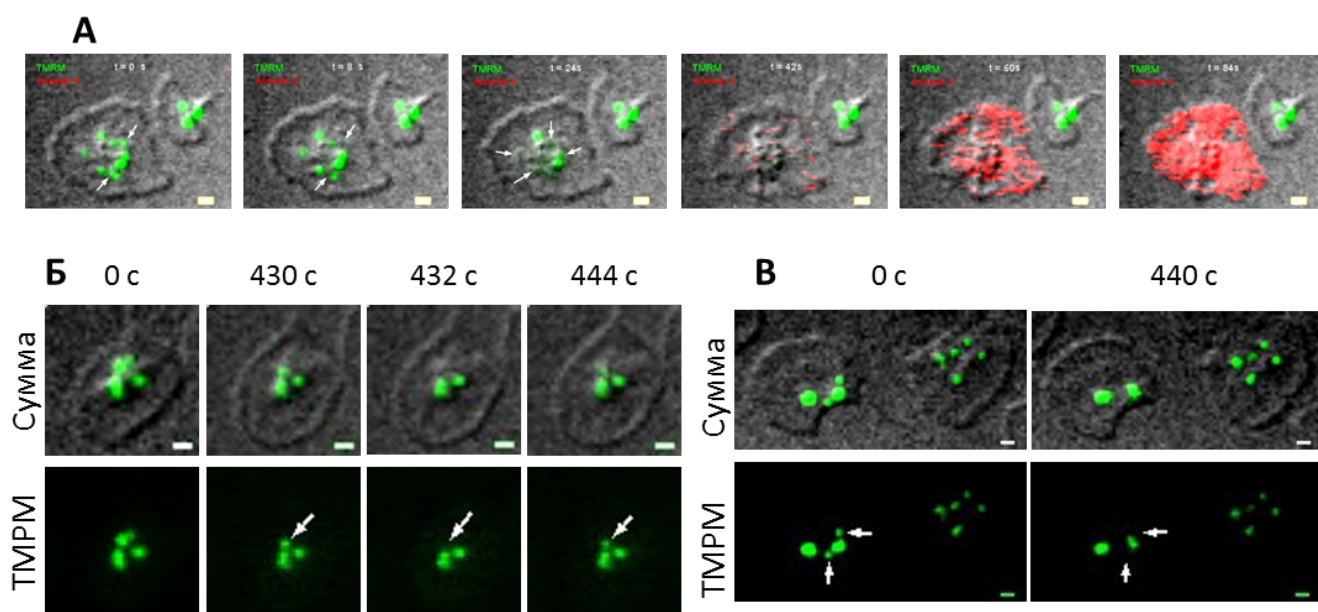


Рисунок 10. Деполяризация отдельных митохондрий. А – деполяризация привела к выходу ФС; Б, В – деполяризация не повлияла на субпопуляцию. Зеленый – ТМРМ, красный – Аннексин V; масштабный отрезок 1 мкм.

Полученные данные указывают, что в процессе формирования прокоагулянтных тромбоцитов, первым начинается процесс деполяризации митохондрий. Согласно опубликованным работам других авторов, ингибитор формирования митохондриальной поры, циклоспорин А, значительно уменьшает долю прокоагулянтных клеток. Такой же эффект на субпопуляции был получен и в данной работе.

Чтобы проверить гипотезу о переполнении митохондрий кальцием с их последующим коллапсом при «перегрузке», были поставлены опыты, в которых образование митохондриальной поры предварительно ингибировали циклоспорином А и произвели активацию клеток, тем самым создав условия увеличения митохондриального кальция без возможности его своевременного сброса за счёт кратковременного приоткрывания поры. Через 10-12 минут после активации к этим тромбоцитам был добавлен протонофор СССР, проникающий в клетки и действующий на митохондрии полной деполяризацией их мембраны (рисунок 11). Ингибитор поры CsA сильно снижал количество прокоагулянтных клеток, а в момент добавления

протонофора СССР происходил лавинообразный рост числа «ФС+» тромбоцитов. Постановка такого же эксперимента, но без использования CsA к резкому увеличению прокоагулянтных тромбоцитов при добавлении протонофора не приводила. Эти данные подтверждают гипотезу, что именно митохондрии являются регулятором субпопуляций тромбоцитов, и от степени их перегрузки кальцием зависит выбор субпопуляции (специализации) клетки.

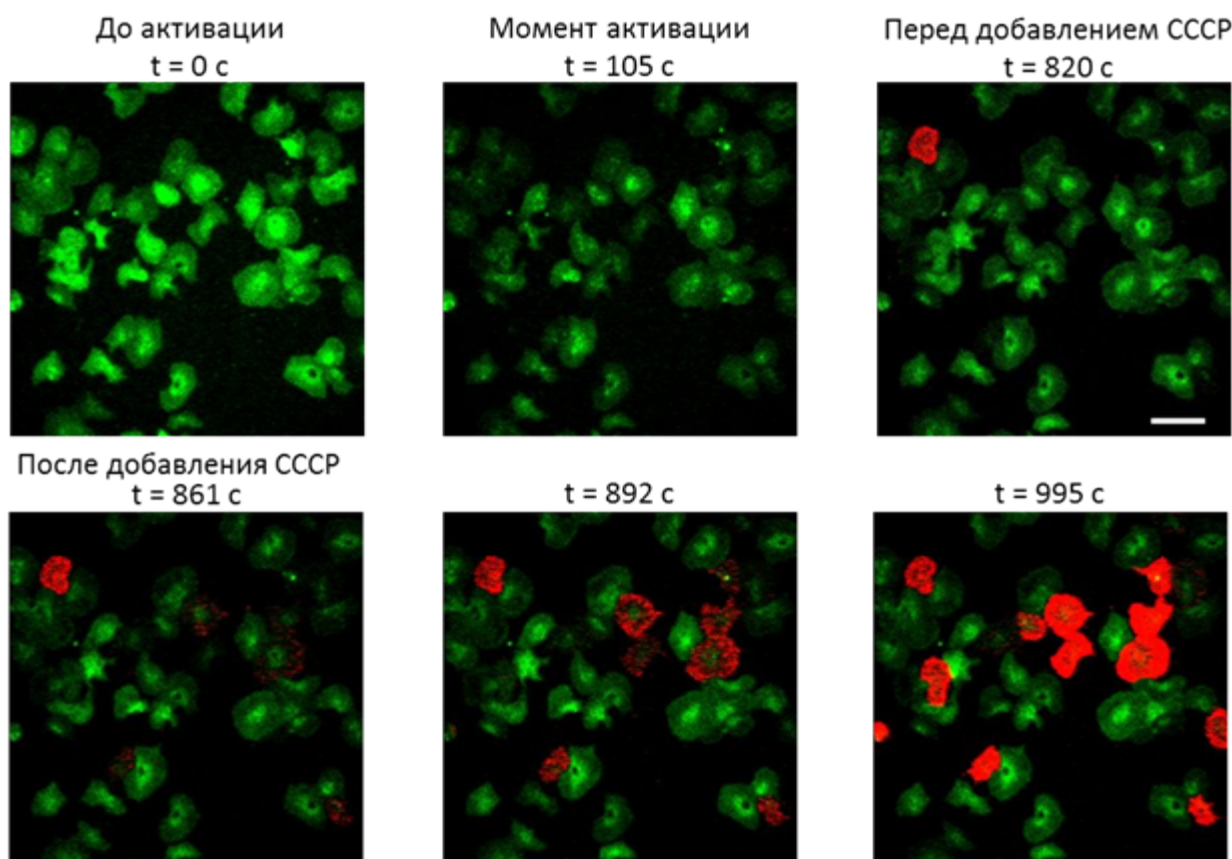


Рисунок 11. Роль митохондрий в формировании прокоагулянтной субпопуляции тромбоцитов. Прединкубированные с ингибитором образования митохондриальной поры клетки активировались тромбином. После 820 секунды был добавлен разобщитель митохондрий СССР, что привело к лавинообразному увеличению числа «ФС+» тромбоцитов. Зеленый – Fura Red, красный – Аннексин V. Масштабный отрезок 10 мкм.

Цитоплазматический кальций в неактивированном тромбоците и число митохондрий влияют на выбор субпопуляции

В качестве возможного предрасполагающего фактора, влияющего на выбор тромбоцитом субпопуляции, был исследован уровень внутриклеточного кальция до активации. Все клетки вместе представляли нормальное распределение по флуоресценции до активации. Для каждой клетки в эксперименте вычислялось среднее значение флуоресценции за период до добавления активатора, а так же каждой клетке

присваивалась субпопуляция «ФС+» или «ФС-», в зависимости от того, стала клетка прокоагулянтной или нет к концу эксперимента, через 20 минут после активации. В отдельных экспериментах проявлялось чёткое отличие по изначальному уровню цитоплазматического кальция для тромбоцитов, перешедших в разные субпопуляции.

В силу малого количества прокоагулянтных тромбоцитов в отдельных экспериментах, для построения подробного распределения, тромбоциты из 11 разных экспериментов были нормированы на среднюю флуоресценцию «ФС-» субпопуляции и построено распределения для нескольких сотен клеток. средняя флуоресценция для «ФС-» клеток составила 1, а для «ФС+» 0.86 с высоким показателем достоверности $p < 0.001$ (рисунок 12). Результат был независим от активатора.

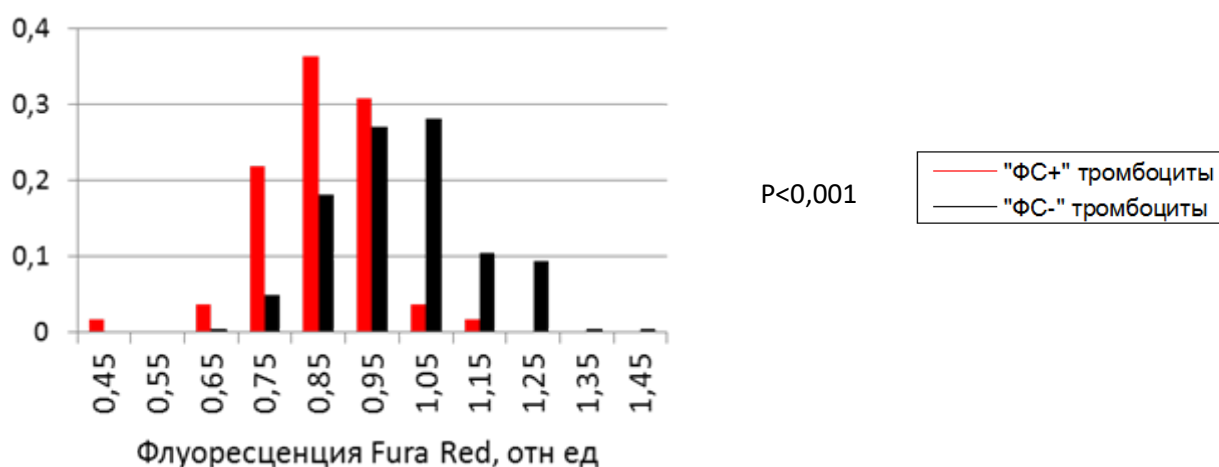


Рисунок 12. Клетки с более высоким уровнем цитоплазматического кальция до активации чаще становятся прокоагулянтными. 55 «ФС+» и 181 «ФС-» тромбоцит из 11 экспериментов.

Таким образом, клетки с более высоким внутриклеточным кальцием чаще становятся прокоагулянтными.

Было обнаружено, что число митохондрий в тромбоците влияет на шансы перехода в прокоагулянтное состояние. В тромбоцитах, активированных PAR-1 АП, были посчитаны митохондрии в экспериментах с динамикой потенциала митохондриальной мембраны и определена финальная субпопуляция по итогу эксперимента. То есть каждая клетка имела два параметра: число митохондрий и конечная субпопуляция. Полученные данные использовались для построения распределения, иллюстрирующего влияние количества митохондрий на субпопуляцию тромбоцита (рисунок 13). Среднее число митохондрий для прокоагулянтных тромбоцитов составило $\sim 5,2$, для непрокоагулянтных $\sim 6,5$, для всех вместе $6,3$. Тромбоциты с числом митохондрий ниже 5 становились прокоагулянтными в $\sim 30\%$ случаях, а тромбоциты с 5 и более – 10-15%.

Можно заключить, что количество митохондрий в тромбоците влияет на результат активации, чем меньше митохондрий, тем выше шансы у тромбоцита стать прокоагулянтным.

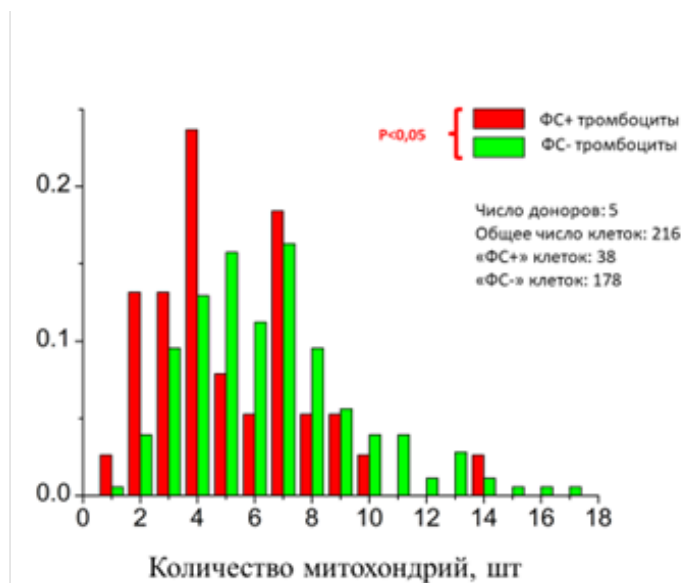


Рисунок 13. Распределение тромбоцитов FC+ и FC- субпопуляций при активации через PAR-1 по количеству митохондрий.

Выводы

1. Разработана методика, позволяющая проводить одновременное измерение концентрации внутриклеточного кальция, потенциала митохондриальной мембраны, митохондриального кальция и выхода фосфатидилсерина в активированных тромбоцитах.

2. Выявлена последовательность внутриклеточных процессов, ведущих тромбоцит к смерти: активация тромбоцита запускает в нем кальциевые осцилляции, способствующие накоплению кальция в митохондриях, затем происходит коллапс митохондрий, повышается уровень внутриклеточного кальция, и следом происходит экспонирование фосфатидилсерина. Стабильно высокий уровень цитоплазматического кальция не является первичной причиной формирования прокоагулянтной субпопуляции тромбоцитов.

3. Впервые обнаружены индивидуальные характеристики тромбоцитов, влияющие на вероятность перехода в прокоагулянтное состояние: количество митохондрий в тромбоците и концентрация цитоплазматического кальция. Тромбоциты с меньшим числом митохондрий и/или большей концентрацией цитоплазматического кальция в покое имеют большую вероятность стать прокоагулянтными в ответ на активацию в рамках настоящей экспериментальной модели.

4. Установлено существование мембранной субклеточной структуры прокоагулянтных тромбоцитов, названной «шапкой» и представляющей из себя небольшую область, богатую прокоагулянтными белками, через которую опосредована агрегация прокоагулянтных клеток с другими тромбоцитами.

Список публикаций

Статьи:

1. Abaeva, A. A. Procoagulant platelets form an α -granule protein-covered “cap” on their surface that promotes their attachment to aggregates / A. A. Abaeva, M. Canault, Y. N. Kotova, S. I. Obydennyu, A. O. Yakimenko, N. A. Podoplelova, V. N. Kolyadko, H. Chambost, A. V. Mazurov, F. I. Ataulakhanov // *Journal of Biological Chemistry*. – 2013. – Т. 288, № 41. – С. 29621-29632.

2. Panteleev, M. Systems biology and systems pharmacology of thrombosis / M. Panteleev, A. Sveshnikova, A. Belyaev, D. Nechipurenko, I. Gudich, S. Obydenny, N. Dovlatova, S. Fox, E. Holmuhamedov // *Mathematical Modelling of Natural Phenomena*. – 2014. – Т. 9, № 6. – С.

4-16.

3. Podoplelova, N. A. Coagulation factors bound to procoagulant platelets concentrate in cap structures to promote clotting / N. A. Podoplelova, A. N. Sveshnikova, Y. N. Kotova, A. Eckly, N. Receveur, D. Y. Nechipurenko, S. I. Obydennyi, I. I. Kireev, C. Gachet, F. I. Ataullakhanov, P. H. Mangin, M. Panteleev // *Blood*. – 2016. – Т. 128, № 13. – С. 1745-1755.

4. Obydennyu, S. I. Dynamics of calcium spiking, mitochondrial collapse and phosphatidylserine exposure in platelet subpopulations during activation / S. I. Obydennyu, A. N. Sveshnikova, F. I. Ataullakhanov, M. A. Panteleev // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2016. – Т. 14, № 9. – С. 1867-1881.

5. Пантелеев, М. Физиология и патология внеклеточных везикул / М. Пантелеев, А. Абаева, Д. Нечипуренко, С. Обыденный, А. Свешникова, А. Шибeko // *Онкогематология*. – 2017. – Т. 12. – №. 1. – С. 62-70.

6. Пантелеев М., Абаева А., Баландина А., Беляев А., Нечипуренко Д., Обыденный С., Свешникова А., Шибeko А., Атауллаханов Ф. Внеклеточные везикулы плазмы крови: состав, происхождение, свойства // *Биологические мембраны: Журнал мембранной и клеточной биологии*. – 2017. – Т. 34. – №. 3. – С. 155-161.

7. Свешникова, А. Современные представления о регуляции тромбоцитарного гемостаза / Свешникова А., Якушева А., Рябых А., Ушакова О., Абаева А., Обыденный С., Нечипуренко Д., Пантелеев М. // *Креативная кардиология*. – 2018. – Т. 12, № 3. – С. 260-274.

8. Nechipurenko, D. Y. Clot contraction drives the translocation of procoagulant platelets to thrombus surface / D. Y. Nechipurenko, N. Receveur, A. O. Yakimenko, T. O. Shepelyuk, A. A. Yakusheva, R. R. Kerimov, S. I. Obydennyu, A. Eckly, C. Léon, C. Gachet // *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. – 2019. – Т. 39, № 1. – С. 37-47.

9. Kotova, Y. N. Binding of Coagulation Factor XIII Zymogen to Activated Platelet Subpopulations: Roles of Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ and Fibrinogen / Y. N. Kotova, N. A. Podoplelova, S. I. Obydennyu, E. A. Kostanova, A. A. Ryabikh, A. S. Demyanova, M. I. Biriukova, M. A. Rosenfeld, A. V. Sokolov, Chambost H. // *Thrombosis and haemostasis*. – 2019.

10. Шахиджанов, С. Кальциевые осцилляции в тромбоцитах крови и их возможная роль в “интерпретации” клеткой информации из внешнего мира / С. Шахиджанов, Ф. Балабин, С. Обыденный, Ф. Атауллаханов, А. Свешникова // *Успехи физических наук*. – 2019. – Т. 189. – №. 9. – С. 703-719.

Доклады на конференциях:

1. Обыденный С.И., Атауллаханов Ф.И., Пантелеев М.А. Формирование трёх субпопуляций тромбоцитов *in vitro*. [Конференция] // IV Съезд биофизиков России. 20-26 августа 2012 г. Симпозиум I. Физико-химические основы функционирования биополимеров и клеток. Материалы докладов.. - Нижний Новгород : [б.н.], 2012.

2. Obydennyu S.I., Podoplelova N.A., Verholomova F.Y., Artemenko E.O., Zakharova N.V., Panteleev M.A. Functional and morphological characterization of the three activated platelet subpopulations. [Конференция] // 1st EUPLAN Platelet Conference , Maastricht , September 2012. - Maastricht : [б.н.], 2012.

3. Обыденный С. И., Атауллаханов Ф. И., Пантелеев М. А. "Локализация фибрин(оген)а на прокоагулянтной субпопуляции тромбоцитов." VI Всероссийская конференция «Клиническая гемостазиология и гемореология в сердечно-сосудистой хирургии», январь 2013

4. Котова Я. Н., Абаева А. А., Обыденный С. И., Пантелеев М. А. "Исследование механизмов формирования белкового покрытия в субпопуляциях активированных тромбоцитов крови человека." VI Всероссийская конференция «Клиническая гемостазиология и гемореология в сердечно-сосудистой хирургии», январь 2013

5. Panteleev M.A., Abaeva A., Canault M., Kotova Y.N., Obydennyi S.I., Yakimenko A.O., Kolyadko V.N., Ataulakhanov F., Nurden A.T. and Alessi M-C. "Alpha-granule proteins are localized in a 'cap' on the surface of procoagulant platelets to promote their incorporation into aggregates" 1 July ISTH 2013, Amsterdam, Oral communications 10.2

6. Obydennyu S.I., Kotova Y.N., Ataulakhanov F. and Panteleev M.A. "Spatial distribution and co-localization of fibrinogen and platelet-derived factor XIIIa on the activated platelet subpopulations" 3 July ISTH 2013, Amsterdam, Oral communications 67.4

7. Obydennyu S.I., Sveshnikova A. N., Ataulakhanov F.I., Panteleev M.A. Calcium oscillations in platelet subpopulations // 47th Nordic Coagulation Meeting, Visby, Sweden 10-12 September 2014

8. Kotova Ya. N., Abaeva A.A., Obydennyu S.I., Panteleev M.A. Mechanisms of the protein coat formation in the activated platelet subpopulations. FEBS Journal: 38th FEBS Congress, Saint Petersburg, Russia, July 6–11, 2013. vol. 280 (Issue Supplement s1): p. 197

9. Obydennyu S., Kotova Y., Ataulakhanov F., Panteleev M. Adhesive proteins and crosslinking enzymes are concentrated together on a spot on the surface of the phosphatidylserine-expressing activated platelets //The Febs Journal. – 2013. – Т. 280. – №. 1. – С. 480.

10. Obydennyi S. et al. Dynamics of calcium spiking, mitochondrial collapse and phosphatidylserine exposure in single platelets during activation // Journal of thrombosis and haemostasis. – 111 river st, hoboken 07030-5774, NJ USA : WILEY-BLACKWELL, 2015. – Т. 13. – С. 649-649.

11. Обыденный С.И., Свешникова А.Н., Атауллаханов Ф.И., Пантелеев М.А. Кальциевая сигнализация и коллапс митохондрий в субпопуляциях активированных тромбоцитов при активации // V Съезд биофизиков России. Материалы докладов : в 2 т.

– Ростов-на-Дону : Издательство Южного федерального университета, 2015. – Т. 2. – С. 262

12. Obydennyi S. et al. Procoagulant platelets and the role of mitochondria in their formation // JOURNAL OF THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS. – 111 river st, hoboken 07030-5774, NJ USA : WILEY-BLACKWELL, 2016. – Т. 14. – С. 111-111.

13. Обыденный С.И., Подоплелова Н.А., Костанова Е.А., Бирюкова М.И., Розенфельд, М.А., Пантелеев М.А. Связывание фактора хiii с субпопуляциями активированных тромбоцитов // Тезисы III Конгресса гематологов России. Гематология и трансфузиология. 2016. Т. 61. № 1 (Прил. 1), С. 154.

14. Подоплелова Н.А., Свешникова А.Н. , Котова Я.Н., Нечипуренко Д.Ю., Обыденный С.И., Атауллаханов Ф.И., Пантелеев М.А. "Взаимодействие факторов свертывания с субпопуляциями активированных тромбоцитов". Научные труды "v съезд физиологов снг . V съезд биохимиков россии. Конференция adflim", 2016, Сочи, Россия 4–8 октября, С. 151

15. М.А. Пантелеев, А.Н. Свешникова, Д.Ю. Нечипуренко, Н.А. Подоплелова, С.И. Обыденный, А.В. Беляев, А.В. Балацкий, М.Н. Балацкая, Я.Н. Котова, А.О. Якименко, А.С. Демьянова, А.А. Абаева, Е.О. Артеменко, Ф.И. Атауллаханов. "Прокоагулянтная субпопуляция тромбоцитов: механизмы внутриклеточной сигнализации, биохимическая характеристика, физиологические функции". Научные труды "v съезд физиологов снг . V съезд биохимиков россии. Конференция adflim", Сочи, Россия 4–8 октября, С. 73

16. Обыденный С.И., Свешникова А.Н., Атауллаханов Ф.И., Пантелеев М.А. "Прокоагулянтные тромбоциты и процесс их формирования". Научные труды "v съезд физиологов снг . V съезд биохимиков россии. Конференция adflim", 2016, Сочи, Россия 4–8 октября, С. 151

17. Обыденный С.И., Атауллаханов Ф.И., Пантелеев М.А. «Влияние исходной концентрации внутриклеточного кальция тромбоцитов на их прокоагулянтную функцию» сборник материалов конференции IV Всероссийская научно-практическая междисциплинарная конференция с международным участием «реабилитация и профилактика–2016», Москва, С. 87-89

18. Podoplelova N., Obydennyi S., Canault M., Ataulakhanov F., Alessi M.-C., Panteleev M. "Kinetics of Prothrombin Interaction with Subpopulations of Activated Platelets" ISTH 2017, PB 1333

19. Obydennyi S., Ataulakhanov F., Panteleev M. "Calcium Signalling Patterns in Adherent Single Platelets during Activation with Collagen-related Peptide" ISTH 2017, PB 731