

© 2024 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ
им. Дмитрия Рогачева»
Минздрава России
Поступила 13.09.2024
Принята к печати 18.10.2024



EDN: FNZICZ

Контактная информация:
Артеменко Елена Олеговна,
научный сотрудник лаборатории
клеточного гемостаза и тромбоза
ФГБУ «НМИЦ ДГОИ
им. Дмитрия Рогачева»
Минздрава России
Адрес: 117997, Москва,
ул. Саморы Машела, 1
E-mail: lartemenko@yandex.ru

© 2024 by «D. Rogachev NMRCPOI»

Received 13.09.2024
Accepted 18.10.2024

Correspondence:
Elena O. Artemenko,
a researcher at the Laboratory
of Cellular Hemostasis and Thrombosis
at the Dmitry Rogachev National Medical
Research Center of Pediatric Hematology,
Oncology and Immunology, Ministry
of Healthcare of the Russian Federation
Address: 1 Samory Mashela St.,
Moscow 117997, Russia
E-mail: lartemenko@yandex.ru

Активация тромбоцитов в кровотоке регулируется широким спектром агонистов, что может приводить к самым разным ответам тромбоцитов [1, 2], в том числе и к формированию их прокоагулянтной субпопуляции, которая экспонирует на своей внешней мембране липид фосфатидилсерин, который детектируется с помощью либо аннексина V [3], либо лактадгерина [4]. Способность тромбоцитов к активации в кровотоке может быть

подавлена с помощью различных простагландинов [5] и оксида азота (II) (NO), который вырабатывается в основном эндотелиальными клетками, выстилающими стенки сосудов [6]. На сегодняшний день один из внутриклеточных цитоскелетных белков тромбоцитов VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein), который ассоциирован с интегринами, рассматривают в качестве одного из основных маркерных белков ингибирования функции тромбоцитов, поскольку

DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-4-54-57

Анализ функции ингибирования тромбоцитов по фосфорилированию внутриклеточного цитоскелетного белка VASP в цельной крови во времени

Е.О. Артеменко^{1,2}, И.А. Чабин², М.А. Пантелеев¹⁻³¹ФГБУН «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии» РАН, Москва²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва³ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва

Состояние тромбоцитов может зависеть от времени, прошедшего с момента забора крови, в первую очередь из-за наличия в циркуляции короткоживущих ингибиторов их активации. В данной работе проанализировано фосфорилирование белка VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein), которое коррелирует с функцией ингибирования тромбоцитов в зависимости от времени с помощью проточной цитометрии. Данное исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России. Мы исследовали фосфорилирование VASP тромбоцитов в цельной крови сразу после ее взятия из вены и через 60 мин. В качестве положительного контроля нами использовано ингибирование функции тромбоцитов с помощью простагландина E1. В результате мы выяснили, что фосфорилирование VASP в тромбоцитах не отличалось достоверно в цельной крови сразу после ее взятия и через 60 мин, в то время как наблюдалось заметное его увеличение при ингибировании тромбоцитов с помощью простагландина E1. Полученные данные предполагают, что состояние тромбоцитов не изменяется заметным образом в течение 60 мин после взятия крови из вены.

Ключевые слова: гемостаз, тромбоциты, VASP, проточная цитометрия

Артеменко Е.О. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2024; 23 (4): 54–7. DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-4-54-57

Analysis of platelet inhibition function by measuring phosphorylation of the intracellular cytoskeleton protein VASP in whole blood over time

Е.О. Artemenko^{1,2}, I.A. Chabin², M.A. Panteleev¹⁻³¹Center for Theoretical Problems of Physical and Chemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, Moscow²The Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow³The M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow

The state of platelets may depend on the time since blood draw, primarily because of the presence of short-lived inhibitors of platelet activation in circulation. In this work, we analyzed the phosphorylation of vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP), which correlates with platelet inhibition, over time using flow cytometry. The study was approved by the Independent Ethics Committee and the Scientific Council of the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare of the Russian Federation. We investigated VASP phosphorylation in platelets in whole blood immediately after the blood was collected and 60 minutes later. As a positive control, we used platelet function inhibition by prostaglandin E1. As a result, it was found that the level of VASP phosphorylation in platelets in whole blood did not differ significantly in samples taken immediately after the blood draw and 60 minutes later, however it was markedly increased with platelet inhibition by prostaglandin E1. Our results suggest that the state of platelets does not change significantly within 60 minutes after the blood draw.

Key words: hemostasis, platelets, VASP, flow cytometry

Artemenko E.O., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2024; 23 (4): 54–7.
DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-4-54-57

повышение его фосфорилирования коррелирует с ингибированием связывания растворимого фибриногена с интегрином $\alpha_{IIb}\beta_3$ и ингибированием агрегации тромбоцитов [7]. VASP имеет 3 различных сайта фосфорилирования, которые фосфорилируются как cGMP-, так и cAMP-зависимыми протеинкиназами, однако каждая киназа проявляет предпочтительность для разных сайтов фосфорилирования [8], есть также данные о фосфорилировании VASP по Ser157 с помощью протеинкиназы C [9]. Антитела к фосфорилированной форме Ser239 VASP были описаны ранее для анализа заингибированного (с помощью простагландина E1 (ПГЕ1) или доноров NO) состояния тромбоцитов [10]. Вопрос о том, насколько исследования тромбоцитов *in vitro* отражают их свойства *in vivo*, до сих пор остается дискуссионным.

В данной работе мы исследовали состояние тромбоцитов с помощью анализа фосфорилирования VASP по Ser239 и показали, что состояние тромбоцитов, напрямую зафиксированных из венозного кровотока, не отличается заметным образом от состояния тромбоцитов в крови, которая была выдержана при комнатной температуре в течение 60 мин после ее забора. Данное исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Забор, фиксация и пермеабилзация крови

Для наименьшего воздействия на тромбоциты непосредственно процессом забора кровь забирали самотеком в свежеприготовленный 1% раствор формалина в буфере А, pH 7,4 (150 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 1 мМ $MgCl_2$, 0,4 мМ NaH_2PO_4 , 20 мМ HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота), 5 мМ глюкозы). Набирали 0,5 мл крови в 4,5 мл 1% раствора формалина, таким образом при заборе кровь разбавлялась в 10 раз. Контрольную кровь также забирали самотеком в 110 мМ цитрата натрия, pH 5,5 в соотношении кровь:цитрат – 9:1. Кровь, которую забирали на цитрат, выдерживали при комнатной температуре в течение 60 мин и затем фиксировали в 1% растворе формалина в буфере А, pH 7,4, при этом кровь разбавлялась в 10 раз. В качестве положительного контроля использовали ингибирование функции тромбоцитов с помощью ПГЕ1: к 100 мкл крови добавляли ПГЕ1 до 5 мкМ из 1 мМ стока в этаноле и инкубировали 3 мин, затем кровь фиксировали в 1% растворе формалина в буфере А, pH 7,4, при этом кровь разбавлялась в 10 раз. Время фиксации крови составляло 30 мин. После этого фиксированные клетки пермеабилизовывали добавлением 0,3% раствора тритона X-100 в буфере А,

pH 7,4 до конечной концентрации тритона 0,2%, пермеабилзацию проводили в течение 30 мин. Далее реакцию сшивки формалином останавливали добавлением 50 мМ раствора глицина в буфере А с 5 мг/мл бычьего сывороточного альбумина (БСА), pH 7,4 и инкубировали с ним при перемешивании 30 мин, затем фиксированные клетки хранили при +4°C в течение 16–20 ч.

Окраска фиксированных клеток антителами

Фиксированные и пермеабилизованные клетки центрифугировали при 2000g в течение 10 мин и затем окрашивали добавлением буфера А с БСА, pH 7,4 с антителами к интегину $\alpha_{IIb}\beta_3$ конъюгированных с фикоэритрином CD61-PE (конечная концентрация 0,5%, Becton Dickinson, США) и первичных кроличьих антител к фосфорилированной форме VASP (по Ser239, Affinity Biosciences, КНР), при этом конечная концентрация этих антител в буфере А составляла 10 мкг/мл. Антитела инкубировали с клетками при постоянном перемешивании в течение 1,5 ч. Затем клетки отмывали добавлением 10-кратного объема буфера А, pH 7,4, после этого их осаждали центрифугированием при 2000g в течение 10 мин и далее окрашивали добавлением вторичных меченных Алексой Флуор-488 антител (антикроличьи антитела, Affinity Biosciences, КНР), при этом конечная концентрация антител в буфере А, pH 7,4 составляла 2 мкг/мл. Антитела инкубировали с клетками при постоянном перемешивании в течение 30 мин. Затем окрашенные клетки разбавляли буфером А с БСА, pH 7,4 в 10 раз и инкубировали при постоянном перемешивании 30 мин.

Проточная цитометрия

Далее пробы сразу же измеряли на цитометре Novocyte (ACEA Biosciences, США) при медленной скорости потока, при этом собирали не менее 2000 событий, попадающих в регион тромбоцитов, которые отделяли по их окрашиванию с помощью CD61-PE.

Статистика

Результаты представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение. Для сравнения выборок использовали критерий Манна–Уитни, отличие считали достоверным при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Нами проанализировано фосфорилирование цитоскелетного белка VASP в тромбоцитах с помощью иммунофлуоресцентного анализа фосфорилированного состояния Ser239 в белке VASP по ранее предложенной Schwarz и соавт. методике [11].

Мы немного модифицировали эту методику – добавили раствор глицина в буфере А к фиксированной крови для остановки реакции сшивки формалином и предотвращения неспецифической пришивки антител в результате просто химической реакции, а не аффинного связывания.

Мы не зарегистрировали заметного изменения фосфорилирования VASP в цельной крови, забранной напрямую самотеком в формалин, и в цельной крови, забранной на цитрат, которая находилась при комнатной температуре в течение 60 мин (рисунок, А). При этом мы наблюдали заметное различие между кровью, простоявшей 60 мин, и той же кровью, в которую был добавлен ПГЕ1 (рисунок, Б), это позволяет говорить о том, что заингибированное состояние тромбоцитов мы действительно регистрируем.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

В данной работе мы показали, что фосфорилирование цитоскелетного белка VASP заметным образом не отличается в крови, которую набирали сразу в фиксирующий раствор, и в крови, выдержанной при комнатной температуре в течение 60 мин.

Анализ фосфорилирования цитоскелетного белка VASP является одним из нескольких предложенных на сегодняшний день подходов для мониторинга состояния тромбоцитов [12]. Этот подход

сейчас широко используется даже для анализа состояния тромбоцитов пациентов [13] и позволяет эффективно отслеживать терапию антагонистами P2Y₁₂ [14, 15]. Однако состояние VASP в тромбоцитах крови по времени, прошедшему от момента ее забора, оставалось неисследованным.

Фосфорилирование цитоскелетного белка VASP является чувствительным к антитромбоцитарной терапии [16] и даже было предложено в качестве одного из способов детекции в крови количества NO [17], однако поскольку в крови всегда присутствует сложная смесь активаторов и ингибиторов тромбоцитов, то состояние тромбоцитов остается непонятным.

В своих экспериментах по исследованию роста тромба в проточных камерах мы наблюдали заметное изменение свойств крови в зависимости от времени, прошедшего от ее забора, в частности заметное увеличение размера растущих тромбов в зависимости от момента забора крови (Троянова, Нечипуренко, Пантелеев, неопубликованные данные). Мы предположили, что такой эффект может быть связан с постепенным изменением состояния тромбоцитов в крови и, возможно, с утратой ими заингибированного состояния, в котором они, возможно, существуют в кровотоке благодаря присутствию ингибиторов тромбоцитов, таких как различные типы простагландин, простациклинов и NO.

Рисунок

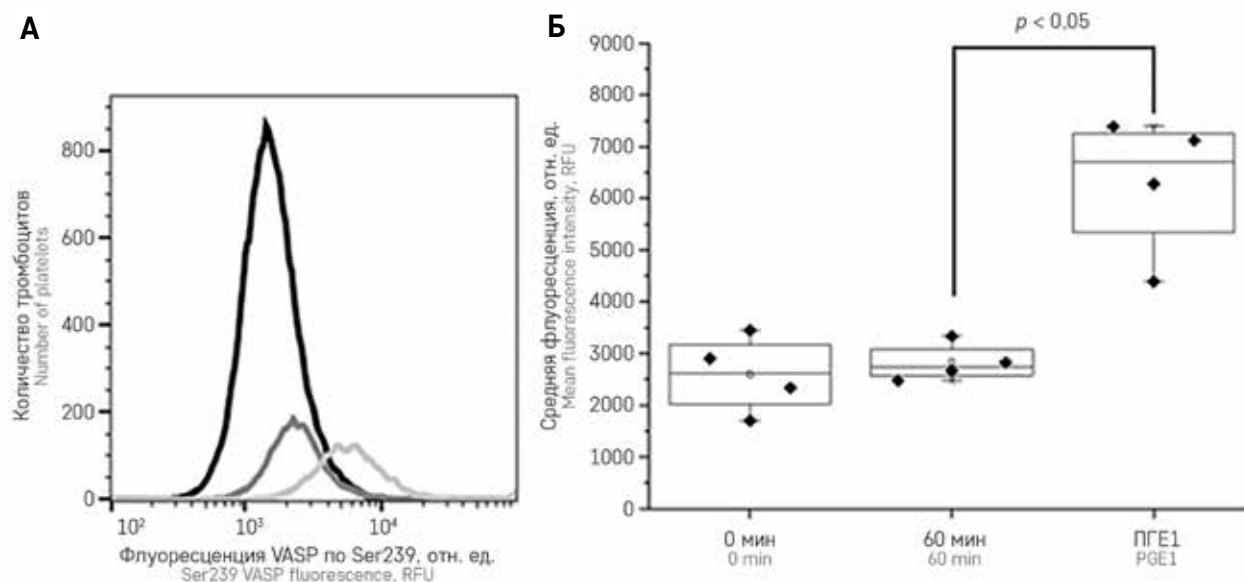
Анализ фосфорилирования цитоскелетного белка VASP по Ser239 в зависимости от времени от момента забора крови

В качестве положительного контроля использовано ингибирование тромбоцитов с помощью ПГЕ1. А – приведены типичные гистограммы флуоресценции для 1 донора. Черный цвет – гистограмма для времени 0 мин, темно-серый цвет – гистограмма для времени 60 мин; светло-серый цвет – гистограмма для ингибирования с ПГЕ1; Б – приведены усредненные значения флуоресценции фосфорилированной формы VASP для Ser239 для 4 доноров

Figure

An analysis of phosphorylation of the cytoskeleton protein VASP at Ser239 by time since blood draw

As a positive control, platelet function inhibition by prostaglandin E1 (PGE1) was used. A – typical fluorescence histograms for 1 donor. The black histogram is for the timepoint "0 min", the dark grey histogram is for the timepoint "60 min"; the light grey histogram is for inhibition with PGE1; Б – mean fluorescence intensity values of phosphorylated VASP for Ser239 for 4 donors



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе показано, что в условиях нашего эксперимента фосфорилирование цитоскелетного белка VASP не изменялось заметным образом в течение 60 мин после взятия крови, в то время как мы наблюдали заметное воздействие ПГЕ1 на детектируемое фосфорилирование VASP (рисунок). Полученные нами данные предполагают, что в пределах исследованного времени состояние тромбоцитов заметным образом не изменяется по анализу фосфорилирования цитоскелетного белка VASP, которое

обычно коррелирует с функцией ингибирования тромбоцитов.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом Российского научного фонда №23-44-00082.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

Artemenko E.O. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0193-0723>

Chabin I.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0625-1743>

Panteleev M.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8128-7757>

Литература / References

1. Свешникова А.Н., Степанян М.Г., Пантелеев М.А. Функциональные ответы тромбоцитов и внутриклеточная сигнализация: молекулярные связи. Часть 1: ответы. Системная биология и физиология 2022; 1 (1): 14–23. [Sveshnikova A.N., Stepanyan M.G., Panteleev M.A. Platelet functional responses and signalling: the molecular relationship. Part 1: responses. Part 1: answers. Systems Biology and Physiology Reports 2022; 1 (1): 14–23. (In Russ.)].
2. Кадыров Т.И., Свешникова А.Н., Пантелеев М.А. Репарация плазматической мембраны, блеbbing и микровезикуляция: параллели и взаимосвязи. Системная биология и физиология 2022; 1 (2): 13–20. [Kadyrov T.I., Sveshnikova A.N., Panteleev M.A. Plasma membrane repair, blebbing and microvesiculation: parallels and relationships. Systems Biology and Physiology Reports 2022; 1 (2): 13–20. (In Russ.)].
3. Коваленко Т.А. Аннексин V: связывающийся с мембраной белок с широчайшим набором функций. Системная биология и физиология 2022; 1 (2): 21–33. [Kovalenko T.A. Annexin V: the membrane-binding protein with diverse functions. Systems Biology and Physiology Reports 2022; 1 (2): 21–33. (In Russ.)].
4. Обыденный С.И. Преимущество применения лактадгерина для оценки экспонирования фосфатидилсерина в тромбоцитах. Системная биология и физиология 2023; 2 (1): 11–3. [Obydennyi S.I. An advantage of lactadgerin in the assessment of phosphatidylserine exposure in platelets. Systems Biology and Physiology Reports 2023; 2 (1): 11–3. (In Russ.)].
5. Braune S., Küpper J.H., Jung F. Effect of Prostanoids on Human Platelet Function: An Overview. Int J Mol Sci 2020; 21 (23): 9020. DOI: 10.3390/ijms21239020
6. Broos K., Feys H.B., De Meyer S.F., Vanhoorelbeke K., Deckmyn H. Platelets at work in primary hemostasis. Blood Rev 2011; 25 (4): 155–67. DOI: 10.1016/j.blre.2011.03.002
7. Horstrup K., Jablonka B., Hönig-Liedl P., Just M., Kochsiek K., Walter U. Phosphorylation of focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein at Ser157 in intact human platelets correlates with fibrinogen receptor inhibition. Eur J Biochem 1994; 225: 21–7.
8. Butt E., Abel K., Krieger M., Palm D., Hoppe V., Hoppe J., et al. cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites of the focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) *in vitro* and in intact human platelets. J Biol Chem 1994; 269 (20): 14509–17.
9. Chitaley K., Chen L., Galler A., Walter U., Daum G., Clowes A.W. Vasodilator-stimulated phosphoprotein is a substrate for protein kinase C. FEBS Lett 2004; 556: 211–5. DOI: 10.1016/S0014-5793(03)01435-2
10. Smolenski A., Bachmann C., Reinhard K., Hönig-Liedl P., Jarchau T., Hoschuetzky H., et al. Analysis and regulation of vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation *in vitro* and in intact cells using a phosphospecific monoclonal antibody. J Biol Chem 1998; 273 (32): 20029–35. DOI: 10.1074/jbc.273.32.20029
11. Schwarz U.R., Geiger J., Walter U., Eigenthaler M. Flow cytometry analysis of intracellular VASP phosphorylation for the assessment of activating and inhibitory signal transduction pathways in human platelets – definition and detection of ticlopidine/clopidogrel effects. Thromb Haemost 1999; 82 (3): 1145–52.
12. Algahtani M., Heptinstall S. Novel strategies for assessing platelet reactivity. Future Cardiol 2017; 13 (1): 33–47. DOI: 10.2217/fca-2016-0054
13. Mallouk N., Varvat J., Berger A., Epinat M., Accassat S., Garcin A., et al. Assessment of a flow cytometry technique for studying signaling pathways in platelets: Monitoring of VASP phosphorylation in clinical samples. Pract Lab Med 2018; 11: 10–8. DOI: 10.1016/j.plabm.2018.02.002
14. Jakubowski J.A., Payne C.D., Li Y.G., Farid N.A., Brandt J.T., Small D.S., et al. A comparison of the antiplatelet effects of prasugrel and high-dose clopidogrel as assessed by VASP-phosphorylation and light transmission aggregometry. Thromb Haemost 2008; 99 (1): 215–22. DOI: 10.1160/TH07-09-0555
15. Glenn J.R., Dovlatova N., White A.E., Dhillon K., Heptinstall S., Fox S.C. 'VASPFix' for measurement of VASP phosphorylation in platelets and for monitoring effects of P2Y12 antagonists. Thromb Haemost 2014; 111 (3): 539–48. DOI: 10.1160/TH13-07-0581
16. Sudo T., Ito H., Kimura Y. Phosphorylation of the vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) by the anti-platelet drug, cilostazol, in platelets. Platelets 2003; 14 (6): 381–90. DOI: 10.1080/09537100310001598819
17. Srihirun S., Schechter A.N., Piknova B. Platelet-based Detection of Nitric Oxide in Blood by Measuring VASP Phosphorylation. J Vis Exp 2019; (143): 10.3791/58647. DOI: 10.3791/58647