

© Коллектив авторов, 2018

УДК 577.125.8:615.217.4+616.12-008.331.1

Соколовская А.А.¹, Вирус Э.Д.¹, Александрин В.В.¹, Роткина А.С.¹,
Никифорова К.А.¹, Московцев А.А.^{1,2}, Иванов А.В.¹, Кубатиев А.А.^{1,2}

Апоптоз тромбоцитов при глобальной ишемии головного мозга у крыс

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, г. Москва, Россия, Балтийская, 8² ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, 125993, г. Москва, ул. Баррикадная, д. 2/1, стр. 1

Цель исследования. Ишемические повреждения головного мозга, являются одной из наиболее частой причин инвалидности и смертности во всем мире. Недавно была установлена роль апоптоза тромбоцитов в патофизиологии инсульта, однако его механизмы до сих пор остаются невыясненными. Несмотря на различные экспериментальные модели, направленные на мониторинг апоптоза тромбоцитов, результаты, относительно изучения и выявления апоптоза тромбоцитов при ишемии головного мозга у крыс, весьма немногочисленны. **Цель исследования** — анализ апоптоза тромбоцитов с помощью метода проточной цитофлуориметрии на модели глобальной ишемии мозга у крыс. **Методика.** В экспериментах использовано 6 крыс-самцов Вистар в возрасте от 5 до 6 мес., разделенных на 2 группы: интактный контроль (К) и глобальная ишемия головного мозга. Модель глобальной ишемии головного мозга у крыс воспроизводилась путём билатеральной окклюзии общих сонных артерий на фоне гипотензии. Уровень системного артериального давления снижали посредством кровопотери до 40—45 мм рт. ст. Суспензию тромбоцитов крыс получали методом гельфильтрации с использованием сефарозы 2В. Для анализа экстернализации фосфатидилсерина (ФС) тромбоциты крыс инкубировали с Аннексином V-PE в связывающем буфере. Для оценки митохондриального мембранного потенциала (ММП) тромбоциты инкубировали с катионным красителем JC-1. После инкубации образцы немедленно анализировали на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, США). **Результаты.** Согласно полученным данным, экстернализация ФС на тромбоцитах крыс, перенесших инсульт, была значительно выше ($53,45 \pm 4,21\%$), чем в контрольной группе крыс ($5,27 \pm 2,40\%$). Данный эффект подтверждается выраженной деполяризацией митохондриальных мембран ($\Delta\Psi_m$). После экспериментальной ишемии мозга почти 40% тромбоцитов было деполяризовано. **Заключение.** Используемый в работе подбор методов и маркеров обеспечивает понимание механизмов апоптоза тромбоцитов как в экспериментальных, так и в клинических условиях. Полученные данные позволяют сделать заключение, что апоптоз тромбоцитов является одним из факторов развития глобальной ишемии головного мозга у крыс. Результаты могут быть использованы для понимания механизмов, участвующих в развитии ишемического повреждения, что, в свою очередь, может быть использовано при разработке новых терапевтических стратегий.

Ключевые слова: тромбоциты; апоптоз; глобальная ишемия мозга; аннексин-5; митохондриальный мембранный потенциал; проточная цитометрия.

Для цитирования: Соколовская А.А., Вирус Э.Д., Александрин В.В., Роткина А.С., Никифорова К.А., Московцев А.А., Иванов А.В., Кубатиев А.А. Апоптоз тромбоцитов при глобальной ишемии головного мозга у крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018; 62(1): 27—35.

DOI: 10.25557/0031-2991.2018.01.27-35

Для корреспонденции: Соколовская Алиса Анатольевна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр., лаб. регуляции агрегатного состояния крови, отдел молекулярной и клеточной патофизиологии, ФГБНУ НИИОПП, e-mail: alice.sokolovskaya@gmail.com

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Поступила 11.01.2018

Sokolovskaya A.A.¹, Virus E.D.¹, Aleksandrin V.V.¹, Rotkina A.S.¹,
Nikiforova K.A.¹, Moskovtsev A.A.^{1,2}, Ivanov A.V.¹, Kubatiev A.A.^{1,2}

Platelets apoptosis in rats after global brain ischemia

¹ Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltijskaya Str. 8, Moscow 125315, Russia² Russian Medical Academy of Postdoctoral Education, Barrikadnaya Str. 2/1, Moscow 12599, Russia

Aim. Stroke is one of the most common causes of disability and mortality worldwide. Multiple experimental models of stroke have focused on monitoring of platelet apoptosis. However, studies on and detection of platelet apoptosis in rats with ischemic stroke are very scarce. We investigated platelet apoptosis in rats with global brain ischemia using flow cytometry. **Methods.** Experiments were carried out on healthy, adult Wistar male rats weighing 300—350 g. The rats were divided into

the following 2 groups: intact rats and rats with global brain ischemia. Global brain ischemia was induced by two-vessel (2-VO) carotid occlusion in combination with hypotension. Systemic blood pressure was reduced by 40–45 mm Hg by inducing haemorrhage. Platelets were isolated by gel filtration on Sepharose 2B. For evaluation of phosphatidylserine (PS) externalization, platelets were incubated with Annexin V-PE and analyzed on FACSCalibur (BD Biosciences). Mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi$) was measured during platelets apoptosis using JC-1, a mitochondrial membrane potential indicator. Platelets were analyzed by flow cytometry immediately after the incubation. **Results.** PS externalization on platelets was significantly greater after global brain ischemia ($53.45 \pm 4.21\%$) than in the control group ($5.27 \pm 2.40\%$). Pronounced depolarization of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) confirmed this finding. In the rat group with experimental brain ischemia, almost 40% ($35.24 \pm 5.21\%$) of platelets were depolarized. **Conclusion.** Our results provide insight into mechanisms involved in platelet apoptosis during ischemic stroke and can be used in further development of new therapeutic strategies.

Keywords: platelets, apoptosis, global brain ischemia, Annexin-V, mitochondrial membrane potential, flow cytometry.

For citation: Sokolovskaya A.A., Virus E.D., Aleksandrin V.V., Rotkina A.S., Nikiforova K.A., Moskovtsev A.A., Ivanov A.V., Kubatiev A.A. Platelets apoptosis in rats after global brain ischemia. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62(1): 27–35. (in Russian). DOI: 10.25557/0031-2991.2018.01.27-35

For correspondence: Alisa Sokolovskaya, PhD, Leading Researcher, Federal State Budgetary Scientific Institution «General Pathology and Pathophysiology», e-mail: alice.sokolovskaya@gmail.com

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Sokolovskaya A.A., <https://orcid.org/0000-0002-0112-2734>

Virus E.D., <https://orcid.org/0000-0001-9371-6494>

Aleksandrin V.V., <https://orcid.org/0000-0003-4625-6522>

Rotkina A.S., <https://orcid.org/0000-0003-1969-2679>

Nikiforova K.A., <https://orcid.org/0000-0002-4119-7175>

Ivanov A.V., <http://orcid.org/0000-0002-2424-6115>

Kubatiev A.A., <https://orcid.org/0000-0001-8077-2905>

Received 11.01.2018

Введение

Ишемические повреждения головного мозга, являются одной из наиболее частой причин инвалидности и смертности во всем мире [1]. В клинических условиях была установлена связь между развитием инсульта и аномальной активностью апоптоза тромбоцитов [2].

Установлено, что для апоптоза тромбоцитов характерны те же события, что и для ядродержащих клеток. Это — деполяризация мембран митохондрий ($\Delta\Psi_m$), активация и транслокация проапоптотических белков Вах и Вак в митохондрию, появление (экстернализация) фосфатидилсерина (ФС) на внешней поверхности мембран, высвобождение апоптогенного цитохрома С из митохондриального межмембранного пространства в цитозоль, активация каспаз 3, 9 и 8 [3–5]. По данным последних исследований экстернализация ФС на внешней стороне плазматической мембраны тромбоцитов является независимым процессом от активации каспаз [6]. Все большее число работ указывает на потенциальное воздействие биоэнергетики митохондрий на активацию и агрегацию тромбоцитов. Более того, доказано, что образование митохондриаль-

ного мембранного потенциала (ММП) играет решающую роль в контроле апоптоза тромбоцитов [7, 8]. Оказалось, что различные стимулы (тромбин, кальций ионофор А23187, антитела против гликопротеина GrIIb) способны индуцировать деполяризацию ММП в тромбоцитах крови [9].

При исследовании роли тромбоцитов в ишемии, предпочтение отдается моделям *in vitro* [10, 11]. В свою очередь, различия в функциональной организации мозга у человека и животных не являются препятствием для исследования молекулярного и клеточного ответа при глобальной ишемии мозга [12]. До последнего времени модели глобальной ишемии *in vivo* активно использовались для понимания механизмов, участвующих в эволюции ишемического повреждения.

Как правило, для изучения апоптоза тромбоцитов используются тромбоциты человека [3, 5, 12], собак и мышей [9, 13]. Исследования ММП в контроле апоптоза тромбоцитов грызунов, и в частности в тромбоцитах крыс, весьма немногочисленны [14]. Следует также отметить, что изучение и выявление апоптоза тромбоцитов при ишемии мозга у крыс ранее не проводилось.

Большое число разных методов позволяет регистрировать процесс апоптоза тромбоцитов на фоне различных патофизиологических процессов. Однако основные проблемы анализа апоптоза тромбоцитов связаны с их повышенной чувствительностью к стрессу, к механическим нагрузкам (центрифугирование) или к резким изменениям температуры. Поэтому крайне важно использовать быстрый и надежный метод регистрации апоптоза, к примеру, такой, как точная цитофлуориметрия.

Цель исследования — анализ апоптоза тромбоцитов с помощью метода проточной цитофлуориметрии на модели глобальной ишемии мозга у крыс.

Методика

Экспериментальная модель

В эксперименте использовано 6 крыс-самцов Вистар в возрасте от 5 до 6 мес., массой от 450 до 500 г (виварий НИИ общей патологии и патофизиологии, Москва). Работу выполняли с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных». Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 г. № 755 и «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» от 18.03.1986.

Глобальная ишемия головного мозга у крыс производилась путём билатеральной окклюзии общих сонных артерий на фоне гипотензии. Уровень системного артериального давления (АД) снижали посредством кровопотери до 40—45 мм рт. ст. (до 30% объема циркулирующей крови или $2,5 \pm 0,2$ мл/100 г массы), после чего следовала двусторонняя окклюзия общих сонных артерий в течение 10 мин, затем реинфузия крови и снятие зажимов с сонных артерий. Кровопотерю и реинфузию осуществляли через бедренную артерию. В эксперименте использовано 2 группы крыс: интактный контроль (К) и глобальная ишемия головного мозга. Кровь, полученная от крыс без ишемии, использовалась для контрольных исследований.

Реактивы и растворы

В работе использовали агонисты активации тромбоцитов: коллаген (Сtopo-Log Corp, Havertown, США), кальциевый ионофор A23187 (Alexis Corporation, Swiss). Додецилсульфат натрия (SDS) и Диметилсульфоксид (ДМСО) — реагенты компании Sigma Aldrich (США). Для измерения ММП использовали JC-1 — липофильный катион 5,5',6,6'-тетрахлор-1,1',3,3'-тетраэтилбензимидазол карбоцианин йодид, 5 мг (Molecular Probes, США). Буфер Тироде (без кальция) — 4 мМ HEPES, 135 мМ NaCl,

2,7 мМ KCl, 2,4 мМ KCl, 2,4 мМ MgCl₂, 5,6 мМ D-глюкоза, 3,3 мМ NaH₂PO₄, 0,35 мг/мл бычий сывороточный альбумин, рН 7,4. Фосфатно-солевой буфер (ФСБ) с 1% раствором параформальдегида (ПФА) для фиксации клеток.

Выделение тромбоцитов

Кровь (~3,15 мл) из яремной вены животного забирала в стерильные пробирки, содержащие в качестве антикоагулянта 3,8% раствор цитрата натрия в соотношении 9:1. Кровь центрифугировали на рефрижераторной лабораторной центрифуге (Joan BR4i multifunction Centrifuge, Франция) 10 мин при 200 г и температуре 23°C. Отбор богатой тромбоцитами плазмы (PRP) производили в объёме 3/4 для более полного отделения от эритроцитов и лейкоцитов, а оставшийся осадок центрифугировали для получения бедной тромбоцитами плазмы (PPP) в течение 15 мин при 1000 g.

Для гельфильтрации тромбоцитов колонку заполняли гелем сефарозой 2B (Sepharosa 2B, Sigma), объём колонки примерно в 10 раз превышал объём наносимой PRP. Тромбоциты считали в камере Горяева с использованием инвертированного микроскопа Axiovert 40 (Carl Zeiss, Германия). Количество отмытых тромбоцитов доводили буфером Тироде до концентрации 2×10^8 /мл.

Проточная цитофлуориметрия

Тромбоциты в количестве 1×10^6 — 2×10^6 клеток в 100 мкл инкубировали с моноклональными антителами FITC Mouse Anti-Rat CD61, clone F11 (BD Pharmingen, San Jose, США) 30 мин при 4°C. В качестве изотипического контроля использовали антитела FITC Mouse IgG1, κ (BD Pharmingen, San Jose, США). После инкубации образцы клеток фиксировали добавлением 400 мкл 1% раствора параформальдегида в ФСБ и анализировали на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, США), укомплектованном воздухоохлаждаемым аргоновым лазером (длина волны 488 нм). В каждом образце накапливали 30 000 событий. Сбор данных проводили в программе CELLQuest (Becton Dickinson, США).

Для оценки экстернализации ФС полученные суспензии тромбоцитов крыс ресуспендировали в буфере Тироде и разводили до концентрации 1×10^7 тромбоцитов/мл. В качестве отрицательного контроля использовали покоящиеся интактные тромбоциты, полученные от контрольных крыс. В качестве положительного контроля тромбоциты контрольных крыс инкубировали с ионофором кальция A23187 (5 мкМ) при комнатной температуре 15 мин. Затем тромбоциты в количестве 1×10^6 в 10 мкл переносили из поло-

жительного контроля в пробирку, содержащую 100 мкл Аннексин V-PE в связывающем буфере (BD Pharmigen, США). Те же процедуры выполнялись при исследовании тромбоцитов крыс после ишемии мозга и неактивированных интактных тромбоцитов. Все образцы инкубировали при комнатной температуре в темноте 15 мин. После чего добавляли 400 мкл связывающего буфера и немедленно анализировали на проточном цитофлуориметре FACSCalibur. В каждом образце накапливали 30 000 событий. Сбор данных проводили в программе CELLQuest (Becton Dickinson, США).

Анализ митохондриального мембранного потенциала (ММП) ΔΨm

Смесь тромбоцитов доводили до нужного объема буфером Тиреде для тромбоцитов (1×10^8 тромбоцитов/мл). В качестве положительного контроля тромбоциты контрольных крыс инкубировали с апоптоз-индуцирующими агентами: тромбином (10 нм), или А23187 (5 мкМ) при комнатной температуре 15 мин. В качестве отрицательного контроля использовали покоящиеся интактные тромбоциты, полученные от контрольных крыс.

Каждый исследуемый образец инкубировали с JC-1 (2 мкг/мл) в течение 30 мин при 37°C. Образец доводили буфером Тиреде до объема 1 мл и немедленно анализировали методом проточной цитофлуориметрии. Интенсивность флуоресценции регистрировали в зеленой 588 нм (FL1) и красной 710 нм (FL2) областях. В каждом гейте анализировали 30 000 событий. Сбор данных проводили в программе CELLQuest (Becton Dickinson, США).

Статистическая обработка результатов

Каждый опыт в конкретных экспериментальных условиях проводили в трех-четырёх повторах. Результаты проточной цитометрии представлены как среднее арифметическое и стандартное отклонение. Для определения статистической значимости различий между средними при доверительном уровне 95% ($p < 0,05$) использовали *t*-критерий Стьюдента.

Результаты и обсуждение

В настоящем исследовании апоптоз тромбоцитов анализировали на модели крыс после глобальной ишемии мозга с помощью метода экстернализации

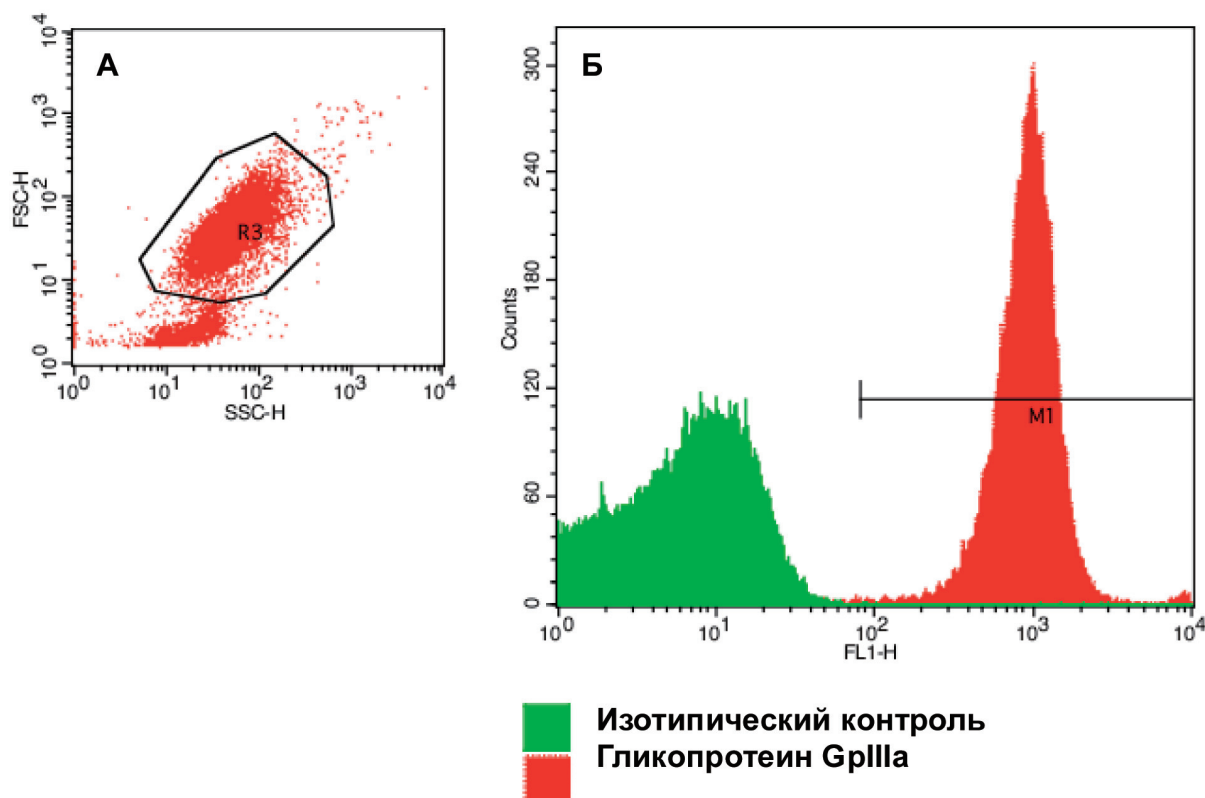


Рис. 1. Цитометрический анализ экспрессии гликопротеина GpIIIa на поверхности тромбоцитов крыс. Тромбоциты инкубировали с антителами анти-CD61/FITC и анализировали на проточном цитофлуориметре FACSCalibur. А — цитограмма на основании прямого FSC и бокового SSC светорассеивания. Показан гейт — R3, содержащий основной пул клеток тромбоцитов; Б — соответствующая гистограмма. В качестве изотипического контроля — FITC Mouse IgG1, κ.

ФС и анализа ММП. Тромбоциты, полученные после гельфильтрации, тестировали на экспрессию специфического поверхностного маркера гликопротеина GP1b. Как видно на рис. 1, тромбоциты, полученные для данного эксперимента, стабильно экспрессировали поверхностный маркер гликопротеин GP1b. Процент CD61⁺ во всех случаях был около 95% ($96,75 \pm 2,01\%$, mean \pm SEM, n = 6).

Экстернализацию ФС на внешнюю сторону плазматической мембраны выявляли с помощью антикоагулянтного белка Аннексина V, который используется для выявления ранних апоптотических клеток с помощью проточной цитофлуориметрии [12, 15]. В качестве положительного контроля использовали тромбоциты контрольных крыс, инкубированные с ионо-

формом кальция A23187, который является золотым стандартом для индукции апоптоза.

Тромбоциты анализировали на основе параметров, измеряемых проточной цитофлуориметрией. На цитограмме проточного цитофлуориметра FACSCalibur на основании прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеивания устанавливали соответствующее окно дискриминации (гейт), который содержал основной пул тромбоцитов, с целью удаления мелких (дебрис) и крупных (агрегаты) частиц. На рис. 2 представлен цитометрический анализ распределения частиц по размеру (FSC) и гранулярности (SSC) в контрольном образце (рис. 2, А) и в образце тромбоцитов крыс после экспериментальной ишемии мозга (рис. 2, Б).

Средняя панель (рис. 2, В, Г, Д) показывает dot plot эксперимента, где по оси X расположены тром-

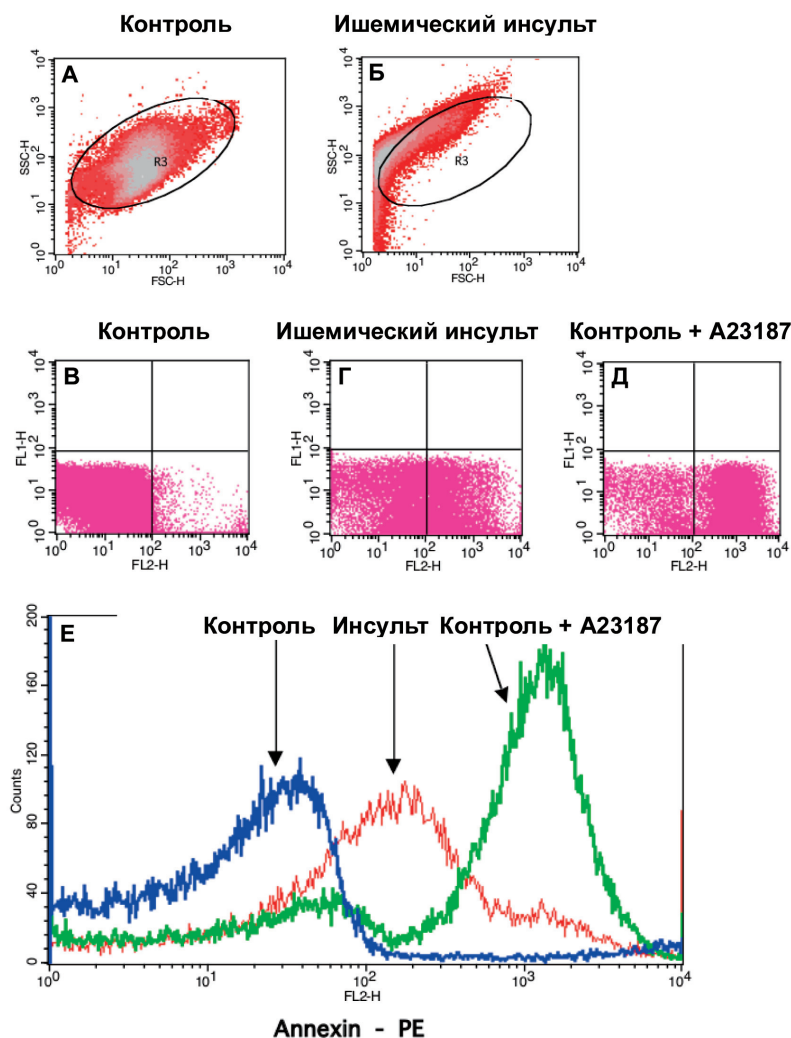


Рис. 2. Цитометрический анализ экспрессии ФС на тромбоцитах крыс: (А) — в контрольной группе крыс, (Б) — в группе крыс после экспериментального ишемического инсульта. В, Г, Д — dot plot и соответствующие гистограммы (Е) (overlay). Тромбоциты контрольных крыс, активированные ионофором кальция A23187 (5 мкМ), использовали в качестве положительного контроля. Анализ проводили на проточном цитофлуориметре FACSCalibur.

боциты, окрашенные Аннексином V-PE. Нижняя панель на рис. 2 (Е) показывает три различные гистограммы данного эксперимента путем их наложения (overly).

В экспериментах было зарегистрировано, что экспрессия ФС на тромбоцитах крыс, после глобальной ишемии мозга ($53,45 \pm 4,21\%$, mean \pm SEM, n = 3) значительно более выражена (рис. 2, Г, Е), чем в контрольной группе ($5,27 \pm 2,40\%$ mean \pm SEM, n = 3) (рис. 2, А, Е). Под воздействием положительного контроля А23187 почти 90% ($95,18 \pm 4,13\%$, mean \pm SEM, n = 4) тромбоцитов были активированы (рис. 2, Д, Е).

Деполяризация мембраны также является одним из важных событий апоптоза тромбоцитов. По некоторым данным, формирование агрегатов JC-1 очень чувствительно к перепадам температуры, поэтому нами был использован метод, при котором тромбоциты инкубировали при температуре 37°C в течение 30 мин [16]. Принцип метода заключается в том, что в присутствии повышенного мембранного потенциала

краситель JC-1 накапливается в виде J-агрегатов в матрице поляризованных митохондрий, что регистрируется по каналу красной флуоресценции (FL2). Во время деполяризации митохондрий JC-1 не накапливается внутри мембраны, он образует мономерные формы, регистрируемые по каналу зелёной флуоресценции (FL1). То есть происходит изменение флуоресценции от красной (FL2) к зелёной (FL1), что и можно зарегистрировать методом проточной цитометрии. Как показано на рис. 3 (А) количество JC-1 агрегатов в тромбоцитах от контрольных крыс составляло почти 90% ($82,23 \pm 7,21\%$, mean \pm SEM, n = 3). В тромбоцитах крыс после экспериментальной ишемии мозга около 40% ($35,24 \pm 5,21\%$, mean \pm SEM, n = 3) тромбоцитов было деполяризовано (рис. 3Г). Активация тромбоцитов от контрольных крыс под воздействием ионофора кальция А23187 приводила к падению мембранного потенциала, около 80% тромбоцитов было деполяризовано ($75,19 \pm 5,21\%$, mean \pm SEM, n = 3) (рис. 3, Б). Под воздействием тромбина почти 50% тромбоцитов

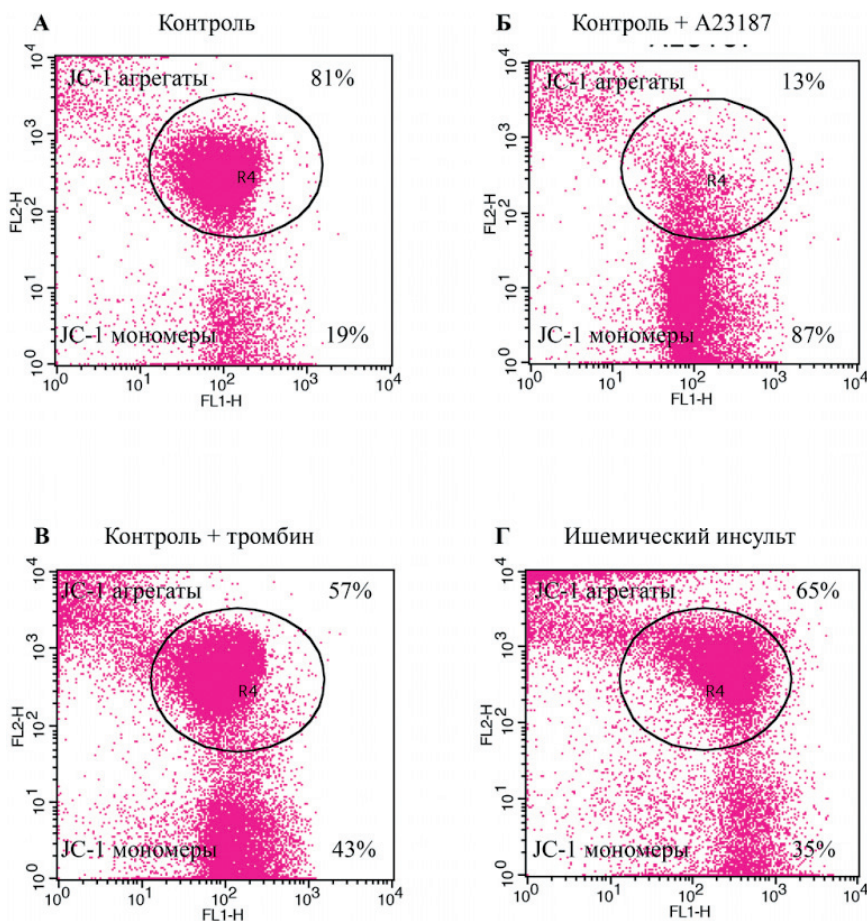


Рис. 3. Деполяризация мембранного потенциала ($\Delta\Psi_m$) в тромбоцитах крыс: в контрольной группе — (А), в группе контрольных крыс, активированных ионофором кальция А23187 (Б) и тромбином (В), в группе крыс после экспериментального ишемического инсульта (Г). Анализ проводили на проточном цитофлуориметре FACSCalibur.

(43,12 ± 6,07%, mean ± SEM, n = 3) было деполяризовано (рис. 3, В).

Многие экспериментальные модели используются для изучения ишемического инсульта, а механизмы повреждения клеток определяют путем тестирования эффектов клеточного стресса или клеточной смерти в конкретной модели. Модели ишемического инсульта, использованные для животных, очень напоминают поражение при инсульте, наблюдаемое у пациентов [13, 17].

Существует 2 основных способа воспроизведения ишемического инсульта *in vivo*: методы фокальной и глобальной ишемии [18, 19]. В первом случае в мозге формируется инфарктное ядро (зона некроза), окруженное пенумброй («ишемической полутени»). В ядерной зоне нейроны гибнут по механизму некроза, тогда как в пенумбре по механизму апоптоза [20]. В случае глобальной ишемии мозга очага некроза не образуется, и гибель отдельных нервных клеток происходит преимущественно по механизму апоптоза [21]. Предполагается, что циркуляторная гипоксия приводит к активации тромбоцитов и секреции ими тромбоксана А₂, который способствует констрикции церебральных артериол и снижению кровотока [22]. В то же время явление апоптоза в тромбоцитах в этих условиях до сих пор не изучалось.

Апоптоз тромбоцитов может возникать как при агонист-индуцированной активации тромбоцитов (коллаген, тромбин, АДФ), так и при индукции нефизиологическими агонистами, такими, как фторбормеристатацетат (РМА) и ионофор кальция А23187 [12]. Процессы и пути, участвующие в обеспечении ФС экспозиции в каждом из этих случаях различны.

Известно, что не все активированные тромбоциты демонстрируют экспрессию ФС [23]. С другой стороны, присутствие ФС на мембранах активированных тромбоцитов ускоряет важнейшие реакции свертывания на несколько порядков. При активации размер некоторых тромбоцитов может значительно варьировать как следствие формирования микрочастиц МЧ [24, 25]. Одновременное стимулирование рецепторов тромбина и коллагена является наиболее распространенным механизмом производства МЧ [26].

Исследования показывают, что биохимические маркеры апоптоза (деполяризация ММП, активация каспазы-3) и морфологические изменения, сопровождающие терминальную фазу апоптоза (сжатие тромбоцитов и формирование МЧ) сильно зависят от формирования поры, изменяющей проницаемость мембраны митохондрий МРТР [8]. Как известно, именно от степени и продолжительности открытия МРТР зависит судьба клетки при инсульте мозга и инфаркте миокарда [27]. Согласно некоторым данным, апоптоз в тромбоцитах индуцирует высвобождение

МЧ, которые играют важную роль в процессах воспаления и коагуляции [28].

Установлено, что один только метод не может быть использован для подтверждения того, что тромбоциты гибнут по классическому пути апоптоза [9].

Согласно требованиям, выдвинутым Номенклатурным комитетом по изучению гибели клеток (NCCD), рекомендовано, в первую очередь, использовать одновременно несколько различных маркеров апоптоза, таких, как деполяризация митохондриальной мембраны ΔΨ_m, экспрессия белков Вах и Вак, активация каспазы-9 и каспазы-3, экстернализация ФС, образование МЧ [9, 29]. И второе, идентифицировать апоптотические тромбоциты по сравнению с положительным и отрицательным контролем.

Для установления оптимального протокола изменения тромбоцитов грызунов, особенно важны такие факторы, как подготовка крови, фиксация тромбоцитов, тип антикоагулянта, методы анестезии и методы исследования функций тромбоцитов. Проточный цитометрический анализ функций тромбоцитов имеет то преимущество, что он может быть использован для процедуры фиксации клеток, что, в свою очередь, позволяет блокировать обменные процессы в клетках, и оставляет активационно-зависимые антигены на поверхности клетки. Поэтому возможность активации артефактных клеток сводится к минимуму [30].

Следует отметить, что тромбоциты крыс по морфологическим свойствам ближе к человеческим тромбоцитам. Кроме того, количество крови, полученное от крыс, позволяет получать достаточное количество тромбоцитов из РРР, столь необходимое для различных функциональных методов [10, 30].

Заключение

Таким образом, на модели глобальной ишемии мозга у крыс с помощью метода проточной цитометрии было показано, что экспрессия ФС на тромбоцитах крыс после глобальной ишемии мозга была значительно выше, чем в контрольной группе крыс. Феномен апоптоза тромбоцитов при глобальной ишемии мозга у крыс был подтвержден с помощью выраженной деполяризации митохондриальной мембраны (ΔΨ_m). Соответствующий подбор методов и маркеров могут помочь в понимании механизмов апоптоза тромбоцитов как в экспериментальных, так и в клинических условиях. В свою очередь, экспериментальная модель глобальной ишемии мозга у крыс может быть использована для изучения механизмов, участвующих в эволюции ишемического повреждения мозга и поиске новых препаратов в предотвращении апоптоза тромбоцитов.

References

1. Wardlaw J.M., von Kummer R., Farrall A.J., Chappell F.M., Hill M., Perry D. A. Large web-based observer reliability study of early ischaemic signs on computed tomography. The Acute Cerebral CT Evaluation of Stroke Study (ACCESS). *PLoS One*. 2010; 5(12). doi:10.1371/journal.pone.0015757
2. Cevik O. The apoptotic actions of platelets in acute ischemic stroke. *Biol Rep*. 2013; 40: 6721-7. doi:10.1007/s11033-013-2787-9.
3. Leytin V. *Blood Rev*. 2012; Mar; 26(2): 51-63. doi:10.1016/j.blre.2011.10.002.
4. Josefsson EC, White MJ, Dowling MR, Kile BT. Platelet life span and apoptosis. *Methods Mol Biol*. 2012; 788: 59-71. doi: 10.1007/978-1-61779-307-3_5.
5. Mindukshev I.V., Rukoyatkina N.I., I.A. Dobrylko, E.A. Skvertchinskaya, E.R. Nikitina, Krivoslyk V.V., S.P. Gambaryan, A.I. Krivchenko. Characterisation of enucleated cells apoptosis: human platelets and erythrocytes. *Russkiy zhurnal fiziologii* 2013; 99(1): 93-110. (in Russian)
6. Artemenko E.O., Sveshnikova A.N., Pantelev M.A. Programmed cell death of platelets during their overactivation. *Oncohematology* 2014; 3: 63-6. doi: http://dx.doi.org/10.17650/1818-8346-2014-9-3-63-66.
7. Barile C.J., Herrmann P.C., Tyvoll D.A., Colman J.P., Decreau R.A., Bull B.S. Inhibiting platelet-stimulated blood coagulation by inhibition of mitochondrial respiration. *PNAS*. 2012; 109: 2539-43. doi:10.1073/pnas.1120645109.
8. Leytin V., Allen D.J., Mitochondrial control of platelet apoptosis: effect of cyclosporin A, an inhibitor of the mitochondrial permeability transition pore. *Laboratory Investigation* 2009; 89: 374-84. doi:10.1038/labinvest
9. Kassassir H., Siewiera K., Przygodzki T., Labieniec-Watala M. and Watala C. Only the Truth Would Enlighten Us — The Advantages and Disadvantages of Flow Cytometry as a Method of Choice in the Study of Mouse and Rat Platelets, Flow Cytometry — Select Topics, M.Sc. Ingrid Schmid (Ed.), InTech. 2016. doi: 10.1182/blood-2012-06-437723.
10. Holloway Paul M., and Gavins Felicity N.E. Modeling Ischemic Stroke In Vitro: The Status Quo and Future Perspectives. *Stroke* 2016; 47(2): 561-9. doi:10.1161/STROKEAHA.115.011932.
11. Sommer C.J. Ischemic stroke: experimental models and reality. *Acta Neuropathol*. 2017; 133(2): 245-61. doi:10.1007/s00401-017-1667-0
12. Gyulkhandanyan A.V., Mutlu A., Freedman J., Markers of platelet apoptosis: methodology and applications. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis* 2012; 33, : 397-411. doi: 10.1007/s11239-012-0688-8.
13. Dasgupta S.K., Argaiz E.R., Mercado J.E., Maul H.O., Garza J., Enriquez A.B., et al. Platelet senescence and phosphatidylserine exposure. *Transfusion* 2010; 50: 2167-75. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2010.02676.x
14. Wu F., Liu Y., Luo L., Lu Y., Yew D.T., Xu J. et al. Platelet mitochondrial dysfunction of DM rats and DM patients. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* 2015; 8: 6937-46.
15. Gibbins and Martyn P. Mahaut-Smith (eds.), Platelets and Megakaryocytes: Volume 3, Additional Protocols and perspectives. *Methods in Molecular Biology* 2012; vol. 788.
16. Verhoeven A.J., Verhaar R., Gouwerok Eric G.W., and Korte D. The mitochondrial membrane potential in human platelets: a sensitive parameter for platelet quality. *Transfusion* 2005; 45:82-89.doi: 10.1111/j.1537-2995.2005.04023.x.
17. Mergenthaler P., Dirnagl U., Meisel A: Pathophysiology of stroke: Lessons from animal models. *Metabolic Brain Disease* 2004; 19: 151-67. PMID: 15554412.
18. Cimino A., Balduini W., Carloni S., Gelosa P., Guerini U., Tremoli E., Sironi L. Neuroprotective effect of simvastatin in stroke: A comparison between adult and neonatal rat models of cerebral ischemia. *Neurotoxicology* 2005; 26: 929-33.
19. Woodruff T.M., Thundyil J., Sung-Chun T., Christopher G. Sobey, Stephen M. et al. Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke. *Molecular Neurodegeneration* 2011; 6: 11. doi:10.1186/1750-1326-6-11.
20. Jiang Y., Wu J., Keep R.F., Hua Y., Hoff J.T., Xi G. Hypoxiainducible factor-1alpha accumulation in the brain after experimental intracerebral hemorrhage. *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* 2002; 22: 689-96. DOI: 10.1097/00004647-200206000-00007.
21. Martin L.J., Sieber F.E., Traystman R.J. Apoptosis and Necrosis Occur in Separate Neuronal Populations in Hippocampus and Cerebellum after Ischemia and Are Associated with Differential Alterations in Metabotropic Glutamate Receptor Signaling Pathways. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2000 Jan; 20(1):153-67. PubMed: 10616804.
22. Rahangdale S., Yeh S.Y., Novack V., Stevenson K., Barnard M.R., Furman M.I. et al. The influence of intermittent hypoxemia on platelet activation in obese patients with obstructive sleep apnea. *J. Clin. Sleep Med*. 2011 Apr 15; 7(2): 172-8. PMID: PMC3077345.
23. Leytin, V., Allen, D.J., Lyubimov, E. & Freedman, J. Higher thrombin concentrations are required to induce platelet apoptosis than to induce platelet activation. *British Journal of Haematology*. 2007; 136: 762-4. doi:10.1111/j.1365-2141.2007.06503.x.
24. Rukoyatkina N., Begonja A. J., Geiger J., Eigenthaler M., Walter U., Gambaryan S. Phosphatidylserine surface expression and integrin alpha IIb beta 3 activity on thrombin/convulxin stimulated platelets/particles of different sizes. *Br J Haematol*. 2009; 144 (4): 591-602. doi:10.1111/j.1365-2141.2008.07506.x.
25. Paltsyn A.A. Platelet microparticles. *Patologicheskaya fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya*. 2017; 61(1): 99-105.
26. Melki I., Tessandier N., Zufferey A., & Boilard E. Platelet microvesicles in health and disease. *Platelets*. 2017; 28(3): 214-21. doi: 10.1080/09537104.2016.1265924.
27. Mattson M.P., Kroemer G. Mitochondria in cell death: novel targets for neuroprotection and cardioprotection. *Trends Mol Med*. 2003; 9: 196-205. doi:10.1016/S1471-4914(03)00046-7.
28. VanWijk M.J., VanBavel E., Sturk A., Nieuwland R., Microparticles in cardiovascular diseases. *Cardiovascular Research* 2003; 59: 277-87. PMID: 12909311.
29. Kroemer G., Galluzzi L., Vandenabeele P., Abrams J., Alnemri E.S., Baehrecke E.H. et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ*. 2009; 16(1):3-11. doi:10.1038/cdd.2008.150.
30. Harrison P. Platelet function analysis. *Blood Reviews*. 2005; 19: 111-23. doi:10.1016/j.blre.2004.05.002.

Сведения об авторах:

Соколовская Алина Анатольевна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. ФГБНУ НИИОПП;

Вирус Э.Д., канд. хим. наук, вед. науч. сотр. ФГБНУ НИИОПП;

Александрин В.В., канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник ФГБНУ НИИОПП;

Роткина А.С., науч. сотр. ФГБНУ НИИОПП;

Никифорова К.А., аспирантка ФГБНУ НИИОПП;

Московцев А.А., канд. мед. наук, вед. науч. сотр. ФГБНУ НИИОПП, доцент каф. общей патологии и патофизиологии ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России;

Иванов А.В., канд. мед. наук, вед. науч. сотр. ФГБНУ НИИОПП;

Кубатиев А.А., доктор мед. наук, акад. РАН, руководитель отдела молекулярной и клеточной патофизиологии ФГБНУ НИИОПП, зав. каф. общей патологии и патофизиологии ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России.