Метод пэтч-клэмп для изучения ионных каналов активированных тромбоцитов

А.Ю. Кохан^{1#}, С.О. Зданевич¹, И.И. Прокофьев¹, И.В. Горудко¹, Е.В. Шамова

1. Белорусский Государственный Университет, Минск, Республика Беларусь

Адрес для переписки: rrchypp@gmail.com

Получено: 14.03.2021

Принято к публикации: 27.03.2021

Опубликовано: 30.03.2021

DOI: 10.52455/sbpr.01.202101012

Аннотация

В данной работе рассмотрены существующие и предложены новые подходы к использованию методики пэтч-клэмп для измерения активности одиночных ионных каналов и мембранного потенциала тромбоцитов человека в конфигурации «cell-attached». Проведена регистрация событий открытия и закрытия одиночных каналов тромбоцитов в конфигурации «cell-attached» после активации сильными агонистами: тромбином и иономицином. Экспериментально и теоретически с использованием простых электрических цепей проанализирована возможность измерения мембранного потенциала тромбоцитов в конфигурации «cell-attached», и обнаружена вероятность образования спайков, вызываемых открытиями одиночных каналов, в процессе регистрации мембранного потенциала методом пэтч-клэмп. Описан простой способ получения конфигурации «inside-out», а также получены записи токов через кальций-управляемые одиночные ионные каналы. В целом в данной работе предложены новые подходы для дальнейшего изучения роли ионных каналов и мембранного потенциала в физиологическом и патофизиологическом отклике тромбоцитов.

Ключевые слова: тромбоциты, пэтч-клэмп, мембранный потенциал, ионный канал

Введение

Тромбоциты млекопитающих представляют собой маленькие безъядерные клетки, играющие ключевую роль в процессах гемостаза и тромбообразования. За несколько последних десятилетий было установлено, что ионные каналы и мембранный потенциал играют важнейшую роль в физиологических и патофизиологических функциях тромбоцитов. До разработки метода пэтч-клэмп исследователи использовали флуоресцентные потенциал-чувствительные зонды [1-3] и радиоактивные изотопы [4-7] для изучения ионной проводимости мембран клеток и измерения мембранного

потенциала. С появлением метода пэтч-клэмп [8, 9] стало возможным напрямую измерять проводимость одиночных ионных каналов или целой мембраны клеток, а также точно измерять значение мембранного потенциала даже таких маленьких клеток как тромбоциты.

Пэтч-клэмп – метод электрофизиологии, который позволяет измерять ионные токи, проходящие через одиночные каналы, фиксируя потенциал на изолированном участке клеточной мембраны (или же целой клетки). Существует несколько конфигураций данного метода. Установление гигаомного контакта между пипеткой и клеточной мембраной позволяет реализовать конфигурацию «cell-attached», в которой возможно измерение ионных токов через одиночные каналы под пипеткой. Если порвать участок мембраны под пипеткой, то мы получим конфигурацию «whole cell», в которой можно измерять как токи от всей мембраны, так и кинетику мембранного потенциала. Другие широко используемые конфигурации пэтч-клэмп – «inside-out» и «outside-out», в которых либо внутренняя, либо внешняя поверхность куса мембраны под пипеткой омывается внеклеточным раствором.

Применение методики пэтч-клэмп к исследованию тромбоцитов пролило свет на различные механизмы их функциональной активности. Например, было показано, что самыми многочисленными ионными каналами на плазматической мембране тромбоцитов являются потенциал-управляемые калиевые каналы K_v 1.3, играющие ключевую роль в поддержании потенциала покоя [10, 11]. С помощью пэтч-клэмп был идентифицирован кальций-управляемый канал K_{Ca} на мембране тромбоцитов, а также установлена его роль в поддержании движущей силы для ионов кальция в процессе активации клеток [12]. Более того, с помощью данного метода был установлен ряд важных модуляторов кальциевой сигнализации в тромбоцитах и мегакариocyтах: рецептор-управляемый катионный канал P2X [13, 14], а также кальциевый канал Orai-1, активируемый высвобождением кальция из внутриклеточных компартментов

[15–17]. Одно из важнейших применений метода пэтч-клэмп – измерение мембранного потенциала. Ранние исследования с применением флуоресцентных зондов показали, что активация тромбоцитов приводит к различным изменениям мембранного потенциала в зависимости от типа агониста. Так, активация тромбоцитов тромбином (в концентрации более 0.1 ед/мл) приводила к деполяризации мембраны, тогда как АДФ (0.3 – 30 мкМ) вызывал гиперполяризацию с дальнейшей деполяризацией мембраны клеток [18]. Более поздние эксперименты с применением пэтч-клэмп показали, что мембранный потенциал мегакариоцитов и, возможно, тромбоцитов может осциллировать после активации клеток АДФ [19, 20]. Более того, изменения мембранного потенциала мегакариоцитов могут напрямую модулировать внутриклеточные кальциевые осцилляции [20]. Так же имеются данные о непосредственном управлении мембранным потенциалом рецепторов связанных с G-белками [21, 22].

Анализ транскриптома тромбоцитов [23], а также другие недавние исследования по изучению тромбоцитов и мегакариоцитов [24] свидетельствуют о наличии в тромбоцитах ранее не идентифицированных ионных каналов. Таким образом, применение метода пэтч-клэмп к тромбоцитам представляет огромный интерес для понимания механизмов, лежащих в основе многих функций этих маленьких клеток.

Несмотря на все преимущества метода пэтч-клэмп, существует множество ограничений для его применения на тромбоцитах. Из-за малых размеров данных клеток и их лабильности некоторые из разработанных конфигураций пэтч-клэмп невозможно применить на тромбоцитах. Например, на данный момент нет опубликованных экспериментальных данных, свидетельствующих о возможности реализации конфигурации «outside-out» на тромбоцитах. Существует мнение, что в данной конфигурации вообще нет необходимости, так как конфигурация «whole-cell» для тромбоцитов ей, по сути, и является [25]. Стоит отметить, что получение конфигурации «whole-cell» также является сложной задачей, и часто ведет к нарушению гигаомного контакта. Некоторые литературные данные свидетельствуют о том, что облегчить получение данной конфигурации можно, добавив в пипеточный раствор, не содержащий ионов кальция, АТФ [10]. Более перспективным способом является использование нистатина (метод «перфорированного пэтча») [13], однако данный подход также имеет ряд ограничений.

Трудности в работе с тромбоцитами, их лабильность и малый размер привели

к использованию мегакариоцитов и соответствующих клеточных линий в качестве модельных клеток в экспериментах пэтч-клэмп вместо тромбоцитов [26, 27]. С одной стороны, это позволяет получать результаты, которые ранее на тромбоцитах было получить проблематично. Но с другой стороны, несмотря на схожесть рецепторного профиля, основных путей сигнализации и ионных каналов тромбоцитов и мегакариоцитов, нельзя быть абсолютно уверенным, что полученные с использованием мегакариоцитов результаты могут быть напрямую перенесены на тромбоциты.

Поэтому целью данной работы стал анализ проблем и ограничений в применении метода пэтч-клэмп на тромбоцитах, поиск потенциальных способов решения данных проблем, а также демонстрация возможностей предложенного в данной работе подхода для изучения токов одиночных каналов в процессе активации тромбоцитов.

Материалы и Методы

Реагенты

Цитрат натрия, HEPES, АДФ, глюкоза, иономицин и апираза были приобретены в Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). PGI₂ был получен в Santa Cruz (Dallas, USA).

Растворы

Внеклеточный буферный раствор с превалирующим содержанием NaCl (внеклеточный буферный раствор) содержал 150 mM NaCl, 10 mM KCl, 10 mM HEPES, 10 mM глюкозы, pH 7.35 (титрование проводилось с помощью NaOH). Пипеточный раствор с превалирующим содержанием KCl (пипеточный буферный раствор) содержал 150 mM KCl, 10 mM NaCl, 10 mM HEPES, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, pH 7.2 (титрование проводилось с помощью KOH). В экспериментах с заменой ионного состава, в пипеточном растворе KCl был заменен эквимоллярным количеством NaCl. Осмолярность растворов была доведена до 300 мОсм для внеклеточного раствора и до 270 мОсм для пипеточного раствора при помощи воды 3-ей степени очистки (MilliQ). Все растворы были профильтрованы через шприцевой фильтр (0.22 мкм).

Выделение клеток

ВВенозную донорскую кровь собирали в пробирки объемом 10 мл, содержащие 3.8 % (w/v) цитрата натрия (в соотношении 9 к 1), 0.5 мкМ PGI₂, 0.3 ед/мл апиразы, и затем центрифугировали при 100 g в течение 7 минут. Далее, 250 мкл обогащенной тромбоцитами плазмы смешивали с

1.25 мл внеклеточного раствора, 0.5 мл цитрата натрия (рН 5.5), 0.5 мкМ PGI_2 , 0.3 ед/мл апиразы и центрифугировали при 200 g в течение 5 минут. Клетки ресуспендировали внеклеточным буферным раствором с превалирующим содержанием NaCl. Все действия выполнялись в соответствии с Хельсинской Декларацией.

Пипетки для пэтч-клэмп

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

Электрофизиологические измерения

Запись в конфигурациях «whole-cell» и «inside-out» проводилась с использованием усилителя НЕКА EPS8 (НЕКА Elektronik GmbH) в режимах фиксации тока и фиксации потенциала. Так как целью экспериментов было изучение одиночных каналов, компенсация последовательного сопротивления или диффузионного потенциала не проводилась. Чашка Петри с внеклеточным раствором была заземлена напрямую через хлорсеребряный электрод, помещенный в стороне от клеток. Перемещение пипетки осуществлялось при помощи манипулятора Sutter MP-225. Чашка Петри располагалась на столике микроскопа (Olympus IX51WI, Tokyo, Japan) с общим увеличением 400x. Фильтрация данных производилась с помощью встроенного фильтра Бесселя нижних частот при 0.7 кГц, оцифровка данных производилась на компьютере при помощи ЦАП/АЦП В-381. Запись данных на жесткий диск осуществлялась с частотой 1 кГц с использованием написанной на Matlab 2004 (The MathWorks, Inc.) программы. Полученные данные анализировались с помощью Origin 8.1 (Origin Lab, Northampton, Massachusetts, USA), WinEDR v. 3.9.1 (University of Strathclyde) и Spectragryph Software (F. Menges "Spekwin32-optical spectroscopy software", Version 1.2.14, 2020, <http://www.effemm2.de/spekwin/>).

Активация клеток

Для того чтобы избежать преждевременной активации тромбоцитов во время их контакта со стеклянной пипеткой, процесс образования гигаомного контакта проводился во внеклеточном буферном растворе с превалирующим содержанием NaCl в отсутствие Ca^{2+} . После этого, 100 мкл внеклеточного раствора, содержащего CaCl_2 и агонист вносили в чашку Петри (конечная

концентрация CaCl_2 в чашке составляла 2 мМ, если другое не указано).

Результаты и Обсуждение

Стеклянные пипетки и электронный шум

УОбычно для клеток небольшого размера рекомендуется использовать толстостенные капилляры для изготовления пипеток (например, внутренний диаметр 0.86 мм, внешний диаметр 1.5 мм) [28]. Теоретически можно использовать и тонкостенные капилляры, однако в этом случае процесс изготовления пипеток с маленькой апертурой, подходящей для тромбоцитов, окажется намного сложнее. При использовании толстостенных пипеток имеется ряд трудностей, главной из которых является повышенный уровень электронного шума, который появляется из-за диэлектрических свойств стекла [8]. Так как большинство токов от одиночных каналов имеют амплитуду в диапазоне 0.5 – 2 пА, повышенный уровень шумов может скрыть данные события. В некоторых исследованиях с применением пэтч-клэмп для уменьшения уровня шумов используют методику покрытия кончика пипетки специальным силиконовым эластомером «Sylgard», что позволяет уменьшить емкость пипетки [9]. Однако в наших исследованиях необходимыми и достаточными условиями для записи одиночных ионных каналов с амплитудами вплоть до 0.4 – 0.5 пА, а в некоторых случаях и ниже, были: корректное заземление всего оборудования, включая клетку Фарадея, сопротивление контакта более 20 ГОм и коэффициент усиления на усилителе 100 мВ/пА или выше.

Получение гигаомного контакта

2 мкл суспензии тромбоцитов помещали на дно пластиковой чашки Петри, изготовленной из 12-луночного планшета для клеточных культур, заполненной 700 мкл внеклеточного буферного раствора с превалирующим содержанием NaCl, содержащего 1 мМ MgCl_2 (в отсутствие Ca^{2+}). Ожидали пока клетки осадут на дно чашки. Далее с помощью микроманипулятора стеклянную пипетку помещали на высоте 1-2 мм от дна чашки. После этого иммерсионный объектив 40x опускали в раствор, и фокусировались на кончик пипетки. Для измерений выбирали только плавающие клетки.

Процент удачно реализованных плотных контактов с клеткой зависит от нескольких факторов. Во-первых, кончик пипетки всегда должен быть чистым, поэтому мы изготавливали пипетки только перед использованием. Во-вторых, внеклеточный и пипеточный растворы всегда должны быть профильтрованы. Другими важными факторами для образования успешного

Рисунок 1. Схематическая иллюстрация регистрации токов от одиночных ионных каналов тромбоцитов во время их активации, исключающая открытие каналов $K_v 1.3$

гигаомного контакта являются наличие дивалентных ионов (кальция и магния) в пипеточном растворе и разница в осмолярности между пипеточным и внеклеточным буферными растворами примерно в 10 % (30 мОсм), как было предложено Неером и Закманом в их новаторской работе [9]. Ранее было показано как теоретически, так и в экспериментах с модельными мембранами, что дивалентные ионы значительно усиливают контакт между мембраной и стеклом капилляра [29]. Еще один важный параметр – это уровень pH в пипеточном буферном растворе, так как ионы H^+ , наравне с Ca^{2+} и Mg^{2+} , увеличивают силу адгезии клеточной мембраны к стеклу. После учета и применения всех вышеназванных подходов, процент успешных гигаомных контактов возрос до 90 %. Хотя стабильность контактов клетки с пипеткой различалась, обычно удавалось получать успешные гигаомные контакты в течение 5 часов после выделения клеток.

Конфигурация «cell-attach» для тромбоцитов

Из-за маленьких размеров тромбоцитов и вышеназванных проблем лишь немного типов каналов мембраны тромбоцитов были описаны с использованием метода пэтч-клэмп, включая $K_{Ca} 3.1$, $K_v 1.3$, P_2X , хлорные каналы. Однако недавние исследования [23] свидетельствуют о том, что несмотря на свой маленький размер и отсутствие ядра, тромбоциты имеют огромное разнообразие ионных каналов, которые на данный момент охарактеризованы недостаточно. Кроме того, некоторые из ранее перечисленных результатов были получены с использованием мегакариоцитов, не тромбоцитов. Поэтому идентификация ионных каналов мембраны тромбоцитов и описание их электрофизиологических характеристик важно для расширения понимания их роли в процессах внутриклеточной сигнализации и физиологическом ответе [22, 30-36].

Измерение ионных токов от одиночных каналов при активации тромбоцитов

Ранее было показано, что тромбоциты имеют большое количество (300-400 шт на клетку)

потенциал-управляемых калиевых каналов $K_v 1.3$ [37]. Учитывая площадь мембраны тромбоцитов и размер апертуры пипетки, как минимум несколько каналов данного типа всегда будут присутствовать в куске мембраны под пипеткой и вносить вклад в регистрируемые токи, что значительно осложняет детектирование токов от других типов каналов. Учитывая имеющиеся биофизические характеристики K_v каналов, а именно потенциал 50%- активации, равный -30 мВ, мы предложили подход, позволяющий измерять активность других типов ионных каналов. Использование конфигурации «cell-attach» в режиме фиксации потенциала с приложенным потенциалом в диапазоне от $+80$ до $+150$ мВ на электроде внутри пипетки позволило избежать активации потенциал-управляемых каналов и сделало возможным регистрацию токов от всех остальных ионных каналов. Во время данной процедуры кусок мембраны под пипеткой был гиперполяризован, что приводило к инактивации каналов $K_v 1.3$. Вместе с тем, фиксируемая разность потенциалов создавала достаточную движущую силу для всех типов ионов, что облегчало регистрацию токов с очень низкой проводимостью в районе 1-2 пСм. Схематическая иллюстрация данного подхода изображена на рис. 1.

Вышеназванные подходы для получения хорошего гигаомного контакта позволили нам записать ионные токи от одиночных каналов тромбоцитов, активированных тромбином (0.73 мкг/мл) и иономицином (1 мкМ) в конфигурации «cell-attached» (рис. 2А, В, С).

Анализ данных, полученных при 6 успешно реализованных гигаомных контактах позволил установить, как минимум 5 различных типов проводимостей в активированных тромбоцитах в диапазоне от 2 до 20 пСм. Учитывая, что большинство известных и описанных ранее ионных каналов имеют низкую проводимость, кинетические кривые ионных токов с низким приложенным потенциалам давали мало результата. Когда приложенный потенциал составлял $+50$ мВ, амплитуда регистрируемых токов от одиночных каналов находилась в диапазоне 0.4 – 0.5 пА, что лишь немногим больше уровня электронных шумов (рис. 2А). Поэтому, фиксация потенциала в диапазоне значений $+80$ – $+150$ мВ позволяет выявить токи от каналов с самой низкой проводимостью. Однако, следует иметь в виду, что большие приложенные потенциалы могут приводить к достаточно быстрому нарушению гигаомного контакта.

На рис. 2В, как и на рис. 2А приведены аналогичные кинетики токов, активируемых тромбином, но с использованием пипеточного

Рисунок 2. Записи токов от одиночных каналов тромбоцитов в конфигурации «cell-attached». А, В Активация тромбоцитов тромбином (0.73 мкг/мл) во внеклеточном буферном растворе с преобладающим содержанием NaCl. Пипеточный буферный раствор с преобладающим содержанием KCl. (А), пипеточный буферный раствор с преобладающим содержанием NaCl (В). С, Активация тромбоцитов иономицином (1 мкМ) во внеклеточном буферном растворе с преобладающим содержанием NaCl. 1,2 - Пипеточный буферный раствор с преобладающим содержанием KCl, 3 – пипеточный буферный раствор с преобладающим содержанием NaCl. Приложенный потенциал (V_{hold}) указан слева от каждой кинетики тока. Представлены типичные кинетические кривые из 15 независимых экспериментов с использованием тромбоцитов разных доноров. donors are presented.

раствора с преобладающим содержанием NaCl. Из представленных данных видно, что некоторые типы событий (оценивали по амплитуде токов при определенном фиксированном потенциале), которые наблюдались при использовании пипеточного раствора с преобладающим содержанием KCl (рис. 2А), не наблюдались, когда пипеточный буферный раствор был с преобладающим содержанием NaCl (рис. 2В), что может свидетельствовать об участии как минимум 2 типов каналов калиевой проводимости в процессе активации тромбоцитов тромбином.

Для тестирования стабильности гигаомного контакта клетки со стеклянной пипеткой,

получаемого с помощью предложенного в данной работе подхода, производили запись токов от одиночных каналов тромбоцитов в ответ на действие 1 мкМ иономицина, Ca^{2+} -ионофора, обладающего сильным активирующим действием на тромбоциты. Результаты этих экспериментов с применением разных пипеточных растворов приведены на рис. 2С.

Значительное увеличение уровня внутриклеточного кальция, индуцируемое иономицином, или же сочетанным действием коллагена и тромбина, обычно переводит тромбоциты в новое прокоагулянтное состояние [38]. Во время этого перехода, морфология клеток значительно меняется. Они становятся шароподобными [39], многие белки плазматической мембраны, а также фосфатидилсерин, переходят в так называемую «кэп»-область [40, 41]. На микрофотографиях (рис. S1 и S2, дополнительные материалы) можно видеть тромбоциты на пипетке или свободно плавающие в растворе до и после активации. Не смотря на сильную активацию и переход в прокоагулянтное состояние, нарушение гигаомного контакта после внесения иономицина наблюдалось лишь в 30% пэтчах.

Ионные каналы играют важную роль во множестве процессов, лежащих в основе активации тромбоцитов. Например, калиевые каналы участвуют в кальциевой сигнализации, поддерживая мембранный потенциал, и таким образом увеличивая движущую силу для Ca^{2+} . Вход кальция во время активации также зависит от работы ряда ионных каналов, включая Orai1, P2X, TRPC [17, 27, 42]. Важно отметить, что скрамблаза Ано6, которая играет решающую роль в прокоагулянтном ответе тромбоцитов, также является каналом для ионов хлора с очень большим порогом активации ионами кальция [33, 43] и может вносить вклад в активацию тромбоцитов и их переход в прокоагулянтное состояние. Таким образом, предложенные в данной работе подходы для регистрации токов от одиночных каналов могут стать полезным инструментом для изучения различных сигнальных путей тромбоцитов, в которых ключевую роль играют ионные каналы.

Измерение мембранного потенциала в конфигурации «cell-attached»

Ранее в работе Mason J. et. al. [19], был предложен новый подход для изучения мембранного потенциала в конфигурации «cell-attached». Согласно модельным экспериментам и данным пэтч-клэмп, точность записи потенциала в режиме фиксации тока зависит от отношения между сопротивлением контакта и входным сопротивлением мембраны, а также от ионного состава раствора в пипетке, так как он должен быть

Рисунок 3. Изменение мембранного потенциала тромбоцитов. А, Измерение мембранного потенциала тромбоцитов после активации 100 нМ МПО было проведено в конфигурации «cell-attached» в режиме фиксации тока. Представлена типичная кинетическая кривая из 15 независимых экспериментов на крови от разных доноров. В, Кинетика мембранного потенциала тромбоцитов, записанная в конфигурации «cell-attached», после активации 1 мкМ АДФ. Можно увидеть небольшие осцилляции мембранного потенциала на уровне 7-10 мВ. Представлены типичные кинетические кривые из 10 независимых экспериментов с использованием тромбоцитов разных доноров. С, Упрощенная электрическая схема, иллюстрирующая запись мембранного потенциала в конфигурации «cell-attached» [19]. V_{measure} – регистрируемый потенциал, G_{seal} – проводимость контакта, G_{input} – входная проводимость, G_{channel} – проводимость одиночного канала. В модели мембранный потенциал (V_{membrane}) установлен на уровне -60 мВ. D, Результаты моделирования простой электрической схемы, представляющей запись мембранного потенциала в конфигурации «cell-attached» с двумя ионными каналами различной проводимости под пипеткой (24 пСм, 5 пСм)

Рисунок 4. Записи токов от одиночных каналов тромбоцитов в конфигурации «inside-out». В отсутствие (A) или присутствии 10 мкМ CaCl₂ (B) во внеклеточном буферном растворе с преобладающим содержанием NaCl. Приложенный потенциал (V_{hold}) указан слева от каждой кинетики тока. Представлены типичные кинетические кривые из 12 независимых экспериментов с использованием тромбоцитов разных доноров.

максимально близким к цитозольному ионному составу клетки. Этот подход позволяет измерять мембранный потенциал тромбоцитов или любых других клеток без нарушения целостности мембраны, как и в случае конфигурации «whole cell», в которой происходит быстрая перфузия внутриклеточного содержимого пипеточным раствором.

С целью проверки данного метода нами было исследовано, как изменяется мембранный потенциал тромбоцитов, активированных миелопероксидазой (МПО), которая, как было ранее показано, оказывает модулирующее действие на агрегацию тромбоцитов, реорганизацию их цитоскелета и депо-зависимый вход кальция в данных клетках [44], а также способна активировать нейтрофилы [45] и связываться с поверхностью эритроцитов, тем самым влияя на их свойства [46, 47]. Добавление 100 нМ МПО во внеклеточный раствор приводило к небольшой гиперполяризации плазматической мембраны на уровне 10-12 мВ (рис. 3А).

В некоторых экспериментах мы наблюдали необычные спайки в записях потенциала в конфигурации «cell-attached». Данный эффект можно увидеть на рис. 3В. Эти спайки были достаточно быстрыми и имели амплитуду порядка 7-10 мВ, и были вызваны, по всей видимости, изменением самого мембранного потенциала, либо же ионным током через одиночные ионные каналы.

Мы исследовали данный эффект с использованием простой модели. Известно, что входное сопротивление мембраны тромбоцитов составляет порядка 50 ГОм [10]. Используя предложенную упрощенную модель [19] измерения мембранного потенциала в конфигурации

«cell-attached» и модифицируя её, добавив проводимость ионных каналов ($G_{channel}$), мы имитировали наличие одиночных ионных каналов под пипеткой. Итоговая электрическая схема представлена на рис. 3С.

Измененные уравнения выглядят следующим образом:

$$V_{measure} = V_{membrane} * \frac{\frac{G_{input} + G_{channel} * F(t)}{G_{seal}}}{1 + \frac{G_{input} + G_{channel} * F(t)}{G_{seal}}} \quad \text{Eq. 1}$$

$$F(t) = a * e^{-\frac{(x-b)^2}{2*c^2}} \quad \text{Eq. 2}$$

Параметры модели: G_{input} - 17 пСм (59 ГОм), $G_{channel}$ - 5 пСм или 24 пСм (что соответствует полученным в данной работе проводимостям одиночных каналов), G_{seal} - переменный параметр (соответствует сопротивлению контакта ($R_{contact}$) в 20, 30 или 50 ГОм). $V_{membrane}$ = -60 мВ. $F(t)$ – функция времени, которая определяет процесс открытия каналов. В нашем случае это простая функция Гаусса (ур. 2) со следующими параметрами: $a = 1$, $b = 3$, $c = 0.07$.

Результаты моделирования (рис. 3D) свидетельствуют о том, что открытие ионных каналов приводило к спайкам в записи потенциала. Амплитуда спайков обратно-пропорциональна сопротивлению контакта и прямо пропорциональна проводимости открывающихся каналов. В случае теоретически идеального гигаомного контакта (сопротивление контакта стремится к бесконечности) мы бы не смогли увидеть никаких спайков в записи потенциала во время открытия одиночных каналов. Аналогично в случае очень низкого входного сопротивления (например, при добавлении нистатина в пипетку) никаких спайков бы не было.

Ранее осциллирующий характер записей мембранного потенциала тромбоцитов при активации АДФ в конфигурации «cell-attached» были показаны Mason J. et. al [19]. Результаты настоящей работы показывают, что причиной такого поведения потенциала могут быть события открытия одиночных каналов под пипеткой. Это необходимо иметь в виду, так как показано, что мембранный потенциал мегакариоцитов может осциллировать [20].

Inside-out mode

Конфигурация «inside-out» является полезным инструментом для изучения поведения одиночных каналов при прямом действии вторичных мессенджеров различных внутриклеточных сигнальных путей, так как позволяет полностью контролировать ионный состав с обеих сторон

куска мембраны.

Для получения данной конфигурации, мы использовали ранее предложенный подход [48]. Капля вязкой жидкости (в данной работе использовали иммерсионное масло для микроскопии) помещается на дно чашки Петри, после чего проводится процедура получения гигаомного контакта. Далее пипетка с клеткой на её конце подводится к краю капли масла, и очень аккуратно погружается в него. После первого контакта клетки с маслом, пипетку отводят в сторону, что отделяет клетку, которая остается в масле, от куска мембраны на пипетке. Следуя ранее указанным рекомендациям нам удавалось получать конфигурацию «inside-out» в более чем 90% случаев, и она была стабильна в течение более чем 10 минут. Анимация процесса получения конфигурации «inside-out» представлена в Дополнительных материалах на рис. S3.

В данной конфигурации мы получили записи ионных токов через одиночные каналы в отсутствие и присутствии Ca^{2+} (рис. 4), одного из основных вторичных мессенджеров, на активность одиночных каналов тромбоцитов.

Заключение

В данный момент методика пэтч-клэмп является самым мощным инструментом для изучения ионных каналов и их роли в процессах жизнедеятельности клеток. В течение последних десятилетий стало очевидным, что ионные каналы, наравне со множеством мембранных рецепторов и внутриклеточных мессенджеров, играют огромную роль в механизмах активации тромбоцитов и их физиологическом ответе. Данная работа предлагает подходы и методы, которые могут помочь другим исследователям расширить применение метода пэтч-клэмп для изучения клеток небольших размеров и раскрыть новые механизмы, посредством которых ионные каналы управляют функциями тромбоцитов.

Вклад авторов

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

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что они не имеют конфликта интересов.

Благодарности

Мы благодарим Ф. Балабина за конструктивное обсуждение экспериментальных данных и редактирование текста статьи. Авторы благодарны Алексею Соколову (Институт Экспериментальной Медицины, Санкт-Петербург, Россия) за великодушно предоставленные МПО и тромбин.

Работа частично поддержана Белорусским Республиканским Фондом Фундаментальных Исследований (грант B20R-215).

Список литературы

1. Waggoner, A. S. (1979). Dye indicators of membrane potential. Annual review of biophysics and bioengineering, 8(1), 47-68. <https://doi.org/10.1146/annurev.bb.08.060179.000403>.
2. Felix, J. P., Williams, B. S., Priest, B. T., Brochu, R. M., Dick, I. E., Warren, V. A., ... & Garcia, M. L. (2004). Functional assay of voltage-gated sodium channels using membrane potential-sensitive dyes. Assay and drug development technologies, 2(3), 260-268. <https://doi.org/10.1089/1540658041410696>.
3. Huber, C., Klimant, I., Krause, C., Werner, T., & Wolfbeis, O. S. (2001). Nitrate-selective optical sensor applying a lipophilic fluorescent potential-sensitive dye. Analytica chimica acta, 449(1-2), 81-93. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)01363-0](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)01363-0).
4. Burnham, C., Braw, R., & Karlsh, S. J. D. (1986). A Ca-dependent K channel in "luminal" membranes from the renal outer medulla. The Journal of membrane biology, 93(2), 177-186. <https://doi.org/10.1007/BF01870809>.
5. Garty, H., Rudy, B., & Karlsh, S. J. (1983). A simple and sensitive procedure for measuring isotope fluxes through ion-specific channels in heterogenous populations of membrane vesicles. Journal of Biological Chemistry, 258(21), 13094-13099. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)44085-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)44085-3).
6. Garty, H. (1984). Amiloride blockable sodium fluxes in toad bladder membrane vesicles. The Journal of membrane biology, 82(3), 269-279. <https://doi.org/10.1007/BF01871636>.
7. Burnham, C., Karlsh, S. J. D., & Jørgensen, P. L. (1985). Identification and reconstitution of a Na⁺/K⁺/Cl⁻ cotransporter and K⁺ channel from luminal membranes of renal red outer medulla. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 821(3), 461-469. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(85\)90051-3](https://doi.org/10.1016/0005-2736(85)90051-3).
8. Neher, E., Sakmann, B., & Steinbach, J. H. (1978). The extracellular patch clamp: a method for resolving currents through individual open channels in biological membranes. Pflügers Archiv, 375(2), 219-228. <https://doi.org/10.1007/BF00584247>.
9. Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., & Sigworth, F. J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. Pflügers Archiv, 391(2), 85-100. <https://doi.org/10.1007/BF00656997>.
10. Maruyama, Y. (1987). A patch-clamp study of mammalian platelets and their voltage-gated potassium current. The Journal of physiology, 391(1), 467-485. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1987.sp016750>.
11. Mahaut-Smith, M. P., Rink, T. J., Collins, S. C., & Sage, S. O. (1990). Voltage-gated potassium channels and the control of membrane potential in human platelets. The Journal of physiology, 428(1), 723-735. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1990.sp018237>.
12. Mahaut-Smith, M. P. (1995). Calcium-activated potassium channels in human platelets. The Journal of physiology, 484(1), 15-24. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1995.sp020644>.
13. Mahaut-Smith, M. P., Sage, S. O., & Rink, T. J. (1992). Rapid ADP-evoked currents in human platelets recorded with the nystatin permeabilized patch technique. Journal of Biological Chemistry, 267(5), 3060-3065. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)50694-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)50694-9).
14. Mahaut-Smith, M. P., Sage, S. O., & Rink, T. J. (1990). Receptor-activated single channels in intact human platelets. Journal of Biological Chemistry, 265(18), 10479-10483. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)86972-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)86972-1).
15. Somasundaram, B., & Mahaut-Smith, M. P. (1994). Three cation influx currents activated by purinergic receptor stimulation in rat megakaryocytes. The Journal of physiology, 480(2), 225-231. <https://doi.org/10.1007/BF01871636>.

16. Somasundaram, B., Norman, J. C., & Mahaut-Smith, M. P. (1995). Primaquine, an inhibitor of vesicular transport, blocks the calcium-release-activated current in rat megakaryocytes. *Biochemical Journal*, 309(3), 725-729. <https://doi.org/10.1042/bj3090725>.
17. Tolhurst, G., Carter, R. N., Amisten, S., Holdich, J. P., Erlinge, D., & Mahaut-Smith, M. P. (2008). Expression profiling and electrophysiological studies suggest a major role for Orai1 in the store-operated Ca²⁺ influx pathway of platelets and megakaryocytes. *Platelets*, 19(4), 308-313. <https://doi.org/10.1080/09537100801935710>.
18. Home, W. C., & Simons, E. R. (1978). Probes of transmembrane potentials in platelets: changes in cyanine dye fluorescence in response to aggregation stimuli. *Blood*, 51(4), 741-749. <https://doi.org/10.1182/blood.V51.4.741.741>.
19. Mason, M. J., Simpson, A. K., Mahaut-Smith, M. P., & Robinson, H. P. C. (2005). The interpretation of current-clamp recordings in the cell-attached patch-clamp configuration. *Biophysical journal*, 88(1), 739-750. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.049866>.
20. Mason, M. J., Hussain, J. F., & Mahaut-Smith, M. P. (2000). A novel role for membrane potential in the modulation of intracellular Ca²⁺ oscillations in rat megakaryocytes. *The Journal of Physiology*, 524(Pt 2), 437. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.00437.x>.
21. Rinne, A., Mobarec, J. C., Mahaut-Smith, M., Kolb, P., & Bünenmann, M. (2015). The mode of agonist binding to a G protein-coupled receptor switches the effect that voltage changes have on signaling. *Science Signaling*, 8(401), ra110-ra110. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aac7419>.
22. Martinez-Pinna, J., Gurung, I. S., Vial, C., Leon, C., Gachet, C., Evans, R. J., & Mahaut-Smith, M. P. (2005). Direct voltage control of signaling via P2Y1 and other G-q-coupled receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 280(2), 1490-1498. <https://doi.org/10.1074/jbc.M407783200>.
23. Wright, J. R., Amisten, S., Goodall, A. H., & Mahaut-Smith, M. P. (2016). Transcriptomic analysis of the ion channelome of human platelets and megakaryocytic cell lines. *Thrombosis and haemostasis*, 116(2), 272. <https://doi.org/10.1160/th15-11-0891>.
24. Balduini, A., Fava, C., Di Buduo, C. A., Abbonante, V., Meneguzzi, A., Soprano, P. M., ... & Minuz, P. (2021). Expression and functional characterization of the large-conductance calcium and voltage-activated potassium channel Kca 1.1 in megakaryocytes and platelets. *J Thromb Haemost*. <https://doi.org/10.1111/jth.15269>.
25. Mahaut-Smith, M. P. (2004). Patch-clamp recordings of electrophysiological events in the platelet and megakaryocyte. In *Platelets and Megakaryocytes* (pp. 277-299). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-783-1:277>.
26. Tolhurst, G., Vial, C., Léon, C., Gachet, C., Evans, R. J., & Mahaut-Smith, M. P. (2005). Interplay between P2Y1, P2Y12, and P2X1 receptors in the activation of megakaryocyte cation influx currents by ADP: evidence that the primary megakaryocyte represents a fully functional model of platelet P2 receptor signaling. *Blood*, 106(5), 1644-1651. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-02-0725>.
27. Carter, R. N., Tolhurst, G., Walmsley, G., Vizuete-Forster, M., Miller, N., & Mahaut-Smith, M. P. (2006). Molecular and electrophysiological characterization of transient receptor potential ion channels in the primary murine megakaryocyte. *The Journal of physiology*, 576(1), 151-162. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.113886>.
28. Ogden, D., & Stanfield, P. (1994). Patch clamp techniques for single channel and whole-cell recording. In *Microelectrode techniques: the Plymouth workshop handbook* (pp. 53-78). Company of Biologists Cambridge.
29. Priel, A., Gil, Z., Moy, V. T., Magleby, K. L., & Silberberg, S. D. (2007). Ionic requirements for membrane-glass adhesion and giga seal formation in patch-clamp recording. *Biophysical journal*, 92(11), 3893-3900. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.099119>.
30. Martins, J. R., Faria, D., Kongsuphol, P., Reisch, B., Schreiber, R., & Kunzelmann, K. (2011). Anoctamin 6 is an essential component of the outwardly rectifying chloride channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(44), 18168-18172. <https://doi.org/10.1073/pnas.1108094108>.
31. Taylor, K. A., & Mahaut-Smith, M. P. (2019). A major interspecies difference in the ionic selectivity of megakaryocyte Ca²⁺-activated channels sensitive to the TMEM16F inhibitor CaCCinh-A01. *Platelets*, 30(8), 962-966. <https://doi.org/10.1080/09537104.2019.1595560>.
32. Berna-Erro, A., Galan, C., Dionisio, N., Gomez, L. J., Salido, G. M., & Rosado, J. A. (2012). Capacitative and non-capacitative signaling complexes in human platelets. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1823(8), 1242-1251. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.05.023>.
33. Harper, M. T., & Poole, A. W. (2013). Chloride channels are necessary for full platelet phosphatidylserine exposure and procoagulant activity. *Cell death & disease*, 4(12), e969-e969. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.495>.
34. Lang, F., Munzer, P., Gawaz, M., & Borst, O. (2013). Regulation of STIM1/Orai1-dependent Ca²⁺ signalling in platelets. *Thromb Haemost*, 110(5), 925-930. <https://doi.org/10.1160/th13-02-0176>.
35. Harper, M. T., Londono, J. E. C., Quick, K., Londono, J. C., Flockerzi, V., Philipp, S. E., ... & Poole, A. W. (2013). Transient receptor potential channels function as a coincidence signal detector mediating phosphatidylserine exposure. *Science Signaling*, 6(281), ra50-ra50. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2003701>.
36. Wolfs, J. L., Wielders, S. J., Comfurius, P., Lindhout, T., Giddings, J. C., Zwaal, R. F., & Bevers, E. M. (2006). Reversible inhibition of the platelet procoagulant response through manipulation of the Gardos channel. *Blood*, 108(7), 2223-2228. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-01-009613>.
37. McCloskey, C., Jones, S., Amisten, S., Snowden, R. T., Kaczmarek, L. K., Erlinge, D., ... & Mahaut-Smith, M. P. (2010). Kv1. 3 is the exclusive voltage-gated K⁺ channel of platelets and megakaryocytes: roles in membrane potential, Ca²⁺ signalling and platelet count. *The Journal of physiology*, 588(9), 1399-1406. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.188136>.
38. Schoenwaelder, S. M., Yuan, Y., Josefsson, E. C., White, M. J., Yao, Y., Mason, K. D., ... & Jackson, S. P. (2009). Two distinct pathways regulate platelet phosphatidylserine exposure and procoagulant function. *Blood*, The Journal of the American Society of Hematology, 114(3), 663-666. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-01-200345>.
39. Hess, M. W., & Siljander, P. (2001). Procoagulant platelet balloons: evidence from cryopreparation and electron microscopy. *Histochemistry and cell biology*, 115(5), 439-443. <https://doi.org/10.1007/s004180100272>.
40. Podoplelova, N. A., Sveshnikova, A. N., Kotova, Y. N., Eckly, A., Receveur, N., Nechipurenko, D. Y., ... & Panteleev, M. A. (2016). Coagulation factors bound to procoagulant platelets concentrate in cap structures to promote clotting. *Blood*, The Journal of the American Society of Hematology, 128(13), 1745-1755. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-02-696898>.
41. Abaeva, A. A., Canault, M., Kotova, Y. N., Obyednnyy, S. I., Yakimenko, A. O., Podoplelova, N. A., ... & Panteleev, M. A. (2013). Procoagulant platelets form an α-granule protein-covered "cap" on their surface that promotes their attachment to aggregates. *Journal of Biological Chemistry*, 288(41), 29621-29632. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.474163>.
42. MacKenzie, A. B., Mahaut-Smith, M. P., & Sage, S. O. (1996). Activation of receptor-operated cation channels via P2X1 not P2T purinoceptors in human platelets. *Journal of Biological Chemistry*, 271(6), 2879-2881. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.6.2879>.
43. Fujii, T., Sakata, A., Nishimura, S., Eto, K., & Nagata, S. (2015). TMEM16F is required for phosphatidylserine exposure and microparticle release in activated mouse platelets. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(41), 12800-12805. <https://doi.org/10.1073/pnas.1516594112>.
44. Gorudko, I. V., Sokolov, A. V., Shamova, E. V., Grudinina, N. A., Drozd, E. S., Shishlo, L. M., ... & Panasenkov, O. M. (2013). Myeloperoxidase modulates human platelet aggregation via actin cytoskeleton reorganization and store-operated calcium entry. *Biology open*, 2(9), 916-923. <https://doi.org/10.1242/bio.20135314>.
45. Gorudko, I. V., Grigorieva, D. V., Sokolov, A. V., Shamova, E. V., Kostevich, V. A., Kudryavtsev, I. V., ... & Panasenkov, O. M. (2018). Neutrophil activation in response to monomeric myeloperoxidase. *Biochemistry and Cell Biology*, 96(5), 592-601. <https://doi.org/10.1139/bcb-2017-0290>.
46. Shamova, E. V., Gorudko, I. V., Grigorieva, D. V., Sokolov, A. V., Kokhan, A. U., Melnikova, G. B., ... & Panasenkov, O. M. (2020). The effect of myeloperoxidase isoforms on biophysical properties of red blood cells. *Molecular and cellular biochemistry*, 464(1), 119-130. <https://doi.org/10.1007/s11010-019-03654-0>.
47. Gorudko, I. V., Sokolov, A. V., Shamova, E. V., Grigorieva, D. V., Mironova, E. V., Kudryavtsev, I. V., ... & Timoshenko, A. V. (2016). Binding of human myeloperoxidase to red blood cells: Molecular targets and biophysical consequences at the plasma membrane level. *Archives of biochemistry and biophysics*, 591, 87-97. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.12.007>.
48. MacKenzie, A. B., & Mahaut-Smith, M. P. (1996). Chloride channels in excised membrane patches from human platelets: effect of intracellular calcium. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1278(1), 131-136. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(95\)00207-3](https://doi.org/10.1016/0005-2736(95)00207-3).