

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ИОННЫХ КАНАЛОВ PIEZO1 ТРОМБОЦИТОВ МЕТОДОМ ПЭТЧ-КЛАМП

А. Ю. Кохан¹, И. И. Прокофьев^{1,2}, В. В. Долговечная², Е. В. Шамова^{1,2}

¹*Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Беларусь*

²*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь*

Механорецепция играет важную роль в процессе функционального ответа тромбоцитов. Примерами механочувствительных механизмов являются индуцированное большими напряжениями сдвига потока (более 3500 с^{-1}) активация фактора фон Виллебранда и его связывание с механочувствительным рецептором тромбоцитов GPIb, приводящее к запуску процессов внутриклеточной сигнализации. Мало изученным является механизм, связанный с активацией механочувствительных ионных каналов. В тромбоцитах и клетках предшественниках мегакариоцитах методами протеомики и транскриптомики обнаружено наличие каналов Piezo1, а также показано их участие в адгезии тромбоцитов к коллагену [1]. Однако прямого исследования данного канала в тромбоцитах проведено не было. Поэтому целью данной работы явилось исследование каналов Piezo1 тромбоцитов методом пэтч-кламп.

Тромбоциты выделяли из стабилизированной цитратом натрия венозной донорской крови последовательным центрифугированием. Механочувствительные ионные каналы тромбоцитов исследовали методом пэтч-кламп в конфигурации «на клетке» с модификациями [2]. В качестве внеклеточного раствора использовали HEPES-буфер с превалирующим содержанием KCl (pH 7.35) для деполяризации мембраны клеток, в качестве пипеточного раствора использовали HEPES-буфер, содержащий CaCl_2 , с превалирующим содержанием NaCl (pH 7.2). Для активации каналов Piezo1 перед измерением в пипеточный буфер добавляли 10 мкмоль/л специфического агониста Yoda1. Кинетики тока регистрировали с частотой дискретизации 5 кГц при фильтрации сигнала с частотой отсечки 1 кГц . Далее строили гистограммы распределения полученных значений тока, и вольт-амперные характеристики зарегистрированных каналов.

Обнаружено, что внесение в пипеточный раствор агониста механочувствительных ионных каналов Yoda1 в концентрации 10 мкмоль/л приводило к регистрации тока от одиночных ионных каналов со средней проводимостью 21 пСм . Ионный ток с данными характеристиками был зарегистрирован в 50% исследованных клеток ($n=30$). В условиях отсутствия агониста в пипеточном растворе событий зарегистрировано не было. Исходя из данных литературы [2], полученное значение проводимости для ионов Na^+ и Ca^{2+} при добавлении Yoda1 в пипеточный раствор подтверждает, что зарегистрированный канал является Piezo1. Стоит отметить, что попытки активировать данный канал подачей отрицательного давления к мембране в 90% случаев приводило к потере гигаомного контакта.

Таким образом, в результате выполнения данной работы получено прямое подтверждение существования ионного канала Piezo1 на тромбоцитах, а также вычислены его биофизические характеристики.

Библиографические ссылки

1. Evidence for shear-mediated Ca^{2+} entry through mechanosensitive cation channels in human platelets and a megakaryocytic cell line / Z. Ilkan [et al.] // Journal of Biological Chemistry. 2017. Vol. 292, iss. 22. P. 9204–9217.
2. Store-operated Ca^{2+} entry contributes to piezo1-induced Ca^{2+} increase in human endometrial stem cells / V. Chubinskiy-Nadezhdin [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. 2022. Vol. 23, iss. 7. P. 3763.