

ОЦЕНКА ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ТРОМБОЦИТОВ ЗДОРОВЫХ МЫШЕЙ ЛИНИИ BALB/C И В ОРТОТОПИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ EMT-6

© 2025 г. А. А. Мишуков¹, С. Гаур², Е.-И. А. Адаманская^{1,3}, М. А. Пантелеев^{1,2,3},
А. Н. Свешникова^{1,3,*}

¹Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, Москва, Россия

²Московский физико-технологический институт, Долгопрудный, Россия

³Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии
и иммунологии им. Дмитрия Рогачева, Москва, Россия

*E-mail: ASvebnikova@yandex.ru

Поступила в редакцию 21.10.2024 г.

После доработки 05.11.2024 г.

Принята к публикации 06.11.2024 г.

Циркулирующие в крови безядерные клеточные фрагменты, тромбоциты, могут рассматриваться как сенсоры состояния сосудистой стенки и латентного тромбообразования в организме. Однако разброс нормальных показателей состояния тромбоцитов слишком большой для корректного считывания информации этих сенсоров. Поэтому необходимо отладить методы оценки функционального состояния тромбоцитов мыши, чтобы затем в контролируемых условиях проверить, как различные патологические процессы изменяют состояние тромбоцитов. В настоящей работе мы адаптировали разработанные нами ранее цитометрические тесты функциональной активности тромбоцитов человека для использования в образцах крови мышей линии BALB/c и провели оценку изменения состояния тромбоцитов *in vivo* модели спонтанно-метастазирующего рака молочной железы EMT-6. В работе использовалась непрерывная проточная цитометрия и цитометрия в конечной точке. Наблюдалось изменение формы тромбоцитов, снижение связывания антител к GPIb, экспонирование P-селектина, активация интегринов, мобилизация кальция и экспонирование фосфатидилсерина. В результате исследования получено несколько отличий функциональной активности тромбоцитов мыши от человеческих тромбоцитов. Во-первых, по всем наблюдаемым параметрам активация тромбоцитов мыши в ответ на 2.5 мкМ АДФ была значительно слабее активации 200 мкМ AYPGKF (агонист PAR4 рецептора к тромбину). Во-вторых, в ответ на АДФ наблюдались обратимая активация интегринов и изменение формы. Основным отличием тромбоцитов мышей с опухолью стало значимое снижение их количества при выделении из крови, при этом наблюдалось снижение значений ряда параметров: связывания антител к GPIb, изменения формы, активации интегринов и подавление прокоагулянтного ответа. Полученные результаты свидетельствуют о том, что опухоль в терминальной стадии, вероятно, снижает количество циркулирующих тромбоцитов и вызывает их повреждение.

Ключевые слова: функциональная активность тромбоцитов, рак молочной железы, проточная цитометрия, кальциевая сигнализация, *in vivo* модель спонтанно-метастазирующего рака

ВВЕДЕНИЕ

Тромбоциты – форменные элементы крови, чьей основной функцией является формирование тромбов и предотвращение кровотечений. Тромбоциты участвуют во множестве процессов за пределами гемостаза: в работе иммунной системы [1–3], поддержании целостности кровеносных сосудов и в других процессах [4].

Тромбоциты мышей представляют существенный интерес как с точки зрения сравнительной и эволюционной физиологии, так и с точки зрения прикладных задач в силу ключевой роли мышинных моделей в физиологических и фармакологических исследованиях гемостаза и тромбоза [5]. С одной стороны, все тромбоциты млекопитающих разделяют ряд фундаментальных характеристик в отличие от остальных позвоночных: это плоские безъядерные клеточные фрагменты с очень похожими физиологическими функциями, активаторами и ингибиторами [6]. С другой стороны, различия в некоторых деталях могут быть довольно существенными [7]. Тромбоциты мышей намного меньше человеческих, зато их концентрация в крови намного выше [8]. Как и человеческие, они имеют два основных типа рецепторов к тромбину, но типы рецепторов и их роли отличаются [9]. Относительные значимости ключевых секретируемых активаторов, тромбоксана А2 и АДФ, у человека и мыши существенно различаются [10, 11]. Эти различия могут указывать на адаптацию этих клеток под определенные задачи, важные для того или иного организма.

Использование мышинных моделей для определения состояния тромбоцитов наиболее актуально при онкологических заболеваниях [12], так как одной из главных причин смертности онкологических пациентов являются тромбозы [13, 14], при этом развитие опухолей часто сопровождается тромбоцитозом или тромбоцитопенией, которые являются маркерами тяжести болезни [15] и метастазирования опухоли [16], соответственно. Взаимодействие тромбоцитов и опухолевых клеток реализуется через множество механизмов и является двунаправленным [12, 15]. Тромбоцитарные гранулы содержат широкое разнообразие цитокинов и хемокинов [17], оказывающих пролиферативное действие на опухолевые клетки [12]. Кроме того, компоненты тромбоцитарных гранул также способны стимулировать эпителиально-мезенхимальный переход – одну из ключевых стадий метастазирования опухолей [18, 19], а также способствовать активной васкуляризации растущей опухоли [20]. В свою очередь опухолевые клетки способны секретировать прямые активаторы тромбоцитов: АДФ [21], тромбоксан А2 [22] и тромбин [23]. Также опухолевые клетки зачастую экспрессируют на своей поверхности тканевый фактор, который участвует в инициации плазменного каскада свертывания, приводящего к наработке тромбина [24]. Существенную роль во взаимодействии опухолевых клеток с тромбоцитами играют микровезикулы – через них опухолевые клетки передают свои мРНК и белки, что приводит к изменениям в транскриптоме и протеоме тромбоцитов [15].

При контакте опухолевых клеток с кровотоком как в форме пассивной инвазии опухоли, так и в форме циркулирующих опухолевых клеток, возможна непосредственная активация тромбоцитов [12]. Самым исследованным путем активации здесь является пара подопланин опухоли/CLEC-2 тромбоцитов, способная приводить к элиминации тромбоцитов [25–27], однако также возможно взаимодействие через интегрины, кадгеринины и другие пары лиганд-рецептор, например CD40/CD40L [15, 28, 29]. При этом не следует забывать о способности опухолевых клеток экспонировать тканевый фактор, а также генерировать несущие тканевый фактор везикулы, что приводит к генерации тромбина и активации тромбоцитов [30]. К тому же доказана способность опухоли изменять транскриптом тромбоцита («tumor educated platelets»), что также может овлиять на их функциональность.

Таким образом, состояние тромбоцитов при онкологии может изменяться по различным показателям, поэтому исследование функционального состояния тромбоцитов

при онкологических заболеваниях следует начинать с животных *in vivo* моделей. Среди существующего многообразия *in vivo* моделей рака ортотопические модели сингенных опухолей молочной железы являются наиболее оптимальными по ряду параметров: использование иммуно-компетентных животных, относительная простота процедуры инокуляции опухолевого материала в молочную железу [31], высокая частота возникновения спонтанных метастазов [32], простота мониторинга развития опухоли, а также относительная дешевизна самой *in vivo* модели [33]. В настоящей работе мы использовали ортотопическую модель спонтанно-метастазирующего рака молочной железы ЕМТ-6 у мышей линии BALB/c для исследования влияния развития опухоли на функциональную активность тромбоцитов.

Ранее мы разработали набор экспериментальных подходов для характеристики функциональной активности тромбоцитов человека методами непрерывной проточной цитометрии и цитометрии в конечной точке [26, 34–37]. Проточная цитометрия позволяет определить наличие преактивированного состояния тромбоцитов, связанного с постоянным контактом с активаторами в кровотоке, по повышению экспрессии Р-селектина [38] или по повышению концентрации кальция в цитоплазме [34]. Увеличенная активация может приводить к повышению выведения тромбоцитов из кровотока и увеличению среднего размера тромбоцита, что также отражается в результатах проточной цитометрии [26, 34, 35].

Целью настоящего исследования стала отработка методики оценки функциональной активности тромбоцитов в крови мыши и использование разработанной методики для оценки состояния тромбоцитов у мышей, несущих опухоль ЕМТ-6.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовались следующие растворы и реагенты (Sigma-Aldrich, США): фосфатно-солевой буфер (PBS), раствор солей Хэнкса (HBSS), PGI_2 , апираза, аннексин-V, фибриноген человека, гирудин, АДФ, АУРГКФ, фукоидан, модифицированный буфер Тироде (в мМ) 150 NaCl, 2.7 KCl, 1 MgCl_2 , 0.4 NaH_2PO_4 , 0.4 NaHCO_3 , 0.5%, 20 HEPES, 5 D-глюкозы, 0.5% BSA, pH 7.34). Аннексин V и фибриноген были конъюгированы с меткой AF647 и AF488 (Люмипроб, Россия). Использовались конъюгированные с флуорофорами антитела к антигенам мыши: CD42b-DyLight647 (Biohub International Trade Co Ltd., Китай), CD62p-FITC, CD31-PE (Biolegend, США). Культура клеток ЕМТ-6 получена из ЦКП «Коллекция культур линий позвоночных» (Nanjing Sobioger Biosciences Co., LTD, Китай), культивирование проводилось стандартными методами при 37 °C в атмосфере 95/5% воздух/ CO_2 .

Для *in vivo* модели рака молочной железы ЕМТ-6 использовались 8–12-недельные самки мышей линии BALB/c (питомник лабораторных животных “Пушино”, г. Пушино, Московская область, Россия). Животные содержались в помещении временного содержания животных Центра теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН при 12-часовом цикле смены дня и ночи, в условиях постоянной влажности и температуры 22 °C в клетках типа T2 по 5–6 особей на клетку. Питание и доступ к питьевой воде было *ad libitum*. За неделю до инокуляции осуществлялся хэндлинг мышей.

Ортотопическая инокуляция суспензии клеток ЕМТ-6 осуществлялась по методике, предложенной Tavera-Mendoza с соавт. [31], с некоторыми изменениями. Вкратце, мыши анестезировались путем внутримышечного введения смеси 50 мг/кг золетила-100 (Virbac, Франция) и 5 мг/кг ксилазина (Нита-Фарм, Россия) и при достижении миорелаксации помещались на подогреваемый столик. В области правого соска 4-й пары молочных желез удалялась шерсть путем депиляции, затем область работы обрабатывалась 70%-ным этиловым спиртом. При достижении должного уровня анестезии (отсутствие болевого рефлекса при сильном нажатии на лапку) делался небольшой

надрез стерильными микрохирургическими ножницами под правым соском 4-й пары молочных желез, и с помощью стерильного микропинцета обнажалась жировая подушечка молочной железы. С помощью инсулинового шприца с иглой 30G в жировую подушечку вводилось 100 мкл суспензии клеток ЕМТ-6 (в концентрации 10^7 клеток/мл) в растворе солей Хэнкса (HBSS). По набуханию молочной железы определялось качество инокуляции, разрез кожи смачивался раствором пенициллина-стрептомицина, заклеивался медицинским клеем БФ-6, и в область инокуляции подкожно вводилось 8 мг/кг местного анестетика бупивакаина (CLARIS LIFESCIENCES, Ltd., Индия). В качестве контроля к мышам с опухолями были использованы здоровые самки линии BALB/c того же возраста. За состоянием мышей наблюдали до момента выхода из наркоза. Далее 1 раз в 2–3 дня осуществлялся мониторинг состояния животных и развивающихся опухолей. С помощью штангенциркуля определялись длина и ширина опухолей, а объем рассчитывался по формуле $V = L \times W^2/2$, где V – объем опухоли, L – длина, W – ширина. На 38–42-й день после инокуляции мыши анестезировались внутримышечным введением смеси 50 мг/кг зоветила-100 и 5 мг/кг ксилазина. После наступления глубокого наркоза у мышей бралась кровь из ретро-орбитального синуса, после чего мыши подвергались эвтаназии путем цервикальной дислокации.

Взятие крови и выделение тромбоцитов

Кровь у мышей была взята с помощью стеклянных гепаринизированных капилляров (1–1.5 см, Machegeu-Nagel, Германия) из ретро-орбитального синуса. В качестве антикоагулянта использовался эноксапарин натрия (10 МЕ/мл, Клексан, Франция). Затем цельная кровь центрифугировалась при 120 g в течение 4 мин. Верхняя фракция (богатая тромбоцитами плазма, БТП) и верхняя часть эритроцитарной массы отбирались в отдельную пробирку и центрифугировались при 100 g в течение 5 мин, после чего отбиралась только БТП. К БТП добавлялся 1 мкМ PGI_2 (инкубация 5 мин), после чего БТП центрифугировалась при 700 g в течение 5 мин. После центрифугирования плазма удалялась, а осадок ресуспендировался в 1 мл буфера Тироде без $CaCl_2$, затем добавлялся 1 мкМ PGI_2 , суспензия инкубировалась 5 мин, после чего снова проводилось центрифугирование 5 мин при 700 g. На последнем этапе осадок тромбоцитов ресуспендировался в буфере Тироде в объеме, равном объему ранее полученной БТП. Определение концентрации выделенных тромбоцитов проводилось с помощью проточной цитометрии. Основное отличие от протоколов, используемых для человека, состоит во взятии мышьиной крови на эноксапарин натрия, в то время как у человека используется гепарин лития, гирудин или цитрат натрия. Другим важным отличием является работа с выделенными (отмытыми от плазмы) тромбоцитами мыши, в то время как работа с человеческими тромбоцитами возможна в разбавленной БТП. Процедура удаления плазмы необходима для последующего использования флуоресцентных зондов и тромбина в качестве активатора.

Проточная цитометрия

Проточная цитометрия изолированных тромбоцитов мыши проводилась с использованием проточного цитометра CytoFLEX (Beckman-Coulter, США). Для оценки уровня экспозиции Р-селектина, связывания антитела к GPIb и прокоагулянтной активности при активации тромбоцитов, а также определения размера тромбоцитов в покое использовалась проточная цитометрия в конечной точке. Суспензия изолированных тромбоцитов разводилась в буфере Тироде с 2.5 мМ $CaCl_2$ до концентрации 6000 клеток/мкл и оставлялась на отдых на 20 мин при 37 °С. Затем тромбоциты в течение 10 мин при 37 °С активировались по отдельности 2.5 мкМ АДФ, 200 мкМ АУРГКФ, 100 нМ тромбина, смесью 250 мкг/мл фукоидана и 2.5 мкМ АДФ путем смешивания 10 мкл суспензии тромбоцитов с 10 мкл активатора в буфере Тироде с 2.5 мкМ $CaCl_2$. Далее тромбоци-

ты смешивались с антителами против мышинных CD62p, CD42b, CD31 и аннексином V (также 10 мкл активированных тромбоцитов + 10 мкл раствора антител) и инкубировались дополнительно 10 мин при 37 °С. Затем к пробам добавлялось 80 мкл буфера Тирод с 2.5 мкМ CaCl₂ и осуществлялась съемка 5000 CD31-положительных событий, определяемых как тромбоциты. Экспозиция тромбоцитами Р-селектина определялась как отношение средней флуоресценции CD62p к полуширине пика (MFI/SD) [35]. Изменение связывания антитела с GPIb определялось по формуле F_{act}/F_{rest} , где F_{act} – средняя флуоресценция анти-CD42b антитела в активированных тромбоцитах, F_{rest} – средняя флуоресценция анти-CD42b антитела в покоящихся тромбоцитах [35]. Прокоагулянтный ответ тромбоцитов определялся как увеличение процента положительных по фосфатидилсерину тромбоцитов при активации. Отличие от ранее использованного протокола для человека [35] состояло в использовании AYPGKF (агонист PAR4) вместо SFLLRN (агонист PAR1, которого на тромбоцитах мышей нет [39]), и использовании антитела к CD31, а не к CD61, для идентификации области тромбоцитов, так как CD31 является более стабильным маркером.

Для оценки уровня внутриклеточного кальция, активации интегринов и изменения формы при активации тромбоцитов мыши методом непрерывной проточной цитометрии была адаптирована методика, описанная в работе Мартянова с соавт. [34]. Вкратце, суспензия отмытых тромбоцитов мыши инкубировалась с 2 мкМ красителя Fura Red-AM в присутствии ингибиторов активации тромбоцитов 1 мкМ PGI₂ и 1 U/мл апиразы в буфере Тирод в течение 35 мин при 37 °С. После инкубации тромбоциты отмывались от красителя путем центрифугирования при 700 g в течение 5 мин при комнатной температуре. Затем тромбоцитарный осадок ресуспендировался в буфере Тирод с 2 мМ CaCl₂ до концентрации тромбоцитов 3000 кл/мкл, после этого осуществлялся отдых в течение 40 мин при 37 °С. За минуту до начала съемки к пробе добавлялся фибриноген-AF647 за исключением пробы, где активатором выступал тромбин. Все пробы записывались в непрерывном режиме, первая минута съемки – покоящиеся тромбоциты, затем съемка ставилась на паузу, к суспензии тромбоцитов добавлялся активатор, и съемка продолжалась в течение 3 мин. Эта часть протокола полностью аналогична предложенной ранее для человека [40].

Обработка данных непрерывной проточной цитометрии проводилась с использованием программы CytExpert 2.4 (гейтирование), программных пакетов Jupyter Notebook (усреднение данных по времени) и программы Microsoft Excel (расчет конечных параметров). Флуоресцентные сигналы усреднялись по времени (интервал 5 с). Параметры активации тромбоцитов: мобилизация кальция, активация интегринов, изменение формы. Мобилизация кальция определялась как амплитуда изменения соотношения флуоресценций двух форм красителя Fura Red: Ca²⁺-связанной формы (возбуждение 405 нм) к Ca²⁺-свободной форме (возбуждение 488 нм). Активация интегринов $\alpha_{IIb}\beta_3$ оценивалась по связыванию флуоресцентно-меченого фибриногена, нормированного на базовую линию (0% активации интегринов) и максимальное связывание после 10 мин инкубации тромбоцитов, предварительно активированных 2.5 мкМ АДФ и 250 мкг/мл фукоидана, с 1 мкМ иономицина (100% активации интегринов). Изменение формы оценивалось как изменение бокового светорассеивания (SSC) тромбоцитов относительно состояния покоя. Эта часть протокола полностью аналогична предложенной ранее для человека [34].

Статистическая обработка и репрезентация данных

Построение графиков и статистическая обработка проводились в программном обеспечении GraphPad Prism 9. Все данные были протестированы на нормальность распределения с помощью теста Шапиро-Уилка. Для статистического анализа использовались двухфакторный анализ ANOVA со множественным сравнением по методу Сидака или *t*-тест Уэлша.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристика ортотопической модели спонтанно-метастазирующего рака молочной железы ЕМТ-6

Из ряда существующих *in vivo* моделей метастазирующего рака наиболее простой и при этом имитирующей реальный туморогенез и метастазирование является ортотопическая модель рака молочной железы у лабораторных мышей [31, 33]. Мы провели два эксперимента по ортотопической инокуляции суспензии клеток рака молочной железы мыши ЕМТ-6 для характеристики модели (рис. 1). Главным отличием двух экспериментов была разница в количестве легочных метастазов (рис. 1d). В эксперименте № 1 поверхностные метастазы в легких были обнаружены только у 3 из 6 мышей, а в эксперименте № 2 – у всех 6 мышей в группе, причем в большем количестве. Также мы оценили изменение массы животных, индекса боли/дистресса и скорости роста опухоли в ходе эксперимента (рис. 1e, f). Так, в течение первой недели (день 0–7) после инокуляции наблюдалось временное и незначительное снижение массы животных, после чего в течение следующих 2 недель (дни 7–21) масса животных оставалась стабильной. С началом 4-й недели (21 день) масса животных начинала плавно расти, и рост наблюдался до конца эксперимента. Начало увеличения массы животных совпало с увеличением скорости роста опухолей (рис. 1f). Оценка индекса боли/дистресса показала, что в течение первых 2 недель животные не испытывали дискомфорта или боли. Спустя 2 недели после инокуляции у мышей на коже в области опухоли появлялись небольшие язвы. К началу 5-й недели состояние животных начинало заметно ухудшаться, что вы-

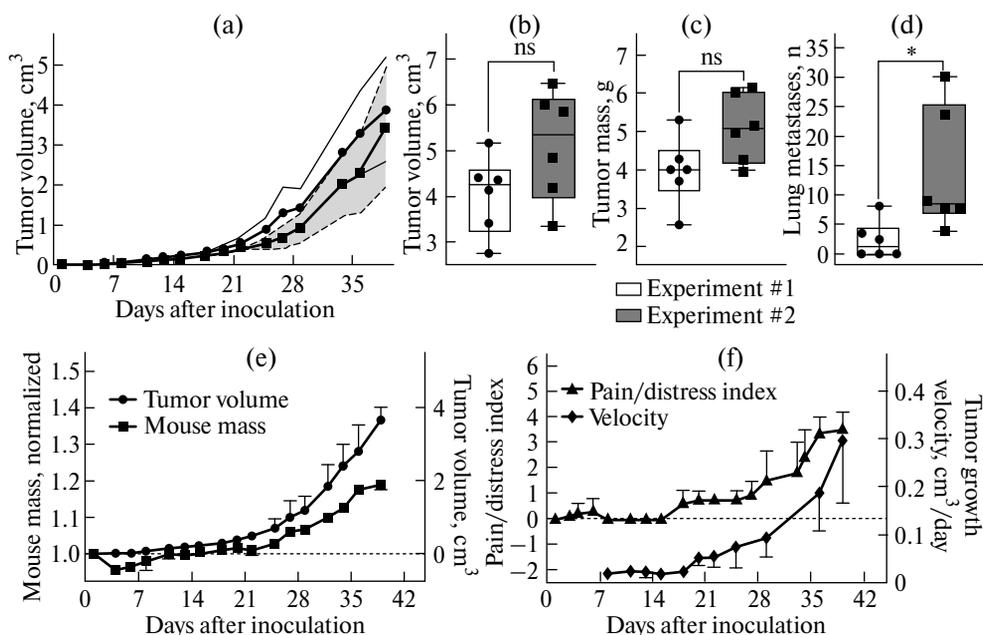


Рис. 1. Общая характеристика ортотопической *in vivo* модели рака молочной железы ЕМТ-6: (а) – рост опухолей ЕМТ-6 в проведенных экспериментах, средние значения \pm SD; (б) – сравнение конечной массы опухоли (б), конечного объема опухоли (с) и количества поверхностных метастазов в легких мышей (д) в двух проведенных экспериментах, тест Стьюдента с поправкой Уэлша, ns – $p > 0.05$, * – $p < 0.05$; (е) – кинетики изменения массы мышей, нормированных на день 0, и размеров опухолей, средние значения по двум экспериментам \pm стандартное отклонение; (ф) – кинетика изменения индекса боль/дистресс и скорости роста опухолей, средние значения \pm стандартное отклонение.

ражалось в пилоэрекции шерсти, мимических признаках боли [41], затрудненности перемещения (из-за размеров опухоли). К моменту завершения эксперимента (6-я неделя после инокуляции клеток EMT-6) признаки боли/дистресса становились выраженными. При некропсии животных было обнаружено, что опухоли врастали в мышцы бедра правой лапы, также у животных с опухолями была отмечена спленомегалия (данные не показаны), макрометастазы были обнаружены только в легких.

Функциональная активность тромбоцитов

Функциональная активность тромбоцитов мыши оценивалась с помощью проточной цитометрии суспензии выделенных тромбоцитов. Мы заметили, что количественный выход тромбоцитов из крови мышей, несущих опухоль EMT-6, был значительно ниже по сравнению со здоровыми мышами (рис. 2а). В дополнение к этому, показатели прямого светорассеяния (FSC), отражающие размер тромбоцитов, у опухолевых мышей значительно превосходил таковые для здоровых мышей (рис. 2б).

Мы измерили уровень экспозиции Р-селектина тромбоцитами (рис. 2с) как одного из наиболее распространенных маркеров активации тромбоцитов и параметра дегра-

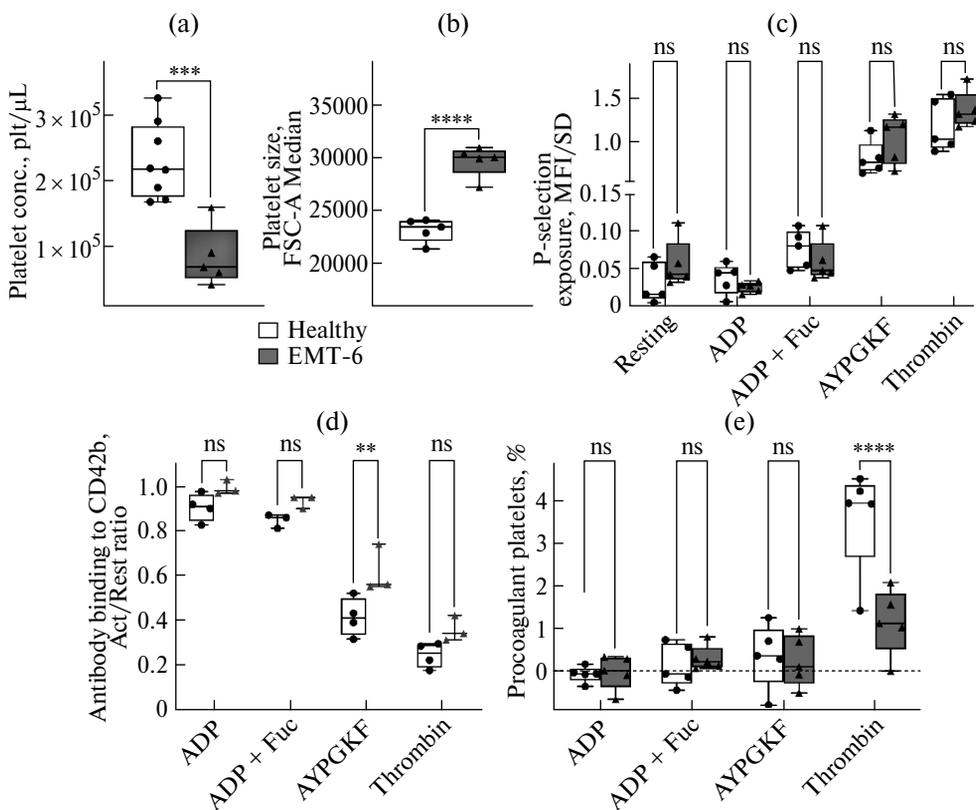


Рис. 2. Результаты end-point цитометрии тромбоцитов здоровых и несущих опухоль EMT-6 мышей: (а) – концентрация тромбоцитов, изолированных из цельной крови здоровых и опухолевых мышей, параметрический тест Уэлша, $p < 0.001$; (б) – медиана прямого светорассеяния как параметра размера тромбоцитов, параметрический тест Уэлша, $p < 0.0001$; экспозиция Р-селектина (с), снижение уровня связывания актигела к GPIb (д) и увеличение процента аннексин V-положительных тромбоцитов (е) при активации тромбоцитов 2.5 мкМ АДФ, комбинацией 2.5 мкМ АДФ и 250 мкг/мл фукоидана, 200 мкМ АYPGKF или 40 нМ тромбина. Двухфакторный дисперсионный анализ со множественным сравнением Сидака, ns – $p > 0.05$, ** – $p < 0.01$, **** – $p < 0.001$.

нуляции альфа-гранул [2]. В покоящихся тромбоцитах как здоровых, так и несущих опухоль ЕМТ-6 мышей мы не наблюдали экспозиции Р-селектина. Активация 2.5 мкМ АДФ или комбинацией 250 мкг/мл фукоидана и 2.5 мкМ АДФ не вызывала значительной экспозиции Р-селектина тромбоцитами как здоровых, так и несущих опухоль ЕМТ-6 мышей. Более сильная активация 200 мкМ АУРГКФ (PAR4 агонист) или 40 нМ тромбина (PAR3, PAR4 агонист) приводила к значительной экспозиции Р-селектина. У тромбоцитов мышей с опухолями уровень экспозиции Р-селектина в среднем был незначительно выше ($p < 0.05$), чем у тромбоцитов здоровых мышей: при активации АУРГКФ -1.0 ± 0.3 и 0.8 ± 0.2 , при активации тромбином -1.4 ± 0.2 и 1.2 ± 0.3 у.е. у тромбоцитов опухолевых и здоровых мышей соответственно.

Поверхностный белок GPIb (CD42b) – рецептор к фактору фон Виллебранда, ответственный за адгезию тромбоцитов к поврежденной стенке сосуда [42]. При активации тромбоцитов наблюдалось снижение уровня связывания рецептора GPIb с антителами-сенсорами, и степень этого изменения зависела от активации тромбоцитов [35]. Данный ответ у тромбоцитов мышей, несущих опухоль ЕМТ-6, был снижен по сравнению со здоровыми мышами (рис. 2d). Так, у тромбоцитов мышей с опухолями ЕМТ-6 наблюдался заметный, но статистически недостоверный ($p > 0.05$) эффект при активации 2.5 мкМ АДФ, комбинацией 250 мкг/мл фукоидана и 2.5 мкМ АДФ или 40 нМ тромбина, а при активации 200 мкМ АУРГКФ – достоверный эффект (отношение флуоресценций анти-CD42b в активации к покою 0.4 ± 0.1 в группе здоровых и 0.6 ± 0.1 в группе ЕМТ-6, $p < 0.01$).

Сверхсильная активация тромбоцитов приводила к перегрузке митохондрий ионами Ca^{2+} , что запускает механизм mPTP-движимого некроза [43] и формирование специфической субпопуляции тромбоцитов с прокоагулянтным фенотипом, которые участвуют в поддержании работы плазменного звена гемостаза [44]. Одним из маркеров прокоагулянтных тромбоцитов является экспозиция фосфатидилсерина на поверхности тромбоцита и, как следствие, возможность связывания белка аннексин V. В наших экспериментальных условиях только активация тромбином вызывала заметное увеличение процента аннексин V-положительных тромбоцитов (рис. 2e). Неожиданно оказалось, что прокоагулянтная активность тромбоцитов мышей, несущих опухоль ЕМТ-6, ниже по сравнению с тромбоцитами здоровых мышей ($3.6 \pm 1.2\%$ у тромбоцитов здоровых мышей против $1.2 \pm 0.8\%$ у тромбоцитов мышей с опухолью, $p < 0.001$).

Методом непрерывной проточной цитометрии мы исследовали транзистентные аспекты активации тромбоцитов: изменение концентрации ионов Ca^{2+} в цитоплазме (параметр функционирования внутриклеточной кальциевой сигнальной системы), связывание флуоресцентно-меченого фибриногена с тромбоцитами (параметр активации интегринов $\alpha_{IIb}\beta_3$) и изменение бокового светорассеивания тромбоцитами (параметр изменения формы). На рис. 3 представлены усредненные кривые изменения концентрации кальция (рис. 3a), связывания фибриногена (рис. 3b) и изменения формы (рис. 3c) при активации тромбоцитов здоровых животных и мышей с опухолью.

Сигнал радиометрического сенсора (Fura Red), предположительно отражающий уровень кальция в покоящихся тромбоцитах, у здоровых мышей был выше, чем у тромбоцитов мышей с опухолями ЕМТ-6 (рис. 3d). Амплитуда кальциевого пика у тромбоцитов опухолевых мышей в среднем несколько больше, чем у тромбоцитов здоровых мышей (рис. 3e). При активации 0.5 мкМ АДФ увеличение цитоплазматического кальция составляет 0.7 ± 0.1 единиц против 0.5 ± 0.2 ($p > 0.05$), при активации 2.5 мкМ АДФ -0.7 ± 0.1 против 0.6 ± 0.1 ($p > 0.05$), при последовательной активации 250 мкг/мл фукоидана и 2.5 мкМ АДФ -1.7 ± 0.3 против 1.0 ± 0.3 ($p < 0.01$), 200 мкМ АУРГКФ -1.1 ± 0.3 против 1.0 ± 0.4 ($p > 0.05$), 40 нМ тромбина -2.6 ± 0.5 против 2.0 ± 0.5 ($p > 0.05$) у тромбоцитов мышей с опухолями и здоровых мышей соответственно.

Интегрины $\alpha_{IIb}\beta_3$ являются основными белками, обеспечивающими агрегацию тромбоцитов [34, 45]. В ходе активации тромбоцитов интегрин $\alpha_{IIb}\beta_3$ также активи-

руются, переходя из закрытого состояния в открытое, способное связывать фибриноген [46]. Использование флуоресцентно-меченого фибриногена и калибровочных проб (см. раздел Методы) можно оценивать степень активации интегринов [34]. При акти-

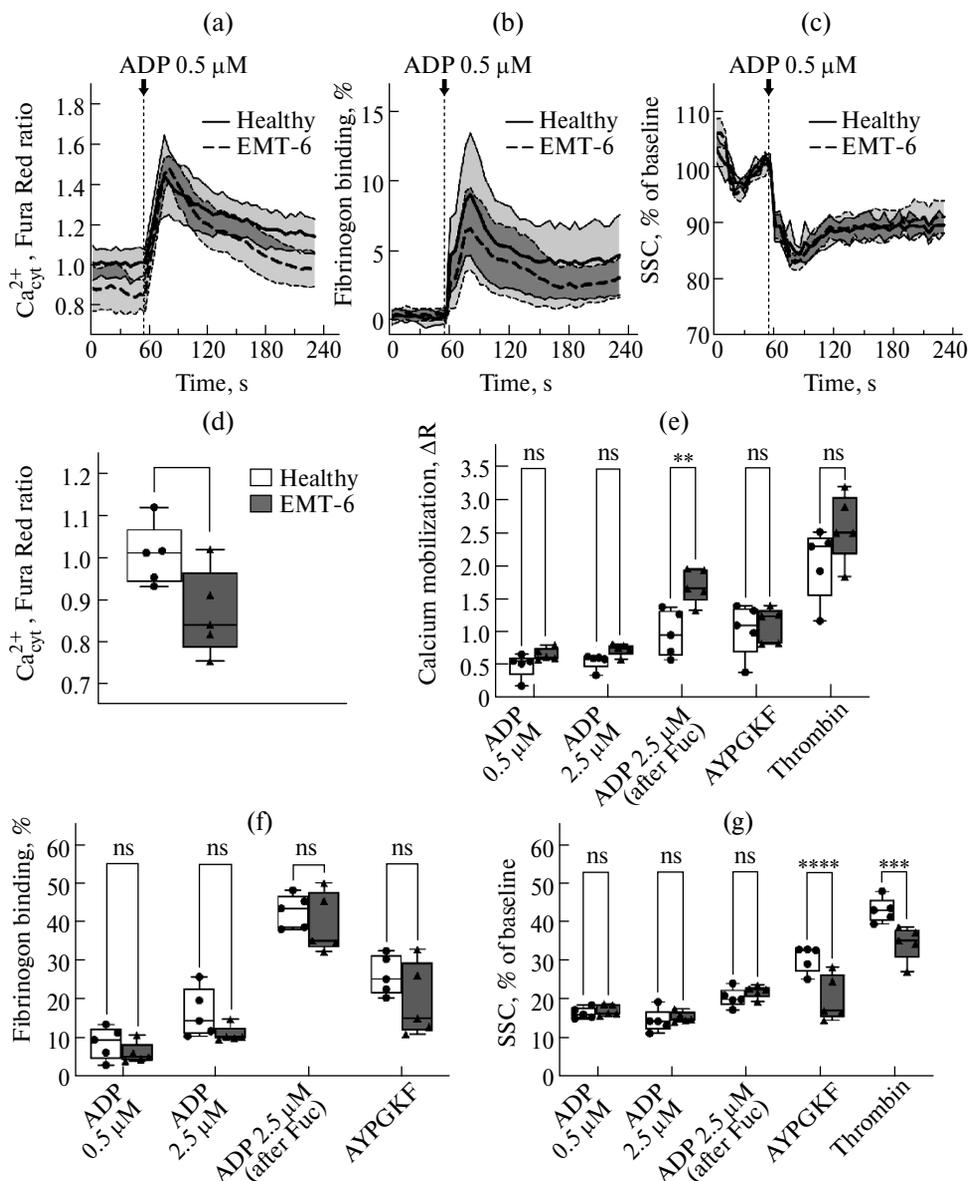


Рис. 3. Результаты непрерывной проточной цитометрии тромбоцитов. Изменение уровня свободных ионов Ca^{2+} (a), связывания фибриногена (b) и изменения формы тромбоцитов (c) при активации (на примере 0.5 мкМ АДФ), средние значения \pm стандартное отклонение; (d) – уровень свободного кальция в покоящихся тромбоцитах, параметрический тест Уэлша, * $-p < 0.05$. Мобилизация кальция (e), связывание фибриногена (f) и изменение формы (g) при активации тромбоцитов здоровых мышей (белый) и мышей, несущих опухоль EMT-6 (серый), АДФ (0.5 и 2.5 мкМ), AYPGKF (200 мкМ), последовательно фукоидана (250 мкг/мл) и АДФ (2.5 мкМ), тромбином (40 нМ). Двухфакторный дисперсионный анализ со множественным сравнением Сидака, ns $-p > 0.05$, ** $-p < 0.01$, *** и **** $-p < 0.001$.

вазии тромбоцитов всеми использованными агонистами наблюдалась сниженная, но статистически недостоверная активация интегринов у тромбоцитов мышей, несущих опухоль (рис. 3f). Так, активация 0.5 мкМ АДФ индуцирует связывание фибриногена на $6.2 \pm 2.7\%$ против $8.8 \pm 4.2\%$ ($p > 0.05$), при активации 2.5 мкМ АДФ – $11.1 \pm 2.2\%$ против $16.5 \pm 6.3\%$ ($p > 0.05$), при последовательной активации 250 мкг/мл фукоидана и 2.5 мкМ АДФ – $39.5 \pm 7.7\%$ против $42.3 \pm 4.3\%$ ($p > 0.05$), 200 мкМ АУРГКФ – $19.7 \pm 9.5\%$ против $26.3 \pm 5.1\%$ ($p > 0.05$) у тромбоцитов мышей с опухолями и здоровых мышей соответственно.

Изменение формы тромбоцита при активации является результатом перестройки цитоскелета [2, 35]. Используя параметр бокового светорассеивания (SSC), можно оценивать изменение формы тромбоцитов при активации [34]. Активация тромбоцитов 0.5 мкМ АДФ ($17.3 \pm 1.4\%$ у опухолевых и $16.6 \pm 1.5\%$ у здоровых) и 2.5 мкМ АДФ ($15.6 \pm 1.4\%$ у опухолевых и $14.6 \pm 3.0\%$ у здоровых) или последовательным добавлением 250 мкг/мл фукоидана и 2.5 мкМ АДФ ($22.1 \pm 1.6\%$ у опухолевых и $20.5 \pm 2.5\%$ у здоровых) не показало значимых различий ($p > 0.05$) между тромбоцитами здоровых и опухолевых мышей (рис. 3g), однако более сильная активация 200 мкМ АУРГКФ или 40 нМ тромбина показала, что тромбоциты мышей, несущих опухоль ЕМТ-6, слабее меняют форму: активация АУРГКФ индуцировала изменение SSC у здоровых тромбоцитов на $30.6 \pm 3.4\%$, а у тромбоцитов опухолевых мышей – на $20.3 \pm 5.9\%$ ($p < 0.001$), активация тромбином – на $43.1 \pm 3.2\%$ и $34.6 \pm 4.4\%$ у тромбоцитов здоровых и опухолевых мышей соответственно ($p < 0.001$).

Таким образом, результаты проточной цитометрии в конечной точке и непрерывной проточной цитометрии показывают, что тромбоциты мышей с опухолями крупнее в размере и демонстрируют ослабленные функциональные ответы на активацию: изменение уровня связывания антитела к GPIb, прокоагулянтную активность, активацию интегринов $\alpha_{IIb}\beta_3$, изменение формы.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящей работе проводилась апробация нового протокола оценки функциональной активности тромбоцитов мыши *in vivo* модели рака молочной железы. При исследовании функциональной активности мы наблюдали набор ответов тромбоцитов на стандартные активаторы – АДФ, АУРГКФ и тромбин – агонисты ассоциированных с G-белками рецепторов. Используемые нами ранее методы оценки изменения формы тромбоцитов по показателям бокового светорассеяния (SSC) [26, 35] и оценка степени активации интегринов по проценту от максимального связывания фибриногена, индуцируемого иономицином [34], оказались применимы и в настоящей постановке (рис. 3).

Согласно нашему исследованию, в ответ на АДФ тромбоциты мыши экспонируют минимальное количество P-селектина, небольшое снижение аффинности GPIb к анти телу-сенсору, обратимое изменение формы и активацию интегринов (рис. 2) в отличие от тромбоцитов человека [34, 47]. При этом мобилизация кальция остается достаточно значительной (рис. 3). Эти результаты согласуются с представлениями о том, что индуцирующий кальциевую сигнализацию пуриnergический рецептор P2Y₁ у мышей представлен значительно больше, чем у людей, в то время как ингибирующий аденилатциклазу P2Y₁₂ представлен относительно меньше [6, 48, 49].

Одним из основных отличий предложенного протокола оценки функциональной активности тромбоцитов мыши является необходимость предварительного выделения (отмывки) тромбоцитов. Использование небольших объемов крови, полученных из ретро-орбитального синуса, приводит к значительному снижению «выхода» тромбоцитов, кроме того, можно предположить, что наблюдаемые функциональные отличия связаны с рассмотрением выделяемой субпопуляции. Сниженная концентрация тром-

боцитов, выделенных из крови мышей с опухолями, может указывать как на развитие тромбоцитопении, так и на повышенную чувствительность тромбоцитов у мышей с опухолями к процессу выделения из цельной крови. Поскольку процесс выделения тромбоцитов из крови мышей идет с выходом не более 50–60% [50], есть вероятность того, что анализ функциональной активности изолированных тромбоцитов отражает функциональную активность некоторой части тромбоцитов. Однако исследование кальциевой сигнализации тромбоцитов мыши невозможно или по крайней мере затруднено без изолирования тромбоцитов от плазмы. Плазма крови мышей содержит большое количество карбоксилэстераз [51], что делает невозможным нагрузку тромбоцитов мыши в цельной крови (по причине активной деградации AM-форм красителей прямо в плазме). Таким образом, в будущих исследованиях оправдано проводить часть анализа (с использованием антител, специфичных к поверхностным белкам) с использованием цельной крови мышей. Для достоверного установления причины сниженной концентрации тромбоцитов, выделенных из крови мышей с опухолями EMT-6, необходимо определение концентрации тромбоцитов в цельной крови для исключения влияния методики выделения тромбоцитов.

Полученные результаты влияния опухоли на функциональную активность тромбоцитов показывают некоторые изменения в реализации ряда функциональных ответов. При отсутствии значительных отличий в функционировании кальциевой сигнальной системы (основного регулятора активации тромбоцитов [2]), наблюдалось некоторое снижение функциональных ответов: изменения бокового светорассеяния (отражающего изменение формы тромбоцитов [34]), изменение уровня связывания антител к GPIb, прокоагулянтного ответа на тромбин, а также связывания фибриногена, отражающего активацию интегринов $\alpha_{IIb}\beta_3$. Все перечисленные ответы согласуются с наблюдаемой при коронавирусной инфекции рефрактерности тромбоцитов к тромбину [35]. Стоит подчеркнуть, что в настоящей работе мы не используем термин «шеддинг» по отношению к GPIb, так как опосредующая его металлопротеиназа ADAM17 активируется только при сильной активации тромбоцитов [52], кроме того, по нашим данным (неопубликованные данные Игнатовой), при активации тромбоцитов происходит не шеддинг, а изменение конформации белка GPIb, что ведет к снижению аффинности GPIb к антителу-сенсору.

В недавно опубликованной работе Kawano с соавт. было показано, что у Nude/SCID мышей, несущих человеческую опухоль поджелудочной железы VxPC-3, наблюдается сниженная концентрация тромбоцитов в крови, увеличенный размер тромбоцитов и больший процент ретикулоцитов, что, по мнению авторов, указывает на ускоренный оборот тромбоцитов в кровотоке. Помимо этого, авторы обнаружили, что у тромбоцитов опухолевых мышей также наблюдается сниженная активация интегринов $\alpha_{IIb}\beta_3$ и сниженное количество поверхностных рецепторов CD42b, CD62p, интегринов $\alpha_{IIb}\beta_3$ и рецептора GPIX [53]. Таким образом, полученные нами результаты хорошо соотносятся с уже опубликованными данными.

Наблюдаемое снижение чувствительности тромбоцитов к тромбину с одновременным увеличением размера тромбоцитов и снижением их количества может говорить о тромбин-опосредованной преактивации тромбоцитов в кровотоке [35]. Так как клетки рака молочной железы богаты тканевым фактором [54], появление рефрактерности к тромбину может отражать генерацию тромбина в сосудистом русле при контакте с опухолью [30].

Несмотря на выявленные различия в функциональной активности тромбоцитов, сравнение было проведено, когда у мышей была уже терминальная стадия туморогенеза: опухоль метастазировала в легкие и оказывала значительное влияние на самочувствие животных. Методика взятия крови из ретро-орбитального синуса дает возможность брать кровь в малых количествах, в результате повторные взятия крови могут происходить с частотой раз в 2–4 недели [55], что позволит провести измерения функциональной активности тромбоцитов как на терминальной, так и на ранних стадиях туморогенеза.

В настоящей статье мы сравнили функциональную активность тромбоцитов здоровых мышей и мышей с опухолями ЕМТ-6. Было показано, что у мышей, несущих опухоль ЕМТ-6, выделяется меньшее количество тромбоцитов, и они крупнее в размере по сравнению с выделенными тромбоцитами здоровых животных, что, возможно, указывает на увеличенный оборот тромбоцитов в крови мышей с опухолями. В дополнение к этому было показано, что выделенные тромбоциты опухолевых мышей демонстрируют несколько сниженные функциональные ответы на активацию (изменение уровня связывания антител к GPIb, прокоагулянтную активность, сниженную активацию интегринов $\alpha_{IIb}\beta_3$ и изменение формы), что может указывать на опухоль-опосредованное повреждение тромбоцитов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны О.И. Ан (Университетский медицинский центр университета Йоганна Гутенберга, Майнц, Германия) и Н.С. Никитину (НМИЦ ДГОИ им. Дм. Рогачева, Москва, РФ) за консультации по работе с животными. Авторы благодарят И.С. Колесникову (ЦТП ФХФ РАН, Москва, РФ) за помощь в культивировании культуры ЕМТ-6.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

А. А. М. – планирование и проведение экспериментов, анализ и интерпретация данных, написание и редактирование рукописи. С. Г. – проведение экспериментов, первичная обработка данных. Е.-И. А. А. – проведение экспериментов. М. А. П., А. Н. С. – идея работы и планирование экспериментов, редактирование рукописи. А. Н. С. – общее руководство исследованием.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Российского научного фонда (проект № 23-45-10039).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с лабораторными животными и были одобрены Комитетом по биоэтике Института теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН (Протокол № 1 от 25.01.2024 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы настоящей работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mandel J, Casari M, Stepanyan M, Martyanov A, Deppermann C (2022) Beyond hemostasis: platelet innate immune interactions and thromboinflammation. *Int J Mol Sci* 23: 3868. <https://doi.org/10.3390/ijms23073868>
2. Sveshnikova A, Stepanyan M, Panteleev M (2021) Platelet functional responses and signalling: the molecular relationship. Part 1: responses. *Syst Biol Physiol Rep* 1: 20–28. <https://doi.org/10.52455/sbpr.01.202101014>
3. Bodrova VV, Shustova ON, Khaspekova SG, Mazurov AV (2021) Platelet reticulated forms, size indexes, and functional activity. Interactions in healthy volunteers. *Platelets* 1–6. <https://doi.org/10.1080/09537104.2021.1922659>
4. Smyth SS, Mcever RP, Weyrich AS, Morrell CN, Hoffman MR, Arepally GM, French PA, Daurman HL, Becker RC (2009) Platelet functions beyond hemostasis. *J Thromb Haemost* 7: 1759–1766. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2009.03586.x>

5. *Jirouskova M, Shet AS, Johnson GJ* (2007) A guide to murine platelet structure, function, assays, and genetic alterations. *J Thromb Haemost* 5: 661–669.
<https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2007.02407.x>
6. *Schmitt A, Guichard J, Massé J-M, Debili N, Cramer EM* (2001) Of mice and men. *Exp Hematol* 29: 1295–1302.
[https://doi.org/10.1016/S0301-472X\(01\)00733-0](https://doi.org/10.1016/S0301-472X(01)00733-0)
7. *Mangin PH, Gardiner EE, Nesbitt WS, Kerrigan SW, Korin N, Lam WA, Pantelev MA, for the Subcommittee on Biorheology* (2020) In vitro flow based systems to study platelet function and thrombus formation: Recommendations for standardization: Communication from the SSC on Biorheology of the ISTH. *J Thromb Haemost* 18: 748–752.
<https://doi.org/10.1111/jth.14717>
8. *Yakusheva AA, Butov KR, Bykov GA, Závodszy G, Eckly A, Ataullakhanov FI, Gachet C, Pantelev MA, Mangin PH* (2022) Traumatic vessel injuries initiating hemostasis generate high shear conditions. *Blood Adv* 6: 4834–4846.
<https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2022007550>
9. *Lin H, Liu AP, Smith TH, Trejo J* (2013) Cofactoring and dimerization of proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev* 65: 1198–1213.
<https://doi.org/10.1124/pr.111.004747>
10. *Nayak MK, Dash A, Singh N, Dash D* (2014) Aspirin delimits platelet life span by proteasomal inhibition. *PLoS One* 9: e105049.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105049>
11. *Balkenhol J, Kaldorf KV, Mammadova-Bach E, Braun A, Nieswandt B, Dittrich M, Dandekar T* (2020) Comparison of the central human and mouse platelet signaling cascade by systems biological analysis. *BMC Genom* 21: 897.
<https://doi.org/10.1186/s12864-020-07215-4>
12. *Sveshnikova AN, Tesakov IP, Kuznetsova SA, Shamova EM* (2024) Role of platelet activation in the development and metastasis of solid tumors. *J Evol Biochem Phys* 60: 211–227.
<https://doi.org/10.1134/S0022093024010150>
13. *Lee AYY, Levine MN* (2003) Venous thromboembolism and cancer: Risks and outcomes. *Circulation* 107: I-17–I-21.
<https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000078466.72504.AC>
14. *Falanga A, Marchetti M* (2023) Cancer-associated thrombosis: Enhanced awareness and pathophysiological complexity. *J Thromb Haemost* 21: 1397–1408.
<https://doi.org/10.1016/j.jtha.2023.02.029>
15. *Yu L, Guo Y, Chang Z, Zhang D, Zhang S, Pei H, Pang J, Zhao ZJ, Chen Y* (2021) Bidirectional interaction between cancer cells and platelets provides potential strategies for cancer therapies. *Front Oncol* 11: 764119.
<https://doi.org/10.3389/fonc.2021.764119>
16. *Lee C, Lin Y, Lin C, Yen C, Shen C, Chang C, Hsieh S* (2015) Pretreatment platelet count early predicts extrahepatic metastasis of human hepatoma. *Liver Int* 35: 2327–2336.
<https://doi.org/10.1111/liv.12817>
17. *Golebiewska EM, Poole AW* (2015) Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. *Blood Rev* 29: 153–162.
<https://doi.org/10.1016/j.blre.2014.10.003>
18. *Kalluri R, Weinberg RA* (2009) The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 119: 1420–1428.
<https://doi.org/10.1172/JCI39104>
19. *Radziwon-Balicka A, Santos-Martinez MJ, Corbalan JJ, O'Sullivan S, Treumann A, Gilmer JF, Radomski MW, Medina C* (2014) Mechanisms of platelet-stimulated colon cancer invasion: role of clusterin and thrombospondin 1 in regulation of the P38MAPK-MMP-9 pathway. *Carcinogenesis* 35: 324–332.
<https://doi.org/10.1093/carcin/bgt332>
20. *Sabrkhany S, Griffioen AW, Oude Egbrink MGA* (2011) The role of blood platelets in tumor angiogenesis. *Biochem Biophys Acta Rev Cancer* 1815: 189–196.
<https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2010.12.001>
21. *Plantureux L, Mège D, Crescence L, Dignat-George F, Dubois C, Panicot-Dubois L* (2018) Impacts of cancer on platelet production, activation and education and mechanisms of cancer-associated thrombosis. *Cancers* 10: 441.
<https://doi.org/10.3390/cancers10110441>
22. *Nie D, Lamberti M, Zacharek A, Li L, Szekeres K, Tang K, Chen Y, Honn KV* (2000) Thromboxane A2 regulation of endothelial cell migration, angiogenesis, and tumor metastasis. *Biochem Biophys Res Commun* 267: 245–251.
<https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1840>

23. *Heinmoller E, Weinel RJ, Heidtmann HH, Salge U, Seitz R, Schmitz I, Moller KM, Zirngibl H* (1996) Studies on tumor-cell-induced platelet aggregation in human lung cancer cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol* 122: 735–744.
<https://doi.org/10.1007/BF01209121>
24. *Ruf W, Yokota N, Schaffner F* (2010) Tissue factor in cancer progression and angiogenesis. *Thromb Res* 125: S36–S38.
[https://doi.org/10.1016/S0049-3848\(10\)70010-4](https://doi.org/10.1016/S0049-3848(10)70010-4)
25. *Suzuki-Inoue K, Kato Y, Inoue O, Kaneko MK, Mishima K, Yatomi Y, Yamazaki Y, Narimatsu H, Ozaki Y* (2007) Involvement of the snake toxin receptor CLEC-2, in podoplanin-mediated platelet activation, by cancer cells. *J Biol Chem* 282: 25993–26001.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M702327200>
26. *Martyanov AA, Tesakov IP, Khachatryan LA, An OI, Boldova AE, Ignatova AA, Koltsova EM, Korobkin J-JD, Podoplelova NA, Svidelskaya GS, Yushkova E, Novichkova GA, Eble JA, Panteleev MA, Kalinin DV, Sveshnikova AN* (2023) Platelet functional abnormalities in pediatric patients with kaposiform hemangioendothelioma/Kasabach-Merritt phenomenon. *Blood Adv* 7: 4936–4949.
<https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2022009590>
27. *Xu Y, Ogose A, Kawashima H, Hotta T, Ariizumi T, Li G, Umezu H, Endo N* (2011) High-level expression of podoplanin in benign and malignant soft tissue tumors: Immunohistochemical and quantitative real-time RT-PCR analysis. *Oncol Rep* 25: 599–607.
<https://doi.org/10.3892/or.2011.1141>
28. *Korniluk A, Kemona H, Dymicka-Piekarska V* (2014) Multifunctional CD40L: pro- and anti-neoplastic activity. *Tumor Biol* 35: 9447–9457.
<https://doi.org/10.1007/s13277-014-2407-x>
29. *Dovizio M, Ballerini P, Fullone R, Tacconelli S, Contursi A, Patrignani P* (2020) Multifaceted functions of platelets in cancer: From tumorigenesis to liquid biopsy tool and drug delivery system. *Int J Mol Sci* 21: 9585.
<https://doi.org/10.3390/ijms21249585>
30. *Kovalenko TA, Panteleev MA, Sveshnikova AN* (2019) The role of tissue factor in metastasising, neoangiogenesis and hemostasis in cancer. *Oncohematology* 14: 70–85.
<https://doi.org/10.17650/1818-8346-2019-14-2-70-85>
31. *Tavera-Mendoza LE, Brown M* (2017) A less invasive method for orthotopic injection of breast cancer cells into the mouse mammary gland. *Lab Anim* 51: 85–88.
<https://doi.org/10.1177/0023677216640706>
32. *Yang Y, Yang HH, Hu Y, Watson PH, Liu H, Geiger TR, Anver MR, Haines DC, Martin P, Green JE, Lee MP, Hunter KW, Wakefield LM* (2017) Immunocompetent mouse allograft models for development of therapies to target breast cancer metastasis. *Oncotarget* 8: 30621–30643.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.15695>
33. *Bokova UA, Tretyakova MS, Schegoleva AA, Denisov EV* (2023) In vivo models in cancer research. *Usp Mol Onkol* 10: 8–16.
<https://doi.org/10.17650/2313-805X-2023-10-2-8-16>
34. *Martyanov AA, Morozova DS, Sorokina MA, Filkova AA, Fedorova DV, Uzueva SS, Suntsova EV, Novichkova GA, Zharkov PA, Panteleev MA, Sveshnikova AN* (2020) Heterogeneity of integrin α IIb β 3 function in pediatric immune thrombocytopenia revealed by continuous flow cytometry analysis. *Int J Mol Sci* 21: 3035.
<https://doi.org/10.3390/ijms21093035>
35. *Martyanov AA, Boldova AE, Stepanyan MG, An OI, Gur'ev AS, Kassina DV, Volkov AY, Balatskiy AV, Butylin AA, Karamzin SS, Filimonova EV, Tsarenko SV, Roumiantsev SA, Rumyantsev AG, Panteleev MA, Ataullakhanov FI, Sveshnikova AN* (2022) Longitudinal multiparametric characterization of platelet dysfunction in COVID-19: Effects of disease severity, anticoagulation therapy and inflammatory status. *Thromb Res* 211: 27–37.
<https://doi.org/10.1016/j.thromres.2022.01.013>
36. *Ignatova AA, Ponomarenko EA, Polokhov DM, Suntsova EV, Zharkov PA, Fedorova DV, Balashova EN, Rudneva AE, Ptushkin VV, Nikitin EA, Shcherbina A, Maschan AA, Novichkova GA, Panteleev MA* (2019) Flow cytometry for pediatric platelets. *Platelets* 30: 428–437.
<https://doi.org/10.1080/09537104.2018.1513473>
37. *Ignatova AA, Demina IA, Ptushkin VV, Khaspekova SG, Shustova ON, Pankrashkina MM, Ryabykh AA, Obydenyi SI, Strelkova OS, Polokhov DM, Seregina EA, Poletaev AV, Ataullakhanov FI, Kireev II, Mazurov AV, Maschan AA, Novichkova GA, Panteleev MA* (2019) Evolution of platelet function in adult patients with chronic immune thrombocytopenia on romiplostim treatment. *Br J Haematol* 187: e38–e42.
<https://doi.org/10.1111/bjh.16164>

38. George R, Bhatt A, Narayani J, Thulaseedharan JV, Sivasadanpillai H, Tharakan JA (2016) Enhanced P-selectin expression on platelet-a marker of platelet activation, in young patients with angiographically proven coronary artery disease. *Mol Cell Biochem* 419: 125–133.
<https://doi.org/10.1007/s11010-016-2756-4>
39. Nakanishi-Matsui M, Zheng Y-W, Sulciner DJ, Weiss EJ, Ludeman MJ, Coughlin SR (2000) PAR3 is a cofactor for PAR4 activation by thrombin. *Nature* 404: 609–613.
<https://doi.org/10.1038/35007085>
40. Stepanyan MG, Filkova AA, Garzon Dasgupta AK, Martyanov AA, Sveshnikova AN (2021) Platelet activation through GPVI receptor: Variability of the response. *Biochem (Mosc) Suppl Ser A Membr Cell Biol* 15: 73–81.
<https://doi.org/10.1134/S1990747820050074>
41. Langford DJ, Bailey AL, Chanda ML, Clarke SE, Drummond TE, Echols S, Glick S, Ingraio J, Klassen-Ross T, LaCroix-Fralish ML, Matsumiya L, Sorge RE, Sotocinal SG, Tabaka JM, Wong D, Van Den Maagdenberg AMJM, Ferrari MD, Craig KD, Mogil JS (2010) Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nat Methods* 7: 447–449.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.1455>
42. Martyanov A, Pantelev M (2021) Platelet functional responses and signalling: The molecular relationship. Part 2: Receptors. *Syst Biol Physiol Rep* 1: 13–30.
<https://doi.org/10.52455/sbpr.01.202103013>
43. Sveshnikova AN, Ataulkhanov FI, Pantelev MA (2015) Compartmentalized calcium signaling triggers subpopulation formation upon platelet activation through PAR1. *Mol Biosyst* 11: 1052–1060.
<https://doi.org/10.1039/c4mb00667d>
44. Podoplelova NA, Nechipurenko DY, Ignatova AA, Sveshnikova AN, Pantelev MA (2021) Procoagulant platelets: Mechanisms of generation and action. *Hamostaseologie* 41: 146–153.
<https://doi.org/10.1055/a-1401-2706>
45. Kaneva VN, Martyanov AA, Morozova DS, Pantelev MA, Sveshnikova AN (2019) Platelet integrin α IIb β 3: mechanisms of activation and clustering; involvement into the formation of the thrombus heterogeneous structure. *Biochemistry (Mosc) Suppl Ser A Membr Cell Biol* 13: 97–110.
<https://doi.org/10.1134/S1990747819010033>
46. Ma Y-Q, Qin J, Plow EF (2007) Platelet integrin α IIb β 3: Activation mechanisms. *J Thromb Haemost* 5: 1345–1352.
<https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2007.02537.x>
47. Ponomarenko EA, Ignatova AA, Polokhov DM, Khismatullina RD, Kurilo DS, Shcherbina A, Zharkov PA, Maschan AA, Novichkova GA, Pantelev MA (2022) Healthy pediatric platelets are moderately hyporeactive in comparison with adults' platelets. *Platelets* 33: 727–734.
<https://doi.org/10.1080/09537104.2021.1981848>
48. Ohlmann P, Hechler B, Cazenave J-P, Gachet C (2004) Measurement and manipulation of $[Ca^{2+}]_i$ in suspensions of platelets and cell cultures. *Methods Mol Biol* 273: 229–250.
<https://doi.org/10.1385/1-59259-783-1:229>
49. Ohlmann P, Eckly A, Freund M, Cazenave JP, Offermanns S, Gachet C (2000) ADP induces partial platelet aggregation without shape change and potentiates collagen-induced aggregation in the absence of Galphaq. *Blood* 96: 2134–2139.
<https://doi.org/10.1182/blood.V96.6.2134>
50. Aurbach K, Spindler M, Haining EJ, Bender M, Pleines I (2019) Blood collection, platelet isolation and measurement of platelet count and size in mice-a practical guide. *Platelets* 30: 698–707.
<https://doi.org/10.1080/09537104.2018.1528345>
51. Rudakova EV, Boltneva NP, Makhaeva GF (2011) Comparative analysis of esterase activities of human, mouse, and rat blood. *Bull Exp Biol Med* 152: 73–75.
<https://doi.org/10.1007/s10517-011-1457-y>
52. Montague SJ, Andrews RK, Gardiner EE (2018) Mechanisms of receptor shedding in platelets. *Blood* 132: 2535–2545.
<https://doi.org/10.1182/blood-2018-03-742668>
53. Kawano T, Hisada Y, Grover SP, Schug WJ, Paul DS, Bergmeier W, Mackman N (2023) Decreased platelet reactivity and function in a mouse model of human pancreatic cancer. *Thromb Haemost* 123: 501–509.
<https://doi.org/10.1055/s-0043-1761419>
54. Carlsson K, Freskgård PO, Persson E, Carlsson U, Svensson M (2003) Probing the interface between factor Xa and tissue factor in the quaternary complex tissue factor-factor VIIa-factor Xa-tissue factor pathway inhibitor. *Eur J Biochem* 270: 2576–2582.
<https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03625.x>
55. Jo EJ, Bae E, Yoon J-H, Kim JY, Han JS (2021) Comparison of murine retroorbital plexus and facial vein blood collection to mitigate animal ethics issues. *Lab Anim Res* 37: 12.
<https://doi.org/10.1186/s42826-021-00090-4>

Evaluation of Platelet Functional Activity in Healthy BALB/c Mice and in EMT-6 Breast Cancer Orthotopic Model

A. A. Mishukov^a, S. Gaur^b, E.-I. A. Adamanskaya^{a, c}, M. A. Panteleev^{a, b, c},
and A. N. Sveshnikova^{a, c, *}

^aCenter for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology, Moscow, Russia

^bMoscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Russia

^cDmitry Rogachev National Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, and Immunology, Moscow, Russia

*E-mail: asvebnikova@yandex.ru

Platelets, anuclear cell fragments circulating in the blood, can be considered as vascular wall and latent thrombosis sensors. However, the heterogeneity of normal platelet indicators is too large for the correct «reading» of information from these sensors. Therefore, it is necessary to fine-tune methods for assessing the functional state of mouse platelets in order to then check under controlled conditions how various pathological processes change the state of platelets. In this work, we adapted previously developed flow cytometry platelet functional activity tests for use in blood samples from BALB/c mice and evaluated changes in platelet status in an *in vivo* model of spontaneous metastatic breast cancer EMT-6. Continuous and endpoint flow cytometry were used. Platelet shape change, decreased GPIb antibody binding, P-selectin exposure, integrin activation, calcium mobilization, and phosphatidylserine exposure were observed. Several functional activity differences between human and murine platelets were obtained. First, according to all observed parameters, activation of mouse platelets in response to 2.5 μm of ADP was significantly weaker than activation in response to 200 μm of AYPGKF (PAR4 thrombin receptor agonist). Second, reversible activation of integrins and shape change were observed in response to ADP. The main difference between platelets of mice with a tumor was a significant decrease in their number when isolated from the blood. Additionally, some responses were diminished: binding of antibodies to GPIb, shape change, activation of integrins, and procoagulant response. The results indicate that a tumor in the terminal stage probably reduces the number of circulating platelets and causes their damage.

Keywords: platelet functional activity, breast cancer, flow cytometry, calcium signaling, *in vivo* model of spontaneous metastatic cancer