

УДК 616.151.5-072.7

ВЛИЯНИЕ МИКРОВЕЗИКУЛ ЭРИТРОЦИТОВ НА КОНЕЧНЫЙ ЭТАП СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ

© 2014 г.

Е.Г. Сухарева^{1,2}, *Г.Я. Левин*²

¹Нижегородский госуниверситет им. Н.И. Лобачевского

²Нижегородский НИИ травматологии и ортопедии

ekaterina.syhareva@gmail.com

Поступила в редакцию 26.09.2013

Исследовано влияние эритроцитарных микровезикул, выделенных после инкубации неотмытых эритроцитов здоровых доноров в консерванте в течение 7 дней, на конечный этап свертывания крови. Показано, что эритроцитарные микровезикулы обладают не только проагрегационным действием, но и выраженным прокоагулянтным эффектом на протекание конечного этапа процесса коагуляции. Установлено, что микровезикулы эритроцитов усиливают спонтанную агрегацию тромбоцитов, а также фибринообразование.

Ключевые слова: микровезикулы, коагуляция плазмы, эритроциты, агрегация тромбоцитов.

Введение

Известно, что микрочастицы — это везикулы плазматической мембраны, выделяемые в кровотоки различными типами клеток. Эти микрочастицы, известные также как микровезикулы (МВ), имеют размер менее 1 мкм и содержат множество белков, полученных ими от клеток, из которых они образовались, а также поверхностных рецепторов, которые позволяют идентифицировать их происхождение. Большинство исследований свидетельствует о том, что МВ гетерогенны и различаются по размеру, фосфолипидному составу, поверхностным антигенам и содержанию белка. Считается, что выход МВ — это жестко контролируемый процесс, вызванный различными стимулами, такими как стресс, комплементарная атака, проапоптотическая стимуляция или повреждение [1]. Известно, что в процессе консервации происходят структурно-функциональные изменения мембраны эритроцитов [2], сопровождающиеся выходом в межклеточное пространство МВ. Исследование их роли в гемостазе имеет важное значение, в связи с большим количеством трансфузий и посттрансфузиологическими осложнениями неиммунного генеза.

Данных о влиянии МВ, высвобождаемых эритроцитами в процессе хранения, на поток-индуцированную агрегацию тромбоцитов и различные этапы процесса коагуляции в открытой литературе мы не встретили. Изучению этого вопроса и посвящено настоящее исследование.

Экспериментальная часть

Исследование проведено на 15 образцах крови здоровых доноров, стабилизированной раствором гемоконсерванта «Гемасин» 500/400 (Синтез, Россия) в соотношении 4:1. Кровь центрифугировали в течение 7 минут при 1000 об/мин, удаляли обогащенную тромбоцитами плазму (ОТП), оставшуюся кровь центрифугировали в течение 20 минут при 3000 об/мин, отбирали бестромбоцитарную плазму, удаляли лейкоцитарно-тромбоцитарную пленку и выделяли эритроцитарную массу. Ее хранили при 4°C в течение 7 дней.

Известно, что в процессе консервации эритроциты выделяют МВ [3]. После инкубации эритроциты осаждали центрифугированием в течение 20 минут при 3000 об/мин. Затем, согласно методике [4], оставшуюся суспензию МВ освобождали от клеточного дебриса путем центрифугирования в течение 20 минут при 5000 об/мин.

Спонтанную (поток-индуцированную) агрегацию тромбоцитов исследовали на приборе собственной конструкции [5], в котором использован принцип, предложенный Н. Schmid-Schönbein et al. [6]. В данном приборе клетки крови помещают между двумя плоскопараллельными пластинами, вращающимися навстречу друг другу. Агрегацию тромбоцитов, а также влияние на нее МВ оценивали в условиях сдвигового потока с видеозаписью процесса агрегации и последующей компьютерной обработкой полученных микроснимков. В кон-

троле исследовали агрегацию в ОТП с добавлением к ней физиологического раствора в соотношении 1:1. В опыте к ОТП добавляли МВ в соотношении 1:1. Оценка процесса спонтанной агрегации тромбоцитов проводилась по следующим показателям:

1. Степень агрегации – по суммарной максимальной интегральной оптической плотности тромбоцитарных агрегатов (усл. ед.) – Ма.

2. Скорость агрегации – по суммарной интегральной оптической плотности тромбоцитарных агрегатов через 180 сек после начала процесса агрегации (усл. ед.) – A_{180} .

Для исследования спонтанной агрегации тромбоцитов их концентрацию в ОТП стандартизовали до $200\text{--}250 \times 10^9/\text{л}$.

Кроме того, исследовали влияние МВ на время рекальцификации плазмы, активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), протромбиновое время (техпластин-тест) и тромбиновое время бестромбоцитарной аутоплазмы на коагулометре *Sticker Coagulometer BC1* (Германия). Соотношение суспензии МВ и аутоплазмы составляло 1:1.

Результаты исследований обработаны с использованием методов непараметрической статистики с применением критерия парных сравнений Вилкоксона при помощи пакета прикладных программ *STATISTICA 6.0*.

Результаты и их обсуждение

Как показали проведенные исследования, МВ, выделенные из хранящейся в гемоконсерванте эритроцитарной массы, в значительной степени усиливали спонтанную агрегацию тромбоцитов в ОТП. При этом происходило образование не только агрегатов тромбоцитов, но и нитей фибрина, что могло способствовать усилению агрегации тромбоцитов по сравнению с контролем: скорость агрегации повышалась на 18%, а степень – на 45%.

Согласно литературным данным, эритроцит способен адсорбировать на своей поверхности фибриноген. Важную роль в этом процессе играет отрицательный заряд эритроцитов [7]. Хотя сам фибриноген также несет отрицательный заряд, предполагается, что адсорбция происходит за счет участков молекулы фибриногена с положительно заряженными простетическими группами [8]. Можно полагать, что в процессе хранения эритроцитов с отрицательно заряженными мембранами МВ способен связываться фибриноген, способствующий усилению агрегации тромбоцитов и образованию нитей фибрина в искусственном сдвиговом потоке.

Можно также предположить, что образование нитей фибрина из фибриногена происходит под действием тромбина, генерирующегося на мембране МВ.

На такую возможность указывают проведенные в последние годы исследования, по данным которых на мембране эритроцитарных МВ происходит генерация тромбина [9]. Авторы связывают этот процесс с наличием на наружной поверхности мембраны МВ отрицательно заряженных фосфолипидов, в частности фосфатидилсерина (ФС), что создает дополнительную поверхность для активации внутреннего и внешнего путей процесса коагуляции.

Для проверки этой гипотезы нами проведено исследование влияния МВ, выделенных из эритроцитарной массы, хранившейся в течение 7 дней, на процесс рекальцификации аутоплазмы, внешний и внутренний путь свертывания крови.

Как показали проведенные исследования, МВ, выделенные из консервированных эритроцитов, крайне незначительно удлиняли АЧТВ, что свидетельствует об отсутствии активации под влиянием МВ внутреннего пути свертывания крови (таблица). Известно, что образование МВ связано с дестабилизацией липидного комплекса мембраны родительской клетки. В результате этого происходит перераспределение

Таблица

Влияние эритроцитарных микровезикул на агрегацию тромбоцитов и различные этапы процесса коагуляции плазмы

| Характеристика процесса | Параметры измерения | Контроль | Опыт |
|-------------------------------|----------------------------|---------------|----------------|
| Процесс Агрегация тромбоцитов | Ма, усл. ед. | 685.45 ± 73.2 | 999.36 ± 92.1* |
| | A_{180} , усл. ед. | 569.00 ± 71.0 | 675.42 ± 75.4* |
| Коагуляция аутоплазмы | АЧТВ, сек | 238.3 ± 16.1 | 240.4 ± 16.3 |
| | Протромбиновое время, сек | 19.5 ± 1.1 | 19.2 ± 0.9 |
| | Тромбиновое время, сек | 20 ± 1.2 | 17.2 ± 0.8* |
| | Время рекальцификации, сек | 373.3 ± 18.3 | 341.6 ± 18.0* |

* $p < 0.05$ в сравнении с контролем, критерий Вилкоксона.

фосфолипидов – нейтральные фосфолипиды (прежде всего фосфатидилхолин) с внешней стороны мембраны переходят на внутреннюю, а несущие отрицательный заряд (например ФС) – с внутренней на внешнюю. При этом мембрана, обогащенная ФС, приобретает отрицательный заряд [7]. Однако можно полагать, что отсутствие усиления коагуляции плазмы под действием эритроцитарных МВ в нашем исследовании связано с тем, что МВ способны отличаться по составу ФС, и имеющиеся на их мембранах кластеры ФС не представляют каталитическую поверхность для внутренней и внешней теназы и протромбиназного комплекса в связи со снижением отрицательного заряда [10].

Одним из оснований для этого предположения являются полученные нами результаты исследований, в которых показано снижение отрицательного заряда мембран эритроцитов в процессе их хранения (неопубликованные данные).

Можно полагать, что эритроцитарные МВ способны оказывать влияние не только на внутренний, но и внешний механизм гемостаза. В его реализации ключевую роль играет наличие тканевого фактора. Есть данные, что мембраны эритроцитарных МВ несут ассоциированный тканевой фактор [11]. По нашим данным, действие на внешний путь гемостаза эритроцитарных МВ было выражено в той же степени, что и на внутренний. Укорочение протромбинового времени под действием МВ составляло не более 2% (таблица). Одним из возможных объяснений такого слабого действия МВ на внешний путь гемокоагуляционного каскада может служить гипотеза [12], согласно которой тканевой фактор на мембране некоторых МВ находится в «неактивной» форме. Таким образом, он может способствовать усилению коагуляции лишь при определенных условиях после активации.

При исследовании конечного этапа свертывания крови были получены результаты, согласно которым МВ ускоряли тромбиновое время плазмы крови на 14% (таблица). Это может быть связано с сохранением возможности генерации тромбина на мембранах МВ, полученных в процессе консервации эритроцитов. Именно поэтому сокращалось, вероятнее всего, время рекальцификации плазмы при добавлении в нее МВ, что отмечено в наших исследованиях.

Время рекальцификации плазмы под действием МВ сокращалось на 8%. Известно, что время рекальцификации плазмы отражает в целом ее коагуляционную способность. Таким образом, сокращение времени коагуляции плазмы под действием МВ связано с усилением фибринообразования под действием МВ.

Заключение

Подводя итог, можно заключить, что МВ, высвобождаемые консервированными эритроцитами, инициируют процесс фибринообразования. Учитывая сведения о том, что количество МВ в процессе хранения эритроцитарной массы увеличивается [13], можно полагать, что образование МВ может служить одной из причин посттрансфузионных микроциркуляторных осложнений.

Список литературы

1. Rubin O., Crettaz D., Tissot J.-D. et al. // *Blood Transfus.* 2010. V. 8. P. 31–38.
2. Левин Г.Я., Морозова Н.В. // *Эфферент. терапия.* 1998. Т. 2. № 1. С. 46–50.
3. Distler J.H., Huber L.C., Reich C.F. et al. // *Apoptosis.* 2005. V. 10. P. 731–741.
4. Dey-Hazra E., Hartel B., Kirsch T. et al. // *Vasc. Health Risk Manag.* 2010. V. 6. P. 1125–1133.
5. Пат. 2278381 РФ. Устройство для исследования агрегации тромбоцитов / Левин Г.Я., Модин А.П., Кудрицкий С.Ю., Соснина Л.Н. (РФ). № 2005100408/14; заявл. 11.01.05; опубл. 20.06.06. Бюл. № 17.
6. Schmid-Schönbein H., Gosen J.V., Heinrich L. // *Microvasc. Res.* 1973. V. 6. P. 366–376.
7. Zwaal R.F., Schroit A.J. // *Blood.* 1997. V. 89. P. 1121–1132.
8. Кузник Б.И. Клеточные и молекулярные механизмы регуляции системы гемостаза в норме и патологии. Чита: Экспресс-изд-во, 2010. 832 с.
9. Salzer U., Zhu R., Lutten M. et al. // *Transfusion.* 2008. V. 48. P. 451–462.
10. Willekens F.L.A., Werre J.M., Groenen-Döpp Y.A.M. et al. // *British J. Haematology.* 2008. V. 141. P. 549–556.
11. Biro E., Sturk-Maquelin K.N., Vogel G.M. et al. // *J. Thromb. Haemost.* 2003. V. 1. P. 2561–2568.
12. Furie B., Furie B.C. // *N. Engl. J. Med.* 2008. V. 359. P. 938–949.
13. Rubin O., Crettaz D., Tissot J.-D. et al. // *Talanta.* 2010. V. 82. P. 1–8.

**THE EFFECT OF ERYTHROCYTE MICROVESICLES
ON THE FINAL STAGE OF BLOOD COAGULATION***E.G. Sukhareva, G.Ya. Levin*

In this paper, we present the results of our investigation of the effect of erythrocyte microvesicles isolated after incubating unwashed red blood cells from healthy donors with anticoagulant for 7 days. Erythrocyte microvesicles are shown to have not only pro-aggregation, but also pronounced procoagulant action on the final stage of blood coagulation. We have also found out that Erythrocyte microvesicles enhance spontaneous aggregation of platelets and fibrin formation.

Keywords: microvesicles, plasma coagulation, erythrocytes, platelet aggregation.

References

1. Rubin O., Crettaz D., Tissot J.-D. et al. // *Blood Transfus.* 2010. V. 8. P. 31–38.
2. Levin G.Ja., Morozova N.V. // *Jefferent. terapija.* 1998. T. 2. № 1. S. 46–50. Distler J.H., Huber L.C., Reich C.F. et al. // *Apoptosis.* 2005. V. 10. P. 731–741.
3. Distler J.H., Huber L.C., Reich C.F. et al. // *Apoptosis.* 2005. V. 10. P. 731–741.
4. Dey-Hazra E., Hartel B., Kirsch T. et al. // *Vasc. Health Risk Manag.* 2010. V. 6. P. 1125–1133.
5. Pat. 2278381 RF. Ustrojstvo dlja issledovanija agregacii trombocitov / Levin G.Ja., Modin A.P., Kudrickij S.Ju., Sosnina L.N. (RF). № 2005100408/14; zajavl. 11.01.05; opubl. 20.06.06. *Bjul.* № 17.
6. Schmid-Schönbein H., Gosen J.V., Heinrich L. // *Microvasc. Res.* 1973. V. 6. P. 366–376.
7. Zwaal R.F., Schroit A.J. // *Blood.* 1997. V. 89. P. 1121–1132.
8. Kuznik B.I. *Kletochnye i molekularnye mehanizmy reguljacii sistemy gemostaza v norme i patologii.* Chita: Jekspres-izd-vo, 2010. 832 s.
9. Salzer U., Zhu R., Luten M. et al. // *Transfusion.* 2008. V. 48. P. 451–462.
10. Willekens F.L.A., Werre J.M., Groenen-Döpp Y.A.M. et al. // *British J. Haematology.* 2008. V. 141. P. 549–556.
11. Biro E., Sturk-Maquelin K.N., Vogel G.M. et al. // *J. Thromb. Haemost.* 2003. V. 1. P. 2561–2568.
12. Furie B., Furie B.C. // *N. Engl. J. Med.* 2008. V. 359. P. 938–949.
13. Rubin O., Crettaz D., Tissot J.-D. et al. // *Talanta.* 2010. V. 82. P. 1–8.