

БИОЛОГИЯ

УДК 616.151.5-07

ВЛИЯНИЕ ЭРИТРОЦИТАРНЫХ МИКРОВЕЗИКУЛ НА ПОКАЗАТЕЛИ ТРОМБОЭЛАСТОГРАММЫ

© 2013 г.

*Е.Г. Сухарева,^{1,2} Г.Я. Левин,² В.Н. Крылов¹*¹Нижегородский госуниверситет им. Н.И. Лобачевского²Нижегородский НИИ травматологии и ортопедии

ekaterina.syhareva@gmail.com

Поступила в редакцию 28.05.2013

Проведено исследование влияния эритроцитарных микровезикул на различные показатели тромбоэластограммы. Показано, что эритроцитарные микровезикулы обладают не только прокоагулянтным действием, но и выраженным антикоагулянтным эффектом, замедляя процесс активации плазменных факторов свертывания и фибринообразования. Выявлена разница в действии на процесс свертывания плазмы микровезикул, выделенных из эритроцитов при их 24- и 48-часовом хранении.

Ключевые слова: микровезикулы, коагуляция плазмы, эритроциты.

Введение

Образующиеся при экзоцитозе, некрозе и апоптозе клеток фрагменты их мембран способны замыкаться и формировать пузырьки – микровезикулы (МВ) диаметром до 2 мкм. Они являются неотъемлемой частью межклеточной коммуникации организма и участвуют в регуляции воспалительного процесса, клеточной пролиферации, апоптоза, сосудистых реакций и ряда других жизненно важных процессов [1]. Активно изучается гемокоагуляционная роль циркулирующих в кровотоке микровезикул, происходящих из форменных элементов крови и эндотелия [2]. В то же время большая часть работ посвящена исследованию коагуляционной активности тромбоцитарных микровезикул, что связано с ведущей ролью в гемостазе именно тромбоцитов [3].

В настоящее время появляются единичные исследования, свидетельствующие о том, что не только микрочастицы тромбоцитов вовлечены в процесс коагуляции, но и микровезикулы эритроцитов, а также микровезикулы других клеток обладают прокоагулянтной активностью [4]. Однако не ясно, какой вклад в гемокоагуляционный процесс вносят микровезикулы эритроцитов. Важность этой проблемы обусловлена, в частности, тем, что количество эритроцитарных микровезикул в крови может резко увеличиваться при многих патологических состояниях,

сопровождающихся анемией, нарушениями гемореологии и микроциркуляции [5]. Мы исследовали влияние МВ эритроцитов на гемостаз с помощью тромбоэластографии (ТЭГ). С помощью ТЭГ можно оценить все три основные фазы свертывания крови: иницирование, усиление и распространение [6].

Экспериментальная часть

Исследование проведено на 15 образцах крови здоровых людей, стабилизированной 3.8% раствором цитрата натрия в соотношении 1:9. Кровь центрифугировали 20 мин при 3000 об./мин, после чего отделяли бестромбоцитарную плазму, удаляли лейкоцитарно-тромбоцитарную пленку и выделяли эритроцитарную массу. Последнюю отмывали в физиологическом растворе, а затем ресуспензировали в *трис*-буфере в соотношении 1:2 и инкубировали при 37°C в течение 24 и 48 часов. В процессе хранения отмывтых эритроцитов происходит накопление микровезикул [4]. После инкубации общую фракцию микровезикул отделяли от эритроцитарной массы центрифугированием в течение 20 мин при 3000 об./мин. Затем, согласно методике [7], выделяли общую фракцию микровезикул. Исследовали влияние МВ на время рекальцификации плазмы на тромбоэластографе TEG 5000 (США). Оценивали следующие показатели ТЭГ: R – отрезок прямой от

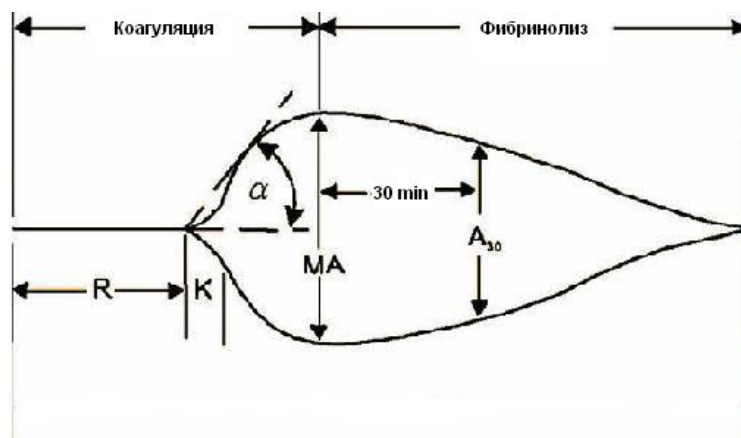


Рис. Схема тромбозаграммы

начала записи до точки разветвления тромбозаграммы, K — отрезок, равный 20 мм, от точки разветвления тромбозаграммы, α — угол, образуемый касательной линией, проведенной от точки разветвления тромбозаграммы к ее расширению, и прямой от начала записи, MA — длина отрезка, проведенного в самой широкой части тромбозаграммы (рисунок). Бестромбоцитарную плазму хранили при 4°C. Для измерения готовили суспензию MB и аутоплазмы в соотношении 1:1. Далее в кювету для измерения помещали 340 μ l суспензии и к ней добавляли 20 μ l 0.2 M CaCl₂.

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

Результаты и их обсуждение

Как показали проведенные исследования, MB, выделенные после 24-часовой инкубации эритроцитов, более чем на 30% уменьшили параметр R, отражающий время с момента, когда образец был помещен в анализатор, до момента образования первых нитей фибрина (таблица). Этот показатель характеризует активацию плазменных факторов свертывания и соответствует фазе инициации, включающей в себя активацию по внешнему и внутреннему механизмам, результатом которой является образование протромбиназы. Известно, что образование MB связано с дестабилизацией липидного комплекса мембраны родительской клетки. В результате этого происходит перераспределение фосфолипидов — нейтральные фосфолипиды (прежде всего фосфатидилхолин) с внешней стороны мембраны переходят на внутреннюю, а несущие отрицательный заряд (например фосфатидилсерин — ФС) — с внутренней на внешнюю. При

этом мембрана, обогащенная ФС, приобретает отрицательный заряд [8]. Таким образом, можно полагать, что усиление коагуляции плазмы под действием эритроцитарных MB связано с тем, что имеющиеся на их мембранах фосфатидилсериновые кластеры представляют каталитическую поверхность для внутренней и внешней теназы и протромбиназного комплекса. Можно полагать, что эритроцитарные MB активируют не только внутренний, но и внешний механизм гемостаза. В его реализации ключевую роль играет наличие тканевого фактора. Несмотря на распространенное мнение о том, что эритроциты не содержат тканевого фактора, имеются противоположные данные о наличии его в мембранах MB. Есть данные, что мембраны эритроцитарных MB несут ассоциированный тканевой фактор [9].

Установлено, что влияние MB, высвобождаемых эритроцитами после 24-часовой инкубации, на параметр K, характеризующий скорость образования сгустка на стадии усиления, крайне незначительно и составляет менее 5%. Кроме того, была отмечена разница между действием MB на параметры K и α . С одной стороны, скорость усиления (показатель K) замедлялась, а угол α , отражающий скорость роста фибриновой сети и ее структурообразование, увеличился на 10%. Можно предположить, что MB могут несколько увеличивать скорость и в то же время замедлять процесс образования нитей фибрина и полимеризацию фибрин-мономеров. Это может быть связано с изменением под влиянием MB конечной фазы свертывания, а также с их влиянием на скорость отщепления фибринопептидов или на полимеризацию фибрин-мономеров. Однако с помощью тромбозаграфии оценить механизм действия MB на конечный этап свертывания не представляется возможным.

Таблица

Влияние эритроцитарных микровезикул на время рекальцификации плазмы

Инкубация	Параметры измерения тромбоэластографии	Контроль	Опыт
24 часа	R, мин	8.66 ± 1.91	5.77 ± 0.84*
	K, мин	4.13 ± 0.61	4.35 ± 0.84
	α, градусы	60.12 ± 3.21	66.19 ± 1.83*
	МА, мм	35.52 ± 2.48	34.84 ± 2.93
48 часов	R, мин	5.68 ± 0.51	6.29 ± 0.54*
	K, мин	4.49 ± 0.66	5.05 ± 0.71
	α, градусы	63.73 ± 2.51	61.84 ± 2.82
	МА, мм	30.58 ± 1.1	30.63 ± 1.35

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

МА – максимальная амплитуда тромбоэластограммы – характеризует максимальную прочность сгустка и зависит, прежде всего, от тромбодинамических свойств тромбоцитов и концентрации фибриногена. В связи с тем, что в нашем эксперименте исследовалась бедная тромбоцитами плазма, разница между опытом и контролем была незначительна и составила менее 2% (таблица).

При изучении влияния МВ, высвобождаемых эритроцитами после 48-часовой инкубации, установлено, что они действовали на процесс свертывания как антикоагулянты. МВ эритроцитов не только не уменьшили, а даже увеличили параметр R на 11%. Объяснением полученных результатов могут служить данные [10], согласно которым при хранении эритроцитарной массы в условиях банка крови количество ФС, содержащихся на поверхности МВ, с течением времени уменьшается. Авторы делают вывод, что это может быть связано как со старением самих МВ, так и со старением эритроцитов, продуцирующих МВ.

Установлено, что параметр K, характеризующий время с момента начала образования сгустка до достижения фиксированного уровня прочности сгустка, увеличился под влиянием МВ на 12.5%. При этом показано, что МВ незначительно способствовали изменению параметра α – всего на 3% (таблица).

Можно предположить, что с увеличением времени инкубации эритроцитов свойства МВ изменяются, и они в большей степени действуют на конечный этап свертывания – процесс образования фибрин-мономеров под действием тромбина. Тромбин представляет собой трипсиноподобную сериновую протеиназу с уникальными свойствами. Благодаря наличию в молекуле тромбина двух субсайтов – анионсвязывающего экзосайта 2, называемого участком связывания гепарина, и анионсвязывающего экзосайта 1, называемого также участком узнавания фибриногена, тромбин способен связы-

ваться с отрицательно заряженными клеточными мембранами [11–13]. Показано также, что отрицательно заряженные лиганды (азид натрия, аденозин-5'-трифосфат, декстрансульфат) ингибируют свертывающую активность тромбина, взаимодействуя с его анионсвязывающими экзосайтами [14]. Можно предположить, что МВ обладают антитромбиновым действием, обусловленным тем, что имеющиеся на их мембранах фосфатидилсериновые кластеры, несущие отрицательный заряд, представляют поверхность для связывания с анионсвязывающими экзосайтами молекулы тромбина.

Заключение

Подводя итог, можно заключить, что эритроцитарные микровезикулы способны оказывать действие на различные звенья гемостаза, при этом они обладают выраженной как про-, так и антикоагуляционной активностью, которая может изменяться в зависимости от времени инкубации. Прокоагулянтная активность эритроцитарных МВ заметно снижается при увеличении времени инкубации.

Список литературы

1. Distler J.H., Huber L.C., Reich C.F. et al. // Apoptosis. 2005. V. 10. P. 731–741.
2. Diamant M., Tushuizen M.E., Sturk A. et al. // Eur. J. Clin. Invest. 2004. V. 34. P. 392–401.
3. Зубаиров Д.М. Молекулярные основы свертывания крови и тромбообразования. Казань: ФЭН, 2000. 364 с.
4. Rubin O., Crettaz D., Tissot J.-D. et al. // Blood Transfus. 2010. V. 8. P. 31–38.
5. Xiong Z., Oriss T.B., Cavaretta J.P. et al. // Vox Sanguinis. 2012. V. 10. P. 1–7.
6. Современные методы распознавания состояния тромбоцитической готовности / Под ред. А.П. Момота. Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2011. 138 с.
7. Dey-Hazra E., Hartel B., Kirsch T. et al. // Vasc. Health Risk Manag. 2010. V. 6. P. 1125–1133.

8. Zwaal R.F., Schroit A.J. // *Blood*. 1997. V. 89. P. 1121–1132.
9. Biro E., Sturk-Maquelin K.N., Vogel G.M. et al. // *J. Thromb. Haemost.* 2003. V. 1. P. 2561–2568.
10. Bosman G.J.C., Lasonder E., Groenen-Döpp Y.A.M. et al. // *Journal of Proteomics*. 2010. V. 73. P. 396–402.
11. Струкова С.М. // *Биохимия*. 2001. Т. 66. Вып. 1. С. 14–27.
12. Fenton J.W. // *Thromb. Haemost.* 1995. V. 74. P. 493–498.
13. Stubbs M.T., Vode W. // *Thromb. Res.* 1993. V. 69. № 1. P. 1–58.
14. Швачко Л.П., Литвинович С.В., Кибирев В.К. // *Укр. біохім. журн.* 2006. Т. 78. № 1. С. 87–93.

THE INFLUENCE OF ERYTHROCYTE MICROVESICLES ON THROMBOELASTOGRAM INDICES

E.G. Sukhareva, G.Ya. Levin, V.N. Krylov

The influence of erythrocyte microvesicles on different thromboelastogram indices has been studied. The erythrocyte microvesicles are shown to have not only procoagulant activity, but also a pronounced anticoagulant effect slowing down the activation process of plasma clotting factors and fibrin formation. The microvesicles derived from the erythrocytes stored for 24 and 48 hours are found to act differently on the plasma coagulation process.

Keywords: microvesicles, plasma coagulation, erythrocytes.