

М.Н. Егорихина, Г.Я. Левин

Фибриноген и агрегация тромбоцитов (на модели термической травмы)

Изучали влияние различных концентраций фибриногена на агрегацию тромбоцитов в искусственном сдвиговом потоке ($60-160\text{с}^{-1}$) у здоровых доноров и больных после термической травмы. Впервые показано, что максимальная агрегация при ожогах происходит при значительно более высокой концентрации фибриногена, чем у здоровых доноров. Рассматриваются возможные механизмы данного явления на моделях с блокадой антителами GP IIb/IIIa, стабилизацией крови ЭДТА и гепарином.

Ключевые слова: агрегация тромбоцитов, гемостаз, фибриноген, рецепторы адгезии, термическая травма.

M.N. Egorikhina, G.Ja. Levin

Fibrinogen and Aggregation of Thrombocytes (on the model of thermal trauma)

The influence of various concentrations of fibrinogen on the aggregation of thrombocytes in the artificial shear flow ($60-160\text{sec}^{-1}$) in healthy donors and in patients after thermal trauma was studied. For the first time it was shown, that the maximum aggregation in burn injury occurs at much higher concentration of fibrinogen, than in healthy donors. Possible mechanisms of the given phenomenon on models with blockage by antibodies GP IIb/IIIa, stabilization of blood EDTA and Heparinum are surveyed.

Key words: aggregation of thrombocytes, hemostasis, fibrinogen, adhesive receptors, thermal trauma.

Введение

Механизм агрегации тромбоцитов активно изучается в последнее время. Известно, что процесс агрегации связан с достаточно сложными молекулярными взаимодействиями, которые развиваются в ходе реакции активации после стимуляции тромбоцитов растворимыми агонистами [5, 8, 23] (рис.1). Обобщая представленные на схеме данные, можно сказать, что главным механизмом активации тромбоцитов, ведущим к их агрегации, является развитие доступности мест связи в рецепторах адгезивных молекул – интегринах, самым обильным из которых является интегрин $\alpha_{IIb}\beta_3$ или GP IIb/IIIa. Связывание с активированными интегринами адгезивных молекул, прежде всего VWF и фибриногена, и обуславливает агрегацию тромбоцитов. Известно, что VWF вызывает агрегацию лишь на высоких скоростях сдвига, а при низких и даже при средних агрегация определяется уровнем фибриногена [2, 13, 17-20]. Многие аспекты механизма действия фибриногена на агрегацию тромбоцитов остаются неясными или противоречивыми. Связано это, в частности, с тем, что исследовалась, главным образом, лишь индуцированная агрегация и механизм действия фибриногена у здоровых людей.

В данном сообщении приведены результаты изучения влияния фибриногена на спонтанную агрегацию тромбоцитов при относительно низкой скорости сдвига $60 - 160\text{с}^{-1}$. Ряд исследований проведен на модели термической травмы, то есть на фоне гиперфибриногенемии, гиперкоагуляции и гиперагрегации тромбоцитов.

Материалы и методы

Исследование проведено на 52 образцах крови здоровых людей и на 30 образцах крови больных ожоговой болезнью, находившихся в остром периоде (ожог II-III-IV степени, более 15 % поверхности тела).

Спонтанную агрегацию тромбоцитов исследовали на приборе собственной конструкции [3], в котором использован принцип, предложенный H Schmid-Schonbain et al. [21]. В данном приборе клетки крови помещают в камеру между двумя плоскопараллельными пластинами, вращающимися навстречу друг другу. Спонтанную агрегацию тромбоцитов оценивали в условиях сдвигового потока с видеозаписью процесса агрегации и последующей компьютерной обработкой полученных микрофотоснимков, которую выполняли с помощью специально разработанной программы. Принцип её работы основан на пороговой

бинаризации изображения и последующем определением интегральной оптической плотности каждого объекта и всех объектов кадра в целом. Оценивали степень и скорость спонтанной агрегации тромбоцитов. Вычисляемый показатель – интегральная оптическая плотность агрегата – содержит, по сути, информацию об объеме агрегата, поскольку количество точек объекта на изображении пропорционально площади объекта, а оптическая плотность характеризует толщину агрегата в каждой точке. Оценку процесса спонтанной агрегации тромбоцитов проводили по следующим показателям:

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

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

При изучении влияния концентрации фибриногена на агрегацию кровяных пластинок к плазме, обогащенной тромбоцитами, добавляли сухой фибриноген (Bio Chemika). Конечная концентрация фибриногена составляла в разных сериях опытов от 4,5 до 7,5 г/л. Каждую серию экспериментов с заданными концентрациями фибриногена проводили на крови одного донора. В качестве контроля использовали показатели агрегации тромбоцитов данного донора.

Для блокирования рецепторной функции GPIIb/IIIa тромбоцитов использовали моноклональные антитела ФраМон (CRC64) (концентрация в плазме 0,0011 мг/мл), предоставленные нам Российским кардиологическим научно-производственным комплексом (профессор А.В. Мазуров).

Для ингибирования агрегации применяли гепарин (ОАО "СИНТЕЗ", Россия), концентрация в плазме 0,91 ЕД в 1 мл.

Результаты исследований обработаны методом непараметрической статистики с применением критериев Манна-Уитни и парных сравнений Вилкоксона при помощи пакета программ STATISTICA 6.0.

Результаты и обсуждение

Известно, что тромбоциты могут активироваться и агрегировать при воздействии на их мембрану гидродинамических сил в зоне с высоким напряжением сдвига [1, 11]. Данных о такой возможности в потоке при скорости сдвига $60 - 160 \text{ с}^{-1}$ мы не встретили. Как показали проведен-

ные исследования, спонтанная агрегация тромбоцитов возникает и при относительно низкой скорости сдвига даже у здоровых людей. Степень спонтанной агрегации тромбоцитов здоровых доноров в этих условиях составляла $468,52 \pm 57,61$ усл.ед., а скорость – $106,05 \pm 19,92$ усл.ед. Её возникновение могло быть связано, по нашему мнению, с двумя причинами: с возможностью активации интактных тромбоцитов ламинарным потоком с низким напряжением сдвига; с активацией тромбоцитов эндогенными индукторами, имеющимися или возникающими в цитратной плазме.

В соответствии с уже признанной теорией о существовании непрерывного внутрисосудистого свертывания крови [24], в норме в ней присутствуют небольшие концентрации тромбина. Даже его наномолярных концентраций достаточно для активации PAR-рецепторов тромбоцитов [5]. С достаточным основанием можно полагать, что эндогенные индукторы тромбоцитов всегда присутствуют в крови. Кроме того, образование индукторов агрегации может происходить вследствие забора крови в цитрат натрия. Поэтому для изучения спонтанной агрегации тромбоцитов в потоке S. Goto et al. (1998) стабилизируют кровь в присутствии ингибитора тромбина.

Нами показано, что увеличение концентрации фибриногена вызывает нарастание спонтанной агрегации тромбоцитов (табл.1). Максимальная агрегация происходит при концентрации фибриногена 4,5 г/л. В дальнейшем наблюдается описанный в литературе "эффект насыщения", который объясняется блокадой рецепторов GPIIb/IIIa, избытком фибриногена [4, 10] или созданием аллостерического равновесия при избытке фибриногена согласно закону действующих масс [7]. Однако при термической травме, когда концентрация фибриногена существенно выше этих показателей, агрегация тромбоцитов остается высокой. Мы полагаем, что это связано с наличием в крови при ожогах большого количества индукторов агрегации: тромбина, тканевого фактора, катехоламинов, АДФ и др. и соответственно с экспрессией на мембране тромбоцитов дополнительных высокоаффинных рецепторов к фибриногену. Увеличение концентрации фибриногена в плазме крови ожоговых больных до 6,0-6,5 г/л вызывало возрастание агрегации тромбоцитов, и лишь дальнейшее повышение его концентрации приводило к её снижению, хотя агрегация продолжала значительно превышать норму. Нами обнаружено, что "эффект насыще-

ния” наблюдается при ожогах лишь при концентрации фибриногена 7,0-7,5 г/л.

При исследовании механизма действия фибриногена на агрегацию тромбоцитов мы использовали антитела к GPIIb/IIIa – ФраМон. При этом нами получены неожиданные результаты. Антитела к GPIIb/IIIa значительно снижали агрегацию тромбоцитов и меняли её характер – крупные агрегаты у здоровых доноров практически не образовывались, однако агрегация сохранялась. Мало того, добавление фибриногена усиливало агрегацию тромбоцитов, несмотря на блокаду GPIIb/IIIa (рис.2). При исследовании обогащенной тромбоцитами плазмы ожоговых больных, на фоне использования антител к GPIIb/IIIa, агрегация тромбоцитов была заметно выше, чем у доноров. В этих условиях образовывались даже крупные агрегаты.

Близкие результаты получали D.J. Schneider et al. (1999). Препарат группы антиагрегантов Абциксимаб (Рео-Про), являющийся специфическим ингибитором рецепторов тромбоцитов GPIIb/IIIa, не блокировал дегрануляцию тромбоцитов, вызванную АДФ и фибриногеном. Авторы предположили, что это может быть связано с тем, что фибриноген связывается с другими интегринами, не ингибируемыми Рео-Про, или с пулом интегринов, которые не ассоциируются с Рео-Про. Мы полагаем, что это могли быть, например, витронектиновые рецепторы, которые “признают” многие лиганды, действующие на GPIIb/IIIa [14].

При наличии в плазме крови ожоговых больных большого количества индукторов агрегации тромбоцитов и активации гемостаза, прежде всего тромбина, активными (высокоаффинными) становятся многие рецепторы, в том числе PAR1 и PAR4, что усиливается действием комплекса TF/VIIa и Ха [6, 15]. Активация PAR-рецепторов стимулирует передачу сигнала внутрь клетки, что ведет к активации фосфолипазы C, мобили-

зации Ca^{2+} , активации протеинкиназы C и как следствие, к активации интегринов и агрегации тромбоцитов [12, 16]. При термической травме это, вероятнее всего, и происходит. Для агрегации тромбоцитов не требуется дополнительных экзогенных индукторов – интегрин уже активированы.

Для проверки этого положения проведены следующие исследования. Кровь стабилизировали ЭДТА (4,8 мкмоль/л), блокируя тем самым один из конечных путей активации тромбоцитов – увеличение концентрации внутриклеточного Ca^{2+} . При этом полностью предотвращалась спонтанная агрегация донорских тромбоцитов (табл. 2). В этих условиях полной блокады агрегации тромбоцитов ожоговых больных не происходило. Добавление фибриногена к плазме, обогащенной тромбоцитами ожоговых больных, дозозависимо усиливало агрегацию тромбоцитов даже при наличии ЭДТА. Это подтверждает наличие большого количества активированных тромбоцитов в крови у больных ожоговой болезнью.

Кроме того, исследовали роль тромбина в агрегации тромбоцитов. Добавление к плазме донора гепарина, обладающего высокой антитромбиновой активностью, снижало агрегацию донорских тромбоцитов (табл. 3). Значительно сильнее действовали ингибиторы тромбина на агрегацию тромбоцитов в плазме ожоговых больных.

Полученные данные свидетельствуют о том, что при ожоге важную роль в спонтанной агрегации, индуцированной искусственным сдвиговым потоком, играют именно тромбинемия и гиперфибриногенемия. Для этой агрегации не требуется дополнительная активация тромбоцитов экзогенными индукторами и высокая скорость сдвигового потока.

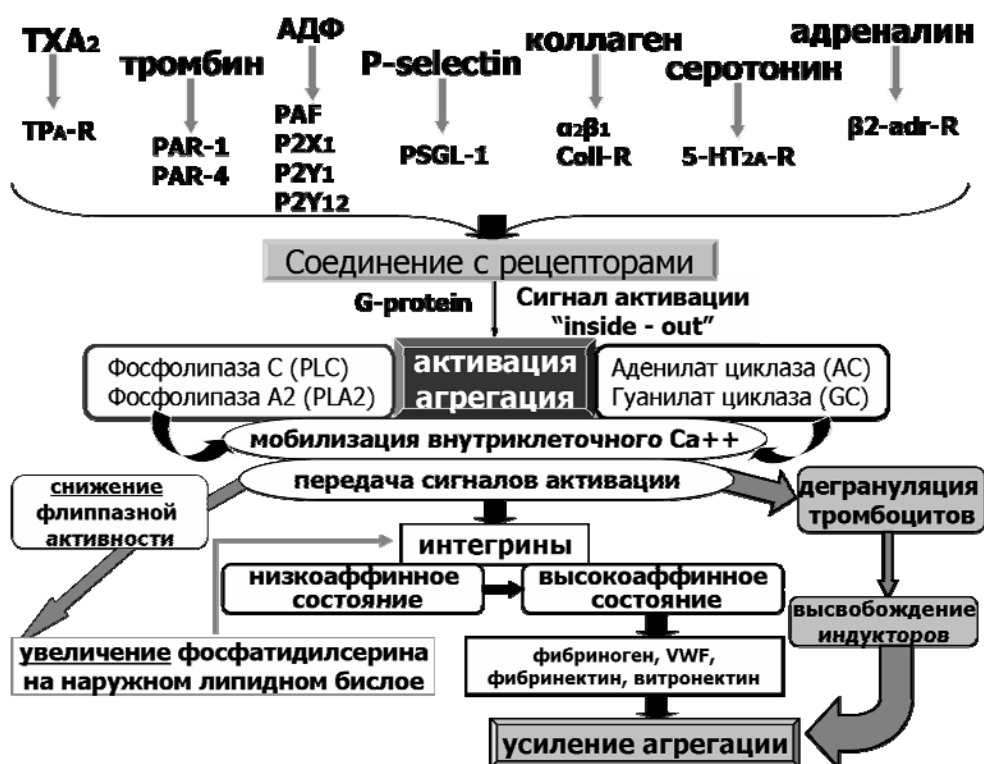


Рис.1. Схема активации и агрегации тромбоцитов

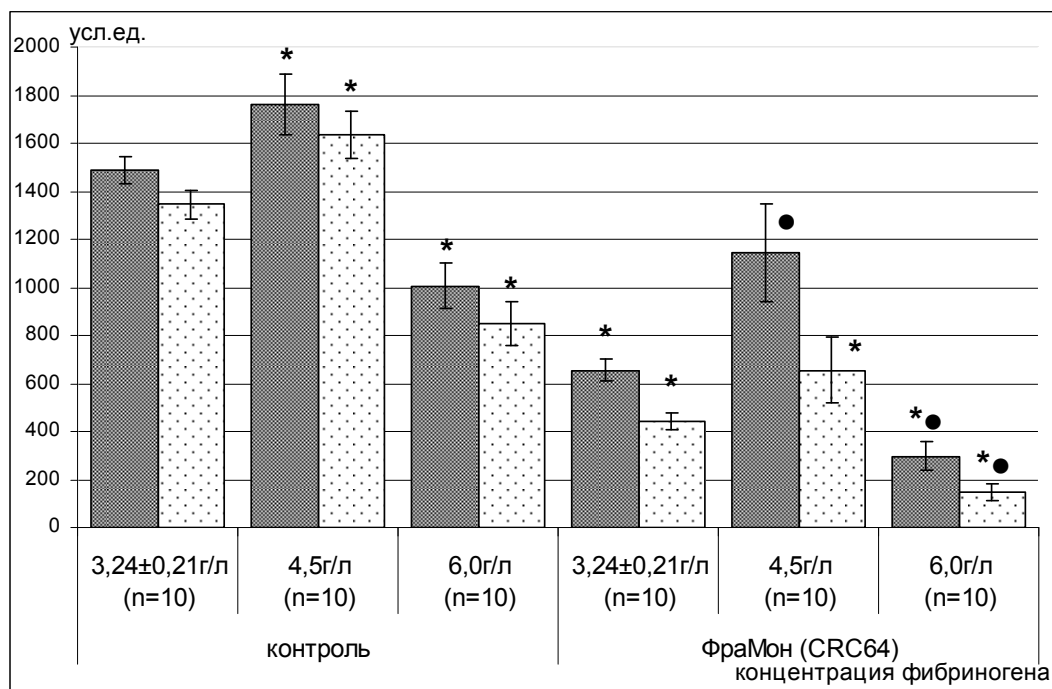


Рис. 2. Изменение спонтанной агрегации тромбоцитов здоровых доноров под влиянием моноклональных антител к GP IIb/IIIa (ФраМон) и фибриногена

■ – степень агрегации;
 □ – скорость агрегации.

Примечание:

* – $p < 0,05$, сравнение с контролем (концентрация фибриногена $3,24 \pm 0,21$ г/л), критерий Вилкоксона;

● – $p < 0,05$, сравнение с показателями агрегации после воздействия ФраМона (концентрация фибриногена $3,24 \pm 0,21$ г/л), критерий Вилкоксона.

Таблица 1

Влияние гиперфибриногенемии на агрегацию тромбоцитов

конц-я фибриногена	2,93 ±0,15 г/л контроль	4,5 г/л	5,0г/л	5,5 г/л	6,0 г/л	6,5 г/л	7,0 г/л	7,5 г/л
показатели агрегации	(n=10)	(n=10)	(n=10)	(n=10)	(n=10)	(n=10)	(n=10)	(n=10)
степень агрегации (усл.ед.)	1206,52 ±71,70	1618,97 ±114,01 *	1318,79 ±49,43 * ●	1016,62 ±92,81 * ●	757,07 ±118,67 * ●	602,08 ±63,32 * ●	402,83 ±66,04 * ●	316,63 ±78,58 * ●
скорость агрегации (усл.ед.)	990,80 ±51,20	1337,00 ±97,87 *	1075,47 ±38,23 * ●	703,28 ±107,57 * ●	561,50 ±107,05 * ●	364,17 ±90,26 * ●	227,85 ±66,08 * ●	170,97 ±60,79 * ●

Примечание: * – $p < 0,05$, сравнение с контролем, критерий Вилкоксона;

● – $p < 0,05$, сравнение с показателями агрегации при концентрации фибриногена 4,5 г/л, критерий Вилкоксона.

Таблица 2

Влияние ЭДТА на агрегацию тромбоцитов в норме и при ожоге

	здоровые доноры		ожог		
концентрация фибриногена (г/л)	2,46±0,29	2,46±0,29	7,11± 0,46	7,11± 0,46	8,11±0,46 г/л
показатели агрегации	контроль (n=10)	ЭДТА (n=10)	контроль (n=10)	ЭДТА (n=10)	ЭДТА+экзогенный фибриноген (n=10)
степень агрегации (усл.ед.)	1032,13 ±40,28	0	1721,48 ±129,70	256,12 ±62,03 *	805,36 ±97,62 * ●
скорость агрегации (усл.ед.)	979,15 ±58,69	0	1491,47 ±153,77	141,64 ±43,20 *	227,67 ±54,31 *

Примечание:

* – $p < 0,05$, сравнение с контролем (ожог), критерий Вилкоксона;

● – $p < 0,05$, сравнение с ЭДТА (ожог), критерий Вилкоксона.

Таблица 3

Влияние гепарина на агрегацию тромбоцитов в норме и при ожоге

показатели агрегации	здоровые доноры		ожог	
	контроль (n=10)	гепарин (n=10)	контроль (n=10)	гепарин (n=10)
степень агрегации (усл.ед.)	1268,52±45,53	1052,45±57,71 *	1962,07±163,38	1353,54±80,22 ●
скорость агрегации (усл.ед.)	1034,14±59,89	952,59±61,88 *	1827,49±178,04	1178,87±109,34 ●

Примечание:

* – $p < 0,05$, сравнение с контролем (здоровые доноры), критерий Вилкоксона;

● – $p < 0,05$, сравнение с контролем (ожог), критерий Вилкоксона.

Библиографический список

1. Будник, И.А., Бриль, Г.Е. Современные представления о сдвиговой регуляции [Текст] / И.А. Будник, Г.Е. Бриль // Усп. совр. биол. – 2009. – Т.129. – №2. – С.198-211.

2. Головина, О.Г. Роль фактора Виллебранда в реакциях гемостаза и тромбоза [Текст] / О.Г. Головина // Ученые записки. – 2004. – Т.11. – №3. – С 37-44.

3. Пат. 2278381 РФ, Устройство для исследования агрегации тромбоцитов [Текст] / Г.Я. Левин, А.П. Модин, С.Ю. Кудрицкий, Л.Н. Соснина (РФ). –

№2005100408/14; заявл. 11.01.05; опубл.20.06.06, Бюл. № 17.

4. Позднякова, Т.М., Белицер, Н.В. Взаимодействие фибриногена с тромбоцитами [Текст] / Т.М. Позднякова, Н.В. Белицер // Усп. совр. биол. – 1990. – Т.110. – Вып. 2(5). – С.267-283.

5. Струкова, С.М. Роль тромбоцитов и сериновых протеаз в сопряжении свертывания крови и воспаления [Текст] / С.М. Струкова // Биохимия. – 2004. – Т.69. – №10. – С.1314-1331.

6. Coughlin, S.R. Thrombin signalling and protease-activated receptors [Текст] / S.R. Coughlin – Nature. – 2000. – Vol. 407. – P.258-264.

7. De Cristofaro, R., Landolfi, R., De Candia, E. et al. Allosteric equilibria in the binding of fibrinogen to platelets [Текст] / R. De Cristofaro et al. – Proc. Natl. Acad. Sci. – 1998. – Vol. 85. – P.8473-8476.

8. Fuster, V., Jang, I.K. Role of platelet-inhibitor agents in coronary artery disease [Текст] / In: Topol E.J. ed. Textbook of interventional cardiology. 2nd ed. Vol.1. Philadelphia: W.B. Saunders, 1994, P.3-22

9. Goto, S., Ikeda, Y., Saldivar, E., Ruggeri, M. Distinct mechanisms of platelet aggregation as a consequence of different shearing flow conditions [Текст] / S. Goto et al. – J. Clin. Invest. – 1998. – Vol. 101. – N. 2. – P.479-486.

10. Henschen, A. On the structure of functional sites in fibrinogen [Текст] / A. Henschen – Thromb. Res. Suppl. – 1983. – Vol.5. – P.27-39.

11. Huang, P.Y., Hellums, J.D. Aggregation and disaggregation kinetics of human blood platelets: Part II. Shear-induced platelet aggregation [Текст] / P.Y. Huang, J.D. Hellums – Biophys.J. – 1993. – Vol.65. – N.1. – P.344-353.

12. Jackson S.P., Nesbitt W.S., Kulkarni S. Signaling events underlying thrombus formation [Текст] / S.P. Jackson et al. – J. Thromb. Haemost. – 2003. – Vol. 1. – P.1602-1612.

13. Kroll, M.H., Harris, T.S., Moake, J.L. et al. von Willebrand factor binding to platelet GpIb initiates signals for platelet activation [Текст] / M.H. Kroll – J Clin Invest. – 1991. – Vol.88. – P.1568-1573.

14. Lefkovits, J., Plow, E.F., Topol, E.J. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors in cardiovascular medicine [Текст] / J. Lefkovits et al. – N. Engl. J. Med. – 1995 – Vol. 332. – N.23. – P.1553-1559.

15. Macfarlane, S.R., Seatter, M.J., Kanke, T. et al. Proteinase-activated receptors [Текст] / S.R. Macfarlane et al. – Pharmacol. Rev. – 2001. – Vol.53. – N.2 – P.245-282.

16. Ruf W., Dorfleutner A., Riewald M. Specificity of coagulation factor signaling [Текст] / W. Ruf et al. – J. Thromb. Haemost. – 2003. – Vol. 1. – N. 7. – P.1495-1503.

17. Ruggeri, Z.M. Plateles in atherothrombosis [Текст] / Z.M. Ruggeri – Nat.Med., 2002. – Vol. 8. – P.1227-1234.

18. Ruggeri, Z.M. Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interaction [Текст] / Z.M. Ruggeri – J. Thromb. Haemost. – 2003. – Vol. 1. – N. 7. – P.1335-1342.

19. Savage B., Ruggeri Z.M. Selective recognition of adhesive sites in surface-bound fibrinogen by GP IIb-IIa on nonactivated platelets [Текст] / B. Savage, Z.M. Ruggeri – J. Bio. Chem. – 1991. – Vol. 266. – P.11227-11233.

20. Savage B., Saldivar E., Ruggeri Z.M. Initiation of platelet adhesion bu arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor [Текст] / B. Savage et al. – Cell. – 1996. – Vol. 84. – P.289-297.

21. Schmid-Schönbein, H., Gosen, J.V., Heinrich, L. Counter-rotating «rheoscope chamber» for the study of the microrheology of blood cell aggregation by microscopic observation and microphotometry [Текст] / H. Schmid-Schönbein et al. – Microvasc. Res. – 1973. – Vol. 6. – P.366-376.

22. Schneider, D.J., Taatjes, D.J., Howard, D.B., Sobel, B.E. Increased reactivity of platelets induced by fibrinogen independent of its binding to the IIb-IIIa surface glycoprotein: a potential contributor to cardiovascular risk [Текст] / D.J. Schneider et al. – J. Am. Coll. Cardiol. – 1999. – N. 33. – P.261-266.

23. Siss, W. Molecular mechanisms of platelet activation [Текст] / W. Siss – Physiological Reviews. – 1989. – Vol. 69. – N. 1. – P.58-178.

24. Zubairov, D.M. Über die Thrombinzirculation in Blut [Текст] / D.M. Zubairov – Folia Haematol. - 1962. – Vol.79. – N. 1. – P. 62-75.