ФИЗИОЛОГИЯ

УДК 612.1

Е. В. Узикова, М. Ю. Милорадов, С. В. Булаева, А. В. Муравьёв, А. В. Замышляев, Л. Г. Зайцев

Молекулярные механизмы агрегации и адгезии эритроцитов

Исследования выполнены при поддержке РФФИ грант №09-04-00436-а.

В настоящем исследовании изучались молекулярные механизмы агрегации и адгезии эритроцитов, проверялась гипотеза о рецепторном механизме объединения эритроцитов в агрегаты на практически здоровых лицах. Были получены данные о том, что препарат антител к рецептору фибриногена IIIb/IIa монафрам (в концентрации 10^{-5}–10^{-6} М) снижал агрегацию в среднем на 25 % и существенно уменьшал степень адгезии клеток.

Ключевые слова: агрегация и адгезия эритроцитов, «мостиковая» модель, рецепторы адгезии, антитела к рецепторам.

E. V. Uzikova, M. Ju. Miloradov, S. V. Bulaeva, A. V. Muravyov, A. V. Zamyshlyaev, L. G. Zaytsev

Molecular Mechanisms of Aggregation and Adhesion of Red Blood Cells (RBCs)

The present study examined the molecular mechanisms of aggregation and adhesion of red blood cells. The hypothesis about the receptor mechanism of association of red blood cells in aggregates in healthy persons is tested. The preparation of antibodies against membrane receptor IIIb / IIa monafram (in concentration of 10^{-5}–10^{-6} M) reduced aggregation to 25 % and significantly decreased the RBCs adhesion degree is reported.

Keywords: aggregation and adhesion of red blood cells, the bridging model, the integrin receptors, antibodies against membrane receptors.

Введение

Механизмы развития агрегации эритроцитов весьма сложны и многообразны и не до конца изучены [6]. Вместе с тем, среди этих механизмов теперь можно выделить те из них, которые имеют ведущее значение. Так, например, в одной из моделей агрегатообразования рассматривают [3] роль электростатических сил и формирование молекулярных мостиков при образовании «монетных» столбиков из эритроцитов («Мостиковая» модель образования агрегатов). Это может проявляться при сближении клеток на расстояние меньше чем 25 нм и быть началом формирования «мостиков» из белковых макромолекул между клетками [1, 2]. Было показано, что даже при высоком гематокрите и, следовательно, при «тесной упаковке» эритроцитов в единице объема не наступает объединения клеток в агрегаты, если не формируются мостики из 3–5 молекул глобулинов или фибриногена [4]. Для подтверждения «мостиковой» модели приводятся данные о том, что на поверхности красных клеток располагается относительно больше фибриногена и глобулинов и меньше альбуминов, чем их соответствующие концентрации в плазме [4, 8]. Эти данные свидетельствуют о том, что альбумины слабо адсорбируются на внешней части мембраны эритроцитов. Было обнаружено, что при гематокрите 45 % и концентрации альбуминов в плазме 45 г/л на поверхности эритроцитов может адсорбироваться только 13 % их общей концентрации. С другой стороны, молекулы фибриногена хотя занимают очень малую площадь поверхности эритроцита (лишь 0,8 мкм^2 общей площади поверхности клетки, равной в среднем 140 мкм^2), однако их степень связи очень высока, и молекулы альбумина не могут в этом конкурировать с ними [5].

Первым этапом объединения клеток в комплексы может быть формирование адгезивных контактов. В связи с этим развитие «мостиковой» модели объединения эритроцитов в агрега-

© Узикова Е. В., Милорадов М. Ю., Булаева С. В., Муравьёв А. В., Замышляев А. В., Зайцев Л. Г., 2011

ты может быть выполнено на платформе рецепторной теории адгезии клеток с участием гликопротеина IIIb/IIa. Последний является интегириновым рецептором, связывающим матриксные белки с RBD-последовательностями и, в частности, фибриноген и фибронектин [7]. Целью данного исследования было изучение адгезии и агрегации эритроцитов при их инкубации с препаратом моноклонных антител к рецептору IIIb/IIa, с ингибитором активности этих рецепторов и ингибитором связывания фибриногена с клеточной мембраной.

Материалы и методы исследования

Цельную кровь (в объеме 20 мл) получали венопункцией у здоровых лиц (n=20) в донорском пункте. В качестве антикоагулянта использовали гепарин (5 МЕ/мл). Эритроциты отделяли от плазмы центрифугированием (15 мин, при 3000 об/мин), и клетки трижды отмывали в изотоническом растворе хлорида натрия, содержавшем глюкозу (5,0 мМ).

Суспензии эритроцитов, приготовленные в изотоническом растворе NaCl (Hct= 40 %), инкубировали с препаратом в течение 15 мин при 37^0C.

Эритроциты инкубировали с: 1) кальцимицином (A23187, 10^{-6} М); 2) ингибитором рецепторов IIIb/IIa тирофибаном (10^{-5}М); 3) фибриноген связывающим пептидом (ФСП, 10^{-6} М); 4) монафрамом (препарат моноклонных антител к рецептору IIIb/IIa, 10^{-6}М) и 5) Интерлейкином-8 (ИЛ-8, 10^{-8}М).

Агрегацию эритроцитов регистрировали методом прямой микроскопии, а степень адгезии эритроцитов определяли методом «смыва» в проточной микрокамере при 8 величинах напряжения сдвига.

Статистическую обработку цифрового материала проводили, используя табличный редактор Microsoft Excel.

Результаты и обсуждение

Известный стимулятор агрегации эритроцитов А23187 способствовал ее приросту на 108 % ($p<0,01$), а величина адгезии эритроцитов превышала таковую у интактных клеток на 18 % ($p<0,05$). Добавления в среду инкубации монафрама привело к снижению агрегации и адгезии эритроцитов на 22 и 28 % соответственно. Важно заметить, что при инкубации эритроцитов с ФСП их агрегация и адгезия умеренно снижались на 10 и 24 % ($p>0,05$).

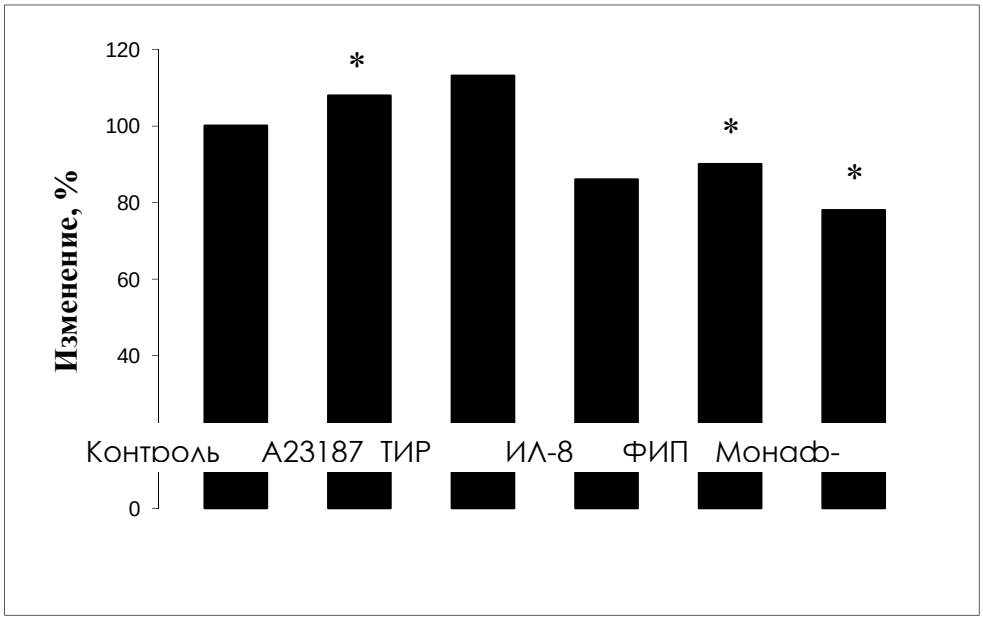

Рис. 1. Изменение показателей агрегации эритроцитов под влиянием адгезивных молекул

Обозначения: *ТИР – тирофибам; ИЛ-8 – интерлейкин-8; ФИП–фибриноген-ингибирующий пептид.* – означает, что различия достоверны по сравнению с контролем при $p<0,05$.*

Ингибитор активности рецепторов IIIb/IIa тирофибан снижал только адгезию эритроцитов на 25 %, тогда как их агрегация достоверно не изменялась. ИЛ-8 не стимулировал агрегацию и

адгезию эритроцитов. Напротив, отмечалось их снижение на 14 и 22 % соответственно, но эти различия с контрольными пробами и не достигли статистически значимых величин.

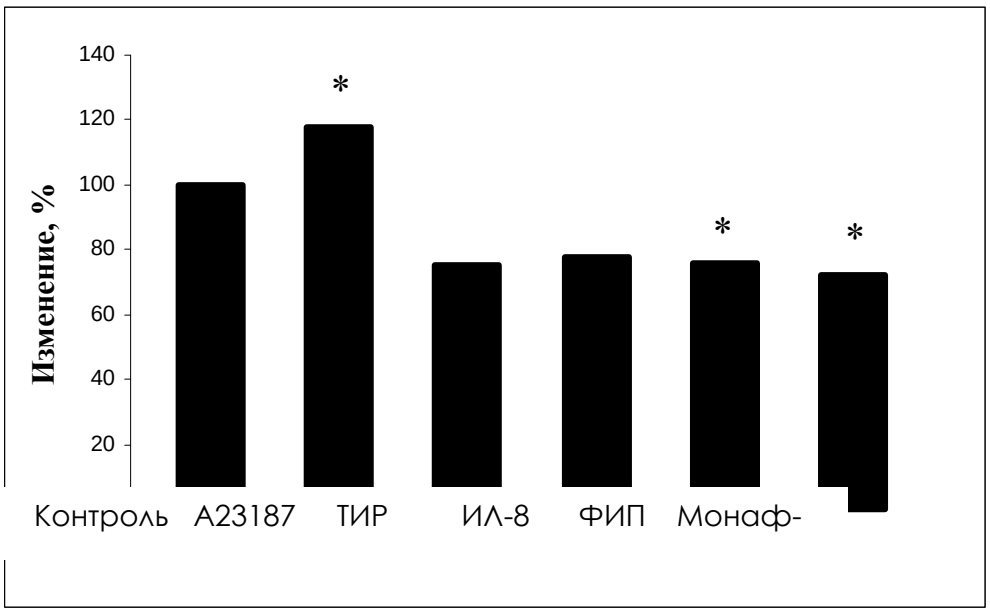

Рис. 2. Изменение адгезивных свойств эритроцитов под влиянием стимуляторов и ингибиторов клеточной активности

Обозначения: *ТИР – тирофибам; ИЛ-8 – интерлейкин-8; ФИП–фибриноген-ингибирующий пептид. * – означает, что различия достоверны по сравнению с контролем при $p<0,05$.*

Таким образом, полученные данные несколько противоречивы и не могут в полной мере подтвердить гипотезу о рецепторном механизме объединения эритроцитов в агрегаты. Требуются дальнейшие исследования этой проблемы.

Библиографический список

1. Bauersachs R. M., Wenby R. B., Meiselman H. J. Determination of specific red cell aggregation indices via an automated system [Текст] // Clin. Hemorheol. – 1989. – Vol. 9. – P. 1–25.

2. Brooks D. Red cell interactions in low flow states [Текст] // Microcirculation. – 1976. – V. 1. – P. 33–52.

3. Chien S., Lung L. Physicochemical basis and clinical implications of red cell aggregation [Текст] // Clin. Hemorheol. – 1987. – Vol. 7. – P. 71–91.

4. London M. The role of blood rheology in regulating blood pressure [Текст] // Clin Hemorheol and Microcirc. – 1997. – Vol. 17. – P. 93–106.

5. Maeda N., Shiga T. Opposite effect of albumin on the erythrocyte aggregation induced by immunoglobulin G and fibrinogen [Текст] // Biochim Biophys Acta. – 1986. – Vol. 13. – № 855. –№ 1. – P. 127–135.

6. Meiselman H.J., Neu B., Rampling M.W., Baskurt O.K. RBC aggregation: laboratory data and models, Indian J Exp Biol. 45 (2007), 9-17.

7. Nierodzik M.L., Klepfish A., Karpatkin S. Role of platelets, thrombin, integrin IIb-IIIa, fibronectin and von Willebrand factor on tumor adhesion in vitro and metastasis in vivo // Thromb Haemost.- 1995.- 74(1).-282-290.

8. Pearson M., Mistry P. S., Ford P. M. Voluntary screening for hepatitis C in a Canadian federal penitentiary for men [Текст] // Can Commun Dis Rep. – 1995. – 30. – № 21(14). – P. 134–136.