

М. Ю. Милорадов, Е. В. Узикова, С. В. Булаева

Взаимодействие клеток крови: феномены и молекулярная сигнализация

Исследование выполнено при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, соглашение 14.В37.21.0214 и при поддержке гранта РФФИ № 12-04-00550-а.

Известно, что кровь состоит из суспензии форменных элементов (эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов) в плазме. Эти клетки крови могут взаимодействовать в потоке, например, выделением сигнальных молекул. Последнее способно приводить к изменению микрореологических свойств клеток. В связи с этим целью данного исследования стало изучение влияния лейкоцитов и тромбоцитов на микрореологические свойства эритроцитов.

Ключевые слова: агрегация эритроцитов, текучесть крови, тромбоциты, адгезия лейкоцитов, деформируемость эритроцитов, микрореологические свойства.

M. Ju. Miloradov, E. V. Uzikova, S. V. Bulaeva

Blood Cell Interaction: Phenomena and Molecular Signaling

Blood is a concentrated suspension of formed elements that includes red blood cells (RBCs), white blood cells (WBCs), and platelets. These cells can interact in a blood flow and their microreological properties can be altered. The aim of this study was to investigate whether WBCs and platelets have an effect upon RBC microreology.

Keywords: RBCs aggregation, blood fluidity, platelets, leukocyte adhesion, RBC deformability, microreological properties.

Введение

Выполнение кровью присущих ей физиологических функций, особенно на уровне микроциркуляции, где диаметр сосудов соизмерим с размерами клеток и непосредственно осуществляется перфузия тканей и транскapиллярный обмен, во многом определяется способностью клеток крови к взаимодействию между собой, друг с другом и с клетками сосудистого эндотелия.

Имеются данные, свидетельствующие о том, что такие реологические параметры, как агрегация эритроцитов, влияют на адгезию лейкоцитов в сосудистом русле [17]. В свою очередь, активированные лейкоциты продуцируют сигнальные молекулы, способные действовать на эритроциты, изменяя их микрореологические свойства, и в том числе агрегацию [14]. Вместе с тем имеются лишь отдельные работы, в которых исследовано взаимодействие эритроцитов и лейкоцитов. В них анализируется влияние отдельных микрореологических изменений одних клеток крови на другие [12, 19, 23], тогда как комплексного исследования влияния лейкоцитов на микрореологические характеристики эритроцитов не проводилось.

Процесс агрегации тромбоцитов и эритроцитов изучается уже достаточно давно. В более ранних экспериментальных работах было показано влияние суспензионной среды и мембранных свойств на межэритроцитарные взаимодействия [1, 6, 8]. Многочисленные исследования ведутся и в отношении агрегации тромбоцитов [2–4]. Однако нами не было найдено исчерпывающей информации о взаимосвязи процессов агрегации эритроцитов и тромбоцитов, хотя в условиях течения *in vivo* эти два процесса происходят в сходных условиях и являются зависимыми от ряда общих факторов.

Целью данного исследования было изучение влияния лейкоцитов и тромбоцитов, а также продуцируемых ими веществ на микрореологические свойства эритроцитов.

Материалы и методы исследования

Исследование проведено на венозной крови практически здоровых мужчин и женщин в возрасте 20–30 лет ($n=64$). Забор крови производился утром натощак из локтевой вены без наложения жгута в условиях клинической лаборатории квалифицированным медицинским персоналом после получения информированного согласия донора. В качестве ан-

тикоагулянта использовали гепарин (10 МЕ/мл). Все измерения и манипуляции с кровью проводились в течение 4 часов после ее забора.

Были организованы 3 серии исследований. В первой серии изучали влияние лейкоцитов, обработанных и не обработанных адреналином на агрегацию эритроцитов с использованием ранее описанных методик [5, 11].

Во второй серии эритроциты инкубировали в изотоническом растворе с одним из важных провоспалительных цитокинов интерлейкином-8 (10 мкг/мл), и одним из ферментов, продуцируемых нейтрофилами, миелопероксидазой (МПО, в концентрациях 10нМ, и 50нМ). Время инкубации составляло 15 мин. С помощью метода оптической микроскопии определяли степень агрегации [10]; деформируемость эритроцитов оценивали путем определения индекса удлинения эритроцитов (ИУЭ) методом проточной микрокамеры.

В третьей серии опытов исследовали влияние тромбоцитов на агрегацию эритроцитов. Обогащенную тромбоцитами плазму (ОБОГ. Т. П.) получали путем центрифугирования антикоагулированной крови в течение 7 мин. при 1000 об/мин. После ее отделения оставшуюся кровь центрифугировали в течение 20 мин. при 3000 об/мин., после чего разделяли обедненную тромбоцитами плазму (ОБЕДН. Т. П.) и эритроцитарную массу [2]. Для активации и индуцированной агрегации тромбоцитов в аликвоты

ОБОГ. Т. П. добавляли адреналин до конечной концентрации 1 мкМ. Образцы плазмы с препаратами оставляли на 10 мин. при комнатной температуре. Суспензию красных клеток крови в изотоническом растворе хлорида натрия при стандартном показателе $Hct=40\%$ инкубировали в течение 15 мин. при температуре 37 °С. Затем эритроциты отделяли от раствора центрифугированием и ресуспендировали в заранее заготовленные образцы аутологичной плазмы с различной концентрацией тромбоцитов при стандартном показателе $Hct=40\%$ и измеряли индексы агрегации эритроцитов с помощью агрегометра MA1 (Mugenne, Германия) [13].

Статистическую обработку полученных цифровых материалов и все виды анализа результатов проводили на РС IBM, используя табличный редактор Microsoft Excel и программу "Statistica" (версия 6.0).

Результаты исследования и их обсуждение

В первой серии исследований путем оптической микроскопии была обнаружена тенденция к снижению ПА и ИИА на 9 и 5 % соответственно в присутствии лейкоцитов по сравнению с контролем (суспензия RBC без лейкоцитов) и достоверное снижение ПА и ИИА на 27 и 25 % соответственно в присутствии лейкоцитов, обработанных адреналином (рис. 1).

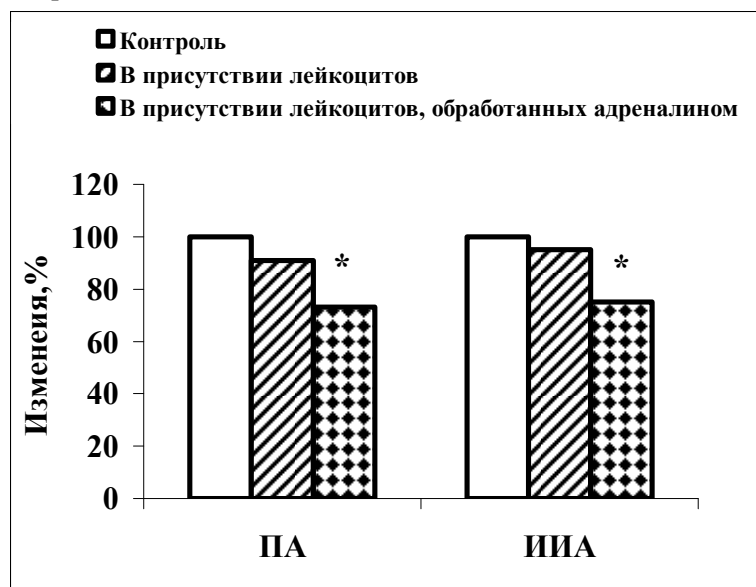


Рис. 1. Изменение ПА и ИИА эритроцитов в присутствии лейкоцитов, обработанных и необработанных адреналином, по сравнению с контролем.

* – различия достоверны при $p < 0,05$ по сравнению с контролем

При измерении агрегации с помощью полуавтоматического агрегометра MA1 получили достоверное ($p < 0,01$) снижение степени агрегации

(СА) эритроцитов (в присутствии лейкоцитов, не обработанных адреналином) и эритроцитов (в присутствии лейкоцитов, обработанных адрена-

лином), подвергнувшись вращению с низкой скоростью сдвига (3 c^{-1}) в интервале времени 10 с (M_{10}), на 16 и 21 % соответственно. При измерении степени агрегации эритроцитов (в присутствии лейкоцитов, не обработанных адреналином) и эритроцитов (в присутствии лейкоцитов,

обработанных адреналином), подвергнувшись вращению с низкой скоростью сдвига (3 c^{-1}) в интервале времени 5 с (M_5), отмечено достоверное снижение агрегации на 17 и 21 % соответственно (рис. 2).

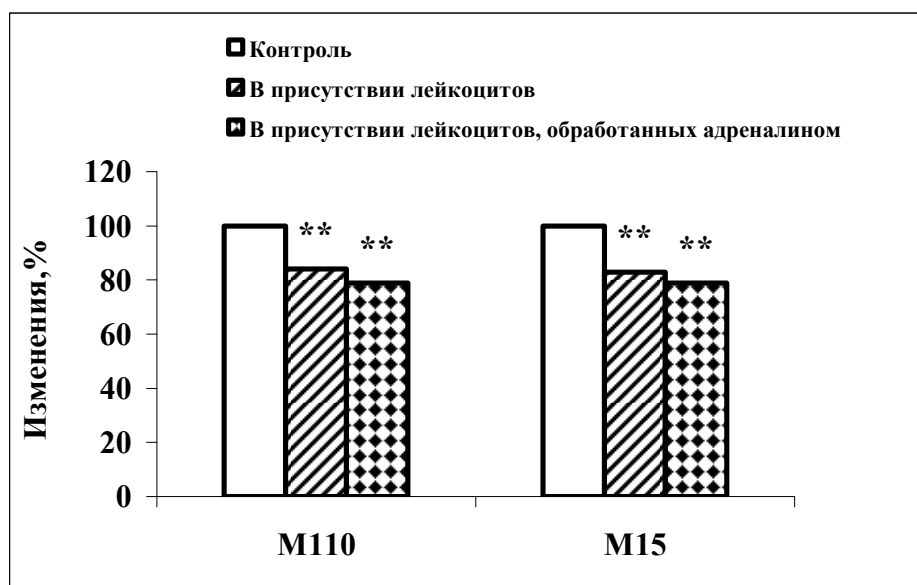


Рис. 2. Изменение СА эритроцитов (в присутствии лейкоцитов, обработанных и необработанных адреналином), подвергнувшихся вращению с низкой скоростью сдвига в течение 10 и 5 с, по сравнению с контролем
** – различия достоверны при $p < 0,01$ по сравнению с контролем.

При измерении агрегации с помощью полуавтоматического агрегометра МА1 получили достоверное снижение СА эритроцитов (в присутствии лейкоцитов, не обработанных адреналином) и эритроцитов (в присутствии лейкоцитов, обработанных адреналином), подвергнувшись вращению с высокой скоростью сдвига (600 c^{-1}) в интервале времени 10 с (M_{10}), на 14 и 22 % соответственно. При измерении СА эритроцитов (в присутствии лейкоцитов, не обработанных адреналином) и эритроцитов (в присутствии лейкоцитов, обработанных адреналином), подвергнувшись вращению с высокой скоростью сдвига (600 c^{-1}) в интервале времени 5 с (M_5), отмечено снижение агрегации на 11 и 20 % соответственно (рис. 3).

Таким образом, присутствие лейкоцитов в суспензии эритроцитов сочетается с достоверным снижением их агрегации, что подтверждается измерением этой микрореологической характеристики двумя разными методами. Поскольку при регистрации агрегации прибором МА1 соотношение лейкоцитов и эритроцитов было примерно как 1:1000, вряд ли лейкоциты влияли на микрореологическое поведение эритроцитов ме-

ханическим способом. Вполне вероятно, что лейкоциты продуцируют какие-то сигнальные молекулы, которые действуют на эритроциты и выражено снижают их агрегацию. Для понимания механизмов этого явления была проведена вторая серия исследований.

Активированные лейкоциты выделяют провоспалительные цитокины. Под их воздействием происходит стимулирование функций клеток эндотелия и лейкоцитов. Интерлейкин-8, являясь основным хемотактическим фактором полиморфноядерных нейтрофильных гранулоцитов, играет ведущую роль в их привлечении в очаг воспаления *in vivo*. Его роль в хемотаксисе нейтрофилов иллюстрируется тем, что инъекция ИЛ-8 вызывает сильную воспалительную реакцию, сопровождающуюся массивной лейкоцитарной инфильтрацией.

При инкубации эритроцитов с интерлейкином-8 прослеживалась тенденция к снижению ПА и ИИА на 10 и 7 % соответственно, и практически не наблюдалось изменение деформируемости (рис. 4).

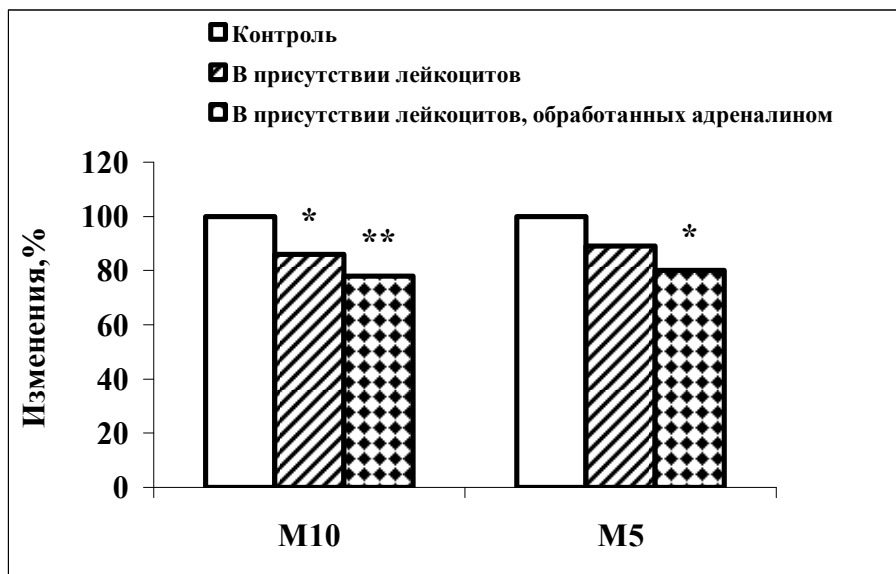


Рис. 3. Изменение СА эритроцитов (в присутствии лейкоцитов, обработанных и не обработанных адреналином), подвергнувшихся вращению с высокой скоростью сдвига в течение 10 и 5 с по сравнению с контролем

* – различия достоверны при $p < 0,05$ по сравнению с контролем; ** – различия достоверны при $p < 0,01$ по сравнению с контролем.

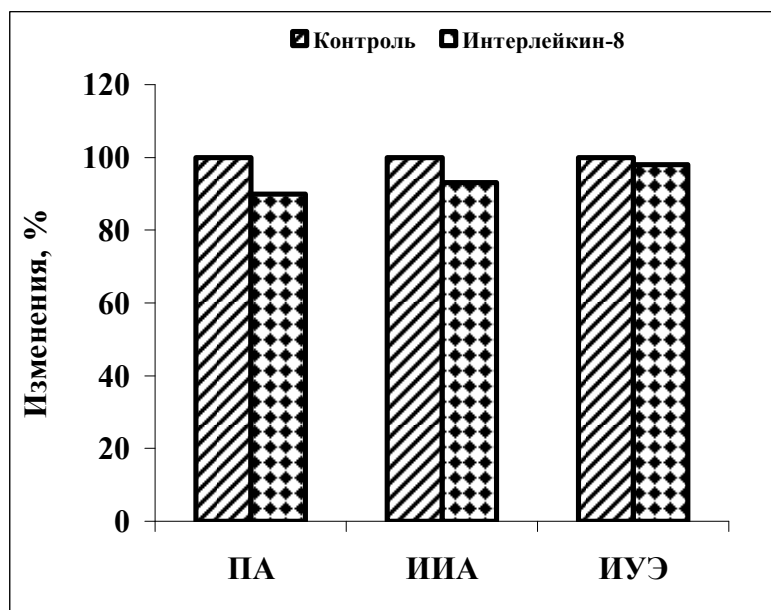


Рис. 4. Изменение ПА, ИИА и ИУЭ эритроцитов в присутствии интерлейкина-8 по сравнению с контролем

Миелопероксидаза (МПО) – железосодержащий фермент, который находится в азурофильных гранулах нейтрофилов.

Было установлено, что МПО в концентрации 10 нМ способствовала достоверному снижению ПА и ИИА эритроцитов на 33 и 39 % соответственно и достоверному снижению деформируемости эритроцитов на 15 % (рис. 5).

В концентрации 50 нМ МПО привела к достоверному снижению ПА и ИИА на 49 и 50 % соответственно и достоверному снижению ИУЭ на 8 % (рис 6).

Согласно литературным данным измененные механические свойства эритроцитов, такие как мембранная жесткость, цитоплазматическая вязкость, снижают скорость и степень агрегации клеток [15, 18, 20, 21].

Нельзя исключить, что МПО проявляет свою ферментативную активность и продуцирует НОС1, которая может инициировать перекисное окисление липидов. Но, помимо этого, НОС1 может и по молекулярным механизмам (без образования свободных радикалов) модифицировать белки, липиды и другие биомолекулы.

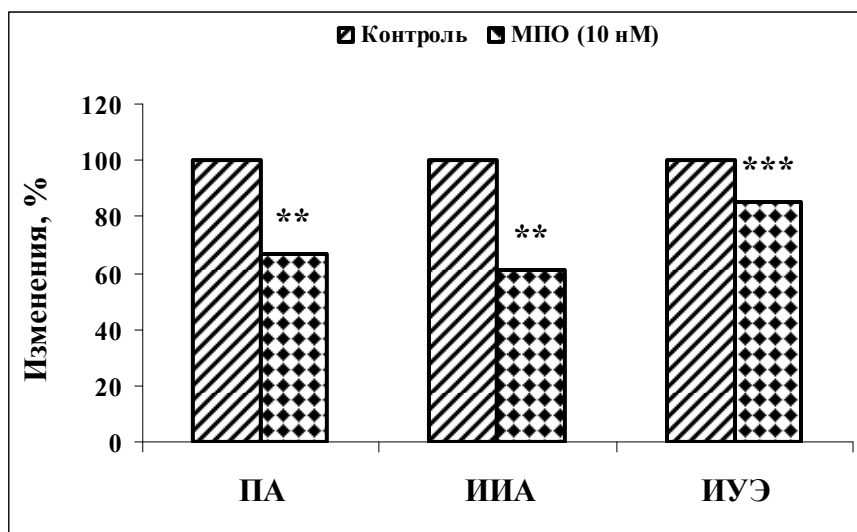


Рис. 5. Изменение ПА, ИИА и ИУЭ эритроцитов в присутствии МПО (10 нМ) по сравнению с контролем
 ** – различия достоверны при $p < 0,01$ по сравнению с контролем; *** – различия достоверны при $p < 0,001$ по сравнению с контролем.

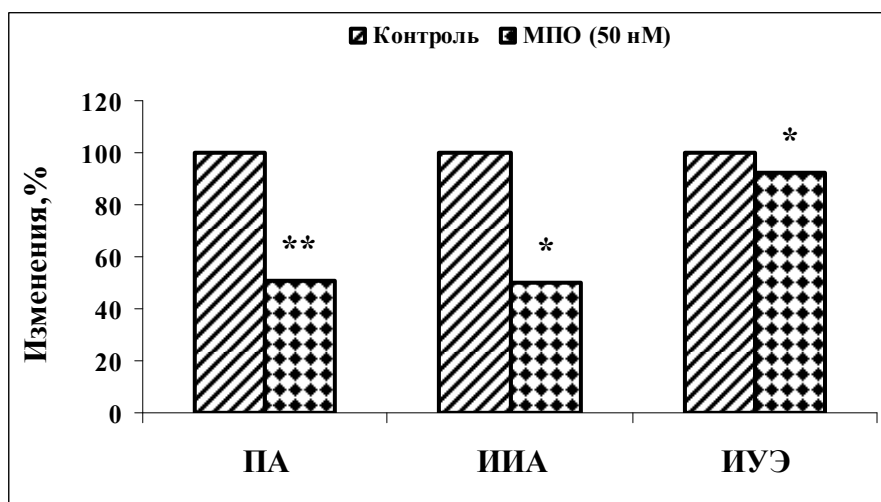


Рис. 6. Изменение ПА, ИИА и ИУЭ эритроцитов в присутствии МПО (50 нМ) по сравнению с контролем
 * – различия достоверны при $p < 0,05$ по сравнению с контролем; ** – различия достоверны при $p < 0,01$ по сравнению с контролем.

Возможен и другой, не имеющий отношения к ферментативной активности механизм. МПО как поликатионный белок может связываться с поверхностью клетки и изменять свойства ее плазматической мембраны.

При исследовании влияния тромбоцитов на проагрегантные свойства эритроцитов агрегацию последних измеряли в разных сдвиговых условиях.

В результате исследования выяснили, что в отсутствие сдвигового течения индексы агрегации эритроцитов (M_5 и M_{10}), суспендированных в ОБОГ. Т. П., были на 16 % ($p > 0,01$) и на 18 % ($p > 0,01$) меньше соответствующих индексов, полученных в ОБЕДН. Т. П. Еще более выраженное снижение агрегации эритроцитов было в ОБОГ. Т. П. с добавлением адреналина, где оно составило 24 % ($p > 0,01$) и 22 % ($p > 0,01$) соответ-

ственно (рис. 7). Подобные изменения агрегации красных клеток крови наблюдались и в условиях низкосдвигового течения, когда оно способствовало сближению и взаимодействию клеток. Индексы агрегации эритроцитов (M_{15} и M_{10}) снижались на 15 % и 14 % в ОБОГ. Т. П. и на 24 % и 25 % в ОБОГ. Т. П. с добавлением адреналина в сравнении с соответствующими индексами, измеренными в ОБЕДН. Т. П. (рис.7).

Таким образом, результаты исследования показывают, что тромбоциты влияют на проагрегантные свойства эритроцитов. Присутствие тромбоцитов в суспензионной среде существенно снижало агрегацию красных клеток крови. Следует отметить, что тромбоциты, подвергшиеся влиянию адреналина, еще сильнее проявляли эти свойства.

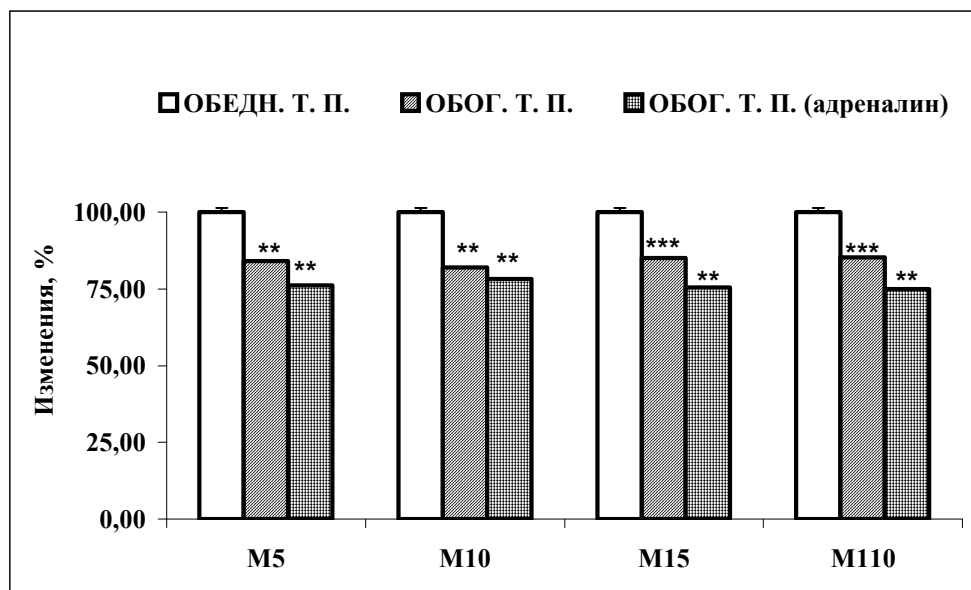


Рис. 7. Индексы агрегации эритроцитов в ОБЕДН. Т. П. и ОБОГ. Т. П., измеренные в разных сдвиговых условиях и временных интервалах

** – различия достоверны по сравнению с индексом агрегации в ОБЕДН. Т. П. при $p < 0,01$; *** – различия достоверны по сравнению с индексом агрегации в ОБЕДН. Т. П. при $p < 0,001$.

Адреналин вызывает агрегацию тромбоцитов без изменения дисковидной формы, взаимодействуя с α -адренорецепторами плазматической мембраны. Известно, что агрегация тромбоцитов, стимулированная адреналином, обусловлена активацией α_2 -адренорецепторов [7, 9]. При их активации происходит ингибирование аденилатциклазы, при этом предполагается, что механизм действия адреналина связан с модуляцией мембран и изменением их проницаемости к ионам Ca^{2+} [16]. Вход Ca^{2+} в тромбоциты при их активации может сопровождаться снижением уровня свободного экстрацеллюлярного кальция в плазме, что, в свою очередь, способно быть причиной снижения агрегации эритроцитов. Тот же самый процесс может происходить и при спонтанной агрегации тромбоцитов в ОБОГ. Т. П., но менее интенсивно. С другой стороны, воздействие тромбоцитов может быть опосредовано рядом активных веществ, выделяющихся при их активации: простагландинов, простациклинов, тромбоксанов, гистамина, серотонина и т. д. [22].

Адреналин вызывает агрегацию тромбоцитов без изменения дисковидной формы, взаимодействуя с α -адренорецепторами плазматической мембраны. Известно, что агрегация тромбоцитов, стимулированная адреналином, обусловлена активацией α_2 -адренорецепторов [7, 9]. При их активации происходит ингибирование аденилатциклазы, при этом предполагается, что механизм действия адреналина связан с модуляцией мембран и изменением их проницаемости к ионам Ca^{2+} [16]. Вход Ca^{2+} в тромбоциты при их активации может сопровождаться снижением уровня свободного экстрацеллюлярного кальция в плазме, что, в свою очередь, способно быть причиной снижения агрегации эритроцитов. Тот же самый процесс может происходить и при спонтанной агрегации тромбоцитов в ОБОГ. Т. П., но менее интенсивно. С другой стороны, воздействие тромбоцитов может быть опосредовано рядом активных веществ, выделяющихся при их активации: простагландинов, простациклинов, тромбоксанов, гистамина, серотонина и т. д. [22].

Библиографический список

1. Блохина, Т. А. Роль плазменных факторов в регуляции реологических свойств эритроцитов человека [Текст] / Т. А. Блохина, С. Б. Назаров, В. В. Чемоданов // Мат. международн. конф. по гемореологии. – Ярославль, 2001. – С. 60–61.
2. Егорихина, М. Н. Роль фибриногена в агрегации клеток крови при ожоговой болезни [Текст] / М. Н. Егорихина // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2009. – № 3. – С. 67–75.
3. Кузник, Б. И. Клеточные и молекулярные механизмы регуляции системы гемостаза в норме и при патологии [Текст]: монография / Б. И. Кузник. – Чита: Экспресс-издательство, 2010. – 832 с.
4. Левин, Г. Я. Нарушения гемостаза и ДВС-синдром в острый период ожоговой болезни [Текст] / Г. Я. Левин // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2004. – № 4. – С. 55–62.
5. Михайлов, П. В. Влияние макро- и микрореологических параметров крови на адгезию лейкоцитов [Текст]: автореф. дисс. ... канд. биол. наук / П. В. Михайлов. – Ярославль, 2004. – 22 с.
6. Муравьев, А. В. Анализ влияния плазменных и клеточных факторов на агрегацию эритроцитов разных возрастных популяций [Текст] / А. В. Муравьев, И. А. Тихомирова, Д. В. Борисов // Физиология человека. – 2002. – Т. 28, № 4. – С. 144–148.
7. Орлов, С. Н., Новиков, К. Н. Регуляция объема клеток: механизмы, сопряженные клеточные реакции и патофизиологическое значение [Текст] / С. Н. Орлов, К. Н. Новиков // Росс. физиол. журнал им. И. М. Сеченова. – 1996. – Т. 82, № 8–9. – С. 1–15.
8. Тихомирова, И. А. Роль экстрацеллюлярных, мембранных и внутриклеточных факторов в процессе агрегации эритроцитов [Текст]: автореф. ... докт. биол. наук / И. А. Тихомирова. – Ярославль, 2006. – 48 с.
9. Ткачук, В. А. Гормональная регуляция транспорта Ca^{2+} в клетках крови и сосудов [Текст] /

- В. А. Ткачук // Рос. физиол. журнал им. И. М. Сеченова. – 1998. – Т. 84, № 10. – С. 1006–1018.
10. Узикова, Е. В. Молекулярные механизмы агрегации и адгезии эритроцитов [Текст] / Е. В. Узикова [и др.] // Ярославский педагогический вестник. – 2011. – Т. 3, № 4. – С. 105–107.
11. Узикова, Е. В. Взаимодействие клеток крови: влияние присутствия лейкоцитов в суспензионной среде на агрегацию эритроцитов [Текст] / Е. В. Узикова [и др.] // Тезисы докладов 5-й Всероссийской с международным участием школы-конференции по физиологии кровообращения. – М., 2012. – С. 125–126.
12. Bagge U., Branemark P.-I. White blood cell rheology. An intravital study in man // *Adv. Microcirculation*. – 1997. – Vol. 7. – P. 1–17.
13. Baskurt O. K., Farley R. A., Meiselman H. J. Erythrocyte aggregation tendency and cellular properties in horse, human, and rat: a comparative study // *Amer. J. Physiol.* – 1997. – Vol. 273. – P. H2604–H2612.
14. Baskurt O. K., Meiselman H. J. Cellular determinations of low-shear blood viscosity // *Biorheology*. – 1997. – Vol. 34. – №. – 3. – P. 235–247.
15. Bradley A. J., Murad K. L., Regan K. L., Scott M. D. Biophysical consequences of linker chemistry and polymer size on stealth erythrocytes: size does matter [Текст] // *Biochim. Biophys. Acta – Biomembranes*. – 2002. – Vol. 1561. – № 2. – P. 147–158.
16. Clerck F., Xhonneux B., Wiele R. Biochemical mechanisms in 5-hydroxytryptamine-induced human platelet aggregation // *Agents Action*. – 1985. – Vol. 17, №2. – P. 220–228.
17. Johnson P., Cabel M., Popel A. Venous resistance and red cell aggregation // *Abstr. Microcirculatory Soc. 41st Annu. Conf.-Anaheim, California*. – 1994. – P. 82–83.
18. Meiselman H. J. Red-blood-cell role in RBC aggregation [Текст] // *Clin Hemorheol*. – 1993. – № 13. – P. 575–592.
19. Munn L. L., Melder R. J., Jain R. K. The role of erythrocytes in leukocyte-endothelial interactions // *Biorheology*. – 1995. – Vol. 32. – №2–3. – p. 142.
20. Nash G. B., Wenby R. B., Sowemimo-Coker S. O., Meiselman H. J. Influence of cellular properties on red cell aggregation // *Clin. Hemorheol*. – 1987. – № 7. – P. 93–108.
21. Sowemimo-Coker S. O., Whittingstall P., Pietsch L. et al. Effects of cellular factors on the aggregation behavior of human, rat and bovine erythrocytes // *Clin. Hemorheol. Microcirc.* – 1989. – № 9. – P. 723–737.
22. Stoltz J.-F., Donner M. Hemorheology: importance of erythrocyte aggregation // *Clin. Hemorheol*. – 1987. – № 7. – P. 15–23.
23. Wautier M.-P., Boulanger E., Wautier J.-L. Erythrocytes from diabetic patients adhere to endothelium and potentiate leukocyte adhesion molecule expression // *Materials of 11th International Congress of Biorheology and 4th International Conference on Clinical Hemorheology*. – Antalya. – Turkey. – September 22–26, 2002. – P. 85.