

Е. Г. Сухарева, М. Н. Егорихина, Г. Я. Левин

Влияние микровезикул эритроцитов на спонтанную агрегацию тромбоцитов

Изучалось влияние эритроцитарных микровезикул, выделенных после 24- и 48-часовой инкубации эритроцитов здоровых доноров, на спонтанную (поток-индуцированную) агрегацию тромбоцитов и конечный этап свертывания крови. Установлено, что микровезикулы эритроцитов снижали спонтанную агрегацию тромбоцитов и замедляли тромбиновое время плазмы крови. Рассматриваются возможные механизмы антиагрегационного и антикоагуляционного действия эритроцитарных микровезикул.

Ключевые слова: агрегация тромбоцитов, микровезикулы эритроцитов, гемостаз.

E. G. Sukhareva, M. N. Egorikhina, G. Ya. Levin

Effect of Erythrocyte Microvesicles on Spontaneous Aggregation of Platelets

The effect of red blood cell microvesicles isolated after 24 and 48 h incubation of red blood cells from healthy donors on the spontaneous (stress-induced) platelet aggregation and the final stage of blood coagulation were studied. It was found out that microvesicles of erythrocytes decreased spontaneous aggregation of platelets and slowed down thrombin time of blood plasma. Possible mechanisms of the antiaggregation and anticoagulation effect of erythrocyte microvesicles was investigated.

Keywords: aggregation of platelets, microvesicles of erythrocytes, haemostasis.

К настоящему времени появилось значительное количество работ, посвященных исследованию клеточных микровезикул (МВ). Достаточно долго считалось, что МВ представляют собой побочные продукты жизнедеятельности клеток и не имеют функциональной активности. По мере накопления знаний стало понятно, что МВ являются неотъемлемой частью межклеточной коммуникации организма [16]. Они участвуют в регуляции воспалительного процесса, клеточной пролиферации, апоптоза, сосудистых реакций и ряда других жизненно важных процессов [8, 12]. Исследуется роль МВ, происходящих из форменных элементов крови и эндотелия, в регуляции системы гемостаза [2, 11, с. 343–352]. Однако в большинстве этих работ рассматривается участие МВ в так называемом плазменном звене гемостатического комплекса. Имеются немногочисленные исследования, в которых описывается участие тромбоцитарных МВ в процессе агрегации самих тромбоцитов. Такое внимание именно к тромбоцитарным МВ связано с сохранением на их мембране рецепторов, в частности GPIIb/IIIa и GP Ib [6], которые в значительной степени и определяют возможность развития агрегационного процесса между тромбоцитами.

В то же время остается неясным, какое влияние оказывают на агрегацию тромбоцитов МВ

эритроцитов. Последние являются преобладающим типом клеток и составляют до 98 % клеточного объема крови.

Материалы и методы

Исследование проведено на 15 образцах крови здоровых доноров, стабилизированной 3,8 % раствором цитрата натрия в соотношении 1:9. Обогащенную тромбоцитами плазму получали путем центрифугирования цитратной крови в течение 7 мин. при 1000 об/мин. После ее отделения оставшуюся кровь центрифугировали в течение 20 мин. при 3000 об/мин., отбирали бес тромбоцитарную плазму, удаляли лейкоцитарно-тромбоцитарную пленку и выделяли эритроцитарную массу. Последнюю трижды отмывали, а затем ресуспензировали в физиологическом растворе в соотношении 1:2 и инкубировали при 37°C в течение 24 и 48 часов. В процессе хранения эритроцитов происходит образование микровезикул [12]. После инкубации эритроциты осаждали центрифугированием в течение 20 мин. при 3000 об/мин. Затем, согласно методике [10], оставшуюся суспензию МВ освобождали от клеточного дебриса путем центрифугирования в течение 20 мин. при 5000 об/мин. Изучали влияние эритроцитарных МВ на процесс спонтанной аг-

регации тромбоцитов, а также на тромбиновое время бестромбоцитарной аутоплазмы.

Спонтанную (поток-индуцированную) агрегацию тромбоцитов исследовали на приборе собственной конструкции [3], в котором использован принцип, предложенный Н. Schmid-Schönbein et al. [20]. В данном приборе клетки крови помещают 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. Оценка процесса спонтанной агрегации тромбоцитов проводилась по следующим показателям:

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

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

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

Тромбиновое время исследовали 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 обсуждение

Как показали проведенные исследования, МВ, выделенные после 24-часовой инкубации эритроцитов, в значительной степени угнетали спонтанную агрегацию тромбоцитов. Под действием МВ скорость агрегации снизилась на 39 %, а степень – на 27 % (табл. 1).

Таблица 1

Изменение спонтанной агрегации тромбоцитов под действием эритроцитарных микровезикул

Инкубация	Показатели агрегации	Контроль	МВ эритроцитов
24 часа	M_a (усл. ед.)	1045,22±101,11	765,58±76,43*
	A_{180} (усл. ед.)	854,99±114,26	520,93±71,60*
48 часов	M_a (усл. ед.)	1234,39±113,97	1081,10±101,23*
	A_{180} (усл. ед.)	898,59±117,07	606,84±71,30*

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

Такое же действие на спонтанную агрегацию тромбоцитов было выявлено и при исследовании влияния МВ, высвобождаемых эритроцитами после 48-часовой инкубации, – скорость агрегации снижалась на 32 %. Однако уменьшение степени агрегации под их действием было менее выражено по сравнению с влиянием МВ, выделенных после 24-часовой инкубации эритроцитов (табл. 1).

Процесс агрегации тромбоцитов связан с достаточно сложными молекулярными взаимодействиями, которые развиваются в ходе реакции активации после стимуляции тромбоцитов растворимыми агонистами [5, 14, 21]. Безусловно, механизм агрегационного процесса в значительной степени определяется возможностью развития доступности мест связи в интегральных рецепторах адгезивных молекул, таких как GPIIb/IIIa, и образованием фибриногеновых мостиков между ними. В то же время активация тромбоцитов, в результате которой гликопротеино-

вые (GP) рецепторы приобретают способность связываться со своими лигандами, осуществляется после связывания растворимых агонистов агрегации (АДФ, тромбина, серотонина и др.) со своими рецепторами и последующей передачи сигнала к GP рецепторам.

Известно, что в крови здоровых людей постоянно присутствует небольшое количество тромбина [24], который даже в наномолярных концентрациях способен активировать тромбоциты, взаимодействуя с рецепторами семейства PAR [5]. Вследствие активации PAR рецепторов происходит активация фосфолипазы C и последующая реализация полифосфоинозитидного пути активации тромбоцитов, что в конечном итоге приводит к их агрегации. Помимо рассмотренного механизма, тромбин может увеличивать возможность участия тромбоцитов в процессах агрегации и гемокоагуляции также путем повышения экспрессии на их поверхности

рецепторов TP_A-R , обладающих высоким сродством к тромбоксану A_2 и простагландину H_2 [17]. Ранее нами было установлено, что гепарин, обладающий высокой антитромбиновой активностью, снижает спонтанную агрегацию тромбоцитов у здоровых доноров практически на 18 %, а при патологии – более чем на 30 % [1].

Тромбин представляет собой трипсиноподобную сериновую протеиназу с уникальными свойствами. Молекула тромбина, наряду с классическим активным центром, имеет дополнительный центр связывания – узнавания субстратов и рецепторов, содержащих аминокислотную последовательность Arg-Gly-Asp. Благодаря наличию в молекуле тромбина двух субсайтов – анионсвязывающий экзосайт 2, называемый участком связывания гепарина, и анионсвязывающий экзосайт 1, называемый также участком узнавания фибриногена, тромбин способен связываться с отрицательно заряженными клеточными мембранами [6, 13, 22]. Показано также, что отрицательно заряженные лиганды (азид натрия, аденозин-5'-трифосфат, декстрансульфат) ингибируют свертывающую активность тромбина, взаимодействуя с его анионсвязывающими экзосайтами [7].

Известно, что образование МВ 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 сильный отрицательный заряд [25]. Можно полагать, что снижение спонтанной агрегации тромбоцитов под действием эритроцитарных МВ обусловлено тем, что имеющиеся на их мембранах фосфатидилсериновые кластеры, несущие отрицательный заряд, представляют поверхность для связывания с анионсвязывающими экзосайтами молекулы тромбина. При этом тромбин может терять способность активировать тромбоциты че-

рез PAR рецепторы. В пользу этой гипотезы свидетельствует значительное угнетение именно начального этапа агрегации, характеризуемого показателем скорости (A_{180}), а не конечного – степени агрегации (Ma) под действием эритроцитарных МВ (табл. 1). Именно на этом этапе важную роль играет активирующее действие тромбина на агрегацию тромбоцитов. Потеря тромбином способности активировать тромбоциты при его взаимодействии с МВ эритроцитов может быть вызвана двумя факторами: во-первых, анионсвязывающие экзосайты тромбина, связываясь с отрицательно заряженными мембранами МВ эритроцитов, уже не имеют возможности взаимодействовать с PAR рецепторами тромбоцитов; во-вторых, анионсвязывающие экзосайты молекулы тромбина рассматриваются некоторыми исследователями как аллостерические центры, изменяющие свойства тромбина при его связывании с определенными эффекторами [4]. Таким образом, возможно, что взаимодействие хотя бы одного из анионсвязывающих экзосайтов тромбина с ФС кластерами МВ эритроцитов приводит к инактивации всей молекулы тромбина как агониста тромбоцитарной агрегации.

Под действием МВ, выделенных после 48-часовой инкубации эритроцитов, наблюдалось менее выраженное угнетение спонтанной агрегации тромбоцитов, чем под влиянием МВ после 24-часовой инкубации. Объяснением полученных результатов могут служить данные, согласно которым при хранении в условиях банка крови, количество ФС, содержащегося на поверхности МВ, с течением времени уменьшается [9]. Авторы делают вывод, что это может быть связано как со старением самих МВ, так и со старением эритроцитов, продуцирующих МВ.

Для уточнения возможности наличия антитромбинового эффекта МВ эритроцитов мы исследовали их влияние на конечный этап свертывания крови. Установлено, что они замедляли тромбиновое время плазмы крови на 10–13 % (табл. 2).

Таблица 2

Влияние эритроцитарных микровезикул на конечный этап свертывания плазмы крови

Инкубация	Тромбиновое время (сек.)	
	Контроль	МВ эритроцитов
24 часа	13,56 ± 0,39	14,90 ± 0,31*
48 часов	15,58 ± 0,88	17,62 ± 0,82*

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

Известны исследования, в которых показано, что МВ, выделенные из цельной крови, а также тромбоцитарные МВ обладают антикоагулянтной активностью [2, с. 343–352, 23]. Авторы полагают, что механизм противосвертывающей активности МВ связан с активацией протеина С, имеющего высокое сродство к отрицательно заряженным фосфолипидам, которая происходит после его взаимодействия с рецептором эндотелиальных клеток тромбомодулином. Реализация подобного механизма в бестромбоцитарной плазме под действием МВ, выделенных из отмытых эритроцитов, практически исключена. Таким образом, увеличение времени коагуляции в данном случае может быть связано либо с замедлением процесса полимеризации фибрин-мономеров под действием микровезикул, либо с инактивацией тромбина.

С целью выявления возможности действия МВ на процесс полимеризации фибрин-мономеров было проведено исследование влияния МВ эритроцитов на время полимеризации фибрин-мономеров с использованием метода стандартизованного определения времени самосборки фибрин-мономера в плазме крови («Тех-

Полимер-тест», Технология-стандарт, Россия). По предварительным данным статистически значимой разницы между контролем (плазма без МВ) и опытом (плазма с эритроцитарными МВ) не выявлено (неопубликованные данные). Это подтверждает выдвинутую гипотезу о том, что замедление конечного этапа коагуляции под действием эритроцитарных МВ, по-видимому, связано с инактивацией под их влиянием тромбина.

Обобщая полученные результаты, можно заключить, что МВ эритроцитов могут проявлять как антиагрегационное, так и антикоагулянтное действие, механизм которого, вероятнее всего, реализуется путем инактивации тромбина при его взаимодействии с отрицательно заряженными мембранами МВ эритроцитов. Учитывая сведения о том, что количество эритроцитарных микровезикул в крови может резко увеличиваться при многих патологических состояниях, сопровождающихся нарушениями гемостаза и тромботическими осложнениями [24–26] можно полагать, что образование МВ является одним из дополнительных механизмов поддержания и регулирования гемостаза, причем как в норме, так и при патологии.

Библиографический список

1. Егорихина, М. Н., Левин, Г. Я. Фибриноген и агрегация тромбоцитов (на модели термической травмы) [Текст] / М. Н. Егорихина, Г. Я. Левин. – Ярославский педагогический вестник. Естественные науки. – 2010. – Т. 3, № 4. – С. 61–66.
2. Зубаиров, Д. М. Молекулярные основы свертывания крови и тромбообразования [Текст] / Д. М. Зубаиров. – Казань : Фэн. – 2000. – 364 с.
3. Пат. 2278381 РФ, Устройство для исследования агрегации тромбоцитов [Текст] / 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.
4. Струкова, С. М. Механизмы взаимодействия тромбина с клетками. Взаимодействие тромбина с клетками эндотелия, тучными и другими [Текст] / С. М. Струкова, Е. Г. Киреева, Т. Н. Дугина // Вестник МГУ. Биология. – 1997. – № 1. – С. 8–13.
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. Струкова, С. М. Тромбин – регулятор процессов воспаления и репарации тканей [Текст] / С. М. Струкова // Биохимия. – 2001. – Т. 66. – Вып. 1. – С. 14–27.
7. Швачко, Л. П. Исследование вторичной структуры и свойств а- и g-форм тромбина человека [Текст] / Л. П. Швачко, С. В. Литвинович, В. К. Кибирев // Укр. біохімі. журн. – 2006. – Т. 78, № 1. – С. 87–93.
8. Abid Hussein, M. N., Meesters, E. W., Osmanovic, N., Romijn, F. P., Nieuwland, R., Sturk, A. Antigenic characterization of endothelial cell-derived microparticles and their detection ex vivo / M. N. Abid Hussein et al. – J Thromb Haemost. – 2003. – N. 1. – P. 2434–2443.
9. Bosman, G.J.C.G.M., Lasonder, E., Groenen-Döpp, Y.A.M., Willekens, F.L.A., Were, J.M., Novotný, V.M.J. Comparative proteomics of erythrocyte aging in vivo and in vitro / G.J.C.G.M. Bosman et al. – Journal of proteomics. – 2010. Vol. 73. – P. 396–402.
10. Dey-Hazra, E., Hartel, B., Kirsch, T., Woywodt, A., Lovric, S., Haller, H., Haubitz, M., Erdbruegger, U. Detection of circulating microparticles by flow cytometry: influence of centrifugation, filtration of buffer, and freezing / E. Dey-Hazra et al. – Vascular Health and Risk Management. – 2010. – Vol. 6. – P. 1125–1133.
11. Diamant, M., Tushuizen, M.E., Sturk, A., Nieuwland, R. Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease? / M. Diamant et al. – Eur J Clin Invest. – 2004. – Vol. 34. – N. 6. – P. 392–401.
12. Distler, J. H., Huber, L. C., Hueber, A. J., Reich, C. F., Gay, S., Distler, O., Pisetsky, D. S. The release of microparticles by apoptotic cells and their effects on macrophages / J. H. Distler et al. – Apoptosis. – 2005. – N. 10. – P. 731–741.
13. Fenton, J. W. Thrombin functions and antithrombotic intervention / J. W. Fenton – Thromb. Haemost. – 1995. – Vol. 74. – P. 493–498.
14. Fuster, V., Jang, I. K. Role of platelet-inhibitor agents in coronary artery disease /. In: Topol E. J. ed.

Textbook of interventional cardiology. 2nd ed. – Vol.1. – Philadelphia: W.B. Saunders. – 1994. – P. 3–22.

15. Holme, P. A., Solum, N. O., Brosstad, F., Pedersen, T., Kveine, M. Microvesicles bind soluble fibrinogen, adhere to immobilized fibrinogen and coaggregate with platelets / P. A. Holme et al. – *Thromb Haemost.* – 1998. – Vol.79. – N. 2. – P. 389–394

16. Hugel, B., Martínez, M. C., Kunzelmann, C., Freyssinet, J. M. Membrane microparticles: two sides of the coin / B. Hugel et al. – *Physiology (Bethesda)*. – 2005. – N. 20. – P. 22–27.

17. Modesti, P. A., Colella, A., Cecioni, I., Costoli, A., Biagini, D., Migliorini, A., Sernerri, G. G. N. Increased number of thromboxane A2-prostaglandin H2 platelet receptors in active unstable angina and causative role of enhanced thrombin formation / P. A. Modesti et al. – *Am. Heart J.* – 1995. – Vol. 129. – N. 5. – P. 873–879.

18. Montoro-Garcia, S., Shantsila, E., Marin, F., Blann, A., Lip, G.Y.H. Circulating microparticles: new insights into the biochemical basis of microparticle release and activity / S. Montoro-Garcia et al. – *Basic Research in Cardiology*. – 2011. – Vol. 106. – N. 6. – P. 911–923.

19. Ogata, N., Imaizumi, M., Nomura, S., Shozu, A., Arichi, M., Matsuoka, M., Matsumura, M. Increased levels of platelet-derived microparticles in patients with dia-

betic retinopathy / N. Ogata et al. – *Diabetes Res Clin Pract.* – 2005. – Vol. 68. – P. 193–201.

20. 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 / H. Schmid-Schönbein et al. – *Microvasc. Res.* – 1973. – Vol. 6. – P. 366–376.

21. Siss, W. Molecular mechanisms of platelet activation / W. Siss – *Physiological Reviews*. – 1989. – Vol. 69. – N. 1. – P. 58–178.

22. Stubbs, M. T. Bode, W. A player of many parts: the spotlight falls on thrombin's structure / M. T. Stubbs, W. Bode – *Thromb. Res.* – 1993. – Vol. 69. – N. 1. – P. 1–58.

23. VanWijk, M. J., VanBavel, E., Sturk, A., Nieuwland, R. Microparticles in cardiovascular diseases / M. J. VanWijk et al. – *Cardiovasc Res.* – 2003. – Vol. 59. – P. 277–287.

24. Zubairov, D. M. Über die Thrombin zirculation in Blut / D. M. Zubairov – *Folia Haematol.* – 1962. – Vol. 79. – N. 1. – P. 62–75.

25. Zwaal, R. F., Schroit, A. J. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells / R. F. Zwaal, A. J. Schroit – *Blood*. – 1997. – Vol. 89. – P. 1121–1132.