

М. Ю. Милорадов, Н. В. Емануйлова, И. В. Масина, С. В. Булаева, А. В. Замышляев

Влияние тромбоцитов и процесса их агрегации на межэритроцитарные взаимодействия

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ №12-04-00550-а и в рамках ведомственной целевой программы Минобрнауки, № 01201276739

Исследование посвящено изучению межклеточных взаимодействий клеток крови. Было показано, что присутствие тромбоцитов в плазме крови сочетается со снижением агрегации эритроцитов. Кроме того было установлено, что если тромбоциты активировать АДФ или адреналином, то ингибирующий эффект тромбоцитов на эритроциты усиливается.

Ключевые слова: РБК агрегация, агрегация эритроцитов, обогащенная тромбоцитами плазма, АДФ, адреналин.

M. Ju. Miloradov, N. V. Emanuylova, I. V. Masina, S. V. Bulaeva, A. V. Zamyshlayev

Effect of platelet and platelet aggregation on RBC interaction

The research is devoted to study intercellular interactions of blood cells. It was shown that presence of platelets in plasma of blood is combined with the decrease of erythrocytes aggregation. Besides it was determined that if to activate platelets with ADP or adrenaline, the inhibiting effect of platelets on erythrocytes is increased.

Keywords: RBC aggregation, erythrocyte aggregation, platelet rich plasma, ADP, epinephrine.

Введение

Основными характеристиками реологического поведения эритроцитов и тромбоцитов является их способность к агрегации. Эритроциты человека в физиологических условиях объединяются в линейные и разветвленные агрегаты при снижении скоростей сдвига до критического уровня. Формирование таких агрегатов обуславливает до 60 % венозного сопротивления [14], и степень агрегации эритроцитов считается одной из важнейших детерминант неньютоновских свойств крови, в том числе и в условиях течения *in vivo* [7, 12].

Агрегация тромбоцитов является необходимым условием успешного выполнения ими гемостатической функции. В нарушении реологии крови агрегация эритроцитов и тромбоцитов играет определяющую роль [2]. 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, 8, 9, 16]. Многочисленные исследования ведутся и в отношении агрегации тромбоцитов [3, 5, 11]. 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.

Материалы и методы

Исследование проводилось на венозной крови практически здоровых доноров-добровольцев (лиц обоего пола, n=10). Обогащенную тромбоцитами плазму (ОБОГ. Т. П.) получали путем центрифугирования крови в течение семи минут при 1000 об./мин. После ее отделения оставшуюся кровь центрифугировали в течение двадцати минут при 3000 об./мин., после чего разделяли обедненную тромбоцитами плазму (ОБЕДН. Т. П.) и эритроцитарную массу [5]. Тонкую пленку лейкоцитарной массы, имеющуюся на поверхности эритроцитов, удаляли.

Эритроциты, отделенные от плазмы, использовались в экспериментах после трехкратной отмывки в изотоническом растворе хлорида натрия. Суспензию красных клеток крови в изотоническом растворе хлорида натрия при стандартном показателе Hct=40 % инкубировали в течение пятнадцати минут при температуре 37 градусов. Затем эритроциты отделяли от раствора центрифугированием и ресуспендировали в образцы аутологичной плазмы при стандартном показателе Hct=40 % и измеряли индексы агрегации эритроцитов.

Для активации и индуцированной агрегации тромбоцитов в аликвоты ОБОГ. Т. П. добавляли аденозиндифосфорную кислоту (АДФ) до конечной концентрации 10 мкМ и адреналин до конечной концентрации 1 мкМ. Образцы плазмы

с препаратами оставляли на десять мин при комнатной температуре.

Для визуализации процесса агрегации эритроцитов в разных образцах плазмы применялся метод оптической микроскопии. Использовали суспензии эритроцитов в плазме с гематокритом 0,5 %. Установка состояла из микроскопа с увеличением $\times 40$, соединенного с ПК через цифровой окуляр с увеличением $\times 12$. Изображение обрабатывали в программе ACDSee версия 7.0.

Степень агрегации эритроцитов определяли с помощью полуавтоматического агрегометра типа MA1, разработанного на основе метода Н. Schmid-Schönbein (Myrenne, Германия). Метод основан на изменении светопропускания при объединении клеток в агрегаты. Образующиеся при этом свободные пространства суспензионной среды способствуют увеличению прохождения света через образец крови [17]. Измерения производили после настройки прибора (оценки собственного светопропускания блока вращающийся конус – неподвижная плоскость). Открыв крышку, помещали 25 мл крови или суспензии эритроцитов с фиксированным гематокритом на нижнюю часть блока (конус с углом наклона 2 градуса). Образец крови подвергался вращению со скоростью сдвига 600 с⁻¹, после остановки степень агрегации измерялась и подсчитывалась автоматически для двух интервалов времени – 5 и 10 секунд (M5 и M10). После высокосдвигового режима вращения степень агрегации измеряли при низкой скорости – 3 с⁻¹ также в двух временных интервалах (M15 и M110).

Статистическую обработку полученных данных проводили в программе STATISTICA 6.0 с использованием t-критерия Стьюдента (в случае нормального распределения); при отклонении распределения от нормального закона применяли критерий Уилкоксона.

Результаты и их обсуждение

Индекс M отражал способность к агрегатообразованию в отсутствие сдвигового течения, индекс M1 – агрегабельность эритроцитов в условиях, когда низкосдвиговое течение способствовало сближению и взаимодействию клеток [17].

В первой серии опытов исследовали влияние присутствия тромбоцитов в суспензионной среде (плазме) на агрегацию эритроцитов в отсутствие сдвигового течения и присутствии низкосдвигового течения. При визуализации процесса агрегации наблюдалось образование устойчивых эритроцитарных агрегатов по типу «монетных столбиков» при видимом отсутствии тромбоцитов в плазме, а также в плазме, обогащенной

тромбоцитами (ОБОГ. Т. П.). Причем в последней регистрировалось присутствие слабой спонтанной агрегации тромбоцитов. Основная часть тромбоцитов находилась в свободном (неагрегированном состоянии).

В обогащенной тромбоцитами плазме (ОБОГ. Т. П.) индекс агрегации эритроцитов был на 16–18 % меньше ($p < 0,01$), чем в обедненной (ОБЕДН. Т. П.) (рис. 1).

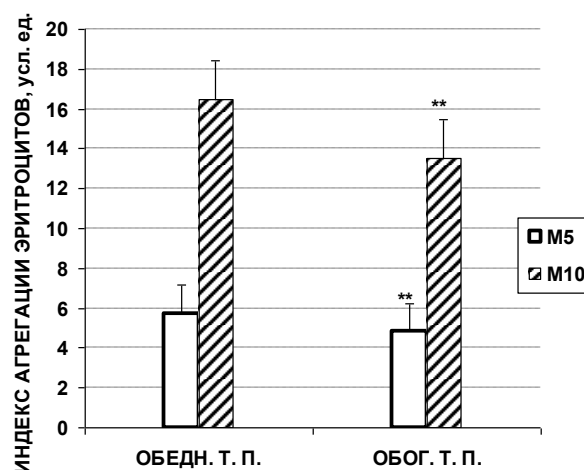


Рис. 1. Индексы агрегации эритроцитов в плазме с разной концентрацией тромбоцитов в условиях отсутствия сдвигового течения.

Обозначение: ** $P < 0,01$ – различия достоверны по сравнению с индексом агрегации в ОБЕДН. Т. П.

В условиях низкосдвигового течения, спустя 5 с после начала агрегации эритроцитов в ОБОГ. Т. П., индекс агрегации эритроцитов был на 15 % меньше ($p < 0,01$), чем в ОБЕДН. Т. П. (рис. 4), и на 14,8 % меньше спустя 10 с после начала процесса агрегации в данных условиях (рис. 2).

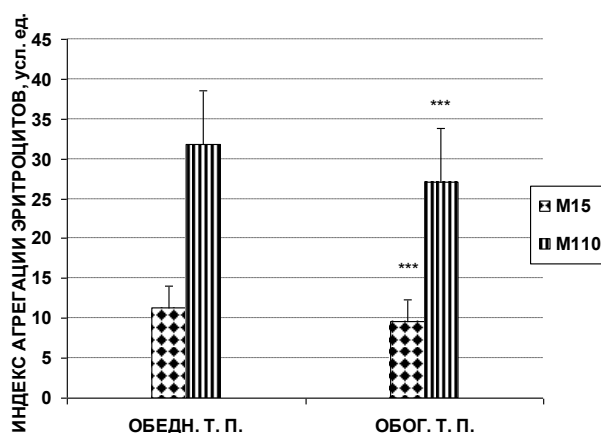


Рис. 2. Индексы агрегации эритроцитов с разной концентрацией тромбоцитов в условиях низкосдвигового течения.

Примечание: *** $P < 0,001$ – различия достоверны по сравнению с индексом агрегации в ОБЕДН. Т. П.

Таким образом, во всех случаях наблюдалось достоверное снижение агрегации эритроцитов в ОБОГ. Т. П.

Во второй серии опытов изучались агрегатные свойства эритроцитов в ОБОГ. Т. П., в которой произошла индуцированная агрегация тромбоцитов. В нашем исследовании агрегация тромбоцитов была индуцирована АДФ (10 мкМ) и адреналином (1,0 мкМ). При визуализации процесса аг-

регации наблюдали образование устойчивых эритроцитарных агрегатов по типу «монетных столбиков» и агрегатов тромбоцитов. В нашем исследовании АДФ и адреналин обладали проагрегантным эффектом в отношении тромбоцитов, причем при визуализации процесса стало очевидно, что эффект АДФ являлся более выраженным (рис. 3).

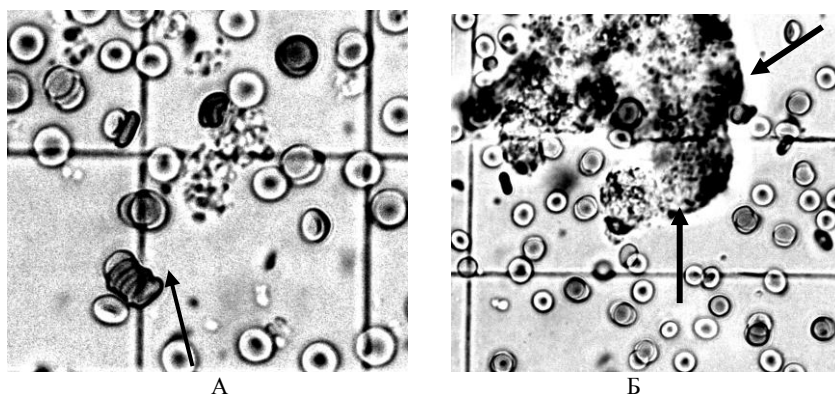


Рис. 3. Агрегация эритроцитов в условиях разной степени активации тромбоцитов присутствии тромбоцитов, агрегированных под действием адреналина

Обозначение: А – интактные тромбоциты; Б – активированные с помощью АДФ (10,0 мкМ) (показаны стрелками).

Агрегацию эритроцитов, ресуспендированных в ОБОГ. Т. П., в которой тромбоциты были агрегированы под действием АДФ и адреналина, также исследовали в условиях отсутствия сдвигового потока и под влиянием низкой скорости сдвига для всех временных интервалов.

В ОБОГ. Т. П. в присутствии АДФ индексы М5 на 24,7 %, М10 на 22 %, М15 на 21 % и М110

на 19,5 % были ниже в сравнении с соответствующими индексами агрегации эритроцитов в ОБЕДН. Т. П. ($p < 0,001$) (рис. 4). В ОБОГ. Т. П., в присутствии адреналина, индексы М5 на 23,9 %, М10 на 21,8 %, М15 на 24,5 % и индекс М110 на 25% были ниже соответствующих индексов агрегации эритроцитов в ОБЕДН. Т. П. ($p < 0,01$) (рис. 7).

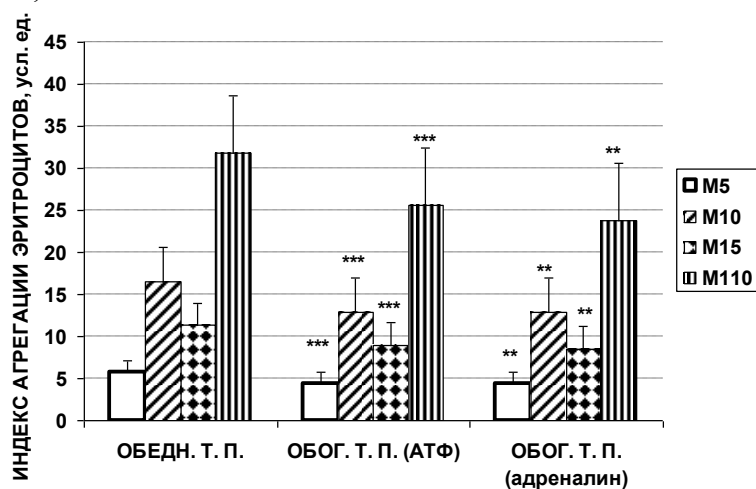


Рис. 4. Индексы агрегации эритроцитов в ОБЕДН. Т. П. и ОБОГ. Т. П. с препаратами при всех исследованных сдвиговых условиях и временных интервалах.

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

С целью оценки вклада индуцированной агрегации тромбоцитов в изменение агрегабельности эритроцитов сравнивали индексы агрегации

эритроцитов, ресуспендированных в ОБОГ. Т. П. и ОБОГ. Т. П., обработанную АДФ и адреналином. Агрегация эритроцитов, ресуспендирован-

ных в обработанной АДФ ОБОГ. Т. П., достоверно отличалась от той, что была получена в ОБОГ. Т. П., в которую не добавляли препарат: М5 на 10,4 % был ниже, а М10 и М15 были ниже на 5,2 %, и 7,3 % соответственно ($p < 0,05$) (рис. 5). При сравнении агрегации эритроцитов, ресус-

пендированных в ОБОГ. Т. П., обработанную адреналином, статистически достоверных отличий не было, хотя были выраженные тенденции к ее снижению (рис. 5), что, по-видимому, связано с менее выраженным проагрегантным эффектом адреналина в сравнении с АДФ.

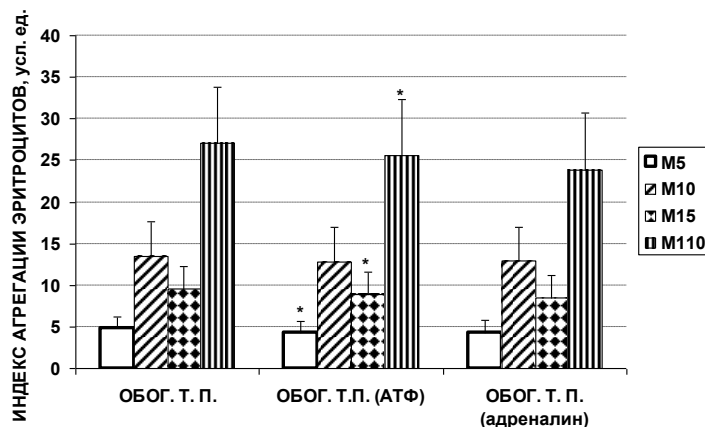


Рис. 5. Индексы агрегации эритроцитов в ОБОГ. Т. П. в присутствии активирующих агентов при всех исследованных сдвиговых условиях и временных интервалах.

Примечание: * $P < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с индексом агрегации в ОБОГ. Т. П.

Как показали результаты наших исследований, присутствие в суспензионной среде тромбоцитов в любом физиологическом состоянии (свободном, спонтанной и индуцированной агрегации) влияет на межэритроцитарные взаимодействия, выражено снижая показатели агрегации эритроцитов. Причем тромбоциты, подвергшиеся влиянию препаратов, еще сильнее проявляли эти свойства: в обработанной адреналином плазме агрегация красных клеток крови имела тенденцию к снижению, в обработанной АДФ – достоверно снижалась в сравнении с ОБОГ. Т. П., в которую не добавляли препараты. Индуцированная агрегация тромбоцитов это рецептор-опосредуемый процесс. Эффект адреналина на тромбоциты выражен значительно слабее по сравнению с АДФ. Адреналин вызывает агрегацию тромбоцитов без изменения дисковидной формы, взаимодействуя с α -адренорецепторами плазматической мембраны. При активации альфа-2-адренорецепторов происходит ингибирование аденилатциклазы, при этом предполагается, что механизм действия адреналина связан с модуляцией мембран и изменением их проницаемости к ионам Ca^{2+} [10].

Важнейшую функцию осуществляют специфические рецепторы, относящиеся к классу P2Y и реагирующие на действие АДФ, благодаря чему наступает агрегация тромбоцитов. По механизму передачи сигнала P2-рецепторы делятся на два семейства: 1. P2X-рецепторы, являющиеся лиганд-зависимыми ионными каналами; P2Y, отно-

сящиеся к группе G-протеин-опосредованных рецепторов. В настоящее время обнаружено семь подтипов P2X-рецепторов и восемь подтипов P2Y. Однако в тромбоцитах выявлено наличие лишь трех подтипов P2-рецепторов – P2Y₁, P2Y₁₂, и P2X₁, каждый из которых играет специфическую роль в активации и агрегации кровяных пластинок. Так стимуляция P2Y₁-рецепторов аденозиндифосфатом мобилизует ионы Ca^{2+} из депо, что приводит к изменению формы тромбоцита и запускает обратимую агрегацию кровяных пластинок. Активация P2Y₁₂-рецепторов при воздействии АДФ ведет к усилению агрегации как самим аденозиндифосфатом, так и другими агонистами – коллагеном, тромбином и эпинефрином (адреналином) [4]. Активация тромбоцитов АДФ приводит к экспонированию рецепторов для фибриногена – гликопротеиновых гетеродимеров α IIb β 3 – на плазматической мембране тромбоцита. Ионы Ca^{2+} участвуют в формировании центра связывания рецептора с фибриногеном, оптимальной для связывания является концентрация кальция 0,1–1,0 мМ [15]. Ту же роль ионы Ca^{2+} выполняют и при спонтанной агрегации тромбоцитов.

Повышение содержания ионизированного кальция в плазме крови вызывает увеличение доли мембраносвязанного кальция в эритроцитах. Он способен связываться с мембранными анионами (главным образом, с карбоксильными группами белков и кислыми фосфолипидами) [15, 18], тем самым интенсифицируя процессы

адгезии и агрегации красных клеток крови. По мнению ряда авторов, именно воздействием биологически активных веществ (катехоламинов, кининов, простагландинов, свободных жирных кислот и т. п.), содержащихся в плазме, во многом и обусловлено происхождение плазменных факторов агрегации [6], однако это предположение требует дальнейшего исследования.

Заключение

В приведенном исследовании мы показали, что присутствие тромбоцитов в агрегирующей

среде способствует снижению агрегации эритроцитов, а выраженная агрегация кровяных пластинок, вызванная АДФ и адреналином, усиливает данный эффект. Наблюдаемое явление может быть связано с потреблением свободного плазменного кальция, в процессе активации и агрегации тромбоцитов в плазме, который необходим также и для процессов агрегации эритроцитов. Кроме того, данное явление может быть объяснено и выделением метаболитов при активации тромбоцитов.

Библиографический список

1. Блохина, Т. А. Роль плазменных факторов в регуляции реологических свойств эритроцитов человека [Текст] / Т. А. Блохина, С. Б. Назарова, В. В. Чемоданов // Мат. междунаrodn. конф. по гемореологии. – Ярославль, 2001. – С. 60–61.
2. Бокарев, И. Н. Внутрисосудистое свертывание крови [Текст] / И. Н. Бокарев, В. М. Щепотин, Я. М. Ена. – М. : Здоровье, 1989. – 240 с.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Левин, Г. Я. Микроциркуляция при ожоговом шоке. Клинические аспекты нарушений микроциркуляции и реологии крови [Текст] / Г. Я. Левин, С. Б. Кораблев, А. П. Модин и соавт. – Горький, 1984. – 234 с.
7. Левтов, В. А. Реология крови [Текст] / В. А. Левтов, С. А. Регирер, Н. Х. Шадрин. – М. : Медицина, 1982. – 272 с.
8. 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. Т. 28. – 2002. – № 4. – С. 144–148.
9. Муравьев, А. В. Микрореологические свойства разных популяций эритроцитов у людей с повышенным артериальным давлением и у физически активных людей [Текст] / А. В. Муравьев, Л. Г. Зайцев, А. А. Муравьев, А. В. Замышляев // Физиология человека. Т. 26. – 2000. – № 4. – 101–109.
10. Орлов, С. Н., Шевченко, А. С. О возможном механизме действия мембраносвязанного кальция на активность аденозинтрифосфатазы и проницаемость эритроцитов для одновалентных катионов [Текст] / С. Н. Орлов, А. С. Шевченко // Биохимия. Т. 43. – 1978. – № 2. – С. 208–215.
11. 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.
12. Фирсов, Н. Н. Введение в экспериментальную и клиническую гемореологию [Текст] / Н. Н. Фирсов, П. Х. Джанашия – М. : Изд-во ГОУ ВПО «РГМУ», 2004. – 280 с.
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. Cabel M., Meiselman H.J., Popel A.S., Johnson P.C. Contribution of red blood cell aggregation to venous vascular resistance in skeletal muscle // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 1997. – Vol. 272. – № 41. – P. H1020–1032.
15. Clerck F., Xhonneux B., Wiele R. Biochemical mechanisms in 5-hydroxytryptamine-induced human platelet aggregation // Agents Action. – 1985. – Vol.17, №2. – P. 220–228.
16. Meiselman H.J. Red-blood-cell role in RBC aggregation // Clin Hemorheol. – 1993. – № 13. – P. 575–592.
17. Schmid-Schönbein H., Malotta H., Striesow F. Erythrocyte aggregation: causes, consequences and methods of assessment // Tijdschr. NVKC. – 1990. – Vol. 15. – P. 88–97.
18. Siess W. Molecular mechanisms of platelet activation // Physiological Reviews. – 1989. – Vol.69, №1. – P. 58–178.

Bibliograficheskij spisok

1. Blohina, T. A. Rol' plazmennyyh faktorov v reguljácii reologicheskikh svojstv jeritrocitov cheloveka [Tekst] / T. A. Blohina, S. B. Nazarova, V. V. Chemodanov // Mat. mezhdunarodn. konf. po gemoreologii. – Jaroslavl', 2001. – S. 60–61.
2. Bokarev, I. N. Vnutrisudistoe svertyvanie krovi [Tekst] / I. N. Bokarev, V. M. Shhepotin, Ja. M. Ena. – M. : Zdorov'e, 1989. – 240 s.
3. Egorihina, M. N. Rol' fibrinogena v agregacii kletok krovi pri ozhogovoj bolezni [Tekst] / M. N. Egorihina // Tromboz, gemostaz i reologija. – 2009. – №3. – S. 67–75.
4. Kuznik, B. I. Kletochnye i molekulyarnye mehanizmy reguljacji sistemy gemostaza v norme i pri patologii [Tekst]: monografija / B. I. Kuznik. – Chita : Jekspress-izdatel'stvo, 2010. – 832 s.
5. Levin, G. Ja. Narusheniya gemostaza i DVS–sindrom v ostryj period ozhogovoj bolezni [Tekst] / G. Ja. Levin // Tromboz, gemostaz i reologija. – 2004. – № 4. – S. 55–62.
6. Levin, G. Ja. Mikrocirkuljacija pri ozhogovom shoke. Klinicheskie aspekty narushenij mikrocirkuljacji i reologii krovi [Tekst] / G. Ja. Levin, S. B. Korablev, A. P. Modin i soavt. – Gor'kij, 1984. – 234 s.
7. Levto, V. A. Reologija krovi [Tekst] / V. A. Levto, S. A. Regirer, N. H. Shadrin. – M. : Medicina, 1982. – 272 s.
8. Murav'jov, A. V. Analiz vlijanija plazmennyyh i kletochnyh faktorov na agregaciju jeritrocitov raznyh vozrastnyh populjacij [Tekst] / A. V. Murav'jov, I. A. Tihomirova, D. V. Borisov // Fiziologija cheloveka. T. 28. – 2002. – № 4. – S. 144–148.
9. Murav'jov, A. V. Mikroreologicheskie svojstva raznyh populjacij jeritrocitov u ljudej s povyshennym arterial'nym davleniem i u fizicheski aktivnyh ljudej [Tekst] / A. V. Murav'jov, L. G. Zajcev, A. A. Murav'jov, A. V. Zamyshljaev // Fiziologija cheloveka. T. 26. – 2000. – № 4. – 101–109.
10. Orlov, S. N., Shevchenko, A. S. O vozmozhnom mehanizme dejstvija membranovjazannogo kal'cija na aktivnost' adenozintrifosfatazy i pronicaemost' jeritrocitov dlja odnovalentnyh kationov [Tekst] / S. N. Orlov, A. S. Shevchenko // Biohimija. T. 43. – 1978. – № 2. – S. 208–215.
11. Tihomirova I. A. Rol' jekstracelljuljarnyyh, membrannyh i vnutrikletochnyh faktorov v processe agregacii jeritrocitov [Tekst] : avtoref. ... dokt. biol. nauk / I. A. Tihomirova. – Jaroslavl', 2006. – 48 s.
12. Firsov, N. N. Vvedenie v jeksperimental'nuju i klinicheskiju gemoreologiju [Tekst] / N. N. Firsov, P. H. Dzhanašija – M. : Izd-vo GOU VPO «RGMU», 2004. – 280 s.
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. Cabel M., Meiselman H.J., Popel A.S., Johnson P.C. Contribution of red blood cell aggregation to venous vascular resistance in skeletal muscle // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 1997. – Vol. 272. – № 41. – P. H1020–1032.
15. Clerck F., Xhonneux B., Wiele R. Biochemical mechanisms in 5-hydroxytryptamine-induced human platelet aggregation // Agents Action. – 1985. – Vol.17, №2. – P. 220–228.
16. Meiselman H.J. Red-blood-cell role in RBC aggregation // Clin Hemorheol. – 1993. – № 13. – P. 575–592.
17. Schmid-Schönbein H., Malotta H., Striesow F. Erythrocyte aggregation: causes, consequences and methods of assessment // Tijdschr. NVKC. – 1990. – Vol. 15. – P. 88 – 97.
18. Siess W. Molecular mechanisms of platelet activation // Physiological Reviews. – 1989. – Vol.69, №1. – P. 58–178.