

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© Коллектив авторов

КОАГУЛЯЦИОННЫЕ СВОЙСТВА МЕМБРАННЫХ МИКРОЧАСТИЦ ЭРИТРОЦИТОВ

*О.А. Антонова¹, О.Н. Шустова¹, Н.В. Голубева¹, В.В. Якушкин¹,
И.Б. Алчинова², М.Ю. Карганов², А.В. Мазуров^{1*}*

¹Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии,
121552, Москва, ул. 3-я Черепковская, 15а; *эл. почта: avmazurov@list.ru

²НИИ общей патологии и патофизиологии, Москва

Мембранные микрочастицы (МЧ), образующиеся при активации и/или повреждении клеток, обладают коагуляционной активностью, то есть способностью ускорять свертывание крови. Они содержат на своей поверхности фосфатидилсерин (ФС) – субстрат для сборки коагуляционных ферментных комплексов, а некоторые из них тканевой фактор (ТФ) – инициатор реакций свёртывающего каскада. В настоящей работе исследовали коагуляционные свойства МЧ эритроцитов, которые получали из эритроцитов доноров, активированных ионофором A23187, а также из длительно хранящейся эритроцитарной массы для переливания. Количество МЧ определяли с помощью проточной цитометрии, а их коагуляционную активность с помощью модифицированного теста рекальцификации плазмы. Участие в этой реакции ФС и ТФ изучали, используя блокатор ФС, лактадгерин и анти-ТФ антитела. Активность ТФ в МЧ оценивали по способности активировать фактор X с помощью хромогенного теста. Размер МЧ измеряли методом динамического светорассеивания. Свойства МЧ эритроцитов сравнивали с ранее охарактеризованными (с помощью аналогичных методов) МЧ тромбоцитов и моноцитарных клеток ТНР-1, не содержащих и содержащих ТФ, соответственно. МЧ эритроцитов ускоряли свертывание плазмы, однако менее эффективно, чем МЧ тромбоцитов и МЧ клеток ТНР-1, которые демонстрировали максимальную активность. Лактадгерин полностью подавлял коагуляционную активность всех МЧ. Анти-ТФ антитела не влияли на параметры свёртывания в присутствии МЧ эритроцитов и тромбоцитов, но замедляли свертывание в присутствии МЧ клеток ТНР-1. В отличие от МЧ клеток ТНР-1, экспрессирующих активный ТФ, активность ТФ не обнаружена в МЧ эритроцитов и тромбоцитов. МЧ эритроцитов были мельче МЧ тромбоцитов и клеток ТНР-1 – средний диаметр около 200 нм и 400 нм, соответственно. Таким образом, МЧ эритроцитов обладают меньшей способностью ускорять свертывание плазмы по сравнению с МЧ моноцитарных клеток ТНР-1 и тромбоцитов. Полученные данные указывают на то, что более низкая коагуляционная активность МЧ эритроцитов по сравнению с МЧ клеток ТНР-1 обусловлена отсутствием в МЧ эритроцитов ТФ (в отличие от МЧ клеток ТНР-1) и их более мелким размером, а по сравнению с МЧ тромбоцитов (не содержащими ТФ, также как и МЧ эритроцитов) – только их более мелким размером.

Ключевые слова: мембранные микрочастицы; коагуляция крови; тканевой фактор; эритроциты; тромбоциты; моноциты

DOI: 10.18097/PBMC20196503214

ВВЕДЕНИЕ

Мембранные микрочастицы (МЧ) (другие названия микровезикулы, экзосомы) представляют собой везикулярные фрагменты плазматической мембраны, которые образуются и отделяются от клеток при их активации и/или повреждении. МЧ имеют размер от 100 до 1000 нм и содержат на поверхности белки плазматической мембраны “родительской” клетки. Клетки также продуцируют ещё один тип внеклеточных мембранных частиц – экзосомы. Экзосомы имеют меньший размер, от 40 до 100 нм, образуются внутри клетки и секретируются наружу после слияния с клеточной поверхностью содержащих их структур, называемых мультивезикулярные тельца. Главной функцией МЧ и экзосом является перенос локализованных в них биологически активных соединений (белки, липиды, нуклеиновые кислоты) от “родительской” клетки к другим клеткам организма [1, 2]. Однако МЧ обладают также коагуляционной активностью, то есть способностью ускорять свёртывание крови. В отличие от экзосом, МЧ содержат на своей поверхности большие количества

фосфатидилсерина (ФС) [3-5]. Этот отрицательно заряженный фосфолипид служит мембранным субстратом для сборки коагуляционных ферментных комплексов, благодаря работе которых происходит активация ключевых факторов свёртывания – фактора X и протромбина. Более того, некоторые виды МЧ, содержат также экспрессированный в “родительских” клетках тканевой фактор (ТФ) – первичный инициатор коагуляционных реакций [6-8].

Очевидно, что такое свойство МЧ, как их коагуляционная активность, может проявиться лишь в том случае, если они попадают в кровоток, где могут влиять на свёртывание крови в процессе остановки кровотечения или внутрисосудистого тромбообразования. Главными источниками циркулирующих МЧ служат клетки крови (тромбоциты, лейкоциты, эритроциты), а также эндотелиальные клетки, выстилающие внутреннюю поверхность сосудов [6-8]. В наших предыдущих работах, используя модифицированный тест рекальцификации плазмы, мы сравнивали коагуляционные свойства МЧ, продуцируемых

in vitro тромбоцитами, моноцитами, нейтрофилами и эндотелиальными клетками [9, 10]. Было показано, что наибольшей способностью ускорять свертывание плазмы обладают МЧ моноцитов и эндотелиальных клеток, которые, в отличие от МЧ тромбоцитов и нейтрофилов, содержат активный ТФ. Эти результаты согласуются с работами других авторов, которые сравнивали МЧ тромбоцитов и моноцитов, используя тест генерации тромбина [4, 11, 12]. Однако, кроме тромбоцитов, лейкоцитов (моноцитов и нейтрофилов) и эндотелиальных клеток, потенциальным источником циркулирующих в кровотоке МЧ могут быть также и эритроциты – наиболее многочисленные форменные элементы крови.

В настоящей работе мы исследовали МЧ, продуцируемые эритроцитами. МЧ эритроцитов сравнивали с ранее охарактеризованными МЧ тромбоцитов и моноцитов, то есть с МЧ, не содержащими и содержащими ТФ.

МЕТОДИКА

Получение микрочастиц

МЧ эритроцитов получали из эритроцитов здоровых доноров или из эритроцитарной массы (эритромассы) для переливания. МЧ, продуцируемые эритроцитами, активированными кальциевым ионофором A23187, получали в соответствии с методом, описанным Van Der Meijden и соавт. [12]. Кровь здоровых доноров собирали, используя в качестве антикоагулянта 3,8% цитрат натрия в соотношении кровь/антикоагулянт – 9/1. Кровь центрифугировали при 180 g в течение 10 мин и собирали тромбоциты (супернатант, обогащённая тромбоцитами плазма) и слой лейкоцитов (“buffy coat”) на поверхности эритроцитарного осадка. Из нижней трети осадка эритроцитов отбирали 1 мл клеток, разводили 9 мл буфера, содержащего 150 mM NaCl, 10 mM HEPES, pH 7,4 (NaCl/HEPES). Эритроциты осаждали при 2000 g в течение 15 мин и трижды отмывали буфером NaCl/HEPES в тех же условиях. Перед последним осаждением подсчитывали количество эритроцитов в гематологическом анализаторе Abacus Junior B (“Diatron Ltd.”, Австрия). Отмытые от плазмы эритроциты ресуспендировали в буфере NaCl/HEPES в концентрации 1×10^9 /мл в присутствии 3 mM CaCl_2 , добавляли к ним ионофор A23187 (“Invitrogen, Life Technologies Corp.”, США) в конечной концентрации 10 мкМ и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Эритроциты и клеточный дебрис осаждали в течение 15 мин при 2000 g и затем 15 мин при 2500 g. Из полученного супернатанта осаждали МЧ 30 мин при 20000 g при 4°C. МЧ ресуспендировали в предварительно фильтрованном (фильтры Millex, Durapore (“Merck Millipore Ltd.”, США) с диаметром пор 0,1 мкм) буфере NaCl/HEPES, содержащем 1% (масса/объём) бычий сывороточный альбумин (BCA) (NaCl/HEPES/BCA). Объём буфера рассчитывали таким образом, чтобы 1 мл содержал МЧ из 1×10^9 эритроцитов. Аликвоты по 1,0 мл замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C не более 6 месяцев. В некоторых

экспериментах использовали также МЧ, образующиеся при хранении эритроцитарной массы (эритромассы) для переливания. Эритромассу в антикоагулянте ЦФДА-2 (цитрат-фосфат-декстроза-аденин 2) получали из отделения переливания крови Национального медицинского исследовательского центра кардиологии. Использовали эритромассу, хранившуюся (при +4°C) дольше рекомендованного срока хранения в 42 дня (43-46 дней). В эритромассе подсчитывали концентрацию эритроцитов и затем осаждали клетки и клеточный дебрис 15 мин при 2000 g и ещё раз 15 мин при 2500 g. Из полученного супернатанта осаждали МЧ 30 мин при 20000 g при 4°C. Микрочастицы ресуспендировали в буфере NaCl/HEPES/BCA так, чтобы 1 мл суспензии содержал МЧ из 1×10^{10} эритроцитов. Аликвоты по 1 мл замораживали в жидком азоте и хранили не более 6 месяцев при -70°C.

МЧ тромбоцитов и клеток THP-1 (моноцитарная линия клеток человека THP-1) получали, как было подробно описано ранее [9, 10]. Тромбоциты здоровых доноров отмывали от плазмы и активировали 10 мкМ TRAP (Thrombin Receptor Activating Peptide, пептид активирующий рецептор тромбина, последовательность SFLLRN) в течение 10 мин при 37°C. TRAP был любезно предоставлен М.А. Овчинниковым (Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии, Москва). Затем тромбоциты осаждали двукратным центрифугированием 15 мин при 2500 g, и осаждали МЧ из полученного супернатанта 30 мин при 20000 g при 4°C. Культивируемые в стандартных условиях клетки THP-1 (из коллекции American Type Culture Collection (ATCC), США) активировали 1 мкг/мл липополисахарида (ЛПС) в течение 6 ч. Клетки и клеточный дебрис осаждали 10 мин при 400 g и затем 15 мин при 2500 g. МЧ осаждали из полученного супернатанта центрифугированием 30 мин при 20000 g при 4°C. МЧ тромбоцитов и клеток THP-1 ресуспендировали в буфере NaCl/HEPES/BCA, замораживали в жидком азоте и хранили не более 6 месяцев при -70°C.

Подсчёт микрочастиц

После размораживания МЧ (37°C) от 5 до 45 мкл суспензии добавляли в 300 мкл содержащего кальций буфера для связывания аннексина V (“Becton Dickinson, BD Pharmingen”, США), затем добавляли 2,5 мкл аннексина V, конъюгированного с FITC (fluorescein isothiocyanate, флуоресцеин изотиоцианат) (“Becton Dickinson, BD Biosciences”, США) и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре в темноте. После инкубации анализ проводили в проточном цитометре FACS Canto II (“Becton Dickinson”, США). Для калибровки по размеру использовали стандартные частицы диаметром 1 мкм (Flow cytometry Sub-Micron Size reference Kit, “Invitrogen, Life Technologies Corp.”). Непосредственно перед анализом в пробу вносили 15 мкл частиц для счёта диаметром 3 мкм с известной концентрацией (MP-Count Beads, “BioCytex, Stago”, Франция). Сбор и анализ данных проводили с использованием программного обеспечения CELLQuest™ (“Becton Dickinson,

BD Biosciences”). Отсечение шумовых сигналов (“threshold”) в базовой настройке прибора проводили по каналу FITC флуоресценции (200 условных ед.) и учитывали (“гейтировали”) все события выше этого порогового значения. Подсчёт частиц из этой области (“гейта”), размером менее 1 мкм проводили в “окне” бокового/прямого светорассеивания (side scattering / forward scattering, SSC/FSC). События регистрировали до достижения 1000 событий в области частиц для счёта (MP-Count Beads). Концентрацию МЧ в мкл в пробе считали по формуле:

$$\left(\frac{(\text{количество МЧ аннексин V+}) \times (\text{концентрация MP-Count Beads})}{(\text{коэффициент разведения})} \right) / 1000.$$

В качестве отрицательного контроля анализировали (1) раствор без МЧ с добавлением аннексина V-FITC, и (2) МЧ без добавления аннексина V. Уровень шумовых событий обычно был выше в контроле без МЧ, но с добавленным аннексином V-FITC. Количество событий в образцах отрицательного контроля вычитали из количества событий в исследуемых

пробах с МЧ. Таким образом, при подсчёте мы учитывали частицы (1) с флуоресценцией аннексина V-FITC выше порога отсечения (“threshold”) по каналу FITC флуоресценции, и (2) размером менее 1 мкм. Пример анализа МЧ различного происхождения в “окне” SSC/FSC представлен на рисунке 1. В предварительных экспериментах была выявлена линейная зависимость количества подсчитываемых МЧ от объёма образца МЧ (от 5 до 45 мкл), добавляемого в анализируемую пробу. Также в предварительных экспериментах было установлено, что при выставлении порога отсечения шумовых сигналов (“threshold”) в базовых настройках прибора по каналу бокового светорассеивания (стандартная настройка) просчитывается меньшее количество МЧ, чем при выставлении порога по каналу флуоресценции FITC. По-видимому, это было обусловлено большим “отсечением” фракции мелких МЧ, что было особенно заметно при анализе МЧ эритроцитов, имеющих меньшие размеры по сравнению с МЧ тромбоцитов и моноцитарных клеток THP-1 (см. раздел “Результаты и обсуждение”).

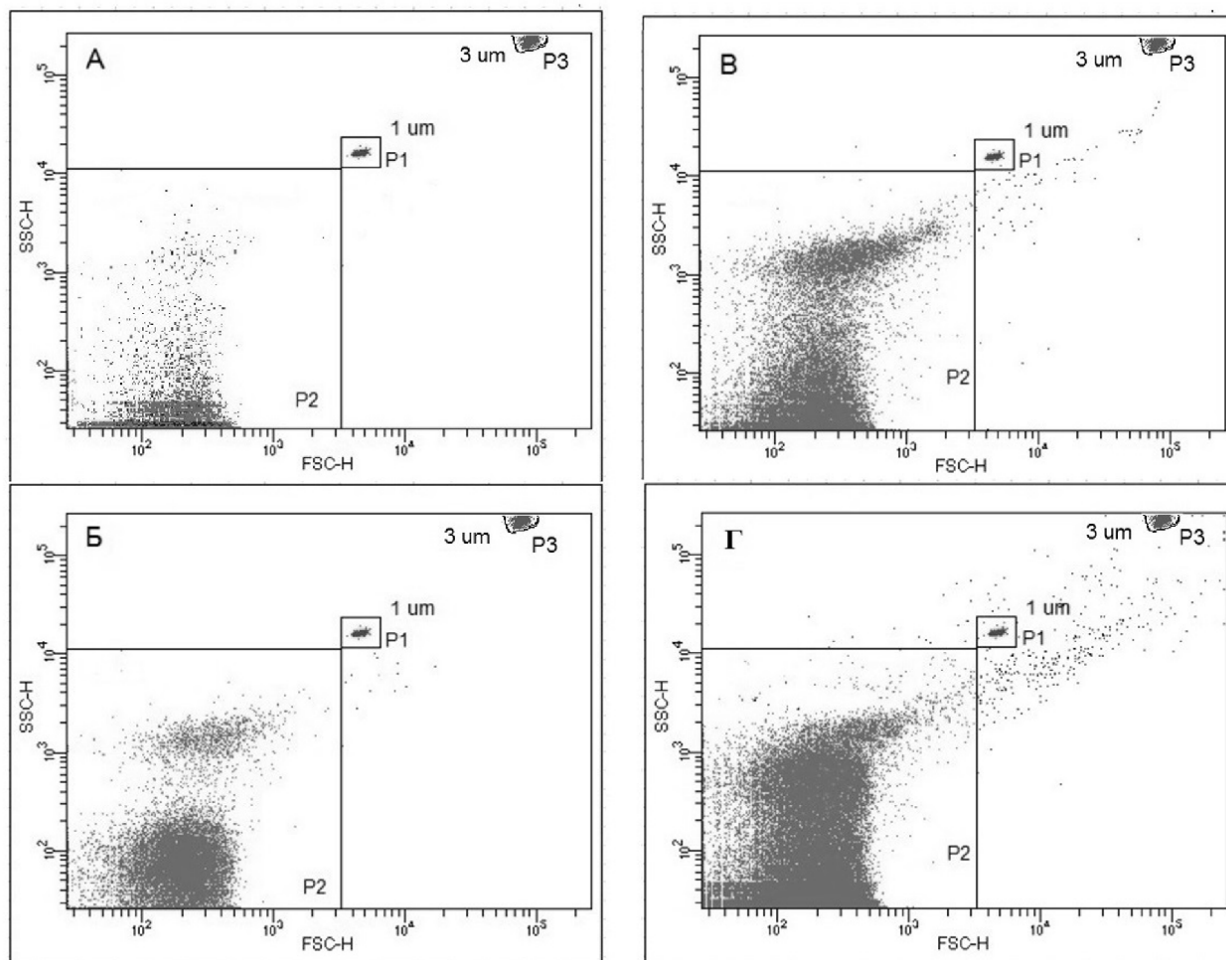


Рисунок 1. Анализ МЧ с помощью проточной цитометрии. А – раствор без МЧ, содержащий аннексин V-FITC (отрицательный контроль), (Б) МЧ эритроцитов (активация A23187) (5 мкл), (В) МЧ тромбоцитов (15 мкл), (Г) МЧ моноцитарных клеток THP-1 (45 мкл). Все МЧ инкубировали с аннексином V-FITC. После выделения (“гейтирования”) всех событий выше порогового значения в канале флуоресценция FITC (не показано) их анализировали в “окне” бокового / переднего светорассеивания (SSC / FCS). P1 – стандартные частицы диаметром 1 мкм (для выделения (“гейтирования”) МЧ по размеру), P2 – область в который проводили подсчёт МЧ (частицы меньше 1 мкм), P3 – частицы для счёта диаметром 3 мкм (для нормирования подсчета МЧ). Субпопуляции наиболее крупных частиц в “гейте” меньше 1 мкм, по-видимому, представляют агрегаты МЧ. Подробно – см. текст.

Определение размера микрочастиц

Размер МЧ эритроцитов, клеток ТНР-1 и тромбоцитов определяли методом динамического светорассеивания в лазерном корреляционном спектрометре ЛКС-03 ("ИНТОКС", Россия), как было подробно описано ранее [10, 13].

Коагуляционная активность микрочастиц

Исследование коагуляционной активности МЧ проводили с помощью модифицированного теста рекальцификации плазмы, как было подробно описано ранее [9, 10]. МЧ в известном количестве ресуспендировали в плазме здоровых доноров, из которой предварительно удаляли эндогенные МЧ центрифугированием при 20000 g в течение 90 мин (МЧ-минус (МЧ-) плазма). К плазме без МЧ или с МЧ из разных клеток добавляли равный объём буфера Оурена-Коллера (Owren-Koller) ("Diagnostics Stago", Франция), в который для частичного ингибирования контактной активации предварительно вносили ингибитор трипсина из кукурузы (corn trypsin inhibitor, СТИ) в конечной концентрации 150 мкг/мл. СТИ был любезно предоставлен Г.В. Шехватовой, Институт белка, Пушкино, Россия). В некоторых экспериментах в буфер также добавляли блокатор ФС, лактадгенин ("Haematologic Technologies Inc.", США) в конечной концентрации 450 нМ или блокирующие антитела против ТФ (клон HTF1, "BD Pharmingen, BD Biosciences") в конечной концентрации 30 мкг/мл. Разведённую буфером плазму в объёме 100 мкл помещали в ячейки силиконизированного 96-луночного планшета, затем добавляли в ячейки по 50 мкл раствора 25 mM CaCl₂ ("Diagnostics Stago") и помещали планшет в прогретую до 30°C ячейку термостатируемого планшетного спектрофотометра Thermo Scientific Multiscan Go ("Thermo Fisher Scientific", Финляндия). Свёртывание плазмы регистрировали при 30°C по изменению поглощения при 450 нм (A450), которое измеряли с интервалом в 30 сек в течение 60 мин. Определяли лаг-фазу (мин) и максимальную скорость образования фибринового сгустка ($V_{\text{макс}}$, рассчитанную, как максимальный прирост A450 в мин в процентах от общего прироста за 60 мин – % A450/мин).

Активность ТФ в МЧ измеряли с помощью хромогенного теста по способности ТФ активировать фактор X в присутствии активированного фактора VII, используя набор Actichrome TF ("Sekisui Diagnostics", США), как подробно описано ранее [9, 10]. Количество активного ТФ во вносимых в пробу МЧ определяли с помощью калибровочной кривой со стандартным ТФ (предоставленным производителем) и выражали в фмоль / 10⁸ МЧ.

Статистическая обработка

Статистическую обработку данных проводили с помощью набора программ "Statistica-10". Данные представляли, как средние ± стандартные отклонения, а различия между ними оценивали с помощью t-критерия Стьюдента для независимых переменных. Достоверными считали различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Мембранные МЧ, продуцируемые активированными А23187 эритроцитами, ускоряли свёртывание МЧ- плазмы (плазма, лишённая эндогенных МЧ), инициированное добавлением Ca²⁺ (тест рекальцификации). При добавлении к МЧ- плазме МЧ эритроцитов наблюдалось укорочение лаг-фазы и увеличение скорости свёртывания (рис. 2 и 3 и табл. 1).

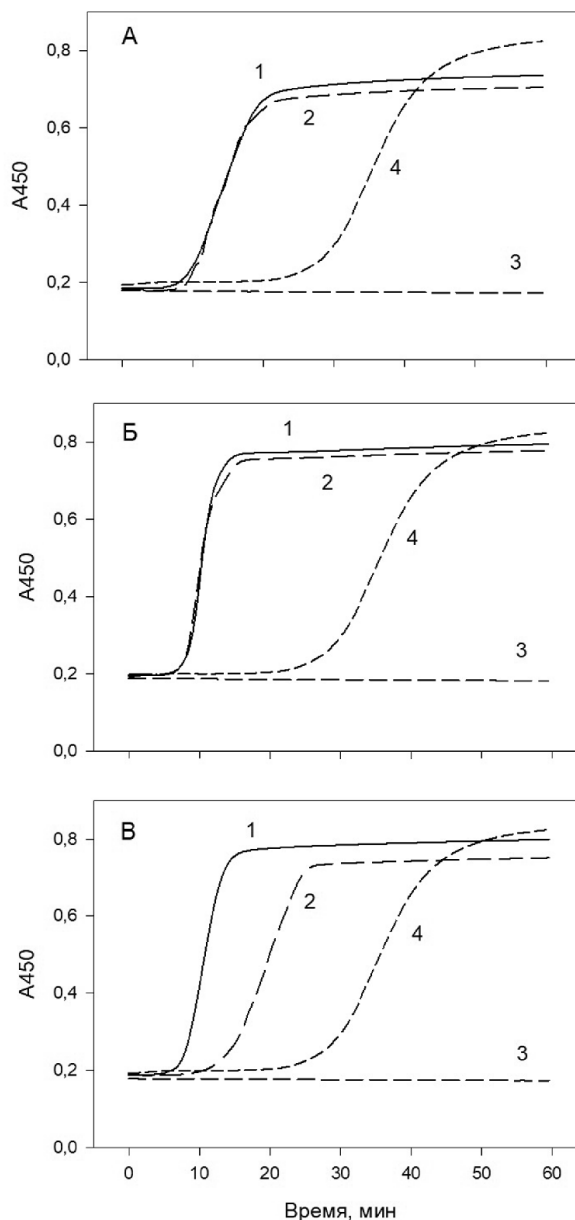


Рисунок 2. Ускорение свёртывания плазмы МЧ. Эффекты анти-ТФ антител и лактадгерина. К МЧ- плазме добавляли 3×10^7 МЧ эритроцитов (активации А23187) (А), $1,5 \times 10^7$ МЧ тромбоцитов (Б), $0,375 \times 10^7$ МЧ моноцитарных клеток ТНР-1 (В). Свёртывание плазмы регистрировали после добавления CaCl₂ по изменению оптической плотности при 450 нм (A450). Кривые 1 – только МЧ, кривые 2 – МЧ + 10 мкг/мл анти-ТФ антител, кривые 3 – МЧ + 150 нМ лактадгерина, кривые 4 – МЧ- плазма (без МЧ). Представлены воспроизводимые кривые из более чем 10 (кривые 1, 4), 3-6 (кривые 2) и 3-4 (кривые 3) экспериментов.

МЕМБРАННЫЕ МИКРОЧАСТИЦЫ ЭРИТРОЦИТОВ

Таблица 1. Коагуляционная активность МЧ различных клеток

Источник МЧ	Лаг-фаза, мин	V _{макс} , %A450/мин
Эритроциты, A23187 (ЭР1)	11,5±1,8 (n=11)	11,3±2,7 (n=11)
Эритроциты, эритроцитарная масса (ЭР2)	10,9±2,0 (n=4) p(ЭР1)=0,543	16,0±4,1 (n=4) p(ЭР1)=0,026
Тромбоциты (ТЦ)	8,9±1,3 (n=14) p(ЭР1)<0,001 p(ЭР2)=0,034	25,1±5,3 (n=14) p(ЭР1)<0,001 p(ЭР2)=0,006
Моноцитарные клетки ТНР-1 (ТНР)	4,6±1,4 (n=10) p(ЭР1)<0,001 p(ЭР2)<0,001 p(ТЦ)<0,001	31,3±9,0 (n=10) p(ЭР1)<0,001 p(ЭР2)=0,008 p(ТЦ)=0,046

Примечание. Коагуляционную активность МЧ различного происхождения изучали с помощью модифицированного теста рекальцификации плазмы. К субстратной МЧ-плазме добавляли МЧ в количестве $1,5 \times 10^7$ и регистрировали лаг-фазу и максимальную скорость свертывания (V_{макс}). Приведены средние ± стандартные отклонения, в скобках количество препаратов МЧ (n). p(ЭР1), p(ЭР2), p(ТЦ) – достоверности отличий от групп (эритроциты, A23187 (ЭР1); эритроциты, эритроцитарная масса (ЭР2); и тромбоциты (ТЦ), соответственно (t-критерий Стьюдента)). Лаг-фаза и V_{макс} для МЧ-плазмы составили 23,3±5,8 мин и 8,5±2,0 %A450/мин (n = 23); достоверность отличий обоих показателей от показателей в присутствии любых МЧ – p≤0,001.

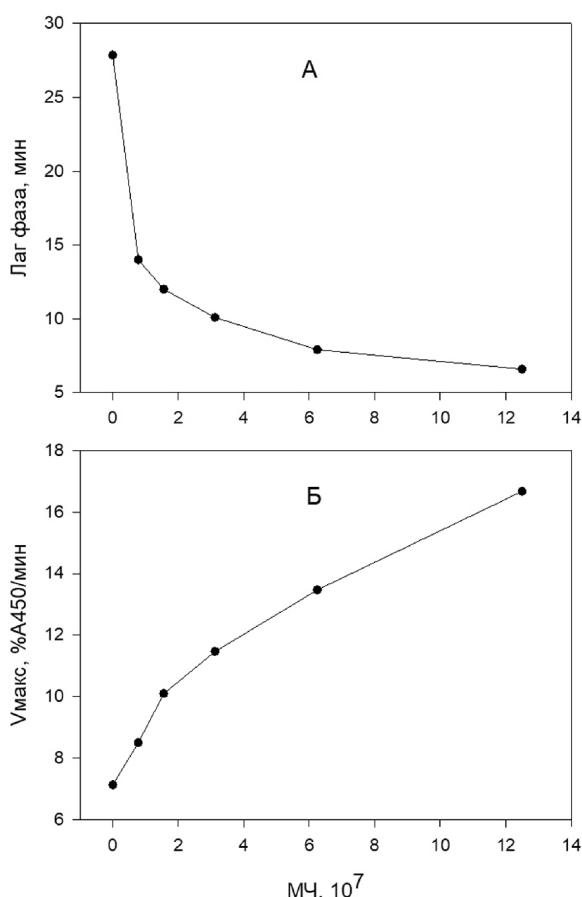


Рисунок 3. Ускорение свертывания плазмы МЧ эритроцитов (активация A23187). К МЧ-плазме добавляли различные количества МЧ эритроцитов и регистрировали лаг-фазу (А) и максимальную скорость свертывания (Б) в тесте рекальцификации. Представлены средние результаты из 3 экспериментов.

По способности ускорять свертывание плазмы МЧ эритроцитов уступали МЧ тромбоцитов и МЧ моноцитарных клеток ТНР-1 (табл. 1). При добавлении МЧ эритроцитов наблюдалась более длительная лаг-фаза и меньшая максимальная скорость свертывания, чем при добавлении таких же количеств МЧ тромбоцитов и клеток ТНР-1. При этом МЧ клеток ТНР-1 обладали наиболее высокой коагуляционной активностью (наиболее короткая лаг-фаза и наиболее высокая максимальная скорость). В связи с тем, что ионофор A23187 является искусственным и не физиологическим индуктором, мы также провели измерения свертывания плазмы в присутствии МЧ, образующихся при хранении эритроцитарной массы для переливания крови. Как видно из таблицы 1, они также, как и МЧ из активированных A23187 эритроцитов, обладали меньшей активностью, чем МЧ тромбоцитов и тем более МЧ клеток ТНР-1. Тем не менее, нужно учитывать, что МЧ из эритроцитарной массы, во-первых, могли содержать небольшие примеси эндогенных МЧ плазмы крови другого клеточного происхождения и, во-вторых, длительное время (более 42 дней) в условиях *in vitro* находились в контакте с белками плазмы и, в том числе, с белками, участвующими в реакциях свертывания крови. Оба фактора могли в какой-то степени повлиять на коагуляционные свойства этого типа МЧ (тенденция к более короткой лаг-фазе и более высокой максимальной скорости свертывания по сравнению с МЧ из активированных A23187 эритроцитов).

Коагуляционная активность МЧ эритроцитов, так же как и МЧ тромбоцитов и клеток ТНР-1, полностью подавлялась блокатором ФС, лактадгерином (рис. 2), что свидетельствует о ключевой роли ФС

в МЧ-зависимых свёртывающих реакциях. В то же время блокирующие антитела против ТФ не влияли на способность МЧ эритроцитов к ускорению свёртывания плазмы (рис. 2). Антитела против ТФ также не влияли на свёртывание плазмы в присутствии МЧ тромбоцитов, но частично ингибировали эффекты МЧ клеток ТНР-1 (анти-ТФ антитела значимо удлиняли лаг фазу свёртывания). В соответствии с этими данными, мы не выявили активности ТФ (способность активировать фактор X) в МЧ эритроцитов и тромбоцитов, но зарегистрировали её в МЧ клеток ТНР-1 (табл. 2).

Результаты по анализу действия МЧ тромбоцитов и клеток ТНР-1 (с которыми сравнивали МЧ эритроцитов) на свёртывание плазмы, в том числе в присутствии лактадгерина и анти-ТФ антител, и по определению в них активности ТФ полностью подтвердили данные, полученные нами ранее [9, 10]. Другие авторы, которые использовали ингибиторы ТФ в тесте генерации тромбина и проводили прямое измерение активности ТФ, также продемонстрировали наличие ТФ в МЧ клеток ТНР-1, но не в МЧ тромбоцитов [4, 11, 12]. Отсутствие ТФ в МЧ эритроцитов было также отмечено и в двух других работах [12, 14].

Измерения размеров МЧ с помощью метода динамического светорассеивания показали, что МЧ эритроцитов (как из активированных A23187 эритроцитов, так и из эритроцитарной массы) существенно мельче, чем МЧ тромбоцитов и клеток ТНР-1 – средний диаметр около 200 нм и около 400 нм, соответственно (табл. 3). В соответствии с данными, опубликованными нами ранее, МЧ эритроцитов существенно мельче не только МЧ тромбоцитов и клеток ТНР-1, но и ещё более крупных МЧ моноцитов крови (диаметр около 500 нм), нейтрофилов и эндотелиальных клеток (диаметр около 600 нм) [10, 13]. Размеры МЧ эритроцитов

Таблица 2. Количество активного ТФ в МЧ различных клеток.

Источник МЧ, количество МЧ ¹	Активный ТФ, фмоль на 10 ⁸ МЧ
Эритроциты, A23187 МЧ = 5×10 ⁸	0 (n=4)
Эритроциты, эритроцитарная масса МЧ = 5×10 ⁸	0 (n=3)
Тромбоциты МЧ = 1×10 ⁸	0 (n=4)
ТНР-1 клетки МЧ = 0,5×10 ⁸	1,49±1,24 (n=6)

Примечание. Количество активного ТФ в МЧ различного происхождения определяли по его способности активировать фактор X с помощью хромогенного теста. 1 – Количество МЧ в анализируемых образцах. Представлены средние ± стандартные отклонения для активного ТФ в МЧ, в скобках количество препаратов МЧ (n). 0 – Ниже порога чувствительности метода (<0,02 фмоль).

Таблица 3. Размеры МЧ различного происхождения

Источник МЧ	Средний диаметр МЧ, нм
Эритроциты, A23187 (ЭР1)	213±14 (n=9)
Эритроциты, эритроцитарная масса (ЭР2)	225±26 (n=7) p(ЭР1)<0,277
Тромбоциты (ТЦ)	382±56 (n=10) p(ЭР1)<0,001 p(ЭР2)<0,001
Монокитарные клетки ТНР-1 (ТНР)	410±35 (n=7) p(ЭР1)<0,001 p(ЭР2)<0,001 p(ТЦ)=0,276

Примечание. Размер (средний диаметр) МЧ различного происхождения определяли методом динамического светорассеивания. Представлены средние ± стандартные отклонения, в скобках указано количество препаратов МЧ (n). p(ЭР1), p(ЭР2), p(ТЦ) – достоверности отличий от групп эритроциты, A23187 (ЭР1), эритроциты, эритроцитарная масса (ЭР2) и тромбоциты (ТЦ), соответственно (t-критерий Стьюдента).

в диапазоне 200 нм были зарегистрированы и в других работах, как с использованием метода динамического светорассеивания, так и микроскопических методов (электронная и атомная силовая микроскопия) [15-17]. Таким образом, при прямом сравнении МЧ эритроцитов оказались существенно мельче МЧ тромбоцитов и клеток ТНР-1 (средний диаметр приблизительно в два раза меньше), и, очевидно, это могло быть одной из причин сравнительно более низкой коагуляционной активности МЧ эритроцитов при нормировке на количество добавляемых к плазме МЧ (наряду с отсутствием ТФ при сравнении с МЧ клеток ТНР-1).

Сравнение коагуляционной активности МЧ эритроцитов (продуцируемых эритроцитами, активированными A23187), тромбоцитов и клеток ТНР-1 было выполнено ранее Van Der Meijden и соавт. [12], использовавшими для этих целей тест генерации тромбина. Эти авторы ожидаемо зарегистрировали наиболее высокую активность в МЧ клеток ТНР-1, которая определялась присутствием в них активного ТФ. В то же время, они не обнаружили значимых различий между МЧ эритроцитов и тромбоцитов. Однако эти авторы проводили сравнение активности МЧ, учитывая не их количество, а активность фосфатидилсерина в МЧ. Возможно, они предполагали, что при подсчёте с помощью проточной цитометрии существенно занижали количество МЧ эритроцитов. Для подсчёта МЧ Van Der Meijden и соавт. использовали менее чувствительный цитометр BD FACS Calibur (по сравнению с BD FACS Canto II, использованным в настоящей работе) и учитывали лишь частицы,

сильноокрашенные флуоресцентно мечеными аннексином V и CD235a антителами (маркер эритроцитов), применяя отсечение по неокрашенным частицам. Этот метод достаточно корректен для сравнительного подсчёта крупных МЧ (в том числе тромбоцитов и клеток ТНР-1), но, по-видимому, не подходит для подсчёта МЧ эритроцитов, многие из которых в силу их очень небольшого размера не в состоянии связать достаточное количество флуоресцентного маркера для преодоления порога отсечения по неокрашенным частицам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Микрочастицы эритроцитов обладают меньшей способностью ускорять свёртывание плазмы по сравнению с МЧ тромбоцитов и моноцитарных клеток ТНР-1. Микрочастицы эритроцитов оказались мельче МЧ тромбоцитов и клеток ТНР-1. Более низкая коагуляционная активность МЧ эритроцитов по сравнению с клетками ТНР-1 обусловлена отсутствием в МЧ эритроцитов ТФ (в отличие от МЧ клеток ТНР-1) и их более мелким размером, а по сравнению с МЧ тромбоцитов (также не содержащими ТФ) – их более мелким размером.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность М.А. Овчинникову (Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии, Москва) за предоставление TRAP и Г.В. Шехватовой (Институт белка, Пушкино) за предоставление СТИ.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа была выполнена при поддержке гранта РФФИ № 17-04-00347.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все доноры предоставили добровольное информированное согласие на использование их образцов крови в исследовательских целях. Проведение исследования было одобрено этическим комитетом Национального медицинского исследовательского центра кардиологии (Москва).

ЛИТЕРАТУРА

1. Raposo G., Stoorvogel W. (2013) J. Cell. Biol., **200**, 373-383.
2. Lawson C., Vicencio J.M., Yellon D.M., Davidson S.M. (2016) J. Endocrinol., **228**, R57-R71.
3. Heijnen H., Schiel A., Fijnheer R., Geuze H., Sixma J. (1999) Blood, **94**, 3791-3799.
4. Tripisciano C., Weiss R., Eichhorn T., Spittler A., Heuser T., Fischer M.B., Weber V. (2017) Sci. Rep., **7**(1), 6522.
5. Skotland T., Hessvik N.P., Sandvig K., Llorente A. (2019) J. Lipid Res., **60**, 9-18.
6. Owens A.P. 3rd, Mackman N. (2011) Circ Res., **108**, 1284-1297.
7. Lacroix R., Dubois C., Leroyer A.S., Sabatier F., Dignat-George F. (2013) J. Thromb. Haemost., **11** Suppl 1, 24-35.
8. Mooberry M.J., Key N.S. (2016) Cytometry A., **89**, 111-122.
9. Хаспекова С.Г., Антонова О.А., Шустова О.Н., Якушкин В.В., Голубева Н.В., Титаева Е.В., Добровольский А.Б., Мазуров А.В. (2016) Биохимия, **81**, 206-214. [Khaspekova S.G., Antonova O.A., Shustova O.N., Yakushkin V.V., Golubeva N.V., Titaeva E.V., Dobrovolsky A.B., Mazurov A.V. (2016) Biochemistry (Moscow), **81**, 114-121.]
10. Shustova O.N., Antonova O.A., Golubeva N.V., Khaspekova S.G., Yakushkin V.V., Aksuk S.A., Alchinova I.B., Karganov M.Y., Mazurov A.V. (2017) Blood Coagul. Fibrinolys., **28**, 373-382.
11. Aleman M.M., Gardiner C., Harrison P., Wolberg A.S. (2011) J. Thromb. Haemost., **9**, 2251-2261.
12. Van Der Meijden P.E., Van Schilfgaarde M., Van Oerle R., Renné T., ten Cate H., Spronk H.M. (2012) J. Thromb. Haemost., **10**, 1355-1362.
13. Алчинова И.Б., Хаспекова С.Г., Голубева Н.В., Шустова О.Н., Антонова О.А., Карганов М.Ю., Мазуров А.В. (2016) Доклады Академии Наук., **470**, 223-226. [Alchinova I.B., Khaspekova S.G., Golubeva N.V., Shustova O.N., Antonova O.A., Karganov M.Yu., Mazurov A.V. (2016) Dokl. Biochem. Biophys., **470**, 322-325.]
14. Rubin O., Delobel J., Prudent M., Lion N., Kohl K., Tucker E.I., Tissot J.-D., Angelillo-Scherrer A. (2013) Transfusion., **53**, 1744-1754.
15. Allan D., Thomas P., Limbrick A.R. (1980) Biochem. J., **188**, 881-887.
16. Salzer U., Hinterdorfer P., Hunger U., Borken C., Prohaska R. (2002) Blood, **99**, 2569-2577.
17. Nguyen D.B., Ly T.B.T., Wesseling M.C., Hittinger M., Torge A., Devitt A., Perrie Y., Bernhardt I. (2016) Cell Physiol. Biochem., **38**, 1085-1099.

Поступила в редакцию: 02. 01. 2019.
После доработки: 10. 02. 2019.
Принята к печати: 16. 02. 2019.

COAGULATION PROPERTIES OF ERYTHROCYTE DERIVED MEMBRANE MICROPARTICLES

*O.A. Antonova¹, O.N. Shustova¹, N.V. Golubeva¹, V.V. Yakushkin¹,
I.B. Alchinova², M.Y. Karganov², A.V. Mazurov^{1*}*

¹National Medical Research Center for Cardiology,
15, 3-rd Cherpkovskaya str., Moscow, 121552 Russia; *e-mail: avmazurov@list.ru

²Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russia

Membrane microparticles (MP) produced upon cell activation and/or damage possess coagulation activity, i.e. ability to accelerate blood clotting. They contain on their surface phosphatidylserine (PS), a substrate for assembling coagulation enzymatic complexes, and some of them tissue factor (TF), the initiator of clotting cascade reactions. In this study coagulation properties of MP derived from erythrocytes have been investigated. These MP were obtained from donor's erythrocytes activated with ionophore A23187 as well as from outdated erythrocyte concentrates for transfusion. MP were counted by flow cytometry. Coagulation activity of MP was examined by modified plasma recalcification assay. Involvement of PS and TF in this reaction was assessed using PS blocker lactadherin and anti-TF antibodies. TF activity in MP was measured by its ability to activate factor X in a chromogenic assay. Size of MP was evaluated by dynamic light scattering. Properties of erythrocyte MP were compared with previously characterized (using the same methodological approaches) MP derived from platelets and monocytic THP-1 cells, lacking and containing TF, respectively. Erythrocyte MP accelerated plasma clotting, but less actively than MP from platelets and MP from THP-1 cells, which demonstrated maximal activity. Lactadherin completely inhibited coagulation activity of all MP. Anti-TF antibodies did not affect clotting parameters in the presence of platelet and erythrocyte MP, but slowed clotting in the presence of MP from THP-1 cells. TF activity was not detected in erythrocyte and platelet MP, unlike MP from THP-1 cells expressing active TF. MP derived from erythrocytes were smaller than MP from platelets and THP-1 cells, with average diameter about 200 nm and 400 nm respectively. Thus, MP from erythrocyte possess less ability to accelerate plasma clotting in comparison with MP from platelet and THP-1 cells. The data obtained suggest that lesser coagulation activity of erythrocyte MP in comparison with MP from THP-1 cells is due to the absence of TF in erythrocyte MP (in contrast to MP from THP-1 cells) and to their smaller size, and in comparison with MP from platelets (which as erythrocyte MP do not express TF) is due to their smaller size only.

Key words: membrane microparticles; blood coagulation; tissue factor; erythrocytes; platelets; monocytes

Funding. This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (grant # 17-04-00347).

Received: 02.01.2019, revised: 10.02.2019, accepted: 16.02.2019.