

## КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

©Коллектив авторов

### КОАГУЛЯЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ МЕМБРАННЫХ МИКРОЧАСТИЦ У ПАЦИЕНТОВ С СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

*О.А. Антонова\*, Н.В. Голубева, В.В. Якушкин, И.Т. Зюряев,  
Е.Н. Кривошеева, А.Л. Комаров, Т.В. Мартынюк, А.В. Мазуров*

Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии им. академика Е.И. Чазова,  
121552 Москва, ул. 3-я Черепковская, 15а; \*эл. почта: loa\_lu@mail.ru

Мембранные микрочастицы (МЧ) высвобождаются активированными или повреждёнными клетками и обладают способностью ускорять свёртывание (коагуляцию) крови. Коагуляционная активность МЧ определяется тем, что все они содержат на своей поверхности фосфатидилсерин (ФС), который служит субстратом для сборки коагуляционных комплексов, а некоторые из них тканевой фактор (ТФ) — первичный инициатор реакций коагуляционного каскада. Мы сравнивали коагуляционную активность и количество МЧ в крови здоровых доноров ( $n=34$ ) и пациентов с инфарктом миокарда (ИМ) ( $n=32$ ), распространенным атеросклерозом (РА) ( $n=32$ ) и идиопатической лёгочной артериальной гипертензией (ИЛАГ) ( $n=19$ ). Общую фракцию МЧ из плазмы крови получали осаждением при 20000 g, 30 мин. Концентрацию МЧ и степень экспрессии на их поверхности ФС определяли методом проточной цитометрии. Коагуляционную активность МЧ оценивали с помощью модифицированного теста рекальцификации плазмы. Концентрация МЧ по сравнению со здоровыми донорами была выше у пациентов с РА, ниже у пациентов с ИМ и достоверно не отличалась у пациентов с ИЛАГ. МЧ во всех группах пациентов ускоряли свёртывание плазмы эффективнее, чем МЧ здоровых доноров. Лаг-фаза у пациентов с РА, ИМ и ИЛАГ была короче по сравнению со здоровыми донорами, а  $V_{\text{макс}}$  в сравнении с здоровыми донорами была выше у пациентов с РА и ИЛАГ, но не ИМ. Во всех группах пациентов отмечена достоверная корреляция между концентрацией МЧ и параметрами 1/лаг-фаза и  $V_{\text{макс}}$  свёртывания плазмы. Полученные данные показывают, что увеличение общей коагуляционной активности МЧ может быть объяснено повышением их концентрации только у пациентов с ИМ. Поскольку анти-ТФ антитела не изменяли параметры свёртывания в присутствии МЧ как здоровых доноров, так и пациентов, ТФ, очевидно, не участвует в реализации коагуляционных свойств тестируемых МЧ. В то же время во всех группах пациентов наблюдали достоверное увеличение экспрессии ФС на поверхности МЧ по сравнению со здоровыми донорами, что может быть одной из причин их повышенной коагуляционной активности.

**Ключевые слова:** мембранные микрочастицы; коагуляция крови; инфаркт миокарда; атеросклероз; лёгочная гипертензия

**DOI:** 10.18097/PBMC20226804288

## ВВЕДЕНИЕ

Мембранные микрочастицы (МЧ) (другие названия — микровезикулы или экзосомы) представляют собой замкнутые фрагменты плазматической мембраны диаметром от 100 нм до 1000 нм, которые отделяются от активированных или повреждённых (апоптотических) клеток. Циркулирующие в крови МЧ образуются всеми клетками крови (эритроцитами, тромбоцитами, лейкоцитами), а также эндотелиальными клетками сосудистой стенки. МЧ обладают способностью ускорять свёртывание (коагуляцию) крови. Это обусловлено тем, что все они содержат на своей поверхности фосфатидилсерин (ФС), служащий субстратом для сборки ферментативных коагуляционных комплексов, а некоторые виды МЧ (например, МЧ моноцитов) могут содержать тканевой фактор (ТФ) — первичный инициатор реакций коагуляционного каскада [1-4]. Ранее нами и другими авторами была продемонстрирована коагуляционная активность МЧ отдельных видов клеток с помощью таких методических подходов, как тесты рекальцификации плазмы и генерации тромбина, тест “тромбодинамика” и другие более сложные методики [4-8].

Изменения как общего количества МЧ, так и МЧ различного клеточного происхождения наблюдаются при патологиях, связанных с активацией и повреждением клеток сосудистого русла, в частности, при некоторых сердечно-сосудистых заболеваниях (ССЗ). Многие авторы отмечали повышение количества циркулирующих МЧ при инфаркте миокарда (ИМ) и нестабильной стенокардии (острый коронарный синдром, ОКС). Такие наблюдения были проведены как для общей фракции МЧ [9], так и для отдельных фракций МЧ тромбоцитов [9-11], моноцитов [12, 13], эритроцитов [14, 15] и эндотелиальных клеток [9, 12, 16]. Следует отметить, что наличие повышенного уровня МЧ существенно зависело от времени определения МЧ по отношению к развитию ОКС [9, 10]. У больных с периферическим атеросклерозом были зарегистрированы повышения МЧ тромбоцитов и эндотелиальных клеток [17, 18]. Специфическое повышение эндотелиальных МЧ было отмечено у наиболее тяжёлых больных с лёгочной гипертензией [19]. В то же время, несмотря на большое количество работ по изучению изменений содержания МЧ при различных патологических состояниях, коагуляционная активность МЧ, непосредственно изолированных из крови пациентов, остаётся малоизученной.

В настоящей работе мы сравнили коагуляционную активность и количество суммарных МЧ в крови здоровых доноров и пациентов с несколькими ССЗ: распространенным атеросклерозом (РА), инфарктом миокарда (ИМ) и идиопатической лёгочной артериальной гипертензией (ИЛАГ).

## МЕТОДИКА

### Здоровые доноры и пациенты

В исследование было включено 34 здоровых донора без клинических признаков каких-либо заболеваний и не принимающих лекарственные препараты, 32 пациента с РА, 32 пациента с ИМ и 19 пациентов с ИЛАГ (табл. 1). Все пациенты находились на лечении в Национальном медицинском исследовательском центре кардиологии им. Е.И. Чазова.

Таблица 1. Распределение здоровых доноров (ЗД) и пациентов с ССЗ по полу и возрасту

|      | Возраст, лет  | Мужчины/женщины  |
|------|---|--|
| ЗД   | 39±18   | 13/21  |
| РА   | 66±11<br><i>p</i> (ЗД) < 0,001  | 25/7<br><i>p</i> (ЗД) = 0,001  |
| ИМ   | 65±9<br><i>p</i> (ЗД) < 0,001<br><i>p</i> (РА) = <b>0,626</b>                           | 19/13<br><i>p</i> (ЗД) = 0,09<br><i>p</i> (РА) = <b>0,106</b>                          |
| ИЛАГ | 37±10<br><i>p</i> (ЗД) = <b>0,571</b><br><i>p</i> (РА) < 0,001<br><i>p</i> (ИМ) < 0,001 | 4/15<br><i>p</i> (ЗД) = <b>0,199</b><br><i>p</i> (РА) < 0,001<br><i>p</i> (ИМ) = 0,008 |

Примечание. Представлены средние ± стандартные отклонения (возраст) и достоверности отличий от соответствующих групп. Жирным выделено отсутствие достоверных различий.

Группу с РА составили больные со стабильными проявлениями ишемической болезни сердца, диагноз которой устанавливали при наличии хотя бы одного критерия: (1) документированная ишемия миокарда при выполнении нагрузочных проб, (2) стеноз коронарной артерии ≥50% по данным ангиографии, (3) предшествующая реваскуляризация миокарда (чрескожное коронарное вмешательство или коронарное шунтирование), (4) перенесённый эпизод ОКС (>6 месяцев до включения). Обязательным дополнительным условием для включения было атеросклеротическое поражение любого периферического сосудистого бассейна в соответствии с одним из следующих критериев: (1) симптомное атеросклеротическое поражение артерий нижних конечностей (пережимающаяся хромота), подтверждённое низким значением лодыжечно-плечевого индекса (<0,9) и/или наличием стеноза ≥50% по данным дуплексного сканирования, (2) атеросклеротическое поражение брахиоцефальных артерий со стенозом ≥50% по данным дуплексного сканирования, (3) предшествующая реваскуляризация артерий нижних конечностей и/или брахиоцефальных артерий. Проводимая антитромботическая терапия

у 23 пациентов включала монотерапию ацетилсалициловой кислотой и у 5 пациентов комбинацию ацетилсалициловой кислоты с клопидогрелом. Трое больных получали пероральные антикоагулянты, но их применение было временно прекращено во время проведения исследования, и 1 больной не получал никакой антитромботической терапии.

У всех больных с ИМ, включённых в исследование, диагностировали ИМ с подъёмом сегмента ST на основании следующих критериев: (1) типичный ангинозный приступ, (2) стойкая (не менее 20 мин) элевация сегмента ST, (3) повышение маркеров некроза миокарда (сердечный тропонин). Всем больным в первые сутки было выполнено чрескожное коронарное вмешательство со стентированием. Кровь для исследования у больных собирали на 3-5 сутки после развития ИМ. В этот период все больные получали двойную антитромбоцитарную терапию: ацетилсалициловую кислоту в сочетании с одним из антагонистов P2Y<sub>12</sub> рецепторов ADP (клопидогрел или тикагрелор), но никто из больных не получал гепарин или другие антикоагулянты. Кроме антиагрегантов, всем больным назначалась стандартная терапия, включающая бета-адреноблокаторы, ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента, статины и другие препараты по индивидуальному назначению.

Диагноз ИЛАГ у всех больных, включённых в исследование, устанавливали в результате комплексного обследования, включавшего катетеризацию правых отделов сердца, в соответствии с современными рекомендациями по диагностике и лечению лёгочной гипертензии [20]. Все пациенты с ИЛАГ в качестве антитромботической терапии получали ацетилсалициловую кислоту; никто из больных во время проведения исследования не получал антикоагулянты. Для лечения лёгочной гипертензии 10 пациентов получали антагонисты рецепторов эндотелина (из них 2 в сочетании с силденафилом) и 9 больных — стимулятор гуанилат циклазы риоцигуат; 10 больных в качестве сопутствующей терапии получали диуретики.

### Получение МЧ

Метод получения МЧ соответствовал последним рекомендациям Международного общества по изучению внеклеточных частиц (International Society for Extracellular Vesicles) [21]. Кровь здоровых лиц и пациентов отбирали из локтевой вены самотёком в пробирку с антикоагулянтом (3,8% цитрат натрия), в соотношении кровь/антикоагулянт : 9/1. Плазму получали двойным центрифугированием крови при 2500 g, 15 мин. МЧ из плазмы осаждали центрифугированием 20000 g, 30 мин при 4°C и ресуспендировали в предварительно фильтрованном буфере (фильтры d=0,1 мкм Millex, Durapore, “Merck Millipore Ltd.”, США), содержащем 150 mM NaCl, 10 mM HEPES, pH 7,4 и 1% БСА (NaCl/HEPES/БСА). Объём буфера был эквивалентен объёму плазмы, из которой осаждали МЧ. Аликвоты МЧ замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C не более 6 месяцев.

*Анализ МЧ методом проточной цитофлуориметрии*

Подсчёт МЧ проводили с помощью проточной цитофлуориметрии, как подробно описано нами ранее для МЧ тромбоцитов [22] и других клеток [23] с некоторыми модификациями. Суспензию МЧ размораживали при 37°C, 5 мкл суспензии смешивали с 10 мкл фосфатно-солевого буфера с ЭДТА (ФСБ/ЭДТА, 150 mM NaCl, 10 mM фосфата натрия, 5 mM ЭДТА, pH 7,4), добавляли 0,5 мкл лактадгерина-FITC ("Haematologic Technologies", США) и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре в темноте. После инкубации объём пробы доводили до 300 мкл ФСБ/ЭДТА и анализировали МЧ на проточном цитометре FACSCanto II ("Becton Dickinson", США). Для определения области ("гейта") МЧ использовали стандартные калибровочные частицы диаметром 1 мкм (Flow cytometry Sub-Micron Size reference Kit, "Invitrogen, Life Technologies Corp.", США). Непосредственно перед анализом в пробу вносили 5 мкл частиц с известной концентрацией (MP-Count Beads, "BioCytex, Stago", Франция). В качестве отрицательного контроля использовали 5 мкл раствора NaCl/HEPES/BCA без МЧ и готовили пробу также, как и с МЧ, включая добавление лактадгерина-FITC. При подсчёте МЧ учитывали частицы (1) размером менее 1 мкм; (2) с флуоресценцией лактадгерин-FITC выше отрицательного контроля. Сбор и анализ данных проводили с использованием программного обеспечения CELLQuestO ("Becton Dickinson"). Концентрацию МЧ в 1 мкл пробы считали по формуле: (количество МЧ лактадгерин-FITC+) × (концентрация MP-Count Beads)/1000. Поскольку МЧ исходно ресуспендировали в объёме, эквивалентном начальному объёму плазмы, то полученная концентрация соответствовала их концентрации в плазме доноров и пациентов. Также в процессе анализа у 22 здоровых доноров из 34 и у всех пациентов, вошедших в исследование, определяли медиану флуоресценции лактадгерин-FITC (отражающую содержание ФС) в пиках флуоресценции МЧ.

*Определение коагуляционной активности МЧ в модифицированном тесте рекальцификации плазмы*

Коагуляционную активность МЧ определяли с помощью теста рекальцификации плазмы, как было описано нами ранее для МЧ отдельных видов клеток [5, 22, 23] с некоторыми модификациями. Субстратную плазму готовили из крови 3–4 здоровых доноров. Кровь отбирали из локтевой вены самотёком в пробирку с антикоагулянтом (3,8% цитрат натрия), в соотношении кровь/антикоагулянт : 9/1. Плазму получали двойным центрифугированием при 2500 g, 15 мин. Далее плазму от разных доноров объединяли и для удаления эндогенных МЧ центрифугировали при 20000 g, 90 мин при 4°C. Субстратную плазму, лишённую эндогенных МЧ, замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C. Для анализа субстратную плазму и МЧ размораживали при 37°C.

Размороженные МЧ осаждали при 20000 g, 30 мин при 4°C и ресуспендировали в субстратной плазме в объёме в 2 раза меньшем изначальной, концентрируя тем самым МЧ в 2 раза. Во всех экспериментах для проведения теста использовали 50 мкл суспендированных МЧ, что соответствовало количеству МЧ, полученным из 100 мкл плазмы здоровых доноров и пациентов. К 50 мкл образца субстратной плазмы с МЧ или без МЧ добавляли 50 мкл буфера Owren-Koller ("Diagnostic Stago", Франция), в который для частичного ингибирования контактной активации свёртывания добавляли ингибитор трипсина кукурузы в конечной концентрации 150 мкг/мл. Подготовленные таким образом образцы помещали в ячейки предварительно силиконизированного круглодонного планшета Costar ("Corning Inc.", США), инкубировали в течение 5 мин в планшетном термостате Shaker Thermostat ST-3M ("Elmi", Латвия) при 30°C и перемешивании 300 об/мин. Затем вносили в ячейки по 50 мкл 25 mM CaCl<sub>2</sub> ("Diagnostic Stago") и помещали планшет в планшетный спектрофотометр Thermo Scientific Multiscan Go ("Thermo Fisher Scientific", Финляндия). Свёртывание плазмы регистрировали при 30°C по изменению поглощения при 450 нм (A<sub>450</sub>) с интервалом в 30 с в течение 60 мин. Кривые свёртывания анализировали с помощью программы Microsoft Excel 2010 ("Microsoft", США), определяя следующие параметры: (1) лаг-фазу коагуляции в мин, которую регистрировали как время достижения 5% от общего изменения A<sub>450</sub> за время измерения (A<sub>0</sub>+ΔA(60 мин)×0,05; где A<sub>0</sub> — значение A<sub>450</sub> в первой точке измерения, а ΔA(60 мин) — общий прирост A<sub>450</sub> за 60 мин); (2) максимальную скорость коагуляции (V<sub>макс</sub>, в % A<sub>450</sub> в мин), которую рассчитывали по формуле ΔA(30 с)макс.×2/ΔA(60 мин)/100%; где ΔA(30 сек)макс. — максимальный прирост A<sub>450</sub> за 30 с (интервал между измерениями), ΔA(60 мин) — общий прирост A<sub>450</sub> за 60 мин. Все измерения проводили в трёхкратных повторях, используя для анализа средние величины.

*Статистическая обработка*

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica 12. Концентрация МЧ и параметры свёртывания плазмы в тесте рекальцификации плазмы во всех группах имели ненормальное распределение, и их анализ проводили с помощью непараметрической статистики. Данные были представлены как медианы [25%-75%], различия между группами оценивали с помощью теста Манна-Уитни, а корреляционные взаимосвязи между концентрацией МЧ и параметрами свёртывания определяли с помощью критерия Спирмана. Вариации возраста доноров и пациентов имели нормальное распределение, и этот показатель был представлен как средние ± стандартное отклонение, а различия между группами оценивали с помощью *t*-теста Стьюдента для средних. Различия по распределению между мужчинами и женщинами в разных группах оценивали с помощью критерия Хи-квадрат. Различия считали значимыми при *p*<0,05.

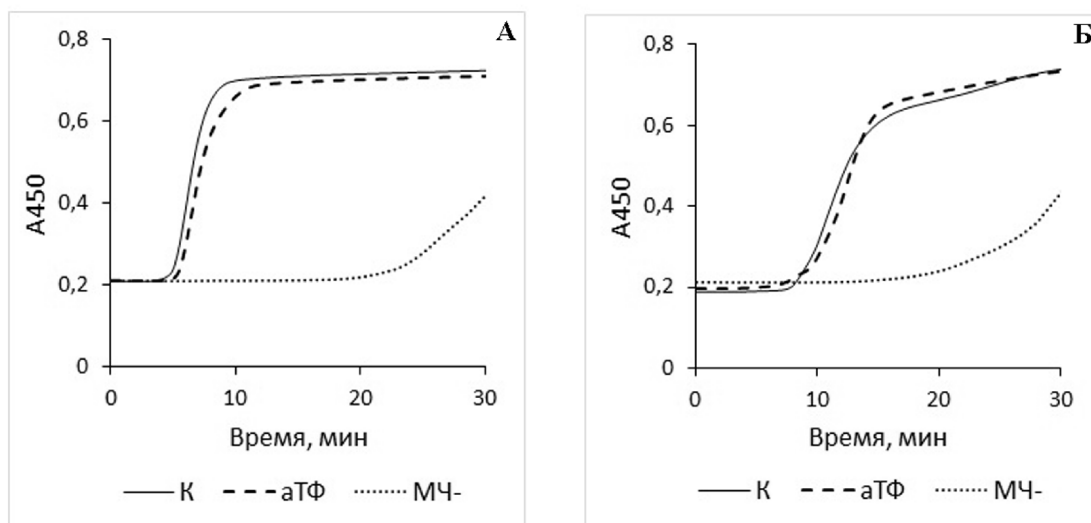
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В таблице 1 представлено распределение здоровых доноров и пациентов из разных групп по возрасту и полу. Как видно из этой таблицы, достоверных отличий по этим параметрам не было между здоровыми донорами и больными с ИЛАГ, а также между больными с РА и ИМ. В то же время больные с РА и ИМ, по сравнению со здоровыми донорами, были старше и в этих группах было больше лиц мужского пола, что могло быть потенциальным ограничением данного исследования. Однако анализ полученных данных не выявил никаких различий в изучаемых показателях между мужчинами и женщинами ни у здоровых доноров, ни в одной из групп пациентов. Также не было обнаружено признаков корреляционных взаимосвязей между изучаемыми показателями и возрастом здоровых доноров и пациентов во всех группах. В связи с этим мы сочли возможным проводить сравнение характеристик МЧ не только между здоровыми донорами и пациентами с ИЛАГ, но и между здоровыми донорами и пациентами с РА и ИМ. Подавляющее большинство больных во всех группах получали антитромбоцитарные препараты: или только ацетилсалициловую кислоту (часть больных с РА и все больные с ИЛАГ), или ацетилсалициловую кислоту с одним из ингибиторов P2Y<sub>12</sub> ADP — клопидогрелом или тикагрелором (часть больных с РА и все больные с ИМ). Во время проведения исследования никто из больных не получал антикоагулянты (они либо не были назначены, либо временно отменены).

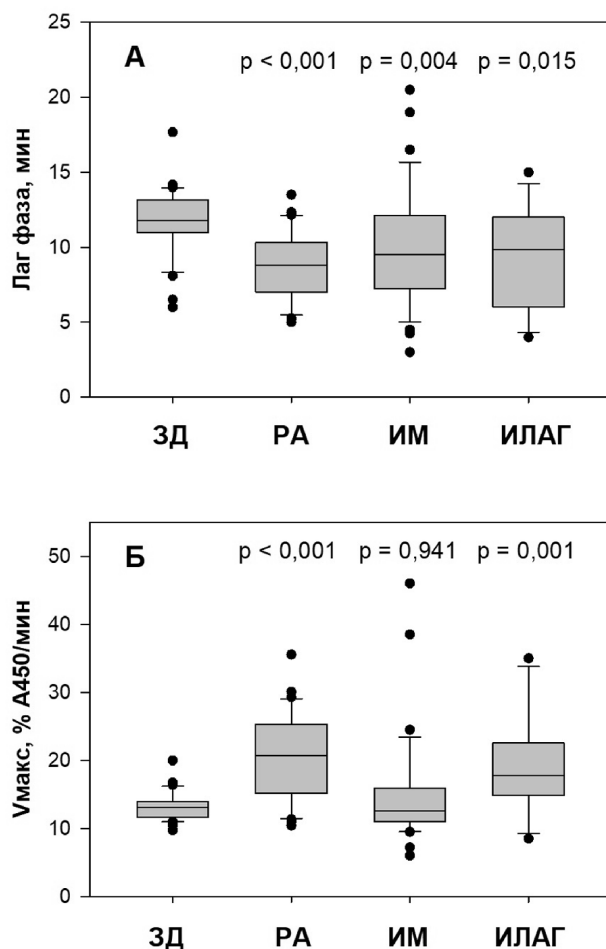
Как видно из примеров кривых рекальцификации, представленных на рисунке 1, МЧ существенно ускоряли свёртывание плазмы по сравнению с образцами без МЧ. Коагуляционная активность суммарной фракции МЧ была выше у всех групп пациентов по сравнению со здоровыми донорами (рис. 2). Лаг-фаза свёртывания по сравнению с донорами (11,8 [11,0-13,1] мин) была короче

пациентов с РА (8,8 [7,0-10,3] мин,  $p<0,001$ ), ИМ (9,5 [7,3-12,1] мин,  $p=0,004$ ) и ИЛАГ (9,8 [6,0-12,0] мин,  $p=0,015$ ). Максимальная скорость свёртывания ( $V_{\text{макс}}$ ) в сравнении с донорами (13,1 [11,7-13,9] %A<sub>450</sub>/мин) была выше у пациентов с РА (20,8 [15,2-25,3] %A<sub>450</sub>/мин,  $p<0,001$ ), ИЛАГ (17,8 [14,9-22,5] %A<sub>450</sub>/мин,  $p=0,001$ ), и лишь у пациентов с ИМ не было зарегистрировано существенных различий (12,6 [11,1-15,7] %A<sub>450</sub>/мин,  $p=0,941$ ). Пациенты с РА и ИМ не отличались по показателю лаг-фазы свёртывания, однако у пациентов с РА была достоверно выше максимальная скорость свёртывания ( $V_{\text{макс}}$ ,  $p<0,001$ ).

На рисунке 3 представлены сравнения концентрации МЧ в плазме доноров и пациентов. Концентрация МЧ по сравнению с донорами (0,59 [0,34-0,78], 10<sup>5</sup>/мкл) была выше у пациентов с РА (0,74 [0,50-1,18], 10<sup>5</sup>/мкл,  $p=0,004$ ), ниже у пациентов с ИМ (0,29 [0,23-0,55] 10<sup>5</sup>/мкл,  $p<0,001$ ), и достоверно не отличалась у пациентов с ИЛАГ (0,43 [0,30-0,76], 10<sup>5</sup>/мкл,  $p=0,445$ ). У пациентов с РА концентрация МЧ в плазме была приблизительно в 2,5 раза выше, чем у пациентов с ИМ ( $p<0,001$ ). Таким образом, полученные данные указывают на то, что только у пациентов с РА повышение коагуляционной активности суммарной фракции МЧ можно объяснить их повышенной концентрацией. В то же время у пациентов с ИМ и ИЛАГ повышение способности МЧ ускорять свёртывающие реакции можно объяснить только увеличением их удельной коагуляционной активности. Повышение содержания суммарной фракции МЧ у пациентов с РА в целом соответствует наблюдениям других авторов, в которых было отмечено повышение у таких больных МЧ тромбоцитов и эндотелиальных клеток [17, 18]. Отсутствие повышения содержания МЧ у больных с ИМ несколько противоречит ранее опубликованным данным, зафиксировавшим повышение МЧ (как общей фракции, так и МЧ различного клеточного происхождения) у таких больных [9-16].

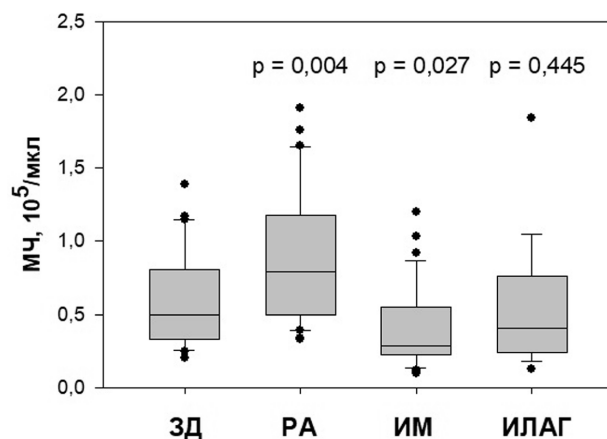


**Рисунок 1.** Примеры кривых свёртывания субстратной плазмы в присутствии МЧ пациента с МА (А) и с ИЛАГ (Б) без и с добавлением анти-ТФ антител. А и Б (К) – контроль без добавления анти-ТФ антител, (аТФ) – добавление 10 мкг/мл анти-ТФ антител, МЧ- – без МЧ.



**Рисунок 2.** Параметры свёртывания плазмы в присутствии МЧ здоровых доноров (ЗД) и пациентов с ССЗ. (А) – лаг-фаза свертывания, (Б) –  $V_{\text{макс}}$  свёртывания. А и Б. Представлены медианы (горизонтальные линии), 25%-75% (нижняя и верхняя границы прямоугольников) и отдельные значения ниже и выше 25% и 75% соответственно, а также достоверности отличий от группы здоровых доноров (ЗД). Достоверности отличий между группами РА и ИМ: лаг-фаза –  $p=0,423$ ;  $V_{\text{макс}}$  –  $p<0,001$ . Остальные отличия недостоверны.

Однако в работах, в которых проводилось исследование динамики изменений содержания МЧ у больных с ИМ [9, 10], было отмечено, что после первого дня развития ИМ содержание МЧ существенно уменьшается. В нашем исследовании забор крови осуществлялся на 3-5 день заболевания и, возможно, этим объясняется отсутствие повышенного уровня МЧ. Нельзя исключить, что это явление обусловлено активным “потреблением” МЧ, то есть включением их в состав локальных микросгустков и/или образовыванием таковых самостоятельно в первые несколько суток ИМ на фоне тромботического процесса и в ранний период после установки стента. Отсутствие повышения содержания МЧ у ранее неисследованных больных с ИЛАГ возможно также объясняется их высоким “потреблением” на фоне хронической эндотелиальной дисфункции.



**Рисунок 3.** Концентрация МЧ в плазме здоровых доноров (ЗД) и пациентов с ССЗ. Представлены медианы (горизонтальные линии), 25%-75% (нижняя и верхняя границы прямоугольников) и отдельные значения ниже и выше 25% и 75% соответственно, а также достоверности отличий от группы здоровых доноров (ЗД). Достоверность различий между группами РА и ИМ –  $p<0,001$ .

Ранее в экспериментах с МЧ, полученными из отдельных клеток крови и эндотелиальных клеток, мы показали, что в тесте рекальцификации параметр лаг-фаза обратно коррелирует с концентрацией МЧ, а между параметром  $1/\text{лаг-фаза}$  и концентрацией МЧ наблюдается прямая корреляционная зависимость (чем больше МЧ, тем короче лаг-фаза свёртывания). Также была продемонстрирована прямая корреляция между параметром максимальной скорости ( $V_{\text{макс}}$ ) и концентрацией МЧ (чем больше МЧ, тем выше скорость свёртывания) [22, 23]. Аналогичные взаимосвязи были зарегистрированы и в настоящей работе при анализе суммарной фракции МЧ, выделенной из крови пациентов и здоровых доноров (рис. 4, табл. 2). Во всех группах пациентов были зарегистрированы достоверные прямые корреляции между величиной  $1/\text{лаг-фаза}$  и концентрацией МЧ и величиной  $V_{\text{макс}}$  и концентрацией МЧ (коэффициенты корреляции ( $r$ ) от 0,383 до 0,730,  $p$  от 0,037 до  $<0,001$ ) и лишь у здоровых доноров наблюдалась не достигающая достоверного уровня тенденция к таким корреляциям. Возможно, это обусловлено тем, что доноры, по сравнению с пациентами, у которых характеристика МЧ определяется, главным образом, наличием соответствующих заболеваний, представляют собой более гетерогенную группу с точки зрения таких факторов, как активация и повреждение клеток крови и эндотелиальных клеток, являющихся источником циркулирующих МЧ. Наличие корреляций между параметрами свёртывания и концентрацией МЧ, аналогичных тем, что были зарегистрированы нами ранее при исследовании образцов МЧ отдельных видов клеток, указывает на корректность определения коагуляционной активности и концентрации МЧ, выделенных из крови пациентов и доноров.

Мы предположили, что одной из возможных причин повышенной коагуляционной активности суммарной фракции МЧ у пациентов с ИМ и ИЛАГ, у которых, в отличие от пациентов с РА, не было зарегистрировано повышения концентрации МЧ, могло быть наличие в их составе активного ТФ. Для оценки возможного вклада ТФ в коагуляционную активность МЧ мы проводили у части доноров и пациентов параллельные измерения свёртывания в отсутствие и в присутствии анти-ТФ антител, блокирующих активность этого фактора [5, 23]. Однако ни в одной группе (включая группы ИМ и ИЛАГ) мы не выявили ингибирующих эффектов таких антител (рис. 1, табл. 3). Эти данные указывают на то, что ТФ не участвует в реализации коагуляционной активности МЧ, выделяемых из крови доноров и пациентов, включённых в настоящее исследование. Нельзя

Таблица 2. Корреляции между концентрацией МЧ и параметрами свёртывания плазмы у здоровых доноров (ЗД) и пациентов с ССЗ

|                        | ЗД               | РА                    | ИМ                    | ИЛАГ                  |
|------------------------|------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| МЧ / 1/лаг-фаза        | 0,268<br>(0,152) | 0,383<br>(0,037)      | 0,634<br>( $<0,001$ ) | 0,730<br>( $<0,001$ ) |
| МЧ / $V_{\text{макс}}$ | 0,332<br>(0,073) | 0,576<br>( $<0,001$ ) | 0,734<br>( $<0,001$ ) | 0,550<br>(0,018)      |

Примечание. Представлены коэффициенты корреляции (r), в скобках достоверности корреляций.

Таблица 3. Отсутствие эффектов анти-ТФ антител на параметры свёртывания плазмы в присутствии МЧ здоровых доноров (ЗД) и пациентов с ССЗ

|            | + Анти ТФ Лаг-фаза, % контроля | + Анти ТФ $V_{\text{макс}}$ , % контроля |
|------------|--------------------------------|--|
| ЗД (n=7)   | 95 [91-98] (88/128)            | 109 [105-112] (80/128)                   |
| РА (n=11)  | 100 [95-105] (85/113)          | 103 [84-117] (75/139)                    |
| ИМ (n=13)  | 106 [100-114] (81/123)         | 106 [94-121] (83/141)                    |
| ИЛАГ (n=7) | 106 [100-113] (95/114)         | 96 [93-108] (87/107)                     |

Примечание. Представлены медианы [25%-75%] (мин/макс). Достоверные различия от контроля отсутствуют.

исключить, что ТФ-содержащие МЧ, потенциальным источником которых могут быть, в первую очередь, активированные моноциты [5, 23, 24], образуются и у некоторых пациентов. Однако такие МЧ обладают очень высокой коагуляционной активностью, и, скорее всего, быстро “потребляются” в составе локальных микросгустков или являются непосредственными инициаторами и платформой для их образования. В связи с этим время их жизни в кровотоке будет минимальным, а появление в периферической крови, из которой были выделены МЧ, маловероятным.

При анализе МЧ с помощью проточной цитометрии мы проводили не только их подсчёт, но и измеряли медианы пика флуоресценции, характеризующие степень их окраски лактадгерином-FITC, маркером ФС, что соответствует количеству ФС на их поверхности. Как видно из таблицы 4, во всех группах пациентов наблюдалось достоверно повышенные уровни экспрессии ФС по сравнению с донорами, что может быть одной из причин их повышенной коагуляционной активности.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Суммарные МЧ, выделенные из крови пациентов с РА, ИМ и ИЛАГ, обладают повышенной коагуляционной активностью (ускоряют свёртывания плазмы в тесте рекальцификации) по сравнению со здоровыми донорами.

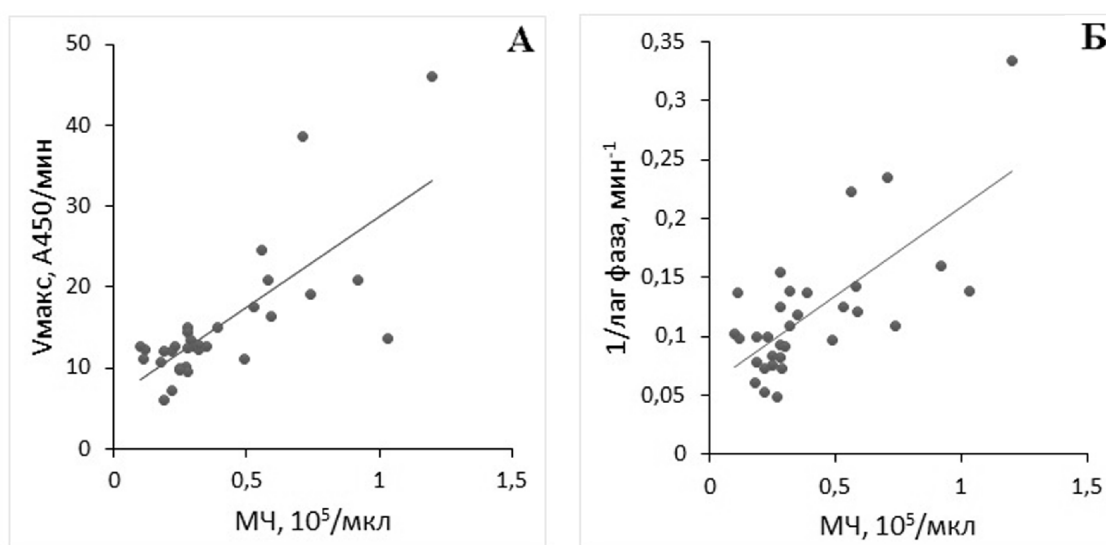


Рисунок 4. Корреляции между концентрацией МЧ и параметрами свёртывания плазмы в присутствии МЧ больных с ИМ. (А) Корреляция между концентрацией МЧ и  $V_{\text{макс}}$  свёртывания. (Б) Корреляция между концентрацией МЧ и 1/лаг фаза свёртывания.

Таблица 4. Содержание ФС на поверхности МЧ здоровых доноров (ЗД) и пациентов с ССЗ

|             | ФС, медиана флуоресценции МЧ, (лактадгерин-FITC) |
|-------------|--|
| ЗД (n=22)   | 1089 [1031-1639]                                 |
| РА (n=32)   | 1663 [1249-1815] ( $p=0,005$ )                   |
| ИМ (n=32)   | 1250 [1145-1461] ( $p=0,033$ )                   |
| ИЛАГ (n=19) | 1389 [1288-1549] ( $p=0,040$ )                   |

Примечание. Содержание ФС на МЧ оценивали с помощью проточной цитофлуориметрии, как медиану пика флуоресценции МЧ, окрашенных лактадгерином-FITC. Представлены медианы [25%-75%],  $p$  – достоверность различий от группы ЗД, остальные различия между группами недостоверны.

У больных с РА причиной высокой коагуляционной активности МЧ может быть как их повышенная концентрация, так и повышенная экспрессия на их поверхности ФС, а у больных с ИМ и ИЛАГ, в отсутствие повышения концентрации, только повышенная экспрессия ФС.

В соответствии с данными ингибиторного анализа, ТФ не участвует в реализации коагуляционной активности МЧ, выделенных из крови доноров и пациентов с РА, ИМ и ИЛАГ, включённых в настоящее исследование.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Г.В. Шехватовой (Институт белка, г. Пушино, Россия) за предоставление ингибитора трипсина кукурузы.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа была выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 22-15-00005.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все доноры и пациенты предоставили добровольное информированное согласие на использование их образцов крови в исследовательских целях. Проведение исследования было одобрено этическим комитетом Национального медицинского исследовательского центра кардиологии им. Е.И. Чазова, протокол № 274 от 29.11.2021 г.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА

- Owens A.P. 3rd, Mackman N. (2011) Microparticles in hemostasis and thrombosis. *Circ. Res.*, **108**, 1284-1297. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.110.233056
- Mooberry M.J., Key N.S. (2016) Microparticle analysis in disorders of hemostasis and thrombosis. *Cytometry A.*, **89**, 111-122. DOI: 10.1002/cyto.a.22647
- Ridger V.C., Boulanger C.M., Angelillo-Scherrer A., Badimon L., Blanc-Brude O., Bochaton-Piallat M.L., Boilard E., Buzas E.I., Caporali A., Dignat-George F., Evans P.C., Lacroix R., Lutgens E., Ketelhuys D.F.J., Nieuwland R., Toti F., Tunon J., Weber C., Hoefer I.E. (2017) Microvesicles in vascular homeostasis and diseases. Position paper of the European Society of Cardiology (ESC) Working Group on Atherosclerosis and Vascular Biology. *Thromb. Haemost.*, **117**, 1296-1316. DOI: 10.1160/TH16-12-0943
- Antonova O.A., Yakushkin V.V., Mazurov A.V. (2019) Coagulation activity of membrane microparticles. *Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*, **13**(3), 169-186. DOI: 10.1134/S1990747819030036
- 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) Activity of tissue factor in microparticles produced *in vitro* by endothelial cells, monocytes, granulocytes, and platelets. *Biochemistry (Moscow)*, **81**(2), 114-121. DOI: 10.1134/S000629791602005X
- Aleman M.M., Gardiner C., Harrison P., Wolberg A.S. (2011) Differential contribution of monocyte- and platelet-derived microparticles towards thrombin generation and fibrin formation and stability. *J. Thromb. Haemost.*, **9**, 2251-2261. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2011.04488.x
- van der Meijden P.E., van Schilfgaarde M., van Oerle R., Renné T., ten Cate H., Spronk H.M. (2012) Platelet- and erythrocyte-derived microparticles trigger thrombin generation via factor XIIa. *J. Thromb. Haemost.*, **10**, 1355-1362. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2012.04758.x
- Lipets E.N., Antonova O.A., Shustova O.N., Losenkova K.V., Mazurov A.V., Ataulakhov F.I. (2020) Use of thrombodynamics for revealing the participation of platelet, erythrocyte, endothelial, and monocyte microparticles in coagulation activation and propagation. *PLoS One*, **15**(5), e0227932. DOI: 10.1371/journal.pone.0227932
- Biasucci L.M., Porto I., di Vito L., de Maria G.L., Leone A.M., Tinelli G., Tritarelli A., di Rocco G., Snider F., Capogrossi M.C., Crea F. (2012) Differences in microparticle release in patients with acute coronary syndrome and stable angina. *Circ. J.*, **76**, 2174-2182. DOI: 10.1253/circj.cj-12-0068
- Skeppholm M., Mobarrez F., Malmqvist K., Wallén H. (2012) Platelet-derived microparticles during and after acute coronary syndrome. *Thromb. Haemost.*, **107**, 1122-1129. DOI: 10.1160/TH11-11-0779
- Namba M., Tanaka A., Shimada K., Ozeki Y., Uehata S., Sakamoto T., Nishida Y., Nomura S., Yoshikawa J. (2007) Circulating platelet-derived microparticles are associated with atherothrombotic events: a marker for vulnerable blood. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **27**, 255-256. DOI: 10.1161/01.ATV.0000252064.97632.2c
- Montoro-García S., Shantsila E., Tapp L.D., López-Cuenca A., Romero A.I., Hernández-Romero D., Orenes-Piñero E., Manzano-Fernández S., Valdés M., Marín F., Lip G.Y. (2013) Small-size circulating microparticles in acute coronary syndromes: relevance to fibrinolytic status, reparative markers and outcomes. *Atherosclerosis*, **227**, 313-322. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2013.01.028
- Suades R., Padró T., Crespo J., Ramaiola I., Martín-Yuste V., Sabaté M., Sans-Roselló J., Sionis A., Badimon L. (2016) Circulating microparticle signature in coronary and peripheral blood of ST elevation myocardial infarction patients in relation to pain-to-PCI elapsed time. *Int. J. Cardiol.*, **202**, 378-387. DOI: 10.1016/j.ijcard.2015.09.011

14. Suades R., Padró T., Vilahur G., Martin-Yuste V., Sabaté M., Sans-Roselló J., Sionis A., Badimon L. (2015) Growing thrombi release increased levels of CD235a+ microparticles and decreased levels of activated platelet derived microparticles. Validation in ST-elevation myocardial infarction patient. *J. Thromb. Haemost.*, **13**, 1776-1786. DOI: 10.1111/jth.13065
15. Giannopoulos G., Vrachatis D.A., Oudatzis G., Paterakis G., Angelidis C., Koutivas A., Sianos G., Cleman M.W., Filippatos G., Lekakis J., Deftereos S. (2017) Circulating erythrocyte microparticles and the biochemical extent of myocardial injury in ST elevation myocardial Infarction. *Cardiology*, **136**, 15-20. DOI: 10.1159/000447625
16. Bernal-Mizrachi L., Jy W., Jimenez J.J., Pastor J., Mauro L.M., Horstman L.L., de Marchena E., Ahn Y.S. (2003) High levels of circulating endothelial microparticles in patients with acute coronary syndromes. *Am. Heart. J.*, **145**, 962-970. DOI: 10.1016/S0002-8703(03)00103-0
17. Tan K.T., Tayehjee M.H., Lynd C., Blann A.D., Lip G.Y. (2005) Platelet microparticles and soluble P selectin in peripheral artery disease: relationship to extent of disease and platelet activation markers. *Ann Med.*, **37**, 61-66. DOI: 10.1080/07853890410018943
18. Crawford J.R., Trial J., Nambi V., Hoogeveen R.C., Taffet G.E., Entman M.L. (2016) Plasma levels of endothelial microparticles bearing monomeric C-reactive protein are increased in peripheral artery disease. *J. Cardiovasc. Trans. Res.*, **9**, 184-193. DOI: 10.1007/s12265-016-9678-0
19. Amabile N., Heiss Ch., Chang V., Angeli F.S., Damon L., Rame E.J., McGlothlin D., Grossman W., de Marco T., Yeghiazarians Y. (2009) Increased CD62E(+) endothelial microparticle levels predict poor outcome in pulmonary hypertension patients. *J. Heart Lung Transplant.*, **10**, 1081-1086. DOI: 10.1016/j.healun.2009.06.005
20. Чазова И.Е., Мартынюк Т.В., Валиева З.С., Азизов В.А., Барбараш О.Л., Веселова Т.Н., Галевич А.С., Горбачевский С.В., Зелвеян П.А., Лазарева И.В., Мукаров М.А., Наконечников С.Н., Саидова М.А., Сарыбаев А.Ш., Стукалова О.В., Шалаев С.В., Шмальц А.А. (2020) Евразийские клинические рекомендации по диагностике и лечению лёгочной гипертензии. *Евразийский Кардиологический Журнал*, **1**, 78-122. [Chazova I.E., Martynyuk T.V., Valieva Z.S., Azizov V.A., Barbarash O.L., Veselova T.N., Galyavich A.S., Gorbachevsky S.V., Zelveian P.A., Lazareva I.V., Mukarov M.A., Nakonetchnikov S.N., Saidova M.A., Sarybaev A.S., Stukalova O.V., Shalaev S.V., Shmalts A.A. (2020) Eurasian clinical guidelines on diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *Eurasian Heart J.*, **1**, 78-122.] DOI: 10.38109/2225-1685-2020-1-78-122
21. International Society for Extracellular Vesicles (2018) Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): A position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J. Extracell. Vesicles.*, **7**(1), 1535750. DOI: 10.1080/20013078.2018.1535750
22. Muravlev I.A., Antonova O.A., Golubeva N.V., Mazurov A.V. (2021) Platelets activated by different agonists produce microparticles with the same procoagulant properties. *Thromb. Res.*, **207**, 123-125. DOI: 10.1016/j.thromres.2021.09.019
23. 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) Differential procoagulant activity of microparticles derived from monocytes, granulocytes, platelets and endothelial cells: Impact of active tissue factor. *Blood Coagulation Fibrinolysis.*, **28**(5), 373-382. DOI: 10.1097/MBC.0000000000000609
24. Osterud B., Bjorklid E. (2012) Tissue factor in blood cells and endothelial cells. *Front. Biosci. (Elite Ed.)*, **4**, 289-299. DOI: 10.2741/376

Поступила в редакцию: 05. 07. 2022.  
После доработки: 03. 08. 2022.  
Принята к печати: 04. 08. 2022.



COAGULATION ACTIVITY OF CIRCULATING MEMBRANE MICROPARTICLES  
IN PATIENTS WITH CARDIOVASCULAR DISEASES

*O.A. Antonova\*, N.V. Golubeva, V.V. Yakushkin, I.T. Zyuryaev,  
E.N. Krivosheeva, A.L. Komarov, T.V. Martynyuk, A.V. Mazurov*

National Medical Research Center of Cardiology, Russian Ministry of Health,  
15a, 3th Cherepkovskaya str., Moscow, 121552 Russia, \*e-mail: loa\_lu@mail.ru

Membrane microparticles (MP) are released by activated or damaged cells and are able to accelerate blood clotting (coagulation). MP possess coagulation activity since all of them contain on their surface phosphatidylserine (PS), a substrate for the assembly of coagulation complexes, and some of them tissue factor (TF), the primary initiator of coagulation cascade reactions. We compared the coagulation activity and amount of MP in the blood of healthy donors (n=34) and patients with myocardial infarction (MI) (n=32), advanced atherosclerosis (AA) (n=32) and idiopathic pulmonary arterial hypertension (IPAH) (n=19). Total MP fraction was obtained from blood plasma by sedimentation at 20000 g, 30 min. The coagulation activity of PM isolated from 100 µl of donor and patient plasma was determined using a modified recalcification test. MP were added to substrate plasma devoid of endogenous MF, plasma was recalcified, and clotting was recorded by changes in optical density ( $A_{450}$ ), determining lag phase (min) and maximum rate ( $V_{max}$ , % $A_{450}$ /min). MP were counted by flow cytometry as PS+ particles (lactadherin-FITC staining) smaller than 1 µm and their concentration was expressed as  $10^5$  MP/µl plasma. MP in all patient groups accelerated plasma clotting more effectively than donor MP. Lag phase compared with donors (11.8 [11.0-13.1] median and interquartile range) was shorter in patients with AA (8.8 [7.0-10.3],  $p<0.001$ ), MI (9.5 [7.3-12.1],  $p=0.004$ ), ILAH (9.8 [6.0-12.0],  $p=0.015$ ), and  $V_{max}$  compared with donors (13.1 [11.7-13.9]) was higher in patients with AA (20.8 [15.2-25.3],  $p<0.001$ ), ILAH (17.8 [14.9-22.5],  $p=0.001$ ), but not MI (12.6 [11.1-15.7],  $p=0.941$ ). MP concentrations compared with donors (0.59 [0.34-0.78]) were higher in patients with AA (0.74 [0.50-1.18],  $p=0.004$ ), lower in patients with MI (0.29 [0.23-0.55],  $p<0.001$ ), and not significantly different in patients with ILAH (0.43 [0.30-0.76],  $p=0.445$ ). In all groups of patient, there was a significant correlation between MP concentration of and parameters 1/lag phase and  $V_{max}$  of plasma clotting. The data obtained show that the increase in total coagulation activity of MP can be explained by an increase in their concentration only in patients with AA. Anti-TF antibodies did not alter clotting parameters in the presence of MP from donors and patients, indicating that TF is not involved in the realization of the coagulation properties of the tested MP. At the same time, in all groups of patients there was a significant increase in the expression of PS on the surface of MP compared to donors, which could be one of the reasons for their increased coagulation activity.

**Key words:** membrane microparticles; blood coagulation; myocardial infarction; atherosclerosis; pulmonary hypertension

**Funding.** This work was supported by Russian Scientific Foundation (grant no. 22-15-00005).

Received: 05.07.2022; revised: 03.08.2022; accepted: 04.08.2022.