

В.И. Ващенко, В.Н. Вильянинов,
Л.А. Скрипай, Е.Ф. Сороколетова

Везикуляция эритроцитов человека и её роль в донорских эритроцитсодержащих компонентах

Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

Резюме. Образование микровезикул клетками крови: моноцитами, тромбоцитами, гранулоцитами, эритроцитами и эндотелиальными клетками – важная особенность межклеточных взаимодействий. Эритроциты формируют микровезикулы, чтобы удалить поврежденные компоненты клетки, такие как окисленный гемоглобин и поврежденные мембранные компоненты, и таким образом продлевают продолжительность своего функционирования. Выдвинуты две гипотезы образования микровезикул: программируемая клеточная гибель (эриптоз) и кластеризация белка полосы 3 в результате нарушения межклеточных взаимодействий. В процессе эриптоза повреждение гемоглобина и изменение путей фосфорилирования мембранных белков, прежде всего белка полосы 3, приводит к ослаблению прочных связей между липидным бислоем и цитоскелетом, что сопровождается трансформацией мембраны, образованием выпячиваний и превращением их в микровезикулы. Обнаружено, что образование микровезикул эритроцитами нарушено у пациентов, страдающих различными патологиями эритроцитов: серповидно-клеточной анемией, дефицитом глюкозо-6-дегидрогеназы, сфероцитозом, малярией. Исследования последнего десятилетия убеждают, что нарушение режима взаимодействия между мембраной и цитоскелетом, вероятно, является главным механизмом, поскольку подтверждается данными, полученными при исследовании структурных изменений эритроцитов донорских гемокомпонентов, хранившихся в условиях банка крови. В настоящее время широкое распространение получили работы по изучению влияния микровезикул на сохранность эритроцитсодержащих компонентов крови. Возобновлена дискуссия о взаимосвязи количества накопленных микровезикул в компонентах крови и эффективности донорских компонентов для пациентов при переливании в зависимости от срока хранения компонентов. Детализированные данные протеомного, липидомического и иммуногенного сравнения микровезикул, полученных из различных источников, являются убедительными в идентификации триггерных стимулов, вызывающих генерацию микровезикул. Выяснение вклада полученных из эритроцитов микровезикул в воспаление, тромбоз и аутоиммунные реакции подтверждает необходимость дальнейшего изучения механизмов и последствий генерации микровезикул эритроцитами донорских компонентов, используемых для трансфузионной медицины.

Ключевые слова: эриптоз, эритроциты, микровезикулы, фосфатидилсерин, анкирин, спектрин, скрамблаза, банк крови, трансфузионная медицина.

Введение. Микровезикулы (МВ), также называемые микрочастицами, представляют собой небольшие фосфолипидные пузырьки размером от 0,1 до 1 мкм, высвобождаемые в кровоток различными клетками: тромбоцитами, эритроцитами, лейкоцитами и эндотелиальными клетками [2]. На своей поверхности они содержат множество белков от клеток, из которых они образовались, а также поверхностных рецепторов, позволяющих идентифицировать происхождение МВ [3]. Кроме того, в состав МВ входят гликопротеины и цитоплазматические компоненты выбросивших их клеток [19]. Размер (объем) и плотность являются основными характеристиками, используемыми для отличия клеточных МВ от апоптотных телец и экзосом [13]. МВ, как правило, меньше, чем апоптотные тельца (>1,5 мкм), а экзосомы (40–100 нм) меньше, чем МВ, и более однородны по размеру.

Мембраны эритроцитов как источника МВ составлены в основном из липидов и белков. Углеводы – лишь небольшая, но важная составляющая мембранных структур. В составе мембран присутствуют липиды трех классов, но для свертывающей системы

наиболее важны глицерофосфолипиды (фосфатидилсерин, фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин), интегрированные согласно жидкомозаичной модели в бислой, который состоит из двух листов – внутреннего, обращенного к цитоплазме, и наружного. Площадь проекции полярной головки на площадь углеводородных цепей в мембране у фосфатидилэтаноламинов меньше, чем у других глицерофосфолипидов, поэтому они менее охотно образуют бислойные структуры, а при ряде возмущающих воздействий упаковываются в мицеллы или цилиндрические структуры, создавая так называемую гексагональную мезофазу. Липиды могут образовывать упорядоченные скопления – липидные «рафты», в которых плотность упаковки может отличаться от таковой в соседних полях наружного листа мембраны. При обычных условиях фосфолипиды плазматической мембраны распределены асимметрично. При этом большинство аминокислотных остатков: фосфатидилсерина, несущие отрицательный заряд, фосфатидилэтаноламины, содержащие свободную аминогруппу, – расположены во внутреннем листке бислоя, а холинсодержащие фосфолипиды

и гликолипиды сосредоточены в наружном листке [1]. Различают три вида активности, присущей белкам, регулирующим распределение липидов в мембранах: во-первых, флиппазная, которая инициирует направленный внутрь транспорт липоидов, во-вторых, флоппазная, которая содействует устремленной наружу миграции липоидов, и, в-третьих, скрамблзая, которая перемешивает липиды между слоями. В то время как две первые активности создают и поддерживают мембранную фосфолипидную асимметрию, скрамблзая активность способствует перескоку (флип-флопу) фосфатидилсерина (ФС) и фосфатидилэтаноламина и образования МВ.

Известно, что потеря фосфолипидной асимметрии возникает в ходе активации клетки, апоптоза или эритролиза и характеризуется выходом ФС на внешнюю поверхность клетки. Наличие ФС на наружной поверхности мембраны является сигналом для удаления макрофагами апоптотных клеток и клеточных фрагментов в виде МВ [17] (рис. 1).

В регуляции асимметрии фосфолипидов клеточной мембраны и в образовании эритроцитарных МВ участвуют четыре фермента: аминоксффолипидная транслоказа (флиппаза), флоппаза, скрамблаза и кальпаин. Менее специфичная АТФ-зависимая флоппаза участвует в транспорте холин- и аминоксффолипидов из внутреннего в наружный листок бислоя, хотя действует медленнее, чем аминоксффолипидтранслоказа. Взаимодействуя комплексно, эти ферменты поддерживают устойчивую асимметрию фосфолипидов клеточной мембраны.

Повышение уровня цитоплазматических ионов Ca^{2+} ингибирует работу флиппазы, но при этом активирует скрамблазу. Этот процесс приводит к потере фосфолипидной асимметрии и выходу ФС на наружную по-

верхность мембраны. Кроме того, повышение уровня цитоплазматических ионов Ca^{2+} активирует кальпаин, выполняющий несколько функций при образовании эритроцитарных МВ, включая расщепление филаментов цитоскелета, облегчая тем самым выброс МВ.

Известно, что появление ФС на наружном листке цитоплазматической мембраны является признаком эритролиза, т. е. сигналом макрофагу для поглощения и удаления эритроцита посредством фагоцитоза [1]. Поскольку спонтанное трансбислойное перемещение фосфолипидов термодинамически невыгодно, то предполагается наличие зависимости Ca^{2+} -индуцированной рандомизации липидов от одного или нескольких мембранных белков с липид-перемешивающей (липид-скрамблзной) активностью. Ферментативная активность белка скрамблазы, развиваемая под действием внутриклеточных ионов Ca^{2+} , состоит в создании определенных участков мембраны для «флип-флопа», которые позволяют всем типам мембранных липидов вне зависимости от полярной головки быстро передвигаться с одной стороны бислоя на другую, разрушая асимметрию за считанные минуты. Глицерофосфолипиды двигаются несколько быстрее, чем сфингомиелины или другие липиды с керамидным якорем [2]. Таким образом, скрамблзая активность нуждается в постоянном присутствии цитоплазматических ионов Ca^{2+} , следовательно, их удаление ведет к восстановлению фосфолипидной асимметрии при условии, что аминоксффолипидтранслоказа не подверглась необратимому протеолизу под действием кальпаина. Считают, что перемешивание липидов не сопряжено с гидролизом АТФ, однако во время пониженной концентрации АТФ (например, при эритролизе при длительном хранении компонентов в банке крови)

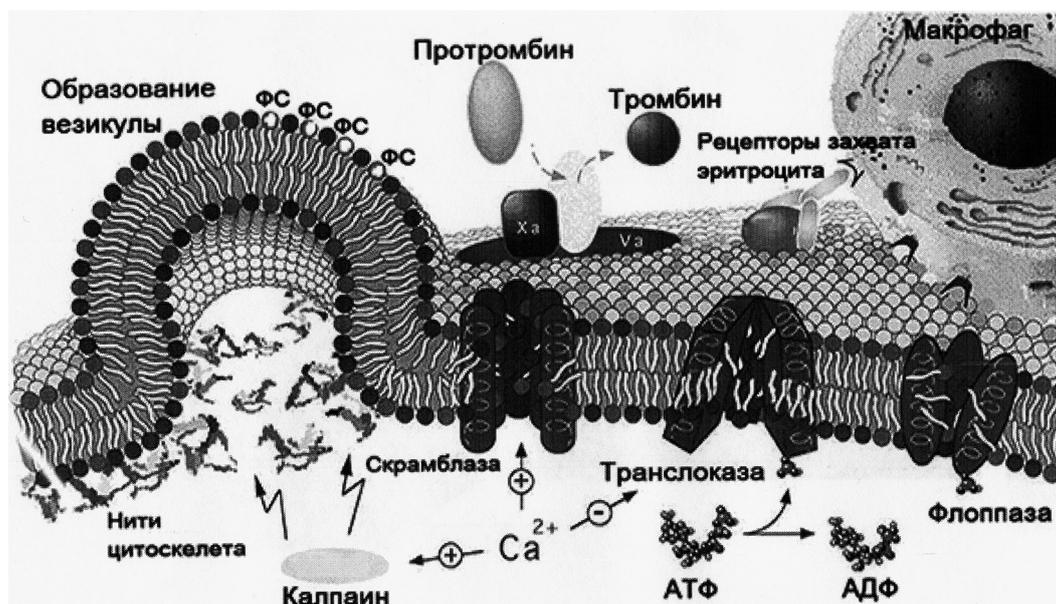


Рис. 1. Схема образования везикулы из мембраны эритроцита человека: ФС – фосфатидилсерин; Xa и Va – факторы коагуляции; АТФ – аденозинтрифосфат; АДФ – аденозиндифосфат

происходит постепенная потеря скрамблзной активности [17].

Таким образом, для образования эритроцитарных МВ необходима дестабилизация липидного комплекса мембраны эритроцитов.

Микровезикулы в крови человека. После открытия МВ в 1967 г. [2] считали, что микрочастицы представляют собой клеточный дебрис или «пыль» без каких-либо биологических функций. Затем долгое время думали, что МВ являются побочными продуктами жизнедеятельности клеток и не имеют функциональной активности. Однако более поздние иммунохимические исследования вместе с протеомным анализом эритроцитарных МВ, полученных из плазмы здоровых людей, показали, что присутствие мембранных белков в МВ усиливает связь белка полосы 3 с актином [5]. Кроме того, МВ обогащены ферментами, включаемыми в поддержание окислительно-восстановительного потенциала, то есть трансфераз с глутаминил-цистеинил-глицином, тиоредоксином, пероксиредоксином-1, пероксиредоксином-2 и убиквитином. Состав гемоглобинов микровезикул напоминает состав гемоглобинов самых старых эритроцитов, т. е. необратимо измененных гемоглобинов HbA1c и HbA1e2. МВ на поверхности имеют сигналы удаления: фосфатидилсерин и гликозилфосфатидилинозитол, а также определенные для клетки антигенные детерминанты белка полосы 3, ингибирующие факторы комплемента CD55 и CD59, которые ранее были обнаружены в самых старых эритроцитах [23]. Отсутствие комплекса спектрина и анкирина в МВ указывает на обширное разложение белков в самых старых эритроцитах и связанное со старением увеличение связанных с мембраной протеасом [5]. Эти изменения подтверждают важность и необходимость протеолитического разрушения соединения полосы 3-анкирин между цитоскелетом и липидным бислоем в процессе везикуляции. Однако отсутствие спектрина в МВ, изолированных из крови, позволило выдвинуть альтернативные объяснения, связанные со старением изменений, а именно трансформацией объема и плотности эритроцита [6]. Следовательно, расщепление связи полосы 3-анкирин необходимо, чтобы вызвать временное расслабление цитоскелетной сети и осуществить прогибание липидного бислоя, затем его выпячивание и образование МВ [5].

Протеомный анализ стареющих эритроцитов и эритроцитарных МВ, выделенных из плазмы, поддерживают рассмотренную выше модель [6], но не объясняют относительно высокие концентрации актина в МВ. Данные о функциях гемоглобина вместе с данными о накоплении ферментов регулирования окислительно-восстановительного потенциала указывают на то, что именно повреждение гемоглобина может быть триггером обратной регуляции, если не основным пусковым механизмом везикуляции эритроцита. Важность роли поврежденного гемоглобина в везикуляции подтверждена обнаружением того факта, что концентрация полученных из эритроцитов МВ

увеличена в крови пациентов с гемоглобинопатиями [5]. Показано, что МВ из крови больных талассемией также содержат высокие концентрации окисленных гемоглобинов с денатурированными альфа-цепями глобинов. Кроме того, эти МВ содержат ферменты: каталазу и пероксиредоксин-2, включаемые в обслуживание статуса окислительно-восстановительного потенциала, а также большое количество белков комплемента и иммуноглобулинов [11].

Можно предположить, что состав белков эритроцитарных МВ, взятых от пациентов, страдающих мембранопатиями, имеющих измененные эритроциты (элиптоциты и стоматоциты вследствие генетических aberrаций в мембранных белках), вероятно, будет отличаться от белков из нетрансформированных эритроцитов. Пока фактических данных недостаточно, но это предположение может быть выведено из эффектов спленэктомии на состав комплекса спектрин/анкирин и их связи с ригидностью мембран сфероцитов [18]. Кроме того, получены данные, что в эритроцитах от пациентов, страдающих синдромом талассемии, повреждение гемоглобина вызывает формирование полимеров из белков полосы 3, связанное с увеличенным фосфорилированием, приводящим к ослаблению соединения полосы 3-анкирин, вызывая формирование МВ [11]. Эти наблюдения вместе с эффектом p72Syk ингибиторов киназы не только поддерживают центральную роль измененных гемоглобинов, особенно совместно с окислением и/или протеолитическим разложением полосы 3 [4] в процессе везикуляции, но и важность этапа фосфорилирования в гомеостазе эритроцитов. Таким образом, участие различных сигнальных путей в везикуляции эритроцитов подтверждается обнаружением относительно больших количеств сигнальных белков в МВ, полученных из плазмы здорового донора [5], а также фармакологическими исследованиями МВ *in vitro* [12].

Известно, что МВ могут образовываться и при других условиях. Так, согласно данным Д.М. Зубаирова, Л.Д. Зубаировой [2], часть циркулирующих МВ, вероятно, происходят от эритроцитарных клеток в результате потери целостности их мембраны или механического разрушения клеток после повреждения. Следовательно, образованные таким образом эритроцитарные МВ будут содержать на своей поверхности отрицательно заряженные ФС, так как после отделения МВ от эритроцитов асимметричное распределение фосфолипидов на мембране МВ не поддерживается.

Образование микровезикул эритроцитов при хранении эритроцитсодержащих компонентов в банке крови. Установлено, что при хранении эритроцитсодержащих компонентов в банке крови в них происходят изменения, известные как «повреждения при хранении» (storage lesion) [22], при этом последовательное накопление МВ является одним из проявлений этого процесса. С удлинением времени хранения компонентов мембраны эритроцитов становятся более жесткими, нарушается фосфолипидная асимметрия, что и вызывает образование

МВ. Накопившиеся МВ при длительном хранении компонента на своей поверхности экспонируют сигналы удаления: ФС и белок полосы 3, подобно МВ, циркулирующим в периферической крови [5, 23]. В недавних исследованиях установлено, что в мембранах МВ донорских компонентов, хранившихся в банке крови, число карбонильных групп увеличивалось по сравнению с мембранами эритроцитов, возможно, за счет накопления окисленных мембранных белков, связывающих полосу 3, актин и белок 4.1 [5, 24].

Процесс окисления компонентов клетки коррелирует с усилением везикуляции эритроцитов во время хранения гемокомпонентов [3, 8]. Образовавшиеся МВ гемокомпонентов являются иммуноактивными, поскольку они содержат иммуноглобулины и факторы комплемента, полученные из плазмы донорского эритроцитсодержащего компонента при хранении [5, 16]. Показано, что МВ из крови пациентов с септической анемией являются патологическими аутоантителами [9]. Эти данные указывают на то, что удаление МВ из поврежденных эритроцитов до их удаления из кровообращения – общее явление для эритроцитарных МВ. Обогащение ацетилхолинэстеразы GPI-закрепленными белками и CD55, как и связанных липидными рафтами форм стоматина и флотилина в МВ среды хранения, указывает на то, что связанные с липидами изменения в мембранной организации включаются в везикуляцию во время хранения компонентов [5, 20]. Этот процесс мог быть вызван потерей скреп между цитоскелетом и мембранными белками, сопровождаемой крупномасштабным разделением различных фаз липида, которые могут сформировать в мембране стабилизированные белком микродомены [20]. Потеря взаимодействия между цитоскелетом и клеточной мембраной может быть вызвана окисленным гемоглобином, подобно тому, как это может происходить в естественных условиях. Действительно, в эксперименте показано, что накопление окисленных остатков гемоглобина во время хранения сопровождается увеличением их количества в микровезикулах [24]. Эта роль гемоглобина в формировании МВ подтверждается тем фактом, что в раннем периоде хранения компонента существенное количество гемоглобина связывается с липидным бислоем в МВ [23]. Пока недостаточно деталей для описания количественной и качественной информации об основных триггерах, приводящих к генерации МВ *in vitro*. Имеющиеся данные главным образом поддерживают роль фосфорилирования и перестановку белка полосы 3. Например, ингибирование дефосфорилирования тирозина не только вызывает образование других форм эритроцитов, включая эхиноциты, указывая тем самым на потерю взаимодействия между цитоскелетом и липидным бислоем, но и стимулирует производство МВ *in vitro* [7, 11]. В деформированных клетках, обнаруженных у пациентов с нейроаканцитозом, нарушенное фосфорилирование и измененная морфология клетки сопровождаются нарушенной генерацией МВ. Установлено, что фосфорилирование

белка полосы 3 связано с образованием скоплений и микродоменов в мембране при формировании МВ во время хранения компонента; аналогичное явление наблюдается в эритроцитах пациентов, страдающих талассемией [11]. Подобные эффекты отмечены также при обработке эритроцитов агентами, которые вызывают кластеризацию белка полосы 3 [7, 11]. Хорошо известным признаком для образования МВ *in vitro* является искусственное увеличение концентрации ионов Ca^{2+} в инкубационной среде. Однако состав белков эритроцитарных МВ, индуцированных кальцием, отличается от спектра белков МВ в среде хранения компонента или МВ в крови. Различия наблюдались по мембранным белкам, по присутствию агрегатов белка полосы 3 и продуктов его распада, по примесным белкам липидных рафтов [5, 20]. Из этого следует вывод, что изменение внутриклеточной концентрации кальция не главный фактор в генерации МВ как в крови, так и в эритроцитах при хранении эритроцитсодержащего компонента в банке крови.

В работе G.I. Harisa et al. [12] образование эритроцитарных МВ было описано в качестве неотъемлемой стадии старения эритроцитов. F.L. Willekens et al. [23] отмечают, что в течение всей жизни в процессе циркуляции стареющие эритроциты теряют от 15 до 30% объема клетки и 20% от содержащегося в них гемоглобина, при этом его внутриклеточная концентрация увеличивается на 14%. Следовательно, микровезикуляция для эритроцитов является способом удаления денатурированного гемоглобина, который может быть токсичным для клетки. Кроме того, выделение МВ является для эритроцитов способом избавления от специфических белков мембраны, которые могут предотвратить или инициировать удаление эритроцитов из кровотока в зависимости от ситуации. Показано, что в качестве защиты МВ могут помочь удалить C5b-9 комплекс комплементарной атаки, неоантиген полосы 3, IgG или другие вредные вещества из мембраны, когда клетки все еще остаются жизнеспособными и, таким образом, предотвратить раннее удаление их из кровотока [23]. Эритроцитарные МВ могут также способствовать и противоположному процессу удалению эритроцитов. В этом случае МВ захватывают маркер комплемента CD47, который является ключевым сигнальным белком, присутствующим на поверхности мембраны эритроцитов. Благодаря ему жизнеспособные эритроциты узнаются макрофагами (белком регулятором α) и в результате обратной регуляции фагоцитоз подавляется. Таким образом, стареющие и поврежденные эритроциты, на мембране которых уменьшается экспрессия CD47, выделяют МВ, обогащенные CD47, и эритроциты уже не признаются в качестве жизнеспособных и, следовательно, удаляются макрофагами [1].

В настоящее время предложены две основные модели старения эритроцитов: эриптоз и кластеризация полосы 3 [5].

С одной стороны, эриптоз как аналог апоптоза ядродержащих клеток можно рассматривать в

качестве ответа эритроцита на различные стрессы, а с другой – модель кластеризации белка полосы 3 – может объяснить физиологию старения эритроцита. Установлено, что в процессе эриптоза усиленный внутриклеточный поток ионов Ca^{2+} через измененные неспецифические катионные каналы вызывает активацию нескольких ферментов: скрамблазы, флиппазы, кальпаина и трансглутаминазы 2. Это приводит к выходу ФС на внешнюю поверхность мембраны. Кроме того, процесс сопровождается деградацией цитоскелета и сшивкой его белков с последующими изменениями в фосфорилировании белка полосы 3 [14]. Модель кластеризации полосы 3 включает окисление белка и гемоглобина. Окисление гемоглобина способствует образованию гемихрома, который состоит из продуктов производных гемоглобина (вероятно, метгемоглобина), связанных с внутренним слоем мембраны. В результате трансформации белка и гемоглобина происходит кластеризация и агрегация мультимеров полосы 3 в мембране.

Таким образом, обе модели дают аналогичный конечный результат, приводящий в итоге к модификации полосы 3. Это событие является индуктором процессов во внутреннем слое мембраны, которые могут привести к разрушению скреп между мембраной и цитоскелетом, в результате чего происходит выпячивание мембраны и образование МВ.

В условиях банка крови эритроциты донорского компонента подвергаются прогрессирующим структурным и биохимическим изменениям, известным как «повреждения при хранении» [22]. При этом с удлинением времени хранения происходит изменение формы эритроцита от дискоцита до сфероэритроцита и сфероцита [18]. Происходят и другие изменения: снижаются количество АТФ и уровень рН, нарастает гемолиз, и увеличивается количество эритроцитарных МВ [13]. Хотя были установлены различия между процессом старения эритроцитов, происходящим *in vitro* и *in vivo*, такие как денатурация спектрина, изменения в углеводной части мембраны и увеличение среднего клеточного объема, тем не менее, повреждения эритроцитов при длительных сроках хранения донорских компонентов имеют сходные черты с процессом старения клетки [5]. Модификация мембраны эритроцитов в процессе хранения инициируется понижением уровня АТФ и усилением окислительных процессов, приводящих к изменению структуры полосы 3. Это событие способствует мембранной дезорганизации и, вероятно, влияет на изменение деформируемости эритроцитов, их осмотической устойчивости и выживаемости после трансфузии.

Образование эритроцитарных МВ представляет собой непрерывный процесс мембранного ремоделирования, который начинается на ранних сроках хранения компонентов в условиях банка крови [20]. Почти все МВ, выделенные из эритроцитарных концентратов, имеют эритроцитарное происхождение, и их число постепенно увеличивается в течение срока хранения [19]. Уровень везикуляции в этих концентратах может

меняться не только с течением времени, но также в зависимости от количества эритроцитов и состава раствора для хранения: количество эритроцитарных МВ значительно увеличивается при высоком гематокрите отмытых клеток [21], в то время как их уровень может быть снижен добавлением растворов, которые эффективны в качестве антиоксидантов.

Состав эритроцитарных МВ в эритроцитарных концентратах почти аналогичен составу МВ, образующихся *in vivo*, за исключением повышенного уровня стоматина [20]. Они также лишены большинства интегральных мембранных белков или компонентов цитоскелета, присутствующих в эритроцитах, за исключением актина и полосы 3 [5, 20]. Кроме того, почти все антигены групп крови, включая минорные, были обнаружены на поверхности эритроцитарных МВ [22]. В связи с отсутствием иммунологического удаления накапливающиеся МВ в концентратах эритроцитов становятся более гетерогенными с течением времени и постепенно увеличиваются в размере, при этом снижается выход ФС на их поверхность [1, 6]. Можно предположить, что в процессе хранения эритроцитов изменяется не только структура, но и характер формирования МВ.

Установлено, что во время заключительного этапа хранения концентратов эритроцитов в условиях банка крови наблюдается переход части эритроцитов в сфероэритроциты и сфероциты. Этой трансформации могут подвергаться до 30% эритроцитов, которые в течение 24 ч после трансфузии исчезают из кровотока реципиента [16]. Было высказано предположение, что эта доля удаленных эритроцитов может являться наглядным примером изменений, происходящих в процессе хранения эритроцитов, и может приводить к неблагоприятным посттрансфузионным осложнениям у реципиента после переливания [5]. Кроме того, при хранении эритроцитов в полиэтиленовых гемаконах происходят не только физиологические, но и биохимические изменения, которые являются частью «повреждений при хранении» [18]. В хранящихся компонентах наблюдается увеличение концентрации липидов, свободного гемоглобина, калия, лактата и снижение уровня рН, глюкозы, 2,3-дифосфоглицерата, натрия и АТФ. Эти изменения имеют важное значение. Установлено, что уменьшение концентрации глюкозы и увеличение содержания лактата отражаются на гликолизе эритроцитов и их везикуляции.

Влияние эритроцитарных МВ на эффективность трансфузий для реципиента пока изучено мало. Существуют аргументы в пользу того, что переливание крови поздних сроков хранения не так эффективно для реципиента, как получение «свежей» крови. Известно, что одним из главных показаний для переливания крови реципиенту является необходимость улучшения транспорта кислорода. В связи с тем, что решающее значение в его транспорте имеет связывание кислорода гемоглобином, то потеря эритроцитом 20% гемоглобина может иметь клинические последствия для реципиента [30]. С 2008 г. и по настоящее

время в литературе широко обсуждается связь между «возрастом» переливаемых эритроцитов и посттрансфузионными осложнениями. Так, в отдельных рандомизированных исследованиях показано, что состояние здоровья пациента (в частности, его системы кровообращения) в последующие 5 лет после переливания было лучше у пациентов, которые получили «свежую» кровь (эритроциты, хранившиеся менее 14 дней), по сравнению с пациентами, которые получили «старую» кровь (хранившуюся более 14 дней). Позже в исследовании P.C. Spinella et al. [21] продемонстрировано, что переливание концентратов эритроцитов, хранившихся более 28 дней, приводило к увеличению случаев тромбозов глубоких вен и смерти пациентов от полиорганной недостаточности. Известны и другие исследования, посвященные изучению зависимости посттрансфузионных осложнений от длительности времени хранения эритроцитсодержащих компонентов до переливания [13]. Однако результаты этих исследований по-прежнему остаются дискуссионными [25].

Несмотря на отсутствие полновесных данных в пользу того, что долгое хранение крови делает ее хуже, в настоящее время (по крайней мере, в европейских странах) практикуется переливание крови малых сроков хранения пациенту, подвергающемуся высокому риску (например, при операции на сердце).

Так как эритроцитарные МВ обладают прокоагулянтными свойствами, можно предположить, что переливание «старых» эритроцитсодержащих компонентов крови, содержащих большое количество МВ, может увеличить риск развития побочных реакций, в частности состояния гиперкоагуляции, ведущее к тромбозам и тромбоэмболическим осложнениям. И, наоборот, во многих ситуациях, требующих переливания крови, состояние гиперкоагуляции может быть полезным для уменьшения или даже остановки кровотечения.

Микровезикуляция эритроцитов при патологических состояниях. Установлено, что МВ присутствуют в кровеносном русле человека при различных воспалительных заболеваниях, в том числе при сепсисе [10]. Сепсис индуцирует фенотипические изменения эндотелия, и эндотелиальная поверхность становится провоспалительной, экспрессируя молекулы клеточной адгезии, а также протромботической, так как повышается экспрессия мембранного тканевого фактора, происходит ингибирование тромбомодулина и синтеза рецептора эндотелиального протеина С. При этом МВ эндотелиальных клеток способны активировать тромбоциты [2]. Они выступают в качестве источника фосфолипидов, которые являются субстратом для фосфолипазы А₂, продукты которой способствуют усилению агрегации тромбоцитов. МВ могут также провоцировать сосудистое воспаление при сепсисе и способствовать хемотаксису тромбоцитов и/или лейкоцитов к эндотелию. Они играют роль триггера в производстве моноцитарных цитокинов (интерлейкина-1, 8 и фактора некроза опухоли α). Взаимодействия между тромбоцитами, лейкоцитами

и эндотелием способствуют сосудистой дисфункции, наблюдаемой при сепсисе [10]. Полагают, что эндотелиальные МВ могут играть определенную роль в распространении воспалительной реакции при сепсисе, которая приводит к полиорганной недостаточности. Они могут участвовать в потенцировании прокоагулянтного состояния, связанного с сепсисом, вплоть до синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови, предоставляя дополнительную липидную поверхность для генерации тромбина.

Имеются данные, указывающие, что окисленные фосфолипиды могут формировать биологически активные компоненты МВ. Окислительный стресс и апоптоз – хорошо известные явления при многих сердечно-сосудистых заболеваниях, таких как кардиомиопатия, миокардит, острый инфаркт миокарда и атеросклероз [15, 17]. Таким образом, наличие окисленных фосфолипидов в МВ эритроцитов и в МВ, сформированных при окислительном стрессе, может стать важным элементом в механизме патогенеза этих заболеваний.

Заключение. Везикуляция эритроцитов проявляется в ответ на действие множества физиологических и патологических триггеров. Хотя изученный структурный состав МВ, произведенных при различных условиях, далеко не полон, имеющиеся данные указывают, что все они обогащаются элементами поврежденных эритроцитов в зависимости от действующих стимулов. Это предполагает, что дальнейшие исчерпывающие исследования эритроцитарных МВ позволят проникнуть в суть молекулярных механизмов их генерации в естественных условиях и, таким образом, выявить конкретные физиологические и патологические триггеры. Кроме того, эритроцитарные МВ являются моделью для исследования биологических, биофизических и клинических свойств МВ. Эритроцитарные МВ потенциально чувствительные и определенные биомаркеры для клинических особенностей эритроцитозависимых болезней: серповидноклеточной анемии, талассемии или сфероцитоза, а также при анемии, сепсисе и тромбозе.

Таким образом, выброс МВ может предотвратить удаление функционально неполноценных эритроцитов из кровообращения при физиологических условиях. Уменьшение везикуляции после спленэктомии может сохранить объем циркулирующих эритроцитов или предотвратить патологическую реакцию, наступающую после массивных и повторных переливаний эритроцитсодержащих компонентов иммунокомпromетированным пациентам.

Литература

1. Ващенко, В.И. Эритроцитоз (квазиапоптоз) эритроцитов человека и его роль в лекарственной терапии / В.И. Ващенко, В.Н. Вильянинов // Обзоры клин. фарм. лекарст. терапии. – 2019. – № 3. – С. 5–38.
2. Зубаиров, Д.М. Микровезикулы в крови. Функции и их роль в тромбообразовании / Д.М. Зубаиров, Л.Д. Зубаирова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 168 с.

3. Almirazq, R.J. Characteristics of extracellular vesicles in red blood concentrates change with storage time and blood manufacturing method / R.J. Almirazq [et al.] // *Transfus. Med. Hemother.* – 2018. – Vol. 45. – P. 185–193.
4. Arashiki, N. Membrane peroxidation and methemoglobin formation are both necessary for band 3 clustering: mechanistic insights into human erythrocyte senescence / N. Arashiki [et al.] // *Biochemistry.* – 2013. – Vol. 52. – P. 5760–5769.
5. Burnouf, T. An overview of the role of microparticles/microvesicles in blood components: Are they clinically or harmful? / T. Burnouf [et al.] // *Transfus. Apher. Scien.* – 2015. – Vol. 53. – P. 137–145.
6. Ciana, A. Membrane remodelling and vesicle formation during ageing of human red blood cells / A. Ciana [et al.] // *Cell. Physiol. Biochem.* – 2017. – Vol. 42. – P. 1127–1138.
7. Cluitmans, J.C. Red blood cell homeostasis: pharmacological interventions to explore biochemical, morphological and mechanical properties / J.C. Cluitmans [et al.] // *Front. Mol. Biosci.* – 2016. – Vol. 3. – P. 1–11.
8. D'Alessandro, A. Omics markers of the red cell storage lesion and metabolic linkage / A. D'Alessandro [et al.] // *Blood Transfus.* – 2017. – Vol. 15. – P. 137–144.
9. Dinkla, S. Inflammation-associated changes in lipid composition and the organization of the erythrocyte membrane / S. Dinkla [et al.] // *BBA Clin.* – 2016. – Vol. 5. – P. 186–192.
10. Distler, J.H. Microparticles as mediators of cellular cross-talk in inflammatory disease / J.H. Distler [et al.] // *Autoimmunity.* – 2006. – Vol. 39. – P. 683–690.
11. Ferru, E. Thalassemic erythrocytes release microparticles loaded with hemichromes by redox activation of p72Syk kinase / E. Ferru [et al.] // *Haematologica.* – 2014. – Vol. 99. – P. 570–578.
12. Harisa, G.I. Erythrocyte nanovesicles: biogenesis, biological roles and therapeutic approach erythrocyte nanovesicles / G.I. Harisa [et al.] // *Saudi Pharm. J.* – 2017. – Vol. 25. – P. 8–17.
13. Koch, C.G. Real age: red blood cell aging during storage / C.G. Koch [et al.] // *Ann. Thorac. Surg.* – 2019. – Vol. 107. – P. 973–980.
14. Kostova, E.B. Identification of signalling cascades involved in red blood cell shrinkage and vesiculation / E.B. Kostova [et al.] // *Biosci. Rep.* – 2015. – Vol. 35. – P. 1–16.
15. Leal, J.K.F. Red blood cell homeostasis: mechanisms and effects of microvesicle generation in health and disease / J.K.F. Leal [et al.] // *Front Physiol.* – 2018. – Vol. 9. – P. 1–7.
16. Lutén, M. Survival of red blood cells after transfusion: a comparison between red cells concentrates of different storage periods / M. Lutén [et al.] // *Transfusion.* – 2008. – Vol. 48. – P. 1478–1485.
17. Qadri, S.M. Eryptosis in health and disease: A paradigm shift towards understanding the (patho) physiological implications of programmed cell death of erythrocytes / S.M. Qadri [et al.] // *Blood Rev.* – 2017. – Vol. 31. – P. 349–361.
18. Roussel, C. Spherocytic shift of red blood cells during storage provides a quantitative whole cell-based marker of the storage lesion / C. Roussel [et al.] // *Transfusion.* – 2017. – Vol. 57. – P. 1007–1018.
19. Rubin, O. Red blood cell-derived microparticles isolated from blood units initiate and propagate thrombin generation / O. Rubin [et al.] // *Transfusion.* – 2013. – Vol. 53. – P. 1744–1754.
20. Salzer, U. Vesicles generated during storage of red cells are rich in the lipid raft marker stomatin / U. Salzer [et al.] // *Transfusion.* – 2008. – Vol. 48. – P. 451–462.
21. Spinella, P.C. Duration of red blood cell storage is associated with increased incidence of deep vein thrombosis and in hospital mortality in patients with traumatic injuries / P.C. Spinella [et al.] // *Crit. Care.* – 2009. – Vol. 13. – P. 1–11.
22. Tissot, J.D. The storage lesion: From past to future / J.D. Tissot [et al.] // *Transfus. Clin. Biol.* – 2017. – Vol. 24. – P. 277–284.
23. Willekens, F.L. Erythrocyte vesiculation: a self-protective mechanism? / F.L. Willekens [et al.] // *Br. J. Haematol.* – 2008. – Vol. 141. – P. 549–556.
24. Wither, M. Hemoglobin oxidation at functional amino acid residues during routine storage of red blood cells / M. Wither [et al.] // *Transfusion.* – 2016. – Vol. 56. – P. 421–426.
25. Zimring, J.C. Established and theoretical factors to consider in assessing the red cell storage lesion / J.C. Zimring // *Blood.* – 2015. – Vol. 125. – P. 2185–2190.

V.I. Vaschenko, V.N. Vilyaninov, L.A. Skripaj, E.F. Sorokoletova

Vesiculation red blood cells. Its role in donor erythrocytes components

Abstract. The formation of microvesicles by blood cells: monocytes, platelets, granulocytes, erythrocytes and endothelial cells is the most important feature of intercellular interactions. Red blood cells form microvesicles to remove damaged cell components, such as oxidized hemoglobin and damaged membrane components, and thus extend their functioning. Two hypotheses have been put forward for the formation of microvesicles: programmed cell death (eryptosis) and clustering of the band 3 protein as a result of disruption of intercellular interactions. In the process of eryptosis, damage to hemoglobin and a change in the pathways of phosphorylation of membrane proteins, primarily protein of strip 3, weaken the strong bonds between the lipid bilayer and the cytoskeleton, which is accompanied by the transformation of the membrane, the formation of protrusions and their transformation into microvesicles. It was found that the formation of microvesicles by red blood cells is impaired in patients suffering from various pathologies of red blood cells: sickle cell anemia, glucose-6-dehydrogenase deficiency, spherocytosis, and malaria. Studies of the last decade show that a violation of the interaction between the membrane and the cytoskeleton is probably the main mechanism, since it is confirmed by data obtained in the study of structural changes in red blood cells of donor hemocomponents stored in a blood bank. Currently, studies on the effect of microvesicles on the safety of erythrocyte-containing blood components have become widespread. A discussion was resumed on the relationship between the number of accumulated microvesicles in blood components and the effectiveness of donor components for patients during transfusion, depending on the shelf life of the components. Detailed data on proteomic, lipidomic and immunogenic comparisons of microvesicles obtained from various sources are convincing in the identification of trigger stimuli causing the generation of microvesicles. Elucidation of the contribution of microvesicles obtained from red blood cells to inflammation, thrombosis, and autoimmune reactions confirms the need to further study the mechanisms and consequences of the generation of microvesicles by red blood cells of donor components used for transfusion medicine.

Key words: eryptosis, red blood cells, microvesicles, phospholipids, phosphatidylserin, ankyrin, spectrin, scramblase, blood bank, transfusion medicine.

Контактный телефон: 8-921-353-24-18; e-mail: vmeda-nio@mil.ru