

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии,
онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Чабин Иван Андреевич

**Проточная цитофлуориметрия в оценке прокоагулянтных свойств
эритроцитов**

3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика

3.1.28. Гематология и переливание крови

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор физико-математических наук,

профессор, член-корреспондент РАН

Пантелеев Михаил Александрович

доктор медицинских наук, профессор

Сметанина Наталия Сергеевна

Москва – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	15
1.1 Гемостаз.....	15
1.2 Плазменное свертывание.....	15
1.3 Эритроциты.....	18
1.3.1 Реология и гемостаз.....	19
1.3.2 Влияние эритроцитарных везикул на гемостаз.....	20
1.3.3 Взаимодействие эритроцитов с тромбоцитами.....	21
1.3.4 Эритроциты и плазменное свертывание.....	22
1.3.5 Эриптоз.....	23
1.4 Наследственные гемолитические анемии.....	27
1.4.1 Наследственный сфероцитоз.....	28
1.4.2 Наследственный дефицит пируваткиназы эритроцитов.....	30
1.5 Тромбоциты.....	32
1.6 Проточная цитофлуориметрия.....	33
ГЛАВА 2. МЕТОДЫ И МАТЕРИАЛЫ.....	37
2.1 Материалы.....	37
2.2 Пациенты.....	38
2.3 Методы.....	40
2.3.1 Протоколы выделения клеток.....	40
2.3.2 Окрашивание эритроцитов эозин-5-малеимидом.....	41
2.3.3 Окрашивание эритроцитов кальцеином-AM.....	41
2.3.4 Окрашивание эритроцитов CFDA SE.....	42

2.3.5 Стимуляция эриптоза.....	42
2.3.6 Цитометрический подсчет эриптотических эритроцитов	42
2.3.7 Тест внутренней теназы	43
2.3.8 Конъюгация аннексина V с флуоресцентной меткой.....	44
2.3.9 Конъюгация аннексина V с золотыми частицами	45
2.3.10 Цитометрический анализ прокоагулянтных эритроцитов.....	45
2.3.11 Конфокальная микроскопия эриптотических эритроцитов.....	47
2.3.12 Электронная микроскопия эритроцитов.....	48
2.3.13 Статистическая обработка.....	49
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	51
3.1 Детекция ФС-экспрессирующих эритроцитов в цельной крови и после выделения.....	51
3.2 Детекция ФС-экспрессирующих эритроцитов при стимуляции эриптоза.....	53
3.3 Изменение формы эритроцита при обработки ионофором A23187	55
3.4 Изменение формы эритроцита при стимуляции эриптоза ФМА	56
3.5 Связывание ЭМА эриптотическими эритроцитами	59
3.6 Визуализация субпопуляций ФС-экспрессирующих эритроцитов.....	62
3.7 Субпопуляции эритроцитов в динамике	63
3.8 Окрашивание эритроцитов CFDA SE	66
3.9 Окрашивание эритроцитов различной формы кальцеином.....	68
3.10 Электронная микроскопия эритроцитов.....	71
3.11 Активация фактора X внутренней теназой в присутствии эритроцитов.....	74
3.12 Выявление прокоагулянтных эритроцитов в крови здоровых доноров	77
3.13 Цитофлуориметрическая оценка качества эритроцитной взвеси	81

3.14 Циркулирующие прокоагулянтные эритроциты у пациентов с наследственными гемолитическими анемиями	83
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	87
4.1 Две субпопуляции прокоагулянтных эритроцитов	87
4.2 Прокоагулянтные эритроциты в крови здоровых доноров	89
4.3 Цитофлуориметрический анализ хранимых эритроцитов	89
4.4 Прокоагулянтные эритроциты в крови пациентов с гемолитическими анемиями	90
ГЛАВА 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	92
5.1 Перспективы дальнейшего развития темы исследования.....	93
ВЫВОДЫ	94
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	96
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	97
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	98
БЛАГОДАРНОСТИ.....	112

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Основными клетками-участниками свертывания крови традиционно считаются тромбоциты, однако в последнее время появляется все больше данных, свидетельствующих о том, что тромбоциты не только не одиноки в процессах тромбообразования, но и, более того, их вклад в отдельные этапы оказывается сравнимым со вкладом других клеток, а именно клеток эндотелия [1], клеток иммунитета [2], опухолевых клеток [3] и, наконец, эритроцитов [4]. Долгое время эритроциты не рассматривались в качестве активных участников процессов свертывания крови, им отводились второстепенные роли в процессах тромбообразования за счет влияния на вязкость крови, формирования пристеночного положения тромбоцитов в сосудах, что улучшает их адгезию при повреждении эндотелия [4–6]. Однако в настоящее время, в связи с большим количеством клинических данных об эритроцитарном вкладе, появляются работы, которые демонстрируют способность эритроцитов поддерживать отдельные реакции каскада плазменной коагуляции [7; 8].

Каскад плазменного свертывания крови – последовательность реакций активации факторов свертывания крови, конечной задачей которого является формирование фибринового сгустка, останавливающего потерю крови. Широко известно, что ключевые реакции данного каскада – активации фактора X и тромбина – являются мембранно-зависимыми, то есть для их протекания необходимо наличие отрицательно-заряженных фосфолипидных мембран, которые являются источником такого фосфолипида, как фосфатидилсерин (ФС). Считается, что основным источником таких мембран в организме является прокоагулянтная субпопуляция тромбоцитов, также значимыми принято считать вклады микровезикул и активированного эндотелия, однако в последнее время появился ряд работ, которые демонстрируют возможное участие эритроцитов в данных

процессах [9]. Но сравнительной оценки важности вклада каждого вида клеток не проводилось.

В клинических работах, посвященных наследственным гемолитическим анемиям, было продемонстрировано, что такая патология эритроидного ростка связана с повышением частоты тромботических осложнений [10–12]. Более того, в ряде работ продемонстрирована взаимосвязь риска тромбоза и уровня гематокрита у взрослых пациентов [13–15]. Частота тромбозов в периоперационном периоде возрастает при трансфузиях эритроцит-содержащих компонентов крови [16], а также риск осложнений напрямую коррелирует с длительностью хранения таких компонентов [17].

Несмотря на широкую клиническую известность, в литературе нет окончательного представления о механизмах влияния эритроцитов на свертывающую систему, а также сравнительной оценки такого вклада с остальными клетками крови, в первую очередь, с тромбоцитами, как считается, важнейшими участниками данного процесса [4; 5]. Одним из предполагаемых механизмов рассматривается предоставление ФС поврежденными или дефектными эритроцитами для сборки на их мембране мембранно-зависимых комплексов плазменного свертывания (внутренней теназы, протромбиназы) [7]. Однако сам факт существования таких эритроцитов в кровотоке вызывает споры и не признается ведущими специалистами в данной области, несмотря на значительные оценки такого влияния в отдельных работах [8; 18]. Большинство результатов было получено вследствие попыток сборки мембранно-зависимых комплексов в присутствии/отсутствии эритроцитов, они не были подтверждены экспериментами с использованием методов проточной цитофлуориметрии с флуоресцентными маркерами [7; 8; 19], в отдельных работах с применением метода проточной цитофлуориметрии авторы использовали методы выделения эритроцитов, которые предполагали возможность формирования поврежденных клеток в процессе (длительные центрифугирования с высокими угловыми скоростями, использование фиколла, перколла) [20]. Более того, тесты с традиционным маркером ФС – аннексином V не смогли выявить эритроциты, экспрессирующие ФС, в крови

здоровых доноров [20]. Считается, что экспрессия ФС для эритроцитов является признаком протекания запрограммированной гибели клетки, которая в случае эритроцитов называется эриптозом [21]. Известно большое количество веществ, способных стимулировать протекание эриптоза, однако окончательные механизмы не установлены, а разграничение этого процесса с гемолизом, по сути лизисом эритроцитов, размыты [22].

Несмотря на свою распространенность, аннексин V, стандартно используемый маркер для детекции ФС, не является единственным. Поскольку аннексин V имеет ряд недостатков, основным из которых можно назвать относительно низкую чувствительность (требуется концентрация ФС более 4% для связывания), а также блокирование сайтов связывания для других белков за счет формирования сети вокруг мембраны, были разработаны такие альтернативные маркеры, как лактадхерин [23], эвектин-2 [24], Tim4 [25]. Первый из них, лактадхерин, в настоящее время считается наиболее перспективным в связи с большей чувствительностью к ФС, а также в связи с кальций-независимым характером связывания. Лактадхерин связывается с ФС за счет C2 домена, недавно была продемонстрирована возможность использования рекомбинантного C2 домена лактадхерина, который не только обладает всеми положительными качествами лактадхерина, но также не препятствует связыванию факторов свертывания [26].

Таким образом, в результате поиска прокоагулянтных эритроцитов при помощи проточной цитофлуориметрии, а также сравнительного анализа активности эритроцитов и тромбоцитов в мембранно-зависимых реакциях свертывания крови был найден новый, чувствительный тест для оценки прокоагулянтных свойств клеток крови. Использование данного теста для детекции прокоагулянтных эритроцитов в крови в норме и при патологии основывается на определении нового лабораторного маркера протромботического состояния.

Степень разработанности темы исследования

В настоящее время в ряде работ продемонстрирована способность эритроцитов поддерживать мембранно-зависимые реакции свертывания крови, такие как активация протромбина комплексом V и X факторов свертывания, а также активность эритроцитов в тесте генерации тромбина [7; 8; 19]. Однако четкой корреляции между наблюдаемой активностью и ФС-положительными эритроцитами не было выявлено, другим проблемным аспектом является оценка экспрессии ФС эритроцитами после их выделения, что затрудняет интерпретацию данных, определение физиологической значимости *in vivo*. Использование в большинстве работ аннексина V, который оказался неспособным выявлять ФС-экспрессирующие эритроциты в крови здоровых доноров [27], является дополнительным ограничением. Учитывая вышеперечисленные факты, существующие работы по оценке экспрессии ФС на циркулирующих при различных заболеваниях эритроидного ростка, таких как наследственные гемолитические анемии и гемоглобинопатии, не решают в полной мере вопрос оценки вероятного увеличения числа циркулирующих поврежденных эритроцитов, способных вносить вклад в прокоагулянтное состояние.

Цель исследования

Выявление субпопуляций прокоагулянтных эритроцитов в цельной крови с использованием метода проточной цитофлуориметрии.

Задачи исследования

1. Исследование субпопуляций прокоагулянтных эритроцитов с использованием высокочувствительных маркеров фосфатидилсерина при стимуляции эритроцитов.

2. Сравнение прокоагулянтной активности субпопуляций эритроцитов и активированных тромбоцитов в поддержании мембранно-зависимых реакций свертывания крови.

3. Разработка методики выявления субпопуляций прокоагулянтных эритроцитов на основе метода проточной цитофлуориметрии.

4. Оценка количества циркулирующих прокоагулянтных эритроцитов в цельной крови и эритроцитной взвеси здоровых доноров

5. Оценка количества циркулирующих прокоагулянтных эритроцитов в цельной крови пациентов с наследственными гемолитическими анемиями (наследственный сфероцитоз, дефицит пируваткиназы эритроцитов).

Научная новизна

Проведен сравнительный анализ аннексина V и C2 домена лактадхерина (C2-лактадхерина) в качестве маркера ФС, продемонстрировано преимущество использования C2-лактадхерина для выявления фосфатидилсерина на внешней мембране эритроцита, впервые описана стадия экспрессии ФС в низких количествах на внешней мембране эритроцита, которая является стабильной промежуточной стадией в переходе из интактных эритроцитов к аннексин V-положительным эритроцитам, что уточняет картину запрограммированной гибели эритроцита – эриптоза.

Впервые продемонстрирована способность ФС-экспрессирующих эритроцитов поддерживать работу комплекса внутренней теназы с активностью, зависящей от уровня экспрессии ФС. Проведена сравнительная оценка активности эритроцитов с активностью активированных тромбоцитов.

Разработана методика цитофлуориметрической детекции прокоагулянтных эритроцитов в цельной крови.

Проведена оценка количества циркулирующих прокоагулянтных эритроцитов в цельной крови здоровых добровольцев, а также оценена скорость накопления таких клеток в образцах хранимой эритроцитной взвеси. Пожалуй, впервые удалось достоверно детектировать прокоагулянтные эритроциты в крови здоровых людей.

Выявлено существенное повышение количества циркулирующих прокоагулянтных эритроцитов в крови пациентов с наследственными гемолитическими анемиями, такими как наследственный сфероцитоз и дефицит пируваткиназы эритроцитов. Установлено, что степень повышения количества циркулирующих прокоагулянтных эритроцитов различна для пациентов с этими двумя заболеваниями и в обоих случаях достоверна в сравнении с показателями контрольной группы здоровых добровольцев.

Теоретическая и практическая значимость

Полученные данные о существовании достаточно стабильного промежуточного этапа в экспрессии ФС эритроцитами уточняют существующие представления об эритроцитозе и механизмах элиминации эритроцитов. Разработанная методика детекции прокоагулянтных эритроцитов с помощью метода проточной цитофлуориметрии может быть использована в рутинных лабораторных исследованиях наряду с другими тестами оценки гемостаза у пациентов с различными заболеваниями. Использование в данной методике минимальных количеств цельной крови делает данную методику применимой для пациентов любого возраста и массы, а отсутствие промежуточных этапов выделения клеток снимает большинство вопросов интерпретации данных. В перспективе использование данной методики может позволить выявлять группы с таким повышением риска развития тромботических осложнений, для которого целесообразно применение первичной профилактики.

Методология и методы исследования

Для определения экспрессии фосфатидилсерина клетками крови использовался метод проточной цитофлуориметрии с флуоресцентно-мечеными маркерами фосфатидилсерина (аннексин V, лактадхерин) с использованием флуоресцентно-меченых антител для идентификации клеток. В качестве второго

метода для подтверждения результатов проточной цитофлуориметрии использовалась флуоресцентная микроскопия. Для определения прокоагулянтной активности клеток проводилась сборка внутренней теназы в присутствии различных концентраций клеток с наработкой фактора Ха с дальнейшим определением полученного количества по скорости расщепления хромогенного субстрата S-2765. Для определения количества циркулирующих эритроцитов в норме и патологии использовался разработанный протокол цитофлуориметрического анализа, проводилась оценка процента ФС-положительных эритроцитов у пациентов с установленными диагнозами «наследственный сфероцитоз» и «дефицит пируваткиназы эритроцитов», подтвержденными с использованием специфических лабораторных методов исследования (в т.ч. эритроцитометрии, ЭМА-теста, теста осмотической резистентности эритроцитов, измерения активности пируваткиназы в эритроцитах) и/или молекулярно-генетических методов исследования (полногеномное секвенирование, таргетная NGS панель) в условиях ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава РФ. Последним этапом проведена статистическая обработка полученных данных с использованием стандартных статистических методов.

Положения, выносимые на защиту

1. Эритроциты характеризуются наличием двух уровней экспрессии фосфатидилсерина: низкого, который выявляется связыванием с лактадхерином, но недостаточен для связывания аннексина V, и высокого, при котором возможно связывание и лактадхерина, и аннексина V.

2. Эритроциты, экспрессирующие фосфатидилсерин, обладают прокоагулянтной активностью, зависящей от уровня экспрессии фосфатидилсерина.

3. Только эритроциты с низкой экспрессией фосфатидилсерина однозначно достоверно выявляются в крови здоровых добровольцев, у пациентов с

наследственным сфероцитозом (0,27%) и у пациентов с дефицитом пируваткиназы (0,45%) определяется повышенный уровень лактадхерин-связывающих, прокоагулянтных эритроцитов в сравнении с показателями здоровых добровольцев (0,13%).

Личный вклад автора

Личный вклад автора заключается в анализе научной литературы, в планировании и непосредственном проведении всей экспериментальной части, за исключением проведения микроскопической визуализации, в подготовке иллюстраций, написания научных статей и тезисов по материалам работы.

Достоверность и обоснованность результатов

Достоверность полученных результатов обусловлена использованием современных методов исследования, а также применением минимум двух различных методов исследования для проверки полученных новых результатов, для анализа результатов использовались современные методы статистического анализа в рамках общедоступных программных пакетов с известной репутацией. Также достоверность результатов подтверждается согласованностью с известными литературными источниками. Достоверность результатов, полученных для пациентов с наследственными гемолитическими анемиями, обусловлена её набором в условиях экспертного гематологического центра и применением разработанных на основе фундаментальных результатов методик исследования.

Апробация диссертации

Апробация работы проводилась на совместном заседании экспертных комиссий по лабораторной диагностике, клеточным технологиям и фундаментальным исследованиям и гематологии, иммунологии и педиатрии ФГБУ

«НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, протокол №6 от 19.06.25.

Основные результаты диссертационной работы были представлены на следующих всероссийских и международных конференциях: 2020 Virtual Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (онлайн, июль 2020 года), на 45-ом съезде Европейского общества биохимиков FEBS Open Bio (онлайн, июль 2021 г.), XXIV съезде физиологического общества им. И.П.Павлова (Санкт-Петербург, Россия, сентябрь 2023 года), 16-й Международной научной конференции «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем» (Минск, Беларусь, июнь 2024 года), VIII Всероссийская школа-конференция, посвящённой 270-летию Московского университета «Физиология и патология кровообращения» (Москва, Россия, февраль 2025 года), всероссийской научной конференции для аспирантов «Системная биология и системная физиология» (Москва, Россия, июнь 2025 года), а также регулярно обсуждались на семинарах лаборатории клеточного гемостаза и тромбоза ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России в 2019 – 2025 гг.

Публикация результатов исследования

По результатам исследования опубликовано 9 работ, в том числе 4 статьи, опубликованные в изданиях, входящих в перечень ВАК с категорией К2 при Минобрнауки Российской Федерации и индексируемых международными базами данных.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 112 страницах машинописного текста и включает оглавление, введение, обзор литературы (глава 1), материалы и методы (глава 2), результаты (глава 3), обсуждение результатов (глава 4), заключение, выводы,

список обозначений и сокращений, список литературы, включающий 115 библиографических ссылок (15 отечественных, 100 зарубежных), и благодарности.

Работа содержит 5 таблиц и 39 рисунков.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Гемостаз

Гемостаз – сложная система, основными задачами которой являются две по сути противоречащих друг другу задачи – поддержание крови в жидком состоянии и предотвращение утечки крови при повреждении сосудов. В этой сложной системе традиционно выделяют три основных компонента: сосудистый гемостаз, тромбоцитарный гемостаз и плазменное свертывание. В рамках сосудистого гемостаза происходит сужение вплоть до полного перекрытия (для мелких сосудов) просвета сосудов [28]. Основные задачи, которые решаются в процессе, - это, с одной стороны, снижение интенсивности кровопотери, с другой стороны, снижение скорости движения крови по сосуду, что облегчает агрегацию тромбоцитов и делает возможным протекание биохимических реакций каскада свертывания. В рамках тромбоцитарного гемостаза происходит агрегация тромбоцитов и образование тромбоцитарной «пробки», закрывающей повреждение и резко снижающей возможность кровопотери [29]. Разумеется, такая «пробка» не является чисто тромбоцитарной, в её составе встречаются другие клетки, такие как эритроциты и нейтрофилы, кроме того, клеточный состав зависит от условий образования: давно известно, что при образовании тромба в условиях венозного кровотока формируется «красный» тромб, в котором в большом количестве представлены эритроциты, в то время как в условиях артериального кровотока формируется «белый» тромб. В настоящее время продолжают интенсивные исследования роли каждого клеточного компонента тромба, зависимости их распределения и выполняемой функции. Последним этапом гемостаза является плазменное свертывание [30].

1.2 Плазменное свертывание

Плазменное свертывание представляет собой каскад последовательных активаций ферментов свертывания (Рисунок 1). Большинство ферментов этого

локализуется место активации свертывания, что препятствует, по сути, диссеминированию процесса, и происходит управление всем каскадом [28].

Однако одной способности тромбина активировать систему естественных антикоагулянтов недостаточно для эффективного решения локализации свертывания крови. Для того чтобы процесс свертывания не распространялся, как чума, по сосудам, ключевые реакции каскада требуют присутствия отрицательно-заряженной поверхности для своего протекания, такие реакции называются мембранно-зависимыми [29]. Основным источником отрицательно-заряженной поверхности в организме является ФС. Фосфатидилсерин – фосфолипид, один из основных компонентов мембраны, который в норме весь находится на внутреннем слое, формируя так называемую мембранную асимметрию, которая в свою очередь поддерживается за счет работы ферментов флиппаз класса транслоказ (Рисунок 2) [30]. При повреждении клетки, приводящей к клеточной гибели, работа этих

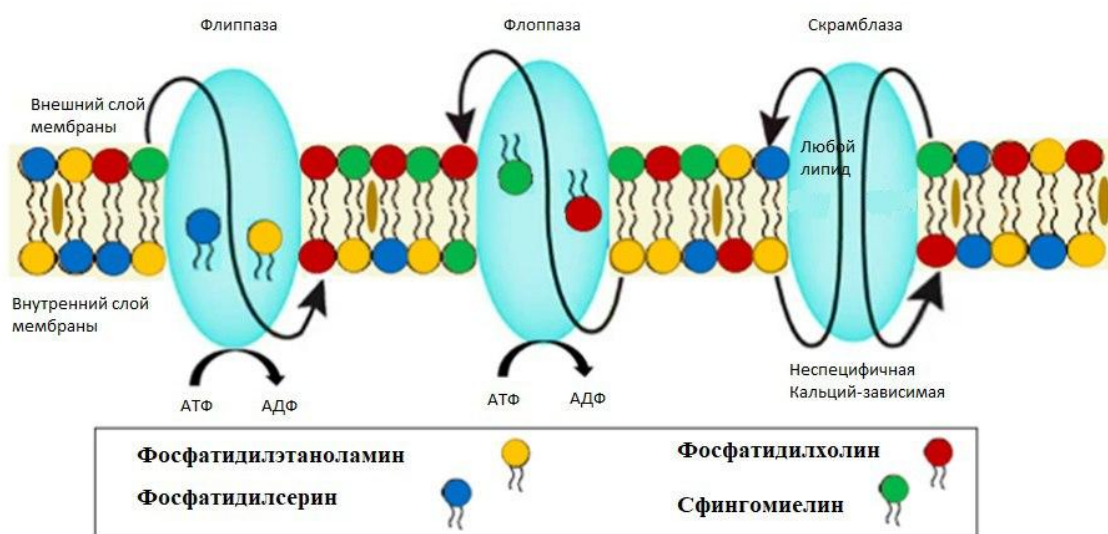


Рисунок 2 – Схема трансмембранных транспортеров липидов, формирующих и поддерживающих мембранную асимметрию. Флиппазы опосредуют АТФ-зависимую транслокацию фосфатидилсерина (ФС) и фосфатидилэтаноламина с внешнего на внутренний слой мембраны. Флоппазы катализируют АТФ-зависимую транслокацию фосфатидилхолина, сфингомиелина и холестерина во внешний слой мембраны. Скрамблазы облегчают неспецифическое двунаправленное движение, запускаемое при высоких концентрациях цитозольного Ca^{2+} . Адаптировано из [30].

ферментов нарушается, клетка теряет асимметрию мембраны, начиная экспрессировать фосфатидилсерин [31]. Особым случаем является способность тромбоцитов в ответ на сильную активацию формировать субпопуляцию прокоагулянтных тромбоцитов, экспрессирующих ФС [32].

Данная субпопуляция считается основным источником отрицательно-заряженной поверхности в организме, однако не является единственным. К другим источникам принято относить поврежденные эндотелиоциты, микровезикулы, в последнее время стала известна способность эритроцитов поддерживать мембранно-зависимые реакции свертывания крови. Однако сравнительные вклады каждого из этих компонентов на сегодняшний день до конца не определены [6; 28].

1.3 Эритроциты

Эритроциты – самая распространенная клетка в человеке, основной задачей которой является доставка кислорода к клеткам тела. Гемоглобин, занимающий до 80% объема клетки, является токсичным для внутренних органов белком, в связи с чем важным вопросом является предотвращение его высвобождения вследствие внутрисосудистого лизиса. Другой причиной убирать эритроциты из кровотока до их окончательной смерти является нарушение способности «старых» клеток к изменению формы и, как следствие, возможность застревания в капиллярах [33; 34]. Таким образом, с одной стороны, необходимость и важность элиминации эритроцитов из кровотока известно давно, равно как и возможное влияние эритроцитов на систему свертывания крови, с другой стороны, ни одна из этих проблем в настоящее время не имеет окончательного решения. Нет единого ясного представления о механизмах элиминации эритроцитов, обычно упоминается роль селезенки, лимфоидного органа с ретикуло-эндотелиальной системой, ответственной за удаление эритроцитов из кровотока [35]. Основным параметром для элиминации эритроцита селезенкой считается его способность менять форму и преодолевать узкие пространства капилляров, или, в случае селезенки, узкие пространства синусов [36].

Другим вопросом, тесно связанным с вопросами клеточной смерти эритроцита, является вопрос его участия в плазменном свертывании крови за счет экспрессии ФС [7; 8; 37; 38]. С одной стороны, в различных исследованиях до сих пор не было истинно детектировано в крови здоровых доноров наличие ФС-экспрессирующих эритроцитов, с другой стороны, данный факт не мешает многим авторам исследований в данной области верить в их существование в кровотоке, пусть и с высокими скоростями элиминации таких клеток [27; 39]. Механизмы такой элиминации не очевидны. Существуют литературные данные о том, что в мышинных моделях нокаут такого белка, как лактадхерин, который опосредует фагоцитоз поврежденных эритроцитов, приводит к снижению скорости элиминации поврежденных донорских эритроцитов у анемизированных мышей [40]. Этот феномен указывает на то, что клиренс эритроцитов осуществляется не только по форме и способности фильтроваться, но также и за счет экспрессии фосфатидилсерина.

1.3.1 Реология и гемостаз

Эритроциты способны влиять на гемостаз за счет влияния на целый ряд его компонентов: от физического расположения клеток внутри сосуда до прямого влияния на протекание реакций плазменного свертывания.

Наверное, самым известным фактом влияния эритроцитов на гемостаз является феномен централизации их расположения [6] в просвете сосуда. Он появляется за счёт многих факторов, в числе которых пластичность формы эритроцитов и их способность к обратимой агрегации (в т.ч. через фибриноген и другие плазменные белки) [41; 42]. Таким образом, остальные клетки, в основном тромбоциты, оказываются оттесненными на периферию, где их концентрация около стенки сосуда увеличивается в 3-8 раз [43], это обстоятельство значительно облегчает процессы агрегации и адгезии при запуске тромбоцитарного гемостаза.

Также эритроциты как основной клеточный компонент крови определяют её вязкость [44–46]. Зависимость вязкости крови от гематокрита экспоненциальная в крупных сосудах [47] и линейная в капиллярах [48]. Получается логичная

закономерность: больше эритроцитов – выше вязкость крови, а повышенная вязкость крови напрямую связана с повышенным риском тромбоза как компонент триады Вирхова, и через изменения характера тока крови и эритроцитопосредованное повреждение эндотелия [4; 6].

Вышеупомянутые свойства эритроцитов определяются их объемом и формой. И если в норме пластичность эритроцитов объясняет различную вязкость крови при высоких скоростях сдвига (в артериях) и при низких (в венах), то значительно возрастает значимость этого факта при различных эритроцитопатиях, связанных с нарушением формы и/или пластичности клетки [6; 49].

1.3.2 Влияние эритроцитарных везикул на гемостаз

Другим важным фактором влияния эритроцитов на гемостаз, особенно субпопуляций «старых» эритроцитов, является образование микровезикул. Образование микровезикул является неотъемлемой частью апоптоза ядерной клетки [50]. Несмотря на отсутствие ядра, впрочем, как и митохондрий, эритроциты способны к образованию микровезикул, причем наиболее склонны из них те, которые циркулируют в крови уже длительное время. Многие везикулы, в т.ч. эритроцитарные, циркулирующие в крови, характеризуются экспрессией ФС [51], являясь прокоагулянтным фактором за счет способности активировать фактор Хагемана [52] и поддерживать мембран-зависимые реакции свёртывания крови. Влияние эритроцитарных везикул на свёртывание крови в норме считается незначительным, однако при различных эритроцитарных [53] и не эритроцитарных [54] патологиях их влияние может существенно увеличиваться.

Другим важным свойством эритроцитарных микровезикул является их способность индуцировать системный воспалительный ответ. Точные механизмы, объясняющих данный феномен, неясны, существует ряд теорий. Первая заключается в том, что микровезикулы являются своеобразным хранилищем свободного гема, при их фагоцитозе клетками эндотелия и попадании во внутриклеточное пространство за счет индукции оксидативного стресса он вызывает его активацию. Другая теория заключается в тромбин-опосредованной активации комплемента на поверхности везикул [55].

Эритроцитарные везикулы являются важным фактором в контексте трансфизиологической службы, эритроцит-содержащие продукты являются самыми потребляемыми компонентами крови. В ряде исследований было продемонстрировано, что количество микровезикул является важным параметром, определяющим прокоагулянтный эффект эритроцитной взвеси и оно увеличивается в процессе хранения [56].

1.3.3 Взаимодействие эритроцитов с тромбоцитами

Взаимодействие эритроцитов и тромбоцитов не ограничивается простым эффектом оттеснения к стенке в рамках кровотока в сосудах, который уже был упомянут. В литературе продемонстрирована возможность прямого взаимодействия эритроцитов и тромбоцитов в условиях венозного тромбоза через гликопротеин VI-опосредованную адгезию. Более того, показано влияние тромбоцитов на эритроциты в условиях тромба, когда близкорасположенный тромбоцит, выставляя на своей поверхности Fas-лиганд, активирует Fas-рецептор эритроцита, что приводит к выставлению последним фосфатидилсерина на внешнем слое мембраны и увеличивает количество прокоагулянтной поверхности [6; 57]. Кроме того, выделяемые активированными тромбоцитами производные арахидоновой кислоты могут влиять на метаболизм и внутриклеточную сигнализацию эритроцитов, увеличивая число клеток, экспрессирующих ФС [58]. Также описана возможность межвидовой агрегации посредством взаимодействия интегрин $\alpha 2\beta 3$ тромбоцита и ICAM-4 молекулы эритроцита [6; 59].

Возможно и обратное направление влияния, эритроциты способны индуцировать активацию тромбоцитов через производство во время стресса АДФ, который является слабым активатором тромбоцитов, индуцирующим агрегацию [60]. Другой аспект влияния связан с внутрисосудистой гибелью эритроцитов, в процессе которой происходит выделение свободного гемоглобина. Гемоглобин, окисляясь под действие оксида азота NO, приводит к его деплеции, тем самым блокируя его функции – вазодилатацию и ингибирование тромбоцитов [61]. Также в цитоплазме эритроцитов содержится такой фермент, как аргиназа. Функцией этого фермента является метаболизм аминокислоты L-аргинина до орнитина.

Данная аминокислота является одним из источников азота для биосинтеза NO. Таким образом, за счет уменьшения доступности прекурсора снижается количество синтезированного оксида азота [62; 63].

1.3.4 Эритроциты и плазменное свертывание

Как уже было упомянуто, ключевые реакции свертывания крови для своего протекания требуют присутствия отрицательно-заряженной поверхности, которая в организме главным образом представлена фосфатидилсерин-содержащими мембранами. Эритроциты долгое время не рассматривались в качестве источника ФС, однако при этом их состав мембраны по количеству фосфатидилсерина не отличается от состава мембраны тромбоцитов [64; 65]. Естественно, что эритроциты способны терять асимметричность мембраны при различных повреждениях, в том числе и физиологических (воспаление, оксидативный стресс) [38; 66]. Потерю асимметрии у эритроцитов принято считать основным признаком эриптоза, процесса, по своим характеристикам напоминающего апоптоз, но для эритроцитов [39]. Естественно, что в литературе существуют данные о том, что в крови существует субпопуляция эритроцитов, которая, по одним оценкам, составляет около 0,4-0,5% от всех эритроцитов, связывает аннексин V, и, значит, должна быть способна поддерживать мембранно-зависимые реакции свертывания крови [8]. С другой стороны, в другом исследовании старения эритроцитов достоверно не было детектировано ни одного (!) эритроцита, связывающего аннексин V. В экспериментах с выделенными эритроцитами было продемонстрировано, что их вклад в генерацию тромбина за счет поддержания работы комплекса протромбиназы (комплекса факторов Va и Xa) составляет до 40% от общего потенциала генерации клетками цельной крови [8]. Эритроциты, способные поддерживать мембранно-зависимые реакции свертывания крови в данной работе называются «прокоагулянтными», по аналогии с субпопуляцией тромбоцитов.

Интересным аспектом активации тромбина в присутствии эритроцитов является тот факт, что основным интермедиатом такой активации является мейзотромбин [8]. Данный фермент отличается от тромбина тем, что с

одинаковыми константами расщепляет фибриноген, активирует тромбоциты через PAR1 рецептор, а также активирует протеин С, в то время как для тромбина константы первых двух реакций на несколько порядков выше в сравнении с константой третьей. Расщепление мейзотромбином, впрочем как и тромбином, протеина С значительно ускоряется в присутствии тромбомодулина и фосфолипидов, причем данный эффект наблюдается вплоть до крайне высоких концентраций фосфолипидов – плато начинается при концентрации около 1 мМ [67]. Протеин С в – естественный антикоагулянт, который, образуя комплекс с протеином S, расщепляет факторы Va и VIIIa, отрезая домен, ответственный за связывание с мембраной, таким образом блокируя работу мембранно-зависимых комплексов этих факторов. Логичным продолжением таких эффектов является ингибирование плазменного свертывания.

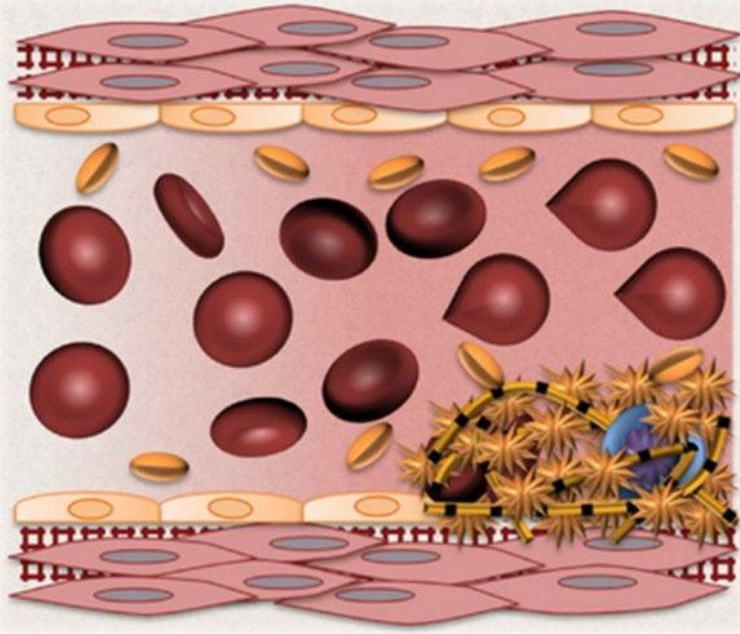
Также у эритроцитов на мембране обнаружен эластазо-подобный фермент, способный самостоятельно расщеплять фактор IX, который входит в состав комплекса внутренней теназы, тем самым поддерживая активацию свертывания крови [6; 68].

Таким образом, механизмов влияния эритроцитов на гемостаз в настоящее время описано множество, степень их влияния зависит от внешних условий, главным образом, от места образования тромба, что наглядно продемонстрировано на Рисунке 3.

1.3.5 Эриптоз

Появившееся около 20 лет назад понятие эриптоза в настоящее время поэтапно входит в обиход, хотя по-прежнему место данного понятия и, в целом, описываемого им феномена неочевидно. Эриптозом называют запрограммированную гибель эритроцита в противоположность полному лизису эритроцита, который называют гемолизом. Эриптоз характеризуется 1) нарушением мембранной асимметрии – появлением фосфатидилсерина на внешней мембране эритроцита, 2) уменьшением объема клетки и 3) образованием микровезикул [21; 50; 51]. Данные признаки характерны и для апоптоза ядерных клеток. Однако несмотря на, а может и вследствие, относительную биохимическую

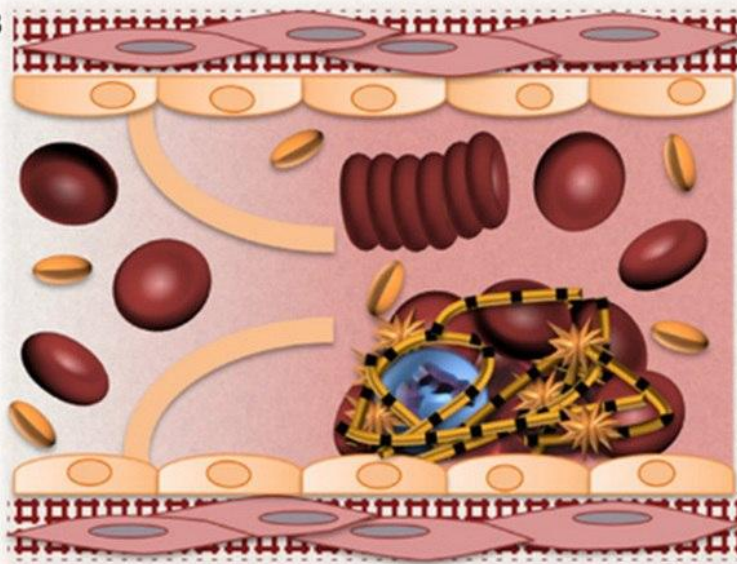
A



Артериальный тромбоз

- повышенная вязкость крови
- адгезия к клеточной стенке
- влияние на тромбоциты:
 - 1) Краевое положение
 - 2) Адгезия
 - 3) Агрегация
 - 4) Активация

B



Венозный тромбоз

- Увеличивает вязкость крови
- Образуют "монетные" столбики
- Адгезия к клеточной стенке
- Способствуют образованию тромбина
- Увеличивают размер тромба
- Снижают проницаемость тромба
- Замедляют тромболитис

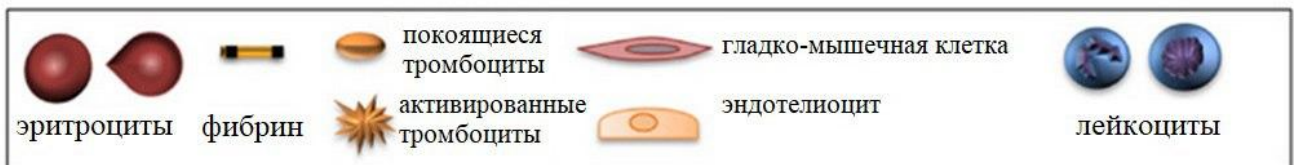


Рисунок 3 – Механизмы влияния эритроцитов на образование артериальных и венозных тромбов. Воспроизведено с модификациями из [46]

и биофизическую простоту организации эритроцита – клетки, лишенной ядра и митохондрий, а также множество описанных в литературе веществ, приводящих к

индукции эриптоза, в настоящее время не установлено единого механизма, запускающего эриптоз [69].

В качестве сигнальных путей, связанных с эриптозом, обычно упоминаются пути, связанные с активацией каспазы 3, протеинкиназы C, а также рядом функциональных изменений в виде изменения ионного баланса, концентрации внутриклеточного кальция, углеводного состава мембраны, а также повышением уровня оксидативного стресса [69]. Однако, несмотря на интенсивные исследования в этой области, окончательной схемы этого процесса не существует. Общим для любого пути инициации эриптоза принято считать происходящее тем или иным путем повышение концентрации внутриклеточного кальция, которое запускает дальнейшие изменения в виде активации кальций-зависимых калиевых каналов Гардоса и кальций-зависимой скрамблазы, что приводит к выставлению фосфатидилсерина (Рисунок 4) [21]. Активация фосфолипазы A₂ продолжает этот марш смерти, продолжая деградацию мембранных фосфолипидов с наработкой такой важной биологически-активной молекулы как арахидоновая кислота. Вследствие активации каналов Гардоса происходит утечка калия из клетки, сопровождаемая утечкой других ионов и воды, что приводит к уменьшению объема клетки, которое может ещё больше повышать концентрацию кальция [22; 70]. А высокая внутриклеточная концентрация кальция приводит к нарушению многих энергетических реакций, связанных с переносом фосфатных групп [71].

Таким образом, в процессе эриптоза эритроциты теряют мембранную асимметрию, и образующаяся субпопуляция должна быть способна поддерживать мембранно-зависимые реакция свертывания крови.

Феномен провоцирования эриптоза в настоящее время описан при целом ряде состояний, включая такие распространенные патологии, как острый коронарный синдром [72], ожирение [73], системные воспалительные заболевания [74; 75], амилоидоз [71], хроническая болезнь почек [76], диабет [76], нарушения липидного обмена [77], артериальная гипертензия [77] и многие другие. Разумеется, при паразитарных заболеваниях, таких как бабезиоз [78] и малярия [79; 80], отмечается

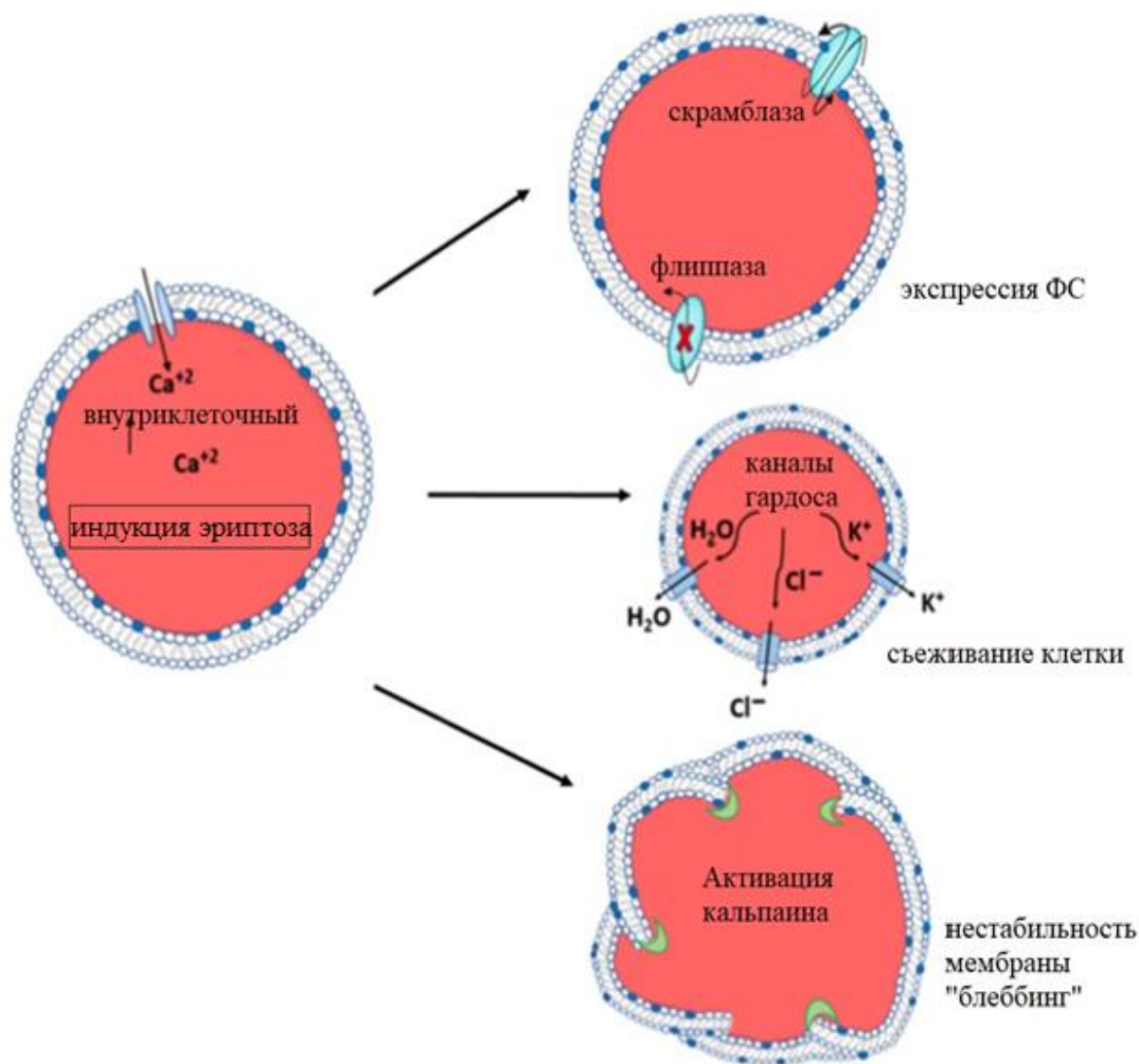


Рисунок 4 – Схема протекания клеточной смерти эритроцита, эриптоза. Под действия повышения внутриклеточной концентрации кальция 1) активируется скрамблаза и тормозится работа флиппазы, что приводит к экспрессии фосфатидилсерина; 2) активируются каналы Гардоса, что приводит к сжатию клетки; 3) активация кальпаина приводит к нестабильности мембраны. Адаптировано из [21].

существенное повышение числа эриптозных эритроцитов, что логично связано с повреждением клеток.

Несмотря на подробные описания уровней эриптозных эритроцитов при ряде негематологических заболеваний, результаты применения методов детекции

эриптоических эритроцитов к гематологическим пациентам несколько более скромные, так при исследовании эриптоза при аутоиммунной гемолитической анемии (АИГА) достоверное повышение было зафиксировано только при АИГА, опосредованной иммуноглобулинами класса М или А. Данная популяция пациентов также отвечала на терапию эритропоэтином, который является известным ингибитором эриптоза [81].

Для пациентов с наследственными гемолитическими анемиями, а также гемоглобинопатиями было продемонстрировано повышение уровня эриптоических эритроцитов у пациентов с наследственным сфероцитозом и обоими формами талассемии, однако в данной работе в качестве пробоподготовки выполнялось выделение эритроцитов на перколле с разделением эритроцитов по плотности, что привело к аномально высокому уровню (около 2%) ФС-положительных эритроцитов в группе здоровых доноров, что заставляет сомневаться в результатах данного исследования. Интересно, что для группы пациентов с наследственным элиптоцитозом отличий в сравнении с контрольной группой отмечено не было [82].

1.4 Наследственные гемолитические анемии

Гемолитические анемии – группа заболеваний, которые характеризуются снижением продолжительности жизни эритроцитов, что приводит к более интенсивному гемолизу. Наследственные гемолитические анемии характеризуются внутренними (клеточными) причинами, которые по своим причинам достаточно разнородны. Их принято разделять на 1) мембранопатии, вызываемые нарушением цитоскелета эритроцитов, 2) ферментопатии, вызываемые дефицитом активности ферментов, участвующих в внутриклеточном метаболизме, 3) гемоглобинопатии, вызываемые нарушениями структуры основного белка эритроцита – гемоглобина [83; 84]. Клинико-лабораторно эта группа заболеваний проявляется ретикулоцитозом, необструктивной желтухой и проявлениями анемического синдрома, такими как бледность слизистых, слабость, а также нередко

спленомегалией вследствие интенсивного гемолиза. Из сопутствующих заболеваний наиболее частым осложнением является развитие калькулезного холецистита вследствие хронически повышенных уровня билирубина и его метаболитов. В настоящее время терапевтические опции при данных патологиях крайне ограничены и сводятся к восполнению дефицита витаминов при хроническом гемолизе, профилактике холестаза, а также, при тяжелых формах гемолиза, проведении оперативного лечения в виде спленэктомии, что приводит к снижению интенсивности гемолиза во многих случаях [85].

Наиболее распространенной мембранопатией является наследственный сфероцитоз, а самой распространенной ферментопатией является наследственный дефицит пируваткиназы эритроцитов [84]. Для каждой из этих патологий клинически описано повышение риска тромбозов, однако механизмы этих осложнений до конца неясны [86; 87].

1.4.1 Наследственный сфероцитоз

Наследственный сфероцитоз (также известен как анемия Минковского-Шоффара)– это самая распространенная форма наследственной гемолитической анемии, связанной с дефектом цитоскелета, циркулирующие эритроциты при этой форме заболевания имеют сферическую форму, что и дало название заболеванию. Впервые данное заболевание было описано Oskar Minkowski в 1900 году при наблюдении нескольких семей с анемией. В настоящее время определено большинство подлежащих генетических дефектов, а также характер наследования, который может быть как аутосомно-доминантным, так и аутосомно-рецессивным. Патогенетически причиной заболевания является нарушение работы белков вертикального цитоскелета, к которому относятся белки полосы 3, 4.2, анкирин и альфа- и бета-спектрины (Рисунок 5) [88; 89].

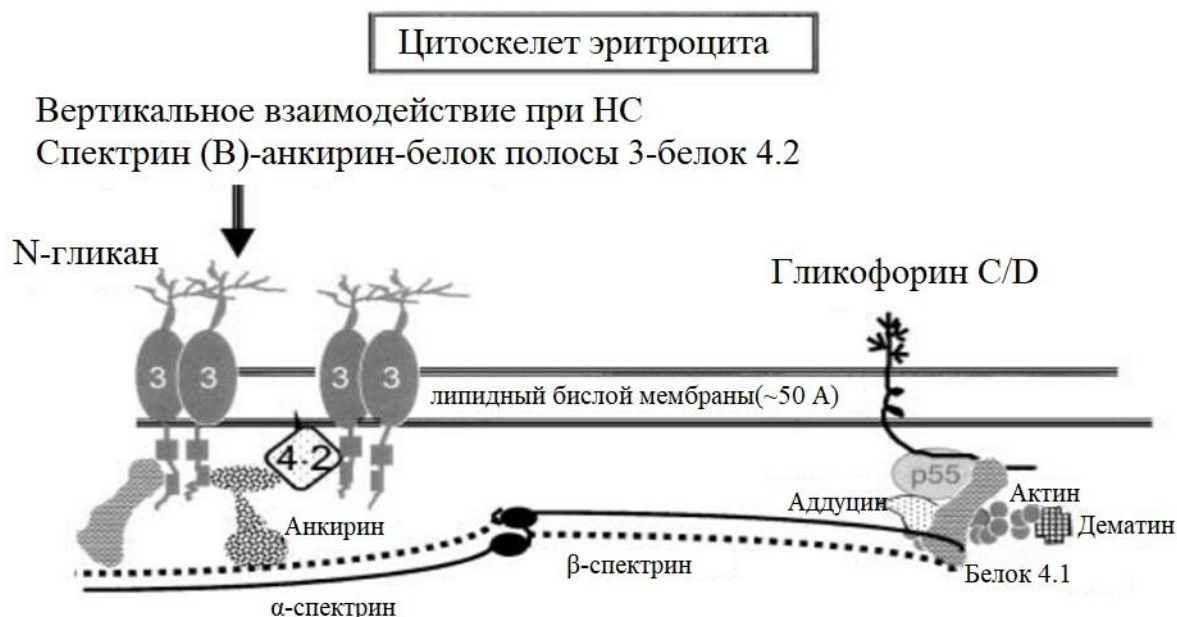


Рисунок 5 – Схема цитоскелета мембраны эритроцита и места нарушений при наследственном сфероцитозе. Адаптировано из [89].

Распространенность наследственного сфероцитоза достаточно высока и в России достигает 1:2000 - 1:5000, однако для большинства людей характерен слабо или средне выраженный гемолиз, что иногда приводит к позднему установлению/неустановлению диагноза [90]. В то же время в связи с аутосомно-доминантным характером наследования для данного заболевания характерен семейный анамнез, хотя фенотипические проявления даже в рамках одной семьи могут сильно варьироваться [91].

Считается, что риск тромботических осложнений при наследственным сфероцитозе существенно повышается после спленэктомии [92]. Однако в одном исследовании было продемонстрировано, что наличие селезенки у данных пациентов является фактором, снижающим риск сердечно-сосудистых событий в сравнении с риском для ближайших родственников пациентов, не подверженным этому заболеванию [93]. Таким образом, предполагается даже некоторая протективная роль гемолиза в отношении образования атеросклеротических бляшек, подтвержденная в других исследованиях [11; 94]. Однако проведение спленэктомии нивелирует этот эффект и уравнивает риски для групп [93]. Таким

образом, в отношении рисков артериального тромбоза достоверных данных о повышении рисков для пациентов с наследственным сфероцитозом нет.

В случае таких осложнений, как венозные тромбозы, считается, что их риск действительно повышается после проведения спленэктомии, однако точные механизмы неизвестны [90]. После проведенного хирургического вмешательства повышается количество тромбоцитов (вторичный тромбоцитоз), что заставляет считать, что этот феномен может объяснять этот эффект, но убедительных данных нет. В то же время продемонстрировано, что эритроциты таких пациентов имеют повышенные характеристики адгезии к эндотелию, что может быть особенно важно для условий венозного тромбоза и продемонстрировано в условиях мышинных моделей [95].

Подводя итог, можно сказать, что достоверных данных о риске тромботических событий с учетом их локализации для наследственного сфероцитоза в литературе немного, что может также объясняться необходимостью крайне длительного наблюдения вследствие возможно поздней реализации рисков во взрослом возрасте после проведенной спленэктомии в детском возрасте.

1.4.2 Наследственный дефицит пируваткиназы эритроцитов

Наследственный дефицит пируваткиназы эритроцитов – самая распространенная наследственная гемолитическая анемия вследствие дефекта гликолитических ферментов [84]. Данное заболевание ассоциировано с мутацией в гене *PKLR* (Рисунок 6), характеризуется аутосомно-рецессивным характером передачи и распространенностью оцениваемой в 3,2-8,5 случаев на 1 млн населения [96]. Выраженное снижение активности пируваткиназы, наблюдаемое при данном заболевании, приводит к снижению синтеза АТФ на 50%, что приводит к энергетическому дефициту, нарушению работы Na^+/K^+ АТФазы и, как следствие, ионному дисбалансу, влияющему на возможность эритроцитов поддерживать форму. Для многих пациентов с этим заболеванием характерна выраженная трансфузионная зависимость, а также в отличие от пациентов со сфероцитозом, они хуже отвечают на проведение спленэктомии [96].

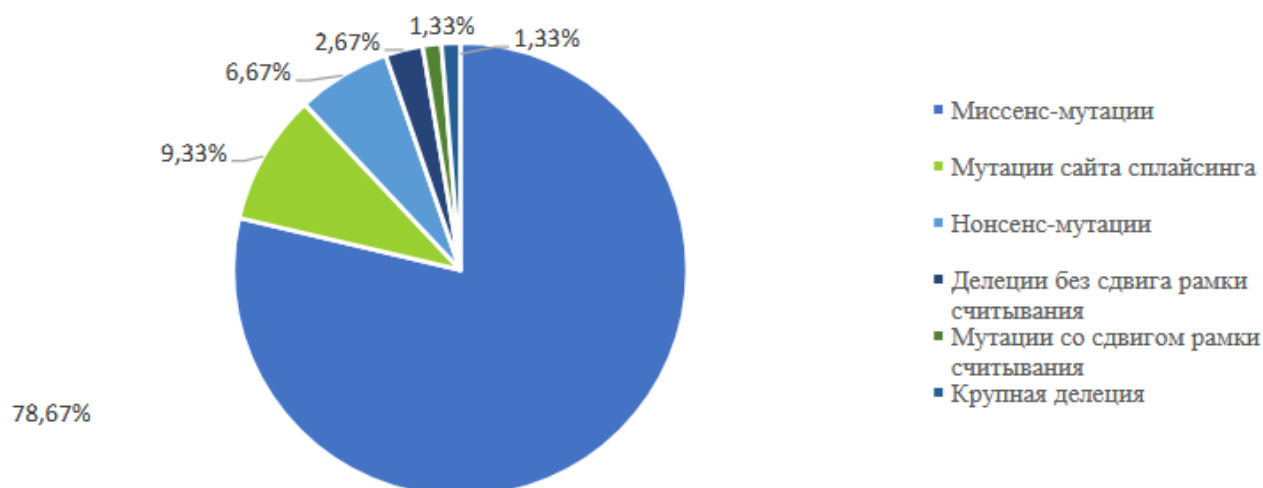


Рисунок 6 – Распределение типов мутаций у пациентов с дефицитом пируваткиназы эритроцитов. Заимствовано из [96]

Наиболее частыми осложнениями данного заболевания считаются камни в желчном пузыре, перегрузка железом и спленомегалия. К редким, но тем не менее крайне значимым клиническим осложнениям можно отнести развитие тромбозов, а проведение спленэктомии для данного заболевания также достоверно повышает риск развития данного вида осложнений [108]. Точных механизмов в настоящее время не установлено, также, впрочем, как и достоверной частоты многих осложнений, что стимулирует запуск работы регистров пациентов с данным заболеванием. Можно предполагать, что в ближайшее время удастся уточнить многие характеристики, связанные с данным заболеванием [109].

Собственный опыт ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России включает в настоящий момент уже несколько десятков больных с наследственным дефицитом пируваткиназы, однако в детском возрасте не было зарегистрировано ни одного тромботического осложнения до настоящего времени [107]. Это обстоятельство заставляет так же, как и в случае наследственного сфероцитоза, предполагать, что данный вид осложнений может носить отдаленный характер, что затрудняет его определение, кроме того, достоверная частота неизвестна.

Как уже было упомянуто, пациенты с дефицитом пируваткиназы эритроцитов нередко требуют трансфузионной поддержки [108]. В крупном многоцентровом

исследовании в 2008 году было продемонстрировано, что длительность хранения эритроцит-содержащих препаратов крови коррелирует с частотой осложнений при их применении [17]. В недавнем исследовании, проведенном в педиатрической популяции, была показана взаимосвязь длительности хранения препаратов эритроцитов с таким редким и тяжелым осложнением, как венозные тромбозы после проведения оперативного вмешательства [16]. Однако точные механизмы, посредством которых переливание препаратов эритроцитов приводит к возникновению тромбозов, остаются неясными. Основными причинами принято считать накопление микровезикул [110], изменение формы клеток [111], а также увеличение экспрессии фосфатидилсерина на внешней мембране эритроцитов [112; 113]. Известны сообщения о кратном детектируемом росте экспрессии фосфатидилсерина при хранении эритроцитной взвеси, который наиболее заметен при использовании в качестве маркера экспрессии фосфатидилсерина лактадхерина в сравнении с аннексином V [114]. В то же время в ряде работ по изучению экспрессии фосфатидилсерина, например для эритроцитарных (CD235+) микровезикул в хранимых продуктах крови, сообщается об отсутствии значимых различий для данных маркеров [110].

1.5 Тромбоциты

Тромбоциты – это небольшие, с диаметром около 2-4 мкм, фрагменты мегакариоцитов, которые традиционно называются клетками. В норме они циркулируют в покое, благодаря размеру свободно проходя через сосуды. В ответ на стимулы, разнообразие которых крайне велико, наиболее важными стимулами считается коллаген I и III типов, а также тромбин и АДФ, они способны активироваться [97]. Этот процесс сопровождается значительными морфологическими изменениями, которые являются отражением перестройки цитоскелета. При активации тромбоциты способны образовывать две различные субпопуляции [32]. Одна из них представляет собой тромбоциты, способные агрегировать друг с другом и другими клетками крови и прикрепляться к

поврежденному эндотелию. Другая субпопуляция тромбоцитов не способна активно формировать агрегаты, однако обладает другой важной особенностью – она экспонирует ФС, что позволяет эффективно протекать мембранно-зависимым реакциям свертывания крови.

Роль данной субпопуляции интенсивно изучается с момента её открытия около 30 лет назад. Было продемонстрировано, что именно на поверхности этих клеток протекают такие реакции, как активация фактора X комплексом VIIIa и IXa факторов, а также активация протромбина комплексом факторов Va и Xa [29]. Благодаря недавним работам мы также знаем, что связывание факторов с мембраной клеток этой субпопуляции неравномерно, оно сосредоточено в одной области, которой было предложено название «шапка» [98]. Связывание факторов свертывания с этой субпопуляцией тромбоцитов ускоряет протекание реакций коагуляции, а также может предотвращать вымывание этих факторов из тромба.

Важным аспектом формирования тромбов, который может быть наиболее важен в условиях венозного кровотока, является возможность активированных тромбоцитов образовывать агрегаты с эритроцитами посредством взаимодействия тромбоцитарного интегрина $\alpha 2\beta 3$ и эритроцитарной ICAM-4 молекулы [6; 59].

1.6 Проточная цитофлуориметрия

Проточная цитофлуориметрия – метод, который в настоящее время приобрел большую распространенность и применяется как в научных целях, так и для решения конкретных клинических задач, таких как определение минимальной остаточной болезни при острых лейкозах, а также для оценки иммунного статуса, поэтапно становясь рутинным [99]. Суть проточной цитофлуориметрии заключается в оптическом анализе суспензии клеток, выстраиваемых в ряд под действием обжимающей жидкости (Рисунок 7) . В отсутствие дополнительных веществ, данный метод позволяет косвенно оценивать такие параметры клетки, как

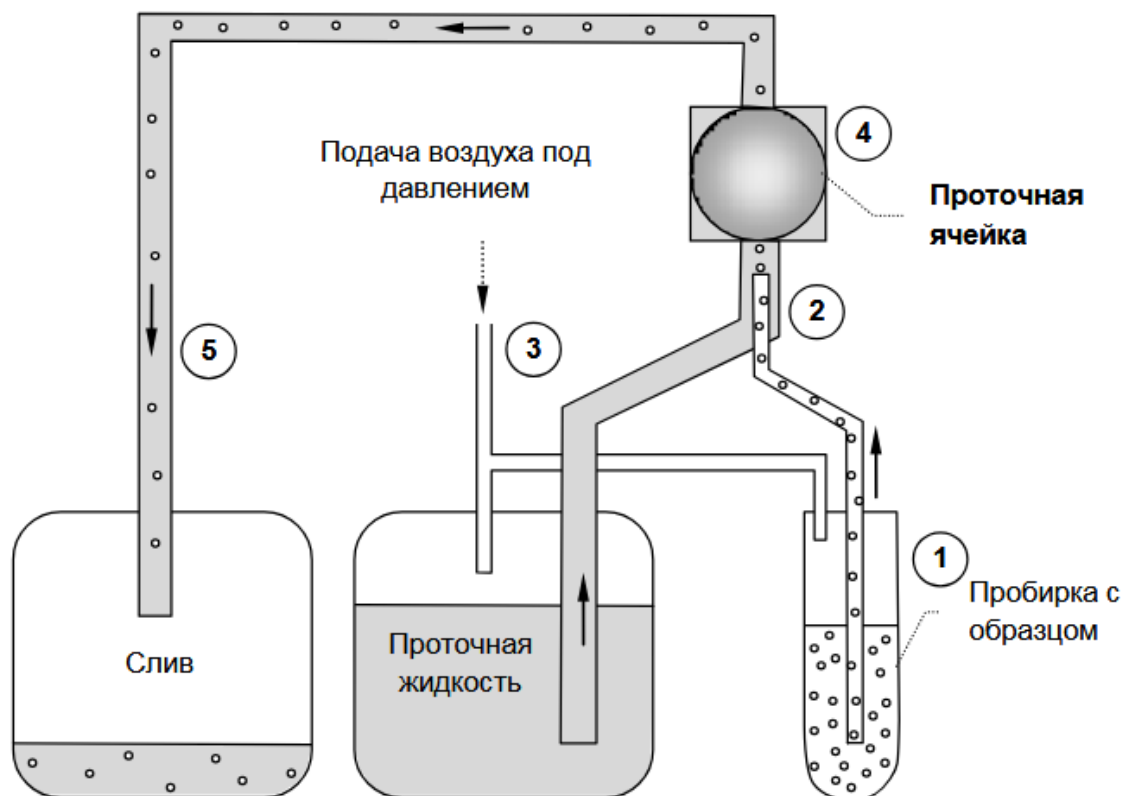


Рисунок 7 – Принципиальная схема работы проточного цитометра. Заимствовано из [105].

размер (через параметр прямого светорассеяния) и гранулярность (посредством бокового светорассеяния) (Рисунок 8) [100]. Однако добавление в арсенал молекул, способных проникать внутрь клетки, связываться с другими молекулами внутри или на поверхности клетки, арсенал применения метода существенно расширяется. Дело в том, что эти молекулы содержат флуороформный фрагмент, который при облучении светом определенной длины волны способен её поглощать и испускать флуоресцентное свечение меньшей частоты, которое улавливается детекторами прибора, поэтому их можно регистрировать. [100]. Несмотря на существенные успехи, данный метод остается достаточно операторозависимым, что может приводить к различным интерпретациям схожих данных [99]. К основным преимуществам данного метода можно отнести способность анализировать достаточно большое количество клеток за адекватное время. По последним данным применения многоцветной проточной цитофлуориметрии в области острых

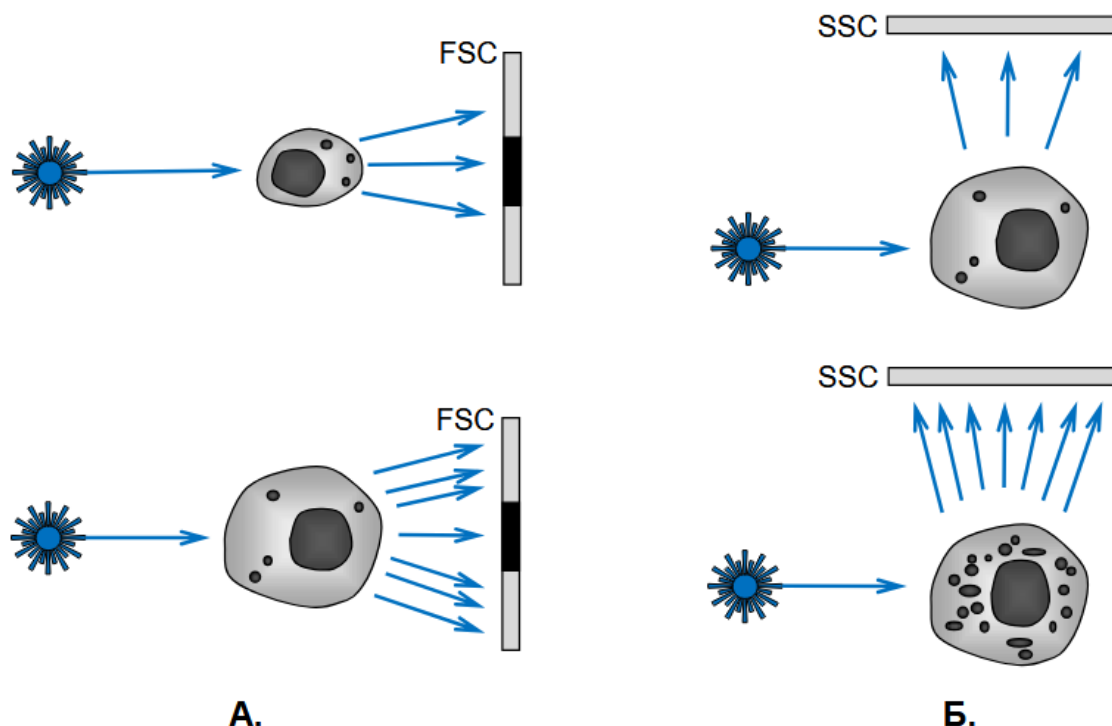


Рисунок 8 – Принципиальная схема измерения А) показателей прямого светорассеяния (FSC) и Б) бокового светорассеяния (SSC). Заимствовано из [105].

лейкозов, данный метод позволяет детектировать опухолевые клетки с крайне высокой чувствительностью: 1 опухолевая клетка на 10000-100000 клеток материала [101].

В литературе представлены различные протоколы для детекции эритроцитических и ФС-экспрессирующих эритроцитов с использованием проточной цитофлуориметрии [8, 38, 70, 102–104]. Для детекции эритроцитов используются показатели прямого и бокового светорассеяния в комбинации с окрашиванием антителами к гликофору А. Однако использование антител к эритроцитам сопряжено с возможностью появления артефактов с учётом известной возможности антител индуцировать эриптоз [81]. Точной оценки этого эффекта в литературе нет. Для детекции фосфатидилсерина большинство авторов используют аннексин V в различных рабочих концентрациях: от 10 до 100 нМ, ряд авторов в исследованиях сообщает об использовании также лактадхерина в схожем диапазоне концентраций, однако значимой разницы в их экспериментах не выявлено [8; 38].

Что касается вопросов пробоподготовки, то часть авторов упоминает хранение эритроцитов до цитометрического анализа с определением числа ФС-экспрессирующих при различных условиях от хранения при температуре +4 °С до +37°С, время до проведения цитометрического анализа также разнится до двух суток, однако в большинстве работ просто не упоминается [8; 38; 70; 102–104]. В большинстве публикаций авторы также не проводили цитофлуориметрическое исследование цельной крови, предпочитая анализировать выделенные эритроциты, что опять же потенциально сопряжено с дефектами выделения, для которого в случае эритроцитов традиционно используются простые буферы, в лучшем случае растворы Рингера, нередко без добавления глюкозы, в сравнении с многокомпонентными буферами, которые используются для работы с тромбоцитами, обеспечивая более приближенный ионный и даже белковый состав к плазме крови.

Проточная цитофлуориметрия в настоящее время также используется для определения функционального статуса тромбоцитов, что позволяет диагностировать такие заболевания, как дефицит плотных гранул, синдром Вискотта-Олдрича, тромбастения Гланцмана и многие другие патологии [105, 106]. В рамках ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» внедрены в клиническую практику такие методы, как функциональная активность тромбоцитов (ФАТ), скрининговое иммунофенотипирование тромбоцитов (СИФТ). Вне активации ФС-экспрессирующие тромбоциты не циркулируют в крови, определяемые же при подобных исследованиях клетки в основной массе рассматриваются как дефекты преаналитического этапа, которые связаны с крайней чувствительностью тромбоцитов к различным условиям (резкие изменения температуры, длительность хранения, интенсивное перемешивание) и веществам, способным вызывать их активацию [97].

ГЛАВА 2. МЕТОДЫ И МАТЕРИАЛЫ

2.1 Материалы

Реагенты:

пробирки вакуумные Improvacuter с цитратом натрия 3,2% – Guangzhou Improve Medical Instruments Co., Ltd, Китай;

Хлорид натрия (NaCl), хлорид калия (KCl), хлорид магния (MgCl₂), хлорид кальция (CaCl₂), гидроксид натрия (NaOH), цитрат натрия (Na₃C₆H₅O₇), глюкоза (C₆H₁₂O₆), тетраоксид осмия (OsO₄), HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота), дигидрофосфат натрия (NaH₂PO₄), кальциевый ионофор A23187, ФМА (форбол-12-миристан-13-ацетат), смола EPON 812, глутаровый альдегид (25%), эозин-5-малеимид (ЭМА), альфа-тромбин – Sigma-Aldrich, США;

Уранила ацетат, свинца цитрат – SPI Chemicals, США

Диметилсульфоксид (ДМСО), Amicon Ultra Centrifugal Filter, 30 кДа– Merck, Германия;

AccuCount Blank Particles, 7 мкм – Spherotec, США;

PGE₁ – MP Biochemicals, США;

NHS-активированные золотые частицы (диаметр 20 нм) – Cytodiagnosics, США;

SAGM – Imuflex-WB-RP, Бельгия;

S-2765 – Chromogenix, Италия;

Бычий сывороточный альбумин (БСА) – VWR Chemicals, США;

Кальцеин-АМ (Calcein-AM) – Thermo Fisher Scientific, США;

Динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) – Хеликон, Россия;

Фосфатный буфер – Панэко, Россия;

Соляная кислота – Химмед, Россия;

AF647, CFDA SE (сукцинимидиловый эфир (5,6)-карбоксифлуоресцеина диацетата) – Lumiprobe, Россия;

Моноклональные антитела к CD235a, конъюгированные с PE-Cy7, моноклональные антитела к CD45, конъюгированные с PE – Elabscience, Китай; Моноклональные антитела к CD61, конъюгированные с Alexa Fluor 647 – Biolegend, США;

Аннексин V рекомбинантный, C2-фрагмент лактадхерина-mNeonGreen, рекомбинантный mNeonGreen – экспрессированы и выделены из клеточной культуры *E. coli* в соответствии с опубликованной методикой [26].

Растворы:

1. Буфер Тироде (150 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 1 мМ MgCl₂, 0,4 мМ NaH₂PO₄, 20 мМ HEPES, 5 мМ глюкоза, 0,5% бычий сывороточный альбумин; pH 7,4);
2. Раствор цитрата натрия, 106 мМ, pH 5,5;
3. Раствор хлорида кальция, 100 мМ;
4. ХЕПЕС-буфер (140 мМ NaCl, 20 мМ HEPES, pH 7,4);
5. Гидрокарбонатный буфер (1,5 М NaHCO₃, pH=9.0).

2.2 Пациенты

Набор пациентов и здоровых доноров осуществлялся на базе ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России.

В исследование включены пациенты с наследственным сфероцитозом (n=20), а также с дефицитом пируваткиназы эритроцитов (n=11), диагностированными в условиях консультативного отделения в соответствии с принятыми протоколами диагностики. Для некоторых пациентов проведены молекулярно-генетические исследования, подтверждающие диагноз. Подробные характеристики пациентов изложены в Таблице 1. Также в исследование включены здоровые доноры, подписавшие добровольное информированное согласие.

Взятие крови производилось путем венепункции в вакуумные пробирки с цитратом натрия (3,2%) объемом от 3 до 10 мл. Исследования проводились в течение 6 часов от момента взятия биоматериала.

Таблица 1 – Характеристики когорты пациентов.

Показатели	Наследственный сфероцитоз (n=20)	Дефицит пируваткиназы (n=11)
Возраст*	11,6 [4,8 - 17,69]	12,1 [3,1 – 19.7]
Пол (м/ж)	10/10	2/9
Семейный анамнез (отягощен/не отягощен)	11/9	3/8
Трансфузии за жизнь (да/нет)	13/7	11/0
Трансфузии за 3 месяца (да/нет)	2/18	6/5
Гемоглобин*	109 [85 - 135]	84 [68 – 110]
Тромбозы в анамнезе(да/нет)	0/20	1(3)/10(7)
Спленэктомия (да/нет)	16/4	4/6
эффект от спленэктомии	100% полный	100% частичный

* – данные приведены как среднее, в квадратных скобках указан размах.

Для анализа эритроцитной взвеси кровь заготавливалась в соответствие со стандартным протоколом, принятым в ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России с использованием добавочного раствора SAGM. Объем отбираемых проб был не менее 3 мл.

Забор крови у пациентов и здоровых доноров производился с разрешения независимого этического комитета ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России.

2.3 Методы

2.3.1 Протоколы выделения клеток

В зависимости от эксперимента из цельной крови выделялись или эритроциты, или тромбоциты, или и то, и другое.

Для выделения эритроцитов цельная кровь центрифугировалась 100g в течение 8 минут, после чего отбиралась богатая тромбоцитами плазма (БТП). Для дальнейшего отмывания эритроцитов использовалась нижняя треть эритроцитарного осадка. Отобранная порция разводилась в 10 раз буфером Тироде, перемешивалась, после чего центрифугировалась 100g в течение 5 минут, далее супернатант аккуратно удалялся. Данная процедура повторялась трижды.

В случае необходимости дальнейшей обработки эритроцитов для стимуляции эриптоза последний этап отмывания проводился с использованием ХЕПЕС-буфера. Для дальнейшего хранения до проведения экспериментов полученные отмывые эритроциты разводились до 30-40% гематокрита, финальная концентрация глюкозы в растворе составляла 5 мМ.

Для выделения тромбоцитов к цельной крови добавлялся простагландин E1 (1 мкМ) и апираза из картофеля (0,1 МЕ/мл) для предотвращения активации тромбоцитов, далее кровь центрифугировалась 100g в течение 8 минут, после чего отбиралась БТП. Далее БТП смешивалась с раствором цитрата натрия в объемном соотношении 3 к 1, затем центрифугировалась 400g в течение 5 минут. По окончании центрифугирования супернатант быстро удалялся, а полученный клеточный осадок ресуспендировался в 250 мкл буфера Тироде. После этого тромбоциты инкубировались при комнатной температуре в течение 30 минут.

Для удаления белков плазмы использовался метод гель-фильтрации на колонке с CL-2В сефарозой. Активацию тромбоцитов проводили 10 нМ тромбина

в течение 15 минут (первые 10 минут при комнатной температуре, оставшиеся 5 при 37°C) в присутствии 2,5 мМ хлорида кальция.

2.3.2 Окрашивание эритроцитов эозин-5-малеимидом

Отмытые эритроциты, ресуспендированные в ХЕПЕС-буфере с 5 мМ глюкозы, доводились до концентрации, соответствующей 5% гематокрита. Далее они инкубировались с эозин-5-малеимидом в рабочей концентрации 1 мкМ при 37°C в течение 30 минут, после чего проба разводилась в 200 раз буфером Тироде и измерялась на проточном цитофлуориметре BD FACSCanto II (BD Biosciences, США) (для определения базовой флуоресценции после окрашивания) при средней скорости потока. Связывание ЕМА характеризовалось по данным флуоресценции в канале, соответствующем красителю FITC, после чего проводилась стимуляция эриптоза, далее пробы повторно анализировались на проточном цитофлуориметре. В конце экспериментального этапа повторно измерялись интактные пробы, чтобы исключить влияние диссоциации/«выгорания» красителя на получаемые результаты.

2.3.3 Окрашивание эритроцитов кальцеином-АМ

Отмытые эритроциты, ресуспендированные до концентрации, соответствующей 5% гематокрита, в ХЕПЕС-буфере с 5 мМ глюкозы, инкубировались с кальцеином-АМ в рабочей концентрации 1 мкМ в течение 2 часов при температуре 37°C. По окончании окрашивания проводился цитометрический контроль связывания – перед измерением проба разводилась в 200 раз буфером Тироде, измерение проводили на проточном цитофлуориметре BD FACSCanto II при средней скорости потока. Флуоресценцию кальцеина измеряли в канале, соответствующем красителю FITC. Далее проводилась стимуляция эриптоза с использованием кальциевого ионофора А23187 или ФМА, после чего проводился повторный цитофлуориметрический анализ пробы (перед измерением проба разводилась буфером Тироде в 100 раз). В конце эксперимента проводился повторный цитофлуориметрический анализ пробы, которая оставалась интактной, для исключения возможности самопроизвольной утечки кальцеина.

2.3.4 Окрашивание эритроцитов CFDA SE

Для данного эксперимента последним этапом отмывания эритроцитов было разведение ХЕПЕС-буфером с последующим центрифугированием. Также из БТП посредством центрифугирования 3000g 15 минут была получена плазма, свободная от тромбоцитов (ПСТ).

Эритроциты ресуспендировались ХЕПЕС-буфером с 5 мМ глюкозы до 5% гематокрита, далее добавлялся CFDA SE до рабочей концентрации 5 мкМ. Проба инкубировалась в течение 30 минут при 37°C, после чего смешивалась в соотношении 1 к 1 с ауто-ПСТ и инкубировалась в течение 10 минут при 37°C для связывания остатков свободного красителя. Затем эритроциты повторно осаждались центрифугированием 100g 5 минут, далее ресуспендировались в 20-кратном объеме ХЕПЕС-буфера, супернатант удалялся. Данная процедура была проведена дважды для удаления плазменных белков. Проводилось цитофлуориметрическое измерение связывания до стимуляции эриптоза, а также после стимуляции эриптоза. Уровень связывания CFDA SE характеризовался по медианной флуоресценции в канале, соответствующем красителю FITC.

2.3.5 Стимуляция эриптоза

Для индукции эриптоза предварительно отмытые эритроциты в концентрации, соответствующей 1% гематокрита, в безбелковом буфере обрабатывались 1 мкМ кальциевого ионофора A23187 в течение 5 минут или 6 мкМ ФМА (активатор протеинкиназы C) в течение 30 минут в присутствии 2,5 мМ хлорида кальция и при температуре 37°C. Затем, если не оговорено обратного, эритроциты осаждались центрифугированием 100g в течение 3 минут, далее супернатант удалялся, а клеточный осадок ресуспендировался в буфере Тироде, аналогичном исходному, с добавлением 2 мМ хлорида кальция, и, при необходимости инкубировался в течение максимально 5 часов при 37°C.

2.3.6 Цитометрический подсчет эриптогенных эритроцитов

Для экспериментов с определением количества клеток с целью определения степени полного лизиса клеток центрифугирование после отмывания не проводилось. Непосредственно после окончания стимуляции проводился

цитофлуориметрический анализ проб с добавлением шариков AccuCount в объемном соотношении 1 к 10 к конечному объему пробы для проточной цитометрии с диаметром 7 мкм для подсчета количества клеток. Далее пробы инкубировались в течение 1 часа при температуре 37°C, после чего проводился повторный анализ. Для цитометрического анализа использовались как неокрашенные пробы, так и пробы, окрашенные антителами к гликофору А (CD235a). Количество событий различных регионов нормировалось на изначальное число эритроцитов, подвергнутых стимуляции эриптоза для каждого отдельного эксперимента. Результаты представлялись в виде процента от начального числа событий.

2.3.7 Тест внутренней теназы

Отмытые эритроциты, обработанные РМА или A23187 или необработанные, или отмытые активированные тромбоциты в объеме 100 мкл в нисходящем диапазоне концентраций клеток предварительно инкубировались при температуре 37°C в течение 5 минут. Непосредственно перед добавлением смеси факторов свертывания забирались образцы для цитометрического анализа. Для проведения теста к 80 мкл суспензии клеток (в различных концентрациях) в объемном соотношении 1 к 1 добавлялась предварительно активированная смесь факторов VIII, IXa, X – финальные концентрации 10 нМ, 1 нМ и 100 нМ соответственно. Предварительная активация VIII фактора проводилась за 1 минуту до добавления к клеткам тромбином в действующей концентрации 1 нМ, после чего спустя минуту тромбин инактивировался 10 нМ РРАСК. Финальная концентрация кальция в тесте составляла 2 мМ. Нарботка фактора Xa проводилась в течение 2 минут, после чего реакция останавливалась путём добавления холодного раствора 100 мМ ЭДТА в объемном соотношении 10 к 1. Таким образом достигалась остановка реакции мембранно-зависимой активации фактора X. Далее смесь центрифугировалась 3000g в течение 2 минут для осаждения клеток, чтобы избежать их влияния на оптическую плотность раствора. После этого 100 мкл супернатанта из каждого образца добавляли в 96-луночные плоские полистироловые планшеты. В каждую лунку добавляли 100 мкл субстрата 0,6 мМ S-2765 и скорость гидролиза

контролировали при 405 нм с помощью планшетного спектрофлуориметра Eppendorf AF 2200 (Eppendorf, США). Для анализа количества наработанного в ходе реакции фактора Ха использовалась начальная скорость расщепления субстрата, определяемая по прямому участку кривой. Количество фактора Ха определяли с помощью калибровочной кривой.

2.3.8 Конъюгация аннексина V с флуоресцентной меткой

Для конъюгации рекомбинантного аннексина V с флуоресцентной меткой сначала аннексин V из амидозолового буфера переводился в буфер, не содержащий свободных аминогрупп – фосфатный буфер. Для этого использовались центрифужные концентраторы Amicon, сначала брался образец, содержащий около 0,5 мг белка, после чего его объем доводился до максимального объема колонки (4 мл) (соотношение разведения записывалось), затем образец центрифугировался 7500g в течение 15 минут, проскок утилизировался. Белок вновь ресуспендировался в максимально возможном объеме фосфатного буфера и вновь центрифугировался. Данная процедура повторялась до достижения как минимум 1000-кратного разведения.

Полученный рекомбинантный аннексин V, ресуспендированный в фосфатном буфере, для проведения реакции конъюгации смешивался с гидрокарбонатным буфером в объемном соотношении 10 к 1, после чего сразу к нему добавлялась флуоресцентная метка AF647, разведенная ДМСО до концентрации 2 мМ, в мольном соотношении на 1 моль белка 5 моль краски, и смесь хорошо перемешивалась. После этого реакция конъюгации проводилась в течение 18-24 часов при комнатной температуре при постоянном перемешивании.

По окончании времени инкубации непрореагировавший краситель удалялся при помощи отмывания на центрифужном концентраторе Amicon по ранее упомянутой схеме до достижения 1000-кратного разведения.

Проводился анализ полученной смеси с использованием кюветного спектрофотометра Eppendorf. Определялись пики поглощения на длинах волн, соответствующих белку (280 нм) и красителю AF647 (647 нм), рассчитывалась концентрация аннексина V и AF647 исходя из закона Бугерта-Ламберта-Бера:

$$A(\lambda) = \varepsilon(\lambda) \cdot C \cdot l. \quad (1)$$

$A(\lambda)$ – измеренная оптическая плотность раствора на соответствующей длине волны λ , $\varepsilon(\lambda)$ – молярный коэффициент экстинкции для вещества на соответствующей длине волны, C – молярная концентрация вещества, l – длина кюветы спектрофотометра.

2.3.9 Конъюгация аннексина V с золотыми частицами

Для конъюгации рекомбинантного аннексина V с золотыми частицами использовали готовый набор для мечения с NHS-активированными золотыми частицами с диаметром 20 нм. Для этого аннексин V, переведенный с помощью центрифужного фильтра Amicon с размером пор 30 кДа в фосфатный буфер, разводили до концентрации 0,5 мг/мл, используя приложенный фирменный буфер для белка. Далее к 24 мкл получившегося белкового раствора добавляли 84 мкл фирменного реакционного буфера, после чего незамедлительно 80 мкл полученной смеси (для снижения рисков гидролиза белка) добавляли к сухим золотым частицам и тщательно ресуспендировали. Инкубировали золотые частицы с белком в течение 2 часов при комнатной температуре, после чего добавляли 10 мкл фирменного гасителя реакции и инкубировали ещё 10 минут.

Полученный конъюгат отмывали согласно рекомендациям производителя. Для этого его центрифугировали 10000g в течение 30 минут, после чего надосадочную жидкость аккуратно удаляли. Конъюгат вновь ресуспендировали в 100 мкл фирменного буфера для хранения, после чего процедуру повторили. Полученный концентрат хранили при +4°C, максимальный срок хранения составлял один месяц.

2.3.10 Цитометрический анализ прокоагулянтных эритроцитов

Цельная кровь, отмытые эритроциты, отмытые эритроциты после индукции эриптоза для анализа разводились буфером Тироде до концентрации, соответствующей 0,03-0,06% гематокрита (в случае цельной крови в 1000 раз). После этого разбавленную кровь инкубировали с маркерами фосфатидилсерина в течение 15 минут в присутствии 2 mM хлорида кальция (CaCl_2). В качестве

маркеров использовали рекомбинантный аннексин V собственного производства, конъюгированный с AF647, а также рекомбинантный C2-фрагмент лактадхерина с флуоресцентной меткой mNeonGreen собственного производства [26]. Финальные концентрации маркеров фосфатидилсерина были 100 нМ. Для наиболее точного детектирования эритроцитов образцы дополнительно окрашивали антителами к гликофору А в течение 5 минут (добавляли через 10 минут от начала инкубации с маркерами фосфатидилсерина) в объемном соотношении 1:50. Для определения возможного влияния антител так же использовали контрольную пробу без окрашивания антителами.

Для аннексина V в качестве контроля была выбрана проба с добавлением аннексина V-AF 647 в присутствии ЭДТА, хелатора ионов кальция, который блокирует связывание аннексина с фосфатидилсерином. По данной пробе была проведена граница региона, обозначающего аннексин-положительные события. Для лактадхерина в качестве контроля была выбрана проба с добавлением рекомбинантного mNeonGreen в концентрации 100 нМ. В качестве положительного контроля для связывания маркеров фосфатидилсерина, использовались отмытые эритроциты, обработанные индуктором эритроза ФМА [107].

Разработанный протокол методики детекции субпопуляций прокоагулянтных эритроцитов для цельной крови, который использовался для анализа пациентов с наследственными гемолитическими анемиями, группы здоровых доноров и образцов эритроцитной взвеси представлен в Таблице 2 [108].

Таблица 2 – Протокол методики цитофлуориметрической детекции прокоагулянтных эритроцитов в цельной крови. Воспроизведено из [108].

Шаг 1. Разведение цельной крови				
Буфер Тироде	1000 мкл			
Цельная кровь	1 мкл			
	Проба 1	Проба 2	Проба 3	Проба 4

Продолжение Таблицы 2

Шаг 2. Пробоподготовка				
Разведенная кровь	150 мкл	150 мкл	150 мкл	150 мкл
Хлорид кальция (CaCl ₂), 100 мМ	3 мкл	3 мкл	3 мкл	-
ЭДТА, 100 мМ	-	-	-	3 мкл
Шаг 3. Окрашивание маркерами фосфатидилсерина				
Аннексин V-AF647, 5 мкМ	3 мкл	3 мкл	-	3 мкл
Лактадхерин-mNeonGreen, 10 мкл	1,5 мкл	1,5 мкл	-	-
mNeonGreen, 10 мкМ	-	-	1,5 мкл	-
Инкубация	10 мин	10 мин	10 мин	10 мин
Шаг 4. Окрашивание антителами				
Антитела к CD235a	-	3 мкл	-	-
Инкубация	5 мин	5 мин	5 мин	5 мин
Шаг 5. Измерение на проточном цитофлуориметре				

2.3.11 Конфокальная микроскопия эриптоических эритроцитов

Отмытые эритроциты после стимуляции эриптоза с использованием кальциевого ионофора A23187 ресуспендировались в концентрации, соответствующей 0,05% гематокрита, в буфере Тироде, после чего инкубировались с С2-фрагментом лактадхерина-mNeonGreen (100 нМ) и аннексином V, конъюгированным с AF647, (100 нМ) в течение 15 минут в присутствии 2 мМ хлорида кальция (CaCl₂). Затем окрашенную клеточную взвесь наносили в просвет канала проточной камеры, сверху накрывали покровным стеклом и герметизировали. Эритроциты наблюдали после самопроизвольного оседания на стекло на инвертированном микроскопе Nikon Eclipse TI-E (Nikon Corporation, Япония) масляным объективом PLAN APO λ D с оптическим усилением 100x и конфокальной приставкой Nikon AX (Nikon Corporation, Япония). Настройки лазеров и детекторов использовались соответствующие флуоресцентным

молекулам AF647 и mNeonGreen из внутренней базы фирменного программного обеспечения NIS-Elements (Nikon Corporation, Япония). Для возбуждения флуоресценции mNeonGreen использовался лазер с длиной волны 488 нм, флуоресценция измерялась детектором в области 500–550 нм. Для возбуждения флуоресценции AF647 использовался лазер с длиной волны 640 нм, детектировалась возбужденная флуоресценция в области 626–737 нм.

Обработка и анализ микроскопических изображений проводился с использованием свободного программного обеспечения Fiji [109].

2.3.12 Электронная микроскопия эритроцитов

Эритроциты отмывались в соответствии с вышеописанным протоколом, после чего фиксировался контрольный образец. При пробоподготовке для электронной микроскопии в качестве основного буфера для ресуспендирования клеток использовался ХЕПЕС-буфер. Далее проводилась стимуляция эритроцитов с использованием кальциевого ионофора A23187 в стандартном режиме, далее эритроциты инкубировались в течение 10-60 минут для получения нужной пропорции субпопуляций ФС-экспрессирующих эритроцитов, после чего часть эритроцитов окрашивались в течение 15 минут золотыми частицами, предварительно конъюгированными с аннексином V. Параллельно с окрашиванием золотыми частицами для отобранных и разведенных буфером Тироде проб проводилось стандартное цитофлуориметрическое окрашивание С2-лактадхерином с флуоресцентной меткой mNeonGreen (100 нМ) и аннексином V-AF647 (100 нМ) в присутствии 2 мМ хлорида кальция. Незамедлительно после проведения измерения пробы на проточном цитофлуориметре FACSCanto II образцы первично фиксировались добавлением 5% глутарового альдегида, разведенного ХЕПЕС-буфером из концентрированного (25%) стока в объемном соотношении образец к глутаровому альдегиду 1:1.

Образцы, меченные золотыми частицами, непосредственно перед проведением первичной фиксации центрифугировались 100g в течение 3 минут, затем надосадочная жидкость удалялась и сразу заменялась на 2,5% раствор глутарового альдегида, смесь тщательно ресуспендировалась. Через 30 минут от

момента первичной фиксации для лучшего удаления золотых частиц, которые оказались не связанными с клетками, из раствора образцы повторно центрифугировались 100g в течение 3 минут и вновь ресуспендировались в 2,5% растворе глутарового альдегида. Далее образцы хранились до следующих этапов в таком виде не более 2 недель.

Дальнейшие этапы пробоподготовки проводились в соответствии с ранее описанной методикой [110]. Клетки отмывались от глутарового альдегида, после чего фиксировались 1% раствором оксида осмия (OsO_4) в течение 60 минут. Следующим этапом был этап обезвоживания в растворах с возрастающей концентрацией ацетона (30%, 50%, 70%, 90% и 100%). Образцы последовательно помещались в соответствующие растворы на 15 минут, этап с 100% ацетоном был повторен трижды. Далее образцы фиксировались в ацетоновых растворах смолы Epon 812, полученных в результате смешения ацетона и смолы в объемных соотношениях 1:2 и, затем, 2:1), в течение получаса. Следующим этапом образец пропитывался чистой смолой при температуре 37°C в течение 12 часов. Далее для полимеризации смолы образцы выдерживались в течение 36 часов при температуре 60°C.

Фиксированные в смоле образцы нарезались на ультрамикротоме Leica EM UC7 (Leica, Германия) на срезы толщиной 100 нм. Для анализа срезы располагали на медных сетках с покрытием из формвара.

Образцы контрастировали 2% раствором уранила ацетата в течение 30 минут и раствором цитрата свинца в течение 5 минут. Готовые контрастированные препараты анализировались на просвечивающем электронном микроскопе JEM-1400 (JEOL, Япония).

Обработка и анализ полученных микроскопических изображения осуществлялась с использованием свободного программного обеспечения Fiji [109].

2.3.13 Статистическая обработка

Результаты анализировались с использованием программного обеспечения OriginPro 2018 (Origin Software, США). Полученные от здоровых доноров,

пациентов с наследственным сфероцитозом и дефицитом пируваткиназы эритроцитов числовые значения процента фосфатидилсерин-экспрессирующих эритроцитов собирались в базу, анализировались, определялись выпадающие точки, выходящие за диапазон от $Q1 - 1,5 \cdot IQR$ до $Q3 + 1,5 \cdot IQR$, где $Q1$ и $Q3$ – значения первого и третьего квартилей соответственно, а IQR – межквартильный размах, определяемый как разность значений третьего и первого квартилей. Выпадающие точки исключались из дальнейшего анализа. Множественные сравнения между группами проводились с использованием методики однонаправленного дисперсионного анализа (ANOVA) с дальнейшим пост-хок t-тестом Холма-Бонферрони.

Для парных сравнений независимых выборок использовался стандартный t-критерий Стьюдента для независимых выборок.

Уровень статистической значимости принимался равным 0,05.

При проведении ROC-анализа (Receiver Operator Characteristic) для показателей аннексин-связывающих и лактадхерин-связывающих эритроцитов значения точек отсечения (cut-off) определялись по максимальным значениям чувствительности и специфичности.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 Детекция ФС-экспрессирующих эритроцитов в цельной крови и после выделения

С использованием проточной цитометрии было проведено сравнение двух маркеров ФС – традиционного аннексина V и высокочувствительного С2-фрагмента лактадхерина, для эритроцитов из цельной крови и отмытых эритроцитов. Для аннексина V использовали окрашивание в присутствии 2мМ ЭДТА в качестве отрицательного контроля. Репрезентативные результаты цитометрии представлены на Рисунке 9.

Для оценки влияния процедуры выделения эритроцитов проводилось сравнение процентов ФС-экспрессирующих эритроцитов с использованием аннексина и лактадхерина до выделения (в цельной крови) и после выделения (в суспензии отмытых эритроцитов). Результаты сравнения представлены в Таблице 3.

Таблица 3 – Процент ФС-экспрессирующих эритроцитов на основании результатов окрашивания лактадхерином и аннексином V. Результаты получены на основании анализа результатов 3 здоровых доноров. Результаты представлены как средние \pm стандартная ошибка среднего

Образец	Связывание аннексина V в присутствии CaCl ₂ , %	Связывание аннексина V в присутствии ЭДТА, %	Связывание лактадхерина в присутствии CaCl ₂ , %
Цельная кровь	0.104 \pm 0.008	0.074 \pm 0.020 <i>p=0,135</i>	0,147 \pm 0.013
Отмытые эритроциты	0.203 \pm 0.042	0.159 \pm 0.056 <i>p=0,44</i>	0.427 \pm 0.029

Как видно, статистически достоверного связывания аннексина не было зафиксировано, в то же время количество лактадхерин-связывающих клеток значительно увеличивалось, однако интерпретация этих данных была затруднена крайне низким числом событий.

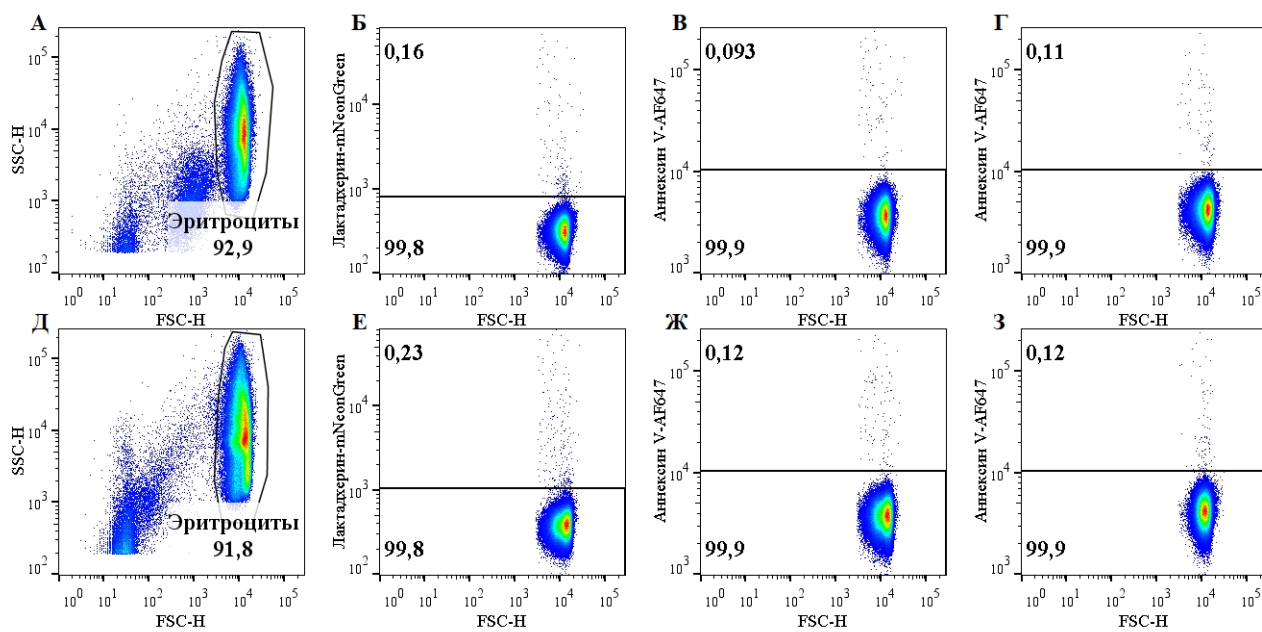


Рисунок 9 – Результаты проточной цитофлуориметрии цельной крови и отмытых буфером Тиродэ эритроцитов с детекцией ФС-экспрессирующих эритроцитов. На панелях А–Г представлены результаты цитофлуориметрического анализа цельной крови, на панелях Д–З - отмытых эритроцитов. Регион эритроцитов выделялся на основании данных прямого и бокового светорассеяния, как представлено на панелях А и Д. На панелях Б и Е представлены плотности для проб с окрашиванием лактадхерином со стратегией выставления гейта для ФС-экспрессирующих клеток. На панелях В и Ж представлены аналогичные плотности для проб с окрашиванием аннексином V в присутствии 2 мМ хлорида кальция и контрольные образцы в присутствии 2 мМ ЭДТА (панели Г и З).

3.2 Детекция ФС-экспрессирующих эритроцитов при стимуляции эриптоза

Для изучения субпопуляций ФС-экспрессирующих эритроцитов проводилась стимуляция эриптоза. При обработке кальциевым ионофором A23187 отмечалось существенное повышение связывания лактадхерина в сравнении со связыванием аннексина V, в то время как при обработке активатором протеинкиназы С ФМА оба маркера давали сравнимые проценты фосфатидилсерин-экспрессирующих клеток (Рисунок 10).

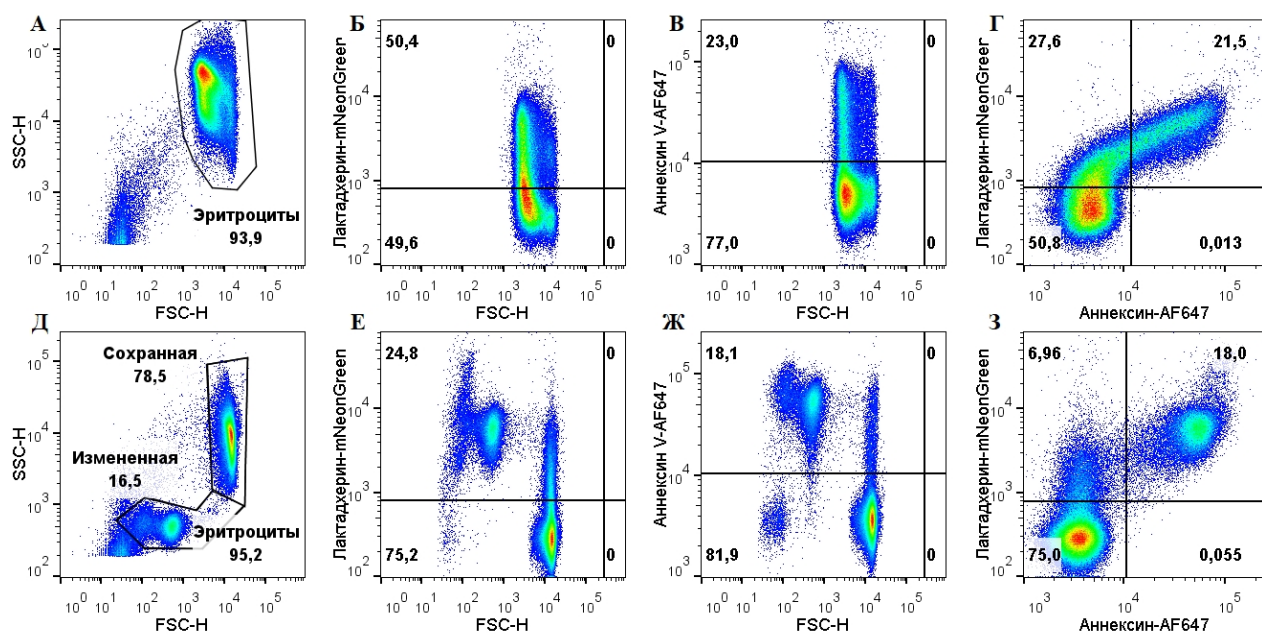


Рисунок 10 – Две субпопуляции фосфатидилсерин-экспрессирующих эритроцитов при стимуляции эриптоза. Представлены репрезентативные плоты результатов цитофлуориметрического анализа эритроцитов после стимуляции эриптоза A23187 (панели А – Г) и ФМА (панели Д – З). Представлены результаты окрашивания 100 нМ лактадхерина (Б, Е), 100 нМ аннексина V (В, Ж). На панелях Г и З представлены результаты совместного окрашивания лактадхерином и аннексином V, на данных панелях видно практически полное отсутствие событий, которые бы связывали аннексин, но не связывали лактадхерин. При стимуляции эриптоза ФМА отмечено появление новой субпопуляции событий по данным прямого и бокового светорассеяния – события разделены на регионы сохранной и измененной формы.

В ходе двойного окрашивания на фосфатидилсерин (лактадхерин + аннексин V) было обнаружено, что не существует субпопуляции эритроцитов, связывающих аннексин V, но не связывающих лактадхерин (Рисунок 10Г, 10З). Это укладывается в представление о лактадхерине в качестве более чувствительного маркера фосфатидилсерина. Отмечался выраженный разброс ответа на стимуляцию эритроцитов между разными донорами, однако сохранялось преобладание процента лактадхерин-связывающих эритроцитов над процентом аннексин-связывающих эритроцитов.

Таким образом, продемонстрировано наличие двух субпопуляций ФС-экспрессирующих эритроцитов: тех, которые связывают только лактадхерин (Лдх+Анн-), и тех, которые связывают оба маркера фосфатидилсерина (Лдх+Анн+).

Одновременно преимущественно для стимуляции ФМА (для стимуляции A23187 она появлялась при дополнительной инкубации или для некоторых доноров) отмечено появление региона событий, которые характеризуются измененными показателями прямого и бокового светорассеяния и повышенной экспрессией фосфатидилсерина (Рисунок 11).

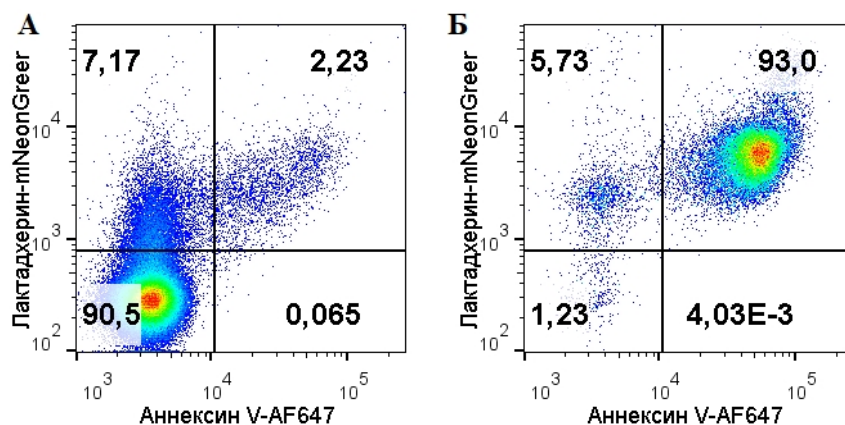


Рисунок 11 – Субпопуляции фосфатидилсерин-экспрессирующих эритроцитов при стимуляции эритроцитов ФМА. На панели А представлены результаты совместного окрашивания аннексином V (100 нМ) и лактадхерин (100 нМ) субпопуляции с сохраненными параметрами прямого и бокового светорассеяния, на панели Б представлены результаты для субпопуляции измененной формы по данным светорассеяния.

3.3 Изменение формы эритроцита при обработки ионофором A23187

В ходе цитофлуориметрического анализа эритроцитов после стимуляции эриптоза было обнаружено появление новой субпопуляции с измененными параметрами светорассеяния. Для определения степени полного лизиса, а также проверки гипотезы, что данный регион состоит из эритроцитарных везикул, были проведены эксперименты с характеристикой числа событий до и после стимуляции эриптоза, а также спустя 1 час инкубации при температуре 37°C после стимуляции. Стратегии гейтирования для A23187 при обработке результатов проточной цитофлуориметрии представлены на Рисунке 12.

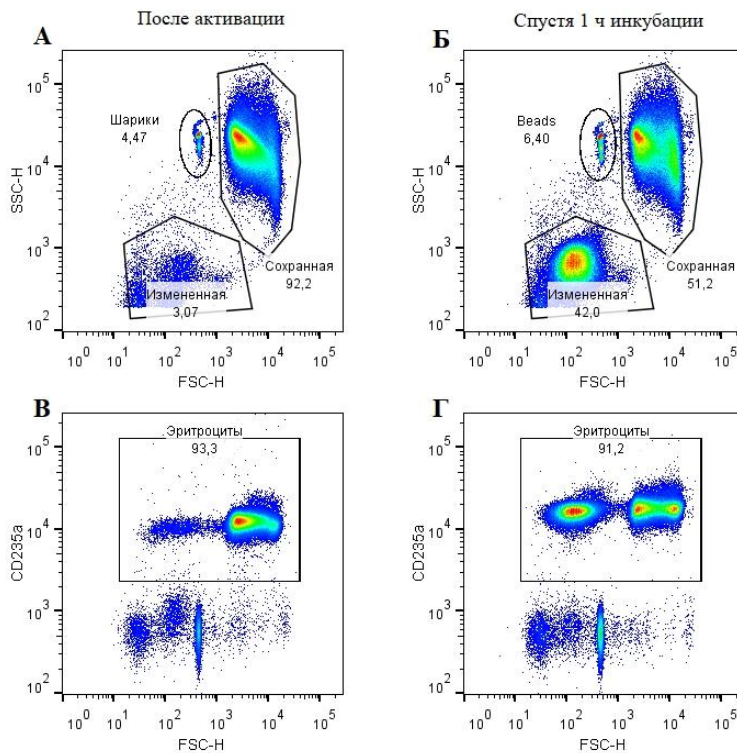


Рисунок 12 – Накопление эритроцитов измененной формы при инкубации после индукции эриптоза кальциевым ионофором A23187. На панелях А, В представлены результаты цитометрического анализа сразу после активации, а на плотах Б, Г через 1 час инкубации от конца активации. Заметно накопление событий с измененными параметрами FSC/SSC, однако сохраняющими экспрессию гликофорина А по данным окраски антителами (панели В, Г). Сводные результаты приведены в Таблице 4.

Перед анализом проверялась синглетность посредством FSC-H/FSC-A дотплота. Ни в одном эксперименте не отмечалось заметного числа агрегатов. Результаты цитофлуориметрического анализа представлены в Таблице 4. Заметно, что при индукции эриптоза отмечается некоторое снижение общего числа событий регионов сохранной и измененной формы, которое значительно не изменяется в дальнейшем, оно, вероятно, связано с необратимым лизисом части клеток в результате стимуляции. При этом определяется выраженное накопление событий с изменёнными параметрами прямого и бокового светорассеяния, что вместе с отсутствием нарастания общего числа событий, говорит в пользу теории о том, что этот регион в основном представлен эритроцитами, которые изменили форму. В Таблице 4 также представлено сравнение двух подходов гейтирования для дополнительного контроля над влиянием добавления антител, а также для характеристики их связывания с регионами разной формы; значимой разницы отмечено не было.

Таблица 4 – Субпопуляции эритроцитов по форме после стимуляции эриптоза кальциевым ионофором A23187.

Эксперимент	После стимуляции эриптоза*				Спустя 1 ч инкубации*			
	Сохран-ные FSC/SSC	Изменен-ные FSC/SSC	Всего	Эритро-циты CD235a+	Сохран-ные FSC/SSC	Изменен-ные FSC/SSC	Всего	Эритро-циты CD235a+
Донор 1	82,49	1,19	83,68	79,03	38,82	25,04	63,87	54,27
Донор 2	73,78	1,66	75,44	65,32	12,68	54,01	66,68	58,49
Донор 3	60,33	1,95	62,28	61,95	22,20	24,94	47,14	49,89

* – результаты представлены как процент к изначальному количеству эритроцитов до стимуляции эриптоза.

3.4 Изменение формы эритроцита при стимуляции эриптоза ФМА

Аналогично для стимуляции ФМА проведены эксперименты с подсчетом количества событий региона сохранной и измененной формы (Рисунок 13). Однако

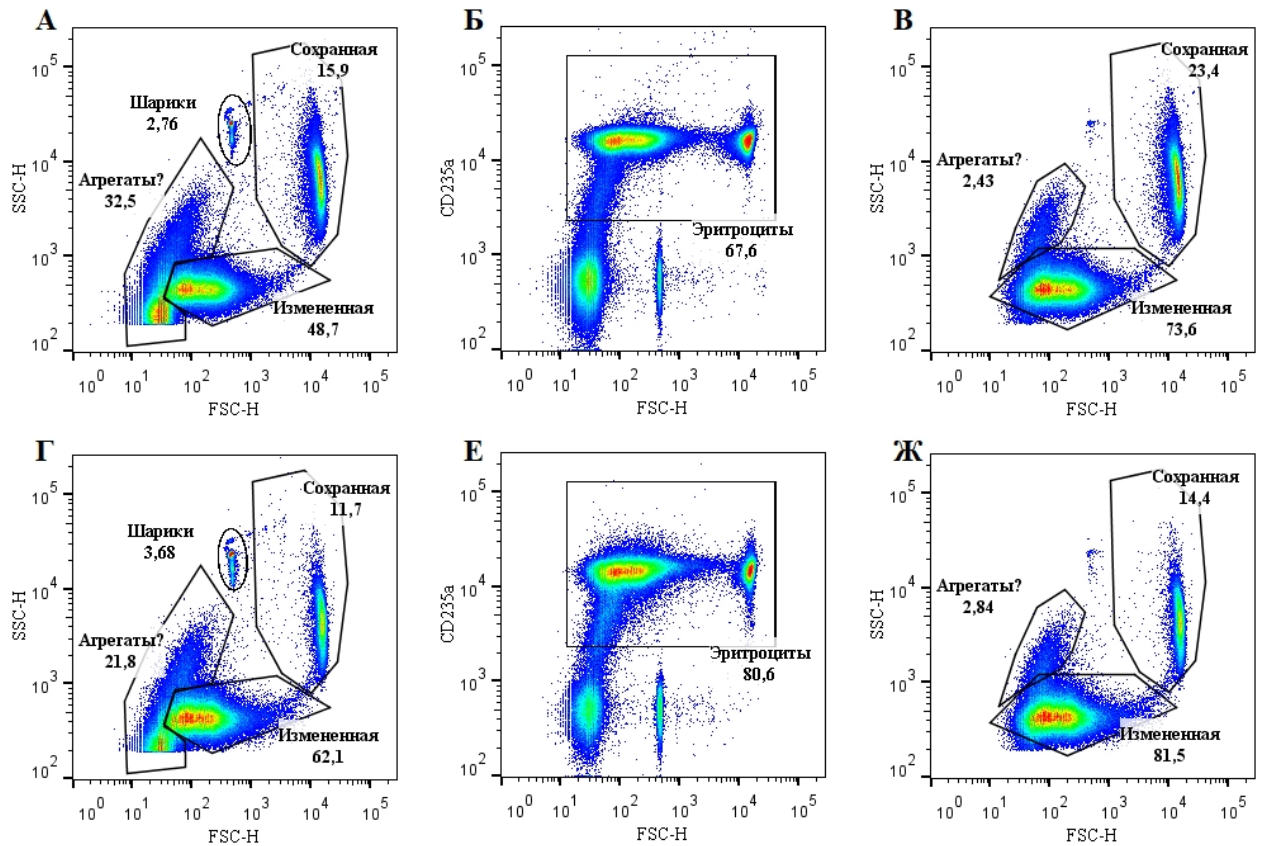


Рисунок 13 – Морфология эритроцитов после индукции эриптоза ФМА. На панелях А – В представлены результаты цитометрического анализа сразу после активации, а на плотках Г – Ж через 1 час инкубации от конца активации, панели В и Ж представляют собой аналоги панелей А и Г после применения гейта, представленного на панелях Б и Е соответственно. Отмечено появление нового региона событий (агрегатов?), который, однако, плохо окрашивался антителами к гликофору А и исчезал при стандартной отмывке центрифугированием. Накопление событий региона с измененными параметрами FSC/SSC, практически не отмечалось, что, вероятно, объясняется изначально высоким процентом событий данного региона. Сводные результаты приведены в Таблице 5.

для стимуляции ФМА без последующего отмывания центрифугированием было отмечено появление нового региона событий, который не окрашивался анти-CD235a антителами. Предположительно данный регион представляет собой агрегаты белка в исходе полного лизиса клетки или эритроцитарные везикулы, с учетом окрашивания малого процента событий, однако данная гипотеза не

проверялась. Значимого накопления событий региона измененной формы не было отмечено, что, вероятно, связано с другим характером внутриклеточных изменений. Подробные сводные результаты исследования крови трёх доноров приведены в Таблице 5, результаты демонстрируют высокую вариабельность ответа в зависимости от донора.

Таблица 5 – Субпопуляции эритроцитов по форме после стимуляции эриптоза ФМА.

Донор	После стимуляции эриптоза				Спустя 1 ч инкубации			
	Сохраненные FSC/SSC	Измененные FSC/SSC	Всего	CD235a+	Сохраненные FSC/SSC	Измененные FSC/SSC	Всего	CD235a+
1	38,84	19,69	58,53	55,88	31,74	21,39	53,13	44,11
2	48,22	17,11	65,33	60,21	29,30	24,27	53,57	53,72
3	23,73	14,52	38,25	35,22	23,78	14,66	38,44	38,41

* – результаты представлены как процент к начальному количеству эритроцитов до стимуляции эриптоза.

В качестве дополнительного контроля была проведена микроскопия эритроцитов, обработанных ФМА (Рисунок 14).

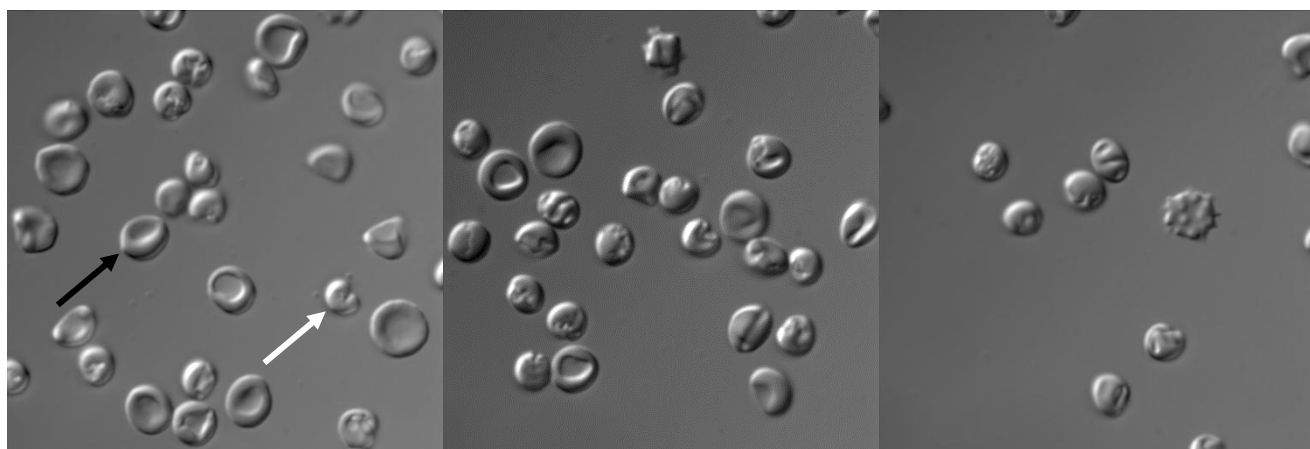


Рисунок 14 – Результаты микроскопии эритроцитов, обработанных ФМА. Черной стрелкой отмечен эритроцит с нормальной морфологией, белой – с измененной морфологией. Микрофотография Сергея Ивановича Обыденного.

Она продемонстрировала наличие двух субпопуляций эритроцитов с различной морфологией, что может соответствовать двум субпопуляциям, наблюдаемым при цитофлуориметрическом анализе.

3.5 Связывание ЭМА эритроцитами

Для определения влияния на мембрану, которая жестко связана с цитоскелетом, процессов эриптоза, а также для оценки возможной потери мембраны вследствие процессов везикуляции эритроциты окрашивались ЭМА, после чего проводилась стимуляция эриптоза с дальнейшей инкубацией в течение часа после неё. Результаты цитофлуориметрии представлены на Рисунке 15. Как видно, в данных экспериментах отмечались события с измененными показателями прямого и бокового светорассеяния как при стимуляции эриптоза A23187, так и при

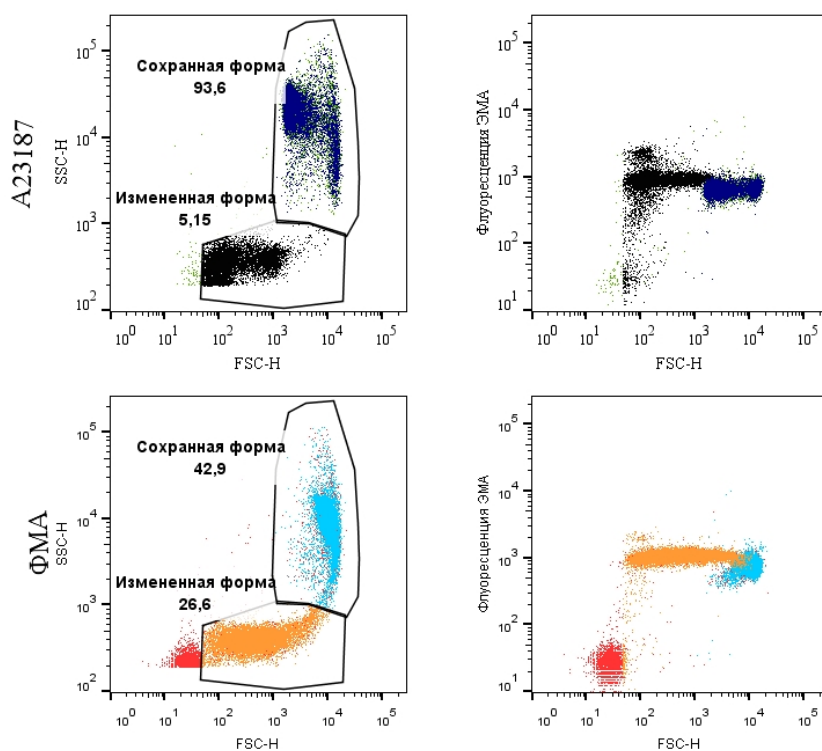


Рисунок 15 – Репрезентативные дот-плоты окрашивания ЭМА эритроцитов после индукции клеточной смерти. Сверху представлены стратегия гейтирования субпопуляций и дот-плоты FSC/ЭМА для эритроцитов, обработанных A23187, снизу – для ФМА.

стимуляции эриптоза ФМА. На дот-плотах снижения флуоресценции в канале, соответствующем ЭМА, не отмечалось. Окрашивание было проведено для трех разных здоровых доноров, средние результаты флуоресценции представлены в виде гистограммах для региона сохранной формы (Рисунок 16).

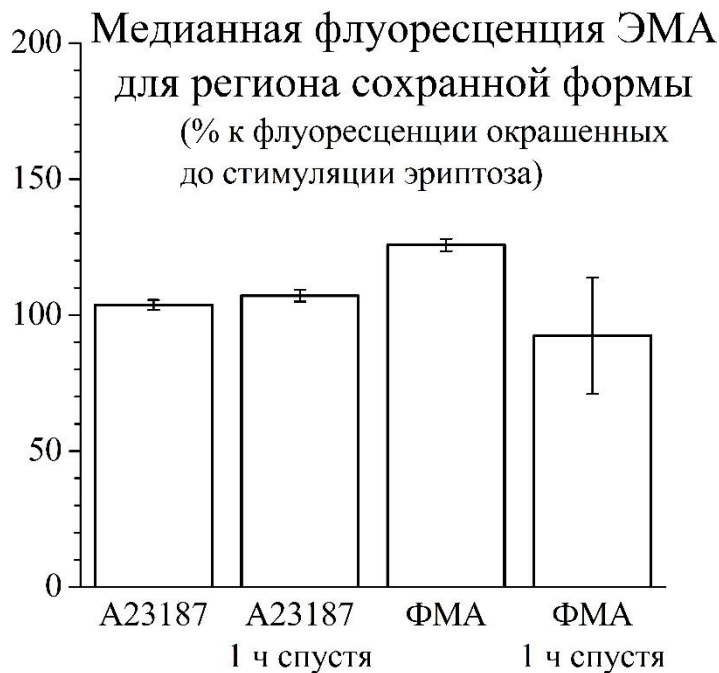


Рисунок 16 – Медианная флуоресценция ЭМА для региона эритроцитов с сохранной формой. Флуоресценция нормирована на флуоресценцию до стимуляции эриптоза для каждого донора. Результаты представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего, $n=3$.

Отличий в флуоресценции в сравнении с флуоресценцией эритроцитов до стимуляции эриптоза в случае обработки кальциевым ионофором A23187 не отмечалось, в то же время минимальные отличия наблюдались для ФМА, как непосредственно после окончания стимуляции эриптоза, так и после окончания дополнительного часа инкубации, однако их значимость не определена. Для региона измененной формы отмечалось некоторое увеличение флуоресценции в канале, соответствующем ЭМА, это заметно на дот-плотах (Рисунок 15) и было подтверждено при дальнейшей обработке результатов для трех здоровых доноров. Полученные результаты демонстрировали обратную корреляцию с результатами

средних показателей FSC-A (данные не приведены), что, вероятно, связано со сжиганием мембраны, которое приводит к увеличению и пиковой флуоресценции. Результаты средней флуоресценции в виде гистограмм для региона измененной формы представлены на Рисунке 17.

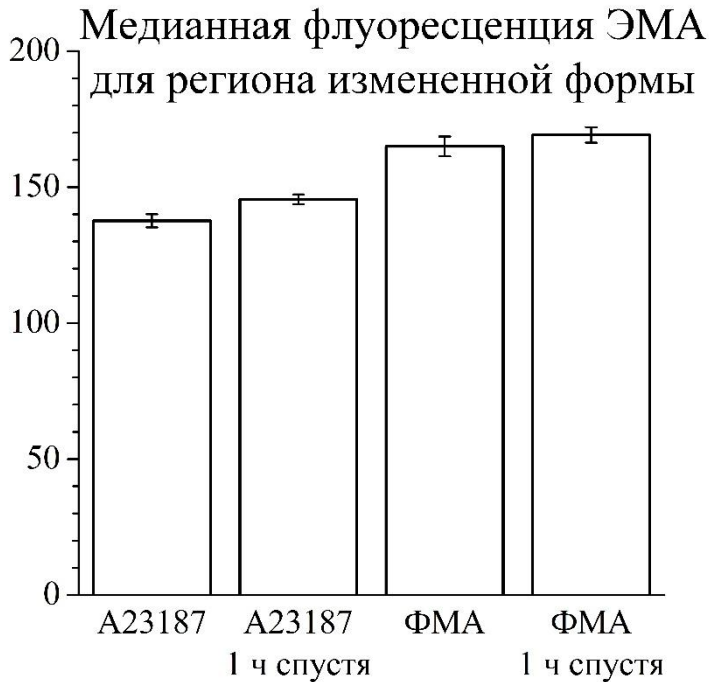


Рисунок 17 – Медианная флуоресценция ЭМА для региона эритроцитов с измененной формой. Флуоресценция нормирована на флуоресценцию до стимуляции эритрозоа для каждого донора. Результаты представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего, $n=3$. Шкала представлена аналогичной как для региона сохранной формы.

Таким образом, по результатам цитофлуориметрического анализа эритроцитов выявлено отсутствие флуоресценции показателей, связанных с мембраной – гликофорина А (Рисунки 12, 13) и белка полосы 3. Данные результаты свидетельствуют об отсутствии значимых потерь мембраны, а значит, об отсутствии влияния на активность в поддержании протекания мембранно-зависимых процессов вследствие разной площади, что могло бы повлиять на дальнейшие результаты.

3.6 Визуализация субпопуляций ФС-экспрессирующих эритроцитов

Для визуализации субпопуляций ФС-экспрессирующих эритроцитов использовали конфокальную микроскопию с окрашиванием С2-лактадхерином с флуоресцентной меткой mNeonGreen и аннексином V-AF647. Необходимость использования конфокальной микроскопии обусловлена достаточно высокой фоновой флуоресценцией, а также относительно низким связыванием лактадхерина для субпопуляции, не связывающей аннексин, что было отмечено ранее при анализе результатов проточной цитофлуориметрии. С использованием данного метода удалось визуализировать обе субпопуляции ФС-экспрессирующих эритроцитов, таким образом доказав их существование (Рисунок 18). Микроскопическая визуализация проводилась для эритроцитов, обработанных А23187.

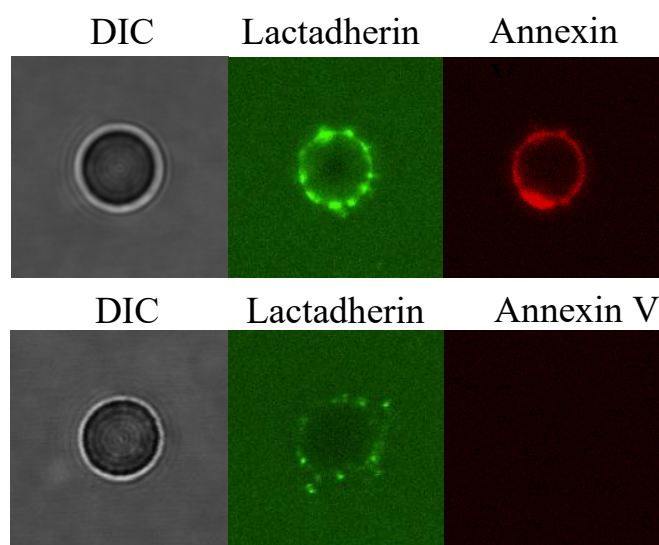


Рисунок 18 – Конфокальная микроскопия эритроцитов после стимуляции эриптоза. Сверху представлены результаты визуализации эритроцита, который связывает и лактадхерин (представлен зеленым псевдоцветом), и аннексин V (представлен красным псевдоцветом). Снизу представлены результаты визуализации эритроцита, связывающего только лактадхерин. Микроскоп - Nikon Eclipse TI-E, масляный объектив PLAN APO λ D,100x; конфокальная приставка Nikon AX.

Что интересно, для лактадхерина характерно наличие участков наиболее интенсивного связывания в виде точек, в то время как аннексин V характеризуется более равномерным связыванием.

3.7 Субпопуляции эритроцитов в динамике

Для определения возможности перехода эритроцитов из одного состояния экспрессии фосфатидилсерина в другое были проведены эксперименты со стимуляцией эритроцитов с использованием A23187 и дальнейшим инкубированием при температуре 37°C. Для ФМА таких экспериментов не проводилось, так как ранее при экспериментах с подсчетом субпопуляций различной формы было отмечено, что значимых изменений практически не происходит, за исключением нарастания полного лизиса клеток с образованием «мусорных» событий, затрудняющих анализ. Репрезентативные результаты проточной цитофлуориметрии представлены на Рисунке 19.

Согласно результатам проточной цитофлуориметрии, с течением времени происходит накопление всех субпопуляций, но если связывание лактадхерина быстро достигает максимальных значений, что говорит о высокой скорости этого процесса, то процент клеток, связывающих аннексин, накапливается в течение более длительного времени, достигая половины от теоретически возможного максимального значения, за которое можно принять процент лактадхерин-связывающих клеток спустя примерно 1 час, что говорит об относительной стабильности такого вида экспрессии ФС в низких концентрациях, который детектируется лактадхерином, но не детектируется аннексином V. Как представлено на Рисунке 19 (В, Г), событий в регионе Анн+Лдх- фактически не обнаруживается ни в один момент времени, что хорошо согласуется с ранее полученными результатами. Также на дот-плотах хорошо демонстрируется некоторая плавность данного процесса, которая видимо отражает постепенный переход эритроцитов, а также выраженное преобладание аннексин-связывающих эритроцитов в субпопуляции эритроцитов измененной формы.

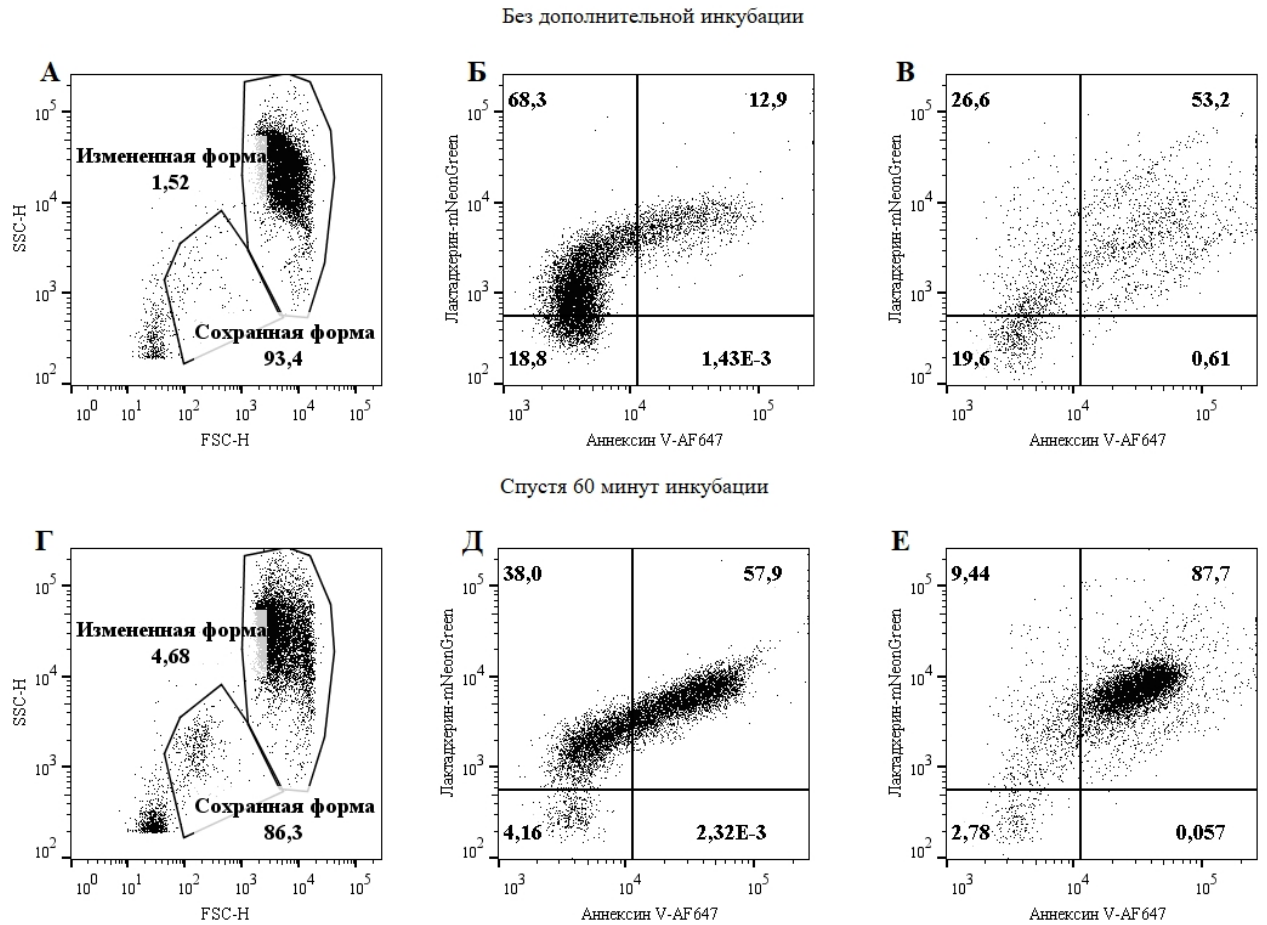


Рисунок 19 – Репрезентативные результаты цитофлуориметрического анализа эритроцитов после стимуляции эриптоза A23187 в зависимости от времени инкубации. Панели А – В представляют собой результаты измерения сразу после стимуляции эриптоза, панели Г – Е – результаты измерения спустя 60 минут дополнительной инкубации. На панелях А, Г представлены стратегии гейтирования регионов субпопуляций сохранной и измененной формы, на панелях Б и Д и В и Е результаты связывания маркеров фосфатидилсерина для субпопуляций сохранной и измененной формы соответственно.

Полная динамика, отражающая динамику накопления для одного донора лактадхерин-связывающих, аннексин-связывающих эритроцитов, а также событий региона измененной формы представлена на Рисунке 20. Данный эксперимент был проведен для трех различных здоровых доноров, отмечался высокий уровень разброса абсолютных значений сигналов, однако тенденции сохранялись.

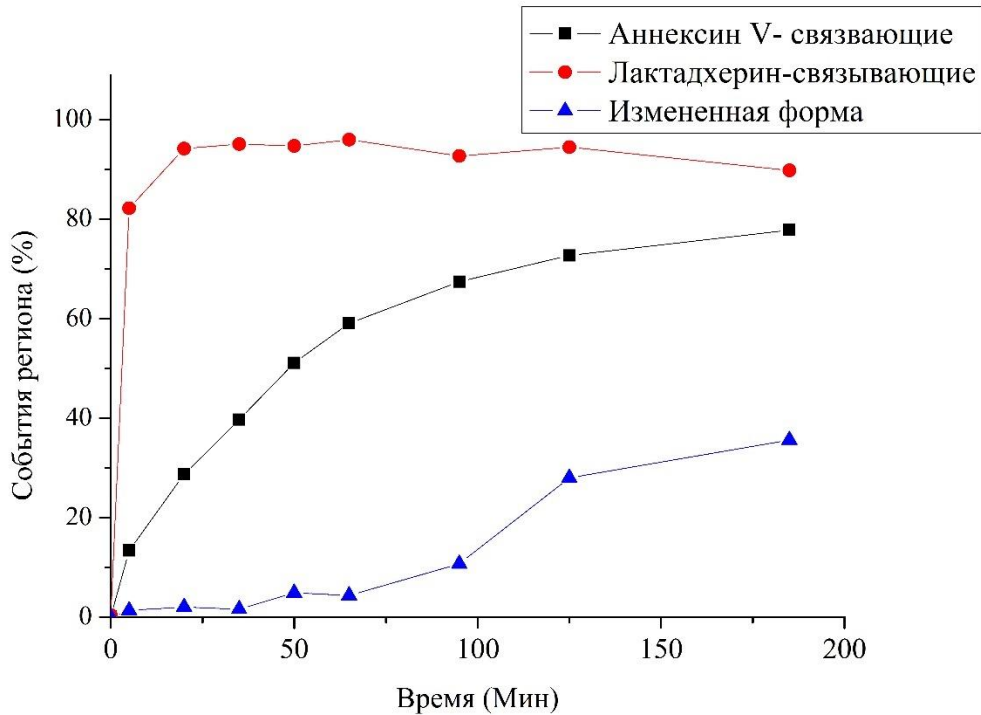


Рисунок 20 – Динамика накопления эритроцитов различных субпопуляций при стимуляции эриптоза A23187. Приведен репрезентативный результат анализа кинетического исследования по точкам с использованием проточной цитофлуориметрии.

Таким образом, в случае стимуляции A23187 наиболее быстрым ответом эритроцитов на стимуляцию является выставление ФС, которое в данных условиях производится практически всеми клетками. Изначально ФС выставляется на внешнем слое мембраны в низких концентрациях, в дальнейшем происходит его постепенное накопление, что свидетельствует о необратимости процесса выставления ФС. Наиболее медленно в случае стимуляции A23187 происходит накопление событий региона измененной формы, что, по-видимому, свидетельствует о тенденции эритроцита как можно дольше регулировать проницаемость мембраны для различных ионов, так как ионный баланс отвечает за способность эритроцита адекватно менять форму и проходить сквозь капилляры.

3.8 Окрашивание эритроцитов CFDA SE

Для характеристики свойств проницаемости мембраны для больших молекул (таких как белки), эритроциты окрашивались CFDA SE – красителем, который необратимо связывается с белками. Результаты проточной цитофлуориметрии представлены на Рисунке 21.

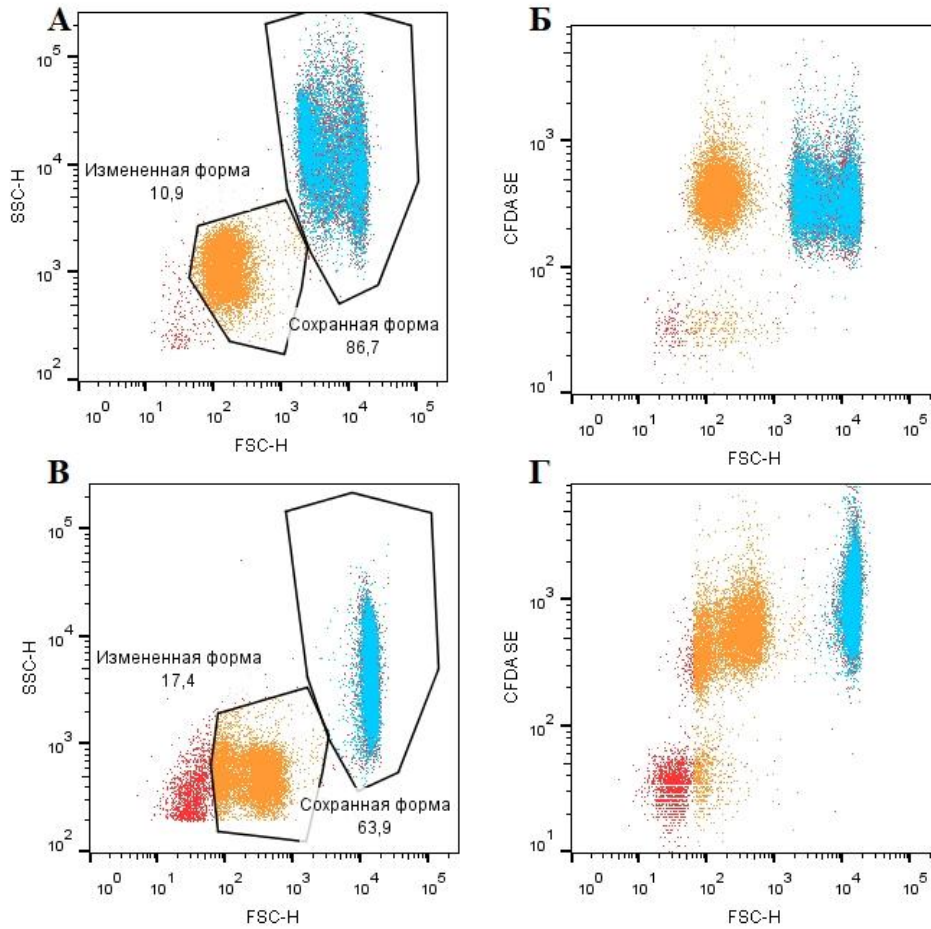


Рисунок 21 – Репрезентативные дот-плоты эритроцитов после окрашивания CFDA и стимуляции эритроцитов. На панелях А и Б представлены результаты цитометрии пробы, обработанной А23187, до и после дополнительной инкубации в течение 1 часа, на панелях В и Г представлены результаты цитометрии пробы после стимуляции ФМА. На панелях А и В представлены стратегии гейтирования регионов сохранной и измененной формы по данным светорассеяния, регионы нормальной формы окрашены голубым, а измененной – оранжевым.

По данным проточной цитофлуориметрии не отмечалось выраженного снижения, однако при дальнейшей обработке отмечалось, что флуоресценция региона сохранной формы была выше для обработки ФМА в сравнении с обработкой A23187 (Рисунок 22). Однако в дальнейшем отмечалась некоторая утечка CFDA SE из клетки, которая, по данным контрольной пробы, не может быть связана с выгоранием красителя, однако может быть связана с тем, что часть красителя не связалась с белком и вытекала через поврежденную ионофором мембрану. Данная гипотеза частично подтверждается результатами окрашивания CFDA SE для популяции измененной формы, а также результатами окрашивания с кальцеином.

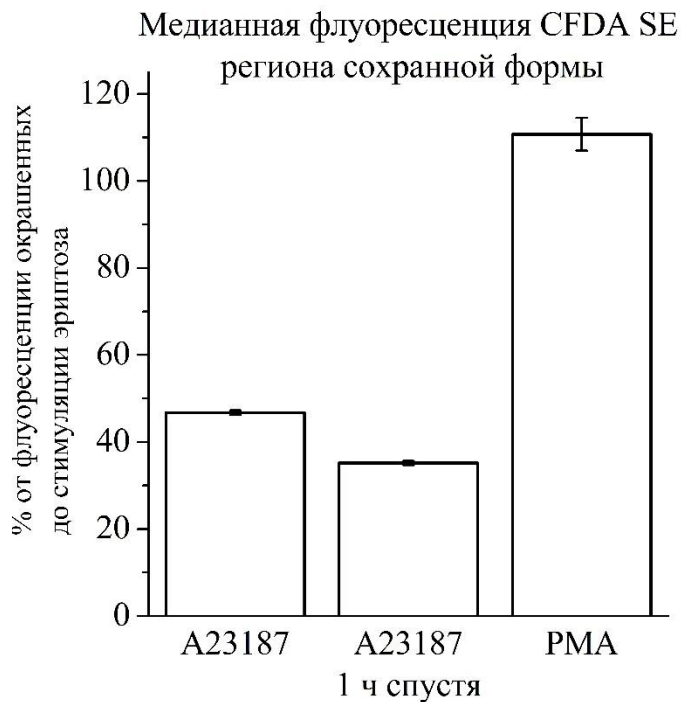


Рисунок 22 – Медианная флуоресценция CFDA для региона эритроцитов с сохранной формой. Флуоресценция нормирована на флуоресценцию до стимуляции эритрозоа для каждого донора. Результаты представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего, $n=3$.

При анализе средней флуоресценции для субпопуляции измененной формы отмечено снижение флуоресценции примерно одинаковое как для PMA, так и для A23187 (Рисунок 23), что свидетельствует об утечке красителя, однако, учитывая,

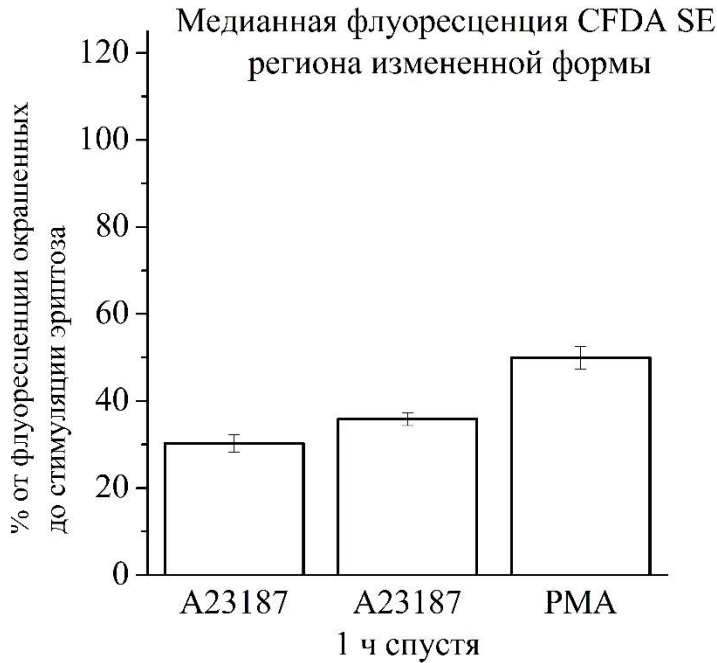


Рисунок 23 – Медианная флуоресценция CFDA для региона эритроцитов с измененной формой. Флуоресценция нормирована на флуоресценцию до стимуляции эритрозоа для каждого донора. Результаты представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего, $n=3$. Шкала представлена аналогичной как для региона сохранной формы.

что результаты потери красителя во многом соответствуют таковым, наблюдаемым для региона сохранной формы при стимуляции A23187, можно предположить, что наблюдается утечка, в основном, части несвязанного красителя, однако можно предположить и утечку части белка (до 50–60 % всех внутриклеточных белков), по-видимому, крайне плотно упакованного в везикулы, с учетом результатов окрашивания мембранных белков.

3.9 Окрашивание эритроцитов различной формы кальцеином

Для характеристики проницаемости мембраны для низкомолекулярных соединений, таких как молекулы глюкозы, неорганические ионы макроэлементов, использовалось окрашивание кальцеином-АМ. Кальцеин-АМ – это молекула,

которая, попадая в клетку, под действием эстераз клетки теряет способность из неё выходить, а также приобретает способность к флуоресценции.

Репрезентативные результаты проточной цитофлуориметрии представлены на Рисунке 24.

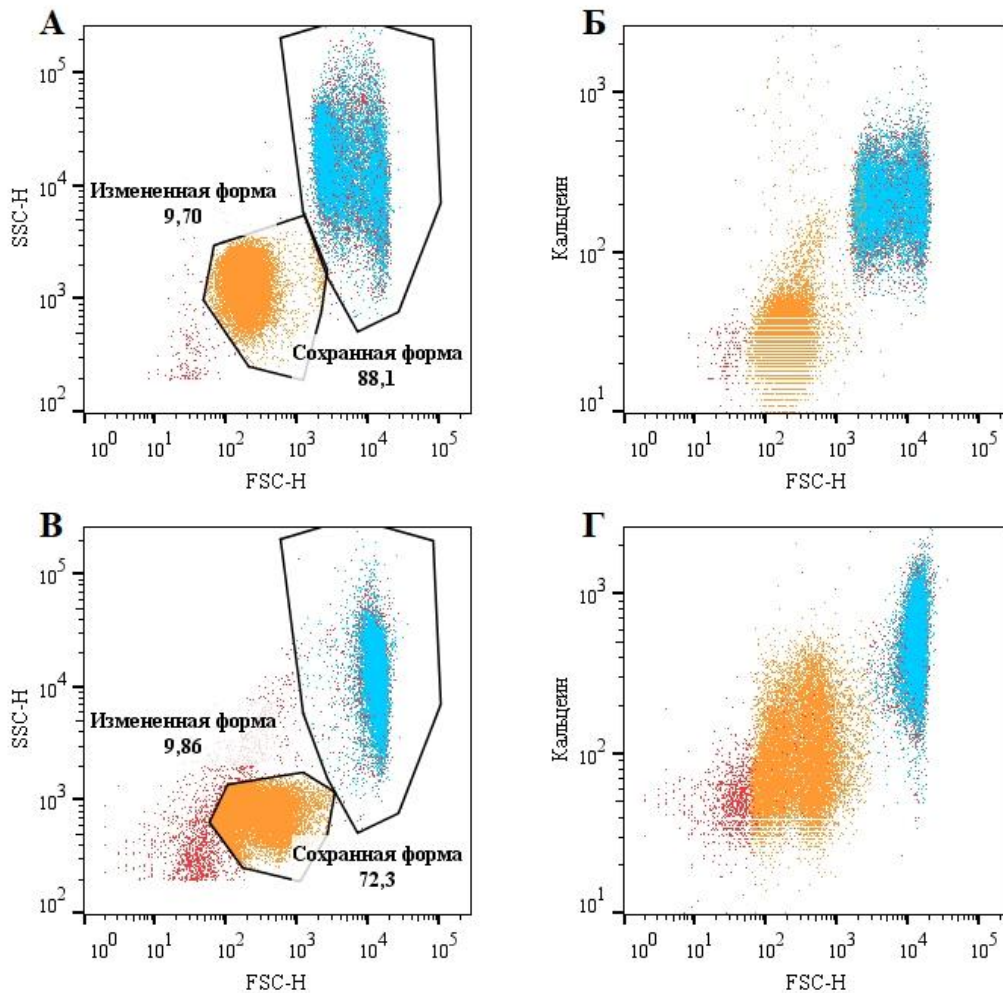


Рисунок 24 – Субпопуляция эритроцитов измененной формы при стимуляции эриптоза отличается высокой проницаемостью мембраны для кальцеина. На панелях А – Б представлены репрезентативные результаты цитофлуориметрического анализа для эритроцитов, обработанных А23187 и далее инкубированных в течение 1 часа для накопления региона измененной формы, на панелях В – Г - для эритроцитов, обработанных ФМА без дополнительной инкубации. На панелях Б, Г представлены дот-плоты флуоресценции субпопуляций различных форм эритроцитов, стратегии гейтирования приведены на панелях А, В.

Результаты анализа флуоресценции эритроцитов региона сохранный формы приведены на Рисунке 25. Как видно, для случая стимуляции A23187 результаты для кальцеина во многом повторяют результаты окрашивания CFDA SE, что в случае CFDA SE мы могли наблюдать снижение флуоресценции частично за счет утечки низкомолекулярного красителя. Аналогично для ФМА утечки практически не отмечалось, что может объясняться характеристиками путей индукции эриптоза.

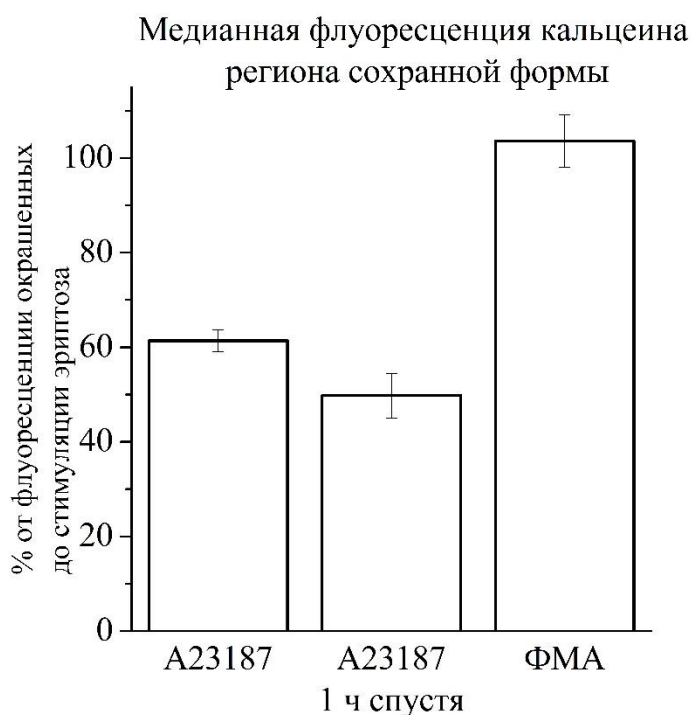


Рисунок 25 – Медианная флуоресценция кальцеина для региона эритроцитов с сохранный формой. Флуоресценция нормирована на флуоресценцию до стимуляции эриптоза для каждого донора. Результаты представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего, $n=3$

В случае же региона измененной формы наблюдали практически полную потерю кальцеина из клеток, причем как для случая стимуляции A23187, так и для стимуляции ФМА (Рисунок 26). Такие результаты свидетельствует о фактически полной проницаемости мембраны для низкомолекулярных соединений, что естественно приводит к ионному дисбалансу и, вероятно, как следствие изменению формы клетки.

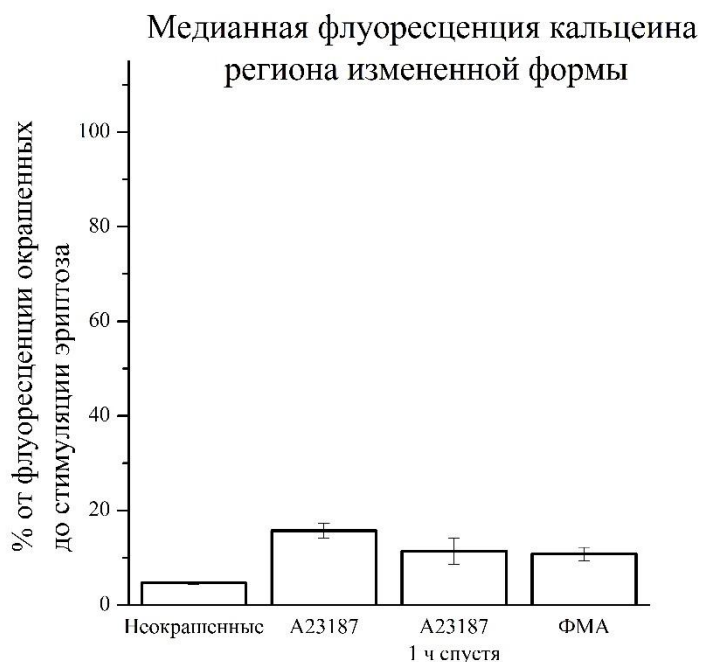


Рисунок 26 – Медианная флуоресценция кальцеина для региона эритроцитов с измененной формой. Флуоресценция нормирована на флуоресценцию до стимуляции эритрозоа для каждого донора. Результаты представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего, $n=3$. Шкала представлена аналогичной как для региона сохранной формы.

3.10 Электронная микроскопия эритроцитов

Для уточнения феномена точечного связывания лактадхерина, который ранее был отмечен в ходе конфокальной микроскопии, была проведена просвечивающая электронная микроскопия эритроцитов.

На Рисунке 27 представлены результаты электронной микроскопии отмытых эритроцитов до стимуляции эритрозоа. Как видно, процессы фиксации значительно не повлияли на морфологию клеток, не отмечается «пузырения мембраны», видимых изменений формы клеток, других отклонений.

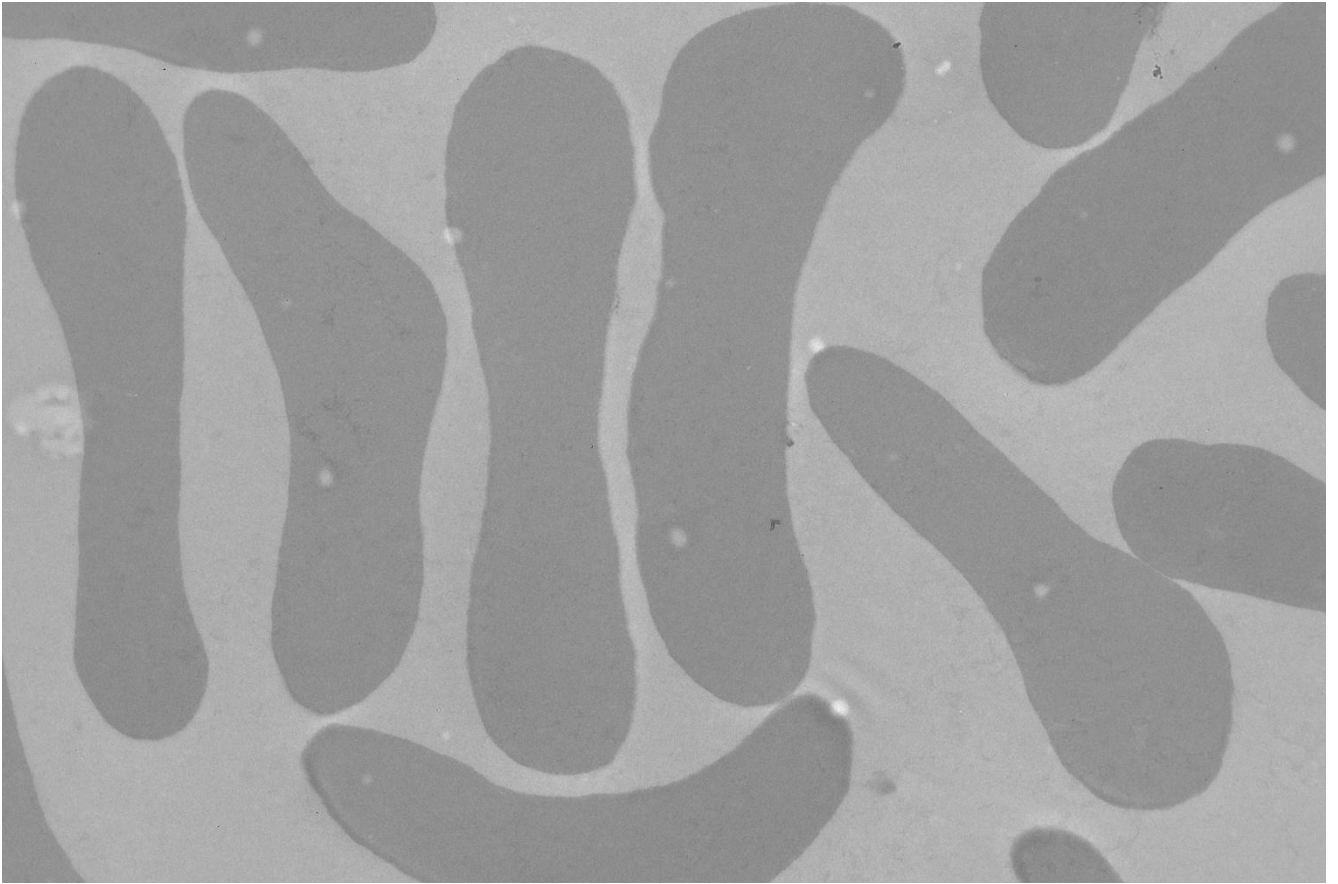


Рисунок 27 – Просвечивающая электронная микроскопия покоящихся эритроцитов. Электронный микроскоп JEM-1400, 4000-кратное увеличение. Микрофотография Сергея Ивановича Обыденного.

При стимуляции эритроцитоза с использованием кальциевого ионофора A23187, для которого отмечено связывание лактадхерина в виде отдельных ярких точек, в ходе электронной микроскопии отмечалось выраженное изменение морфологии клетки – клетки приобретали округлую форму, что логично связано с кальциевой активацией каналов Гардоса, а также отмечается образование выпячиваний мембраны, которые на некоторых срезах выглядели как отдельные микровезикулы, но с высокой долей вероятности все они оставались связанными с основной мембраной клетки (Рисунок 28). Предположительно, именно в этих выпячиваниях начинается постепенное выставление ФС эритроцитом, которое детектируется лактадхерином, однако для точного подтверждения данной гипотезы необходимо проведение мечения лактадхерином, что затруднено вследствие того, что NHS-химия приводит к инактивации лактадхерина .

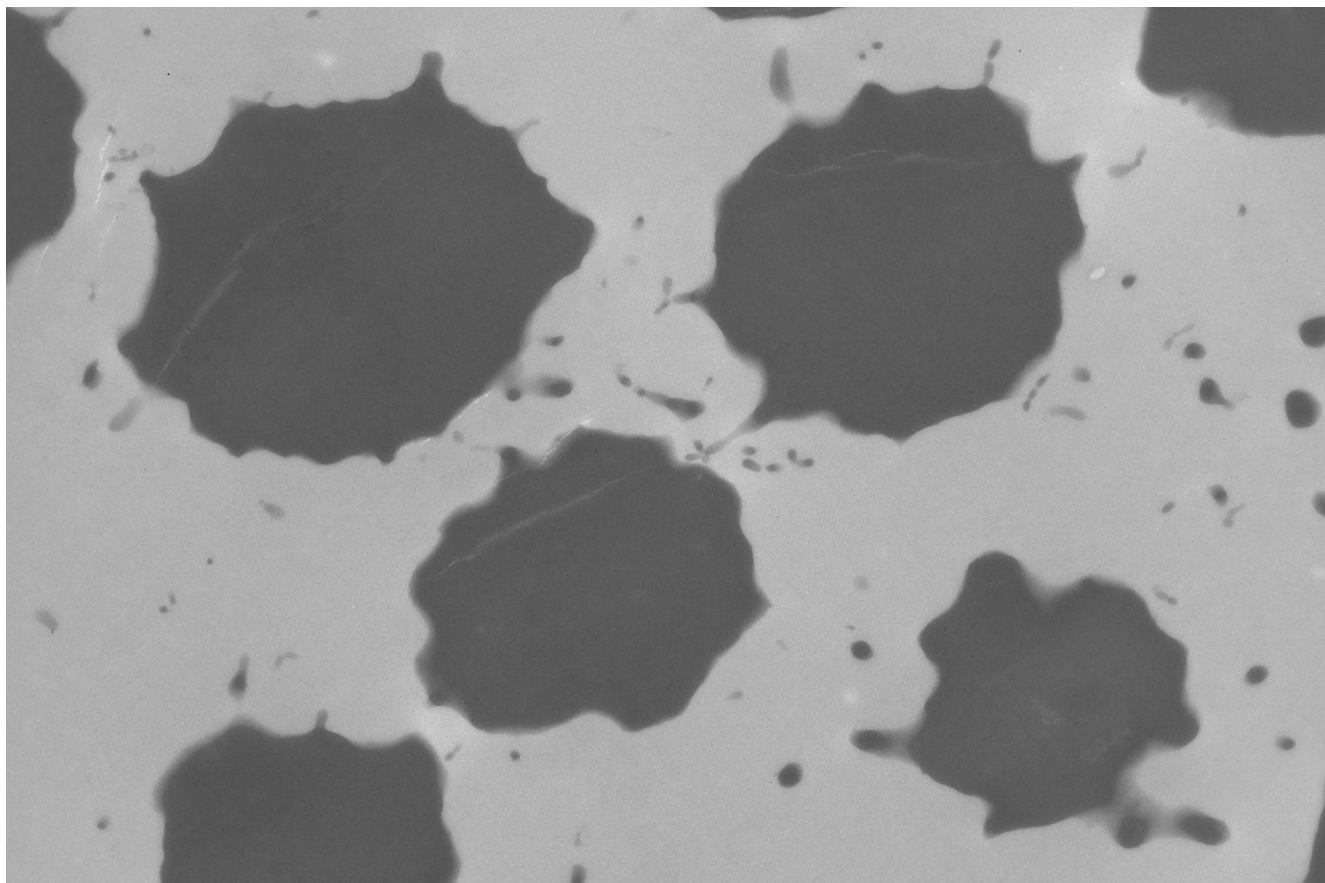


Рисунок 28 – Просвечивающая электронная микроскопия эритроцитов, обработанных A23187. Электронный микроскоп JEM-1400, 4000-кратное увеличение. Микрофотография Сергея Ивановича Обыденного.

При окраске с использованием золотых частиц, конъюгированных с рекомбинантным аннексином V, связывание было детектировано с использованием электронной микроскопии, однако видимого предпочтения к «выпячиваниям» мембраны не отмечалось, что во многом воспроизводит результаты конфокальной микроскопии, одновременно видимых морфологических различий между эритроцитами, связывавшими золотые частицы и не связавшими золотые частицы, не отмечалось (Рисунок 29). Это также соответствует ранее полученным результатам как конфокальной микроскопии, так и проточной цитофлуориметрии.

Достоверно непонятно, что именно характеризует субпопуляцию измененной формы, однако в ходе электронной микроскопии были обнаружены эритроциты, которые менее интенсивно окрашивались (Рисунок 28), а также их количество

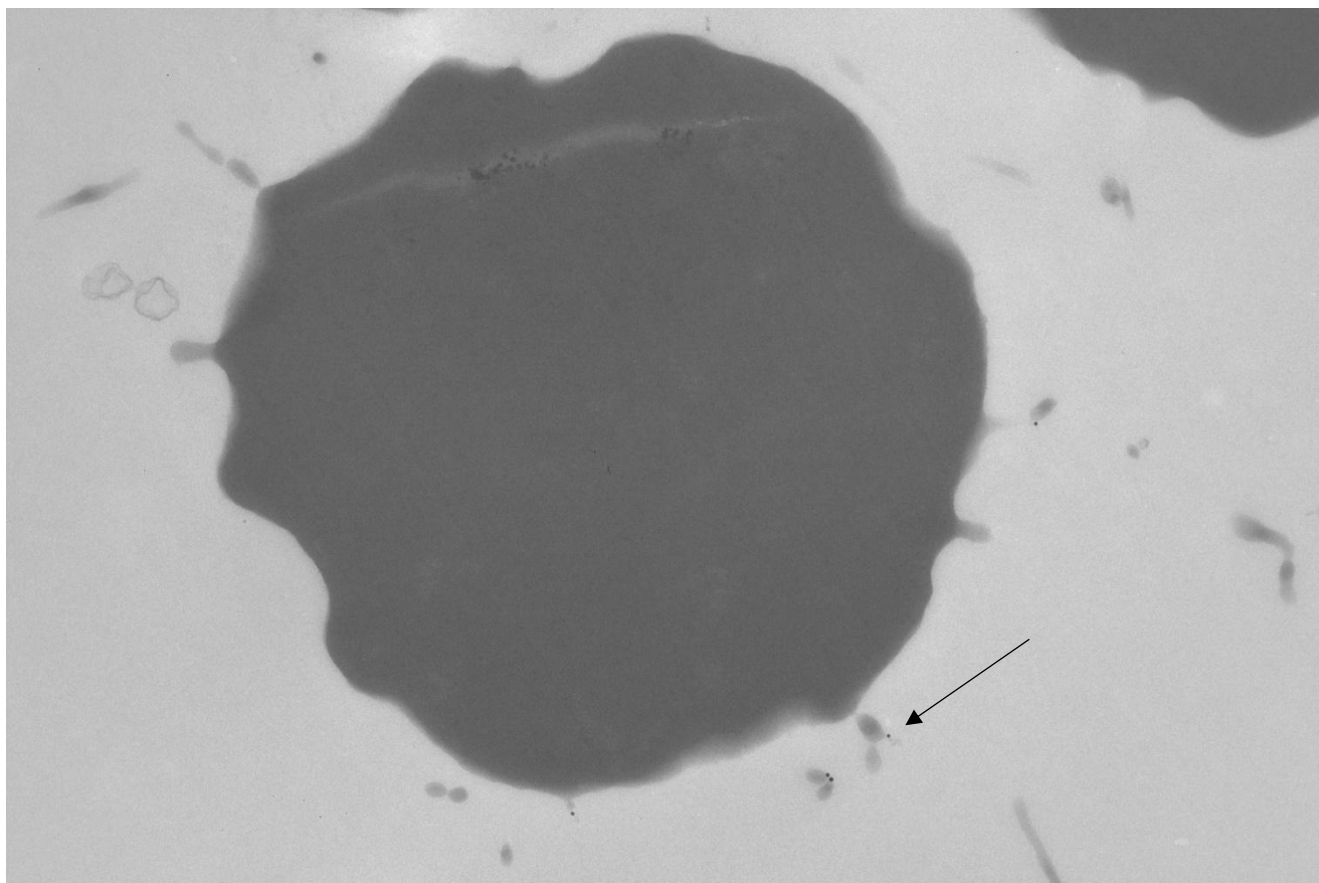


Рисунок 29 – Просвечивающая электронная микроскопия эритроцитов, обработанных A23187, с окрашиванием золотыми частицами, конъюгированными с аннексином V. Золотая частица указана черной стрелочкой. Электронный микроскоп JEM-1400, 8000-кратное увеличение. Микрофотография Сергея Ивановича Обыденного.

увеличивалось при увеличении субпопуляции измененной формы, по данным проточной цитофлуориметрии.

3.11 Активация фактора X внутренней теназой в присутствии эритроцитов

Способность эритроцитов поддерживать мембранно-зависимые реакции свертывания была охарактеризована с помощью теста внутренней теназы.

При постановке реакции в присутствии отмытых эритроцитов здоровых доноров, а также активированных тромбоцитов, были получены сравнимые

значения наработанного фактора Ха под действием внутренней теназы (Рисунок 30).

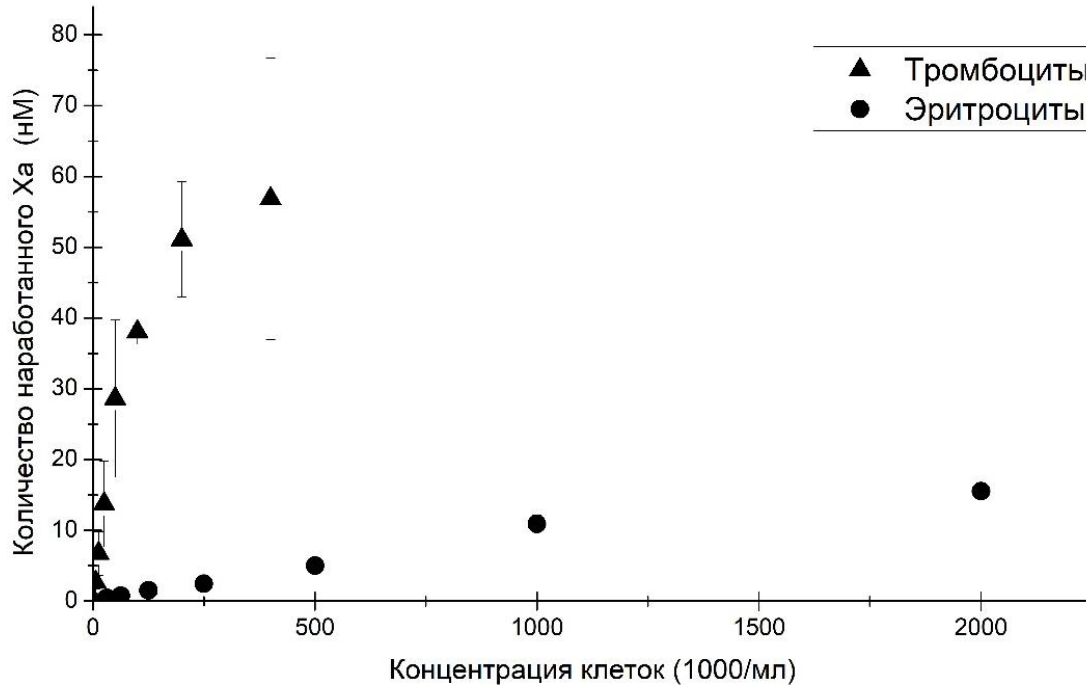


Рисунок 30 – Количество фактора Ха, полученного в результате работы внутренней теназы, в присутствии эритроцитов и активированных тромбоцитов.

Оказалось, что активность эритроцитов в концентрации, соответствующей примерно 40% от физиологической, сравнима с активностью тромбоцитов, активированных 10 нМ тромбина, в концентрации около $40 \cdot 10^9$ кл/л. А при аппроксимации активность физиологической концентрации эритроцитов практически сравнялась бы с активностью тромбоцитов, активированных 10 нМ тромбина, в концентрации около $150 \cdot 10^9$ кл/л, что свидетельствует о потенциально практически равном вкладе эритроцитов и тромбоцитов в поддержание мембранно-зависимых реакций свертывания крови в физиологических условиях.

Реакция активации фактора Ха внутренней теназой в присутствии эритроцитов, обработанных А23187 и ФМА, с одновременной цитофлуориметрической оценкой числа прокоагулянтных эритроцитов может быть описана уравнением:

$$A = A_{Ann} \cdot N_{Ann} + A_{Ldh} \cdot N_{Ldh} \quad (1),$$

где A – измеренное количество наработанного фактора Ха; A_{Ann} и A_{Ldh} – активность одного эритроцита, связывающего только лактадхерин, или и лактадхерин, и аннексин V, эти переменные рассчитывались при обработке данных; N_{Ann} и N_{Ldh} – количество клеток, относящихся к соответствующим субпопуляциям эритроцитов, по данным проточной цитофлуориметрии.

Данное уравнение было решено методом наименьших квадратов с учетом переопределенности экспериментальных данных, вклад каждого типа клеток был статистически достоверным, значения рассчитанной активности на одну клетку представлены на Рисунке 31.

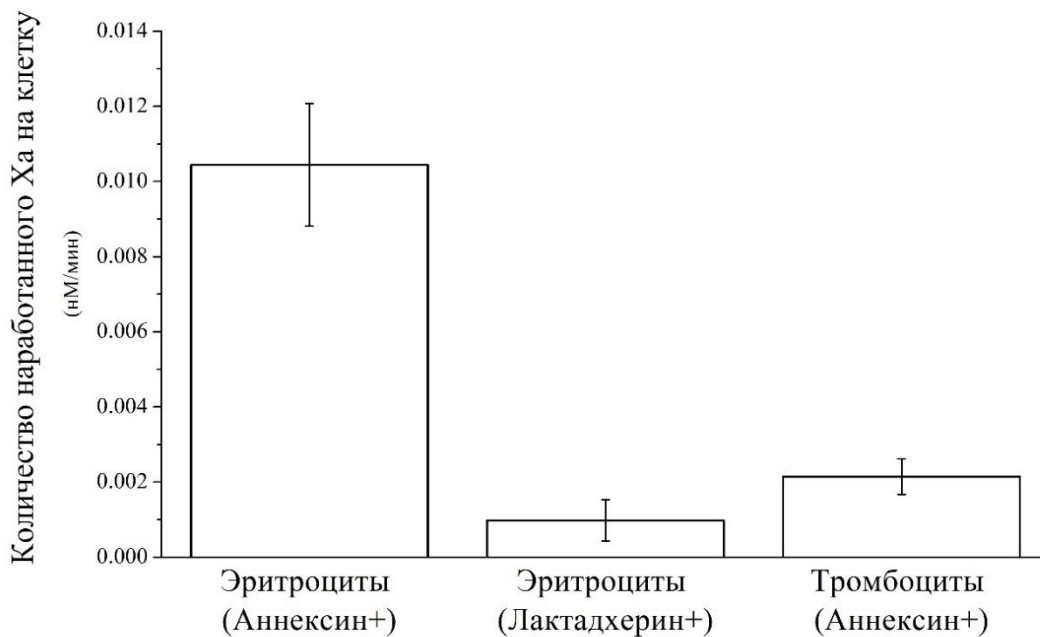


Рисунок 31 – Количество наработанного фактора Ха на одну клетку. Данные приведены как среднее \pm стандартное отклонение. В анализ включены результаты обработки 8 независимых экспериментов.

Расчетная активность аннексин-связывающего тромбоцита оказалась всего лишь в 2 раза выше активности только лактадхерин-связывающего эритроцита и в 5 раз меньше активности аннексин-связывающего эритроцита.

3.12 Выявление прокоагулянтных эритроцитов в крови здоровых доноров

С учетом полученных фундаментальных результатов был разработан метод цитофлуориметрического исследования цельной крови с детекцией прокоагулянтных эритроцитов с использованием двух разных маркеров фосфатидилсерина – лактадхерина и аннексина V. При использовании антител удалось выявить субпопуляцию с измененными параметрами прямого и бокового светорассеяния (Рисунок 32), до половины данной субпопуляции связывает лактадхерин, что указывает на процессы клеточной смерти, которая сопровождается потерей дискоидной формы. Однако, учитывая малое число этих событий, их достоверный анализ затруднен [108].

При анализе количества циркулирующих прокоагулянтных эритроцитов с помощью лактадхерина в качестве маркера фосфатидилсерина мы обнаружили, что вне зависимости от используемой стратегии гейтирования сигнал достоверно отличался от контроля, в качестве которого использовался рекомбинантный mNeonGreen. Кроме того, также достоверно отличались результаты при использовании гейтирования на основании антител в сравнении с гейтированием на основании светорассеяния, но при этом результаты обеих групп достоверно не

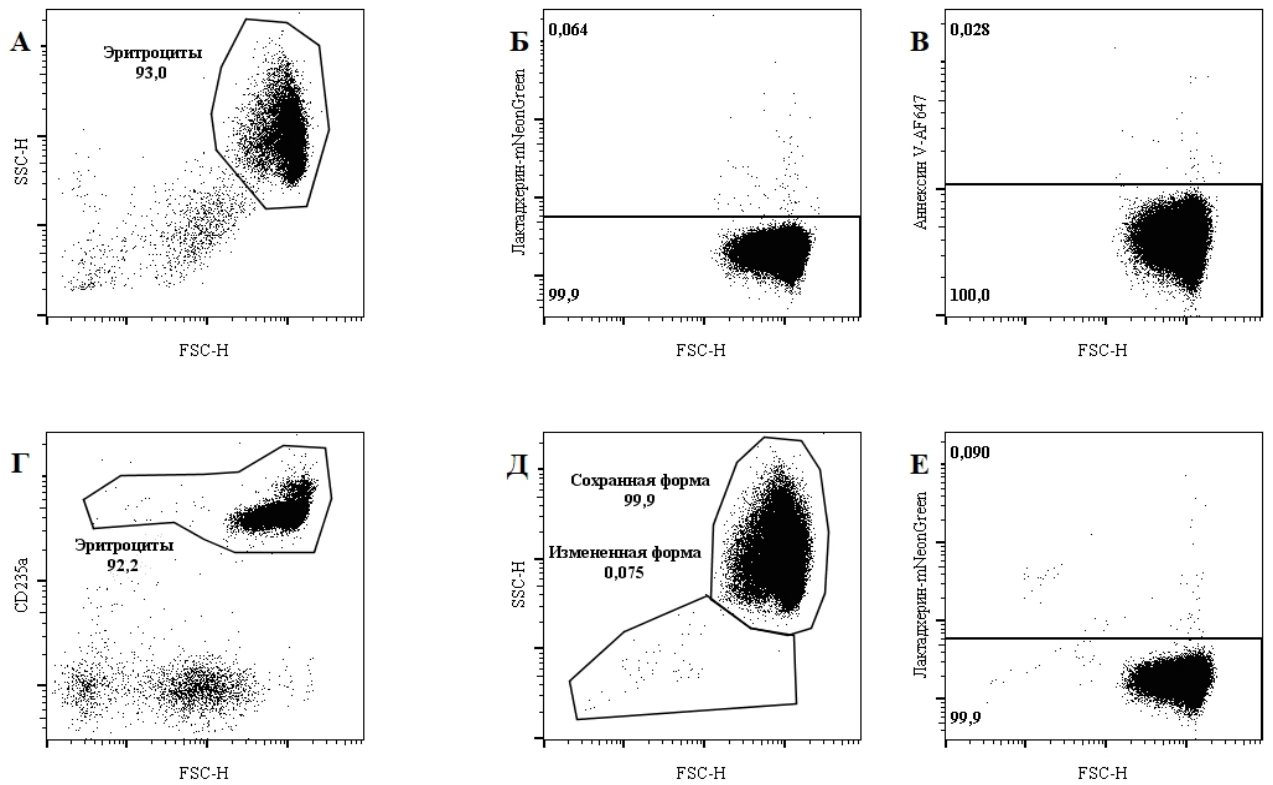


Рисунок 32 – Стратегия гейтирования эритроцитов и выделения регионов фосфатидилсерин-экспрессирующих субпопуляций. В качестве образца для анализа использовалась цельная кровь, разведенная в 1000 раз буфером Тироде. Сверху приведены гейты для региона эритроцитов по FSC/SSC плоту (А), далее для клеток внутри выделенного региона приведены примеры гейтов для определения доли фосфатидилсерин-экспрессирующих субпопуляций для лактадхерина (Б) и аннексина V (В). Снизу приведен гейт для региона эритроцитов по FSC/CD235a плоту (проба, окрашенная антителами к гликофору А) (Г). Для событий внутри этого региона приведен пример гейтов для выделения клеток сохранной и измененной формы по данным FSC/SSC плота (Д), а также выделение фосфатидилсерин-экспрессирующей субпопуляции с использованием лактадхерина (Е)..

отличались от результатов, полученных с использованием комбинированного гейта (Рисунок 33).

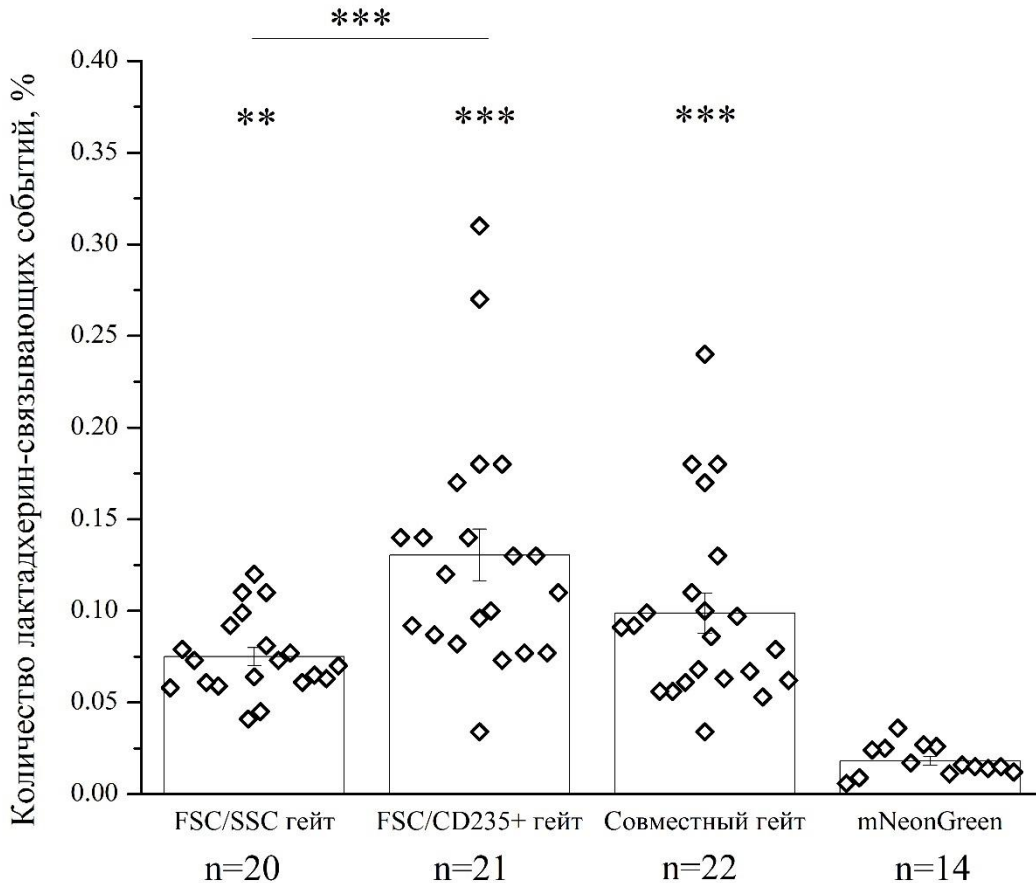


Рисунок 33 – Процент лактадхерин-связывающих эритроцитов в зависимости от используемой стратегии гейтирования. На графике приведены диаграммы размаха с исходными данными результатов проточной цитофлуориметрии разведенной цельной крови с определением доли лактадхерин-связывающих эритроцитов в зависимости от стратегии гейтирования. Приведены результаты для FSC/SSC гейта, FSC/CD235а гейта, комбинированного (FSC/SSC + FSC/CD235а) и отрицательного контроля с окрашиванием mNeonGreen. Данные группы показали отличие в дисперсионном анализе и по результатам пост-хок теста Холма-Бонферрони, (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$. Данные собраны на основании выборки 24 здоровых доноров для лактадхерина, для mNeonGreen – 14. Выпадающие точки исключались из анализа, снизу приведено число точек, включенных в анализ для каждой группы.

Аналогично были проанализированы результаты для второго маркера фосфатидилсерина – аннексина V (Рисунок 34). Результаты для FSC/SSC гейта достоверно не отличались как от результатов ЭДТА-контроля, так и от

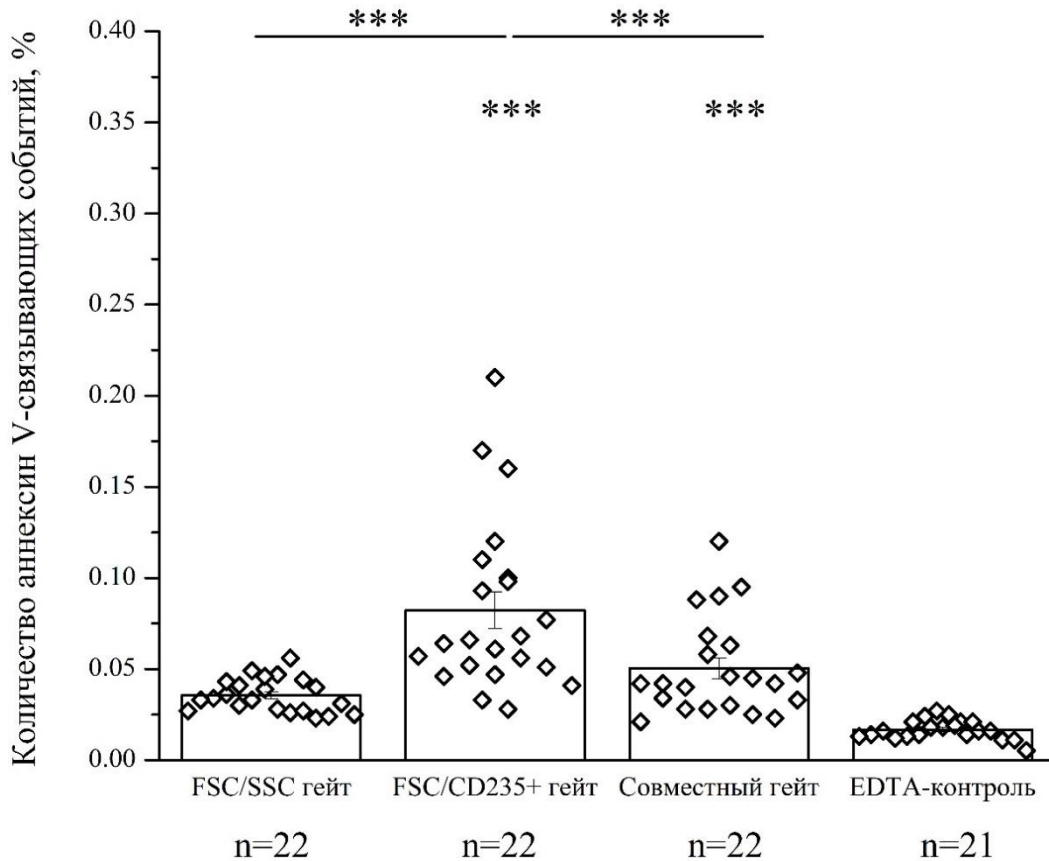


Рисунок 34 – Процент аннексин V-связывающих эритроцитов в зависимости от используемой стратегии гейтирования. На графике приведены диаграммы размаха с исходными данными результатов проточной цитофлуориметрии разведенной цельной крови с определением доли аннексин V-связывающих эритроцитов в зависимости от стратегии гейтирования. Приведены результаты для FSC/SSC гейта, FSC/CD235a гейта, комбинированного (FSC/SSC + FSC/CD235a) и отрицательного контроля в присутствии ЭДТА. Данные группы показали отличие в дисперсионном анализе и по результатам пост-хок теста Холма-Бонферрони, (***) – $p < 0,001$. Данные собраны на основании выборки 24 здоровых доноров. Выпадающие точки исключались из анализа, снизу приведено число точек, включенных в анализ для каждой группы.

комбинированного гейта, при этом комбинированное гейтирование достоверно отличается от ЭДТА-контроля. Группа FSC/CD235a достоверно отличалась от всех остальных групп.

Таким образом, добавление антител влияет на число выявляемых ФС-экспрессирующих событий; как минимум, часть такого влияния обусловлена дополнительной детекцией эритроцитов измененной формы. Но с учетом того, что их добавление делает связывание аннексина V статистически значимым даже для использования совместного гейта, т.е. нивелирования эффекта от региона измененной формы, разумно предположить, что они стимулируют экспрессию фосфатидилсерина.

3.13 Цитофлуориметрическая оценка качества эритроцитной взвеси

Для трех временных точек в течение срока хранения эритроцитной взвеси при помощи проточной цитофлуориметрии были оценены 3 параметра: 1) процент клеток с измененной формой (по прямому и боковому светорассеянию); 2) процент клеток, связывающих лактадхерин; 3) процент клеток, связывающих аннексин V.

По данным цитофлуориметрического анализа, с течением времени отмечался постепенный прирост субпопуляции клеток с измененными показателями прямого и бокового светорассеяния клеток, вероятно, вследствие хранения потерявших свою дискоидную форму (Рисунок 35). Изменение формы клетки является одним из признаков протекания процесса программируемой клеточной гибели эритроцита. При дисперсионном анализе между группами отмечена лишь тенденция к статистически значимому различию ($p=0,08$), что, вероятно, объясняется малым размером выборки ($n=3$).

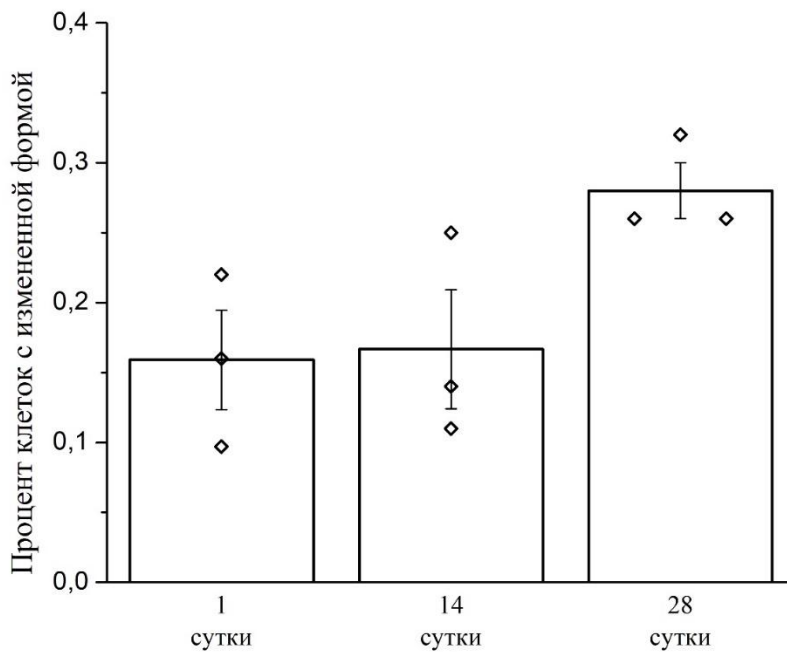


Рисунок 35 – Процент клеток с измененными параметрами светорассеяния в образцах эритроцитной взвеси. На рисунке представлена зависимость процента клеток измененной формы в зависимости от срока хранения эритроцитной взвеси. Данные представлены для 3 образцов в каждой точке хранения. Гистограммы представлены как средние значения \pm стандартная ошибка среднего. Точками представлены измеренные данные для каждого образца.

При исследовании уровня экспрессии фосфатидилсерина при помощи лактадхерина и аннексина V видимой динамики изменения процента фосфатидилсерин-положительной субпопуляции эритроцитов не отмечалось вне зависимости от используемого маркера (Рисунок 36). Однако результаты специфического связывания (после вычитания процента фосфатидилсерин-положительных событий в контрольной пробе) аннексина V достоверно не детектировались для измерений в 1ые ($p=0,45$) и 28ые ($p=0,33$) сутки.

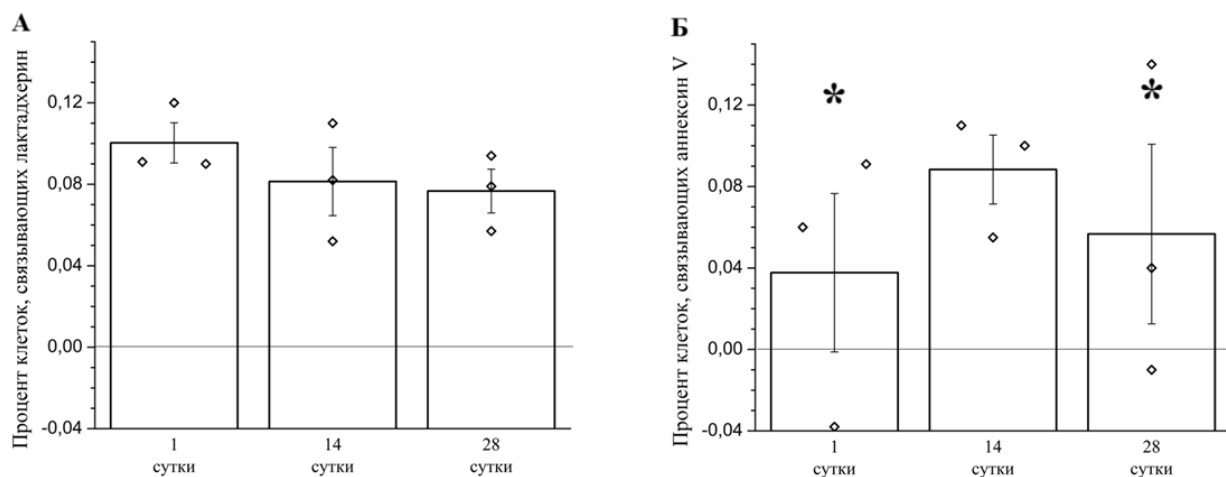


Рисунок 36 – Процент фосфатидилсерин-экспрессирующих эритроцитов в эритроцитной взвеси. На рисунке представлена зависимость процента фосфатидилсерин-положительных эритроцитов в зависимости от длительности хранения эритроцитов при оценке с использованием лактадхерина (панель А) и аннексина V (панель Б). Процент фосфатидилсерин-положительных клеток для аннексина V представлен как разность процента в присутствии 2 мМ хлорида кальция и в присутствии 2 мМ ЭДТА. Статистического изменения с течением времени не отмечалось. Связывание в образцах, отмеченных * по данным одновыборочного t-критерия Стьюдента, достоверно не отличалось от 0 ($p > 0,05$). Гистограммы представлены как средние значения \pm стандартная ошибка среднего. Точками представлены измеренные данные для каждого образца.

3.14 Циркулирующие прокоагулянтные эритроциты у пациентов с наследственными гемолитическими анемиями

Для пациентов с наследственными гемолитическими анемиями (наследственным сфероцитозом, дефицитом пируваткиназы эритроцитов) были проведены тесты цитофлуориметрической детекции циркулирующих прокоагулянтных эритроцитов. В анализ включались результаты пробы, окрашенной антителами, с учётом выявленных у части пациентов эритроцитов измененной формы.

Результаты определения фосфатидилсерин-положительных эритроцитов с использованием лактадхерина представлены на Рисунке 37. Выявлено достоверное увеличение количества циркулирующих прокоагулянтных эритроцитов для пациентов с наследственными гемолитическими анемиями в сравнении с группой

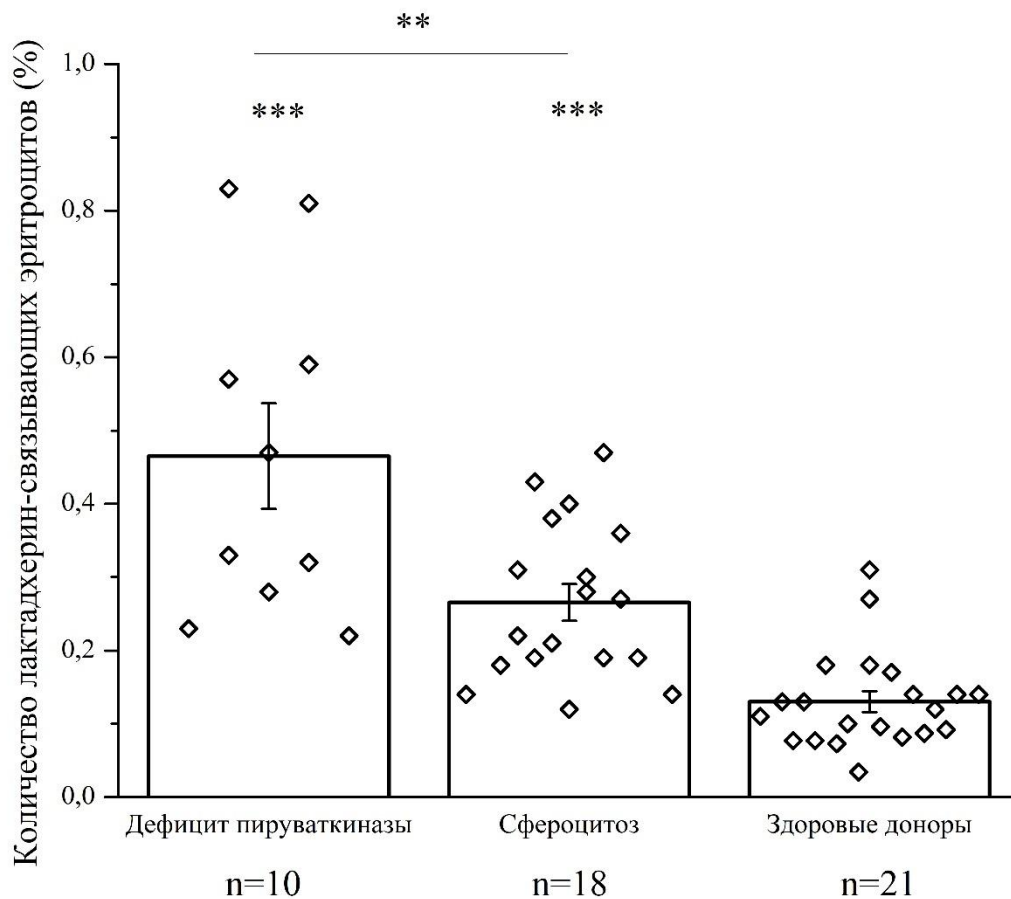


Рисунок 37 – Количество лактадхерин-связывающих эритроцитов в крови пациентов с гемолитическими анемиями. На рисунке представлены результаты детекции прокоагулянтных эритроцитов с использованием лактадхерина для пациентов с наследственным дефицитом пируваткиназы эритроцитов (всего 12 пациентов), наследственным сфероцитозом (всего 20 пациентов), здоровых доноров (24 здоровых донора). Выпадающие точки были исключены из анализа, снизу приведено число точек, включенных в анализ для каждой группы. Данные группы показали отличие в дисперсионном анализе и по результатам пост-хок теста Холма-Бонферрони, (***) – $p < 0,001$, (**) – $p < 0,01$.

здоровых доноров, кроме того, при наследственном дефиците пируваткиназы эритроцитов увеличение было более значимым, чем для пациентов с наследственным сфероцитозом.

Аналогичные результаты для традиционного маркера фосфатидилсерина – аннексина V представлены на Рисунке 38.

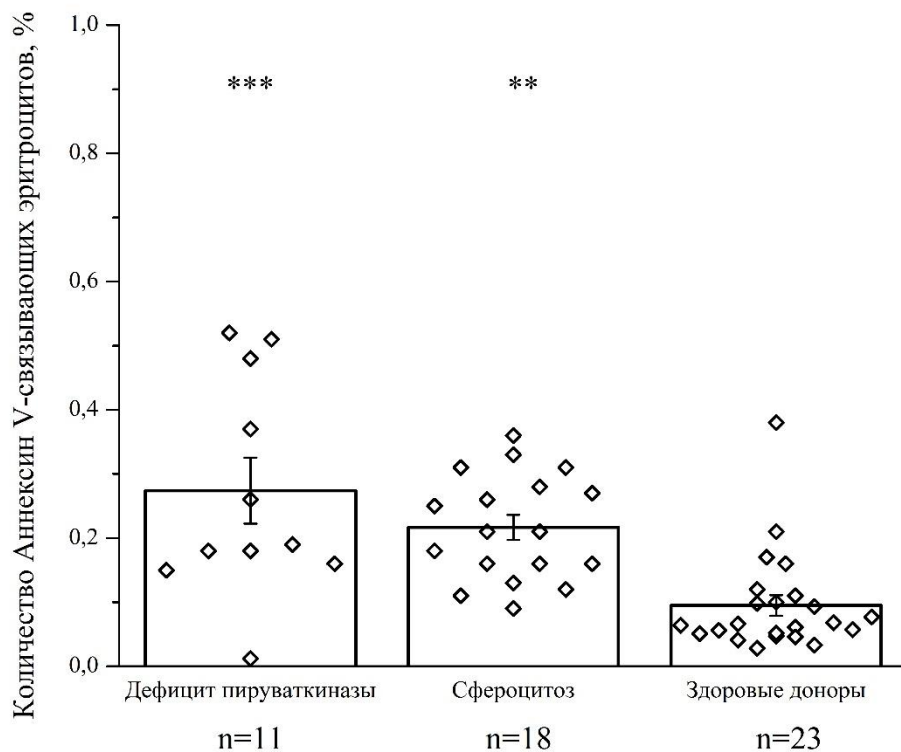


Рисунок 38 – Количество аннексин V-связывающих эритроцитов в крови пациентов с гемолитическими анемиями. На рисунке представлены результаты детекции прокоагулянтных эритроцитов с использованием лактадхерина для пациентов с наследственным дефицитом пируваткиназы эритроцитов (всего 12 пациентов), наследственным сфероцитозом (всего 20 пациентов), здоровых доноров (24 здоровых донора). Выпадающие точки были исключены из анализа, снизу приведено число точек, включенных в анализ для каждой группы. Данные группы показали отличие в дисперсионном анализе и по результатам пост-хок теста Холма-Бонферрони, (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$.

Аннексин также позволил выявить статистически значимое повышение уровня прокоагулянтных эритроцитов, однако различия между пациентами с наследственным дефицитом пируваткиназы эритроцитов и наследственным сфероцитозом выявлено не было.

При ROC-анализе дифференциации пациентов с наследственной гемолитической анемией и здоровых доноров значительной разницы между использованием лактадхерина и аннексина V не было выявлено, но тем не менее по показателю AUC (площадь под кривой), детектирование с использованием лактадхерина оказалось предпочтительнее (Рисунок 39).

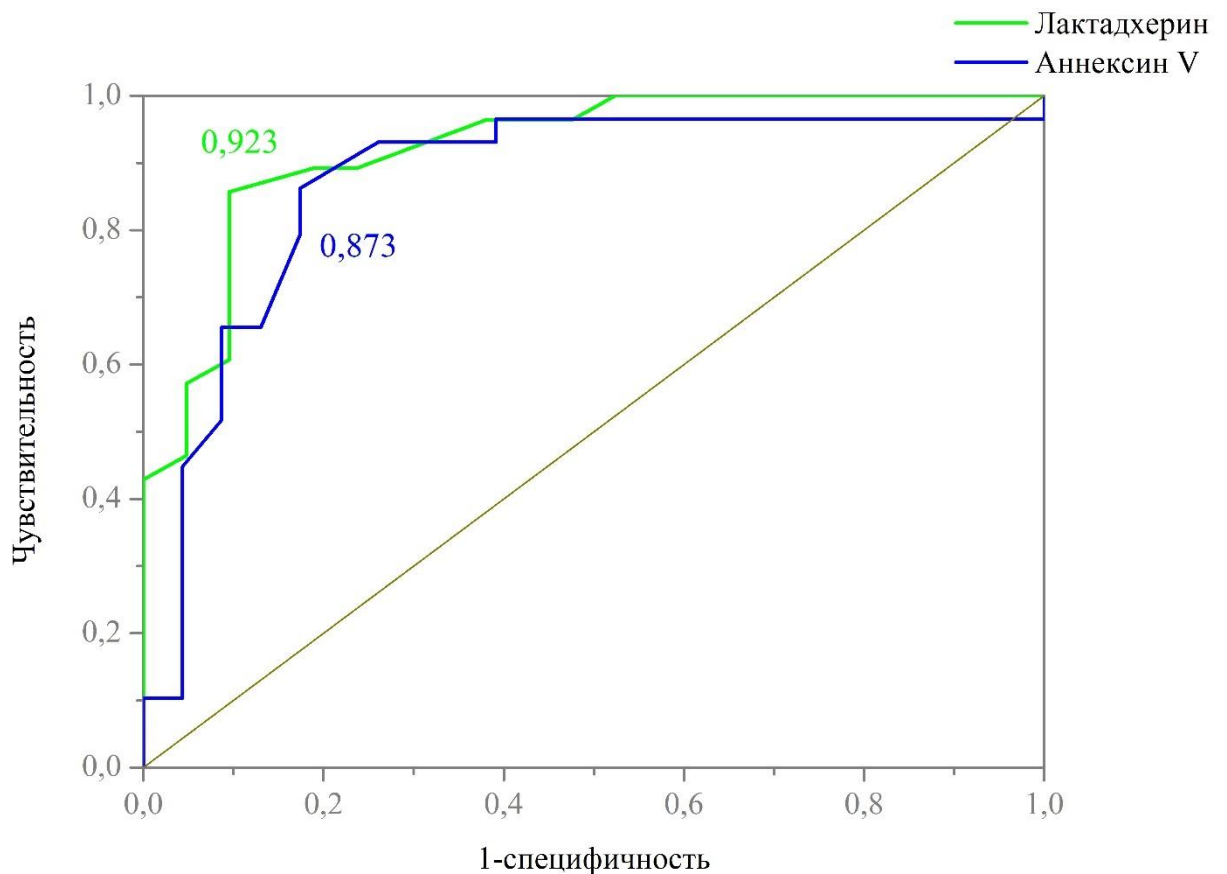


Рисунок 39 – ROC-анализ использования лактадхерина и аннексина V для задач дифференциации здоровых доноров и пациентов с наследственной гемолитической анемией. На рисунке представлены кривые, а также значения AUC (площади под кривой).

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

4.1 Две субпопуляции прокоагулянтных эритроцитов

В рамках данного диссертационного исследования было проведено исследование клеточной смерти эритроцита, которая сопровождается потерей физиологической асимметрии мембраны [30]. В отличие от тромбоцитов, которые теряют свою асимметрию мембраны достаточно быстро при сильной активации, для эритроцитов не характерно быстрое выставление больших количеств фосфатидилсерина (ФС) [97]. Напротив, при смерти эритроцита ФС происходит достаточно быстро в низких количествах, однако это состояние оказывается для него достаточно устойчивым и не выявляется при использовании традиционного маркера ФС – аннексина V, только применение высокочувствительного маркера ФС, лактадхерина, позволило детектировать потерю асимметрии мембраны.

Одновременно с экспрессией фосфатидилсерина при стимуляции эритроцита кальциевым ионофором A23187 отмечается появление субпопуляции эритроцитов, которые характеризуются измененными параметрами FSC/SSC. Количество клеток данной субпопуляции накапливается постепенно при инкубации после стимуляции клеточной смерти, причем скорость их накопления оказалась даже ниже скорости накопления числа эритроцитов, связывающих фосфатидилсерин. При дальнейшем изучении эритроцитов данной субпопуляции оказалось, что мембрана таких клеток, высокопроницаемая для низкомолекулярных соединений, в то же время непроницаема для белков, то есть высвобождения гемоглобина при переходе к данной субпопуляции фактически не происходит.

При анализе способности эритроцитов поддерживать мембранно-зависимые реакции свертывания крови в зависимости от степени экспрессии фосфатидилсерина выявлено, что обе субпопуляции поддерживают протекание мембранно-зависимых реакций свертывания крови, однако те эритроциты, которые связывают и аннексин V, и лактадхерин, делают это практически в 10 раз эффективнее эритроцитов, связывающих только лактадхерин. Что интересно,

активность ФС-экспрессирующего тромбоцита, клетки, для которой не было продемонстрировано разницы в детектируемом количестве между аннексином V и лактадхерином, клетки, которая считается основным источником отрицательно-заряженной поверхности в условиях гемостаза, оказалась всего в 2 раза выше, чем активность только лактадхерин-связывающего эритроцита. Логично, что вклад эритроцитов может оказаться весьма значимым в определенных условиях, например в условиях венозного тромбоза, для которого характерно образование красных тромбов. Кроме того, можно предположить, что контракция тромба и сжатие эритроцитов в её процессе может приводить к повышению концентрации внутриклеточного кальция и, как следствие, появлению аннексин-связывающих эритроцитов, чья активность в 5 раз превышает аналогичную для прокагулянтного тромбоцита.

Открытие субпопуляции только лактадхерин-связывающих эритроцитов добавляет также важный штрих к картине элиминации эритроцитов. Принято считать, что селезенка, ответственная за элиминацию эритроцитов, в основном ориентируется на их способность преодолевать узкие пространства [36], однако, также продемонстрировано влияние других факторов, в первую очередь, экспрессии CD47, который подавляет фагоцитоз эритроцитов [35], а также экспрессии ФС, однако последний факт представлялся наиболее спорным, так как в работе, в которой изучалось *in vivo* старение эритроцита, не было обнаружено ни одного аннексин-связывающего эритроцита [27]. С учетом полученных данных о том, что экспрессия фосфатидилсерина в низких концентрациях является достаточно стабильным состоянием для эритроцита, а также литературных данных о том, что именно лактадхерин опосредует фагоцитоз эритроцитов макрофагами [40; 111], становится понятно, что именно на этой стадии эритроциты должны вылавливаться из кровотока – на фазе, в которой у клетки остаются ресурсы, чтобы поддерживать относительную асимметрию мембраны, а также ионный баланс, который, вероятно, ещё позволяет преодолевать большинство сосудов.

4.2 Проккоагулянтные эритроциты в крови здоровых доноров

При исследовании крови здоровых доноров оказалось, что аннексин-положительные эритроциты достоверно не выявлялись с использованием метода проточной цитофлуориметрии без применения антиэритроцитарных антител, добавление же антител к цельной крови позволяло обнаруживать аннексин-связывающие эритроциты. Кроме того, добавление антител способствовало увеличению числа лактадхерин-связывающих эритроцитов, хотя этот эффект оказался статистически незначимым. Данные результаты, таким образом, подтверждают литературные данные о том, что антитела (в основном, IgM и IgA) стимулируют клеточную гибель эритроцитов. Однако до конца непонятно, влияют ли IgG в основном на эритроциты, уже вступившие на путь клеточной гибели (связывающие лактадхерин), или влияют на все клетки одинаково.

Лактадхерин-связывающие эритроциты, в отличие от аннексин-связывающих, достоверно выявлялись в венозной крови здоровых доноров; таким образом, впервые без любых дополнительных методических манипуляций, от которых можно отказаться, были детектированы ФС-экспрессирующие эритроциты.

4.3 Цитофлуориметрический анализ хранимых эритроцитов

Эритроцитная взвесь – самый используемый продукт крови сегодня, однако его применение сопряжено с риском осложнений. Исследование, а возможно и рутинная характеристика, свойств эритроцитной взвеси могут быть использованы в дальнейшем для снижения их частоты, а ставшее в последнее время рутинным применение проточной цитофлуориметрии позволяет лучше оценивать различные параметры хранимых эритроцитов, открывая новые возможности для оценки влияния различных манипуляций [112].

Представленные в данной диссертационной работе результаты ставят под сомнение эффективность использования аннексина V для оценки параметров хранимой эритроцитной взвеси. Однако даже использование более

чувствительного маркера фосфатидилсерина, лактадхерина, не позволило достоверно выявить накопление потенциально прокоагулянтных эритроцитов по мере хранения эритроцитарной взвеси. Требуется продолжение исследования на большей выборке для уточнения результатов. В литературе представлено описание во многом обратных результатов [113], но это расхождение, скорее всего, обусловлено методическими различиями.

В то время как использование маркеров фосфатидилсерина не позволило выявить значимых различий во время хранения, оценка морфологии эритроцитов через параметры прямого и бокового светорассеяния выявила постепенное накопление эритроцитов измененной формы, что соотносится с известными литературными данными. Одновременно открывается возможность соотнесения данных проточной цитофлуориметрии с результатами других методов, например эритроцитометрии. Другим направлением развития может стать добавление других известных маркеров повреждения эритроцитов, например CFDA-SE [114].

4.4 Прокоагулянтные эритроциты в крови пациентов с гемолитическими анемиями

Известно, что у пациентов с гемолитическими анемиями в течение жизни отмечается повышенный риск развития тромботических осложнений, причем для некоторых из них совершенно понятно, что этот риск обусловлен в основном эпизодами венозного тромбоза [84]. Способность эритроцитов поддерживать мембранно-зависимые реакции свертывания крови предположительно имеет большее влияние в условиях, когда таких клеток много, что соответствует условиям венозного тромбоза. Логичной гипотезой, объясняющей данные факты, является повышение количества прокоагулянтных эритроцитов в крови таких пациентов, что и было продемонстрировано в данном исследовании. Использование лактадхерина позволило выявить более значимое повышение для пациентов с наследственным дефицитом пируваткиназы эритроцитов в сравнении с пациентами с наследственным сфероцитозом. Однако дальнейшие выводы делать сложно

вследствие редкости данных заболеваний, а также отдаленном характере осложнений.

ГЛАВА 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Длительное время эритроциты считались пассивными участниками процессов свертывания крови, в настоящее время их роль интенсивно исследуется, одновременно с такими тесно связанными процессами, как старение и клеточная смерть эритроцита [4]. Экспрессия фосфатидилсерина, которая, как считается, играет роль в каждом из этих аспектов, традиционно исследуется с использованием аннексина V.

В ходе данной работы было продемонстрировано, что использование высокочувствительного маркера ФС, лактадхерина, позволяет детектировать ранние стадии потери мембранной асимметрии эритроцитом, на которых эритроцит также может поддерживать мембранно-зависимые реакции свертывания крови, причем достаточно эффективно, даже в сравнении с прокоагулянтным тромбоцитом, основной клеткой свертывания, – всего лишь в 2 раза менее активно.

Другим аспектом клеточной смерти эритроцита является потеря им способности к поддержанию нормальной формы вследствие нарушения избирательной проницаемости мембраны. Оказалось, что данный процесс представляется более медленным в сравнении с выставлением фосфатидилсерина, одновременно с тем, что мембрана эритроцита, даже потерявшая способность адекватно контролировать транспорт низкомолекулярных соединений, по-видимому, не пропускает значимые количества белка, стремясь до конца предотвратить утечку гемоглобина.

В крови здоровых доноров достоверно были детектированы эритроциты, связывающие лактадхерин, а достоверность выявления эритроцитов, связывающих аннексин V, сомнительна. С учётом литературных данных о роли лактадхерина в элиминации эритроцитов, а также полученных данные о стабильности экспрессии эритроцитов ФС в низкой концентрации, складывается логичная картина элиминации эритроцита до этапа экспрессии ФС в высоких концентрациях.

У пациентов с наследственными гемолитическими анемиями (наследственный сфероцитоз, наследственный дефицит пируваткиназы

эритроцитов) отмечается повышенный уровень прокоагулянтных эритроцитов, которые могут циркулировать в кровотоке, что может объяснять повышенный риск тромботических осложнений у них [84].

5.1 Перспективы дальнейшего развития темы исследования

Перспективы дальнейшего развития темы данного исследования связаны с продолжением определения места прокоагулянтных эритроцитов в фундаментальных механизмах регуляции свертывания крови, а также в ряде потенциально клинически применимых исследований. В первую очередь, описанные параметры могут дополнить арсенал инструментов для оценки качества эритроцит-содержащих продуктов крови, а дальнейшие исследования могут позволить на их основе выявить характеристики, предсказывающие вероятность наступления нежелательных явлений, рутинный мониторинг на их основе в будущем позволит снизить их частоту. Для пациентов дальнейшее изучение взаимосвязи между прокоагулянтными эритроцитами и рисками тромботических осложнений может позволить выявить группы риска, для которых, возможно, будет эффективно применение мер первичной профилактики.

ВЫВОДЫ

1. Лактадхерин в качестве маркера фосфатидилсерина позволяет определять его на поверхности мембраны эритроцита даже при его низкой концентрации в рамках исследования клеточной смерти, что невозможно при использовании аннексина V.

2. Эритроциты способны поддерживать активацию фактора X комплексом внутренней теназы за счет субпопуляции фосфатидилсерин-положительных эритроцитов, их активность зависит от степени экспрессии фосфатидилсерина. Активность аннексин-связывающих эритроцитов в 5 раз превышает активность активированных, аннексин-связывающих тромбоцитов, и в 10 раз превышает активность только лактадхерин-связывающих эритроцитов. Активность только лактадхерин-связывающих эритроцитов в 2 раза меньше активности аннексин-связывающих тромбоцитов, а активность аннексин-связывающих эритроцитов в 5 раз превышает активность тромбоцитов.

3. Разработанная методика с использованием метода проточной цитофлуориметрии позволяет дифференцировать субпопуляции прокоагулянтных эритроцитов с различной экспрессией фосфатидилсерина.

4. В цельной крови здоровых добровольцев достоверно обнаруживаются лактадхерин-связывающие эритроциты при спорных результатах обнаружения аннексин V-связывающих. При анализе эритроцитной взвеси в ходе хранения значимого накопления фосфатидилсерин-экспрессирующих клеток не выявлено, однако отмечено прогрессивное накопление клеток измененной формы.

5. У пациентов с наследственными гемолитическими анемиями, такими как наследственный сфероцитоз и дефицит пируваткиназы эритроцитов содержание фосфатидилсерин-экспрессирующих эритроцитов достоверно выше (0,27% и 0,46%, соответственно) в сравнении с здоровыми донорами (0,13%, $p < 0,05$), что может объяснять прокоагулянтное состояние у таких пациентов. Данный эффект отмечался как при использовании лактадхерина, так и при использовании

аннексина V, при этом использование лактадхерина дает более достоверные результаты.

6.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Учитывая известное влияние селезенки на клиренс эритроцитов, а также повышение рисков тромботических осложнений у пациентов с гемолитическими анемиями после спленэктомии, целесообразно проводить комплексную оценку гемостаза до и после спленэктомии с оценкой количества циркулирующих прокоагулянтных эритроцитов.

2. При проведении цитофлуориметрического изучения клеточной смерти эритроцитов необходимо использование как минимум двух маркеров фосфатидилсерина – аннексина V и лактадхерина.

3. При проведении цитофлуориметрического выявления прокоагулянтных эритроцитов у пациентов с гемолитическими анемиями необходимо использование антиэритроцитарных антител с оценкой числа эритроцитов с измененными параметрами прямого и бокового светорассеяния одновременно с контрольной пробой без добавления антител.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ФС – фосфатидилсерин

ФМА – форбол-12-миристан-13-ацетат

ANOVA (Analysis of variance) – дисперсионный анализ

AUC (Area under curve) – площадь под кривой

CFDA SE – сукцинимидиловый эфир (5,6)-карбоксифлуоресцеина диацетата

FSC (forward scatter) – прямое светорассеяние

SSC (side scatter) – боковое светорассеяние

ROC-анализ (receiver operating characteristic) – статистический метод, позволяющий оценить качество бинарной классификации

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Neubauer K. Endothelial cells and coagulation / Neubauer K., Zieger B. // *Cell Tissue Res.* – 2022. – Vol. 387, no. 3. – Pp. 391–398. – DOI: 10.1007/S00441-021-03471-2.
2. Colling M. E. Inflammation, Infection and Venous Thromboembolism / Colling M. E., Tourdot B. E., Kanthi Y. // *Circ Res.* – 2021. – Vol. 128, no. 12. – Pp. 2017–2036. – DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.121.318225.
3. Falanga A. Cancer-associated thrombosis: enhanced awareness and pathophysiologic complexity / Falanga A., Marchetti M. // *J Thromb Haemost.* – 2023. – Vol. 21, no. 6. – Pp. 1397–1408. – DOI: 10.1016/J.JTHA.2023.02.029.
4. Weisel J. W. Red blood cells: the forgotten player in hemostasis and thrombosis / Weisel J. W., Litvinov R. I. // *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* – 2019. – Vol. 17, no. 2. – Pp. 271–282. – DOI: 10.1111/jth.14360.
5. Alamin A. A. The Role of Red Blood Cells in Hemostasis / Alamin A. A. // *Semin Thromb Hemost.* – 2021. – Vol. 47, no. 1. – Pp. 26–31. – DOI: 10.1055/S-0040-1718889.
6. Чабин И. А. Влияние эритроцитов на свертывание крови / Чабин И. А., Подоплелова Н. А., Пантелеев М. А. // *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии.* – 2022. – Т. 21. – С. 136–141. – DOI: 10.24287/1726-1708-2022-21-3-136-141.
7. Sun S. Crucial roles of red blood cells and platelets in whole blood thrombin generation / Sun S., Campello E., Jinmi Z., et al. // *Blood Adv.* – 2023. – Vol. 7, no. 21. – Pp. 6717–6731. – DOI: 10.1182/BLOODADVANCES.2023010027.
8. Whelihan M. F. Prothrombin activation in blood coagulation: The erythrocyte contribution to thrombin generation / Whelihan M. F., Zachary V., Orfeo T., Mann K. G. // *Blood.* – 2012. – Vol. 120, no. 18. – Pp. 3837–3845. – DOI: 10.1182/BLOOD-2012-05-427856.
9. Коваленко Т. А. Мембранные реакции системы свертывания крови: классический взгляд и современные представления / Коваленко Т. А., Пантелеев М.

A. // Биологические мембраны. – 2024. – Т. 41, № 5–6. – С. 427–447. – DOI: 10.31857/S0233475524050063.

10. Novelli E. M. Pulmonary embolism in sickle cell disease: a case-control study / Novelli E. M., Huynh C., Gladwin M. T., et al. // *J Thromb Haemost.* – 2012. – Vol. 10, no. 5. – Pp. 760–766. – DOI: 10.1111/J.1538-7836.2012.04697.X.

11. Schilling R. F. Delayed adverse vascular events after splenectomy in hereditary spherocytosis / Schilling R. F., Gangnon R. E., Traver M. I. // *J Thromb Haemost.* – 2008. – Vol. 6, no. 8. – Pp. 1289–1295. – DOI: 10.1111/J.1538-7836.2008.03024.X.

12. Hill A. Thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria / Hill A., Kelly R. J., Hillmen P. // *Blood.* – 2013. – Vol. 121, no. 25. – Pp. 4985–4996. – DOI: 10.1182/BLOOD-2012-09-311381.

13. Toss F. Association between hematocrit in late adolescence and subsequent myocardial infarction in Swedish men / Toss F., Nordström A., Nordström P. // *Int J Cardiol.* – 2013. – Vol. 168, no. 4. – Pp. 3588–3593. – DOI: 10.1016/J.IJCARD.2013.05.065.

14. Gagnon D. R. Hematocrit and the risk of cardiovascular disease--the Framingham study: a 34-year follow-up / Gagnon D. R., Zhang T. J., Brand F. N., Kannel W. B. // *Am Heart J.* – 1994. – Vol. 127, no. 3. – Pp. 674–682. – DOI: 10.1016/0002-8703(94)90679-3.

15. Danesh J. Haematocrit, viscosity, erythrocyte sedimentation rate: meta-analyses of prospective studies of coronary heart disease / Danesh J., Collins R., Peto R., Lowe G. D. O. // *Eur Heart J.* – 2000. – Vol. 21, no. 7. – Pp. 515–520. – DOI: 10.1053/EUHJ.1999.1699.

16. Goel R. Perioperative Transfusions and Venous Thromboembolism / Goel R., Josephson, C. D., Patel, E. U., et al. // *Pediatrics.* – 2020. – Vol. 145, no. 4. – DOI: 10.1542/PEDS.2019-2351.

17. Koch C. G. Duration of red-cell storage and complications after cardiac surgery / Koch C. G., Li, L., Sessler, D. I., et al. // *N Engl J Med.* – 2008. – Vol. 358, no. 12. – Pp. 1229–1239. – DOI: 10.1056/NEJMOA070403.

18. Zheng Y. N. Lactadherin and procoagulant activities of red blood cells in cyclosporine induced thrombosis / Zheng Y. N., Yu H. J., Hou J. X., et al. // *Chin Med J (Engl)*. – 2009. – Vol. 122, no. 14. – Pp. 1674–1680. – DOI: 10.3760/CMA.J.ISSN.0366-6999.2009.14.013.
19. Wesseling M. C. Phosphatidylserine Exposure in Human Red Blood Cells Depending on Cell Age / Wesseling M. C., Wagner-Britz, L., Huppert, H., et al. // *Cell Physiol Biochem*. – 2016. – Vol. 38, no. 4. – Pp. 1376–1390. – DOI: 10.1159/000443081.
20. Lang K. S. Mechanisms of suicidal erythrocyte death / Lang K. S., Lang, P. A., Bauer, C., et al. // *Cell Physiol Biochem*. – 2005. – Vol. 15, no. 5. – Pp. 195–202. – DOI: 10.1159/000086406.
21. Lang E. Triggers, inhibitors, mechanisms, and significance of eryptosis: the suicidal erythrocyte death / Lang E., Lang F. // *Biomed Res Int*. – 2015. – Vol. 2015. – DOI: 10.1155/2015/513518.
22. Dasgupta S. K. Lactadherin binding and phosphatidylserine expression on cell surface-comparison with annexin A5 / Dasgupta S. K., Guchhait P., Thiagarajan P. // *Transl Res*. – 2006. – Vol. 148, no. 1. – Pp. 19–25. – DOI: 10.1016/J.LAB.2006.03.006.
23. Uchida Y. Intracellular phosphatidylserine is essential for retrograde membrane traffic through endosomes / Uchida Y., Hasegawa, J., Chinnapen, D., et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2011. – Vol. 108, no. 38. – Pp. 15846–15851. – DOI: 10.1073/PNAS.1109101108.
24. Miyanishi M. Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor / Miyanishi M., Tada K., Koike M., et al. // *Nature*. – 2007. – Vol. 450, no. 7168. – Pp. 435–439. – DOI: 10.1038/NATURE06307.
25. Koltsova E. Engineered Fluorescent Variants of Lactadherin C2 Domain for Phosphatidylserine Detection in Flow Cytometry / Koltsova E., Avilova A., Nikolaeva E., et al. // *Biomolecules* 2025. – 2025. – Vol. 15, no. 5. – Pp. 673. – DOI: 10.3390/BIOM15050673.
26. Franco R. S. Changes in the properties of normal human red blood cells during in vivo aging / Franco R. S., Puchulu-Campanella, M. E., Barber, L. A., et al. // *Am J Hematol*. – 2013. – Vol. 88, no. 1. – Pp. 44. – DOI: 10.1002/AJH.23344.

27. Подоплелова Н. А. Свертывание крови в XXI веке: новые знания, методы и перспективы для терапии / Подоплелова Н. А., Сулимов В.Б., Тащилова А.С., и др. // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. – 2020. – Т. 19, № 1. – С. 139–157. – DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-139-157.
28. Podoplelova N. A. Hysteresis-like binding of coagulation factors X/Xa to procoagulant activated platelets and phospholipids results from multistep association and membrane-dependent multimerization / Podoplelova N. A. et al. // *Biochim Biophys Acta Biomembr.* – 2016. – Vol. 1858, no. 6. – Pp. 1216–1227. – DOI: 10.1016/j.bbamem.2016.02.008.
29. Leventis P. A. The distribution and function of phosphatidylserine in cellular membranes / Leventis P. A., Grinstein S. // *Annu Rev Biophys.* – 2010. – Vol. 39, no. 1. – Pp. 407–427. – DOI: 10.1146/ANNUREV.BIOPHYS.093008.131234/
30. Alghareeb S. A. Molecular Mechanisms and Pathophysiological Significance of Eryptosis / Alghareeb S. A., Alfihli M. A., Fatima S. // *Int J Mol Sci.* – 2023. – Vol. 24, no. 6. – Pp. 5079. – DOI: 10.3390/ijms24065079.
31. Dale G. L. Stimulated platelets use serotonin to enhance their retention of procoagulant proteins on the cell surface / Dale G. L., Friese, P., Batar, P., et al. // *Nature.* – 2002. – Vol. 415, no. 6868. – Pp. 175–179. – DOI: 10.1038/415175A.
32. Атауллаханов Ф. И. Эритроцит: мешок с гемоглобином или живая, активная клетка? / Атауллаханов Ф. И., Борсакова Д. В., Протасов Е. С., и др.// Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. – 2018. – Т. 17, № 1. – С. 108–116. – DOI: 10.24287/1726-1708-2018-17-1-108-116.
33. Чабин И.А. Цитофлуориметрический анализ свойств эритроцитной взвеси: результаты пилотного исследования / Чабин И.А., Подоплелова Н.А., Артеменко Е.О., и др.// Вопросы гематологии / онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2025. Т. 24, № 2. С. 98–104.
34. Dimitrov J. D. Heme: driver of erythrocyte elimination / Dimitrov J. D., Roumenina L. T. // *Blood.* – 2021. – Vol. 138, no. 13. – Pp. 1092–1094. – DOI: 10.1182/BLOOD.2021012875.

35. Li H. How the spleen reshapes and retains young and old red blood cells: A computational investigation / Li H., Liu Z. L., Lu L., et al. // *PLoS Comput Biol.* – 2021. – Vol. 17, no. 11. – Pp. 1–18. – DOI: 10.1371/JOURNAL.PCBI.1009516.
36. Mannucci P. M. Red cells playing as activated platelets in thalassemia intermedia / Mannucci P. M. // *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* – 2010. – Vol. 8, no. 10. – Pp. 2149–2151. – DOI: 10.1111/j.1538-7836.2010.04030.x.
37. Whelihan M. F. The role of the red cell membrane in thrombin generation / Whelihan M. F., Mann K. G. // *Thromb Res.* – 2013. – Vol. 131, no. 5. – Pp. 377–382. – DOI: 10.1016/J.THROMRES.2013.01.023.
38. Freikman I. Distribution and shedding of the membrane phosphatidylserine during maturation and aging of erythroid cells / Freikman I., Fibach E. // *Biochim Biophys Acta.* – 2011. – Vol. 1808, no. 12. – Pp. 2773–2780. – DOI: 10.1016/J.BBAMEM.2011.08.014.
39. Dasgupta S. K. Role of lactadherin in the clearance of phosphatidylserine-expressing red blood cells / Dasgupta S. K., Abdel-Monem H., Guchhait P., et al. // *Transfusion (Paris).* – 2008. – Vol. 48, no. 11. – Pp. 2370–2376. – DOI: 10.1111/J.1537-2995.2008.01841.X.
40. Dintenfass L. Inversion of the Fahraeus-Lindqvist phenomenon in blood flow through capillaries of diminishing radius / Dintenfass L. // *Nature.* – 1967. – Vol. 215, no. 5105. – Pp. 1099–1100. – DOI: 10.1038/2151099A0.
41. Baskurt O. K. Modulation of endothelial nitric oxide synthase expression by red blood cell aggregation / Baskurt O. K., Yalcin O., Ozdem S., et al. // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2004. – Vol. 286, no. 1. – DOI: 10.1152/AJPHEART.00532.2003.
42. Flamm M. H. Multiscale systems biology and physics of thrombosis under flow / Flamm M. H., Diamond S. L. // *Ann Biomed Eng.* – 2012. – Vol. 40, no. 11. – Pp. 2355–2364. – DOI: 10.1007/S10439-012-0557-9.
43. Lowe G. D. O. Blood viscosity and risk of cardiovascular events: the Edinburgh Artery Study / Lowe G. D. O., Lee A. J., Rumley A., et al. // *Br J Haematol.* – 1997. – Vol. 96, no. 1. – Pp. 168–173. – DOI: 10.1046/J.1365-2141.1997.8532481.X.

44. Rampling M. W. The binding of fibrinogen and fibrinogen degradation products to the erythrocyte membrane and its relationship to haemorheology. / Rampling M. W. // *Acta Biol Med Ger.* – 1981. – Vol. 40, no. 4–5. – Pp. 373–378.
45. Byrnes J. R. Red blood cells in thrombosis / Byrnes J. R., Wolberg A. S. // *Blood.* – 2017. – Vol. 130, no. 16. – Pp. 1795–1799. – DOI: 10.1182/BLOOD-2017-03-745349.
46. Pries A. R. Blood viscosity in tube flow: dependence on diameter and hematocrit / Pries A. R., Neuhaus D., Gaehtgens P. // *Am J Physiol.* – 1992. – Vol. 263, no. 6 Pt 2. – DOI: 10.1152/AJPHEART.1992.263.6.H1770.
47. Lanotte L. Red cells' dynamic morphologies govern blood shear thinning under microcirculatory flow conditions / Lanotte L., Mauer, J., Mendez, S., et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2016. – Vol. 113, no. 47. – Pp. 13289–13294. – DOI: 10.1073/PNAS.1608074113.
48. Piety N. Z. Shape matters: the effect of red blood cell shape on perfusion of an artificial microvascular network / Piety N. Z., Reinhart W. H., Pourreau P. H., et al. // *Transfusion (Paris).* – 2016. – Vol. 56, no. 4. – Pp. 844–851. – DOI: 10.1111/TRF.13449.
49. Morel O. Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles / Morel O., Jesel L., Freyssinet J. M., Toti F. // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2011. – Vol. 31, no. 1. – Pp. 15–26. – DOI: 10.1161/ATVBAHA.109.200956.
50. Leal J. K. F. Red blood cell homeostasis: Mechanisms and effects of microvesicle generation in health and disease / Leal J. K. F., Adjobo-Hermans M. J. W., Bosman G. J. C. G. M. // *Front Physiol.* – 2018. – Vol. 9, no. JUN. – Pp. 703. – DOI: 10.3389/FPHYS.2018.00703/.
51. van der Meijden P. E. J. Platelet- and erythrocyte-derived microparticles trigger thrombin generation via factor XIIa / van der Meijden P. E. J., van Schilfgaarde M., van Oerle R., Renné T., et al. // *J Thromb Haemost.* – 2012. – Vol. 10, no. 7. – Pp. 1355–1362. – DOI: 10.1111/J.1538-7836.2012.04758.X.
52. Allan D. Release of spectrin-free spicules on reoxygenation of sickled erythrocytes / Allan D., Limbrick A. R., Thomas P., Westerman M. P. // *Nature.* – 1982. – Vol. 295, no. 5850. – Pp. 612–613. – DOI: 10.1038/295612A0.

53. Forest A. Circulating microparticles and procoagulant activity in elderly patients / Forest A., Pautas, E., Ray, P., et al. // *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* – 2010. – Vol. 65, no. 4. – Pp. 414–420. – DOI: 10.1093/GERONA/GLP187.
54. Zecher D. Erythrocyte-derived microvesicles amplify systemic inflammation by thrombin-dependent activation of complement / Zecher D., Cumpelik A., Schifferli J. A. // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2014. – Vol. 34, no. 2. – Pp. 313–320. – DOI: 10.1161/ATVBAHA.113.302378.
55. Kim Y. Microparticles from aged packed red blood cell units stimulate pulmonary microthrombus formation via P-selectin / Kim Y., Goodman, M. D., Jung, A. D., et al. // *Thromb Res.* – 2020. – Vol. 185. – Pp. 160–166. – DOI: 10.1016/J.THROMRES.2019.11.028.
56. Klatt C. Platelet-RBC interaction mediated by FasL/FasR induces procoagulant activity important for thrombosis / Klatt C., Krüger, I., Zey, S., et al. // *Journal of Clinical Investigation.* – 2018. – Vol. 128, no. 9. – Pp. 3906–3925. – DOI: 10.1172/JCI92077.
57. Vallés J. Platelet-erythrocyte interactions enhance α IIB β 3 integrin receptor activation and P-selectin expression during platelet recruitment: Down-regulation by aspirin ex vivo / Vallés J., Santos, M. T., Aznar, J., et al. // *Blood.* – 2002. – Vol. 99, no. 11. – Pp. 3978–3984. – DOI: 10.1182/blood.V99.11.3978.
58. Hermand P. Red cell ICAM-4 is a novel ligand for platelet-activated α IIB β 3 integrin / Hermand P., Gane, P., Huet, M., et al. // *Journal of Biological Chemistry.* – 2003. – Vol. 278, no. 7. – Pp. 4892–4898. – DOI: 10.1074/jbc.M211282200.
59. Reimers R. Potentiation by Red Blood Cells of Shear-Induced Platelet Aggregation: Relative Importance of Chemical and Physical Mechanisms / Reimers R., Sutera S., Joist J. // *Blood.* – 1984. – Vol. 64, no. 6. – Pp. 1200–1206. – DOI: 10.1182/BLOOD.V64.6.1200.1200.
60. Nakai K. Inhibition of endothelium-dependent relaxation by hemoglobin in rabbit aortic strips: comparison between acellular hemoglobin derivatives and cellular hemoglobins / Nakai K., Ohta, T., Sakuma, I., et al. // *J Cardiovasc Pharmacol.* – 1996. – Vol. 28, no. 1. – Pp. 115–123. – DOI: 10.1097/00005344-199607000-00018.

61. Schnog J. J. B. Evidence for a metabolic shift of arginine metabolism in sickle cell disease / Schnog J. J. B., Jager, E. H., van der Dijks, F. P., et al. // *Ann Hematol.* – 2004. – Vol. 83, no. 6. – Pp. 371–375. – DOI: 10.1007/S00277-004-0856-9.

62. Rother R. P. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease / Rother R. P., Bell L., Hillmen P., Gladwin M. T. // *JAMA.* – 2005. – Vol. 293, no. 13. – Pp. 1653–1662. – DOI: 10.1001/JAMA.293.13.1653.

63. Owen J. S. Decreased erythrocyte membrane fluidity and altered lipid composition in human liver disease. / Owen J. S., Bruckdorfer K. R., Day R. C., McIntyre N. // *J Lipid Res.* – 1982. – Vol. 23, no. 1. – Pp. 124–132. – DOI: 10.1016/S0022-2275(20)38181-5.

64. Crawford N. Structural and Molecular Properties of Platelet Membrane Systems / Crawford N. // *Platelet Membrane Glycoproteins.* – 1985. – Pp. 13–49. – DOI: 10.1007/978-1-4684-4880-1_2.

65. Shi J. Lactadherin detects early phosphatidylserine exposure on immortalized leukemia cells undergoing programmed cell death / Shi J., Shi Y., Waehrens L. N., Rasmussen J. T., Heegaard C. W., Gilbert G. E. // *Cytometry A.* – 2006. – Vol. 69, no. 12. – Pp. 1193–1201. – DOI: 10.1002/CYTO.A.20345.

66. Whelihan M. F. Prothrombin activation in blood coagulation: the erythrocyte contribution to thrombin generation / Whelihan M. F., Zachary V., Orfeo T., Mann K. G. // *Blood.* – 2012. – Vol. 120, no. 18. – Pp. 3837–3845. – DOI: 10.1182/BLOOD-2012-05-427856.

67. Stojanovski B. M. Enhancing the anticoagulant profile of meizothrombin / Stojanovski B. M., Pelc L. A., Zuo X., Pozzi N., Di Cera E. // *Biomol Concepts.* – 2018. – Vol. 9, no. 1. – Pp. 169–175. – DOI: 10.1515/BMC-2018-0016.

68. Iwata H. Purification, identification, and characterization of elastase on erythrocyte membrane as factor IX-activating enzyme / Iwata H. et al. // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2004. – Vol. 316, no. 1. – Pp. 65–70. – DOI: 10.1016/J.BBRC.2004.02.020.

69. Чумакова С. П. Особенности физиологии эритроцитов. Гемолиз и эриптоз / Чумакова С. П., Уразова О. И., Зима А. П., Новицкий В. В. // Гематология и трансфузиология. – 2018. – Т. 63, № 4. – С. 343–351.
70. Föller M. Ion Transport in Eryptosis, the Suicidal Death of Erythrocytes / Föller M., Lang F. // *Front Cell Dev Biol.* – 2020. – Vol. 8. – Pp. 597. – DOI: 10.3389/FCELL.2020.00597.
71. Nicolay J. Stimulation of Suicidal Erythrocyte Death by Methylglyoxal / Nicolay J., Schneider, J., Niemoeller, O. M., et al. // *Cellular Physiology and Biochemistry.* – 2006. – Vol. 18, no. 4–5. – Pp. 223–232. – DOI: 10.1159/000097669.
72. Attanasio P. Enhanced suicidal erythrocyte death in acute cardiac failure / Attanasio P., Bissinger, R., Haverkamp, W., et al. // *Eur J Clin Invest.* – 2015. – Vol. 45, no. 12. – Pp. 1316–1324. – DOI: 10.1111/ECI.12555.
73. Solá E. Erythrocyte membrane phosphatidylserine exposure in obesity / Solá E., Vayá, A., Martínez, M., et al. // *Obesity (Silver Spring).* – 2009. – Vol. 17, no. 2. – Pp. 318–322. – DOI: 10.1038/OBY.2008.499.
74. Jiang P. Eryptosis as an Underlying Mechanism in Systemic Lupus Erythematosus-Related Anemia / Jiang P., Bian, M., Ma, W., et al. // *Cell Physiol Biochem.* – 2016. – Vol. 40, no. 6. – Pp. 1391–1400. – DOI: 10.1159/000453191.
75. Abioye A. I. Anemia of Inflammation during Human Pregnancy Does Not Affect Newborn Iron Endowment / Abioye A. I., Park, S., Ripp, K., et al. // *J Nutr.* – 2018. – Vol. 148, no. 3. – Pp. 427–436. – DOI: 10.1093/JN/NXX052.
76. Hojs N. V. Oxidative Stress Markers in Chronic Kidney Disease with Emphasis on Diabetic Nephropathy / Hojs N. V., Bevc S., Ekart R., Hojs R. // *Antioxidants* 2020. – 2020. – Vol. 9, no. 10. – Pp. 925. – DOI: 10.3390/ANTIOX9100925.
77. Pinzón-Díaz C. E. Eryptosis and oxidative damage in hypertensive and dyslipidemic patients / Pinzón-Díaz C. E., Calderón-Salinas, J. V., Rosas-Flores, M. M., et al. // *Mol Cell Biochem.* – 2018. – Vol. 440, no. 1–2. – Pp. 105–113. – DOI: 10.1007/S11010-017-3159-X.

78. Song P. Enhanced phosphatidylserine exposure and erythropoiesis in *Babesia microti*-infected mice / Song P., Cai, Y. C., Chen, M. X., et al. // *Front Microbiol.* – 2023. – Vol. 13, no. 1083467. – Pp. 1–9. – DOI: 10.3389/FMICB.2023.1083467.
79. Föller M. Suicide for Survival - Death of Infected Erythrocytes as a Host Mechanism to Survive Malaria / Föller M., Bobbala, D., Koka, S., et al. // *Cellular Physiology and Biochemistry.* – 2009. – Vol. 24, no. 3–4. – Pp. 133–140. – DOI: 10.1159/000233238.
80. Boulet C. Manipulating Eryptosis of Human Red Blood Cells: A Novel Antimalarial Strategy? / Boulet C., Doerig C. D., Carvalho T. G. // *Front Cell Infect Microbiol.* – 2018. – Vol. 8, no. 419. – Pp. 1–18. – DOI: 10.3389/FCIMB.2018.00419.
81. Bartolmäs T. Eryptosis in autoimmune haemolytic anaemia / Bartolmäs T., Mayer B., Balola A. H., Salama A. // *Eur J Haematol.* – 2018. – Vol. 100, no. 1. – Pp. 36–44. – DOI: 10.1111/EJH.12976.
82. Basu S. Eryptosis in hereditary spherocytosis and thalassemia: role of glycoconjugates / Basu, S., Banerjee, D., Chandra, S., Chakrabarti, A.. // *Glycoconj J.* – 2010. – Vol. 27, no. 7–9. – Pp. 717–722. – DOI: 10.1007/S10719-009-9257-6.
83. Богданов А. Н. Гемолитические анемии / Богданов А. Н., Мазуров В. И. // *Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. И. И. Мечникова.* – 2011. – Т. 3, № 3. – С. 107–114.
84. Haley K. Congenital Hemolytic Anemia / Haley K. // *Med Clin North Am.* – 2017. – Vol. 101, no. 2. – Pp. 361–374. – DOI: 10.1016/J.MCNA.2016.09.008.
85. Iolascon A. Recommendations regarding splenectomy in hereditary hemolytic anemias / Iolascon A., Andolfo, I., Barcellini, W., et al. // *Haematologica.* – 2017. – Vol. 102, no. 8. – Pp. 1304–1313. – DOI: 10.3324/HAEMATOL.2016.161166.
86. Troendle S. B. Laboratory markers of thrombosis risk in children with hereditary spherocytosis / Troendle, S. B., Adix, L., Crary, S. E., Buchanan, G. R. // *Pediatr Blood Cancer.* – 2007. – Vol. 49, no. 6. – Pp. 781–785. – DOI: 10.1002/PBC.21319.

87. Rothman J. A. How I approach hereditary hemolytic anemia and splenectomy / Rothman, J. A., Stevens, J. L., Gray, F. L., Kalfa, T. A. // *Pediatr Blood Cancer*. – 2020. – Vol. 67, no. 11. – Pp. 1–8. – DOI: 10.1002/PBC.28337.

88. Bolton-Maggs P. H. B. Guidelines for the diagnosis and management of hereditary spherocytosis – 2011 update / Bolton-Maggs P. H. B., Langer, J. C., Iolascon, A., et al. // *Br J Haematol*. – 2012. – Vol. 156, no. 1. – Pp. 37–49. – DOI: 10.1111/J.1365-2141.2011.08921.X.

89. Bolton-Maggs P. H. B. Guidelines for the diagnosis and management of hereditary spherocytosis / Bolton-Maggs P. H. B., Langer, J. C., Iolascon, A., et al. // *Br J Haematol*. – 2004. – Vol. 126, no. 4. – Pp. 455–474. – DOI: 10.1111/J.1365-2141.2004.05052.X.

90. Румянцев А. Г. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению наследственного сфероцитоза / Румянцев А. Г., Масчан А. А. // Национальное общество детских гематологов онкологов России. – 2014.

91. Бурцева Е. А. Клиническое наблюдение наследственного сфероцитоза у пожилого пациента / Бурцева Е. А., Снежко И. В., Нагорная Г. Ю., Шатохин Ю. В. // *Южно-Российский журнал терапевтической практики*. – 2021. – Т. 2, № 2. – С. 100–103. – DOI: 10.21886/2712-8156-2021-2-2-100-103.

92. Crary S. E. Vascular complications after splenectomy for hematologic disorders / Crary S. E., Buchanan G. R. // *Blood*. – 2009. – Vol. 114, no. 14. – Pp. 2861–2868. – DOI: 10.1182/BLOOD-2009-04-210112.

93. Schilling R. F. Arteriosclerotic events are less frequent in persons with chronic anemia: evidence from families with hereditary spherocytosis / Schilling R. F., Gangnon R. E., Traver M. // *Am J Hematol*. – 2006. – Vol. 81, no. 5. – Pp. 315–317. – DOI: 10.1002/AJH.20566.

94. Morita T. Heme oxygenase and atherosclerosis / Morita T. // *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. – 2005. – Vol. 25, no. 9. – Pp. 1786–1795. – DOI: 10.1161/01.ATV.0000178169.95781.49.

95. Colin Y. Red cell adhesion in human diseases / Colin Y., Le Van Kim C., El Nemer W. // *Curr Opin Hematol.* – 2014. – Vol. 21, no. 3. – Pp. 186–192. – DOI: 10.1097/MOH.0000000000000036.
96. Черняк Е. А. Молекулярно-генетическая диагностика и эффективность различных опций терапии дефицита пируваткиназы у детей : дис. канд. мед. наук / Черняк Е. А. // ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России. На правах рукописи. – 2021.
97. Пантлеев М. А. Тромбоциты и гемостаз / Пантлеев М. А., Свешникова А. Н. // *Онкогематология.* – 2014. – Т. 9, № 2. – С. 65–73.
98. Podoplelova N. A. Blood coagulation factors bound to procoagulant platelets are concentrated in their cap structures to promote clotting. / Podoplelova N. A., veshnikova, A. N., Kotova, Y. N., et al. // *Blood.* – 2016. – Vol. 128, no. 13. – Pp. 1745–1756. – DOI: 10.1182/blood-2016-02-696898.
99. Попов А. М. Результаты внешнего контроля качества диагностики острого лимфобластного лейкоза методом проточной цитометрии / Попов А.М., Вержбицкая Т.Ю., Зуева Е.Е., и др. // *Онкогематология.* – 2016. – Т. 11, № 3. – С. 68–75. – DOI: 10.17650/1818-8346-2016-11-3-68-75.
100. Балалаева И. В. Проточная цитофлуориметрия: учебно-методическое пособие / Балалаева И. В. // Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского. – 2014.
101. Pessach I. MRD Monitoring by Multiparametric Flow Cytometry in AML: Is It Time to Incorporate Immune Parameters? / Pessach I., Spyropoulos T., Lamprianidou E., Kotsianidis I. // *Cancers (Basel).* – 2022. – Vol. 14, no. 17. – Pp. 4294. – DOI: 10.3390/CANCERS14174294.
102. Lang E. Storage of erythrocytes induces suicidal erythrocyte death / Lang E., Pozdeev, V. I., Xu, H. C., et al. // *Cellular Physiology and Biochemistry.* – 2016. – Vol. 39, no. 2. – Pp. 668–676. – DOI: 10.1159/000445657.
103. Jemaà M. Methods Employed in Cytofluorometric Assessment of Eryptosis, the Suicidal Erythrocyte Death / Jemaà M., Fezai M., Bissinger R., Lang F. // *Cellular*

Physiology and Biochemistry. – 2017. – Vol. 43, no. 2. – Pp. 431–444. – DOI: 10.1159/000480469.

104. Eisele K. Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by mercury ions / Eisele K., Lang, P. A., Kempe, D. S., et al. // *Toxicol Appl Pharmacol.* – 2006. – Vol. 210, no. 1–2. – Pp. 116–122. – DOI: 10.1016/j.taap.2005.07.022.

105. Ignatova A. A. Flow cytometry for pediatric platelets / Ignatova A. A., Ponomarenko, E. A., Polokhov, D. M., et al. // *Platelets.* – 2019. – Vol. 30, no. 4. – Pp. 428–437. – DOI: 10.1080/09537104.2018.1513473.

106. Ignatova A. A. Evolution of platelet function in adult patients with chronic immune thrombocytopenia on romiplostim treatment / Ignatova A. A., Demina, I. A., Ptushkin, V. V., et al. // Blackwell Publishing Ltd. – 2019. – DOI: 10.1111/bjh.16164.

107. Nguyen D. B. Regulation of phosphatidylserine exposure in red blood cells / Nguyen D. B., Wagner-Britz, L., Maia, S., et al. // *Cell Physiol Biochem.* – 2011. – Vol. 28, no. 5. – Pp. 847–856. – DOI: 10.1159/000335798.

108. Чабин И.А. Детекция фосфатидилсерин-экспрессирующих эритроцитов в цельной крови / Чабин И.А., Подоплелова Н.А., Кольцова Е.М., и др. // *Вопросы гематологии / онкологии и иммунопатологии в педиатрии.* 2025. Т. 24, № 2. С. 75–80.

109. Schindelin J. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis / Schindelin J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., et al. // *Nature Methods* 2012 9:7. – 2012. – Vol. 9, no. 7. – Pp. 676–682. – DOI: 10.1038/nmeth.2019.

110. Обыденный С. И. Селективное обогащение популяции редких клеток костного мозга для электронной микроскопии / Обыденный С. И., Кузнецова С.А., Федянина О.С., и др. // *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии.* – 2024. – Т. 24, № 1. – С. 133–137.

111. Fens M. H. A. M. Angiogenic endothelium shows lactadherin-dependent phagocytosis of aged erythrocytes and apoptotic cells / Fens M. H. A. M., Mastrobattista, E., de Graaff, A. M., et al. // *Blood.* – 2008. – Vol. 111, no. 9. – Pp. 4542–4550. – DOI: 10.1182/BLOOD-2007-06-094763.

112. Pulliam K. E. Washing packed red blood cells decreases red blood cell storage lesion formation / Pulliam K. E., Joseph, B., Makley, A. T., et al. // *Surgery*. – 2021. – Vol. 169, no. 3. – Pp. 666–670. – DOI: 10.1016/J.SURG.2020.07.022.

113. Lu C. Procoagulant activity of long-term stored red blood cells due to phosphatidylserine exposure / Lu C., Shi J., Yu H., Hou J., Zhou J. // *Transfus Med*. – 2011. – Vol. 21, no. 3. – Pp. 150–157. – DOI: 10.1111/J.1365-3148.2010.01063.X.

114. Peltier S. Proteostasis and metabolic dysfunction characterize a subset of storage-induced senescent erythrocytes targeted for posttransfusion clearance / Peltier S., Marin, M., Dzieciatkowska, M., et al. // *J Clin Invest*. – 2025. – Vol. 135, no. 9. – Pp. 1–14. – DOI: 10.1172/JCI183099.

115. Panteleev M. A. Task-Oriented modular decomposition of biological networks: Trigger mechanism in blood coagulation / Panteleev M. A., Balandina A. N., Lipets E. N., et al. // *Biophys J*. – 2010. – Vol. 98, no. 9. – Pp. 1751–1761. – DOI: 10.1016/j.bpj.2010.01.027.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубокую благодарность своим научным руководителям, Пантелееву Михаилу Александровичу и Сметаниной Наталии Сергеевне, за плодотворные дискуссии, руководство и предоставленные возможности.

Особая признательность выражается Подоплеловой Надежде Александровне за помощь в овладении методами, ценные замечания при оформлении статей и плодотворные дискуссии и помощь.

Выражается искренняя благодарность коллективу врачей, научных сотрудников и медицинских сестер ФГБУ «НМИЦ ДГОИ имени Дмитрия Рогачева» Минздрава России за предоставленные клинические данные и поддержку в исследовательской деятельности.

Выражается благодарность и признательность всем бывшим и действующим коллегам по лаборатории клеточного гемостаза, а также коллегам из ЦТП ФХФ РАН, которые помогали в осуществлении этой и других работ. Отдельно, хочется поблагодарить Артеменко Елену Олеговну, Бовт Елизавету Андреевну, Бутова Кирилла Романовича, Кольцову Екатерину Михайловну, Обыденного Сергея Ивановича, Шахиджанова Сослана Сергеевича, Юшкову Евгению Вячеславовну благодаря которым, эта работа была завершена.

Отдельная благодарность адресуется тем, кто поддерживал меня во время выполнения данной работы – Чередановой Виктории Романовне, Чабиной Оксане Валерьевне, Чабину Даниилу Андреевичу и, наконец, Чабину Андрею Викторовичу.