

Левин Г.Я., Сухарева Е.Г., Егорихина М.Н.

О роли микровезикуляции эритроцитов и гликирования гемоглобина в гемореологических нарушениях при ожоговой болезни

ФГБУ «Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр» Минздрава России, 603155, г. Нижний Новгород, Верхневолжская набережная, д. 18/1

Введение. Гемореологические нарушения играют важную роль в патогенезе острого периода ожоговой болезни. Механизм этих нарушений остается мало изученным. В частности, неизвестна роль гликирования гемоглобина, а также микровезикуляции эритроцитов в снижении их деформируемости после термической травмы. **Методика.** Исследование проведено на 30 образцах крови больных в острый период ожоговой болезни и 40 образцах крови здоровых людей. Оценка количества и стандартизация концентрации эритроцитарных микровезикул проводилась на проточном цитофлуориметре после их осаждения с помощью ультрацентрифугирования при 100000g, в течение 60 мин. Электрофоретическую подвижность эритроцитов определяли в специальной камере оптической кюветы, в поле зрения светового микроскопа. Деформируемость эритроцитов оценивали по степени их вытяжения в искусственном сдвиговом потоке. **Результаты и обсуждение.** Установлено, что содержание HbA_{1c} в эритроцитах ожоговых больных оказалось почти в два раза более высоким, чем в норме. В опытах *in vitro* подтвердилось зависимость деформируемости эритроцитов от степени гликирования Hb. Гликирование Hb приводит к повышению ригидности эритроцитов также путем увеличения их микровезикуляции. Число выделяющихся из эритроцитов ожоговых больных микровезикул в 3,47 раза превышает норму. Важной причиной микровезикуляции является дестабилизация липидного комплекса мембраны эритроцитов, которая сопровождается повышением отрицательного заряда эритроцитов. Можно заключить, что гликирование Hb и перераспределение фосфолипидов мембраны эритроцитов являются важными причинами усиления их микровезикуляции и сопровождаются снижением деформируемости эритроцитов после термической травмы.

Ключевые слова: эритроциты; микровезикулы; ожоговая болезнь; электрофоретическая подвижность эритроцитов; гликированный гемоглобин; деформируемость эритроцитов.

Для цитирования: Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2015; 59(4): 21-25.

Levin G.Ya., Sukhareva E.G., Egorihina M.N.

The role of erythrocyte microvesiculation and hemoglobin glycation in hemorheological disorders during burn injury

Federal State Budgetary Institution «Privolzhsky Federal Research Medical Centre» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 18/1, Verhne-Volzhsкая nab., 603155, Nizhny Novgorod, Russia

Introduction. Hemorheological disorders play an important part in pathogenesis of acute period of burn injury. This mechanism remains practically unstudied. Thus, unknown is the role of hemoglobin glycation and erythrocyte microvesiculation in the decrease in erythrocyte deformability after thermal trauma. **Methods.** Research was performed on 30 blood samples of burn patients in the acute period and 40 blood samples of healthy donors. The number of erythrocyte-derived microvesicles was determined by flow cytometry and then standardized in the samples; the microvesicles were preliminarily separated by ultracentrifugation at 100000g, for 60 minutes. Electrophoretic mobility of erythrocytes was measured in a processing chamber of the optical cuvette under the light microscope. Deformability of erythrocytes was assessed by the level of their extension in the artificial shear flow. **Results.** It was found that the amount of HbA_{1c} in red blood cells of burn patients demonstrated a 2-fold increase compared to healthy donors. In the experiments *in vitro* it was proved that deformability of erythrocytes correlates with the level of hemoglobin glycation. Hb glycation leads to the increased rigidity of erythrocytes also by increasing their microvesiculation. The number of microvesicles derived from red blood cells of burn patients demonstrated a 3.47-fold increase compared to healthy donors. An important reason for microvesiculation is the destabilization of lipid complex of erythrocyte membrane, which is accompanied by the increase in

Для корреспонденции: Левин Григорий Яковлевич, заслуженный деятель науки РФ, доктор мед. наук, проф., руководитель отделения гравитационной хирургии и гемодиализа, e-mail: levin@unn.ac.ru

the erythrocyte negative charge. It can be concluded that Hb glycation and redistribution of erythrocyte membrane phospholipids are the important reasons for the increase erythrocyte microvesiculation and are accompanied by the decrease in erythrocyte deformability after thermal trauma.

Keywords: erythrocytes; microvesicles; burn injury; electrophoretic mobility of erythrocytes; glycated hemoglobin; erythrocyte deformability.

For citation: *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya. 2015; 59(4): 21-25.*

For correspondence: Levin G.Ya., e-mail: levin@unn.ac.ru

В патогенезе ожоговой болезни важную роль играют нарушения реологических свойств крови, прежде всего — деформируемости эритроцитов [1, 2]. Она обуславливается такими факторами, как внутренней вязкостью (концентрацией внутриклеточного Hb), эластическими и вязкостными свойствами мембраны, которые также в определенной степени связаны с наличием в ней Hb, особенно его гликированной формы, клеточной геометрией эритроцитов [3, 4]

Ряд факторов, ухудшающих деформируемость эритроцитов при ожоговой болезни, остается практически неизученным. Прежде всего, это относится к роли гликированного гемоглобина (HbA_{1c}) в деформируемости эритроцитов после термической травмы. Известно, что HbA_{1c} увеличивает внутриклеточную вязкость красных клеток крови. Кроме того, HbA_{1c} участвует в мембранной организации эритроцитов, о чем свидетельствует, в частности, феномен образования серповидной и других форм эритроцитов при различных гемоглобинопатиях. Лишь в последние годы стал исследоваться вопрос о роли микроvesикуляции эритроцитов в изменениях их деформируемости [5, 6]. С одной стороны, образующиеся микроvesикулы (МВ) могли бы удалять HbA_{1c} с мембран эритроцитов, но с другой — нарушать соотношение площади поверхности и объема эритроцита и, тем самым, снижать их способность к деформации. Эта проблема практически не исследовалась при ожоговой болезни, также как и вопрос об активности микроvesикуляции эритроцитов после термической травмы.

Целью настоящего исследования являлось изучение содержания HbA_{1c} в эритроцитах, их мембранах и образующихся из них МВ в ранний период ожоговой болезни, активности процесса микроvesикуляции эритроцитов и связи его с отрицательным зарядом красных клеток крови.

Методика

Исследование проведено на 30 образцах крови больных в острый период ожоговой болезни (ожог II—III степени, более 20% поверхности тела, в возрасте от 18 до 65 лет) и 40 образцах крови здоровых людей. Кровь стабилизировали 3,8% раствором цитрата натрия в соотношении 9:1, и центрифугировали 20 мин при 3000 об/мин. После этого отделяли бес-

тромбоцитарную плазму, удаляли лейкоцитарно-тромбоцитарную пленку и выделяли эритроцитарную массу. Последнюю трижды отмывали в физиологическом растворе, а затем ресуспензировали в трис-HCl буфере (рН 7,4) в соотношении 2:1 и инкубировали при 37°C в течение 24 часов. В процессе хранения отмывтых эритроцитов происходит накопление МВ [7]. После инкубации эритроциты осаждали с помощью центрифугирования в течение 20 мин при 3000 об/мин, затем надосадочную жидкость, согласно методике Dey-Hazra [8], очищали от клеточного дегриса.

Оценка количества и стандартизация концентрации эритроцитарных микроvesикул (эМВ) проводилась на проточном цитофлюориметре Navios/Gallios (Beckman Coulter, США), после их предварительного осаждения с помощью ультрацентрифугирования на центрифуге Sorvall MX 150 Micro-Ultracentrifuge (Thermo Scientific, США) при 100000g, в течение 60 мин [9]. Стандартизация числа эМВ в пробах проводилась путем разбавления образцов и доведения количества МВ до 5000 ± 512 в мкл.

После 24 часовой инкубации из эритроцитов выделяли их мембраны, следующим образом: 0,5 мл эритроцитов гемолизировали в 1,5 мл дистиллированной воды и центрифугировали при 21380 g в течение 20 мин. Затем надосадочную жидкость удаляли, вновь добавляли 1,5 мл дистиллированной воды, в ней ресуспензировали осадок и центрифугировали при тех же параметрах. Отмывание мембран от Hb повторяли 9 раз, пока надосадочная жидкость не становилась прозрачной.

Количество HbA_{1c} в эритроцитах, их мембранах и МВ определяли с помощью набора «Гликогемотест» («ЭЛТА», Россия) согласно инструкции. Содержание HbA_{1c} как в самих красных клетках крови, так и в их мембранах, а также в выделенных из них МВ выражали как в абсолютных величинах (в г/л), так и в процентах от общего Hb.

Количество Hb в эритроцитах, мембранах и МВ определяли гемихромным методом: 0,02 мл эритроцитарной массы, мембран или МВ растворяли в 5 мл раствора SDS (0,06%). Через 20 мин после полного растворения регистрировали оптическую плотность при λ = 540 нм на спектрофотометре Spekol UV VIS (Zeiss, Германия).

Электрофоретическую подвижность эритроцитов (ЭФПЭ) определяли следующим образом: 40 мкл 0,1% суспензии эритроцитов в трис-НСl буфере (рН 7,4), помещали в рабочую камеру оптической кюветы на предметном столике микроскопа, в которую опускали Ag/AgCl-электроды. Наблюдение за движением клеток вели при +25°C и силе тока 8 мА в поле зрения светового микроскопа, измеряя время прохождения клеткой расстояния 10 мкм. Фиксировали перемещение 10 клеток. Вычисляли среднее значение. Величину ЭФПЭ определяли по формуле:

$$U = S/TH,$$

где:

S — расстояние, на которое перемещалась клетка;

T — время перемещения клетки на расстояние S;

H — градиент потенциала.

Величину градиента потенциала определяли по формуле:

$$H = I/g\chi,$$

где:

I — сила тока;

g — поперечное сечение камеры;

χ — удельная электропроводимость среды.

Кроме того, исследовали влияние гликирования Hb на деформируемость эритроцитов в опытах *in vitro*. Эритроцитарную массу, приготовленную и отмытую описанным выше способом, разделяли на 2 части. В одну часть добавляли трис-НСl буфер (рН 7,4), а во вторую часть — раствор глюкозы в трис-НСl буфере (рН 7,4) с концентрацией 100 ммоль/л, в соотношении 1:3. Смеси инкубировали при 4°C в течение 20 часов. После инкубации эритроцитарную массу дважды отмывали физиологическим раствором с помощью центрифугирования в течение 20 мин при 3000 об./мин. Количество HbA_{1c} в эритроцитах определяли описанным выше способом.

Деформируемость эритроцитов определяли с помощью ригидометра [10]. Принцип действия его заключался в следующем: суспензия эритроцитов помещалась между двумя коаксиальными цилиндрами, создавался ламинарный поток, в котором эритроциты деформировались (вытягивались) и фиксировались в этом положении с помощью 0,8% раствора глютаральдегида. В поле зрения светового микроскопа подсчитывали количество деформированных (вытянутых) и недеформированных эритроцитов. Степень деформируемости эритроцитов выражалась в процентном отношении деформированных клеток к недеформированным.

Результаты исследований обработаны с использованием методов непараметрической статистики с при-

менением критерия парных сравнений Вилкоксона при помощи пакета прикладных программ Statistica 6.0.

Результаты и обсуждение

Как показали проведенные исследования, содержание HbA_{1c} в эритроцитах ожоговых больных, выраженное как в процентах от Hb, так и в г/л, оказалось значительно более высоким, чем в эритроцитах здоровых доноров. При этом после 24 часов хранения отмытых эритроцитов при 37°C, содержание HbA_{1c} в красных клетках крови, как здоровых доноров, так и ожоговых больных, снижалось в среднем на 34% (HbA_{1c} выраженный в процентах) и на 22% (HbA_{1c} выраженный в г/л) (табл. 1). Снижение концентрации HbA_{1c} в эритроцитах и их мембранах в процессе инкубации в условиях нашего эксперимента связано, вероятнее всего, с отсутствием глюкозы в составе трис-НСl буфера, в котором хранились красные клетки крови.

Установлено, что после 24 часов инкубации эритроцитов здоровых доноров содержание в их мембранах HbA_{1c}, выраженное в г/л, нарастало, причем в мембранах, эритроцитов ожоговых больных — в меньшей степени (табл. 1).

Кроме этого, изучали содержание HbA_{1c} в МВ, выделенных из эритроцитов после 24-часовой инкубации эритроцитов. Установлено, что концентрация HbA_{1c} в эМВ ожоговых больных значительно выше, чем в эМВ здоровых доноров, причем как в абсолютных величинах, так и в процентах от общего Hb (табл. 1).

В исследованиях ЭФПЭ при ожоговой болезни установлено, что она была в 1,8 раза выше, чем ЭФПЭ здоровых доноров (табл. 2). После 24-часовой инкубации эритроцитов ЭФП снижалась, однако при ожоговой болезни ее уровень оставался выше контроля на 51%.

Как показали результаты опытов *in vitro*, количество HbA_{1c} в эритроцитах после инкубации с глюкозой в течение 20 часов увеличивалось и приближалось к значению HbA_{1c} в эритроцитах ожоговых больных. Было установлено, что деформируемость эритроцитов при этом значительно снижалась. Если количество вытянутых (деформированных) эритроцитов, выделенных из крови здоровых доноров, составляло после 20-часовой инкубации в среднем 50,0 ± 3,6%, то после инкубации эритроцитов с глюкозой количество, вытянутых в искусственном сдвиговом потоке клеток снижалось до 31,2 ± 2,4%.

Как свидетельствуют литературные данные, при ожоговой болезни, особенно в ее ранний период, значительно ухудшается микроциркуляция, важнейшей причиной чего является снижение деформируемости

эритроцитов [11]. Нами установлено, что в повышении ригидности эритроцитов после термической травмы важную роль играет увеличение содержания в эритроцитах HbA_{1c} . Это согласуется с данными литературы о том, что снижение деформируемости эритроцитов при сахарном диабете связано с гликированием Hb , а отсюда — с увеличением внутриэритроцитарной вязкости [12]. Особо важное значение имеют полученные нами результаты, свидетельствующие об увеличении HbA_{1c} в мембранах эритроцитов после ожога, что обуславливает ухудшение эластических и вязкостных свойств мембран.

По результатам опытов *in vitro*, также отмечена достаточно высокая корреляционная зависимость между повышением концентрации HbA_{1c} в инкубированных в растворе глюкозы эритроцитах и снижением количества сильно вытянутых в искусственном сдвиговом потоке красных клеток крови ($R = -0,59$, $\rho = 0,016$), а также между степенью повышения концентрации HbA_{1c} , и увеличением количества невытянутых (недеформированных) эритроцитов ($R = 0,51$, $\rho = 0,043$).

Гликирование Hb не только само по себе вызывает ухудшение деформируемости эритроцитов, но и приводит к повышению их ригидности путем увеличения микровезикуляции красных клеток крови. О таком влиянии HbA_{1c} на процесс образования эМВ свидетельствуют исследования F.L. Willekens et al. [13].

По данным, полученным с помощью проточной цитофлуориметрии, количество эМВ после 24-часовой инкубации эритроцитов по сравнению с нормой

увеличено в 3,47 раза у ожоговых больных (в среднем с $266,2 \pm 33,2$ до $924,2 \pm 97,1$ шт/ в 1 мкл).

Усиление микровезикуляции эритроцитов ожоговых больных является, вероятно, объяснением того факта, что после инкубации содержание в их мембранах HbA_{1c} , выраженное в г/л, нарастало в меньшей степени, чем в мембранах эритроцитов здоровых доноров. При ожоге значительная часть мембранного HbA_{1c} «уходит» в микровезикулы.

Образование МВ является по данным ряда авторов защитным механизмом для удаления молекул, связанных с участками мембраны эритроцита, в том числе и измененного, мембраносвязанного Hb и его токсических производных, задерживая тем самым, несвоевременное удаление эритроцитов из кровотока, что приводит к продлению жизни эритроцитов *in vivo* [14]. Однако удаление части мембран при микровезикуляции сопровождается во-первых, нарушением геометрии эритроцитов, а во-вторых — повышением внутриклеточной вязкости за счет относительного увеличения концентрации в клетке Hb , в том числе — его гликированной формы. Это, несомненно, вызывает снижение способности эритроцитов значительно деформироваться при прохождении через капилляры.

Важной причиной микровезикуляции является дестабилизация липидного комплекса мембраны эритроцитов. В результате этого происходит перераспределение фосфолипидов — нейтральные фосфолипиды (прежде всего фосфатидилхолин) с внешней стороны мембраны переходят на внутреннюю, а несущие отри-

Таблица 1

Содержание HbA_{1c} в эритроцитах, их мембранах и выделенных из них МВ

Объект исследования	Группа исследования	Эритроциты здоровых доноров		Эритроциты ожоговых больных	
		HbA_{1c} , %	HbA_{1c} , г/л	HbA_{1c} , %	HbA_{1c} , г/л
Эритроциты	Контроль	$6,78 \pm 0,631$	$12,48 \pm 1,032$	$8,77 \pm 0,885$	$21,49 \pm 2,233$
	Опыт	$4,27 \pm 0,381^*$	$9,61 \pm 0,982^*$	$6,08 \pm 0,591^*$	$17,08 \pm 1,696^*$
Мембраны	Контроль	$5,84 \pm 0,614$	$0,35 \pm 0,031$	$6,74 \pm 0,638$	$0,61 \pm 0,057$
	Опыт	$4,98 \pm 0,431$	$0,50 \pm 0,044^*$	$6,03 \pm 0,563$	$0,72 \pm 0,071$
МВ	Опыт	$4,56 \pm 0,479$	$0,14 \pm 0,021$	$5,78 \pm 0,612$	$0,29 \pm 0,031$

Примечание. Контроль — до инкубации; Опыт — после 24-часовой инкубации; * — $p < 0,05$ в сравнении с контролем, критерий Вилкоксона.

Таблица 2

Изменение ЭФП эритроцитов в процессе консервации

Группа исследования	ЭФП эритроцитов здоровых доноров, мкм x см/В x с	ЭФП эритроцитов ожоговых больных, мкм x см/В x с
Контроль	$7,78 \pm 0,781$	$13,72 \pm 1,291$
Опыт	$4,33 \pm 0,452^*$	$6,53 \pm 0,658^*$

Примечание. Контроль — до инкубации; Опыт — после 24-часовой инкубации; * — $p < 0,05$ в сравнении с контролем, критерий Вилкоксона.

цательный заряд (фосфатидилсерин — ФС) — с внутренней стороны на внешнюю. При этом мембрана, обогащенная ФС, приобретает отрицательный заряд [15].

С достаточным основанием можно полагать, что показанное в наших исследованиях значительное увеличение ЭФП эритроцитов ожоговых больных связано с происходящим в их мембранах перераспределением фосфолипидов, которое и является одной из важных причин усиления микровезикуляции эритроцитов после термической травмы.

Заключение

Таким образом, нами установлено, что при ожоговой болезни значительно увеличивается гликирование Hb, и нарастает концентрация HbA_{1c} как внутри эритроцитов, так и в их мембранах. Гликирование Hb и дестабилизация липидного комплекса мембраны эритроцитов являются важными причинами усиления микровезикуляции красных клеток крови и сопровождаются снижением деформируемости эритроцитов после термической травмы.

References

1. Braasch D., Rogausch H. Decreased red-cell deformability after severe burns, determined with the chlorpromazine test. *Pflugers. Arch.* 1971; 323(1): 41-9.
2. Baar S. The functional significance of red cell deformability and its significance in burns. *Burns.* 1979; 6: 85-90.
3. Chien S. Red cell deformability and its relevance to blood flow. *Annu. Rev. Physiol.* 1987; 49: 177-92.
4. Mohandas N., Chasis J.A. Red blood cell deformability, membrane material properties and shape: regulation by transmembrane, skeletal and cytosolic proteins and lipids. 1993; 30: S171-92.
5. Levin G.Ya., Sukhareva E.G. ship between erythrocyte deformability with glycation of hemoglobin and the formation of microvesicles. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal.* 2015; 35 (2): 37-42. (in Russian)

6. Orlov D., Karkouti K. The pathophysiology and consequences of red blood cell storage. *Anaesthesia.* 2015; 70 (Suppl. 1): 29-37.

7. Distler J.H., Huber L.C., Hueber A.J., Reich C.F., Gay S., Distler O., et al. The release of microparticles by apoptotic cells and their effects on macrophages. *Apoptosis.* 2005; 10: 731-41.

8. Dey-Hazra E., Hertel B., Kirsch T., Woywodt A., Lovric S., Haller H., et al. Detection of circulating microparticles by flow cytometry: influence of centrifugation, filtration of buffer, and freezing. *Vasc. Health. Risk. Manag.* 2010; 6: 1125-33.

9. Chung S.M., Bae O.N., Lim K.M., Noh J.Y., Lee M.Y., Jung Y.S. et al. Lysophosphatidic acid induces thrombogenic activity through phosphatidylserine exposure and procoagulant microvesicle generation in human erythrocytes. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2007; 27: 414-21.

10. Levin G.Ya., Yakhno V.G., Tsarevskiy N.N., Kotyayeva N.P. *A device for the deformation of erythrocytes in a shear flow.* Certificate of authorship 1363065, RF; 1987. (in Russian)

11. Bekyarova G., Yankova T., Kozarev I, Yankov D. Reduced erythrocyte deformability related to activated lipid peroxidation during the early postburn period. *Burns.* 1996; 22(44): 291-4.

12. Sorette M.R., Lavenant M.G., Clark M.R. Ektacytometric measurement of sickle cell deformability as a continuous function of oxygen tension. *Blood.* 1987; 69(1): 316-23.

13. Willekens F.L., Werre J.M., Kruijt J.K., Roerdinkholder-Stoelwinder B., Groenen-Dopp Y.A., van den Bos A.G. et al. Liver Kupffer cells rapidly remove red blood cell-derived vesicles from the circulation by scavenger receptors. *Blood.* 2005; 105: 2141-5.

14. Willekens F.L., Werre J.M., Groenen-Dopp Y.A., Roerdinkholder-Stoelwinder B., de Pauw B., Bosman G.J. Erythrocyte vesiculation: a self-protective mechanism? *Br. J. Haematol.* 2008; 141(4): 549-56.

15. Zwaal R.F., Schroit A.J. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood.* 1997; 89: 1121-32.

Поступила 02.11.15

Сведения об авторах:

Сухарева Екатерина Геннадьевна (Sukhareva E.G.), мл. науч. сотр. отделения гравитационной хирургии и гемодиализа, e-mail: ekaterina.syhareva@gmail.com

Егорихина Марфа Николаевна (Egorihina M.N.), ст. науч. сотр. отделения гравитационной хирургии и гемодиализа, e-mail: egorihina@rambler.ru