

ЛИЗОФОСФАТИДНАЯ КИСЛОТА И АГРЕГАЦИЯ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

© Ю. А. Шереметьев,¹ А. Н. Поповичева, Г. Я. Левин

Научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии МЗ РФ, Нижний Новгород;

¹ электронный адрес: ya.sher@rambler.ru

Изучено влияние лизофосфатидной кислоты (ЛФК) на форму и агрегацию эритроцитов в аутоплазме. Морфологию эритроцитов и их агрегатов изучали с помощью световой микроскопии. Показано, что добавление плазмы с высоким содержанием ЛФК к эритроцитам приводит к изменению их формы: дискоциты превращаются в эхиноциты. Практически отсутствует агрегация эритроцитов в виде «монетных столбиков». В то же время наблюдается сильная агрегация эхиноцитов. При этом наблюдается образование микровезикул. Добавление нормальной плазмы крови к эхиноцитам восстанавливает форму и агрегацию эритроцитов в виде «монетных столбиков». Обсуждается возможный механизм действия ЛФК на эритроциты.

Ключевые слова: эритроциты, агрегация, аутоплазма, эхиноциты, «монетные столбики», микровезикулы, лизофосфатидная кислота.

Лизофосфатидная кислота (ЛФК) — липидный медиатор с множеством биологических функций (Moolenaar, 1995; Бердичевец и др., 2010).

Известно, что при патологических состояниях концентрация ЛФК в крови повышается вследствие ее высвобождения из тромбоцитов в ответ на повреждение и тромбоз (Aoki et al., 2002), а также гидролитическое действие фосфолипазы A₂ на фосфолипиды мембран микровезикул (Fourcade et al., 1995; Neidlinger et al., 2006). Показано, что ЛФК индуцирует агрегацию тромбоцитов (Schumacher et al., 1979), стимулирует вход кальция в эритроциты (Yang et al., 2000), экстернализацию фосфатидилсерина в наружный мембранный слой, образование эхиноцитов и высвобождение из них микровезикул (Chung et al., 2007).

Ранее нами с помощью фотометрического метода установлено, что агрегация эритроцитов, помещенных в плазму, богатую ЛФК, резко снижается. Параллельно с этим изменяется форма эритроцитов: дискоциты превращаются в эхиноциты (Шереметьев и др., 2013). Недавно показано, что лизофосфатидная кислота индуцирует агрегацию отмытых эритроцитов (Steffen et al., 2011; Kaestner et al., 2012).

В настоящей работе мы провели детальное микроскопическое изучение влияния ЛФК на агрегацию эритроцитов в аутоплазме. Кроме того, исследовали агрегационную способность эритроцитов (образование «монетных столбиков») после восстановления формы клеток.

Материал и методика

В работе использовали кровь 8 здоровых добровольцев. Кровь забирали в вакутайнеры, содержащие 3.8%-ный цитрат натрия (соотношение 9 : 1). Плазму,

не содержащую тромбоцитов, получали путем центрифугирования крови в течение 20 мин при 3000 об/мин. Тромбоциты и лейкоциты удаляли, а неотмытые эритроциты и плазму отдельно хранили при 4 °С в течение 24 ч.

Для получения высокой концентрации эндогенной ЛФК плазму крови инкубировали при 37 °С в течение 24 ч. За это время концентрация ЛФК увеличивается до 10 мкМ (Aoki et al., 2002). Механизм увеличения содержания ЛФК в инкубированной при 37 °С плазме довольно хорошо изучен. Лецитинхолестеринацилтрансфераза превращает фосфатидилхолин в лизофосфатидилхолин, который в дальнейшем с помощью лизофосфолипазы D превращается в ЛФК (Aoki et al., 2008). В качестве контроля использовали эритроциты и плазму, хранящиеся 24 ч при 4 °С.

Морфологию агрегатов эритроцитов и форму эритроцитов изучали с помощью светового микроскопа (Primo Star Carl Zeiss, Германия). Для изучения морфологии агрегатов плазму смешивали с эритроцитами в соотношении 2 : 1. Каплю полученной смеси плазмы с эритроцитами помещали на предметное стекло, перемешивали и опускали в нее объектив с увеличением 100×. Для достижения фокуса объекта добавляли небольшое количество плазмы. Общее увеличение микроскопа составляло 1000×. Контрольную плазму и плазму, обогащенную ЛФК, инкубировали с эритроцитами в течение 15 мин при комнатной температуре.

Для изучения формы эритроцитов их фиксировали в 0.25%-ном растворе глутаральдегида, приготовленном на фосфатном буфере (10 мМ Na₂HPO₄ и 150 мМ NaCl, pH 7.4).

Использовали глутаральдегид фирмы Sigma (США), Na₂HPO₄ и NaCl марки «хч» отечественного производства.

Результаты и обсуждение

Изучение агрегации эритроцитов фотометрическим методом на реоскопе позволяет с помощью записи агрегатограммы оценить степень агрегации клеток как в аутоплазме, так и стимулированной высокомолекулярными полимерами (Schmid-Schonbein et al., 1973; Rampling et al., 2004). При этом запись агрегатограммы отражает степень агрегации эритроцитов, которая состоит из так называемых монетных столбиков (*rouleaux*).

В настоящей работе мы провели более детальное исследование процесса агрегации эритроцитов с помощью светового микроскопа. Мы не наблюдали так называемого эффекта стекла, когда нормальные эритроциты трансформируются в эхиноциты при контакте двух стеклянных поверхностей. Отсутствие эффекта стекла связано, по-видимому, с присутствием в плазме крови альбумина, который предотвращает эхиноцитоз (Eriksson, 1990).

Для изучения влияния ЛФК на эритроциты мы использовали бестромбоцитарную плазму, которую инкубировали при 37 °С в течение 24 ч. За время инкубации плазмы содержание в ней ЛФК увеличивается до 10 мкМ (Aoki et al., 2002). Локальная концентрация ЛФК, по данным ряда авторов (Eichholtz et al., 1993; Kaestner et al., 2012), после активации тромбоцитов в крови составляет от 2,5 до 10 мкМ. Показано, что ЛФК плазмы проявляет активность только в связанном с альбумином или рядом других белков крови виде (Moolenaar et al., 2004).

На рис. 1, *а* представлена агрегация нормальных свежих эритроцитов в аутоплазме. Видно, что агрегация эритроцитов состоит из «монетных столбиков». В качестве контроля использовали неотмытые эритроциты и плазму, которые хранили при 4 °С в течение 24 ч. Морфология агрегатов контрольных эритроцитов практически не отличалась от морфологии свежих агрегатов (рис. 1, *б*).

Добавление плазмы с высоким содержанием ЛФК к контрольным эритроцитам приводит к изменению формы клеток от дискоцитов к эхиноцитам (рис. 2): агрегаты, состоящие из «монетных столбиков», отсутствуют. В то же время мы наблюдали выраженную агрегацию эхиноцитов (рис. 3, *а*). Инкубация эритроцитов более 15 мин в плазме, богатой ЛФК, приводила к сильному выделению из агрегированных эхиноцитов фрагментов мембран и микровезикул (рис. 3, *б*).

Мы изучили также влияние ЛФК на морфологию агрегатов эритроцитов, состоящих из «монетных столбиков». Для этого после образования «монетных столбиков» контрольную плазму удаляли, замещая ее на инкубированную. На рис. 4, *а* видно, что ЛФК изменяет морфологию агрегатов. Агрегаты становятся аморфными и приобретают глыбчатые формы. По-видимому, происходит слияние клеток и агрегация становится необратимой.

Ранее нами показано, что истощение эритроцитов по АТФ приводит к образованию эхиноцитов и резкому снижению их агрегационной способности в аутоплазме (Шереметьев и др., 2013). Снижение агрегационной способности эхиноцитов показано и в других работах (Reinhart et al., 1989, 1999, 2011).

В настоящей работе мы исследовали способность эритроцитов образовывать «монетные столбики» после восстановления их дисковидной формы. Для этого мы добавляли к эхиноцитам контрольную плазму. Нами показано, что после восстановления формы эритроцитов от эхиноцитов к дискоцитам восстанавливается агрегация,

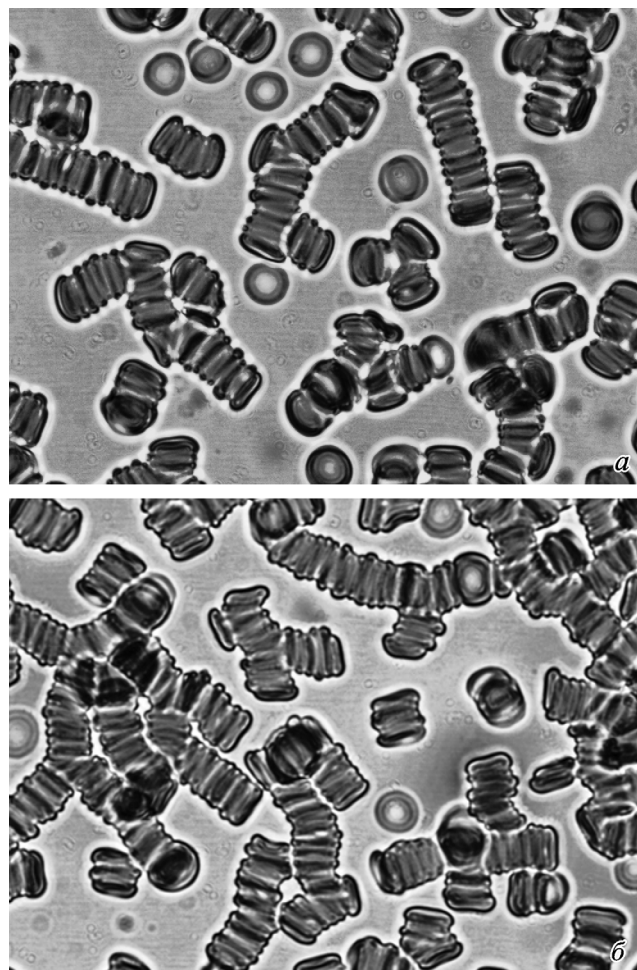


Рис. 1. Агрегация интактных эритроцитов в аутоплазме до (*а*) и после их хранения в течение 24 ч при 4 °С (*б*).

Об. 100×.

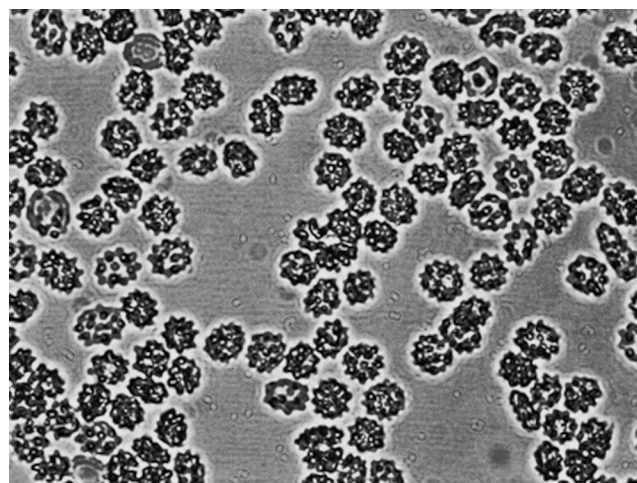


Рис. 2. Морфология эритроцитов после добавления плазмы, богатой лизофосфатидной кислотой (ЛФК).

Инкубация 15 мин при комнатной температуре. Фиксация глутаральдегидом. Об. 100×.

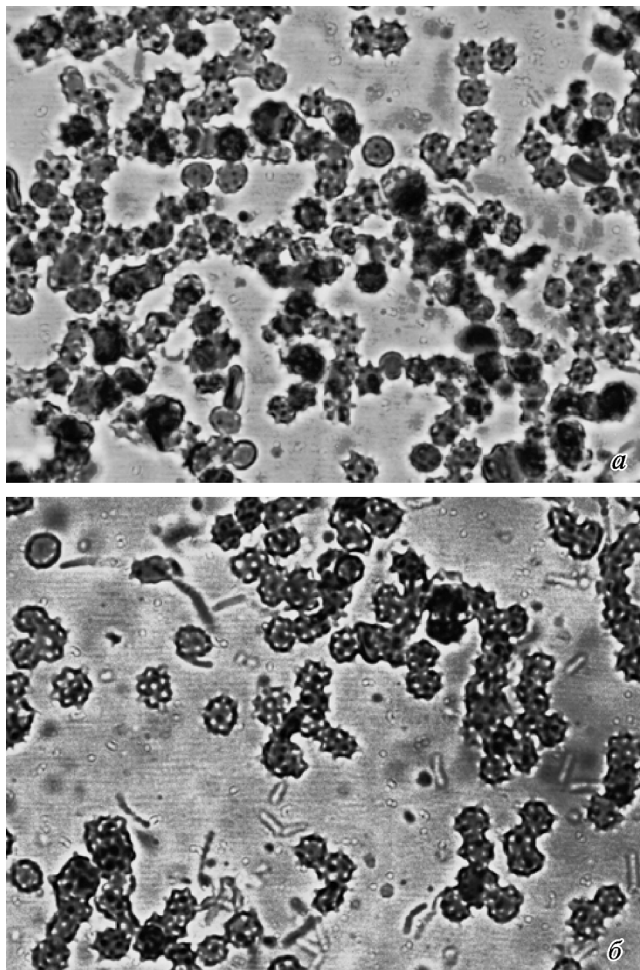


Рис. 3. Агрегация эхиноцитов в аутоплазме, богатой ЛФК, в течение 15 мин при комнатной температуре (а) и образование микровезикул (б).

Об. 100×.

состоящая из «монетных столбиков» (рис. 4, б). Восстановление дисковидной формы связано с тем, что альбумин плазмы связывает ЛФК, находящуюся на мембранах эритроцитов, и тем самым нивелирует ее токсическое действие.

Таким образом, исследования, проведенные на микроскопическом уровне, показали, что ЛФК индуцирует образование эхиноцитов и микровезикул. При этом нарушается агрегация эритроцитов в виде «монетных столбиков» и возникает агрегация эритроцитов эхиноцитарной формы. Восстановление дисковидной формы эритроцитов восстанавливает образование «монетных столбиков».

Механизмы нарушения агрегации эритроцитов, состоящей из «монетных столбиков», и возникновения агрегации эхиноцитов в аутоплазме под влиянием ЛФК остаются неизученными. Известно, что процесс агрегации эритроцитов определяется двумя типами биофизических и физико-химических факторов: свойствами плазмы крови и свойствами самих эритроцитов (главным образом компонентами их мембран) (Baskurt, Meiselman, 1997, 2013).

Исходя из наших данных и анализа современной литературы мы выдвинули гипотезу механизма агрегации эритроцитов в виде «монетных столбиков», основанную на изменении спонтанной кривизны мембраны эритроци-

тов (Шереметьев, Левин, 2012). Согласно этой гипотезе, изменение в спонтанной кривизне мембран эритроцитов будет приводить или к усилению, или к снижению их агрегационной способности в аутоплазме. Известно, что ЛФК обладает положительным, а фосфатидная кислота — отрицательным влиянием на спонтанную кривизну мембраны (Kooijman et al., 2005), определяющую форму клеток. При этом ЛФК обладает эхиноцитогенным действием, а фосфатидная кислота — стоматоцитогенным. Недавно показано, что фосфатидная кислота усиливает агрегационную способность эритроцитов (Noh et al., 2010). Поэтому вещества, вызывающие образование положительной кривизны мембраны (образование эхиноцитов), будут подавлять агрегацию эритроцитов в аутоплазме. А вещества, вызывающие отрицательную кривизну мембраны (образование стоматоцитоподобных клеток), будут усиливать агрегационную способность эритроцитов. Предполагается также, что изменение спонтанной кривизны мембраны приводит к изменению ее связывающей способности к таким белкам плазмы крови, как фибриноген и альфа2-макроглобулин. Следовательно, повышение биологически активных липидов в крови, таких как ЛФК или фосфатидная кислота, будет разнонаправленно изменять агрегационную способность эритроцитов.

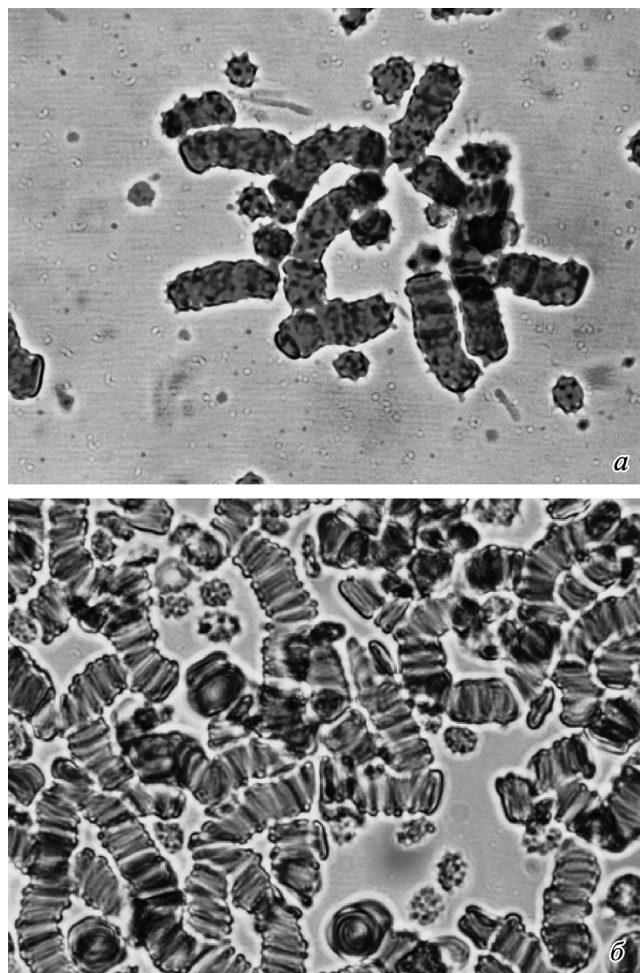


Рис. 4. Влияние ЛФК на агрегацию эритроцитов из «монетных столбиков» (а) и восстановление агрегации в виде «монетных столбиков» после восстановления дисковидной формы клеток (б).

Об. 100×.

Возможный механизм агрегации эритроцитов под влиянием ЛФК можно объяснить на основании полученных нами данных по изучению влияния пикриновой кислоты на эритроциты (Шереметьев и др., 2005). Показано, что для возникновения агрегации эритроцитов при действии пикриновой кислоты необходимы два условия — образование эхиноцитов и низкое значение pH среды. Пикриновая кислота одновременно вызывает эхиноцитоз и снижает pH среды ниже физиологического уровня.

Известно, что ЛФК индуцирует вход кальция в эритроциты (Yang et al., 2000) и экспонирование на их поверхности фосфатидилсерина (Chung et al., 2007). Имеются сведения о том, что увеличение внутриклеточного содержания кальция под влиянием ЛФК приводит к снижению в эритроцитах величины pH (Nguyen, 2010).

Исходя из этих данных и сведений, имеющихся в литературе, можно предположить возможный механизм агрегирующего действия ЛФК на эритроциты человека. Известно, что в процессе образования эхиноцитов на мембранах эритроцитов происходит перераспределение поверхностного отрицательного заряда. Это показано для эхиноцитов, полученных после обработки клеток лизофосфатидилхолином (Marikovsky et al., 1976) и после понижения в эритроцитах уровня АТФ (Marikovsky et al., 1985). В последние годы стало известно, что образование эхиноцитов сопровождается экспонированием на внешнюю поверхность мембраны эритроцитов фосфатидилсерина, обладающего сильным отрицательным зарядом (Schwarz et al., 1999; Wolfs et al., 2003; Nguyen et al., 2011), что вносит значительный вклад в увеличение локального отрицательного заряда. В результате перераспределения заряда на мембранах эритроцитов образуются дискретные области с сильным отрицательным зарядом. Известно также, что в результате снижения pH в эритроцитах на их мембранах образуется избыточный положительный заряд (Head, Seaman, 1960; Seaman et al., 1977; Бондарь и др., 1988).

Следовательно, в результате увеличения содержания кальция в эритроцитах под влиянием ЛФК происходят образование эхиноцитов и снижение внутриклеточного pH. В связи с этим на мембранах эритроцитов образуются дискретные области (кластеры) с сильными отрицательными и положительными зарядами. Электростатическое взаимодействие эхиноцитов приводит к их агрегации.

В заключение необходимо отметить, что изучение влияния эндогенной ЛФК на эритроциты в плазме крови моделирует состояние, которое может возникнуть при тромбозе *in vivo* (Wagner et al., 2013). Использование светового микроскопа при большом увеличении позволяет подойти с новых позиций к изучению механизмов агрегации эритроцитов в плазме крови.

Список литературы

Бердичевец И. Н., Тяжелова Т. В., Шимшилашвили Х. Р., Робаев Е. И. 2010. Лизофосфатидная кислота — липидный медиатор с множеством биологических функций. Пути биосинтеза и механизм действия. Биохимия. 75 (9) : 1213—1223. (Berdichevets I. N., Tyazhelova T. V., Shimshilashvili Kh. R., Rogayev E. I. 2010. Lysophosphatidic acid is a lipid mediator with wide range of biological activities. Biosynthetic pathways and mechanism of action. Biochemistry (Moscow). 75(9) : 1088—1097.)

Бондарь О. П., Холодова Ю. А., Смирнова И. П., Возиан П. А. 1988. Поверхностный заряд мембран эритроцитов при нарушении липидного обмена по данным микроэлектрофореза, H⁺-титрования и флуоресцентных исследований. Укр. био-

хим. журн. 60 (1) : 74—81. (Bondar' O. P., Kholodova Yu. D., Smirnova I. P., Vozian P. A. 1988. Surface charge of erythrocyte membrane during disorders of lipid metabolism from the data of microelectrophoresis. H⁺-titration and fluorescence studies. Ukr. Biokhim. Zn. 60 (1) : 74—81.)

Шереметьев Ю. А., Левин Г. Я. 2012. О механизме агрегации эритроцитов. Материалы докладов IV съезда биофизиков России. Нижний Новгород. 322. (Sheremet'ev Yu. A., Levin G. Ya. 2012. On the mechanism of red blood cell aggregation. Proceeding of the IV Congress of biophysicists Russia. Nizhny Novgorod. 322.)

Шереметьев Ю. А., Поповичева А. Н., Егорихина М. Н., Левин Г. Я. 2013. Изучение взаимосвязи между изменением формы и агрегацией эритроцитов человека. Биофизика. 58 (2) : 264—268. (Sheremet'ev Yu. A., Popovicheva A. N., Egorihina M. N., Levin G. Ya. 2013. Study of the relationship between shape and aggregation change in human erythrocytes. Biophysics. 58 (2) : 193—196.)

Шереметьев Ю. А., Шереметьева А. В., Леднев А. В. 2005. Изучение агрегации эритроцитов человека, индуцированной пикриновой кислотой. Биофизика. 50 (5) : 901—902. (Sheremet'ev Yu. A., Sheremet'eva A. V., Lednev A. V. 2005. A study of the aggregation of human erythrocytes induced by picric acid. Biophysics. 50 (5) : 784—785.)

Aoki J., Inoue A., Okudaira S. 2008. Two pathways for lysophosphatidic acid production. Biochim. biophys. acta. 1781 : 513—518.

Aoki J., Taira A., Takanezawa Y., Kishi Y., Hama K., Kishimoto T., Mizuno K., Saku K., Taguchi R., Arai H. 2002. Serum lysophosphatidic acid is produced through diverse phospholipase pathways. J. Biol. Chem. 277 : 48 737—48 744.

Baskurt O. K., Meiselman H. J. 1997. Cellular determinants of low-shear blood viscosity. Biorheology. 34 : 235—247.

Baskurt O. K., Meiselman H. J. 2013. Erythrocyte aggregation: basic aspects and clinical importance. Clin. Hemorheol. Microcirculation. 53: 23—37.

Chung S. M., Bae O. N., Lim R. M., Noh J. Y., Lee M. Y., Jung Y. S., Chung J. H. 2007. Lysophosphatidic acid induces thrombotic activity through phosphatidylserine exposure and procoagulant microvesicle generation in human erythrocytes. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 27 : 414—421.

Eichholtz T., Jalink K., Fahrenfort I., Moolenaar W. H. 1993. The bioactive phospholipid lysophosphatidic acid is released from activated platelets. Biochem. J. 291 : 677—680.

Eriksson L. E. 1990. On the shape of human red blood cells interacting with flat artificial surfaces — the «glass effect». Biochim. biophys. acta. 1036 : 193—201.

Fourcade O., Simon M. F., Viode C., Rugani N., Leballe F., Ragab A., Fournie B., Sarda L., Chap H. 1995. Secretory phospholipase A₂ generated the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated cells. Cell. 80 : 919—927.

Heard D. H., Seaman G. V. F. 1960. The influence of pH and ionic strength on the electrokinetic stability of the human erythrocyte membrane. J. Gen. Physiol. 43 : 635—654.

Kaestner L., Steffen P., Nguyen D. B., Wang J., Wagner-Britz L., Jung A., Wagner C., Bernhardt I. 2012. Lysophosphatidic acid induced red blood cell aggregation *in vitro*. Bioelectrochemistry. 87 : 89—95.

Kooijman E. E., Chupin V., Fuller N. L., Koslov M. M., de Kruijff B., Burger K. N., Rand P. R. 2005. Spontaneous curvature of phosphatidic acid and lysophosphatidic acid. Biochemistry. 44 : 2097—2102.

Marikovsky Y., Brown C. S., Weinstein R. S., Wortis H. H. 1976. Effects of lysolecithin on the surface properties of human erythrocytes. Exp. Cell Res. 98 : 313—324.

Marikovsky Y., Weinstein R. S., Skutelsky E., Danon D. 1985. Changes of cell shape and surface charge topography in ATP-depleted human red blood cells. Mech. Ageing Develop. 29 : 309—316.

Moolenaar W. H. 1995. Lysophosphatidic acid, a multifunctional phospholipid messenger. J. Biol. Chem. 270: 12949—12952.

- Moolenaar W. H., van Meeteren L. A., Giepmans B. N. 2004. The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling. *Bioessays*. 26 : 870—881.
- Neidlinger N. F., Larkin S. K., Bhagat A., Victorino G. P., Kuypers F. A. 2006. Hydrolysis of phosphatidylserine-exposing red blood cells by secretory phospholipase A₂ generates lysophosphatidic acid and results in vascular dysfunction. *J. Biol. Chem.* 281 : 775—781.
- Nguyen D. B. 2010. Phosphatidylserine exposure in red blood cells: a suggestion for the active role of red blood cells in blood clot formation. Dissertation. Saarbrücken. 144 p.
- Nguyen D. B., Wagner-Britz L., Maia S., Steffen P., Wagner C., Kaestner L., Bernhardt I. 2011. Regulation of phosphatidylserine exposure in red blood cells. *Cell. Physiol. Biochem.* 28 : 847—856.
- Noh J. Y., Lim K. M., Bae O. N., Chung S. M., Lee S. W., Joo K. M., Lee S. D., Chung J. H. 2010. Procoagulant and prothrombic activation of human erythrocytes by phosphatidic acid. *Amer. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 299 : H347—H355.
- Rampling M. W., Meiselman H. J., Neu B., Baskurt O. K. 2004. Influence of cellular cell-specific factors on red blood cell aggregation. *Biorheology*. 41: 91—112.
- Reinhart W. H., Baerlocher G. M., Cerny T., Owen G. R., Meiselman H. J., Beer J. H. 1999. Ifosfamide-induced stomatocytosis and mesna-induced echinocytosis: influence on biorheological properties of blood. *Eur. J. Haematol.* 62: 223—230.
- Reinhart W. H., Schulzki T. 2011. Metabolic depletion decreases the aggregability of erythrocytes. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 49 : 451—461.
- Reinhart W. H., Singh A., Straub P. W. 1989. Red blood cell aggregation and sedimentation: the role of the cell shape. *Br. J. Haematol.* 73 : 551—556.
- Schmid-Schönbein H., von Gosen J., Heinich L., Klose H. J., Volger E. 1973. A counter-rotating «rheoscope chamber» for study of the microrheology of blood cell aggregation by microscopic observation and microphotometry. *Microvasc. Res.* 6 : 366 —376.
- Schumacher K. A., Classen H. G., Spath M. 1979. Platelet aggregation evoked *in vitro* and *in vivo* by phosphatidic acids and lysoderivatives: identity with substances in aged serum (DAS). *Thromb. Haemost.* 42 : 631—640.
- Schwarz S., Deuticke B., Haest C. W. 1999. Passive transmembrane redistributions of phospholipids as a determinant of erythrocyte shape change. Studies on electroporated cells. *Mol. Membr. Biol.* 16 : 247—255.
- Seaman G. V. F., Knox R. J., Nordt R. J., Regan D. H. 1977. Red cell agins. I. Surface charge density and sialic acid content of density-fractionated human erythrocytes. *Blood*. 50 : 1001—1011.
- Steffen P., Jung A., Nguyen D. B., Muller T., Bernhardt I., Kaestner L., Wagner C. 2011. Stimulation of human red blood cells leads to Ca²⁺-mediated intercellular adhesion. *Cell Calcium*. 50 : 54—61.
- Wagner C., Steffen P., Svetina S. 2013. Aggregation of red blood cells: from rouleaux to clot formation. *Comptes Rendus Physiologie*. doi.org/10.1016/j.crhy.2013.04.004.
- Wolfs J. L., Comfurius P., Bevers E. M., Zwaal R. F. A. 2003. Influence of erythrocyte shape on the rate of Ca²⁺-induced scrambling of phosphatidylserine. *Mol. Membr. Biol.* 20 : 83—91.
- Yang L., Andrews D. A., Low P. S. 2000. Lysophosphatidic acid opens a Ca⁺⁺ channel in human erythrocytes. *Blood*. 95 : 2420—2425.

Поступила 6 VIII 2013

LYSOPHOSPHATIDIC ACID AND HUMAN ERYTHROCYTE AGGREGATION

Yu. A. Sheremet'ev,¹ A. N. Popovicheva, G. Ya. Levin

Scientific Research Institute of Traumatology and Orthopedics,
Ministry of Health of Russian Federation, Nizhniy Novgorod;

¹ e-mail: ya.sher@rambler.ru

The effects of lysophosphatidic acid on the morphology and aggregation of human erythrocytes has been studied. Morphology of erythrocytes and their aggregates were studied by light microscopy. It has been shown that lysophosphatidic acid changes the shape of red blood cells: diskocyte become echinocytes. Aggregation of red blood cells (rouleaux) was significantly reduced in autoplasm. At the same time there is a strong aggregation of echinocytes. This was accompanied by the formation of microvesicles. Adding normal plasma to echinocytes restores shape and aggregation of red blood cells consisting of «rouleaux». A possible mechanism of action of lysophosphatidic acid on erythrocytes is discussed.

Key words: erythrocytes, aggregation, autoplasm, echinocytes, «rouleaux», microvesicles, lysophosphatidic acid.