

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ЭКСПРЕССИЯ БЕЛКОВ CD42b И CD9 В ТРОМБОЦИТАХ И ВНЕКЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАННЫХ ВЕЗИКУЛАХ ПРИ ХРАНЕНИИ ТРОМБОЦИТНОГО КОНЦЕНТРАТА

**В. В. Кищенко,¹ К. А. Кондратов,^{1,*} М. В. Белякова,¹ В. Ю. Михайловский,²
С. В. Сидоркевич,¹ Т. В. Вавилова,¹ А. В. Федоров,^{1,3} О. В. Сироткина^{1,4}**

¹ Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург, 197341,

² Междисциплинарный ресурсный центр по направлению «Нанотехнологии» С.-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург, 199034,

³ Кафедра цитологии и гистологии С.-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург, 199034,

и ⁴ Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Гатчина, Ленинградская обл., 188300;

* электронный адрес: kondratovk.kirill@yandex.ru

Тромбоцитный концентрат применяют для восстановления и поддержания гемостаза у пациентов со сниженным количеством или активностью тромбоцитов. При хранении тромбоцитный концентрат меняет свои свойства, что приводит к ослаблению терапевтического эффекта, а также возникновению побочных трансфузионных реакций. Одним из процессов, меняющих тромбоцитные концентраты при хранении, является секреция нескольких типов мембранных везикул. Несмотря на то что тромбоцитарные мембранные везикулы влияют на гомеостаз и передают сигналы межклеточной коммуникации, до сих пор остаются малоизученными механизмы их образования, особенности регуляторной активности и молекулярный состав. В настоящей работе представлены результаты исследования экспрессии мембранных белков CD42b и CD9 в тромбоцитах и тромбоцитарных мембранных везикулах при хранении тромбоцитного концентрата. Из тромбоцитных концентратов выделены и охарактеризованы популяции мембранных везикул разного размера. Белковый состав тромбоцитов и мембранных везикул различается. В процессе хранения наблюдаются агрегация и изменение морфологии тромбоцитов, меняется белковый состав как тромбоцитов, так и мембранных везикул, а также происходит значительное повышение уровней белков CD42b и CD9 во фракциях мембранных везикул. Полученные результаты свидетельствуют о том, что тромбоцитные концентраты содержат различные популяции мембранных везикул, молекулярный состав которых меняется в процессе хранения.

Ключевые слова: хранение тромбоцитного концентрата, активация тромбоцитов, внеклеточные мембранные везикулы, экзосомы, микровезикулы, дифференциальное центрифугирование, CD42b, CD9.

Принятые сокращения: СЭМНН — сканирующая электронная микроскопия низкого напряжения, ДРС — динамическое рассеяние света.

Тромбоциты — это клетки размером 2—4 мкм, которые являются основным компонентом системы свертывания крови. Они играют роль в процессах заживления ран, воспаления, ангиогенеза и метастазирования. Снижение количества или нарушения функциональной активности тромбоцитов приводят к геморрагическим либо тромбоцитическим осложнениям (Patel et al., 2005).

Тромбоцитный концентрат представляет собой суспензию жизнеспособных и гемостатически активных тромбоцитов, получаемых из донорской крови. Тромбоцитный концентрат восполняет уровень тромбоцитов у пациентов, со сниженным количеством этих клеток или пониженной их активностью, поддерживая их пер-

вичный гемостаз (White, Gilbert, 2006). Применение тромбоцитного концентрата имеет большое значение в лечении патологий, связанных с кровотечениями. Кроме того, этот препарат часто используют при терапии гематологических злокачественных новообразований и недостаточности костного мозга (Thon et al., 2008; Prudova et al., 2014).

Тромбоцитный концентрат хранится до клинического применения при 22 °С и постоянном помешивании. Время хранения тромбоцитного концентрата не должно превышать 7 сут. Срок хранения лимитируют два фактора — риск бактериальной инфекции и снижение качества тромбоцитов (Devine, Serrano, 2010). Снижение качества

тромбоцитов приводит к ослаблению терапевтического эффекта (Rosenfeld et al., 1995) и возникновению побочных трансфузионных реакций (Riccardi et al., 1997). Эти клинические проявления связаны с тем, что во время хранения в тромбоцитах происходят изменения на молекулярном уровне (Cervers et al., 2004; Wadhawan et al., 2004; Cauwenberghs et al., 2007). Понимание конкретных молекулярных механизмов, изменяющих функциональную активность тромбоцитов при хранении, необходимо для поиска биомаркеров таких изменений, усовершенствования протоколов приготовления и хранения тромбоцитов, а также персонализированного использования тромбоцитов, наиболее подходящих для конкретных групп пациентов.

При хранении тромбоцитного концентрата происходит секреция нескольких типов мембранных везикул. Этот процесс меняет свойства тромбоцитного концентрата (Wolf, 1967; Vode et al., 1991). Известно, что тромбоцитарные везикулы обладают рядом биологических активностей. В частности, они могут регулировать воспалительные реакции (Cognasse et al., 2015). Кроме того, показано, что эти структуры влияют на гомеостаз, поскольку обладают как про-, так и антикоагуляционными свойствами (Tans et al., 1991; Keuren et al., 2006). Однако до конца не выяснены ни механизмы образования тромбоцитарных мембранных везикул, ни особенности их регуляторной активности, ни молекулярный состав, определяющий эту активность. Отдельного внимания заслуживают белки, локализованные на поверхности мембранных везикул и контролирующие их взаимодействие с окружением. Одними из самых распространенных белков на поверхности тромбоцита, которые также присутствуют и на тромбоцитарных мембранных везикулах, являются тетраспанин CD9 и субъединица рецептора для фактора фон Виллебранда CD42b (Higashihara et al., 1990; Owens et al., 1992; Innigjerdigen et al., 1999).

В настоящей работе изучена экспрессия белков CD42b и CD9 в тромбоцитах и тромбоцитарных мембранных везикулах при хранении тромбоцитного концентрата.

Материал и методика

Приготовление и хранение тромбоцитного концентрата осуществляли на станции переливания крови Северо-Западного федерального медицинского исследовательского центра им. В. А. Алмазова (Санкт-Петербург) в соответствии с национальным стандартом РФ ГОСТ Р 53420—2009 «Кровь донорская и ее компоненты» (от 28 октября 2009 г. N485-ст). Донорами были мужчины с I (0) группой крови, Rh⁺. Для получения тромбоцитных концентратов использовали систему автоматического цитоплазмафереза MCS⁺ (Haemonetics, США). Тромбоцитные концентраты хранили в течение 7 сут в инкубаторе тромбоцитов с тромбомиксером в контейнерах MQT (MacoPharma, Франция) в присутствии ресуспендирующего раствора SSP⁺ (MacoPharma, Франция) при постоянном перемешивании и температуре 22 °С. На 2-е и 7-е сут хранения из контейнера с тромбоцитным концентратом в стерильных условиях отбирали несколько образцов объемом 1.6 мл.

Фазово-контрастная микроскопия тромбоцитного концентрата. Препараты тромбоцитного концентрата помещали на предметные стекла. Объек-

ты наблюдали при комнатной температуре с помощью микроскопа Zeiss Axio Observer Z1 (Carl Zeiss AG, Германия) с использованием объектива 40× и дополнительным увеличением 1.6×. Снимки получали с помощью фотокамеры Zeiss AxioCam ICc5 и управляющей программы ZEN 2 pro.

Фракционирование компонентов тромбоцитного концентрата с помощью дифференциального центрифугирования. Не подвергавшиеся заморозке аликвоты тромбоцитных концентратов фракционировали в день отбора образца из контейнера хранения. Аликвоту тромбоцитного концентрата объемом 1.6 мл центрифугировали 10 мин при 5000 g. Осадок тромбоцитов ресуспендировали в 1.6 мл раствора фосфатно-солевого буфера (PBS pH 7.4: 137 mM NaCl и 2.7 mM KCl). Супернатант центрифугировали 10 мин при 16 000 g. Полученный осадок промывали трижды в 1 мл буфера PBS путем последовательного ресуспендирования в этом буфере, центрифугирования (10 мин, 16 000 g) и удаления супернатанта. После отмывок осадок ресуспендировали в 1.6 мл PBS. К полученному на предыдущем этапе супернатанту добавляли PBS до конечного объема 25 мл. Затем препарат ультрацентрифугировали 2 ч при 100 000 g. Отбирали фракцию супернатанта объемом 1.6 мл. Полученный осадок промывали дважды в 25 мл PBS путем последовательного ресуспендирования в этом буфере, центрифугирования (2 ч, 100 000 g) и удаления супернатанта. После этого осадок ресуспендировали в 1.6 мл PBS. Полученные фракции осадков после центрифугирования при 5000, 16 000 и 100 000 g, а также фракцию супернатанта после центрифугирования при 100 000 g отправляли на хранение при -80 °С, а затем использовали для анализа.

Для анализа фракций тромбоцитного концентрата методом динамического рассеяния света (ДРС) использовали установку Zetasizer Nano ZSP (Malvern Instruments, Великобритания, любезно предоставлена официальным представителем КД Система и Оборудование), оборудованную лазером He-Ne 632.8 нм и системой детекции света, рассеянного под углом 173°. Измерения проводили при 25 °С. Для каждого образца строили кривые распределения частиц по размерам по усредненным результатам трех измерений. Анализ и визуализацию результатов проводили с помощью программного обеспечения Zetasizer Software.

Анализ фракций тромбоцитного концентрата с помощью сканирующей электронной микроскопии низкого напряжения. Для визуализации объектов из фракций тромбоцитного концентрата применяли протокол сканирующей электронной микроскопии низкого напряжения (СЭМНН), описанный ранее для анализа объектов из фракций плазмы крови (Кондратов и др., 2017). При этом исследуемые образцы наносили на предметные стекла Superfrost Plus (Thermo Scientific, США) с предварительно напыленным слоем углерода толщиной около 4 нм. Напыление проводили с помощью прибора Gatan PECS 682 (Gatan, США).

Электрофорез в полиакриламидном геле и иммуноблотинг. Образцы фракций, полученные в результате дифференциального центрифугирования, инкубировали с буфером Лэммли (Laemmli, 1970) в течение 10 мин при 100 °С и затем использовали для определения концентрации белка методом Лоури с помощью набора RC DC Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, США). На одну дорожку наносили количество образца, соответствующее

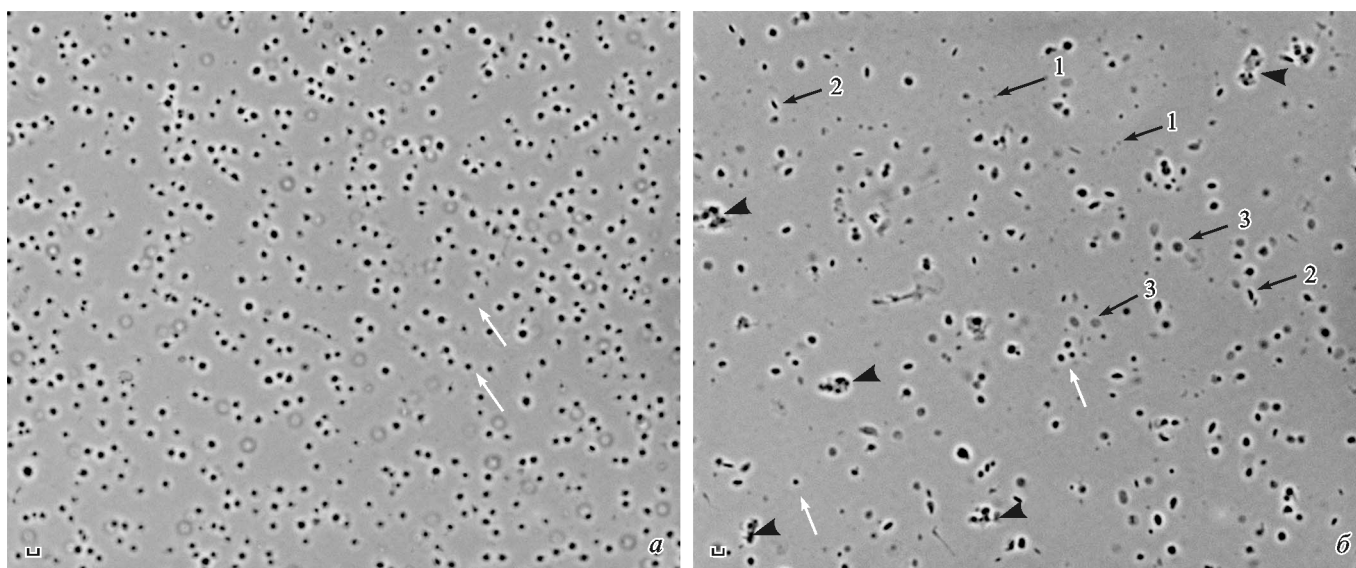


Рис. 1. Микрофотографии препаратов тромбоцитного концентрата на 2-е (а) и 7-е (б) сут хранения. Фазово-контрастная микроскопия.

Белые стрелки указывают на свободно лежащие объекты, соответствующие по форме и размеру тромбоцитам, черные головки стрелок указывают на агрегаты клеток, черные стрелки — на остатки разрушенных клеток (1), тромбоциты, изменившие форму (2) или размер (3). Масштабный отрезок — 5 мкм.

ющее 0.87 мкг общего белка. Белковый электрофорез проходил в денатурирующих условиях с применением градиента концентрации акриламида от 6 до 14 %. В качестве стандарта молекулярных масс использовали маркер PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, США). После разделения в геле выполняли электроперенос белков на нитроцеллюлозную мембрану. Мембрану окрашивали в растворе Ponceau S (Sigma, США) и фотографировали. После отмывок фрагменты мембраны, содержащие исследуемые белки, инкубировали с антителами против CD9 (ab65230, Abcam, Великобритания) и CD42b (sc-7071, Santa Cruz Biotechnology, США). Первичные антитела выявляли с помощью соответствующих вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена (Cell Signaling, США), и хемилюминесцентного субстрата SuperSignal Substrate (Thermo Scientific, США). Сигнал регистрировали с помощью системы документации Fusion FX (Vilber, Франция).

Результаты и обсуждение

Изменение морфологии тромбоцитов в процессе хранения. Для визуализации объектов в компонентах тромбоцитного концентрата и анализа изменения их морфологии в процессе хранения применяли фазово-контрастную микроскопию. На 2-е сут хранения в препаратах тромбоцитного концентрата во всех полях зрения наблюдали свободно лежащие клетки одинакового размера, которые не образовывали агрегатов и соответствовали по форме и размеру тромбоцитам (рис. 1, а). На 7-е сут хранения в препаратах наблюдали значительное уменьшение свободно лежащих клеток, наличие крупных плотных агрегатов и остатков разрушенных клеток, а также изменение размера (анизоцитоз) и формы (пойкилоцитоз) тромбоцитов (рис. 1, б). Таким образом, фазово-контрастная микроскопия позволяет наблюдать процесс агрегации и изменение морфологии тромбоци-

тов, которые являются известными признаками ухудшения свойств тромбоцитных концентратов в процессе хранения (Slichter et al., 1976). Следует отметить, что анализ изменения морфологии тромбоцитов с помощью микроскопического исследования (Kunicki et al., 1975) считается одним из лучших тестов для оценки качества тромбоцитных концентратов (Maurer-Spurej, Chipperfield, 2007), поскольку рассчитываемый в результате такого исследования параметр, а именно число дискоидных клеток, хорошо коррелирует с выживаемостью тромбоцитов *in vivo* после переливания пациентам (Bellhouse et al., 1987).

Характеристика фракций мембранных везикул из препаратов тромбоцитных концентратов. С помощью дифференциального центрифугирования компоненты тромбоцитных концентратов были разделены на фракции супернатанта и осадков, осаждающихся после центрифугирования при 16 000 и 100 000 g. Объекты в полученных фракциях были охарактеризованы с помощью методов СЭМНН и ДРС. Микрофотографии на рис. 2 демонстрируют примеры объектов, выявляемых с помощью СЭМНН во фракциях тромбоцитного концентрата 2-х сут хранения. Наиболее часто во фракциях осадков после центрифугирования при 16 000 и 100 000 g встречались околосферические частицы диаметром около 200 и 50 нм соответственно (рис. 2). Присутствие частиц диаметром менее 100 нм во фракции осадка после центрифугирования при 16 000 g может быть объяснено их агрегацией во время центрифугирования (Linares et al., 2015). На основании метода их выделения, формы и размера визуализированных околосферических объектов можно заключить, что они соответствуют ранее охарактеризованным тромбоцитарным мембранным везикулам — микровезикулам и экзосомам (Heijnen et al., 1999; Pook et al., 2014; Пономарева и др., 2016). Таким образом, полученные фракции содержат мембранные везикулы и могут быть использованы для детального изучения их характеристик.

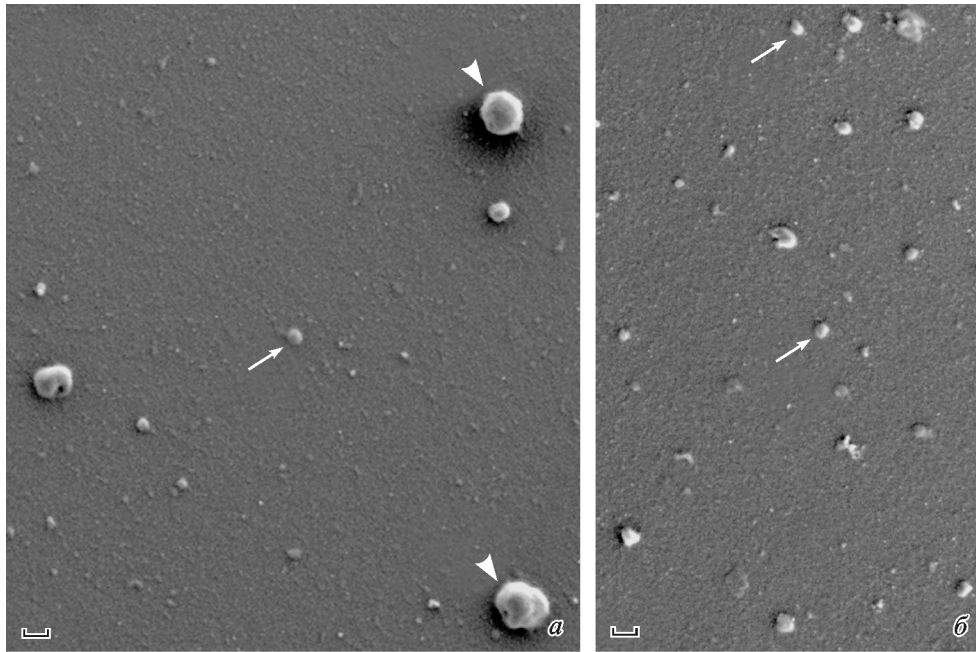


Рис. 2. Визуализация с помощью СЭМНН объектов во фракциях осадков после центрифугирования тромбоцитарных концентратов при 16 000 (а) и 100 000 (б) g.

На микрофотографиях околосферические объекты диаметром более 100 нм показаны *головами стрелок*, менее 100 нм — *стрелками*. Масштабный отрезок — 100 нм.

Методом ДРС установлено, что фракция супернатанта на 2-е сут хранения содержит объекты диаметром от 6 до 500 нм с максимумами около 10 и 80 нм. На 7-е сут хранения профиль распределения объектов во фракции супернатанта не меняется (рис. 3, а). Объекты во фракции супернатанта предположительно сформированы агрегатами белков плазмы. Фракция осадка после центрифугирования при 16 000 g на 2-е сут хранения содержит объ-

екты диаметром от 25 до 80 и от 150 до 700 нм с максимумами соответственно около 50 и 300 нм. Такое распределение по размерам согласуется с результатами СЭМНН, позволившей выявить в этой фракции две популяции околосферических объектов. На 7-е сут хранения основной максимум распределения смещается до положения 400 нм (рис. 3, б). Фракция осадка после центрифугирования при 100 000 g на 2-е сут хранения содержит объекты диамет-

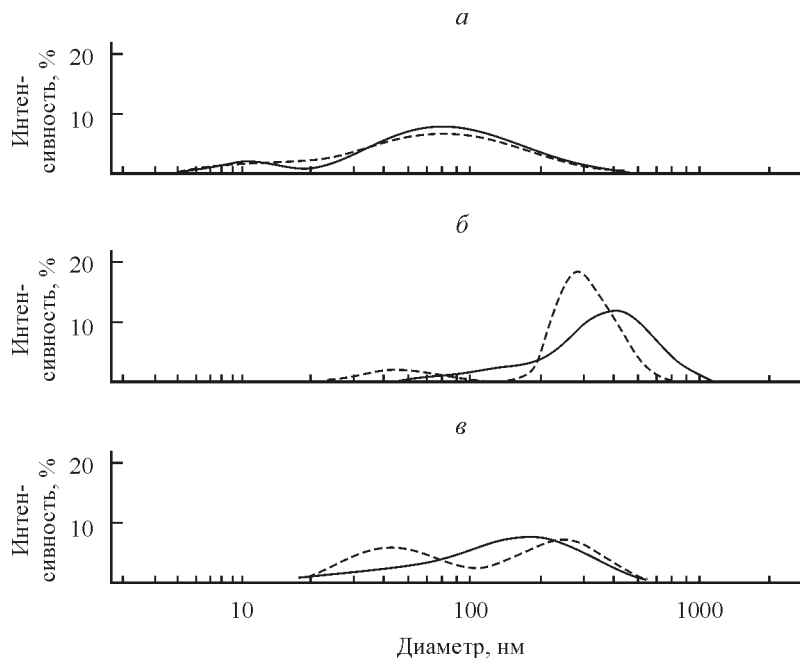


Рис. 3. Распределение по размерам объектов из фракций тромбоцитарных концентратов.

Измерения проведены с помощью метода ДРС. Объекты из фракции супернатанта (а) и фракций осадков после центрифугирования при 16 000 (б) и 100 000 (в) g. Штриховая линия — 2-е сут хранения, сплошная линия — 7-е сут хранения.

ром от 20 до 600 нм с максимумами около 50 нм и 250 нм. Присутствие в этой фракции объектов диаметром около 50 нм согласуется с результатами СЭМНН, а объекты диаметром около 250 нм, по-видимому, являются агрегатами более мелких частиц. На 7-е сут хранения максимум 50 нм смещается до положения 180 нм (рис. 3, в). В обеих фракциях осадков на 7-е сут хранения максимумы распределений смещаются в сторону больших диаметров. Это явление может быть результатом повышения способности внеклеточных везикул к агрегации за счет того, что во время хранения на их поверхности увеличивается уровень комплекса GPIIb—GPIIa (Miyamoto et al., 1998). Кроме этого, известно, что в процессе приготовления и хранения препаратов тромбоцитного концентрата под воздействием напряжения сдвига активируется лиганд рецептора CD42b (Frojmovic et al., 1997). Поэтому агрегации внеклеточных везикул также может способствовать экспрессия на их поверхности рецептора CD42b.

Изменение белкового состава тромбоцитов и мембранных везикул в процессе хранения. Для изучения белкового состава фракций тромбоцитных концентратов использовали электрофорез в полиакриламидном геле и иммуноблоттинг. Как видно на рис. 4, а, профили общего белка во фракциях тромбоцитных концентратов на 2-е и 7-е сут хранения не совпадают. Эти данные подтверждают представление о существовании нескольких популяций тромбоцитарных мембранных везикул, различающихся по молекулярному составу (Aatonen et al., 2014). Кроме этого, сравнение фракций одного типа, полученных из тромбоцитных концентратов разного срока хранения позволяет выявить дополнительные бэнды, появляющиеся на 7-е сут хранения, как в тромбоцитах, так и во фракциях мембранных везикул (рис. 4, а, стрелки). Это свидетельствует об изменении белкового состава препаратов тромбоцитов и фракций мембранных везикул при хранении. Такие изменения могут быть обусловлены селективным накоплением продуктов определенных генов в мембранных везикулах и (или) запуском известного для препаратов хранящихся тромбоцитов процесса синтеза белка de novo (Weyrich et al., 2004; Thiele et al., 2007; Thon, Devine, 2007; Сироткина и др., 2016).

Данные иммуноблоттинга позволяют на примере конкретных белков CD42b и CD9 проследить изменение состава фракций тромбоцитного концентрата в процессе хранения. На 2-е сут хранения уровень белка CD42b в тромбоцитах больше, чем во фракциях мембранных везикул. Этот факт согласуется и дополняет данные литературы об экспрессии CD42b во фракциях богатой тромбоцитами плазмы, а именно тромбоцитах и мембранных везикулах, осаждаемых центрифугированием при 33 000 g (Zdebska et al., 1998). В процессе хранения уровень белка CD42b в тромбоцитах уменьшается (рис. 4, б), что может быть обусловлено его усиленным экспортом в мембранные везикулы. Кроме этого, известно, что во время хранения тромбоцитов металлопротеаза ADAM17 отщепляет N-концевой внеклеточный домен белка CD42b (Bergmeier et al., 2004). Поскольку используемые нами антитела sc-7071 распознают этот N-концевой домен, уменьшение уровня CD42b может также являться следствием удаления внеклеточного домена CD42b с поверхности тромбоцитов. Потеря внеклеточного домена CD42b негативно влияет на функциональность перелитых тромбоцитов, поскольку уменьшает их способность к адгезии (Bergmeier et al., 2004) и увеличивает клиренс (Chen et al., 2016).

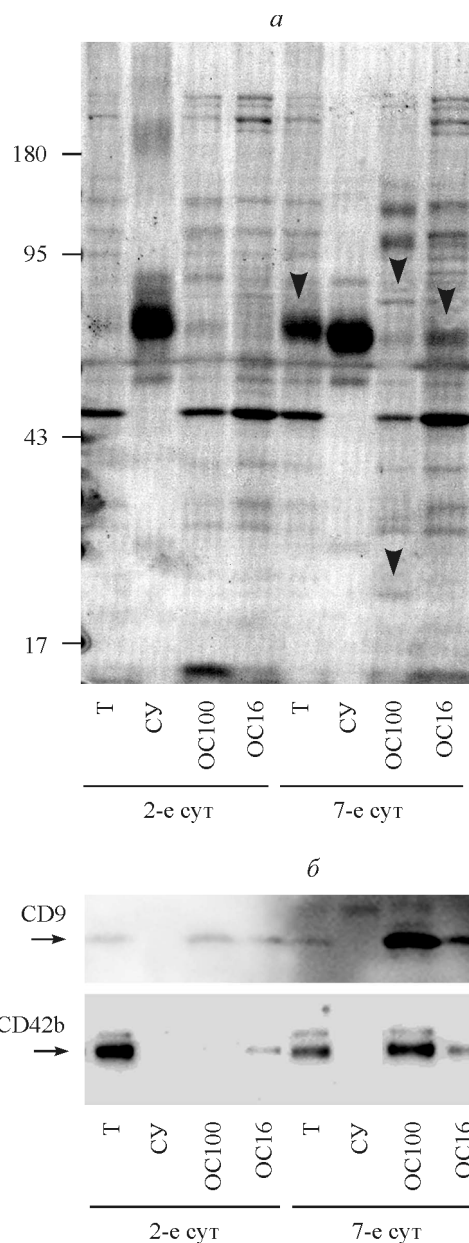


Рис. 4. Анализ белкового состава фракций тромбоцитного концентрата при хранении.

а — окраска Ponceau S, головки стрелок указывают на примеры бэндов, интенсивность которых увеличивается на 7-е сут хранения; б — детекция белков CD9 и CD42b с помощью иммуноблоттинга во фракциях тромбоцитного концентрата на 2-е и 7-е сут хранения. Стрелки указывают на положение полос, соответствующих массе CD9 и CD42b. Т — тромбоциты, свободные от мембранных везикул, СУ — супернатант, OC16 и OC100 — фракции осадков после центрифугирования при 16 000 и 100 000 g соответственно.

Уровни белков CD42b и CD9 значительно повышаются во фракциях мембранных везикул на 7-е сут хранения (рис. 4, б). Поскольку на каждую дорожку нанесено одинаковое количество общего белка, увеличение уровней исследуемых маркеров можно объяснить их селективным накоплением в везикулах и (или) увеличением доли везикул, несущих эти маркеры. Значительное увеличение количества CD42b и CD9 в везикулярных фракциях в процессе хранения указывает на возможность использования этих белков в качестве маркеров для оценки изменений функциональных свойств и качества

применяемых в клинике препаратов тромбоцитных концентратов.

В связи с полученными нами данными о том, что в тромбоцитных концентратах мембранные везикулы несут белки CD42b и CD9, становятся актуальными дальнейшие исследования возможных регуляторных взаимодействий между этими белками на поверхности везикул. В частности, необходимы дальнейшие исследования непосредственного взаимодействия между CD42b и CD9, которое известно для тромбоцитов (Longhurst et al., 1999). Также представляет определенный интерес проверка гипотезы о том, что высокий уровень внеклеточного домена CD42b в везикулах может быть обусловлен ингибированием активности металлопротеазы ADAM17 белком CD9 (Gutiérrez-Lopez et al., 2011).

Увеличение при хранении уровня CD42b в тромбоцитарных мембранных везикулах может обуславливать их адгезию к субэндотелию (Owens et al., 1992) и влиять на прокоагуляционный потенциал (Cauwenberghs et al., 2006; Keuren et al., 2006). Однако с учетом того, что в кровотоке время жизни тромбоцитарных мембранных везикул невелико (Flaumenhaft, 2006), их активность, по-видимому, может проявляться только непосредственно после переливания.

Заключение

Таким образом, в препаратах тромбоцитного концентрата присутствует несколько типов мембранных везикул, различающихся как по размеру, так и по молекулярному составу. Во время хранения происходят агрегация и изменение морфологии тромбоцитов, а также изменение белкового состава как тромбоцитов, так и мембранных везикул. Учитывая выявленные различия молекулярного состава, нельзя исключать, что функции и, следовательно, терапевтический эффект соответствующих популяций мембранных везикул различаются, что необходимо знать при применении тромбоцитных концентратов разных сроков хранения в клинике.

Работа выполнена с использованием оборудования междисциплинарного ресурсного центра по направлению «Нанотехнологии» С.-Петербургского государственного университета и при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 16-04-01142).

Список литературы

- Кондратов К. А., Петрова Т. А., Михайловский В. Ю., Иванова А. Н., Костарева А. А., Федоров А. В. 2017. Изучение внеклеточных везикул, выделенных из плазмы крови, с помощью сканирующей электронной микроскопии низкого напряжения. Цитология. 59 (3) : 169—177. (Konratov K. A., Petrova T. A., Mikhailovskii V. U., Ivanova A. N., Kostareva A. A., Fedorov A. V. 2017. Extracellular vesicles from blood plasma studied by low voltage scanning electron microscopy. Tsitologiya. 59 (3) : 169—177.)
- Пономарева А. А., Невзорова Т. А., Мордаханова Э. Р., Андрианова И. А., Литвинов Р. И. 2016. Структурная характеристика тромбоцитов и тромбоцитарных микровезикул. Цитология. 58 (2) : 105—114. (Ponomareva A. A., Nevzorova T. A., Mor-dakhanova E. R., Andrianova I. A., Litvinov R. I. 2016. Structural characterization of platelets and platelet-derived microvesicles. Tsitologiya. 58 (2) : 105—114.)
- Сироткина О. В., Ласковец А. Б., Андоскин П. А., Емельянов А. К., Заботина А. М., Вавилова Т. В. 2016. Увеличение ко-

личества рецепторов GP IIb-IIIa и P2Y12 в тромбоцитах при активации — свидетельство синтеза белков de novo. Молекуляр. биол. 50 (1) : 128—135. (Sirotkina O. V., Laskovets A. B., Andoskin P. A., Emelyanov A. K., Zabolina A. M., Vavilova T. V. 2016. Increase in GP IIb-IIIa and P2Y12 receptors in activated platelets as the possible indicator of de novo protein synthesis. Mol. Biol. 50 (1) : 111—117.)

Aatonen M. T., Ohman T., Nyman T. A., Laitinen S., Grönholm M., Siljander P. R. 2014. Isolation and characterization of platelet-derived extracellular vesicles. J. Extracell Vesicles. 6; 3. Doi: 10.3402/jev.v3.24692.

Bellhouse E. L., Inskip M. J., Davis J. G., Entwistle C. C. 1987. Pre-transfusion non-invasive quality assessment of stored platelet concentrates. Br. J. Haematol. 66 : 503—508.

Bergmeier W., Piffath C. L., Cheng G., Dole V. S., Zhang Y., von Andrian U. H., Wagner D. D. 2004. Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM17) mediates GPIIb/alpha shedding from platelets in vitro and in vivo. Circ. Res. 95 : 677—683.

Bode A. P., Orton S. M., Frye M. J., B. J. Udis. 1991. Vesiculation of platelets during in vitro aging. Blood. 77 : 887—895.

Cauwenberghs S., Feijge M. A., Harper A. G., Sage S. O., Curvers J., Heemskerk J. W. 2006. Shedding of procoagulant microparticles from unstimulated platelets by integrin-mediated destabilization of actin cytoskeleton. FEBS Lett. 580 : 5313—2530.

Cauwenberghs S., van Pampus E., Curvers J., Akkerman J. W., Heemskerk J. W. 2007. Hemostatic and signaling functions of transfused platelets. Transfus. Med. Rev. 21 : 287—294.

Chen W., Liang X., Syed A. K., Jessup P., Church W. R., Ware J., Josephson C. D., Li R. 2016. Inhibiting GPIIb/alpha shedding preserves post-transfusion recovery and hemostatic function of platelets after prolonged storage. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 36 : 1821—1828.

Cognasse F., Hamzeh-Cognasse H., Laradi S., Chou M. L., Seghatchian J., Burnouf T., Boulanger C., Garraud O., Amabile N. 2015. The role of microparticles in inflammation and transfusion: a concise review. Transfus. Apher. Sci. 53 : 159—167.

Curvers J., van Pampus E. C., Feijge M. A., Rombout-Sestri-enkova E., Giesen P. L., Heemskerk J. W. 2004. Decreased responsiveness and development of activation markers of platelets stored in plasma. Transfusion. 44 : 49—58.

Devine D. V., Serrano K. 2010. The platelet storage lesion. Clin. Lab. Med. 30 : 475—487.

Flaumenhaft R. 2006. Formation and fate of platelet microparticles. Blood Cells Mol. Dis. 36:182—187.

Frojmovic M. M., Kasirer-Friede A., Goldsmith H. L., Brown E. A. 1997. Surface-secreted von Willebrand factor mediates aggregation of ADP-activated platelets at moderate shear stress: facilitated by GPIIb but controlled by GPIIb-IIIa. Thromb. Haemost. 77 : 568—576.

Gutiérrez-López M. D., Gilsanz A., Yáñez-Mó M., Ovalle S., Lafuente E. M., Domínguez C., Monk P. N., González-Alvaro I., Sánchez-Madrid F., Cabañas C. 2011. The sheddase activity of ADAM17/TACE is regulated by the tetraspanin CD9. Cell Mol. Life Sci. 68 : 3275—3292.

Heijnen H. F., Schiel A. E., Fijnheer R., Geuze H. J., Sixma J. J. 1999. Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. Blood. 94 : 3791—3799.

Higashihara M., Takahata K., Yatomi Y., Nakahara K., Kurokawa K. 1990. Purification and partial characterization of CD9 antigen of human platelets. FEBS Lett. 264 : 270—274.

Inngerdlingen M., Waterhouse K., Solum N. O. 1999. Studies on the dual effects on platelets of a monoclonal antibody to CD9, and on the properties of platelet CD9. Thromb. Res. 95 : 215—227.

Keuren J. F., Magdeleyns E. J., Govers-Riemslog J. W., Lindhout T., Curvers J. 2006. Effects of storage-induced platelet microparticles on the initiation and propagation phase of blood coagulation. Br. J. Haematol. 134 : 307—313.

Kunicki T. J., Tuccelli M., Becker G. A., Aster R. H. 1975. A study of variables affecting the quality of platelets stored at «room temperature». Transfusion. 15 : 414—421.

- Laemmli U. K.* 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227 : 680—685.
- Linares R., Tan S., Gounou C., Arraud N., Brisson A. R.* 2015. High-speed centrifugation induces aggregation of extracellular vesicles. *J. Extracell. Vesicles*. 4 : 29509. Doi: 10.3402/jev.v4.29509.
- Longhurst C. M., White M. M., Wilkinson D. A., Jennings L. K.* 1999. A CD9, alphaIIb beta3, integrin-associated protein, and GPIb/V/IX complex on the surface of human platelets is influenced by alphaIIb beta3 conformational states. *Eur. J. Biochem*. 263 : 104—111.
- Maurer-Spurej E., Chipperfield K.* 2007. Past and future approaches to assess the quality of platelets for transfusion. *Transfus. Med. Rev.* 21 : 295—306.
- Miyamoto S., Marcinkiewicz C., Edmunds L. H., jr., Niewiarowski S.* 1998. Measurement of platelet microparticles during cardiopulmonary bypass by means of captured ELISA for GPIIb/IIIa. *Thromb. Haemost.* 80 : 225—320.
- Owens M. R., Holme S., Cardinali S.* 1992. Platelet microvesicles adhere to subendothelium and promote adhesion of platelets. *Thromb. Res.* 66 : 247—258.
- Patel S. R., Hartwig J. H., Italiano J. E., jr.* 2005. The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *J. Clin. Invest.* 115 : 3348—3354.
- Pook M., Tamming L., Padari K., Tiido T., Maimets T., Patarroyo M., Juronen E., Jaks V., Ingerpuu S.* 2014. Platelets store laminins 411/421 and 511/521 in compartments distinct from α - or dense granules and secrete these proteins via microvesicles. *J. Thromb. Haemost.* 12 : 519—527.
- Prudova A., Serrano K., Eckhard U., Fortelny N., Devine D. V., Overall C. M.* 2014. TAILS N terminomics of human platelet reveals pervasive metalloproteinase-dependent proteolytic processing in storage. *Blood*. 124 : e49—e60.
- Riccardi D., Raspollini E., Rebulli P., Pappalettera M., Marangoni F., Greppi N., Sircchia G.* 1997. Relationship of the time of storage and transfusion reactions to platelet concentrates from buffy coats. *Transfusion*. 37 : 528—530.
- Rosenfeld B. A., Herfel B., Faraday N., Fuller A., Braine H.* 1995. Effects of storage time on quantitative and qualitative platelet function after transfusion. *Anesthesiology*. 83 : 1167—1172.
- Slichter S. J., Harker L. A.* 1976. Preparation and storage of platelet concentrates. I. Factors influencing the harvest of viable platelets from whole blood. *Br. J. Haematol.* 34 : 395—402.
- Tans G., Rosing J., Thomassen M. C., Heeb M. J., Zwaal R. F., Griffijn J. H.* 1991. Comparison of anticoagulant and procoagulant activities of stimulated platelets and platelet-derived microparticles. *Blood*. 77 : 2641—2648.
- Thiele T., Steil L., Gebhard S., Scharf C., Hammer E., Brigulla M., Lubenow N., Clemetson K. J., Völker U., Greinacher A.* 2007. Profiling of alterations in platelet proteins during storage of platelet concentrates. *Transfusion*. 47 : 1221—1233.
- Thon J. N., Devine D. V.* 2007. Translation of glycoprotein IIIa in stored blood platelets. *Transfusion*. 47 : 2260—2270.
- Thon J. N., Schubert P., Devine D. V.* 2008. Platelet storage lesion: a new understanding from a proteomic perspective. *Transfus. Med. Rev.* 22 : 268—279.
- Wadhawan V., Karim Z. A., Mukhopadhyay S., Gupta R., Dikshit M., Dash D.* 2004. Platelet storage under *in vitro* condition is associated with calcium-dependent apoptosis-like lesions and novel reorganization in platelet cytoskeleton. *Arch. Biochem. Biophys.* 422 : 183—190.
- Weyrich A. S., Lindemann S., Tolley N. D., Kraiss L. W., Dixon D. A., Mahoney T. M., Prescott S. P., McIntyre T. M., Zimmerman G. A.* 2004. Change in protein phenotype without a nucleus: translational control in platelets. *Semin. Thromb. Hemost.* 30 : 491—498.
- White I. I., Gilbert C.* 2006. Congenital and acquired platelet disorders: current dilemmas and treatment strategies. *Semin. Hematol.* 43 : S37—S41.
- Wolf P.* 1967. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br. J. Haematol.* 13 : 269—288.
- Zdebska E., Woźniak J., Dzieciatkowska A., Kościelak J.* 1998. In comparison to progenitor platelets, microparticles are deficient in GpIb, GpIb-derived carbohydrates, glycerophospholipids, glycosphingolipids, and ceramides. *Acta Biochim. Pol.* 45 : 417—428.

Поступила 3 III 2017

DIFFERENTIAL EXPRESSION OF CD42b AND CD9 PROTEINS IN PLATELETS AND EXTRACELLULAR MEMBRANE VESICLES DURING STORAGE OF PLATELET CONCENTRATE

V. V. Kishenko,¹ K. A. Kondratov,^{1,*} M. V. Belyakova,¹ V. Yu. Mikhailovskii,² S. V. Sidorkevich,¹
T. V. Vavilova,¹ A. V. Fedorov,^{1,3} O. V. Sirotkina^{1,4}

¹ Federal V. A. Almazov North-West Medical Research Centre, St. Petersburg, 197341,

² St. Petersburg State University, Interdisciplinary Resource Center for Nanotechnology, St. Petersburg, 199034,

³ St. Petersburg State University, Department of Cytology and Histology, St. Petersburg, 199034, and

⁴ B. P. Konstantinov St. Petersburg Institute of Nuclear Physics, «Kurchatov Institute» National Research Center, Gatchina, Leningrad Region, 188300;

* e-mail: kondratovk.kirill@yandex.ru

Platelet concentrates are used to restore and maintain hemostasis in patients with reduced number or activity of platelets. Properties of platelet concentrates gradually change during storage, which leads to a weakening of the therapeutic effect and causes adverse transfusion reactions. One of the processes that alter platelet concentrates during storage is secretion of several types of membrane vesicles. Platelet derived membrane vesicles affect homeostasis and mediate intercellular communication. However, mechanisms of their formation, regulatory activity and molecular composition are still poorly understood. In this study, we have evaluated expression of CD42b and CD9 surface proteins in platelets and platelet derived membrane vesicles during storage of platelet concentrate. Membrane vesicles populations of different sizes were isolated from platelet concentrates and characterized. Protein composition of platelets and membrane vesicles differs. During storage platelets showed morphological alterations and form aggregates. In addition, protein composition of platelets and membrane vesicle changed, and there a significant increase of CD42b and CD9 proteins levels in the fractions of membrane vesicles. These results indicate that platelet concentrates contain different populations of membrane vesicles, and their molecular compositions change during storage.

Key words: platelet storage lesion, platelet activation, extracellular membrane vesicles, exosomes, microvesicles, differential centrifugation, CD9, CD42b.