

DOI: 10.31116/tsitol.2018.07.15

ВЫДЕЛЕНИЕ ТРОМБОЦИТАМИ МЕМБРАННЫХ ВЕЗИКУЛ, НЕСУЩИХ ЗРЕЛУЮ микроРНК-221 И АКТИВИРОВАННУЮ КАСПАЗУ-3, В ПРОЦЕССЕ ХРАНЕНИЯ ТРОМБОЦИТНОГО КОНЦЕНТРАТА

© В. В. Кищенко,¹ К. А. Кондратов,¹ В. Ю. Михайловский,² С. В. Сидоркевич,¹
Т. В. Вавилова,¹ О. В. Сироткина,^{1,3,4,*} А. В. Федоров¹

¹Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова
Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, 197341,

²С.-Петербургский государственный университет, Междисциплинарный ресурсный центр
по направлению «Нанотехнологии», Санкт-Петербург, 199034,

³Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова
Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»,
Гатчина, Ленинградская обл., 188300 и

⁴Первый С.-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова
Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, 197022;

* электронный адрес: olga_sirotkina@mail.ru

Процесс приготовления и хранения препаратов тромбоцитного концентрата может сопровождаться активацией тромбоцитов и запуском в них апоптоза, в результате чего усиливается образование тромбоцитарных мембранных везикул и ухудшаются терапевтические свойства таких препаратов. Однако механизмы регуляции апоптоза в тромбоцитах и молекулярный состав тромбоцитарных мембранных везикул, связанных с этим процессом, до сих пор остаются мало изученными. Целью работы было изучение уровней проапоптотической каспазы-3 и антиапоптотической микроРНК-221 в тромбоцитах и тромбоцитарных мембранных везикулах при хранении препаратов тромбоцитного концентрата. Объектом исследования были образцы пулированных тромбоцитных концентратов ($n = 6$), отобранные из контейнеров на 2-е и 7-е сут хранения. Установлено, что препараты тромбоцитных концентратов содержат каспазу-3 и ее активированную форму как в составе тромбоцитов, так и во фракциях мембранных везикул. При хранении в тромбоцитах увеличивается доля активированной каспазы-3. МикроРНК-221 присутствует в тромбоцитах, фракциях мембранных везикул, а также во вневезикулярной фракции. В процессе хранения количество микроРНК-221 повышается в 8 раз ($P = 0.004$) во фракции мембранных везикул, осаждаемых при 100 000 g. Результаты работы свидетельствуют о том, что мембранные везикулы, выделяемые тромбоцитами в процессе хранения, несут зрелую микроРНК-221 и активированную форму каспазы-3.

Ключевые слова: тромбоцитный концентрат, мембранные везикулы, экзосомы, микроРНК-221, каспаза-3

Принятые сокращения: СЭМНН — сканирующая электронная микроскопия низкого напряжения.

Тромбоцитный концентрат, получаемый из донорской крови, является важным средством терапии патологий, требующих восстановления гемостаза (Tunngard, 2009). Свойства тромбоцитного концентрата меняются в процессе хранения. Одними из основных причин ухудшения качества тромбоцитного концентрата являются активация тромбоцитов и запуск в них апоптоза (Leutin et al., 2008). Оба процесса сопровождаются выделением тромбоцитарных мембранных везикул (Heijnen et al., 1999; Jackson, Schoenwaelder, 2010). Продукты генов апоптотического сигнального пути, в частности эффекторной каспазы-3, присутствуют в тромбоцитах как в форме неак-

тивных проферментов, так и мРНК (Li et al., 2000), поэтому реализация программы апоптоза в тромбоцитах может регулироваться как на уровне активации соответствующих белков, так и посредством модуляции их синтеза de novo. Однако механизмы такой регуляции до сих пор остаются мало изученными. МикроРНК — класс молекул, которые в тромбоцитах активно вовлечены в посттранскрипционную регуляцию экспрессии (Landry et al., 2009). МикроРНК-221 известна как супрессор апоптоза опухолевых клеток, в том числе и посредством прямой негативной регуляции каспазы-3 (Wang et al., 2015; Fornari et al., 2017; Jin et al., 2018). МикроРНК-221 присутст-

вует в значительных количествах в тромбоцитах (Pontes et al., 2015), однако ее роль в регуляции апоптоза тромбоцитов пока не определена.

В настоящей работе изучены уровни каспазы-3 и микроРНК-221 в тромбоцитах и тромбоцитарных мембранных везикулах при хранении препаратов тромбоцитного концентрата.

Материал и методика

Получение и фракционирование препаратов тромбоцитного концентрата. Препараты тромбоцитного концентрата были получены на станции переливания крови НМИЦ им. В. А. Алмазова в соответствии с национальным стандартом РФ ГОСТ Р 53420-2009. Применялся метод пулирования материала от четырех доноров. Хранение осуществляли с соблюдением всех требований. Образцы тромбоцитных концентратов ($n = 6$) отбирали в стерильных условиях на 2-е и 7-е сут хранения. Фракции тромбоцитов, а также осадков после центрифугирования при 16 000 и 100 000 g , содержащие мембранные везикулы, и обедненный везикулами супернатант получали с помощью описанной ранее методики дифференциального центрифугирования (Кищенко и др., 2017). Для визуализации объектов из фракций тромбоцитного концентрата применяли описанный ранее протокол сканирующей электронной микроскопии низкого напряжения (СЭМНН) (Кищенко и др., 2017).

Иммуноблотинг. Разделение белков в полиакриламидном геле, электроперенос на нитроцеллюлозную мембрану и регистрацию сигнала от вторичных антител выполняли, как описано ранее (Кищенко и др., 2017). Для детекции полноразмерной и активированной (расщепленной) форм каспазы-3 использовали первичные антитела 8G10 (Cell Signaling, США).

Количественное измерение уровней микроРНК. Выделение общей РНК из фракций тромбоцитного концентрата и количественную ПЦР в реальном времени выполняли по описанным ранее методикам (Kondratov et al., 2016). Для детекции зрелой микроРНК-221 использовали набор 000524 (Life Technologies, США). Относительное количество микроРНК-221 определяли как

$2^{(34-Cq)}$, где Cq — значение цикла квантификации. Статистический анализ и визуализацию результатов измерений проводили с помощью программного пакета R версии 2.15.2. Для анализа различий уровней микроРНК использовали парный t -критерий. Различия считали статистически значимыми при $P < 0.05$.

Результаты и обсуждение

Препараты тромбоцитных концентратов были разделены на фракцию тромбоцитов, фракции объектов, осаждающихся после центрифугирования при 16 000 и 100 000 g , а также фракцию супернатанта. С помощью СЭМНН во фракциях осадков после центрифугирования при 16 000 и 100 000 g наблюдали околосферические частицы диаметром около 200 и 50 нм соответственно (рис. 1). Выявленные частицы, по всей видимости, соответствуют описанным ранее тромбоцитарным мембранным везикулам — микровезикулам и экзосомам (Heijnen et al., 1999).

Ранее нами было показано, что белковый состав полученных фракций тромбоцитных концентратов различается и, кроме того, меняется в процессе хранения (Кищенко и др., 2017). В настоящей работе с помощью иммуноблотинга в тромбоцитах детектирована как полноразмерная, так и активированная формы каспазы-3 (рис. 2, б). Доля активированной формы значительно возрастает на 7-е сут, что свидетельствует о развитии апоптоза в процессе хранения исследуемых тромбоцитных концентратов и согласуется с данными литературы (Li et al., 2000). Вне тромбоцитов полноразмерная и активированная формы каспазы-3 присутствуют во фракциях мембранных везикул, осаждаемых при 16 000 и 100 000 g , но не в супернатанте. Эти наблюдения подтверждают и дополняют представления о присутствии полноразмерной и активированной форм каспазы-3 в мембранных везикулах, осаждаемых центрифугированием при 18 890 g (Voing et al., 2008).

С помощью количественной ПЦР в реальном времени зрелая микроРНК-221 была выявлена как в тромбоцитах, так и во всех внутромбоцитарных фракциях (рис. 2, а). Большая часть общей зрелой микроРНК-221

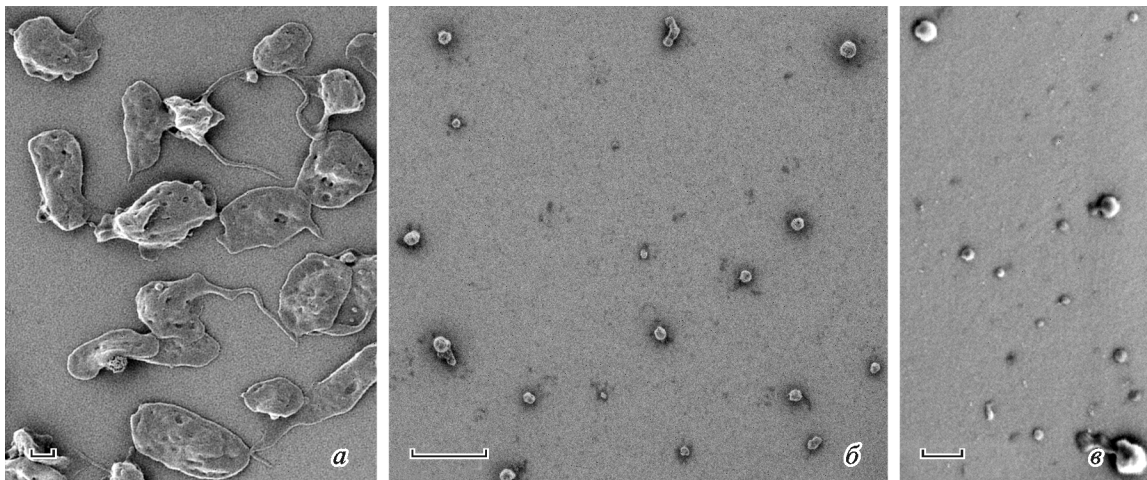


Рис. 1. Визуализация с помощью СЭМНН объектов в препарате тромбоцитов (а), а также во фракциях осадков после центрифугирования тромбоцитных концентратов при 16 000 g (б) и 100 000 g (в).

Масштабные отрезки: а, б — 1000 нм, в — 200 нм.

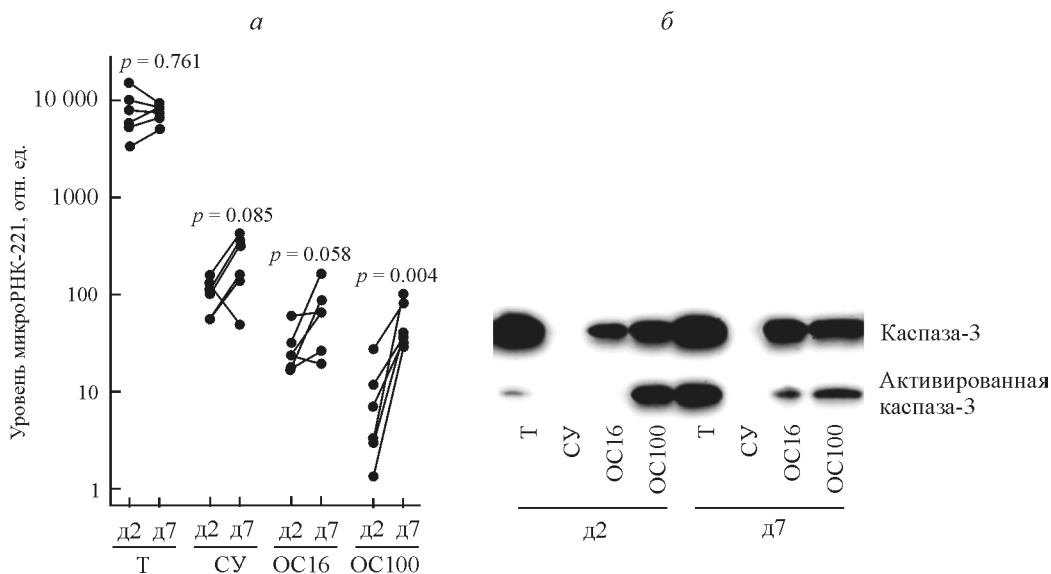


Рис 2. Содержание микроРНК-221 и каспазы-3 во фракциях тромбоцитного концентрата на 2-е (д2) и 7-е (д7) сут хранения. а — относительные уровни микроРНК-221; б — детекция полноразмерной и активированной форм каспазы-3. Т — тромбоциты, СУ — супернатант, ОС16 и ОС100 — фракции осадков после центрифугирования при 16 000 и 100 000 g соответственно.

препаратов тромбоцитных концентратов содержится в тромбоцитах. В процессе хранения доля зрелой микроРНК-221 в тромбоцитах не меняется, а во внутромбоцитарных фракциях увеличивается с 2 до 5 % ($P = 0.002$). На 2-е сут хранения внутромбоцитарная зрелая микроРНК-221 распределена по фракциям следующим образом: 78 % — супернатант, 17 — ОС16, 5 % — ОС100. На 7-е сут хранения уровни зрелой микроРНК-221 во фракции экзосом (ОС100) увеличиваются в 8 раз ($P = 0.004$), что указывает на возможность использования экзосомальной микроРНК-221 в качестве маркера, характеризующего изменения свойств тромбоцитных концентратов при хранении.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что во время хранения тромбоциты выделяют каспазу-3 и зрелую микроРНК-221 во фракциях мембранных везикул. Попадание каспазы-3 и микроРНК-221 в мембранные везикулы может быть механизмом вывода этих молекул из регуляторных путей тромбоцитов в процессе хранения. Дальнейших исследований требует вопрос о возможности транспорта активированной каспазы-3 и зрелой микроРНК-221 в составе тромбоцитарных мембранных везикул в клетки-реципиенты и последующей реализации их про- и антиапоптотической активности.

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

Список литературы

Кишенко В. В., Кондратов К. А., Белякова М. В., Михайловский В. Ю., Сидоркевич С. В., Вавилова Т. В., Федоров А. В., Сироткина О. В. 2017. Дифференциальная экспрессия белков CD42b и CD9 в тромбоцитах и внеклеточных мембранных везикулах при хранении тромбоцитарного концентрата. Цитология. 59 (7): 467—473. (Kishenko V. V., Kondratov K. A., Belyakova M. V., Mikhailovskii V. Yu., Sidorkevich S. V., Vavilova T. V., Fedorov A. V., Sirotkina O. V. 2017. Differential expression of CD42b and CD9 proteins in platelets and extracellular membrane vesicles during platelet-concentrate storage. Cell Tissue Biol. 11 (6): 440—446.)

Boing A. N., Hau C. M., Sturk A., Nieuwland R. 2008. Platelet microparticles contain active caspase 3. Platelets. 19: 96—103.

Fornari F., Pollutri D., Patrizi C., La Bella T., Marinelli S., Casadei Gardini A., Marisi G., Baron Toaldo M., Baglioni M., Salvatore V., Callegari E., Baldassarre M., Galassi M., Giovannini C., Cescon M., Ravaoli M., Negrini M., Bolondi L., Gramantieri L. 2017. In hepatocellular carcinoma miR-221 modulates sorafenib resistance through inhibition of caspase-3-mediated apoptosis. Clin. Cancer Res. 23: 3953—3965.

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.

Jackson S. P., Schoenwaelder S. M. 2010. Procoagulant platelets: are they necrotic? Blood. 116: 2011—2018.

Jin X., Cai L., Wang C., Deng X., Yi S., Lei Z., Xiao Q., Xu H., Luo H., Sun J. 2018. CASC2/miR-24/miR-221 modulates the TRAIL resistance of hepatocellular carcinoma cell through caspase-8/caspase-3. Cell Death Dis. 9: 318.

Kondratov K., Kurapeev D., Popov M., Sidorova M., Minasian S., Galagudza M., Kostareva A., Fedorov A. 2016. Heparinase treatment of heparin-contaminated plasma from coronary artery bypass grafting patients enables reliable quantification of microRNAs. Biomolecular Detection and Quantification. 8: 9—14.

Landry P., Plante I., Ouellet D. L., Perron M. P., Rousseau G., Provost P. 2009. Existence of a microRNA pathway in anucleate platelets. Nat. Struct. Mol. Biol. 16: 961—966.

Leytin V., Allen D. J., Mutlu A., Mykhalov S., Lyubimov E., Freedman J. 2008. Platelet activation and apoptosis are different phenomena: evidence from the sequential dynamics and the magnitude of responses during platelet storage. Br. J. Haematol. 142: 494—497.

Li J., Xia Y., Bertino A. M., Coburn J. P., Kuter D. J. 2000. The mechanism of apoptosis in human platelets during storage. Transfusion. 40: 1320—1329.

Pontes T. B., Moreira-Nunes Cde F., Maues J. H., Lama-rao L. M., de Lemos J. A., Montenegro R. C., Burbano R. M. 2015. The miRNA profile of platelets stored in a blood bank and its relation to cellular damage from storage. PLoS ONE. 10 : e0129399.

Tynngard N. 2009. Preparation, storage and quality control of platelet concentrates. Transfus. Apher. Sci. 41 : 97—104.

Wang L., Liu C., Li C., Xue J., Zhao S., Zhan P., Lin Y., Zhang P., Jiang A., Chen W. 2015. Effects of microRNA-221/222 on cell proliferation and apoptosis in prostate cancer cells. Gene. 572 : 252—258.

Поступила 20 III 2018

PLATELETS RELEASE MEMBRANE VESICLES CARRYING THE MATURE microRNA-221 AND ACTIVATED CASPASE-3 DURING THE PLATELET CONCENTRATE STORAGE

V. V. Kishenko,¹ K. A. Kondratov,¹ V. Yu. Mikhailovskii,² S. V. Sidorkevich,¹
T. V. Vavilova,¹ O. V. Sirotkina,^{1,3,4,*} A. V. Fedorov¹

¹ V. A. Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, 197341,

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

³ Konstantinov Petersburg Nuclear Physics Institute, National Research Centre «Kurchatov Institute»,
Gatchina, Leningrad Region, 188300, and

⁴ I. P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University, Ministry of Healthcare of Russian Federation,
St. Petersburg, 197022;

* e-mail: olga_sirotkina@mail.ru

The isolation and storage of platelet concentrates can be accompanied by platelets activation and apoptosis, which cause membrane vesicles release and decline in therapeutic properties of concentrates. However, the mechanisms for the regulation of platelet apoptosis as well as the molecular composition of platelet membrane vesicles remain poorly understood. The aim of the study was to analyze the levels of pro-apoptotic caspase-3 and anti-apoptotic microRNA-221 in platelets and platelet membrane vesicles during storage of platelet concentrates. The object of the study was samples of the pooled platelet concentrates (n = 6), collected from the containers on the 2nd and the 7th day of storage. Full length and activated caspase-3 were found in platelets and in fractions of membrane vesicles. The proportion of activated caspase-3 in platelets increased during storage. MicroRNA-221 was found in platelets, fractions of membrane vesicles, as well as in the extravesicular fraction. During storage, levels of microRNA-221 increased 8-fold ($P = 0.004$) in the fraction of membrane vesicles pelleted at 100 000 g. The results of the work indicate that the membrane vesicles, released by platelets during storage, carry the mature microRNA-221 and the activated form of caspase-3.

Key words: platelet concentrate, membrane vesicles, exsomes, microRNA-221, caspase-3