

УДК 577.3

© А. А. Зінченко, В. М. Шаталов

ВПЛИВ ЦЕНТРИФУГУВАННЯ ПЛАЗМИ КРОВІ НА ФУНКЦІОНАЛЬНУ АКТИВНІСТЬ ТРОМБОЦИТІВ *IN VITRO*

Донецький національний університет; 83050, м. Донецьк, вул. Щорса, 46
e-mail: vladishat@gmail.com

Зінченко А. А., Шаталов В. М. Вплив центрифугування плазми крові на функціональну активність тромбоцитів *in vitro*. – Досліджено *in vitro* зміну функціонування тромбоцитів у відповідь на видалення з плазми розчинених газів. Дегазація зразків плазми проводилася за допомогою центрифугування за раніше розробленою методикою. Показано, що дегазація призводить до значного зростання як спонтанної, так і індукованої агрегації, і додавання інгібітору агрегації аспірину не змінює картину незалежно від дози. Зроблено висновок про можливу причину підвищення ризику тромбоутворення *in vivo* внаслідок неконтрольованих зовнішніх впливів.

Ключові слова: кров, повітря, бульбашки, дегазація, тромбоцити, агрегація, аспірин, серцево-судинні захворювання.

PACS: 87.19.U-;87.50.-a;87.55.ne

Вступ

Як відомо, система гемостазу складається з ферментів і інших біохімічних факторів плазми, тромбоцитів й інтимі кровоносних судин. Із фізіологічної точки зору виділяють судинно-тромбоцитарний гемостаз, який здійснює первинну реакцію на ушкодження судин мікроциркуляційного русла [1, 2]. Він формується судинною стінкою й тромбоцитами, які забезпечують зупинку кровотечі на початкових етапах через рефлекторний спазм судин з адгезією й агрегацією тромбоцитів. При активації тромбоцитів виникає однотипна реакція, що завершується активацією фосфоліпази. У результаті мембрана кліток стає податливою й може вступати в контакт із сусідніми клітками, через що тромбоцити можуть агрегувати один з одним і утворювати тромбоцитарний тромб. Активування тромбоцитів – дуже важливий етап гемостатичного процесу, тому що він лежить в основі як нормального гемостазу, так і патологічного утвору тромбів і дісимільованого внутрішносудинного згортання. Постійне надлишкове активування тромбоцитів – один з істотних етапів атерогенезу й судинних поразок.

Відомо, що будь-яке біологічне порушення системи гемостазу приводить до ненадійності функціонування регуляторних механізмів і виникненню передтромбозного стану [1, 2]. Самостійною причиною розвитку гострого коронарного синдрому є вікові зміни гемостазу, існуює також ряд інших факторів, які можуть прискорити розвиток ішемічного процесу. У дослідженнях окремих ланцюжків гемостазу показано [3], що при коронарному тромбозі в'язкість крові підвищується в 5-10 разів і головна роль у такому процесі належить саме судинно-тромбоцитарним взаємодіям. За деякими даними [4], у хворих з гострою серцевою недостатністю значно підвищується ступінь агрегації тромбоцитів паралельно зі зміною концентрації фібриногену, тромбінового часу й інших біохімічних показників, що характеризують важкість захворювання. У зв'язку з цим комплексна терапія хворих включає такі препарати, які впливають на функціональний стан системи гемостазу. Так, аспірин і його аналоги (кардіомагніл, тромбоас) широко використовується в кардіологічній практиці для зниження агрегації тромбоцитів [5]. Метод профілактики ішемічної хвороби серця шляхом приймання міні-доз аспірину одержав широке поширення в розвинених країнах.

У цьому зв'язку в цій роботі досліджується зміна інгібіруючої дії аспірину та швидкості агрегації тромбоцитів у плазмі, з якої вилучені розчинені гази, й обговорюються можливі причини спостережуваних при цьому змін функцій тромбоцитів.

Передумовою для проведення таких досліджень є повідомлення, які з'являються останнім часом [6], про біологічні ефекти, що пов'язані з розчиненим у рідині повітрям. Результати багатьох робіт указують на визначальну роль границі розділу вода-повітря як при контакті з атмосферою, так і в мікробульбашках, які спонтанно утворюються в об'ємі води

через гідрофобність розчиненого повітря. Те ж саме відноситься й до біорідини на основі води. Автори роботи [7], дослідивши поведінку швидкості осідання еритроцитів при компресії й декомпресії, доходять висновку, що отримані результати можна пояснити, якщо припустити існування пов'язаних з еритроцитами газових порожнин. Згідно [7] ці порожнини, можливо, існують у вигляді кластерів із дрібних порожнеч і мають вільну границю з рідиною, подібно тому, як це влаштоване в клітках фітопланктону. Зовсім недавно існування бульбашок або їх кластерів на поверхні еритроцита було підтверджено методом лазерної інтерференційної мікроскопії [8]. Видалення розчиненого повітря (або дегазація) змінює фізико-хімічні властивості біорідини, такі як електропровідність, кислотність, прозорість [9], що позначається на медико-біологічних показниках [10]. Дегазація плазми крові *in vitro* суттєво змінює такі показники, як активність системи, що згортає кров [11], зміст глюкози в крові [12], швидкість осідання еритроцитів [13] та ін.

Одним з авторів запропонована теоретична модель [14], згідно з якою тривалий вплив слабких електромагнітних полів приводить до росту мікробульбашок і дегазації біорідини, тобто до зміни співвідношення між кількістю газу у вигляді дійсного розчину й у колоїді з мікробульбашок. Задача про вплив такого процесу на функції біорідини є досить актуальною в зв'язку зі зростаючим забрудненням навколишнього середовища електромагнітними полями від промислових та побутових джерел. Існування такого зв'язку могло б пояснити тенденцію до росту частоти серцево-судинних захворювань (ССЗ), що намітилася в останні роки в промислово розвинених країнах. Тому, на нашу думку, питання про вплив газів, що розчинені в крові, на функціональну активність тромбоцитів є досить актуальним.

Матеріали та методи дослідження

Готування зразків. Матеріалом для дослідження слугувала збагачена тромбоцитами плазма з крові здоровіших донорів. Перед узяттям крові в пробірки обсягом 10 мл наливали по 1 мл антикоагулянту, як антикоагулянт використовували 130 мМ розчин цитрату натрію. Кров брали по два зразки від кожного донора з ліктьової вени по 9мл у кожен пробірку, доводили до 10 мл, закривали пробкою й негайно перемішували. Для одержання плазми зразки центрифугували протягом 7 хвилин на швидкості 2000 об./хв. (більш тривале обробка приводить до збідніння плазми тромбоцитами). Після чого з кожного зразка обережно відбирали 2.5 мл верхнього шару – зразки готової плазми (позначка «норма» в табл. 1).

Дегазація зразків. Дегазація плазми проводилася за допомогою центрифугування зразків за раніше розробленою методикою [11-13]. Дегазація під час центрифугування здійснюється за рахунок, по-перше, підвищення тиску в рідині, внаслідок чого за законом Генрі газ переходить із розчину в бульбашки. А по-друге, багаторазово збільшена сила Архімеда пришвидшує спливання мікробульбашок. Крива на рис. 1 зв'язує тривалість центрифугування зі ступенем дегазації плазми крові.

При цьому визначення змісту газів, розчинених у плазмі крові, проводилось в окремих пробах без доступу повітря при атмосферному тиску 743 mmHg на модульному аналізаторі OMNI C фірми Roche (Швейцарія). Для цього плазма попередньо відділялася від еритроцитів після 15 хвилин центрифугування при 3000 об./хв. і температурі 4°C. Потім при кімнатній температурі частина плазми витримувалася в центрифугі при 3000 об./хв. протягом t_d хвилин, а інша частина залишалася як контроль.

У цій роботі дегазація здійснювалася додатковим центрифугуванням зразків протягом $t_d = 15$ хв. на 3000 об./хв., після чого обережно, не струшуючи, перемішували плазму напівавтоматичною піпеткою з пластиковим наконечником. Відповідно до рис. 1 така процедура додатково видаляє з плазми 70% O_2 і 85% CO_2 . Оброблені таким чином зразки мають позначки «дегазація» в табл. 1.

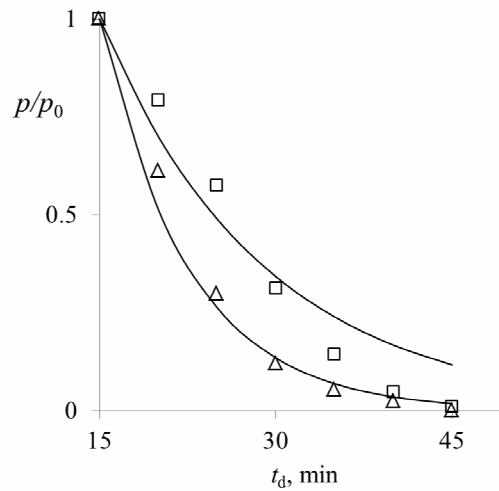


Рис. 1. Парціальний тиск розчиненого кисню (квадрати) і вуглекислого газу (трикутники) у зразках плазми крові залежно від тривалості центрифугування t_d при 3000 об./хв. щодо контрольного тиску p_0 ; безперервні лінії – інтерполяційні формули $\exp(-t_d/14)$ і $\exp(-t_d/7,5)$ відповідно (за даними [13]).

Інгібітори агрегації. В окремі зразки плазми додавали суспензію аспірину з розрахунку відповідної дози 250, 325, 500 мг аспірину на людину на добу. Мікродози аспірину одержували із препаратів ацетилсаліцилової кислоти виробників Україна ВАТ «Фармак» (Київ) і ТВО «Фармацевтична Компанія Здоров'я» (Харків). З таблеток готували навішення по 0,025; 0,035; 0,05 мг і розчиняли в 5 мл стерильного ізотонічного розчину натрію хлориду й центрифугували 15 хвилин при 3000 об./хв., фільтрували через бактеріальний фільтр. Потім робили добавки з розрахунку 10 мкл фільтрату й 10, 30, 40 мкл ізотонічного розчину для моделювання в кровеноснім руслі відповідних доз добового приймання 250, 325, 500 мг аспірину. Чотири різні зразки плазми поміщали в імунологічні планшетки 8 x 12 по 8 проб кожного зразка. Потім у кожний зразок вносили 80, 60 і 50 мкл плазми й інкубували 15 хвилин при температурі 37°C. По закінченню інкубації проби плазми вносили в агрегометр. У різних серіях спроб поряд зі спонтанною агрегацією в якості індукторів агрегації використовувалися адреналін і аденозін-5'-діфосфат (АДФ).

Індуктори агрегації. Досліджувалася спонтанна агрегація, агрегація під дією низьких концентрацій індукторів, а також агрегація зразків, перемішаних із суспензією дезагрегатора (аспірину). Як індуктори агрегації нормальної й дегазованої плазми застосовувалися адреналін і АДФ. Останній готували з розчину АДФ фірми Serva с М=529 у концентрації 155 мкМ. Проби з нормальною й дегазованою плазмою індукували при 37°C додаванням 0,1 мкл АДФ. У плазму з аспірином додавали 0,5 мкл АДФ.

Визначення функціональної активності тромбоцитів. Ступінь агрегації тромбоцитів A визначався на агрегометрі фірми TECAN (Австрія) високочутливим турбідиметричним методом Борна [15], заснованим на реєстрації зміни світлопрозорості збагаченої тромбоцитами плазми. Показник агрегації визначали за кривою світлопрозорості як максимальне збільшення світлопрозорості після додавання індуктора. При дослідженні спонтанної агрегації в зразках із суспензією аспірину, індукованої 0,5 мкл АДФ, визначали дві показникові агрегації за двома максимумами та швидкість агрегації, яку визначали як максимальний спад кривої середнього розміру у відносних одиницях. Середній розмір агрегатів у даних зразках плазми зростав монотонно, тому для розумної інтерпретації показник агрегації визначали через 5 хвилин після початку перемішування, як рекомендовано для пацієнтів з ішемічною хворобою серця, що проходять медикаментозну терапію.

Аналогічні дослідження проводили з дегазованою плазмою, при цьому попередньо перед інкубацією для зменшення контакту з повітрям закривали імунологічну планшечку

чистим фрагментом поліетиленової плівки. Для контролю були також проведені виміри з частиною зразків, що не зазнали ніякої обробки. Ці значення приймалися за норму для кожного зразка, відносно якої визначалися зміни в результаті того або іншого впливу.

Результати та обговорення

Табл. 1 містить усереднені результати вимірів із вказівкою стандартних відхилень. Фактори впливу й методи агрегації перераховані в заголовках стовпців і рядків відповідно. Дія кожного з 10 факторів, а також контрольні спроби перевірялися на чотирьох зразках у восьми повторностях. Маючи на меті прослідкувати за тенденцією змін активності тромбоцитів, ми наводимо лише відносні зміни, оскільки зразки плазми різних донорів мають зазвичай різні абсолютні значення ступені агрегації. Для кожної серії спроб обчислювалася величина зміни відносно контролю $\Delta A/A$, результати усереднилися за 8 повторностями з обчисленням стандартного відхилення, а потім ці значення усереднилися за чотирма різними зразками для кожного з діючих факторів і методів агрегації.

Таблиця 1

Зміни ступеня спонтанної, адреналін- та АДФ-індукованої агрегації тромбоцитів $\Delta A/A$ під дією різних факторів (у відсотках щодо контролю)

Серія	Фактор \ Метод	Спонтанна (Sp)	Адреналін (Adr)	АДФ (ADP)
1	Норма + 250 мг Аспірину	-60 ± 14	-48 ± 2	-30 ± 4
2	Норма + 325 мг Аспірину	-61 ± 7	-50 ± 3	-31 ± 4
3	Норма + 500 мг Аспірину	-60 ± 8	-51 ± 3	-39 ± 3
4	Дегазація + 0 мг Аспірину	248 ± 23	46 ± 5	56 ± 5
5	Дегазація + 250 мг Аспірину	267 ± 22	59 ± 6	54 ± 5
6	Дегазація + 325 мг Аспірину	266 ± 21	62 ± 6	52 ± 6
7	Дегазація + 500 мг Аспірину	267 ± 20	64 ± 6	51 ± 6
8	Норма + Дегазація + 250 мг Аспірину	16 ± 12	-20 ± 4	-15 ± 6
9	Норма + Дегазація + 325 мг Аспірину	21 ± 9	-21 ± 4	-15 ± 5
10	Норма + Дегазація + 500 мг Аспірину	23 ± 13	-21 ± 5	-14 ± 4

Результати контрольних вимірів ступеню агрегації для зразків, що не зазнали ніякої обробки, були такі: $A = 20,8 \pm 1,1$, $49,7 \pm 1,5$ і $50,6 \pm 1,6\%$ відповідно для спонтанної, адреналін- і АДФ-агрегації. Таким чином, за нормальних умов індуктори прискорюють спонтанну агрегацію у 2,5 разів.

На рис. 2 отримані результати представлені у вигляді гістограми. Як видно з рис. 2, ступінь спонтанної й індукованої агрегації тромбоцитів суттєво зменшується при додаванні аспірину (серії 1-3), що відповідає загальноприйнятим уявленням про інгібувальну дію аспірину. Слабка залежність від дози свідчить про те, що концентрація інгібітору близька до насичення.

Дегазація зразків плазми приводить до значного росту як спонтанної, так і індукованої агрегації, і додавання аспірину не міняє картину незалежно від дози (серії 4-7). Крім того, дегазація зменшує в кілька раз ефективність дії індукторів агрегації. У контрольних зразках швидкості адреналін- або АДФ-індукованої агрегації в кілька разів перевищували швидкість спонтанної агрегації, але в дегазованих зразках дія індукторів ослаблена. Як видно з рис. 2, найбільші зміни в порівнянні з контролем спостерігаються при спонтанній агрегації тромбоцитів, додавання індукторів слабо міняє ступінь агрегації, оскільки дегазація сама по собі діє як індуктор агрегації. У дегазованих зразках плазми вже в першу хвилину спостерігалася різке збільшення світлопрозорості плазми, що свідчить про бурхливу агрегацію тромбоцитів. Можна говорити про гіперактивацію тромбоцитів або про «синдром в'язких тромбоцитів». Слід відмітити появу необоротної агрегації в дегазованих зразках плазми при стимуляції АДФ і адреналіном у концентраціях, що викликають у нормі

оборотну агрегацію. Спільна дія дегазації й індукторів приводить до перевищення межі оборотної агрегації. Така ж підвищена агрегація спостерігається у всіх досліджуваних зразках плазми з аспірином. Агрегація не знижується навіть при збільшенні концентрації аспірину вдвічі.

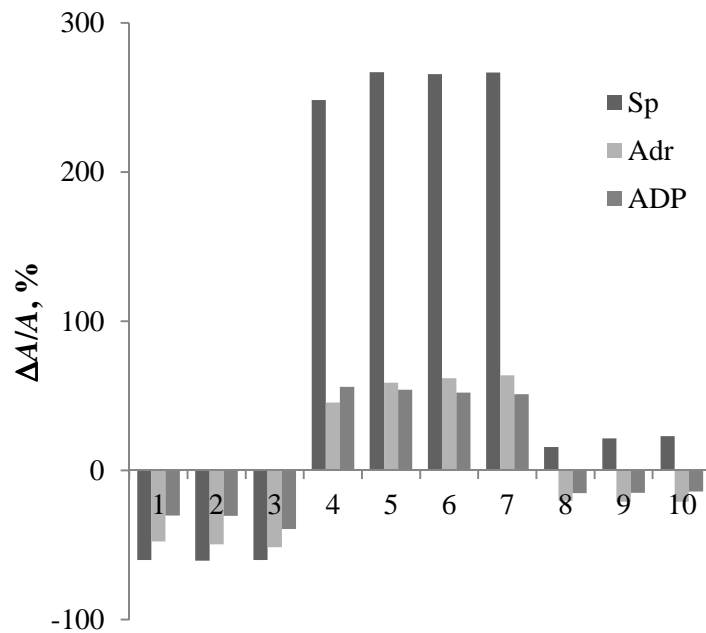


Рис. 2. Результати 10-ти серій дослідів зміни ступеня спонтанної (Sp), адреналін (Adr) та АДФ (ADP) індукованої агрегації тромбоцитів $\Delta A/A$ (у відсотках щодо контролю) під дією 10-ти різних факторів, що наведені у табл. 1.

Для підтвердження інгібуючої дії розчинених газів дегазовані зразки плазми змішувалися з рівною кількістю нормальної плазми (серії 8-10). Відповідно концентрація аспірину в таких зразках зменшувалася, а вміст O_2 і CO_2 збільшувався вдвічі. За таких умов спостерігалось істотне зниження спонтанної й інгібування, хоч і менш ефективне, індукованої агрегації тромбоцитів. Як видно з рис. 1, ефективність інгібування в два-три рази нижче, ніж у нормі. Цей факт указує на зниження чутливості тромбоцитів до аспірину при зменшенні концентрації розчиненого в плазмі повітря або на неефективність аспірину в дегазованій плазмі.

Таким чином, після часткової дегазації плазми формені елементи системи, що згортає кров, мають, по-перше, підвищену агрегацію, а по-друге, повну відсутність чутливості до дезагрегатору *in vitro*. Відомо, що агрегація є об'єднанням або укрупненням часток дисперсних і колоїдних систем під дією молекулярних і міжмолекулярних сил притягання. При дегазації плазми процес злипання окремих тромбоцитів один з одним підсилюється, утворюються більші агрегати, які не здатні втримуватися в зваженому стані. Процес седиментації колоїду підсилюється, а значить, швидкість коагуляції збільшується. Можливо, що цей ефект пояснюється зміною розподілу заряду на тромбоцитах при видаленні розчинених газів або зміною ступені гідратації білкових молекул плазми крові. Погіршення функціональної активності тромбоцитів при зміні концентрації розчинених газів може вплинути на мікроциркуляцію й суттєво сповільнити або повністю зупинити кровоток (стаз).

Отримані результати свідчать про підвищення ризику несприятливих наслідків у випадку можливої дегазації крові *in vivo*. Досить незначного зменшення концентрації розчиненого повітря достатньо для того, щоб одночасно змінити більше трьох маркерів системи, що згортає кров, і викликати появу тромбів. Розчинене повітря представляється як система «плаваючих пасток» [11], що діє винятково на гальмування активації тромбоцитів *in vivo*, а зниження його концентрації в якій-небудь зоні судинного русла може привести не

тільки до агрегації, але й запуску системи згортання по внутрішньому шляхові, оскільки фосфоліпід агрегуючих тромбоцитів активують фактор XII. Як показано раніше [11], повна дегазація плазми збільшує активність системи, що згортає кров, у кілька раз. За таких умов небажаний ефект проявляється в зниженні антитромбінової активності при дегазації, що може викликати зміни в кровоносних судинах.

Таким чином, отримані в цей роботі зміни функціонування тромбоцитів і системи згортання крові *in vitro* у відповідь на видалення розчинених газів, можливо, є причиною підвищення ризику тромбоутворення *in vivo* внаслідок неконтрольованих зовнішніх впливів, як, наприклад, перепади атмосферного тиску або поля електромагнітного забруднення, що приводять до росту мікробульбашок і дегазації біорідини.

Питання про зв'язок між ростом мікробульбашок і розвитком тромбозів, тромбофілій, тромбоваскулітів і тромбоземорагічного синдрому потребує подальшого вивчення.

Подяки

Автори висловлюють щирі подяку В. А. Березовському за обговорення результатів роботи та критичні зауваження.

Список літератури

1. Балуда В. П. Физиология системы гемостаза / В. П. Балуда, М. В. Балуда, И. И. Деянов и др. – М: Медицина, 1995. – 245 с.
2. Баркаган З. С. Механизмы формирования и маркеры предтромботического статуса у пожилых людей / З. С. Баркаган // Клиническая геронтология. – 1996. – № 3. – С. 53–56.
3. Карпунькина Т. И. Соотношение липидной и белковой частей в бета-липопротеидах сыворотки крови больных сахарным диабетом и ишемической болезнью сердца / Т. И. Карпунькина // Лабораторная диагностика. – 2000. – № 3. – С. 58–60.
4. Berger A. K. Thrombolysis in elderly patients with acute myocardial infarction / A. K. Berger // Am. J. Geriatr. Cardiol. – 2003. – Vol. 12 (4). – P. 251–256.
5. Gibbons R. J. Comparison of fondaparinux and enoxaparin in acute coronary syndromes. The fifth organization to assesstrategies in acute ischemic syndromes investigator / R. J. Gibbons, V. Fuster et all. // N. Engl. J. Med. – 2006. – Vol. 354. – P. 1464–1476.
6. Молекулярная структура воды и ее роль в механизмах биоэлектромагнитных явлений (Пушино, 5–8 июля 2011 г.): тез. докл. симп. – М.: ФИАН, 2011. – 31 с.
7. Костина О. В. Оседание эритроцитов при компрессии и декомпрессии / О. В. Костина, В. Н. Крылов, Г. Я. Левин, Д. А. Селивановский // Докл. акад. наук. – 1999. – Т. 368, № 2. – С. 278–279.
8. Bunkin N. F. Long-living nanobubbles of dissolved gas in aqueous solutions of salts and erythrocyte suspensions / N. F. Bunkin, B. W. Ninham, P. S. Ignatiev et all. // J. Biophotonics. – 2010. – Vol. 93. – P. 1–15. [DOI 10.1002/jbio.201000093]
9. Шаталов В. М. Влияние газовых нанопузырьков на электропроводность чистой воды / В. М. Шаталов, И. В. Нога, А. А. Зинченко, Н. Ф. Бункин // Проблемы экологии и охраны природы техногенного региона. – 2010. – № 1 (10). – С. 252–257.
10. Shatalov V. M. Degassing of bioliquids in low electromagnetic fields / V. M. Shatalov, I. V. Noga, A. A. Zinchenko // Electronic Journal of Biology. – China: Web, 2010. – Vol. 6, № 3. – P. 67–72.
11. Зинченко А. А. Влияние растворенного в крови воздуха на динамику свертывания *in vitro* / А. А. Зинченко, В. М. Шаталов // Физика живого. – К.: Mavis, 2010. – Т. 18, № 1. – С. 31–35.
12. Зинченко А. А. Влияние дегазации при центрифугировании на содержание глюкозы в крови / А. А. Зинченко, В. М. Шаталов // Проблемы экологии и охраны природы техногенного региона. – 2010. – № 1 (10). – С. 240–245.

13. Зинченко А. А. Дегазация плазмы крови меняет скорость оседания эритроцитов / А. А. Зинченко, В. М. Шаталов // Уч. зап. Таврического нац. ун-та. Сер. «Биол., хим.». – Симферополь: ТавНУ, 2010. – Т. 23, № 4. – С. 95–102.

14. Шаталов В. М. Дегазация биожидкостей как механизм биологического действия слабых электро-магнитных полей / В. М. Шаталов // Біофізичний вістник. – Харків: ХНУ, 2009. – Т. 23, № 2. – С. 120–128.

15. Born G. V. The aggregation of platelet / G. V. Born, V. J. Cross // J. Physiol. – 1963. – Vol. 16. – P. 178–195.

Зинченко А. А., Шаталов В. М. Влияние центрифугирования плазмы крови газов на функциональную активность тромбоцитов *in vitro*. – Исследовано *in vitro* изменение функционирования тромбоцитов в ответ на удаление из плазмы растворенных газов. Дегазация образцов плазмы проводилась с помощью центрифугирования по ранее разработанной методике. Показано, что дегазация приводит к значительному росту как спонтанной, так и индуцированной агрегации, и добавление ингибитора агрегации аспирина не меняет картину независимо от дозы. Сделан вывод о возможной причине повышения риска тромбообразования *in vivo* вследствие неконтролируемых внешних воздействий.

Ключевые слова: кровь, воздух, пузырьки, дегазация, тромбоциты, агрегация, аспирин, сердечно-сосудистые заболевания.

Zinchenko A. A., Shatalov V. M. Effect of blood plasma centrifugation on platelet functional activity *in vitro*. – The platelet function changes in response to dissolved gases removal from plasma were investigated *in vitro*. Degassing of plasma samples was carried out by centrifugation using previously developed technique. It was shown that degassing leads to significant increase in both spontaneous and induced aggregation and addition of an inhibitor of aggregation – aspirin – does not alter the picture in spite of the dose. It is concluded about that the possible reason for increased risk of thrombosis *in vivo* owing to uncontrollable external factors.

Key words: blood, air bubbles, degassing, platelet aggregation, aspirin, and cardiovascular disease.