

МЕТАЛЛОДЕКСТРАНОВЫЕ ПРЕПАРАТЫ СПЕЙСФЕРРОН И РОНДФЕРРИН ИНДУЦИРУЮТ АПОПТОТИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ТРОМБОЦИТОВ *IN VITRO*

Е.В. Воробей (МГУ имени А.А. Кулешова)

Введение. Коррекция железодефицитных состояний до сих пор представляет собой актуальную проблему современной медицины. Так, дефицит железа как облигатного микроэлемента сопровождается развитием железодефицитных анемий, в то время как его избыток, в частности, при парентеральной коррекции железодефицитных состояний, приводит к внутриклеточной аккумуляции в виде ферритина во многих органах и тканях [1]. С учетом актуальности коррекции железодефицитных состояний, в настоящее время разработан достаточно широкий спектр препаратов железа для парентерального введения. Их недостатком является токсичность, которая наиболее выражена у препаратов с повышенным содержанием железа в форме свободных катионов, принимающих непосредственное участие в окислительно-восстановительных реакциях (реакция Фентона) и, следовательно, в индукции оксидативного стресса [2–6]. Наименее токсичны препараты, содержащие комплексно связанное железо, в частности, комплексы железа с декстраном, декстрином и мальтозой [4, 7]. Среди токсических эффектов препаратов железа для парентерального применения следует отметить повышение частоты риска артериальных тромбозов и развитие тромбоцитопений, механизм формирования которых остается до конца неясным [5, 6].

Отечественные металлодекстраны (МД), созданные на основе радиационно- и химически модифицированного декстрана, помимо комплексно связанного железа, содержат кобальт (спейсферрон), кобальт и медь (рондферрин) [7]. Влияние самих по себе комплексно связанных кобальта и меди, а тем более их комбинации на функциональное состояние тромбоцитов остается практически неизученным, а использование декстрана таит в себе опасность индукции тромбоцитопении *in vivo*, что и определяет актуальность настоящего исследования.

Предварительные исследования показали, что одной из наиболее важных причин изменения гемостазиологического равновесия при введении металлодекстранов (МД) спейсферрона и рондферрина *in vitro* является умеренное снижение количества тромбоцитов и развитие их прогрессирующей дисфункции, что может лежать в основе описанных геморрагических и тромботических осложнений при применении МД [8, 9]. Анализ возможных механизмов развития дисфункции тромбоцитов в эксперименте с МД *in vitro* и определяет цель настоящего исследования.

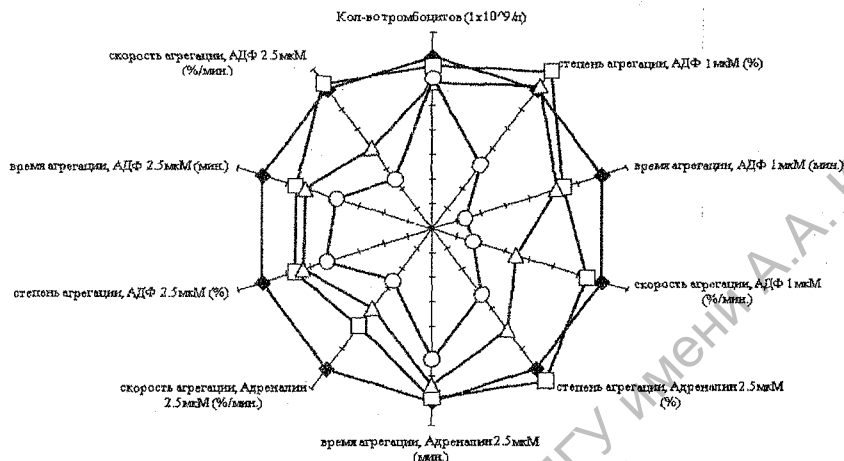
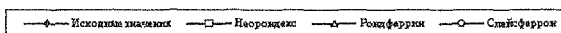
Материалы и методы. Объектом исследования явились 782 образца цельной венозной крови 98 здоровых мужчин-добровольцев в возрасте $25,89 \pm 5,34$ лет. Разработана оригинальная методика исследования: МД препараты (спейсферрон 10,0 мкл/мл, рондферрин 70 мкл/мл и неорондекс 70 мкл/мл образца в качестве контроля как чистая декстрановая основа) добавлялись в образцы крови *in vitro* с последующей инкубацией в пластиковых тубах при 37°C и оценкой функциональных реакций тромбоцитов через 60 и 180 мин от начала эксперимента по сравнению с исходными значениями.

Функциональная активность тромбоцитов оценивалась по данным серии агрегатограмм, записанных фотометрическим методом на агрегометре "Solar-1210" (СП "Solar", Беларусь). В качестве индукторов агрегации тромбоцитов использованы АДФ в конечных концентрациях 1,0 и 2,5 мкМ и адреналин 2,5 мкМ. Оценивались степень, время и скорость агрегации (% за 30 сек.), количество тромбоцитов (методом фазово-контрастной микроскопии).

Результаты исследования функциональной активности тромбоцитов при кратковременном эксперименте с рондферрином и спейсферроном (60-минутная продолжительность эксперимента) по сравнению с исходными значениями представлены на рисунке.

Уже при кратковременном исследовании оба МД вызывают умеренное, но статистически значимое снижение количества тромбоцитов, которое не достигает уровня тромбоцитопении, тогда как при инкубации с неорондексом этот параметр достоверно не изменяется. При исследовании АДФ-индуцированной агрегации (1,0 мкМ) в эксперименте со спейсферроном обнаружено статистически значимое снижение степени, времени и скорости агрегации, а в эксперименте с рондферрином помимо этого зарегистрированы также сокращение времени достижения пика кривой и снижение скорости агрегации. Аналогичные тенденции регистрируются и при более высокой концентрации АДФ (2,50 мкМ) и адреналина (2,50 мкМ).

Следовательно, полученные данные свидетельствуют о влиянии экспозиции именно МД, но не самого декстрана, представленного в эксперименте неорондексом. Наиболее вероятно, это связано с умеренной цитотоксичностью обоих препаратов. Поскольку используемых концентраций препаратов недостаточно для гибели даже половины популяции тромбоцитов *in situ*, следует предполагать, что исследуемые МД индуцируют запуск или ускорение их апоптотических изменений.



Изменения количества и функциональной активности тромбоцитов в кратковременном эксперименте с мегаллодекстранами *in vitro*

Интересно отметить, что при продолжении эксперимента сохраняется устойчивая тенденция к снижению количества тромбоцитов, причем, она появляется и при инкубации с неорондексом, однако, при исследовании МД она однонаправленно более выражена ($p = 0.02$). В этом интервале наблюдения обнаружены и более значимые изменения функциональной активности тромбоцитов. При инкубации со спейсферроном агрегация тромбоцитов, индуцированная АДФ (1.0 мкМ) остается сниженной, а при более высокой концентрации этого индуктора выявлена противоположная тенденция: все параметры агрегации достоверно возрастают. При продолжении эксперимента с рондферрином регистрируется дальнейшее снижение функциональных реакций на все используемые индукторы агрегации, что вероятно, связано и с более глубокой дисфункцией этих форменных элементов.

Обсуждение. Полученные результаты свидетельствуют о том, что при продолжении эксперимента эффекты МД являются различными: у спейсферрона преобладает феномен цитотоксичности, что подтверждается снижением количества тромбоцитов и, в меньшей степени, их функционального резерва. Представляет интерес также и разнонаправленная реакция на АДФ в качестве индуктора: при низкой концентрации (1.0 мкМ) агрегационная активность снижается, тогда как при более высокой – достоверно возрастает по сравнению с исходными значениями. При добавлении рондферрина снижение количества тромбоцитов сопровождается прогрессирующим угнетением их функциональной активности.

Эта разнонаправленность требует отдельного анализа, так как, на наш взгляд, отражает дисбаланс необратимого взаимодействия «тромбоцит-тромбоцит» (гомо-

типическое взаимодействие «клетка-клетка»), которая реализуется посредством образования фибриновых мостиков между клетками, связывающих широкой комплексины на клеточной поверхности.

Следует обратить внимание, что проблема апоптотических изменений безъядерных элементов, в частности, тромбоцитов и эритроцитов, нашла свое дальнейшее развитие лишь в последнее время и только после того, как в области структурной и молекулярной биологии расшифрованы механизмы ранних апоптотических реакций [10, 11]. Эти реакции развиваются на уровне митохондрий и предшествуют изменениям ядер, поэтому могут не наблюдаться (и не рассматриваться) на уровне безъядерных элементов: 1) деполяризация внутренних мембран митохондрий; 2) мощная проапоптотическая экспрессия *Bax* при слабой экспрессии *Bcl-2*, нарушающая баланс про- и антиапоптотических факторов; 3) активация каспазного каскада. Из перечисленных факторов только изменения мембран при активации тромбоцитов известны давно и связаны с конверсией фосфатидилсерина на внешнюю сторону мембраны [12, 13]. Хотя в настоящем исследовании прямых доказательств апоптотических изменений тромбоцитов не получено, но используемые индукторы агрегации (АДФ и адреналин) активируют различные рецепторы тромбоцитов, что и позволило выявить их прогрессирующую дисфункцию. Последняя, как раз, и указывает на высокую вероятность ускорения апоптотических процессов, которые требуют определенного времени на реализации. В связи с этим возникает еще одна пока не решенная проблема: как экспрессия интегринов связана с реализацией апоптотической программы?

Предполагается следующее: в процессе апоптоза тромбоциты экспрессируют различные интегрины на их поверхности (например, гликопротеины IIb/IIIa при высоких напряжениях сдвига или IIb/IIIa при индукции тромбином). В то же время, эта экспрессия может быть реализована при взаимодействии типа «тромбоцит-тромбоцит» (низкие концентрации АДФ), так и «тромбоцит-субстрат» (необратимая агрегация). Возникает обоснованное предположение о тесной связи апоптотических процессов, протекающих в тромбоцитах и экспрессии интегринов на их поверхности, поскольку после адгезии к субстрату или другим клеткам они в последующем становятся объектом фагоцитоза (как и апоптотические тела), но, в то же время, являются мощным источником факторов роста суперсемейств *PDGF*, *TGF* и *Ang*. В итоге, остается открытым вопрос: какой фактор в данном случае выступает в качестве лиганда смерти.

Литература

1. Соболева, М.К. Клинические и лабораторные маркеры дефицита и перегрузки организма железом // Дефицит железа и железодефицитная анемия у детей. – М., 2001. – С. 71–87.
2. Danielson B.G., Salmonson T., Derendorf H., Geisser P. Pharmacokinetics of iron (III)-hydroxide sucrose complex after a single intravenous dose in healthy volunteers // *Arzneimittelforschung*. – 1996. – Vol. 46. – P. 615–621.
3. Zager R.A., Johnson A.C., Hanson S.Y., Wasse H. Parenteral iron formulations: A comparative toxicologic analysis and mechanisms of cell injury // *Am. J. Kidney Dis.* – 2002. – Vol. 40. – P. 90–103.
4. Fishbane S. Safety in iron management. // *Am. J. Kidney Dis.* – 2003. – Vol. 41. – P. 18–26.

5. Rooyackers T.M., Stroes E.S., Kooistra M.P. Ferric saccharate induces oxygen radical stress and endothelial dysfunction in vivo // *Eur. J. Clin. Invest.* – 2002. – Vol. 32. – P. 9–16.
6. Cairo G., Tacchini L., Recalcati S., et al. Effect of Reactive Oxygen Species on Iron Regulatory Protein Activity // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 1998. – Vol. 851(1). – P. 179–186.
7. Гапанович В.Н., Петров П.Т., Иванов Е.П., Царенков В. М. и др. Кровезамещающий раствор на основе металлодекстранового комплекса – рондферрин / В кн. : *Мат. межд. конф. «Актуальные проблемы разработки и производства кровезаменителей и препаратов крови»*, Минск, (28 ноября-1 декабря 1994 г.). – Минск, 1994. – С.29–32.
8. Тепляков А.И., Воробей Е.В. Роль тромбоцитов в метаболизме металлодекстранов спейсферрона и рондферрина (экспериментальное исследование *invitro*) // *Вестник МДУ імя А.А. Куляшова.* – 2006. – № 2-3(24). – С. 203–210.
9. Воробей Е.В., Тепляков А.И. Влияние металлодекстранов рондферрина и спейсферрона на реологические свойства крови и структурно-функциональные свойства эритроцитов (экспериментальное исследование *invitro*) // *Тромбоз, гемостаз и реология* – 2006. – № 2(26). – С. 63–68.
10. Serine protease inhibitors suppress cytochrome c-mediated caspase-9 activation and apoptosis during hypoxia-reoxygenation / Dong Z., Saikumar P., Patel Y. [et al.] // *Biochem. J.* – 2000. – Vol. 347, №3. – P. 669–677.
11. Dale G.L., Frise P. Bax activators potentiate coated-platelet formation // *Int. J. Thromb. Haemost.* – 2006. – Vol. 4, №12. – P. 2664–2670.
12. Thrombin-triggered platelet apoptosis / Leytin V., Allen D.J., Mykhaylov S. [et al.] // *Int. J. Thromb. Haemost.* – 2006. – Vol. 4, №12. – P. 2672–2678.
13. Bcl-2 family proteins are essential for platelet survival / H. Zhang, P.M. Nimmer, S.K. Tahir, edited by G.Salvesan // *Cell Death and Differentiation.* – 2007. – Vol. 14, №1. – P. 943–951.