

РОЛЬ ТРОМБОЦИТОВ В МЕТАБОЛИЗМЕ МЕТАЛЛОДЕКСТРАНОВ СПЕЙСФЕРРОНА И РОНДФЕРРИНА (экспериментальное исследование *in vitro*)

Отечественные металлодекстраны (МД), созданные на основе радиационно-химически-модифицированного декстрана, помимо комплексно связанного железа, содержат кобальт (спейсферрон), кобальт и медь (рондферрин). Влияние самих по себе комплексно связанных железа, кобальта и меди, а тем более их комбинации на функциональное состояние тромбоцитов остается практически неизученным. Цель настоящей работы: изучить функциональные реакции тромбоцитов в ответ на введение МД рондферрина и спейсферрона в экспериментальном исследовании *in vitro*. Объектом исследования явились образцы цельной крови 98 добровольцев-мужчин в возрасте от 18 до 35 лет. Методы. Образцы крови после введения спейсферрона (10,0 мкл/мл), рондферрина или неорондекса (70.0 мкл/мл) инкубировались в пластиковых тубах при 37°C с последующей оценкой функционального состояния тромбоцитов на агрегометре "Солар1210" (СП "Солар", Беларусь) при добавлении различных индукторов агрегации. АДФ (1,0 и 2,5 мкМ) и адреналин (2,5 мкМ) – индуцированная агрегация тромбоцитов (по параметрам степени, времени и скорости агрегации) оценивалась через 60 и 180 мин. инкубации образцов крови с МД по сравнению с неорондексом как контрольным препаратом (декстран). Результаты. При инкубации образцов крови с обоими МД уже через 60 минут нами зарегистрировано статистически значимое снижение количества тромбоцитов (но неходящее до уровня тромбоцитопении) и снижение функциональной активности тромбоцитов, причем, дисфункция тромбоцитов усугубляется снижением их количества. После 180 минут инкубации с МД обнаружено дальнейшее снижение количества тромбоцитов и усугубление их дисфункции. Возможно, что снижение реакций тромбоцитов индуцировано в результате их адгезии к МД и последующей дисфункцией (снижением агрегации в ответ на оба индуктора – АДФ и адреналин). Обсуждение. Мы предполагаем, что дисфункция тромбоцитов может быть обусловлена снижением агрегационной активности тромбоцитов в результате повышения адгезии тромбоцитов к исследуемым МД. Сами по себе цитотоксические реакции на уровне тромбоцитов могут иметь несколько важных следствий. В физиологичес-

ких условиях агрегаты тромбоцитов секретируют большое количество медиаторов (цитокинов и факторов роста), которые ускоряют процесс распознавания тромбоцитарных агрегатов другими клеточными популяциями, прежде всего гранулоцитами и моноцитами, с последующей адгезией и фагоцитозом тромбоцитарных фрагментов, обогащенных микроэлементами, входящими в состав МД, и могут усиливать оксидативный стресс (как метаболический путь МД). Таким образом, можно сделать обоснованное предположение о том, что тромбоциты принимают непосредственное участие в метаболизме МД, которое заключается в транспорте комплексно связанных железа, кобальта и меди к фагоцитирующим клеткам с формированием в последующем пула хранения (известного, по крайней мере, для железа), что и реализует трансклеточный метаболизм указанных катионов.

Актуальность: 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 Фентони) 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]. В то же время, последние исследования указывают на активное участие тромбоцитов в оксидативных реакциях и элиминации ROS (reactive oxygen species – формы реактивного кислорода) [8-10].

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.

Материалы и методы исследования: Объектом настоящего исследования послужили образцы венозной крови, полученной при венепункции кубитальных вен 98 добровольцев мужчин в возрасте от 18 до 35 лет, не принимавших никаких лекарственных препаратов.

МД добавлялись в образцы цельной крови *in vitro* (70 мкл /мл для рондферрина и 10 мкл/мл для спейсферрона), что не превышает среднетерапевтических доз и позволяет, таким образом, избежать прямых токсических эффектов [7]. С целью исключения влияния модифицированного декстрана самого по себе проведено аналогичное исследование при инкубации образцов крови с неорондексом (как препаратом на основе только модифицированного декстрана, также в количестве 70 мкл/л). В дальнейшем образцы крови с препаратами инкубировались в пластиковых тубах при 37°C с оценкой функциональной активности тромбоцитов через 60 и 360 минут от начала эксперимента с МД по сравнению с исходными значениями.

Исследование функциональной активности тромбоцитов проводилось на основании анализа агрегатограмм, записанных на агрегометре "Solar-1210" (СП "Solar", Беларусь) с использованием различных индукторов агрегации: АДФ в конечных концентрациях 1,0 и 2,5 мкМ и адреналина (2,5 мкМ). Функциональное состояние тромбоцитов оценивалось по следующим параметрам: количество тромбоцитов, степень, времени и скорость их агрегации. Сопоставлялись исходные параметры, а также через 60 и 180 минут инкубации крови с каждым МД по сравнению с неорондексом (в качестве контрольного препарата) [7].

Результаты и их обсуждение: Результаты исследования изменения функциональной активности тромбоцитов при 60-минутной инкубации с указанными препаратами приведены в таблице 1.

Таблица 1

Функциональные параметры тромбоцитов
после 60-минутной инкубации с МД ($X \pm SD$; $n=34$)

| Параметр гемостазиограммы | Исходные значения | 60 минут инкубации при 37°C | | |
|---|---------------------|-----------------------------|------------------------|-------------------------------|
| | | Неорондекс | Рондферрин | Спейсферрон |
| <i>Сосудисто-тромбоцитарный гемостаз</i> | | | | |
| Количество тромбоцитов, $1 \times 10^9/\text{л}$ | 266,53 \pm 71,18 | 256,50 \pm 40,65 | 238,35 \pm 32,33* | 243,00 \pm 36,67* |
| <i>Агрегация тромбоцитов с АДФ, 1 мкМ</i> | | | | |
| степень агрегации, % | 68,18 \pm 41,50 | 74,47 \pm 39,30 | 69,46 \pm 67,29 | 42,22 \pm 21,84* |
| время агрегации, мин | 383,76 \pm 203,14 | 322,70 \pm 229,32 | 313,64 \pm 227,74* | 167,00 \pm 118,80*, **, *** |
| скорость агрегации, %/мин | 32,26 \pm 10,47 | 30,30 \pm 12,05 | 20,87 \pm 17,80* | 15,09 \pm 7,38* |
| <i>Агрегация тромбоцитов с адреналином, 2,5 мкМ</i> | | | | |
| степень агрегации, % | 102,02 \pm 44,62 | 108,38 \pm 40,21 | 82,25 \pm 60,59* | 64,38 \pm 51,36*, **, *** |
| время агрегации, мин | 517,07 \pm 81,26 | 510,70 \pm 98,38 | 483,76 \pm 145,10* | 429,63 \pm 175,87* |
| скорость агрегации, %/мин | 17,81 \pm 19,24 | 14,00 \pm 7,59* | 12,44 \pm 10,18* | 9,98 \pm 7,68*, ** |
| <i>Агрегация тромбоцитов с АДФ, 2,5 мкМ</i> | | | | |
| степень агрегации, % | 107,36 \pm 53,28 | 92,83 \pm 28,65 | 89,30 \pm 59,91* | 78,60 \pm 54,50*, **, *** |
| время агрегации, мин | 447,46 \pm 117,37 | 386,60 \pm 182,26* | 368,65 \pm 217,88* | 312,90 \pm 194,04*, **, *** |
| скорость агрегации, %/мин | 47,35 \pm 34,99 | 48,70 \pm 32,61 | 33,41 \pm 24,11*, ** | 25,98 \pm 17,90**, *** |

Примечание:

* – достоверные различия по сравнению с исходными значениями (t-тест для зависимых переменных);

** – достоверные различия по сравнению с неорондексом;

*** – достоверные различия между обоими МД.

Обращает на себя внимание статистически значимое снижение количества тромбоцитов через 60 минут после введения обоих МД, которое, однако, не достигает степени тромбоцитопении. Отсутствие статистически значимых изменений количества тромбоцитов при инкубации с неорондексом указывает на то, что в основе снижения количества тромбоцитов лежит добавление именно МД, а не самого декстрана.

При добавлении АДФ в конечной концентрации 1 мкМ при инкубации со спейсферроном обнаружено статистически значимое снижение степени, времени и скорости агрегации. При инкубации с рондферрином и АДФ в этой же конечной концентрации зарегистрированы достоверные сокращение времени достижения пика кривой и снижение скорости агрегации. Следовательно, исследование АДФ-индуцированной агрегации при низкой концентрации индукера (1 мкМ) показало, что максимальные изменения зарегистрированы при инкубации со спейсферроном, менее выраженные, но однонаправленные – при инкубации с рондферрином.

При исследовании агрегации, индуцированной АДФ в концентрации 2,5 мкМ, также зарегистрировано снижение степени агрегации при инкубации с обоими препаратами, а также укорочение времени и снижение скорости агрегации. Обращает на себя внимание тот факт, что перечисленные тенденции статистически значимо более выражены в ответ на инкубацию со спейсферроном по сравнению с рондферрином.

При изучении агрегации тромбоцитов, вызванной адреналином, через 60 минут инкубации с МД нами зарегистрировано достоверное снижение степени агрегации по сравнению с неорондексом и исходными значениями. В ответ на инкубацию с обоими препаратами время агрегации сокращается, а скорость агрегации достоверно падает.

Как и при добавлении АДФ, при введении адреналина, наиболее выраженные изменения агрегатограмм зарегистрированы при инкубации образцов крови со спейсферроном по сравнению с таковыми наблюдаемыми при инкубации как с рондферрином, так и неорондексом.

Таким образом, при инкубации образцов крови с обоими МД уже через 60 минут нами зарегистрировано статистически значимое снижение количества тромбоцитов (но не доходящее до уровня тромбоцитопении) и снижение их функциональной активности.

Дисфункция тромбоцитов наблюдается при добавлении обоих МД по сравнению с декстраном и более выражена при инкубации образцов крови со спейсферроном. Следует отметить, что концентрация МД в спейсферроне выше по сравнению с рондферрином.

Результаты изучения функциональной активности тромбоцитов при продолжении инкубации с препаратами до 180 минут представлены в таблице 2.

Таблица 2

**Функциональные параметры тромбоцитов
после 180-минутной инкубации с МД ($X \pm SD$; $n=34$)**

| Параметр гемостазиограммы | Исходные значения | 180 минут инкубации при 37°C | | |
|--|---------------------|------------------------------|------------------------------|----------------------------------|
| | | Неорондекс | Рондферрин | Спейсферрон |
| <i>Сосудисто-тромбоцитарный гемостаз</i> | | | | |
| Количество тромбоцитов, $1 \times 10^9 / \text{л}$ | 266,53 \pm 71,18 | 219,36 \pm 45,85* | 213,23 \pm 53,13* | 166,66 \pm 33,76*, **, *** |
| <i>Агрегация тромбоцитов с АДФ, 1 мкМ</i> | | | | |
| степень агрегации, % | 68,18 \pm 41,50 | 55,05 \pm 66,68* | 48,55 \pm 8,60*,** | 28,28 \pm 18,34*, **, *, * |
| время агрегации, мин | 383,76 \pm 203,14 | 290,81 \pm 236,34* | 378,38 \pm 222,37 | 178,45 \pm 175,51*, **, *, *** |
| скорость агрегации, %/мин | 32,26 \pm 10,47 | 25,96 \pm 10,11*, | 5,96 \pm 8,61*, **, *, *** | 21,83 \pm 17,16 |

Окончание табл. 2

| Параметр гемостазиограммы | Исходные значения | 180 минут инкубации при 37°C | | |
|---|-------------------|------------------------------|-------------------------|------------------------|
| | | Неорондекс | Рондферрин | Спейсферрон |
| <i>Агрегация тромбоцитов с адреналином, 2,5 мкМ</i> | | | | |
| степень агрегации, % | 102,02±44,62 | 97,32±69,84 | 46,92±48,28* | 82,38±93,73 |
| время агрегации, мин | 517,07±81,26 | 492,36±148,38 | 468,90±142,42* | 531,90±125,53 |
| скорость агрегации, %/мин | 17,81±19,24 | 22,65±36,33 | 7,23±5,83* | 10,80±11,27 |
| <i>Агрегация тромбоцитов с АДФ, 2,5 мкМ</i> | | | | |
| степень агрегации, % | 107,36±53,28 | 100,29±59,80 | 51,24±30,54* | 148,03±93,67*, **, *** |
| время агрегации, мин | 447,46±117,37 | 335,72±233,35 | 123,07±112,89*, **, *** | 246,27±162,46* |
| скорость агрегации, %/мин | 47,35±34,99 | 44,92±25,33 | 26,15±13,74*, **, *** | 51,69±28,85 |

Примечание:

* – достоверные различия по сравнению с исходными значениями;

** – достоверные различия по сравнению с неорондексом;

*** – достоверные различия между представленными препаратами.

Как видно из представленной таблицы, динамика изменений параметров, описывающих функциональную активность тромбоцитов, носит несколько иной характер. Так, сохраняется тенденция к снижению количества тромбоцитов, причем эта тенденция наблюдается и при инкубации с неорондексом. Однако при инкубации как с рондферрином, так и со спейсферроном, количество тромбоцитов снижается статистически значимо, причем эта тенденция наиболее выражена при инкубации со спейсферроном (как и в ответ на более кратковременную инкубацию). Важно, что она не достигает уровня значимой тромбоцитопении (количество тромбоцитов находится в рамках нормального диапазона значений).

Исследование агрегации тромбоцитов в образцах крови при инкубации с неорондексом показало снижение функциональной реакции тромбоцитов на введение АДФ в конечной концентрации 1 мкМ. В то же время, инкубация образцов крови с неорондексом указывает на сохранение чувствительности тромбоцитов к более высокой концентрации этого индуктора: время, степень и скорость агрегации достоверно не отличаются от исходных значений при концентрации АДФ 2,5 мкМ.

Таким образом, согласно результатам проведенного исследования инкубация образцов крови с неорондексом продемонстрировала один из возможных реокорректирующих эффектов этого препарата, связанный со снижением чувствительности тромбоцитов к низкой концентрации АДФ.

После 180 минут инкубации с МД обнаружено снижение степени агрегации тромбоцитов в ответ на добавление АДФ 1 мкМ, причем угнетение агрегации статистически значимо при введении спейсферрона по сравнению с рондферрином. При более высокой концентрации АДФ (2,5 мкМ) характер агрегации тромбоцитов во многом изменяется: увеличиваются степень, время и скорость агрегации. Следовательно, после добавления в образцы крови спейсферрона характер изменения агрегационной активности тромбоцитов носит неоднозначный характер и, возможно, характеризует более мощную вторую волну агрегации при увеличении концентрации АДФ.

В то же время при продолжении инкубации с рондферрином нами регистрируется дальнейшее снижение степени, времени и скорости агрегации, практически доходящее до уровня умеренной гипофункции тромбоцитов.

Полученные результаты свидетельствуют том, что при продолжительной инкубации с рондферрином и спейсферроном эффекты обоих препаратов являются различными. У спейсферрона преобладает феномен умеренной цитотоксичности, подтверждаемый снижением количества тромбоцитов и в меньшей степени касающийся снижения их функционального резерва, тогда как при добавлении рондферрина наблюдается как снижение количества тромбоцитов, так и их умеренная гипофункция.

Еще одно важное различие заключается в том, что эффекты инкубации со спейсферроном проявляются в короткий промежуток времени и регистрируются уже через 60 минут после введения препарата, тогда как основные эффекты при введении рондферрина в основном обнаруживаются через 180 минут инкубации образцов крови с этим МД.

В основе указанных изменений нельзя исключить и определенные различия в составе препаратов: концентрация железа и кобальта в спейсферроне намного превышает их концентрацию в рондферрине, несмотря даже на тот факт, что это различие нами учитывалось. Кроме того, наличие комплексно связанной меди в рондферрине может явиться и дополнительным источником оксидативного стресса, с учетом ее роли как периксиданта, конвертирующего Fe^{2+} в Fe^{3+} с генерацией ROS (формы реактивного кислорода) [5, 6, 8, 11]. В то же время кобальт также индуцирует внутриклеточный оксидативный стресс. Это может явиться и существенной предпосылкой для включения этих микроэлементов в метаболизм тромбоцитов, их активации и последующей адгезии с помощью молекул клеточной адгезии, которые относятся к семейству интегринов [8]. Возможно, указанные механизмы и способны естественным образом снижать их реактивность по отношению к другим индукторам адгезии и агрегации [13, 14].

Согласно данным литературы железо является одним из важнейших модуляторов оксидативного стресса. Одной из малоизученных проблем является способность этого элемента модулировать клеточные функции, в частности, активность тромбоцитов, причем активация тромбоцитов, как показывает проведенный сравнительный анализ препаратов, зависит от концентрации МД в препарате [13, 14]. Помимо прооксидантных реакций на введение МД в образцы крови, возможен и другой физиологический механизм, связанный с активацией процессов связывания препарата с TfR-2 (трансферриновыми рецепторами второго типа). Причем, в этой ситуации часть железа должна быть в свободной форме, и только в этом случае будет связано с тромбоцитарными рецепторами к трансферрину [9].

Заключение: Возможно, что снижение функциональных реакций тромбоцитов на использованные индукторы обусловлено снижением агрегационного потенциала тромбоцитов в результате активации механизмов адгезии. Среди них нельзя исключить адгезию тромбоцитов к декстрану, тем более к МД. В этой ситуации изменения агрегационной функции тромбоцитов носят компенсаторную направленность, однако не могут предотвратить высокого тромбогенного риска, т.е. взаимодействие с самими МД (как индукторами спонтанной адгезии тромбоцитов) может активировать тромбоциты, а снижение их агрегационной активности при введении исследуемых МД является признаком дисфункции.

Влияние именно ионов железа подтверждено данными литературы о возможности экспериментального подавления тромбоцитарных реакций с помощью

десфероксамина [12]. С нашей точки зрения, нельзя исключить того, что изучаемые дивалентные катионы могут напрямую реагировать с тромбоцитами, модифицируя их функциональную способность не только через генерацию свободнорадикальных реакций, но и путем рецепторного связывания.

Сами по себе цитотоксические реакции на уровне тромбоцитов могут иметь несколько важных следствий. Так, в физиологических условиях агрегаты тромбоцитов секретируют большое количество медиаторов, в частности, хемокинов и других молекул с хемоаттрактантной активностью, которые ускоряют процесс распознавания тромбоцитарных агрегатов другими клеточными популяциями, прежде всего гранулоцитами и моноцитами, с последующей адгезией и фагоцитозу тромбоцитарных фрагментов, обогащенных микроэлементами.

Следует отметить, что указанный путь метаболизма железа представляется вполне логичным, хотя и не описан в имеющейся литературе: тромбоциты могут активироваться при повышении концентрации свободного железа, однако, образование тромбоцитарных агрегатов, особенно при адгезии к эндотелию, несомненно, приведет к их дальнейшему фагоцитированию и активации нейтрофильных гранулоцитов крови.

Таким образом, можно сделать обоснованное предположение о том, что тромбоциты принимают непосредственное участие в метаболизме МД, которое заключается в транспорте комплексосвязанных железа, кобальта и меди к другим форменным элементам крови.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Соболева, М.К.** Клинические и лабораторные маркеры дефицита и перегрузки организма железом / М.К. Соболева // Дефицит железа и железодефицитная анемия у детей. – М., 2001. – С. 71-87.
2. **Danielson, B.G.** Pharmacokinetics of iron (III)-hydroxide sucrose complex after a single intravenous dose in healthy volunteers / B.G. Danielson [etc.] // *Arzneimittelforschung*. – 1996. – Vol. 46. – P. 615-621.
3. **Zager, R.A.** Parenteral iron formulations: A comparative toxicologic analysis and mechanisms of cell injury / R.A. Zager [etc.] // *Am. J. Kidney Dis.* – 2002. – Vol. 40. – P. 90-103.
4. **Fishbane, S.** Safety in iron management / S. Fishbane // *Am. J. Kidney Dis.* – 2003. – Vol. 41. – P. 18-26.
5. **Rooyackers T.M.** Ferric saccharate induces oxygen radical stress and endothelial dysfunction in vivo / T.M. Rooyackers, E.S. Stroes, M.P. Kooistra // *Eur. J. Clin. Invest.* – 2002. – Vol. 32. – P. 9-16.
6. **Cairo G.** Effect of Reactive Oxygen Species on Iron Regulatory Protein Activity / G. Cairo [etc.] // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 1998. – Vol. 851(1). – P. 179-186.
7. Кровезамещающий раствор на основе металлодекстранового комплекса – рондферрин / В.Н. Гапанович [и др.] / 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. **Drüeke, T.** Iron therapy, advanced oxidation protein products, and carotid artery intima-media thickness in end-stage renal disease / T. Drüeke [etc.] // *Circulation* – 2002. – Vol. 106. – P. 2212-2217.
9. **Kawabata, H.** Molecular cloning of transferrin receptor 2. A new member of the transferrin receptor-like family / H. Kawabata [etc.] // *J. Biol. Chem.* – 1999. – Vol. 274. – P. 20826-20832.
10. **Ronald S. Go.** Call. Thrombocytopenia after Iron Dextran Administration in a Patient with Severe Iron Deficiency Anemia / S.Go. Ronald, F. Porrata Luis, G. Timothy // *Annals of Internal Medicine*. – 2000. – Vol. 132(11). – P. 925.
11. **Krötz F.** Reactive Oxygen Species: Players in the Platelet Game / F. Krötz, Sohn Hae-Young, U. Pohl // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2004. – Vol. 24. – P. 1988-1996.

12. **Alymara V.** Effectiveness and safety of combined iron-chelation therapy with deferoxamine and deferiprone / V. Alymara [etc.] // The Hematology Journal. – 2004. – Vol. 5. – № 6. – P. 475-479.
13. **Praticm D.** Iron-Dependent Human Platelet Activation and Hydroxyl Radical Formation: Involvement of Protein Kinase C / D. Praticm [etc.] // Circulation. – 1999. – Vol. 99. – P. 3118-3124.
14. **Sharlene M. Day.** Chronic Iron Administration Increases Vascular Oxidative Stress and Accelerates Arterial Thrombosis / M. Shariene // Circulation. – 2003. – Vol. 107. – P. 2601.

Поступила в редакцию 28.12.2005.