

УДК 615.151.5: 612.46

ВЛИЯНИЕ ЭРИТРОПОЭТИНА НА АКТИВНОСТЬ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ IN VITRO

¹Осиков М.В., ²Тригорьев Т.А., ¹Федосов А.А.

¹ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России», Челябинск, e-mail: prof.osikov@yandex.ru;

²ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница», Челябинск, e-mail: aya111@mail.ru

В экспериментальных условиях in vitro с использованием крови клинически здоровых людей-добровольцев и больных хронической почечной недостаточностью, имеющих дефицит эндогенного эритропоэтина (ЭПО), исследовано влияние различных доз ЭПО на функциональную активность тромбоцитов по показателям АДФ-индуцированной агрегации и состоянии плазменных протеолитических систем, участвующих в гемостазе – фибринообразования, фибринолиза и противосвертывания. ЭПО применяли в концентрациях 30; 15; 7,5; 3,75; 1,88 МЕ/л, что соответствует 200, 100, 50, 25, 12,5% от его нормальной концентрации в сыворотке. Установлено, что ЭПО ускоряет АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов, полученных от клинически здоровых людей-добровольцев и больных хронической почечной недостаточностью. При этом скорость агрегации тромбоцитов увеличивается по мере снижения дозы ЭПО от 30 до 1,88 МЕ/л. Добавление ЭПО к плазме клинически здоровых людей-добровольцев угнетает систему фибринолиза и оказывает гипокоагуляционный эффект с заинтересованностью факторов внешнего и внутреннего пути в диапазоне доз от 1,88 до 30 МЕ/л.

Ключевые слова: эритропоэтин, гемостаз, тромбоциты, свертывание крови

EFFECT OF ERYTHROPOIETIN ON HAEMOSTASIS ACTIVITY IN IN VITRO EXPERIMENTS

¹Osikov M.V., ²Grigoryev T.A., ¹Fedosov A.A.

¹South Ural State Medical University of Health Ministry of Russia, Chelyabinsk, e-mail: prof.osikov@yandex.ru;

²Chelyabinsk Regional Hospital, Chelyabinsk, e-mail: aya111@mail.ru

The paper provides information about the investigation of the EPO effect in different doses on the functional activity of platelets in terms of ADP-induced aggregation and the state of the plasma proteolytic systems involved in haemostasis – fibrinogenesis, fibrinolysis and anticoagulation under in vitro experimental conditions using the blood of healthy volunteers and that of patients with chronic renal failure in deficit of endogenous erythropoietin (EPO). EPO is used in concentrations of 30; 15; 7,5; 3,75; 1,88 IU/L, corresponding to 200, 100, 50, 25, 12,5% of the normal concentration in the serum. EPO was revealed to accelerate ADP-induced platelet aggregation in both clinically healthy human volunteers and patients with chronic renal failure. In this case, the rate of platelet aggregation increases with decreasing doses of EPO 30 to 1,88 IU/l. Being added to the plasma of healthy human volunteers EPO inhibits fibrinolysis system and has hypocoagulation impact on factors of external and internal paths interest in the dose range of 1,88 to 30 IU/L.

Keywords: erythropoietin, haemostasis, platelets, coagulation

Актуальной проблемой медицины является расшифровка механизма действия биологически активных веществ эндогенного происхождения, способных выступать в роли мультипотентных регуляторов гомеостаза. Ранее нами убедительно продемонстрирована роль белков острой фазы церулоплазмينا и альфа-1-кислого гликопротеина в регуляции активности единой клеточно-гуморальной защитной системы организма [2-7, 13]. В последние годы объектом пристального внимания многих отечественных и зарубежных исследователей выступает эритропоэтин [1]. Нами показано участие эритропоэтина (ЭПО) в коррекции аффективного статуса у больных хронической почечной недостаточностью [11]. По нашим данным, ЭПО снижает выраженность геморрагического синдрома у больных хронической почечной недостаточностью, регулирует функциональную

активность тромбоцитов и плазменных протеолитических систем при хронической почечной недостаточности (ХПН) в клинических и экспериментальных условиях [8-10, 12]. Возникает вопрос о возможности регуляторного влияния ЭПО на активность тромбоцитов и плазменных систем гемостаза и антигемостаза в интактных условиях вне зависимости от наличия патологии. **Цель работы** – исследовать влияние ЭПО на функциональную активность тромбоцитов и плазменных систем гемостаза и антигемостаза в экспериментальных условиях in vitro.

Материалы и методы исследования

Для реализации поставленной цели использована цельная кровь 96 клинически здоровых добровольцев-доноров Челябинской областной станции переливания крови и 30 больных ХПН, не принимающих ЭПО, находящихся на лечении гемодиализом в ГБУЗ ЧОКБ. Стабилизацию крови осуществляли

3,8% раствором цитрата натрия в соотношении 1:5 для исследований агрегации тромбоцитов и 1:9 – для исследований коагуляционного гемостаза. ЭПО в форме препарата «Рекормон» (МНН: эпэстин бэта, «Roche», Швейцария) применяли в концентрациях 30; 15; 7,5; 3,75; 1,88 МЕ/л, что соответствует 200, 100, 50, 25, 12,5% от его нормальной концентрации в сыворотке. После добавления ЭПО плазму инкубировали в условиях термостата при температуре 37°C в течение 30 мин. АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов исследовали с помощью двуканального лазерного анализатора агрегации тромбоцитов «LA-230» (Россия). Для получения обогащенной тромбоцитами плазмы (ОТП) кровь центрифугировали при 1500 об/мин в течение 5 минут. Затем получали бедную тромбоцитами плазму (БТП), для чего остаток центрифугировали в течение 15 минут, при 4500 об/мин. Смешиванием ОТП и БТП получали тромбоцитарную плазму с концентрацией тромбоцитов 300·10⁹/л. В качестве индуктора агрегации использовали динатриевую соль АДФ в концентрации 0,109 М. Регистрировали амплитуду агрегации (%), время агрегации (мин), скорость агрегации (% мин). Для исследования коагуляционного гемостаза плазму получали путем центрифугирования цельной крови при 3000 об/мин в течение 15 мин. С использованием коагулометра «АПГ2-02» (Россия) определяли тромбиновое время (ТВ), активированное парциальное тромбoplastиновое время (АПТВ), протромбиновое время (ПТВ), концентрацию фибриногена (ФГ) в плазме, активность антитромбина (АТ), ХПзависимый (хагеманзависимый) фибринолиз (ФЛ) с использованием реактивов фирмы «Технология-Стандарт» (Россия, Барнаул). Проверку статистических гипотез в группах проводили с использованием критериев Манна–Уитни, Вальда–Вольфовица, Уилкоксона. Для выявления связи между изучаемыми па-

раметрами использовали коэффициенты корреляции Спирмена (R) и Гамма.

Результаты исследования и их обсуждение

На первом этапе исследовали влияние ЭПО на агрегацию тромбоцитов, полученных от больных ХПН, т.к. при ХПН содержание ЭПО прогрессивно снижается, что позволяет исследовать функцию тромбоцитов в условиях дефицита эндогенного ЭПО и при добавлении к ним различных концентраций экзогенного ЭПО. Установлено, что ЭПО ускоряет агрегацию тромбоцитов во всех дозах, кроме максимальной (30 МЕ/л). Ускорение агрегации тромбоцитов достигается за счет уменьшения времени процесса, а не увеличения амплитуды, более того, амплитуда процесса при этом значимо уменьшается (табл. 1). Создается впечатление, что большие дозы ЭПО оказывают ингибирующий, а малые – стимулирующий эффект на реактивность тромбоцитов. Причем по мере уменьшения дозы скорость агрегации тромбоцитов нарастает. Для выявления дозозависимого эффекта ЭПО был использован корреляционный анализ в парах «доза» – «эффект», в качестве интегрального показателя «эффекта» ЭПО использована скорость агрегации. Установлено, что скорость агрегации тромбоцитов нарастает по мере снижения дозы ЭПО (коэффициент корреляции Спирмена $R = -0,44$; $p < 0,05$).

Таблица 1

Влияние ЭПО на показатели агрегации тромбоцитов больных ХПН (M ± m)

Группы сравнения	Показатели	Амплитуда агрегации, %	Время агрегации, мин	Скорость агрегации, %/мин
Группа 1 (n = 6) тромбоциты + физ. р-р		62,50 ± 8,59	4,78 ± 0,76	14,66 ± 2,92
Группа 2 тромбоциты + ЭПО 30 МЕ/л (n = 6)		28,17 ± 2,75 <i>p</i> = 0,004	2,68 ± 0,96	16,03 ± 3,14
Группа 3 тромбоциты + ЭПО 15 МЕ/л (n = 6)		38,63 ± 5,12 <i>p</i> = 0,002	2,93 ± 1,03	23,52 ± 6,64 <i>p</i> = 0,02 (WW)
Группа 4 тромбоциты + ЭПО 7,5 МЕ/л (n = 6)		51,13 ± 2,17	2,02 ± 0,52 <i>p</i> = 0,02	34,31 ± 7,59 <i>p</i> = 0,02 (U)
Группа 5 тромбоциты + ЭПО 3,75 МЕ/л (n = 6)		44,1 ± 5,63	2,46 ± 1,04	41,84 ± 10,00 <i>p</i> = 0,04 (W)
Группа 6 тромбоциты + ЭПО 1,88 МЕ/л (n = 6)		71,23 ± 5,26	1,34 ± 0,22 <i>p</i> = 0,003	60,39 ± 8,51 <i>p</i> = 0,04 (W)

Пр и м е ч а н и е . Здесь и далее *p* – показатель значимости различий при сравнении с группой 1.

Для выявления эффекта ЭПО на функциональную активность тромбоцитов независимо от наличия патологии нами проведены аналитические эксперименты *in vitro* в условиях, аналогичных при исследовании уремических тромбоцитов (табл. 2). При этом ЭПО добавляли к интактным тромбо-

цитам, полученным от клинически здоровых добровольцев-доноров.

Как видно, ЭПО ускоряет агрегацию тромбоцитов при всех используемых дозах. Эффект ЭПО в одних случаях реализовался за счет увеличения амплитуды процесса, в других был связан с укорочением времени

агрегации. С использованием непараметрического корреляционного анализа установлено, что скорость агрегации тромбоцитов

нарастает по мере снижения дозы ЭПО (коэффициент корреляции Гамма = $-0,23$; $p < 0,05$).

Таблица 2

Влияние ЭПО на показатели агрегации тромбоцитов здоровых людей ($M \pm m$)

Группы сравнения	Показатели	Амплитуда агрегации, %	Время агрегации, мин	Скорость агрегации, %/мин
Группа 1 тромбоциты + физ. р-р ($n = 8$)		107,40 ± 15,54	4,79 ± 0,92	25,89 ± 3,06
Группа 2 тромбоциты + ЭПО 30 МЕ/л ($n = 8$)		83,33 ± 4,79 $p < 0,01$	4,25 ± 1,06 $p = 0,04$	33,16 ± 8,11 $p = 0,002$
Группа 3 тромбоциты + ЭПО 15 МЕ/л ($n = 8$)		81,12 ± 9,35	2,29 ± 0,28	39,36 ± 5,75 $p = 0,04$
Группа 4 тромбоциты + ЭПО 7,5 МЕ/л ($n = 8$)		93,30 ± 7,36	2,30 ± 0,29 $p = 0,01$	42,90 ± 4,31 $p = 0,01$
Группа 5 тромбоциты + ЭПО 3,75 МЕ/л ($n = 8$)		78,30 ± 6,63	2,42 ± 0,64 $p = 0,01$	47,28 ± 8,30 $p = 0,002$
Группа 6 тромбоциты + ЭПО 1,88 МЕ/л ($n = 8$)		130,37 ± 23,13 $p = 0,03$	3,49 ± 0,84 $p < 0,01$	53,91 ± 12,27 $p = 0,04$

В аналитических условиях *in vitro* ЭПО изменял показатели коагуляционного гемостаза после 30-минутной инкубации с цельной кровью здоровых людей (табл. 3). Отмечено угнетение активности системы фибринолиза в связи с удлинением времени фибринолиза. Гипокоагуляционный эффект ЭПО обусловлен заинтересованностью факторов внешнего и внутреннего, т.к. наряду с укорочением тромбинового времени при всех используемых дозах, наблюдалось укорочение ПТВ во всех дозах кроме минимальной (1,88 МЕ/л), и укорочение АПТВ при добавлении ЭПО в дозе 7,5 и 30 МЕ/л. Дисперсионный однофакторный анализ позволил установить, что влияние ЭПО на

показатели системы фибринообразования может составить ($p < 0,05$): для тромбинового времени не менее 21,54% и не более 72,28% от общего влияния всей суммы факторов; для протромбинового времени – не менее 19,94% и не более 64,32% от общего влияния всей суммы факторов.

Таким образом, ЭПО ускоряет агрегацию интактных и уремических тромбоцитов; скорость агрегации тромбоцитов увеличивается по мере снижения дозы ЭПО от 30 МЕ/л до 1,88 МЕ/л. Добавление ЭПО к интактной плазме угнетает систему фибринолиза и оказывает гипокоагуляционный эффект в диапазоне доз от 1,88 до 30 МЕ/л.

Таблица 3

Влияние ЭПО на активность систем плазменного протеолиза ($M \pm m$)

Группы	Группа 1 Кровь + физ. р-р $n = 8$	Группа 2 Кровь + ЭПО 1,88 МЕ/л $n = 8$	Группа 3 Кровь + ЭПО 3,75 МЕ/л $n = 8$	Группа 4 Кровь + ЭПО 7,5 МЕ/л $n = 8$	Группа 5 Кровь + ЭПО 15 МЕ/л $n = 8$	Группа 6 Кровь + ЭПО 30 МЕ/л $n = 8$
ТВ, с	14,65 ± 0,49	15,73 ± 0,35 $p = 0,01$	16,05 ± 0,65 $p = 0,02$	18,03 ± 1,05 $p = 0,001$	16,60 ± 0,85 $p = 0,05$	17,10 ± 0,70 $p = 0,01$
АПТВ, с	33,53 ± 0,68	33,30 ± 1,36	34,33 ± 1,66	40,18 ± 4,69 $p = 0,05$	33,20 ± 1,82	39,40 ± 1,44 $p = 0,001$
ПТВ, с	15,30 ± 0,59	15,63 ± 0,66	17,53 ± 1,05 $p = 0,001$	18,08 ± 0,99 $p = 0,001$	16,90 ± 0,78 $p = 0,001$	16,73 ± 0,68 $p = 0,001$
ФГ, г/л	3,16 ± 0,21	3,08 ± 0,28	2,83 ± 0,22	2,99 ± 0,24	3,03 ± 0,23	2,99 ± 0,25
ФЛ, мин	5,58 ± 0,17	4,90 ± 0,20 $p = 0,001$	5,05 ± 0,16 $p = 0,001$	4,90 ± 0,55	5,15 ± 0,06 $p = 0,01$	4,98 ± 0,21 $p = 0,001$
АТ, с	105,30 ± 2,63	111,43 ± 4,94	100,85 ± 5,59	109,88 ± 5,92	102,80 ± 5,83	109,57 ± 2,28

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект 12-04-

31726 «Механизм влияния эритропоэтина на функциональную активность тромбоцитов».

Список литературы

1. Захаров Ю.М. Цитопротекторные функции эритропоэтина // Клиническая нефрология. – 2009. – № 1. – С. 16–21.
2. Осиков М.В. Церулоплазмин устраняет нарушения гемостаза при экспериментальной гипераммониемии / М.В. Осиков, Е.В. Макаров, Л.В. Кривохижина // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2006. – Т. 142, № 10. – С. 396–399.
3. Осиков М.В. Анализ эфферентных свойств церулоплазмينا и альфа-1-кислого гликопротеина при экспериментальном перитоните / М.В. Осиков, Л.В. Кривохижина, А.В. Мальцев // Эфферентная терапия. – 2006. – Т. 12, № 4. – С. 36–39.
4. Осиков М.В. Гемостазиологические эффекты альфа-1-кислого гликопротеина при экспериментальном септическом перитоните / М.В. Осиков, Е.В. Макаров, Л.В. Кривохижина // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2007. – Т. 144, № 8. – С. 143–145.
5. Осиков М.В. Влияние альфа-1-кислого гликопротеина на процессы свободнорадикального окисления при экспериментальной печеночной недостаточности // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2007. – Т. 144, № 7. – С. 29–31.
6. Осиков М.В. Реактивные изменения клеточно-гуморальной системы организма как типовой патологический процесс и его регуляция реактантами острой фазы: автореф. дис.... д-ра мед. наук. – Челябинск, 2008. – 44 с.
7. Осиков М.В. Роль орозомукоида в регуляции активности систем плазменного протеолиза при экспериментальной почечной недостаточности / М.В. Осиков // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2009. – Т. 148, № 7. – С. 27–30.
8. Осиков М.В. Анализ гематологических эффектов эритропоэтина у больных хронической почечной недостаточностью, находящихся на диализе / М.В. Осиков, К.В. Ахматов, Л.В. Кривохижина, В.Ю. Ахматов // Вестник Южно-Уральского государственного университета. Серия: Образование, здравоохранение, физическая культура. – 2009. – № 20 (153). – С. 79–82.
9. Осиков М.В. Роль эритропоэтина в коррекции нарушений сосудисто-тромбоцитарного гемостаза у больных с терминальной стадией хронической почечной недостаточности / М.В. Осиков, Т.А. Григорьев // Фундаментальные исследования. – 2011. – № 9–3. – С. 462–466.
10. Осиков М.В. Влияние эритропоэтина на активность систем плазменного протеолиза при экспериментальной почечной недостаточности / М.В. Осиков, Т.А. Григорьев // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2012. – Т. 153, № 1. – С. 27–30.
11. Осиков, М.В. К вопросу о механизме влияния эритропоэтина на аффективный статус у больных хронической почечной недостаточностью, находящихся на гемодиализе / М.В. Осиков, К.В. Ахматов, А.А. Федосов // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 7–1. – С. 140–145.
12. Осиков, М.В. Влияние эритропоэтина на функциональную активность тромбоцитов / М.В. Осиков, Т.А. Григорьев, А.А. Федосов, Козочкин Д.А., Ильиных М.А. // Современные проблемы науки и образования. – 2012. – № 6. – С. 195–199.
13. Osikov, M.V. Effects of α 1-acid glycoprotein on hemostasis in experimental septic peritonitis / M.V. Osikov, E.V. Makarov, L.V. Krivokhizhina // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2007. – № 2. – P. 178–180.

References

1. Zaharov Ju.M. Klinicheskaja nefrologija, 2009, vol. 1, pp. 16–21.
2. Osikov M.V., Makarov E.V., Krivohizhina L.V. Bjulleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny. – Bulletin of experimental biology and medicine, 2006, vol. 142, no.10, pp. 396–399.
3. Osikov M.V., Krivohizhina L.V., Mal'cev A.V. Jeffferentnajataterapija – Effferent therapy, 2006, vol. 12. no. 4, pp. 36–39.
4. Osikov M.V., Makarov E.V., Krivohizhina L.V. Bjulleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny. – Bulletin of experimental biology and medicine, 2007, vol. 144, no.8, pp. 143–145.
5. Osikov M.V. Bjulleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny. – Bulletin of experimental biology and medicine, 2007, vol. 144, no.7, pp. 29–31
6. Osikov M.V. Reaktivny'e izmeneniya kletochno-gumoral'noj sistemy' organizma kak tipovoj patologicheskoy processu i ego regulyaciya reaktantami ostroj fazy' [Jet changes of cellular and humoral system of an organism as standard pathological processions its regulation by reactant of a sharp phase], Avtoref. dis. d-ra med. nauk. Chelyabinsk, 2008. 44 p.
7. Osikov M.V. Bjulleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny. – Bulletin of experimental biology and medicine, 2009, vol. 148, no.7, pp. 27–30
8. Osikov M.V., Ahmatov K.V., Krivohizhina L.V., Ahmatov V.Ju. Vestnik Juzhno-Ural'skogogosudarstvennogouniversiteta. Serija: Obrazovanie, zdravooohranenie, fizicheskajakultura, 2009, vol. 20, pp. 79–82.
9. Osikov M.V., Grigor'ev T.A. Fundamentalnie issledovaniâ – Fundamental research, 2011, no. 9–3, pp. 462–466.
10. Osikov M.V., Grigor'ev T.A. Bjulleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny. – Bulletin of experimental biology and medicine, 2012, vol. 153, no.1, pp. 27–30
11. Osikov M.V., Ahmatov K.V., Fedosov A.A. Fundamentalnie issledovaniâ – Fundamental research, 2012, no. 7–1, pp. 140–145.
12. Osikov M.V., Grigor'ev T.A., Fedosov A.A., Kozochkin D.A., Ilinykh M.A. Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya – Modern problems of education and science, 2012, no. 6, pp. 195–199.
13. Osikov M.V., Makarov E.V., Krivohizhina L.V. Bjulleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny. – Bulletin of experimental biology and medicine, 2007, no. 2, pp. 178–180.

Рецензенты:

Абрамовских О.С., д.м.н., профессор кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии, клинической лабораторной диагностики, ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Челябинск;
 Цейликман В.Э., д.б.н., профессор, заведующий кафедрой биологической химии, ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Челябинск.

Работа поступила в редакцию 11.04.2013.