

УДК 616.155.2-092.9

ЦЕРУЛОПЛАЗМИН – ЭНДОГЕННЫЙ РЕГУЛЯТОР ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ТРОМБОЦИТОВ

¹Ермолаева Е.Н., ¹Кривохижина Л.В., ¹Кантюков С.А., ²Яковлева В.П.

¹ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет»

Министерства здравоохранения Российской Федерации, Челябинск;

²ФГБОУ ВПО «Уральский государственный университет физической культуры»,
Челябинск, e-mail: ermen33@mail.ru

Тромбоциты рассматриваются как источники гуморальных факторов, стимулирующих одновременно процессы гемостаза и воспаления. В эксперименте рассматривается влияние белка «острой фазы» – церулоплазмينا на функцию тромбоцитов. Церулоплазмин вводили intactным крысам однократно в дозе 50% от физиологического уровня, что соответствует его повышению при остром воспалении. Результаты оценивали через 12 часов, на 1, 3-е и 8-е сутки после введения препарата. Церулоплазмин способствовал уменьшению ретенционной и агрегационной способности тромбоцитов: снизилась максимальная амплитуда и скорость агрегации и высвобождение тромбоцитарных факторов P₃ и P₄ с 12 часов до 8 суток. На 24 ч после введения церулоплазмينا снизилась АДФ-индуцированная хемилюминесценция тромбоцитов крыс. Таким образом, белок острой фазы церулоплазмин обладает способностью снижать проагрегантные свойства тромбоцитов, что может расцениваться как наличие обратной связи в реализации процесса воспаления.

Ключевые слова: тромбоциты, церулоплазмин, белок острой фазы

CERULOPLASMIN – ENDOGENOUS REGULATORS FUNCTIONAL STATE OF PLATELET

¹Ermolaeva E.N., ¹Krivokhizhina L.V., ¹Kantyukov S.A., ²Yakovleva V.P.

¹South Ural State Medical University (SUSMU), Chelyabinsk;

²Ural State University of Physical Culture, Chelyabinsk, e-mail: ermen33@mail.ru

Platelets are considered as sources of humoral factors stimulating both processes of hemostasis and inflammation. The experiment examined the impact of a single administration of ceruloplasmin intact rats on platelet function. Ceruloplasmin was administered at a dose of 50% of the physiological level, which corresponds to its increase during acute inflammation. Results were evaluated after 12 hours for 1, 3 rd and 8 th day after introduction of preparation. Introduction ceruloplasmin led to lower retention and platelet aggregation: maximal amplitude and aggregating speed went down; freeing of thrombocyte factors of P₃ and P₄ diminished from 12 hours a to 8 twenty-four hours after single introduction. At 24 hours after administration of ceruloplasmin decreased ADP-induced chemiluminescence platelet rats. Protein acute phase ceruloplasmin proagregantnye possesses of thrombocytes, that can be considered as a presence of feed-back is in realization of process of inflammation.

Keywords: platelets, ceruloplasmin, protein acute phase

На сегодняшний день тромбоциты рассматриваются как источники гуморальных факторов, стимулирующих одновременно процессы гемостаза и воспаления [14]. Наличие в тромбоцитах м-РНК для синтеза – предшественника ИЛ-1β, каспаз, остеонектина, виментина, убихитина, тканевого ингибитора матриксной металлопротеиназы I типа свидетельствуют о многогранной роли тромбоцитов в процессе воспаления [4]. В α-гранулах тромбоцитов содержатся модуляторы воспаления, такие как Р-селектин, тромбоспондин-1, 4-й фактор тромбоцитов, трансформирующий фактор роста β и RANTES (регуляторы активации процессов экспрессии и секреции нормальных Т-лимфоцитов).

Транскрипторный аппарат тромбоцитов состоит в основном из м-РНК, кодирующей воспалительные белки [5]. Активация тромбоцитов приводит к экспрессии на их поверхности Р-селектина и увеличению интенсивности тромбоцитарно-лейкоцитарной адгезии на эндотелий и циркули-

рующих тромбоцитарно-моноцитарных агрегатов [9]. Следствием взаимодействия макрофагов с аутологичными тромбоцитами является повышение их провоспалительных свойств [10]. Центральная роль в обеспечении межклеточных взаимодействий принадлежит сигнальной системе – рецептор CD40 и его лиганд – CD40L [9]. Более 90% CD40L имеют тромбоцитарное происхождение [9]. Наличие на тромбоцитах лиганда CD40 (CD40L) к CD40 позволяет тромбоцитам присоединяться к макрофагам, Т-лимфоцитам и эндотелиальным клеткам. После отсоединения CD40L от поверхности тромбоцита он активует каскад воспалительных реакций, в который вовлечены такие белки, как Е-селектин, VCAM и ICAM.

Тромбоциты способны экспрессировать внутренние факторы, запускающие как классический, так и альтернативный путь активации комплемента. Подобная активация клеток – следствие действия биохимических агонистов и (или) напряжения сдви-

га и связана с экспрессией Р-селектина, gC1qR и хондроитина сульфата. Тромбоцит как посредник активации комплемента в известной мере увеличивает растворимые воспалительные медиаторы (С3а и С5а) [8].

Другими участниками одновременно тромбоцитического и воспалительного процессов являются высвобождаемые активированными тромбоцитами микрочастицы (PDMP). PDMP принимают участие в адгезии тромбоцитов к поврежденному эндотелию, путем экспрессии Р-селектина, PDMP способствуют агрегации лейкоцитов.

Исходя из вышеизложенного, можно предположить, что белки острой фазы воспаления прямо или опосредованно могут влиять на тромбоциты, изменяя их функциональное состояние.

Цель исследования – определить наличие и механизмы влияния белка острой фазы – церулоплазмينا – на функциональное состояние тромбоцитов.

Материалы и методы исследования

Исследование проведено на 50 половозрелых белых беспородных крысах-самцах массой 180–200 г. Все исследования выполнены в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденными приказом МЗ СССР № 755 от 12.08.1977. Забор крови осуществлялся внутрисердечно, согласно правилам гемостазиологических исследований [1]. Церулоплазмин (ЦП) вводили однократно, внутривенно в дозе 20 мг/кг веса животного, что составляет 50% от его физиологического уровня в сыворотке крови крыс. В экспериментах использовался препарат «Церулоплазмин» (НПО «Иммунопрепарат», Уфа). Сроки исследования – 12 часов, 3 и 8 сутки. Ретенцию тромбоцитов оценивали по их способности

прилипать к стеклянной поверхности. Способность тромбоцитов к агрегации определяли по методу Борна. В качестве индуктора агрегации использовали АДФ в конечной концентрации $7 \cdot 10^{-7}$ М. Агрегационная способность тромбоцитов оценивалась по: лаг-периоду; времени, скорости, максимальной амплитуде. Фактор P_3 определяли по разнице показателей АВР плазмы до и после удаления тромбоцитов из нее по Rabiner, Groder. Фактор P_4 плазмы определяли по действию прогретой БТП на тромбин-гепариновое время свертывания субстратной плазмы [1].

Способность тромбоцитов к продукции свободных радикалов оценивали методом хемилюминесценции [3]. Интенсивность свободнорадикального окисления в тромбоцитах исследовали методом хемилюминесценции с использованием хемилюминометра ХЛ-003. Объем пробы составлял 5 мл обогащенной тромбоцитами плазмы (ОТП) с концентрацией клеток 300000 в мкл, использовали медленное перемешивание, температурный режим – 37°C, время регистрации 30 минут. Интенсивность хемилюминесценции тромбоцитов исследовали в присутствии люминола, так как это соединение, вступающее в реакции с активными формами кислорода или органическими свободными радикалами, в ходе которых образуются молекулы продуктов в возбужденном электронном состоянии. Статистическая обработка результатов исследования проводилась на персональном компьютере с помощью пакета программ анализа данных Statistica 6.0, использован непараметрический критерий Манна – Уитни.

Результаты исследования и их обсуждение

Однократное введение ЦП крысам в дозе 50% от физиологического уровня, что соответствует его повышению при остром воспалении, приводило к снижению ретенционной способности тромбоцитов на весьма длительное время (табл. 1).

Таблица 1

Влияние церулоплазмينا на ретенцию тромбоцитов (M ± m)

Показатели	Процент ретенции тромбоцитов	P
Сроки исследования (количество животных)		
Контроль (n = 14)	26,68 ± 0,91	–
12 часов (n = 10)	21,15 ± 2,01	p = 0,0346
3 сутки (n = 12)	24,99 ± 0,56	p = 0,0567
8 сутки (n = 10)	21,84 ± 0,67	p = 0,0072

Примечания: n – число наблюдений; p – показатель различия с контрольной группой по критерию Манна – Уитни.

Под влиянием ЦП изменялась агрегационная способность тромбоцитов, это касалось снижения максимальной амплитуды и скорости агрегации с 12 часов до 8 суток после однократного введения. Удлинение лаг-периода отмечено лишь на 12 час (табл. 2).

Снижалась реакция высвобождения тромбоцитарных факторов P_3 и P_4

(табл. 3). Роль этих двух факторов в поддержании гемостатического потенциала велика: фактор P_3 (тромбоцитарный тромбопластин) – постоянно действующий ускоритель образования протромбиназы по внутреннему механизму; фактор P_4 (антигепарин) ограничивает антикоагулянтную активность гепарина.

Таблица 2

Влияние ЦП на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов ($M \pm m$)

Сроки исследования	Показатели	Лag-период, мин	Время агрегации, мин	Максимальная амплитуда агрегации, мм	Скорость агрегации, мм/мин
Контроль $n = 8$		$0,85 \pm 0,04$	$15,74 \pm 0,20$	$39,75 \pm 0,96$	$2,50 \pm 0,05$
12 часов $n = 8$		$1,14 \pm 0,08$ $p = 0,038$	$15,37 \pm 0,20$ $p = 0,367$	$24,70 \pm 2,25$ $p = 0,0007$	$1,60 \pm 0,15$ $p = 0,0067$
3 сутки $n = 7$		$1,18 \pm 0,13$ $p = 0,067$	$15,86 \pm 0,14$ $p = 0,584$	$30,40 \pm 1,46$ $p = 0,0074$	$1,92 \pm 0,10$ $p = 0,0083$
8 сутки $n = 8$		$0,87 \pm 0,09$ $p = 0,854$	$15,75 \pm 0,11$ $p = 0,498$	$23,0 \pm 0,67$ $p = 0,0005$	$1,46 \pm 0,04$ $p = 0,0003$

Примечания: n – количество наблюдений; p – показатель различия с контрольной группой по критерию Манна – Уитни.

Таблица 3

Влияние ЦП на реакцию P_4 высвобождения факторов P_3 и P_4 ($M \pm m$)

Сроки исследования (количество животных)	Показатели	P_4 , с	P_3 , с
Контроль $n = 8$		$68,85 \pm 1,70$	$2,63 \pm 0,17$
12 часов $n = 7$		$40,86 \pm 0,75$ $p = 0,0004$	$1,71 \pm 0,17$ $p = 0,0046$
3 сутки $n = 7$		$57,07 \pm 0,75$ $p = 0,038$	$1,86 \pm 0,24$ $p = 0,156$
8 сутки $n = 7$		$60,38 \pm 3,26$ $p = 0,343$	$1,67 \pm 0,30$ $p = 0,024$

Примечания: n – количество наблюдений; p – показатель различия с контрольной группой по критерию Манна – Уитни.

Действие ЦП относительно функции тромбоцитов реализуется через его антиоксидантные свойства. В исследованиях *in vitro* на человеческих тромбоцитах было показано, что инкубация тромбоцитов с ЦП приводит к снижению интенсивности процессов свободнорадикального окисления, общих и промежуточных продуктов перекисного окисления липидов, малонового диальдегида и увеличению активности супероксиддисмутазы в тромбоцитах, что сопровождается снижением их максимальной амплитуды и скорости агрегации [2]. Наличие подобного эффекта подтверждается и в условиях *in vivo*.

Бедная тромбоцитами плазма (БТП) обладает слабой хемилюминесценцией: максимальная светимость – $0,47 \pm 0,04$ у.е.; светосумма свечения – $0,75 \pm 0,12$ у.е. Хемилюминесценция обогащенной тромбоцитами плазмы (ОТП) составляет: максимальная светимость – $3,23 \pm 0,35$ у.е. ($p = 0,0076$); светосумма свечения – $12,98 \pm 1,6$ у.е. ($p = 0,0084$). Добавление АДФ к тромбоцитам значительно увеличивает ХЛ тромбоцитов, а ЦП на 24 час после введения приводит к снижению АДФ-индуцированной хемилюминесценции тромбоцитов крыс (табл. 4).

Таблица 4

Влияние ЦП на АДФ-индуцированную хемилюминесценцию тромбоцитов на 24 час после введения ($M \pm m$)

Показатели/эксперимент	Группа контроля (введение физ. раствора) ($n = 9$)	Опытная группа (введение ЦП) ($n = 9$)
Светосумма, у.е	$40,64 \pm 5,33$	$21,55 \pm 2,80$; $p = 0,0065$
Макс. светимость, у.е	$9,40 \pm 1,17$	$5,45 \pm 0,63$; $p = 0,0078$

Примечания: n – число наблюдений; p – показатель различия с контрольной группой по критерию Манна – Уитни.

В работах ряда авторов было показано, что и иные белки острой фазы могут изменять функциональное состояние тромбоцитов, такие как гаптоглобин, трансферрин, α_1 -кислый гликопротеид и другие. Исследование влияния этих белков на функциональное состояние тромбоцитов выявило снижение агрегационной активности кровяных пластинок [13]. В экспериментах *in vitro* было показано, что α -глобулин уменьшает коллаген-индуцированную агрегацию тромбоцитов. При исследовании трех других плазменных белков: фибриногена, фактора Хагемана и γ -глобулина снизилась АДФ-индуцированная агрегация. С-реактивный белок также оказал ингибирующее влияние на агрегацию тромбоцитов [15]. Трансферрин не влияет на агрегацию тромбоцитов, это связано, по-видимому, с индивидуальными особенностями белка, в отличие от α_1 -кислого гликопротеида, который в условиях *in vitro* снизил эпинефрин- и АДФ-индуцированную агрегацию кровяных пластинок, но при этом изменял только первую волну агрегации, не влияя на вторую [13].

Указывается, что антитромбоцитарные лекарственные препараты одновременно снижают провоспалительную функцию тромбоцитов. Наибольшее количество публикаций касается противовоспалительных эффектов клопидогрела. О способности клопидогрела благоприятно влиять на свидетели процесса воспаления впервые сообщили Chew D.P. и соавт. в 2001 году [6]. Механизм действия антиагрегантного действия клопидогрела связан с ингибированием АДФ-индуцированной активации тромбоцитов за счет блокады пуриновых рецепторов P2Y₁₂ [5].

Таким образом, белок острой фазы церулоплазмин обладает способностью снижать проагрегантные свойства тромбоцитов, что может расцениваться как наличие обратной связи в реализации процесса воспаления.

Список литературы

1. Балуда В.П., Баркаган З.С., Гольдберг Е.Д. Лабораторные методы исследования системы гемостаза. – Томск: Медицина, 1980. – 310 с.
2. Ермолаева Е.Н., Кривохижина Л.В., Кантюков С.А., Сергиенко В.А. Механизмы антиагрегационного действия церулоплазмينا // Эфферентная терапия. – 2004. – Т. 10, № 4. – С. 39–42.
3. Пат. 2230322 РФ Способ обнаружения свечения тромбоцитов / Исаев А.П., Кривохижина Л.В., Кантюков С.А., Ермолаева Е.Н., Курилов И.Н. – М., 2004. – 5 с.
4. Комаров А.Л., Панченко Е.П. Роль воспаления в развитии атеротромбоза. Противовоспалительные эффекты клопидогрела // Фарматека. – 2007. – № 8/9. – С. 23–29.
5. Bhatt D.I., Topol E.J. Scientific and therapeutic advances in antiplatelet therapy // Nat Rev Drug Discov. – 2003. – Т. 2. – P. 15–28.
6. Chew D.P. et al. Effect of clopidogrel added to aspirin before percutaneous coronary intervention on the risk associated with C-reactive protein // Am J Cardiol. – 2001. – Т. 88. – P. 672–674.
7. Christopher M. Scull, William D. Hays, and Thomas H. Fischer. Macrophage pro-inflammatory cytokine secretion is enhanced following interaction with autologous platelets // J Inflamm (Lond). – 2010. – Т. 7. – P. 53.

8. Ellinor I. Peerschke, Wei Yin and Berhane Ghebrehwet. Complement Activation on Platelets: Implications for Vascular Inflammation and Thrombosis // Mol Immunol. – 2010. – Т. 47(13). – P. 2170–2175.

9. Henn V. et al. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells // Nature. – 1998. – Т. 391. – P. 591–594.

10. Lindemann S., et al. Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1-synthesis // J Cell Biol. – 2001. – Т. 154. – P. 485–490.

11. Neumann F.J. et al. Induction of cytokine expression in leukocytes by binding of thrombin – stimulated platelets // Circulation. – 1997. – Т. 95. – P. 2387–2394.

12. Schonbeck U., Libby P. CD40 Signaling and Plaque Instability // Circ Res. – 2001. – Т. 89. – P. 1092–1103.

13. Shyder S. Serum complement levels in hyperlipidemic subjects with or without vascular disease // Fed. Proc. – 1974. – Vol. 33. – P. 229–231.

14. Topol E.J., Serruys P.W. Frontiers in interventional cardiology // Circulation. – 1998. – Т. 98. – P. 1802–1820.

15. Foreman J.C. Neuropeptides and the pathogenesis of allergy // Allergy. – 1987. – Vol. 42, № 1. – P. 1–11.

References

1. Baluda V.P., Barkagan Z.S., Goldberg E.D. Laboratory methods of the hemostatic system. Tomsk: Medicine, 1980. 310 p.
2. Ermolayeva E.N., Krivohizhina L.V., Kanyukov S.A., Sergienko V.A. Mechanisms of antiagregatsion action ceruloplasmin. Efferent therapy. 2004. Vol. 10, no. 4. pp. 39–42.
3. Isaev A.P., Krivohizhina L.V., Kanyukov S.A., Yermolayeva E.N., Kurilov I.N. A method for detecting the glow platelets Patent 2230322 of the Russian Federation. M., 2004. 5 p.
4. Komarov A.L., Panchenko E.P. Role of inflammation in the development of atherothrombosis. Antiinflammatory effects of clopidogrel. Farmateka. 2007. no. 8/9. pp. 23–29.
5. Bhatt D.I., Topol E.J. Scientific and therapeutic advances in antiplatelet therapy. Nat Rev Drug Discov. 2003. T.2. pp. 15–28.
6. Chew D.P. et al. Effect of clopidogrel added to aspirin before percutaneous coronary intervention on the risk associated with C-reactive protein. Am J Cardiol. 2001. T. 88. pp. 672–674.
7. Christopher M. Scull, William D. Hays, and Thomas H. Fischer. Macrophage pro-inflammatory cytokine secretion is enhanced following interaction with autologous platelets. J Inflamm (Lond). 2010. T. 7. pp. 53.
8. Ellinor I. Peerschke, Wei Yin and Berhane Ghebrehwet. Complement Activation on Platelets: Implications for Vascular Inflammation and Thrombosis. Mol Immunol. 2010. T.47(13). pp. 2170–2175.
9. Henn V. et al. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. Nature. 1998. T. 391. pp. 591–594.
10. Lindemann S., et al. Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1-synthesis. J Cell Biol. 2001. T. 154. pp. 485–490.
11. Neumann F.J. et al. Induction of cytokine expression in leukocytes by binding of thrombin stimulated platelets. Circulation. 1997. T. 95. pp. 2387–2394.
12. Schonbeck U., Libby P. CD40 Signaling and Plaque Instability. Circ Res. 2001. T. 89. pp. 1092–1103.
13. Shyder S. Serum complement levels in hyperlipidemic subjects with or without vascular disease. Fed. Proc. 1974. Vol. 33. pp. 229–231.
14. Topol E.J., Serruys P.W. Frontiers in interventional cardiology. Circulation. 1998. T. 98. pp. 1802–1820.
15. Foreman J.C. Neuropeptides and the pathogenesis of allergy. Allergy. 1987. Vol.42, no. 1. pp. 1–11.

Рецензенты:

Головлева Е.С., д.м.н., профессор кафедры нормальной физиологии, ГБОУ ВПО ЮУГМУ Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск;

Казачков Е.Л., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой патологической анатомии, ГБОУ ВПО ЮУГМУ Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск.

Работа поступила в редакцию 10.06.2014.