

## ЭРИТРОПОЭТИН КАК РЕГУЛЯТОР ЭКСПРЕССИИ ТРОМБОЦИТАРНЫХ ГЛИКОПРОТЕИНОВ

Осиков М.В.<sup>1</sup>, Григорьев Т.А.<sup>2</sup>, Федосов А.А.<sup>1</sup>, Козочкин Д.А.<sup>1</sup>, Ильиных М.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ГБОУ ВПО «Челябинская государственная медицинская академия Минздрава России», Челябинск, Россия (454092, г. Челябинск, ул. Воровского, 64), e-mail: [mvo2003@list.ru](mailto:mvo2003@list.ru).

<sup>2</sup> ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница», Челябинск, Россия (454076, г. Челябинск, Медгородок), e-mail: [aya111@mail.ru](mailto:aya111@mail.ru)

Плейотропные эффекты эритропоэтина (ЭПО) могут быть связаны с его влиянием на экспрессию тромбоцитарных гликопротеинов. Для проверки высказанного предположения проведен анализ количественного и качественного представительства гликопротеинов на тромбоцитах в условиях дефицита эндогенного эритропоэтина (ЭПО) и при введении экзогенного ЭПО у 62 больных хронической почечной недостаточностью (ХПН), находящихся на лечении диализом в ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница». У больных ХПН повышается экспрессия гликопротеинов Gp IIb-IIIa на 35%, Gp IIb – на 43%, Gp Ib – на 52% при сравнении с группой клинически здоровых добровольцев. Количество клеток, экспрессирующих Gp Ib, значимо не изменяется, что свидетельствует об увеличении плотности рецепторов. После процедуры гемодиализа экспрессия Gp IIb-IIIa и Gp Ib возвращается к нормальному уровню. Применение экзогенного ЭПО у больных ХПН в суммарной дозе около 40000 МЕ приводит к снижению представительства рецептора Ib и комплекса IIb-IIIa, причем последнего до уровня, наблюдаемого у здоровых людей и, вероятно, за счет субъединицы IIIa, т.к. экспрессия субъединицы IIb значимо не изменяется. Таким образом, ЭПО выступает в роли регулятора экспрессии тромбоцитарных гликопротеинов.

Ключевые слова: тромбоциты, функциональная активность, рецепторы, гликопротеины, эритропоэтин, плейотропные эффекты.

## ERYTHROPOIETIN AS A REGULATOR OF THE PLATELET GLYCOPROTEIN EXPRESSION

Osikov M.V.<sup>1</sup>, Grigoryev T.A.<sup>2</sup>, Fedosov A.A.<sup>1</sup>, Kozochkin D.A.<sup>1</sup>, Ilinykh M.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> "Chelyabinsk State Medical Academy of Health Ministry of Russia", Chelyabinsk, Russia (454092, Chelyabinsk, street Vоровского, 64), e-mail: [mvo2003@list.ru](mailto:mvo2003@list.ru).

<sup>2</sup> Chelyabinsk Regional Hospital, Chelyabinsk, Russia (454076, Chelyabinsk, Medgorodok), e-mail: [aya111@mail.ru](mailto:aya111@mail.ru)

Pleiotropic effects of erythropoietin (EPO) may be related to its effect on the expression of platelet glycoproteins. To test this hypothesis the quantitative and qualitative analysis of glycoproteins on platelets in cases of endogenous erythropoietin (EPO) deficiency and the administration of exogenous EPO in 62 patients with chronic renal failure (CRF) on dialysis in Chelyabinsk Regional Hospital was conducted. In patients with chronic renal failure the expression of glycoproteins Gp IIb-IIIa is increased by 35%, Gp IIb - by 43%, Gp Ib - 52% in comparison with the group of healthy volunteers. The number of cells expressing the Gp Ib was not significantly changed, proving the receptor density enhancement. After hemodialysis Gp IIb-IIIa and Gp Ib expression returned to normal levels. The administration of exogenous EPO in patients with CRF in a total dose of about 40,000 IU reduces the number of Ib receptor and IIb-IIIa complex, and the latter up to the level of healthy people, and it is likely due to subunit IIIa, because IIb subunit expression was not significantly changed. Thus, EPO acts as a regulator of the expression of the platelet glycoprotein.

Keywords: platelets, functional activity, receptors, glycoproteins, erythropoietin, pleiotropic effects.

### Введение

Поиск эндогенных регуляторов функциональной активности тромбоцитов является актуальной фундаментальной и прикладной проблемой, т.к. позволит расширить имеющиеся представления о поддержании гомеостаза и является предпосылкой для разработки эффективных подходов фармакологической коррекции дисфункции тромбоцитов [1; 2]. В этом отношении неподдельный интерес вызывает эритропоэтин (ЭПО) как средство

базисной терапии при хронической почечной недостаточности (ХПН), плеiotропные эффекты которого в последние годы являются объектом пристального внимания исследователей во многих странах мира. Установлены нейро- и кардиопротекторные свойства ЭПО, его влияние на аффективный статус, сосудистый тонус и пролиферацию эндотелиоцитов, связанные с антиапоптотическим, пролиферацию стимулирующим, антигипоксическим и др. действиями [5; 6]. Плеiotропные эффекты ЭПО реализуются за счет наличия специфических рецепторов на нейронах, кардиомиоцитах, эндотелиоцитах и гладкомышечных клетках, эпителии почечных канальцев и др. клетках.

**Цель исследования** – исследовать влияние эритропоэтина на экспрессию тромбоцитарных гликопротеинов.

### **Материалы и методы исследования**

Для реализации поставленной цели использована кровь больных людей с хронической почечной недостаточностью (ХПН) – пациентов отделения диализа ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница». ХПН является удобной моделью для исследования эффектов ЭПО, т.к. пери- и тубулярные клетки почек являются основным местом синтеза эндогенного ЭПО. При ХПН продукция эритропоэтина критически снижается, что позволяет оценивать изменения функциональной активности тромбоцитов в этих условиях, а также в условиях введения экзогенного ЭПО. Проведено краткосрочное, открытое, проспективное клиническое исследование гемостазиологических эффектов ЭПО у больных ХПН, находящихся на гемодиализе. Первоначально обследовано 160 больных с терминальной стадией ХПН в возрасте от 22 до 72 лет (средний возраст 45,5 года), получающих гемодиализную терапию на аппаратах «Искусственная почка» 4008S/VIBAG фирмы Fresenius (Германия) 3 раза в неделю в течение 4 часов. После рандомизации в исследование включено 62 больных, из них 29 женщин и 33 мужчины. Отбор больных для исследования проводили в соответствии с критериями включения и исключения. Критерий включения: больные с терминальной стадией ХПН. Критерии исключения: 1) декомпенсация со стороны сердечно-сосудистой, дыхательной, пищеварительной систем; 2) наличие в анамнезе туберкулеза, венерических заболеваний, гепатита, ВИЧ-инфекции, онкологических заболеваний; 3) острые нарушения церебрального кровообращения; 4) острый воспалительный процесс; 5) беременность; 6) уровень гемоглобина ниже 60 г/л. Группа 1 – контроль (n=25) представлена клинически здоровыми людьми – добровольцами, не имеющими соматической патологии и сопоставимыми по возрасту и полу с основными группами. Группа 2 – больные ХПН, не принимающие ЭПО, до процедуры гемодиализа (n=24). Группа 3 – больные ХПН, не принимающие ЭПО после процедуры гемодиализа (n=24). Группа 4 – больные ХПН, принимающие ЭПО, до процедуры гемодиализа (n=38).

Группа 5 – больные ХПН, принимающие ЭПО, после процедуры гемодиализа (n=38). Кровь для исследований у больных 2–5 групп забиралась из артериального колена артерио-венозной фистулы. Больные 4 и 5 группы получали ЭПО в составе препарата «Рекормон» (МНН: эпоэтин бэта, Roche Швейцария) 2 раза в неделю внутривенно в разовой дозе 2000-4000 МЕ в течение 2 месяцев, суммарная доза составила около 40000 МЕ.

Количество тромбоцитов в периферической крови определяли на гематологическом анализаторе фирмы Orphee (Япония) волюмометрическим методом. Оценка экспрессии тромбоцитарных рецепторов выполнялась методом проточной цитометрии на проточном цитофлуориметре FACS Canto-II (Becton Dickinson, США). В качестве реактивов использовали моноклональные антитела: CD61<sup>+</sup>-FIT (Beckman Coulte, США) – для определения гликопротеина IIb/IIIa; CD41<sup>+</sup>-FIT (Beckman Coulte, США) – для определения гликопротеина IIb; CD42b<sup>+</sup>- PE (Becton Dickinson Pharmingen, США) – для определения гликопротеина Ib-Ix. Выбор исследуемых гликопротеинов определялся их принадлежностью к реализации функциональной активности тромбоцитов. Так, гликопротеины IIb/IIIa участвуют в обеспечении агрегационной способности, а гликопротеин Ib – адгезивной функции тромбоцитов. Обогащенную тромбоцитами плазму получали центрифугированием цельной крови в течение 15 минут при 1000 об/мин. Количество тромбоцитов в полученной плазме определяли и стандартизировали на гематологическом анализаторе AST-diff (Beckman Coulter, США). Для исследования экспрессии маркеров CD41<sup>+</sup>, CD42b<sup>+</sup>, CD61<sup>+</sup> на тромбоцитах полученную плазму разводили средой RPMI-1640 («ПанЭко», Россия) до концентрации тромбоцитов 20x10<sup>3</sup>/мкл. Содержимое пробирок перемешивали на вортексе в течение 5 секунд. Далее пробы инкубировались 15 мин в темноте при комнатной температуре, затем в них вносили по 450 мкл лизирующего раствора и повторно инкубировали в темноте в течение 10 мин при комнатной температуре. Экспрессию на тромбоцитах CD61<sup>+</sup>; CD41<sup>+</sup>; CD42b<sup>+</sup> оценивали по среднепиковому значению в условных единицах флюоресценции (у.е.ф.). Учитывая, что CD61<sup>+</sup> и CD41<sup>+</sup> экспрессируются на тромбоцитах в 100% случаев, а CD42b<sup>+</sup> – нет, определяли количество тромбоцитов, экспрессирующих CD42b<sup>+</sup> в % от общего количества тромбоцитов в пробе. Статистический анализ проведен с использованием пакета прикладных программ Statistica for Windows 6.0. Для анализа нормальности распределения данных применяли критерий Шапиро–Уилка, проверки гипотез о равенстве генеральных дисперсий – критерий Левена. Проверку статистических гипотез проводили с использованием непараметрических критериев (U-критерий Манна–Уитни, WW – критерий Вальда–Вольфовитца). При множественных сравнениях вводили поправку Бонферрони. Для выявления связи между параметрами

использовали коэффициент корреляции Спирмена (R). Отличия считали статистически значимыми при  $p \leq 0,05$ .

### Результаты исследования и их обсуждение

Результаты представлены в таблице 1. Как видно, у больных ХПН при исследовании до процедуры гемодиализа на тромбоцитах повышается экспрессия всех исследуемых рецепторов: Gr Пб-Ша на 35%, Gr Пб – на 43%, Gr Ib – на 52%. При этом количество клеток, экспрессирующих Gr Ib, значимо не изменяется, что свидетельствует об увеличении плотности рецепторов на поверхности отдельного тромбоцита. После процедуры гемодиализа экспрессия Gr Пб-Ша и Gr Ib не отличается от группы здоровых людей, а экспрессия Gr Пб остается повышенной.

**Таблица 1 – Влияние эритропоэтина на экспрессию рецепторов тромбоцитов у больных ХПН, находящихся на гемодиализе ( $M \pm m$ )**

Группы / показатели	Группа 1: здоровые (n=25)	Группа 2: ХПН до диализа (n=24)	Группа 3: ХПН после диализа (n=24)	Группа 4: ХПН+ЭПО до диализа (n=38)	Группа 5: ХПН+ЭПО после диализа (n=38)
Gr Пб-Ша, у.е.	1,66±0,04	2,25±0,18 *	1,93±0,15	1,63±0,04 *	1,77±0,07
Gr Пб, у.е.	1,99±0,04	2,84±0,16 *	2,70±0,14 *	2,40±0,06 *	2,65±0,10 *
Gr Ib, у.е.	560,40±39,34	850,09±79,41 *	728,36±76,74	650,29±27,93 *#	529,54±26,84 &^
Gr Ib, % кл.	74,86±3,68	73,66±4,44	61,92±4,92 *	85,56±1,89 * #	60,89±3,84 ^

\* – статистически значимые различия ( $p < 0,05$ ) с группой 1,

# – с группой 2,

& – с группой 3,

^ – с группой 4.

На первый взгляд, полученные результаты противоречат изменению агрегации тромбоцитов у больных ХПН, ранее нами было показано, что она существенно снижается [3; 4]. Известно, что агрегация тромбоцитов обеспечивается экспрессией Gr Пб-Ша на поверхности тромбоцитов и реализуется взаимодействием этих гликопротеинов с фибриногеном и реце фактором Виллебранда. Действительно, нами не обнаружено значимой корреляции между экспрессией Gr Пб-Ша и скоростью агрегации тромбоцитов у больных ХПН как до процедуры гемодиализа ( $R = -0,09$ ;  $p > 0,05$ ), так и после ( $R = -0,10$ ;  $p > 0,05$ ). Кроме того, ряд исследователей констатируют снижение экспрессии Gr Ib и Gr Пб-Ша на поверхности тромбоцитов и связывают этот факт с нарушением адгезивной и агрегационной способности клеток [8]. Еще более не ясен факт изменения рецепторного профиля тромбоцитов у больных ХПН после процедуры гемодиализа.

Однако детальный анализ литературных источников, а также собственных результатов позволил предположить следующее. У тромбоцитов больных ХПН, находящихся на гемодиализе, наблюдаются существенные изменения цитоскелета, специфичные для молекул актина, альфа-актинина и миозина [9]. Вместе с тем известно, что после активации тромбоцитов экспрессируемые на их поверхности гликопротеины должны пройти интернализацию, однако из-за нарушения сборки цитоскелета гликопротеины накапливаются на поверхности клетки, их плотность увеличивается. Кроме того, повышенный уровень гликопротеинов характерен для более «старых» тромбоцитов, которые накапливаются в крови у больных ХПН из-за феномена негативной селекции [10].

Процедура гемодиализа оказывает неоднозначный, двухфазный эффект на реактивность тромбоцитов, оцениваемый по экспрессии поверхностных рецепторов: в начале процедуры реактивность тромбоцитов возрастает, а к концу – достоверно снижается. При этом после диализа на тромбоцитах определяются фибриновые депозиты; полагают, что именно этот фактор, а не функциональная перестройка тромбоцитов, приводит к изменению их активности после гемодиализа [7].

Установлено, что ЭПО у больных ХПН изменяет экспрессию мембранных гликопротеинов на поверхности тромбоцитов (таблица 1). В частности, при исходном повышении снижается экспрессия рецепторного комплекса Пв-Ша и рецептора Ib. По всей видимости, эффект ЭПО на комплекс Пв-Ша реализуется за счет субъединицы Ша, т.к. экспрессия субъединицы Пв значимо не изменяется. Следует отметить, что плотность рецепторов Пв-Ша на фоне применения ЭПО восстанавливалась до уровня, наблюдаемого у здоровых людей. После процедуры гемодиализа экспрессия Пв-Ша не изменялась, а представительство рецептора Ib еще больше снижалось, достигая значений контрольной группы. Привлекает внимание тот факт, что удельный вес клеток, презентующих рецепторы Ib, на фоне применения ЭПО повышался, а после диализа восстанавливался до уровня здоровых людей.

Как было предположено выше, у больных ХПН повышение на поверхности тромбоцитов экспрессии гликопротеинов, обеспечивающих реализацию их функциональной активности, обусловлено нарушением интернализации этих рецепторов из-за изменений свойств цитоплазматической мембраны в условиях уремической интоксикации, оксидативного стресса, контакта с диализной мембраной. Увеличение доли тромбоцитов, экспрессирующих Gr Ib, может быть связано с увеличением общего количества тромбоцитов в периферической крови на фоне применения ЭПО. Действительно, установлена положительная средней силы связь между количеством тромбоцитов, экспрессирующих Gr

Ib, и общим количеством тромбоцитов ( $R=0,52$ ;  $p<0,05$ ), а также сильная связь с уровнем тромбокрита ( $R=0,74$ ;  $p<0,05$ ).

### **Заключение**

Таким образом, у больных ХПН до процедуры гемодиализа повышается представительство на тромбоцитах Gr IIb-IIIa на 35%, Gr IIb – на 43%, Gr Ib – на 52%. Количество клеток, экспрессирующих Gr Ib, значимо не изменяется, что свидетельствует об увеличении плотности рецепторов. После гемодиализа экспрессия Gr IIb-IIIa и Gr Ib возвращается к нормальному уровню. ЭПО выступает в роли регулятора экспрессии тромбоцитарных гликопротеинов: у больных ХПН снижает представительство рецептора Ib и комплекса IIb-IIIa, причем последнего до уровня, наблюдаемого у здоровых людей и, вероятно, за счет субъединицы IIIa, т.к. экспрессия субъединицы IIb значимо не изменяется.

### **Список литературы**

1. Осиков М.В. Церулоплазмин устраняет нарушения гемостаза при экспериментальной гипергаммониемии / М.В. Осиков, Е.В. Макаров, Л.В. Кривохижина // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2006. – Т. 142. – № 10. – С. 396-399.
2. Осиков М.В. Гемостазиологические эффекты  $\alpha$ -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.
3. Осиков М.В. Реактивные изменения клеточно-гуморальной системы организма как типовой патологический процесс и его регуляция реактантами острой фазы : автореферат дис. ... д-ра мед. наук. – Челябинск, 2008. – 46 с.
4. 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.
5. 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.
6. 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.

7. Aggarwal A. Biphasic effects of hemodialysis on platelet reactivity in patients with end-stage renal disease: a potential contributor to cardiovascular risk / A. Aggarwal, S.S. Kabbani J.M. Rimmer et al. // Am. J. Kidney Dis. – 2002. – Vol. 40. – № 2. – P. 315-322.
8. Brzósko S. Influence of hemodialysis on expression of glycoprotein Ib platelets reactivity in patients with the end stage renal failure / S. Brzosko, T. Hryzko, J. Zak et al. // Przegl. Lek. – 2002. – Vol. 59. – № 10. – P. 823-825.
9. Díaz-Ricart M. Abnormal platelet cytoskeletal assembly in hemodialyzed patients results in deficient tyrosine phosphorylation signaling / M. Diaz-Ricart, E. Estebanell, A. Cases et al. // Kidney Int. – 2000. – Vol. 27. – P. 1905-1914.
10. Moal V. Impaired expression of glycoproteins on resting and stimulated platelets in uraemic patients / V. Moal, P. Brunet, L. Dou, et al. // Nephrol. Dial. Transplant. – 2003. – Vol. 18. – № 9. – P. 1834-1841.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект 12-04-31726 «Механизм влияния эритропоэтина на функциональную активность тромбоцитов».*

#### **Рецензенты**

Цейликман В.Э., д.б.н., профессор, заведующий кафедрой биологической химии ГБОУ ВПО «Челябинская государственная медицинская академия Минздравсоцразвития России», г. Челябинск.

Абрамовских О.С., д.м.н., старший преподаватель кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии, клинической лабораторной диагностики ГБОУ ВПО «Челябинская государственная медицинская академия Минздравсоцразвития России», г. Челябинск.