

## МЕХАНИЗМЫ НАРУШЕНИЙ ЭРИТРОПОЭЗА ПРИ СЕПСИСЕ

Э. Н. Баркова, В. В. Кузнецов, Е. В. Жданова,  
Л. Ф. Балабанова, О. Г. Сивков, Е. В. Назаренко

Тюменская государственная медицинская академия, кафедра патофизиологии

## Mechanisms of Impaired Erythropoiesis in Sepsis

E. N. Barkova, V. V. Kuznetsov, Ye. V. Zhdanova, L. F. Balabanova, O. G. Sivkov, Ye. V. Nazarenko

Department of Pathophysiology, Tyumen State Medical Academy, Tyumen

**Цель исследования** — определить механизмы нарушения пространственно-временной организации эритропоэза при экспериментальном сепсисе. **Материал и методы.** У 240 крыс Вистар с полимикробным сепсисом и 80 интактных животных изучена суточная динамика титра эритропоэтина, содержания эритроцитов и их распределения по объему, гемоглобина и ретикулоцитов в периферической крови, продолжительности жизни и продукции эритроцитов, малонового диальдегида, статокINETического индекса эритроидных клеток и инкорпорации  $^{59}\text{Fe}$  костным мозгом. Обнаружено, что при сепсисе десинхронизм ПВОЭ обусловлен ростом МДА и популяции микроцитов с укороченной продолжительностью жизни. Продолжительность максимума для эритропоэза увеличена, для продукции эритроцитов — сокращена на фоне снижения уровня эритроцитов и гемоглобина в периферической крови. Прогрессирующий рост титра эритропоэза сопровождается снижением статокINETического индекса и инкорпорации  $^{59}\text{Fe}$  костным мозгом при одновременном увеличении популяции микроцитов и сокращении продолжительности жизни эритроцитов. **Заключение.** Установлено, что в механизмах десинхронизма ПВОЭ ведущая роль принадлежит эндотоксикозу. Активация процессов липопероксидации в мембранах эритроцитов повышает их ригидность, инициируя развитие анемии и нарушения микроциркуляции. Снижение продукции эритроцитов, статокINETического индекса и инкорпорации  $^{59}\text{Fe}$  костным мозгом на фоне неадекватно высокого титра эритропоэза свидетельствует о торможении эритропоэтинзависимых процессов в клетках-мишенях, что способствует прогрессии септической анемии. **Ключевые слова:** биоритмы, эритропоэз, эритропоэтин, анемия, сепсис.

**Objective:** to determine the mechanisms responsible for impairments in the space-time organization of erythropoiesis (SPOE) in experimental sepsis. **Materials and methods.** The diurnal changes in the titer of erythropoietin, the content of red blood cells, and their distribution by volume, the peripheral blood levels of hemoglobin and reticulocytes, life span, the production of erythrocytes, malonic dialdehyde (MDA), the statokinetic erythroid cell index, and bone marrow  $^{59}\text{Fe}$  incorporation were studied in 240 Wistar rats with multimicrobial sepsis and 80 intact animals. **Results.** In sepsis, SPOE desynchronization was found to be due to increases in MDA and in the population of microcytes with shorter life span. The maximum duration was increased for erythropoiesis and decreased for erythrocytic production with the decreased peripheral blood level of erythrocytes and hemoglobin. The progressive rise in the titer of erythropoiesis was accompanied by decreases in the statokinetic index and bone marrow  $^{59}\text{Fe}$  incorporation with a simultaneous increase in the population of microcytes and with a reduction in the life span of erythrocytes. **Conclusion.** Endotoxemia was established to play the leading role in the mechanisms of SPOE desynchronization. Activation of lipid peroxidation in the red blood cell membranes enhances their rigidity, by initiating the development of anemia and microcirculatory disorders. The decreases in erythrocytic production, statokinetic index, and bone marrow  $^{59}\text{Fe}$  incorporation with an inadequately high titer of erythropoiesis suggest the inhibition of erythropoietin-dependent processes in the target cells, which promotes the progression of septic anemia. **Key words:** bio-rhythms, erythropoiesis, erythropoietin, anemia, sepsis.

Осложнения гнойно-воспалительных заболеваний анемией различной степени тяжести [1–3] сопровождаются появлением в периферической крови патологических форм эритроцитов с укороченной продолжительностью жизни и сниженной деформируемостью [4, 5]. Отсутствие корреляции между титром эритропоэтина сыворотки и тяжестью малокровия у септических больных [6–8], а также адекватной реакции эритрона на антианемическую терапию [9, 10] определяют актуальность изучения механизмов нарушения различных уровней интеграции эритропоэза как патогенетической основы для ранней диагностики анемии при сепсисе.

Информативность ритмометрической оценки эритропоэтинзависимых реакций позволяет выявить механизмы адаптивных реакций эритропоэза и разработать способы их коррекции при различных патологических состояниях [11, 12].

В свете этих представлений, актуальность изучения временной организации эритропоэза обусловлена отсутствием данных об особенностях суточной динамики показателей, характеризующих различные уровни его интеграции при сепсисе.

Цель исследования — определить механизмы нарушений пространственно-временной организации эритропоэза при экспериментальном сепсисе.

Таблица 1

## Ритмометрические параметры эритропоэза у крыс Вистар при сепсисе

Показатель	Группа животных	Мезор ( $M \pm t$ )	Амплитуда ( $M \pm t$ )	Акрофаза (95% ДИ)
Эритропоэтин, МЕ/л	Контроль	18,5±1,8	13,5±1,2	16.29(15.42;17.16)
	Сепсис: 1-е сутки	22,2±3,2	10,5±2,4	15.10(14.27;19.16)
	3-и сутки	52,4±4,3*	11,4±2,9	Ритма нет
	5-е сутки	65,5±5,2*	10,2±1,8	Ритма нет
Продукция эритроцитов, $\times 10^9$ /л	Контроль	27,9±1,2	9,1±0,2	16.49(15.38;17.52)
	Сепсис: 1-е сутки	23,1±1,6*	6,3±2,0	16.10(15.30;16.27)
	3-и сутки	19,1±1,9*	4,2±2,7	Ритма нет
	5-е сутки	17,5±1,2*	3,1±2,1	Ритма нет
Продолжительность жизни эритроцитов, сутки	Контроль	46,0±1,3	13,2±1,2	9.27(8.42;10.16)
	Сепсис: 1-е сутки	38,1±1,6*	9,5±2,4	10.12(9.27;10.46)
	3-и сутки	27,1±1,5*	6,4±0,9	Ритма нет
	5-е сутки	23,6±1,6*	4,2±0,1	Ритма нет
Ретикулоциты, $\times 10^9$ /л	Контроль	106,0±3,0	44,0±2,0	16.34(15.32;17.58)
	Сепсис: 1-е сутки	89,1±3,0*	26,5±2,1	17.12(16.15;17.30)
	3-и сутки	54,1±4,1*	5,4±0,9	Ритма нет
	5-е сутки	40,6±5,2*	4,8±0,8	Ритма нет
Эритроциты, $\times 10^{12}$ /л	Контроль	5,87±0,12	1,40±0,16	21.45(20.40;23.12)
	Сепсис: 1-е сутки	3,98±0,08*	0,44±0,07	22.05(20.15; 22.25)
	3-и сутки	3,50±0,06*	0,31±0,09	Ритма нет
	5-е сутки	3,21±0,10*	0,30±0,08	Ритма нет
Гемоглобин, г/л	Контроль	148,5±1,8	28,0±0,21	22.49(20.36; 23.52)
	Сепсис: 1-е сутки	96,1±1,5*	15,5±0,31	22.32(20.21; 22.08)
	3-и сутки	85,8±1,4*	10,3±0,29	Ритма нет
	5-е сутки	79,5±1,6*	9,8±0,41	Ритма нет

Примечание. \* —  $p < 0,01$  по сравнению с аналогичными показателями в контрольной группе.

## Материалы и методы

Комплексное ритмометрическое исследование эритропоэза проведено у 240 крыс Вистар с полимикробным сепсисом и 80 интактных животных с массой 180–200 граммов. Все животные находились в равных условиях водного, пищевого и светового режима. Экспериментальный сепсис воспроизводили посредством наложения лигатуры на слепую кишку и перфорации ее стенки (ЛСКП) инъекционной иглой [13] у крыс, наркотизированных посредством внутривенного введения тиопентала натрия из расчета 5 мг/100 г массы тела. Исследования проводили 8 раз в сутки через трехчасовые интервалы на протяжении 1-х, 3-х и 5-х суток сепсиса параллельно в опытной и контрольной группах. Кровь для исследования забирали из левой яремной вены. Содержание гемоглобина (Г), эритроцитов (Э) и их распределение по объему определяли на автоматическом анализаторе Cell-Dyn 3500 фирмы Abbott (Германия). Содержание ретикулоцитов (Р) оценивали после окраски мазков 1% раствором бриллианткрезилблау. Уровень сывороточного эритропоэтина (ЭП) исследовали с помощью ИФА, используя тест-систему «ERYTHROPOIETIN — ELISA» фирмы IBL (Hamburg). Одновременно определяли митотическую активность эритроидных клеток костного мозга по величине статмокинетического индекса, суточную продукцию (СПЭ) и продолжительность жизни эритроцитов (ПЖЭ) [14]. Утилизацию железа эритроидными клетками костного мозга оценивали после внутрибрюшинного введения 0,4 мл раствора цитрата железа, меченного  $^{59}\text{Fe}$  (18 кБк) [15], активность ПОЛ — по содержанию малонового диальдегида (МДА) [16]. Для статистической обработки результатов использовали программы «Statgraphics Plus for Windows» и «Косинор» для расчета хронобиологических параметров: мезора — среднесуточной величины, амплитуды — наибольшего отклонения от мезора; акрофаза — времени максимального значения. Степень взаимосвязи показателей оценивали по коэффициенту корреляции ( $r$ ).

## Результаты и обсуждение

Через 24 часа после наложения ЛСКП на фоне сепсиса значительно увеличены мезоры МДА и популяции микроцитов; резко сокращена и продолжительность жизни эритроцитов (табл. 1, 2). Обнаружена сильная обратная зависимость между среднесуточными величинами МДА и ПЖЭ ( $r = -0,87$ ;  $p < 0,05$ ), а также между мезорами процента популяции микроцитов и ПЖЭ ( $r = -0,89$ ;  $p < 0,05$ ). При этом достоверно снижены среднесуточные уровни Э и Г (табл. 1). Очевидно, что инициальные механизмы анемии при сепсисе сопряжены с увеличением в периферической крови популяции ригидных микроцитов с укороченной продолжительностью жизни.

Мезоры ЭП, СПЭ и Р, несмотря на явную тенденцию к снижению, не имеют достоверных различий по сравнению с таковыми у интактных животных. При ритмометрическом анализе отчетливо выражена синхронизация акрофаз ЭП и СПЭ, однако продолжительность максимальной продукции эритроцитов сокращена (доверительные границы для акрофазы СПЭ у интактных животных: 15,18–17,52; при сепсисе: 15,30–16,27), а для титра ЭП — увеличена (доверительные границы для акрофазы у интактных животных: 15,42–17,16; при сепсисе: 14,27–19,16). Закономерное удлинение внутренней акрофазы ЭП-СПЭ (временной интервал между акрофазами сравниваемых показателей) у крыс с сепсисом до 60 мин (20 мин — в контроле; табл. 1) свидетельствует о снижении скорости эритропоэтинзависимых процессов в клетках-мишенях и сокращении плацдарма эритропоэза в кровяной ткани.

Таблица 2

**Ритмометрические параметры МДА ( нмоль/мл)  
и распределения эритроцитов (%) по объему у крыс Вистар при сепсисе**

Группа животных	Показатель	Мезор ( $M \pm t$ )	Амплитуда ( $M \pm t$ )	Акрофаза (95% ДИ)
Контроль	МДА	109,9 $\pm$ 1,7	25,7 $\pm$ 2,8	21.22(19.12;22.36)
	микроциты	12,1 $\pm$ 0,9	4,3 $\pm$ 0,8	22.10(20.30;00.00)
	нормоциты	75,4 $\pm$ 1,1	28,9 $\pm$ 1,3	15.40(14.50;16.30)
	макроциты	12,5 $\pm$ 0,7	4,8 $\pm$ 0,9	17.21(16.27;17.46)
Сепсис: 1-е сутки	МДА	236,7 $\pm$ 6,7*	67,9 $\pm$ 9,8	20.07(18.09;21.51)
	микроциты	25,4 $\pm$ 1,1*	5,9 $\pm$ 1,2	21.12(19.38;23.52)
	нормоциты	49,5 $\pm$ 1,9*	20,1 $\pm$ 1,9	16.00(15.30;17.50)
	макроциты	25,1 $\pm$ 0,8*	2,3 $\pm$ 0,8	17.01(16.17;17.36)
Сепсис: 3-и сутки	МДА	309,8 $\pm$ 8,3*	60,7 $\pm$ 10,9	Ритма нет
	микроциты	34,1 $\pm$ 2,1*	7,5 $\pm$ 2,4	Ритма нет
	нормоциты	53,7 $\pm$ 2,9*	6,4 $\pm$ 0,9	Ритма нет
	макроциты	12,2 $\pm$ 0,6*	0,9 $\pm$ 0,3	Ритма нет
Сепсис: 5-е сутки	МДА	327,3 $\pm$ 8,8*	53,4 $\pm$ 11,2	Ритма нет
	микроциты	45,8 $\pm$ 3,0*	6,5 $\pm$ 2,1	Ритма нет
	нормоциты	45,9 $\pm$ 3,4*	5,4 $\pm$ 0,9	Ритма нет
	макроциты	9,3 $\pm$ 0,7*	0,8 $\pm$ 0,3	Ритма нет

**Примечание.** Микроциты — эритроциты, имеющие объем менее 80 фл; нормоциты — 81—99 фл; макроциты — более 99 фл.

\* —  $p < 0,01$  по сравнению с аналогичными показателями в контрольной группе.

Таблица 3

**Ритмометрические параметры пролиферативной активности эритроидных клеток и инкорпорации  $\text{Fe}^{59}$   
костным мозгом у крыс Вистар с экспериментальным сепсисом**

Группа животных	Показатель	Мезор ( $M \pm t$ )	Амплитуда ( $M \pm t$ )	Акрофаза (95% ДИ)
Колхициновые митозы, %	Контроль	19,06 $\pm$ 1,09	11,37 $\pm$ 0,64	17.38 (16.30;18.19)
	Сепсис: 1-е сутки	13,12 $\pm$ 2,11*	9,12 $\pm$ 2,29	16.50 (15.41;17.18)
	3-и сутки	10,93 $\pm$ 3,09*	3,11 $\pm$ 1,17	Ритма нет
	5-е сутки	8,65 $\pm$ 3,15*	1,95 $\pm$ 0,95	Ритма нет
Инкорпорация $\text{Fe}^{59}$ , имп/мин/мг <sup>-1</sup>	Контроль	13746,4 $\pm$ 576,4	5070,0 $\pm$ 400,0	19.49 (15.20; 23.24)
	Сепсис: 1-е сутки	10975,6 $\pm$ 631,3*	4980,0 $\pm$ 511,2	15.37(14.40;16.11)
	3-и сутки	8894,4 $\pm$ 917,7*	2163,5 $\pm$ 345,9	Ритма нет
	5-е сутки	5785,7 $\pm$ 945,3*	1875,3 $\pm$ 278,5	Ритма нет

**Примечание.** ДИ — доверительный интервал (здесь и в табл. 2). \* —  $p < 0,01$  по сравнению с аналогичными показателями в контрольной группе.

На третьи сутки экспериментального сепсиса прогрессирующее падение средне-суточных уровней гемоглобина и эритроцитов сопровождается ростом концентрации МДА и популяции микроцитов, а также нивелированием циркадианного ритма для этих показателей, закономерно проявляющегося у интактных крыс Вистар (табл. 1, 2). Ритм показателей эритропоэза нивелирован на фоне высокого титра плазменного эритропоэтина и снижения мезоров СПЭ и Р, а также статмокинетического индекса эритроидных клеток и среднесуточного показателя инкорпорации  $\text{Fe}^{59}$  костным мозгом (табл. 3).

Расогласование циркадианных ритмов эритропоэза и эритродиереза в полной мере проявляется на протяжении пятых суток экспериментального сепсиса. О рефрактерности клеток-мишеней к высокому титру эндогенного ЭП свидетельствует торможение митотической активности эритроидных клеток, а также весьма значительное снижение способности кроветворной ткани поглощать  $\text{Fe}^{59}$ . Этот показатель находится в сильной обратной зависимости с весьма интенсивным ростом популяции микроцитов ( $r = -0,79$ ;  $p < 0,05$ ), что

свидетельствует о торможении эритропоэтинзависимых процессов и перестройке кинетики эритрона на неэффективный путь.

Наши исследования впервые показали, что десинхрониз ПВОЭ является основой для выявления ранних нарушений эритроцитарного баланса. Уже в течение 1-х суток экспериментального сепсиса обнаружено значительное увеличение популяции микроцитов с укороченной ПЖ, перегруженных МДА. Несомненно, что эти изменения следует квалифицировать как признаки ускоренного старения эритроцитов [17], стимулирующего не только эритрофагоцитоз [18], но и потерю гемоглобина зрелыми клетками: дефицит антиоксидантов приводит к окислению гемоглобина и потере гемина [19]. Очевидно, что первоначальным звеном в патогенезе септической анемии является повышенный эритродиерез.

Прогрессирующий рост популяции микроцитов, находящийся в прямой зависимости с увеличением МДА ( $r = +0,85$ ;  $p < 0,01$ ) и обратной корреляции с ПЖ ( $r = -0,89$ ;  $p < 0,05$ ), отмечен на протяжении всего эксперимента. Снижение деформальности у корот-

коживущих патологических форм эритроцитов способствует нарушениям микроциркуляции и усугублению гипоксии при сепсисе [4, 5]. Более того, взаимодействие с ригидными эритроцитами стимулирует в моноцитах секрецию интерлейкина-1 и  $\alpha$ -ФНО, конкурирующих с ЭП за рецепторно-опосредованные реакции в клетках-мишенях [20, 21]. Очевидно, что повышенный эритродиализ проявляет себя не только как инициальный механизм септической анемии, но и как пусковой фактор нарушения микроциркуляции, приводящего к развитию полиорганной недостаточности, а также к снижению транспорта гормона в костный мозг.

При анализе амплитудно-фазовых взаимоотношений ЭП и СПЭ обнаружен внутрисистемный десинхронизм. Несомненно, что торможение ЭП-зависимых процессов — свидетельство снижения рецепторно-опосредованного биосинтеза в клетках-мишенях. Очевидно, что при сепсисе, осложненном ПОН, и при септическом шоке нарушения кислородного бюджета связаны не только с дисфункцией системной гемодинамики, внешнего дыхания и кислородной емкости крови, но и с тканевой гипоксией [22]. В этих условиях сохранена адекватная реакция на критическое падение  $pO_2$  в тка-

нях: как при анемии и высотной гипоксии организм реагирует компенсаторной гиперпродукцией ЭП [23].

Обнаруженный в наших экспериментах аномально высокий титр ЭП обусловлен не только стимуляцией его биосинтеза, но и снижением утилизации. В этом убеждают прогрессирующее падение как СПЭ, так и показателей инкорпорации  $Fe^{59}$  и митотического индекса эритроидных клеток костного мозга. Нарастающий объем популяции короткоживущих эритроцитов-микроцитов в периферической крови, коррелирующий с повышением уровня МДА, обусловлен не только эритрофагоцитозом, но и снижением пролиферативного пула ЭП-чувствительных клеток на фоне эндотоксикоза, перестройкой кинетики и существенным преобладанием неэффективного эритропоэза.

## Заключение

Таким образом, анализ ПВОЭ приводит к заключению о ведущей роли эндотоксикоза в повреждении всех уровней интеграции эритрона при сепсисе. Высокий уровень ЭП не обеспечивает адекватное напряжение эритропоэза вследствие ингибиции эндотоксинами рецепторно-опосредованных процессов в клетках-мишенях.

## Литература

1. Aird W. The hematologic system as a marker of organ dysfunction in sepsis. *Mayo Clin. Proc.* 2003; 7: 869–881.
2. Cadi P., Claessens Y., Cariou A., Safran D. Severe bone marrow necrosis associated with septic shock in the intensive care. *Ann. Fr. Anesth. Reanim.* 2004; 5: 501–504.
3. Goyette R. E., Key N. S., Ely E. Hematologic changes in sepsis and their therapeutic implications. *Semin Respir. Crit. Care Med.* 2004; 6: 645–659.
4. Condon M., Kim J., Deitch E. et al. Appearance of an erythrocyte population with decreased deformability and hemoglobin content following sepsis. *Am. J. Heart Circ. Physiol.* 2003; 6: 2177–2184.
5. Posch J., Leray C., Ruef P. et al. Endotoxin binding to erythrocyte membrane and erythrocyte deformability in human sepsis and *in vitro*. *Crit. Care Med.* 2003; 3: 924–928.
6. Fowler R. A., Rizoli S. B., Levin P. D., Smith T. Blood conservation for critically ill patients. *Crit. Care Clin.* 2004; 2: 313–324.
7. Tamion F., Menard J. F., Girault C. et al. Erythropoietin and renin as biological markers in critically ill patients. *Crit. Care Med.* 2004; 8: 328–335.
8. Tamion F., Le Cam-Duchez V., Menard J. et al. Serum erythropoietin levels in septic shock. *Anaesth. Intensive Care* 2005; 5: 578–584.
9. Napolitano L. M. Current status of blood component therapy in surgical critical care. *Curr. Opin Crit. Care* 2004; 5: 311–317.
10. Zimmerman J. L. Use of blood products in sepsis: an evidence-based review. *Crit. Care Med.* 2004; 11 Suppl.: 542–547.
11. Баркова Э. Н., Черноглазова О. В. Механизмы репаративных реакций эритрона при экстремальных воздействиях. *Бюл. СО АМН СССР* 1986; 3: 76–78.
12. Баркова Э. Н., Жданова Е. В., Курлович Н. А. Хронофизиология и хронопатология обмена железа. Екатеринбург: Полиграфист; 2001.
13. Baker C., Chaudry I., Gaines H. et al. Evaluation of factors affecting mortality-rate after sepsis in a murine cecal ligation and puncture model. *Surgery* 1983; 94: 331–335.
14. Мосягина Е. Н. Нормальное кроветворение и его регуляция. Под ред. Н. А. Федорова. М.: Медицина; 1976. 341–363.
15. Козинец Г. И., Тюбиана М., Фридель Э. Исследование динамики эритропоэза с помощью тимидина-НЗ,  $Fe^{59}$  и эритропоэтина. *Мед. радиология* 1963; 6: 60–63.
16. Стальная И. Д. Современные методы в биохимии. М.: Медицина; 1977: 63–66.
17. Spolarics Z., Siddiqi M., Siegel J. et al. Increased incidence of sepsis and altered mono-cyte functions in severely injured type A-glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient african american trauma patients. *Crit. Care Med.* 2001; 29: 728–736.
18. Bratosin D., Mazurier J., Tissier J. et al. Cellular and molecular mechanisms of senescent erythrocyte phagocytosis by macrophages. *Biochimie* 1998; 80: 173–195.
19. Comporti M., Signorini C., Buonocore G. et al. Iron release, oxidative stress and erythrocyte ageing. *Free Radic. Biol. Med.* 2002; 32: 568–576.
20. Liese A., Siddiqi M., Siegel J. et al. Augmented TNF- and IL-10 production by primed human monocytes following interaction with oxidatively modified autologous erythrocytes. *J. Leukoc. Biol.* 2001; 70: 289–296.
21. Richard C., Wilcox B., Loegering D. IgG-coated erythrocytes augment LPS-stimulated TNF- $\alpha$  secretion, TNF- $\alpha$  mRNA levels, and TNF- $\alpha$  mRNA stability in macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000; 271: 70–74.
22. Torres F., Spiess B., Pittman R. et al. Experimental analysis of critical oxygen delivery. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2005; 3: H1071–H1079.
23. Kendall R. Erythropoietin. *Clin. Lab. Haematol.* 2001; 23: 71–80.

Поступила 20.06.07