

ВЛИЯНИЕ ЭРИТРОПОЭТИНА НА ПОКАЗАТЕЛИ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ IN VITRO

¹Осиков М.В., ¹Телешева Л.Ф., ¹Ожиганов К.С., ²Федосов А.А.

¹Научно-образовательный центр «Проблемы фундаментальной медицины»

²ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России (454092, г. Челябинск, ул. Воровского, 64), e-mail: kanc@chelsma.ru

За последние 20 лет накоплены сведения о плеiotропных, незритропоэтических функциях эритропоэтина (ЭПО), система ЭПО - рецептор ЭПО на ауто- и паракринном уровнях рассматривается как звено неспецифической защиты при повреждении, а рецепторы ЭПО на незритроидных клетках, в частности на различных популяциях лейкоцитов, в том числе фагоцитах, обозначаются как защищающие ткань рецепторы. Цель работы – исследовать влияние различных концентраций ЭПО на функциональную активность фагоцитов в экспериментальных условиях *in vitro* – реализована на цельной крови 20 клинически здоровых людей. Рекомбинантный человеческий ЭПО в составе препарата «Эпокрин» (международное непатентованное название: эпоэтин альфа, ФГУП ГНИИ ОЧБ ФМБА России, г. Санкт-Петербург) применяли в концентрациях 1,88 МЕ/л; 3,75 МЕ/л; 7,5 МЕ/л; 15 МЕ/л; 30 МЕ/л, что соответствует от 12,5, 25, 50, 100, 200% от среднего физиологического уровня ЭПО в крови, показатели исследовали после 10 и 30 мин инкубации в термостате при 37 °С. Функцию фагоцитов исследовали по способности поглощать частицы монодисперсного, полистирольного латекса и кислород-зависимому внутриклеточному метаболизму в спонтанном и индуцированном тесте с нитросиним тетразолием (НСТ-тесте). Установлено, что 10-минутный контакт ЭПО с цельной кровью не оказывает статистически значимого влияния на функцию фагоцитов, после 30-минутной инкубации ЭПО с цельной кровью зафиксирована активация поглотительной способности и кислородзависимого метаболизма фагоцитов периферической крови. Выявлено, что ЭПО в диапазоне доз от 1,88 до 30 МЕ/л увеличивает количество активно фагоцитирующих клеток и поглотительную способность отдельного фагоцита; в дозах 3,75 и 15 МЕ/л ЭПО повышает количество клеток, генерирующих активные метаболиты кислорода, и интенсивность генерации активных метаболитов кислорода отдельным фагоцитом в индуцированном НСТ-тесте. Эффект ЭПО на функциональную активность фагоцитов не зависит от дозы.

Ключевые слова: эритропоэтин, врожденный иммунитет, фагоцитоз, *in vitro*.

ERYTHROPOIETIN IMPACT ON INNATE IMMUNITY INDICES IN IN VITRO EXPERIMENTAL CONDITIONS

¹Osikov M.V., ¹Telesheva L.F., ¹Ozhiganov K.S., ²Fedosov A.A.

¹Research and Education Center of Basic Medicine Issues,

²"South Ural State Medical University" of Health Ministry of Russian Federation (454092, Chelyabinsk, Vorovskogo str., 64), e-mail: kanc@chelsma.ru

Data of pleiotropic, nonerythropoietic functions of erythropoietin (EPO) were accumulated during 20 years. EPO- EPO receptor on the autocrine/paracrine axis is considered as nonspecific protection in case of damage, and EPO receptors on nonerythroid cells on various leukocyte populations including phagocytes are indicated as tissue protective receptors. The study aim – investigation of different EPO concentrations effect on phagocytes functional activity in *in vitro* experimental conditions - was implemented on the whole blood of 20 healthy people. Recombinant human EPO as ingredient of "Epoetin" (international nonproprietary name: epoetin alfa, Russia, St. Petersburg) was used at concentrations of 1.88 IU/l, 3.75 IU/l, 7.5 IU/l, 15 IU/l, 30 IU/l, corresponding to 12.5%, 25%, 50%, 100%, 200% of EPO average physiological levels in blood. Indices were examined in 10 and 30 min of incubation in thermostat at 37 °C. Phagocytic function was investigated by absorbability of monodisperse polystyrene latex particles and oxygen-dependent intracellular metabolism in spontaneous and induced nitroblue tetrazolium (NBT) test. EPO 10-minute contact with whole blood had not statistically significant effect on phagocytes function. Activation of absorbability and oxygen-dependent metabolism of peripheral blood phagocytes was noted after a 30-minute incubation of EPO with whole blood. EPO in doses from 1.88 IU/l to 30 IU/l increases active phagocytes amount and individual phagocyte absorbability, in doses of 3.75 IU/l and 15 IU/l EPO increases the number of cells which generate active oxygen metabolites, and intensity of reactive oxygen metabolites generation in individual phagocytes in induced NBT-test. EPO effect on phagocytes functional activity is not dose-dependent.

Keywords: erythropoietin, innate immunity, phagocytosis, in vitro.

Клеточные механизмы врожденного иммунитета связаны с реализацией функциональной активности фагоцитирующих клеток, прежде всего нейтрофилов и моноцитов/макрофагов. Изменение функции фагоцитов может являться ключевым звеном патогенеза при различных заболеваниях и типовых изменениях гомеостаза [2]. Так, при хронической почечной недостаточности активация врожденного звена иммунитета и связанная с ней манифестация локального и системного воспаления способствует развитию и прогрессированию сердечно-сосудистых заболеваний; при термической травме изменения функции фагоцитов сопряжены с динамикой и успешным завершением репаративных процессов. Одной из ключевых задач современной медицинской науки является поиск регуляторов функциональной активности эффекторов врожденного иммунитета. Ранее нами продемонстрирована роль биологически активных веществ эндогенной природы церулоплазмينا и альфа-1-кислого гликопротеина в регуляции функции фагоцитов при различной патологии [1; 3; 4]. В последние годы внимание многих исследователей привлекают плеiotропные эффекты эритропоэтина (ЭПО). Впервые ЭПО стал известен как гемопозитин – фактор, стимулирующий образование эритроцитов *de novo*, благодаря пионерской работе Carnot and Deflandre, опубликованной в 1906 г. Основным местом синтеза ЭПО являются перитубулярные и тубулярные клетки почек, в которых в ответ на снижение парциального давления кислорода экспрессируется ген ЭПО при участии гипоксия-индуцируемого фактора-1 (HIF-1). Современные представления о механизмах действия ЭПО на молекулярном уровне позволяют отнести его одновременно к гормонам, факторам роста и цитокинам. Основной точкой приложения для действия ЭПО являются клетки эритроидного ряда в костном мозге: бурст- и колониеобразующие единицы гранулоцитарно-моноцитарно-мегакариоцитарно-эритроцитарные, эритроцитарные, а также эритробласты и пронормобласты, на которых имеются специфические рецепторы. ЭПО отвечает за пролиферацию, дифференцировку и угнетение апоптоза в этих клетках. Открытие рецепторов для ЭПО на клетках незритроидных тканей, таких как нейроны, кардиомиоциты, клетки почек, эндотелиоциты позволило обнаружить новые биологические эффекты ЭПО. Ранее нами показана протективная роль ЭПО при хронической почечной недостаточности в клинических и экспериментальных условиях в отношении аффективного статуса, психофизиологического статуса, функционального состояния системы гемостаза и др. [5-9]. Полагаем, что косвенная реализация плеiotропных эффектов ЭПО может быть связана с его влиянием на функцию фагоцитирующих клеток. В настоящее время система ЭПО-рецептор ЭПО на ауто- и паракринном уровне рассматривается как звено

неспецифической защиты при повреждении, а рецепторы ЭПО на неэритроидных клетках обозначаются как защищающие ткань рецепторы. **Цель работы** – исследовать влияние различных концентраций ЭПО на функциональную активность фагоцитов в экспериментальных условиях *in vitro*.

Материалы и методы исследования

Работа выполнена с использованием цельной крови 20 клинически здоровых людей-доноров. Рекомбинантный человеческий эритропоэтин в составе препарата «Эпокрин» (международное непатентованное название: эпоэтин альфа, ФГУП ГНИИ ОЧБ ФМБА России, г. Санкт-Петербург) применяли в концентрациях 1,88; 3,75; 7,5; 15; 30 МЕ/л, что соответствует от 12,5, 25, 50, 100, 200% от среднего физиологического уровня ЭПО в крови, показатели исследовали после 10 мин и 30 мин инкубации в термостате при 37 °С. Функцию фагоцитов исследовали по фагоцитарной способности и кислородзависимому внутриклеточному метаболизму. Фагоцитарную способность лейкоцитов оценивали по поглощению частиц монодисперсного (диаметр 1,7 мкм), полистирольного латекса, для чего 200 мкл суспензии клеток смешивали с 20 мкл взвеси частиц полистирольного латекса. После 30 мин инкубации при температуре 37 °С оценивали активность и интенсивность фагоцитоза, фагоцитарное число. Оценку внутриклеточного кислородзависимого метаболизма в фагоцитах проводили с помощью НСТ-теста, который основан на образовании нерастворимого диформаза из нитросинего тетразолия. Проводили спонтанный и индуцированный НСТ-тест. Для постановки спонтанного НСТ-теста к 100 мкл крови добавляли 50 мкл физиологического раствора и 20 мкл нитросинего тетразолия, в индуцированном НСТ-тесте к 100 мкл крови 50 мкл суспензии полистирольного латекса в физиологическом растворе и 20 мкл нитросинего тетразолия. Учитывали количество диформазан-положительных клеток (активность НСТ-теста), для вычисления индекса НСТ-теста оценивали площадь гранул по отношению к площади ядра (единичные пылевидные гранулы – 0; клетки с отложениями, не превышающие в сумме 1/3 площади ядра, - 1; клетки с отложением диформаза более 1/3 площади ядра – 2; превышающие размеры ядра – 3). Статистический анализ проведен с использованием пакета прикладных программ Statistica for Windows 8.0. Проверку статистических гипотез проводили с использованием рангового дисперсионного анализа по Фридмену, критерия Вилкоксона. Для оценки зависимости влияния ЭПО на функцию фагоцитов от дозы использован корреляционный анализ с вычислением коэффициента корреляции Спирмена. Отличия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты влияния ЭПО на показатели функциональной активности фагоцитов после 10 мин инкубации при 37 °С представлены в табл. 1 и 2. Как видно, нами не зафиксированы статистически значимые изменения поглотительной способности и кислородзависимого метаболизма фагоцитов периферической крови. Следует отметить, что на правах тенденции увеличивалась активность, интенсивность фагоцитоза, фагоцитарное число, показатели спонтанного и индуцированного НСТ-теста; наибольшие значения средних величин наблюдались при добавлении ЭПО в дозе 30 МЕ/л (200% от физиологического уровня в сыворотке). Установлено, что 30-минутная инкубация ЭПО с цельной кровью приводит к изменению функциональной активности фагоцитов периферической крови (табл. 3 и 4). ЭПО в диапазоне концентраций от 1,88 до 30,00 МЕ/л приводит к активации поглотительной способности фагоцитов: увеличивается активность, интенсивность фагоцитоза и фагоцитарное число. Максимальное увеличение количества активно фагоцитирующих клеток, на 49,9% от среднего значения в контрольной группе, отмечено при добавлении ЭПО в дозе 7,5 МЕ/л (50% от физиологического уровня ЭПО в сыворотке). Эффект ЭПО не зависит от дозы при оценке активности фагоцитоза (коэффициент корреляции Спирмена $R=0,21$; $p>0,05$), интенсивности фагоцитоза (коэффициент корреляции Спирмена $R=0,17$; $p>0,05$), фагоцитарного числа (коэффициент корреляции Спирмена $R=0,13$; $p>0,05$). Влияние ЭПО на кислородзависимый метаболизм в фагоцитах носит неоднозначный характер. Так, эффект ЭПО во всех используемых дозах на показатели спонтанного НСТ-теста отсутствовал (табл. 4). Отмечено, что ЭПО повышает генерацию метаболитов кислорода фагоцитами после индукции частицами латекса только в дозах 3,75 и 15,00 МЕ/л (25 и 100% от физиологического уровня ЭПО в сыворотке); возрастает как количество активных клеток, так и индекс НСТ-теста, отражающий интенсивность генерации кислородных метаболитов отдельной клеткой.

По данным других исследователей, на лейкоцитах обнаружены рецепторы к ЭПО, так, с использованием методов проточной цитометрии и обратной полимеразной цепной реакции были обнаружены экспрессия гена и мРНК рецептора ЭПО в Т- и В-лимфоцитах и моноцитах. Группа исследователей из центра трансплантологии в Бергамо (Италия) полагают, что одной из мишеней для иммуномодулирующего действия ЭПО являются дендритные клетки, экспрессирующие рецепторы к ЭПО, взаимодействие с которыми ЭПО приводит к экспрессии CD86, CD40, TLR-4. При этом данные о влиянии ЭПО на функциональную активность фагоцитов противоречивы. Так, Kristal B. et al. (2008) приводят данные о том, что ЭПО у больных хронической почечной недостаточностью при исходном увеличении вызывает снижение продукции супероксид-анион-радикала нейтрофилами *in vivo* и *ex vivo* и увеличивает стабильность (срок жизни) нейтрофилов *in vitro*. Spaan M. et al.

(2013) констатируют активацию поглотительной и снижение киллинговой способности фагоцитов у больных вирусным гепатитом С после культивирования в среде с добавлением ЭПО. Полагаем, что такие противоречивые данные связаны с регулирующим влиянием ЭПО на функциональную активность фагоцитов, эффект ЭПО определяется исходным уровнем функциональной активности клеток. Известно, что внутриклеточная трансдукция сигнала после связывания ЭПО с рецептором обеспечивается многочисленными Jak-2-зависимыми сигнальными путями: трансдукторы сигналов и активаторы транскрипции (STAT-5, STAT-3), фосфатидилинозитол-3-киназа (PI3K), протеинкиназа В (PKB), гликоген-синтаза киназа-3 β (GSK-3 β), митоген-активируемая протеинкиназа (МАРК) и др [10]. Возможно, такое многообразие сигнальных путей объясняет неоднозначный, модулирующий характер влияния ЭПО на функциональную активность клеточных эффекторов врожденного иммунитета.

Таким образом, результаты проведенного исследования позволили установить, что 10-минутный контакт ЭПО с цельной кровью не оказывает статистически значимого влияния на функцию фагоцитов. В экспериментальных условиях *in vitro* после 30-минутной инкубации ЭПО с цельной кровью зафиксирована активация поглотительной способности и кислородзависимого метаболизма фагоцитов периферической крови. Выявлено, что ЭПО в диапазоне доз от 1,88 до 30 МЕ/л увеличивает количество активно фагоцитирующих клеток и поглотительную способность отдельного фагоцита; в дозах 3,75 и 15 МЕ/л ЭПО повышает количество клеток, генерирующих активные метаболиты кислорода, и интенсивность генерации активных метаболитов кислорода отдельным фагоцитом в индуцированном НСТ-тесте. Эффект ЭПО на функциональную активность фагоцитов не зависит от дозы.

Таблица 1. Влияние ЭПО на показатели поглотительной способности фагоцитов периферической крови после 10 мин инкубации (M \pm m)

Условия эксперимента	Активность фагоцитоза, %	Интенсивность фагоцитоза, у.е.	Фагоцитарное число, у.е.
Контроль (+ физ. р-р) (n=10)	35,30 \pm 2,73	1,13 \pm 0,20	1,85 \pm 0,24
+ ЭПО 1,88 МЕ/л (n=10)	34,82 \pm 4,39	1,26 \pm 0,41	1,94 \pm 0,31
+ ЭПО 3,75 МЕ/л (n=10)	38,19 \pm 1,62	1,29 \pm 0,18	1,79 \pm 0,22
+ ЭПО 7,5 МЕ/л (n=10)	41,14 \pm 2,95	1,38 \pm 0,26	2,05 \pm 0,18
+ ЭПО 15 МЕ/л (n=10)	40,30 \pm 2,83	1,33 \pm 0,21	2,01 \pm 0,17
+ ЭПО 30 МЕ/л (n=10)	42,82 \pm 3,98	1,37 \pm 0,24	2,09 \pm 0,21

Таблица 2. Влияние ЭПО на показатели кислородзависимого метаболизма фагоцитов периферической крови после 10 мин инкубации (M \pm m)

Условия эксперимента	Спонтанный НСТ-тест		Индукцированный НСТ-тест	
	Активность, % клеток	Индекс, у.е.	Активность, % клеток	Индекс, у.е.
Контроль (+ физ. р-р) (n=10)	23,30±2,86	0,39±0,04	30,40±3,24	0,49±0,05
+ ЭПО 1,88 МЕ/л (n=10)	21,87±2,37	0,37±0,05	31,81±2,19	0,51±0,03
+ ЭПО 3,75 МЕ/л (n=10)	26,12±1,98	0,42±0,03	32,18±2,42	0,50±0,04
+ ЭПО 7,5 МЕ/л (n=10)	25,23±2,61	0,41±0,02	31,42±2,36	0,51±0,05
+ ЭПО 15 МЕ/л (n=10)	28,42±2,99	0,44±0,05	33,15±3,48	0,56±0,06
+ ЭПО 30 МЕ/л (n=10)	28,97±2,08	0,45±0,04	34,01±3,11	0,55±0,04

Таблица 3. Влияние ЭПО на показатели поглотительной способности фагоцитов периферической крови после 10 мин инкубации (M±m)

Условия эксперимента	Активность фагоцитоза, %	Интенсивность фагоцитоза, у.е.	Фагоцитарное число, у.е.
Контроль (+ физ. р-р) (n=10)	35,30±2,73	1,13±0,20	1,85±0,24
+ ЭПО 1,88 МЕ/л (n=10)	39,80±1,94 *	1,31±0,21 *	3,32±0,48 *
+ ЭПО 3,75 МЕ/л (n=10)	48,00±3,97 *	1,71±0,26 *	3,69±0,55 *
+ ЭПО 7,5 МЕ/л (n=10)	52,90±3,80 *	1,69±0,26 *	3,15±0,44 *
+ ЭПО 15 МЕ/л (n=10)	49,40±4,38 *	1,56±0,24 *	3,25±0,48 *
+ ЭПО 30 МЕ/л (n=10)	48,30±3,40 *	1,53±0,16 *	3,15±0,29 *

* - статистически значимые (p<0,05) различия с группой контроля.

Таблица 4. Влияние ЭПО на показатели кислородзависимого метаболизма фагоцитов периферической крови после 10 мин инкубации (M±m)

Условия эксперимента	Спонтанный НСТ-тест		Индукцированный НСТ-тест	
	Активность, % клеток	Индекс, у.е.	Активность, % клеток	Индекс, у.е.
Контроль (+ физ. р-р) (n=10)	23,30±2,86	0,39±0,04	30,40±3,24	0,49±0,05
+ ЭПО 1,88 МЕ/л (n=10)	31,70±4,87	0,50±0,08	32,70±5,34	0,56±0,10
+ ЭПО 3,75 МЕ/л (n=10)	27,00±2,13	0,45±0,04	36,60±3,71 *	0,60±0,08 *
+ ЭПО 7,5 МЕ/л (n=10)	29,80±4,12	0,52±0,05	34,50±3,56	0,51±0,03
+ ЭПО 15 МЕ/л (n=10)	31,20±4,26	0,51±0,06	41,70±4,55 *	0,60±0,07 *
+ ЭПО 30 МЕ/л (n=10)	30,80±3,45	0,49±0,06	37,40±2,17	0,58±0,04

* - статистически значимые (p<0,05) различия с группой контроля.

Список литературы

1. 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.
2. Осиков М.В. Влияние гемодиализа на процессы свободнорадикального окисления у больных хронической почечной недостаточностью / М.В. Осиков, В.Ю. Ахматов, Л.В. Кривохижина // Вестник Южно-Уральского государственного университета. Серия: Образование, здравоохранение, физическая культура. – 2007. – № 16 (71). – С. 95-97.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Осиков М.В. Эфферентные и антиоксидантные свойства эритропоэтина при хронической почечной недостаточности / М.В. Осиков, Т.А. Григорьев, Ю.И. Агеев // Эфферентная терапия. – 2011. – Т. 17, № 4. – С. 7-13.
7. Осиков М.В. Влияние эритропоэтина на функциональную активность тромбоцитов / М.В. Осиков, Т.А. Григорьев, А.А. Федосов, Д.А. Козочкин, М.А. Ильиных // Современные проблемы науки и образования. – 2012. – № 6. - URL: www.science-education.ru/106-7450 (дата обращения: 11.02.2014).
8. Осиков М.В. Современные представления о гемостазиологических эффектах эритропоэтина / М.В. Осиков, Т.А. Григорьев, А.А. Федосов // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 5-1. – С. 196-200.
9. Осиков М.В. Эритропоэтин как регулятор экспрессии тромбоцитарных гликопротеинов / М.В. Осиков, Т.А. Григорьев, А.А. Федосов, Д.А. Козочкин, М.А. Ильиных // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 1. - URL: www.science-education.ru/107-7731 (дата обращения: 11.02.2014).
10. Broxmeyer H.E. Erythropoietin: multiple targets, actions, and modifying influences for biological and clinical consideration // J. Exp. Med. – 2013. – Vol. 210 (2). – P. 205-208.

Рецензенты:

Куренков Е.Л., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой анатомии человека 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.