

ВЛИЯНИЕ ЭРИТРОПОЭТИНА НА ПОКАЗАТЕЛИ ИММУННОГО СТАТУСА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ХРОНИЧЕСКОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

Агеев Ю.И., Осиков М.В., Телешева Л.Ф., Федосов А.А.

ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет», Минздрава России (454092, Челябинск, ул. Воровского, 64), e-mail: prof.osikov@yandex.ru

Открытие в начале XXI века рецепторов для ЭПО на клетках незритроидных тканей позволило целенаправленно исследовать его негемопоэтические функции. В 2010 г. рецепторы для ЭПО обнаружены на Т- и В-лимфоцитах, моноцитах, что позволяет предположить иммуностропные эффекты этого гликопротеина. Проверку гипотезы удобно провести при экспериментальной хронической почечной недостаточности (ХПН), когда продукция эндогенного ЭПО критически снижается. Цель работы – исследовать влияние ЭПО на показатели врожденного и адаптивного иммунитета при экспериментальной ХПН. Работа выполнена на 115 белых нелинейных крысах, группа I – контрольная, ложнооперированные животные; группа II – животные с ХПН; группа III – животные, которым на фоне ХПН вводили ЭПО. ХПН моделировали путем двухэтапной оперативной резекции 5/6 почечной ткани. ЭПО в составе препарата «Эпокрин» (эпоэтин альфа, Санкт-Петербург) применяли в дозе 100 МЕ/кг массы тела 9 дней. Исследования проводили на 30 сутки. Иммуный статус оценивали по количеству лейкоцитов в крови и лейкоцитарной формуле, поглотительной способности лейкоцитов с использованием частиц монодисперсного полистерольного латекса, кислород-зависимому метаболизму фагоцитов в спонтанном и индуцированном НСТ-тесте, Т-хелпер-1 и Т-хелпер-2-зависимого иммунный ответ оценивали по количеству антителообразующих клеток в селезенке крыс, иммунизированных аллогенными эритроцитами. Установлено, что при экспериментальной ХПН в периферической крови увеличивается абсолютное количество фагоцитирующих клеток (сегментоядерных нейтрофилов и моноцитов), снижается количество лимфоцитов. Активация врожденного иммунитета при экспериментальной ХПН проявляется увеличением поглотительной способности и кислород-зависимого метаболизма фагоцитирующих клеток. При оценке адаптивного иммунитета зафиксировано угнетение клеточного (Т-хелпер-1-зависимого) и гуморального (Т-хелпер-2-зависимого) иммунного ответа. Применение ЭПО в суммарной дозе 900 МЕ/кг при экспериментальной ХПН приводит к восстановлению количественного состава лейкоцитов в периферической крови, поглотительной активности и кислород-зависимого метаболизма фагоцитов в крови, показателей Т-хелпер-1 и Т-хелпер-2-зависимого иммунного ответа.

Ключевые слова: эритропоэтин, иммунитет, хроническая почечная недостаточность.

ERYTHROPOIETIN INFLUENCE ON IMMUNOLOGICAL STATUS INDICIES IN EXPERIMENTAL CHRONIC RENAL FAILURE

Ageev J.I., Osikov M.V., Telesheva L.F., Fedosov A.A.

South Ural State Medical University of Health Ministry of Russia, Chelyabinsk, Russia (454092, Chelyabinsk, Vorovskogo str., 64), e-mail: prof.osikov@yandex.ru

Discovery of EPO receptors on nonerythroid tissues cells at the beginning of XXI century enabled to investigate EPO non-hematopoietic functions. In 2010 EPO receptors were revealed on T and B-lymphocytes, monocytes, suggesting glycoprotein immunotropic effects. Hypothesis testing is convenient to perform in experimental chronic renal failure (CRF), when endogenous EPO production is significantly reduced. Aim of investigation: EPO influence on innate and adaptive immunity in experimental CRF. Of 115 white nonlinear rats: group I comprised controls, sham-operated animals; group II animals with CRF; group III animals with CRF with EPO administration. CRF was modeled by two-stage operative resection of 5/6 renal tissue. EPO in preparation "Epokrin" (epoetinalfa, St. Petersburg) was used at 100 IU/kg dose during 9 days. Investigation was performed on day 30. Immune status was evaluated by leukocytes amount, leucocyte formula, leukocytes absorbability using monodisperse polystyrene latex particles, phagocytes oxygen-dependent metabolism in spontaneous and induced nitrobluetetrazolium test. T-helper-1 or T-helper-2-dependent immune response was evaluated by antibody producing cells number in the rats' spleen, which were immunized with allogeneic erythrocytes. In experimental CRF absolute amount of phagocytic cells (segmented neutrophils, monocytes) increases in peripheral blood, lymphocytes amount reduces. Innate immunity activation is manifested by increased absorbency and oxygen-dependent metabolism of phagocytic cells. In assessing adaptive immunity, inhibition of cellular (T-helper-1-dependent) and humoral (T-helper-2-dependent) immune responses was noted. EPO in a total dose of 900 IU/kg results in CRF experimental quantitative restoration of leukocytes, phagocytic activity

Поиск и экспериментальное обоснование применения эндогенных регуляторов гомеостаза является актуальной проблемой современной медицинской науки. Ранее нами успешно продемонстрированы регуляторные свойства реактантов острой фазы альфа-1-кислого гликопротеина и церулоплазмينا при экспериментальной патологии различного генеза [3]. Плейотропные эффекты эритропоэтина (ЭПО) в последнее десятилетие являются объектом внимания многих научных групп: обнаружены рецепторы ЭПО на многих клетках организма, успешно продемонстрированы эффекты ЭПО в экспериментальных и клинических условиях при патологии нервной системы, органа зрения, хронической почечной недостаточности (ХПН), кардиоваскулярной патологии и др. [2, 4-8]. Идентификация рецепторов для ЭПО на лимфоцитах и других иммунокомпетентных клетках позволяет предположить иммуностропные эффекты этого гликопротеина [9]. Результаты исследований за последние 20 лет позволили рассматривать систему эритропоэтин-рецептор эритропоэтина на ауто- и паракринном уровне как звено неспецифической защиты при повреждении, а рецепторы эритропоэтина на незритроидных клетках обозначаются как защищающие ткань рецепторы. ХПН является удобной моделью для исследования плейотропных эффектов ЭПО, принимая во внимание факт критического снижения эндогенной продукции ЭПО пери- и тубулярными клетками почек. Цель работы – исследовать влияние ЭПО на показатели врожденного и адаптивного иммунитета при экспериментальной ХПН.

Материалы и методы исследования. Работа выполнена на 115 белых нелинейных крысах массой 180–220 г., находящихся в стандартных условиях вивария на типовом рационе в соответствии с нормами, утвержденными Приказом Минздрава СССР № 1179 от 10.10.1983 г. Все манипуляции с животными выполнялись в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приказ МЗ СССР № 775 от 12.08.1977 г.) и положениями Хельсинской Декларации ВОЗ (1997). Группа I – контрольная, ложнооперированные животные; группа II – животные с ХПН; группа III – животные, которым на фоне ХПН вводили ЭПО. Модель ХПН у крыс создавали путем двухэтапной оперативной резекции 5/6 почечной ткани [10]. Терминальная стадия ХПН развивалась через 21 сутки, критериями служили повышение в сыворотке концентрации креатинина (> 60 мкмоль/л), мочевины (> 5 ммоль/л). Животным III группы, начиная с 21 суток эксперимента, внутривенно, ежедневно вводили рекомбинантный человеческий ЭПО в составе препарата «Эпокрин» (эпоэтин альфа, ГНИИ Особо чистых биопрепаратов,

Санкт-Петербург) применяли в дозе 100 МЕ/кг массы тела в течение 9 дней. Животным I и II группы вводили эквивалентное количество стерильного физиологического раствора. Исследования проводили на 30 сутки. Количество лейкоцитов в периферической крови и лейкоцитарную формулу определяли общепринятыми методами. Исследование поглотительной способности лейкоцитов периферической крови проводили с использованием частиц монодисперсного (диаметр 1,7 мкм) полистерольного латекса, учитывали активность фагоцитоза (ФА) – % клеток, захвативших хотя бы одну частицу латекса, интенсивность фагоцитоза (ФИ) – число поглощенных микросфер латекса в 100 подсчитанных клетках и фагоцитарное число (ФЧ) – число поглощенных микросфер латекса на один фагоцит. Исследование кислород-зависимого метаболизма фагоцитов периферической крови проводили, учитывая интенсивность восстановления нитросинего тетразолия (НСТ) в его нерастворимую форму – диформазан, по методу А.Н. Маянского. Проводили спонтанный и индуцированный НСТ-тест с учетом активности (% клеток) и интенсивности (у.е.). Т-хелпер-2 (Th-2) – зависимый иммунный ответ оценивали по количеству антителообразующих клеток в селезенке крыс, иммунизированных аллогенными эритроцитами, по методу А. J. Cunningham[1]. Th1-зависимый иммунный ответ исследовали по реакции гиперчувствительности замедленного типа у крыс, иммунизированных аллогенными эритроцитами, интенсивность реакции оценивали по выраженности воспалительного отека стопы, в которую вводили аллогенные эритроциты, использовавшиеся для предварительной иммунизации. Статистический анализ проведен с использованием пакета прикладных программ StatisticaforWindowsv.10.0. Проверку статистических гипотез проводили с использованием критериев Краскела – Уоллиса, Манна – Уитни, Вальда – Вольфовитца.

Результаты исследования и их обсуждение. Особенности исследования иммунного статуса при экспериментальной ХПН при сравнении с клинической группой больных ХПН является типовое у всех животных развитие синдрома ХПН после резекции 5/6 почечной ткани, независимое от первичного заболевания (артериальная гипертензия, сахарный диабет, гломерулопатии и др.), отсутствие влияния сопутствующей патологии, системного эффекта гемодиализной процедуры, антикоагулянтов и других групп лекарственных препаратов. Это позволяет оценить иммунный статус в условиях терминальной стадии ХПН с исключением влияния сторонних факторов, способных модифицировать иммунный ответ за счет изменения количественного состава и функциональной активности иммунокомпетентных клеток.

При экспериментальной ХПН в периферической крови изменяется относительное количество популяций лейкоцитов: повышается количество нейтрофилов за счет

сегментоядерных форм и снижается количество лимфоцитов без выхода за границы референсных значений. Пересчет показателей в абсолютные величины показал статистически значимое увеличение количества сегментоядерных нейтрофилов (в среднем на 62,1 % по сравнению с группой контроля), моноцитов (в среднем на 29,0 % по сравнению с группой контроля) и снижение количества лимфоцитов (в среднем на 38,2 % по сравнению с группой контроля). Общее количество лейкоцитов в крови достоверно не изменялось за счет того, что количество одних клеток увеличивалось, а других – уменьшалось (табл. 1). При исследовании врожденного иммунитета зафиксировано увеличение активности, интенсивности фагоцитоза и фагоцитарного числа (табл. 2). Повышение активности фагоцитоза может быть связано с увеличением в периферической крови количества фагоцитирующих клеток – сегментоядерных нейтрофилов и моноцитов. Отмечено повышение активности и индекса спонтанного НСТ-теста без изменения показателей индуцированного НСТ-теста. Оценка адаптивного иммунитета установила снижение интенсивности реакции ГЗТ, косвенно свидетельствующая об угнетении Th1-зависимого иммунного ответа, и уменьшение количества АОК в селезенке, демонстрирующее подавление Th2-зависимого иммунного ответа (табл. 3).

Полагают, что одним из механизмов лимфоцитопении при ХПН выступает повышение концентрации в плазме крови индоламина-2,3-диоксигеназы и аргиназы I типа, участвующих в катаболизме соответственно триптофана и аргинина. Установлены проапоптотическое и антипролиферативное действие индоламина-2,3-диоксигеназы и аргиназы I типа на Т-клетки, их концентрация в крови обратно пропорциональна абсолютному количеству лимфоцитов. Патогенез активации функциональной активности фагоцитов при ХПН является многофакторным: имеют значение азотемия, нарушение обмена витамина D, гиперпаратиреоз и сопутствующее нарушение фосфорно-кальциевого обмена, нарушение обмена железа, анемия, активация РААС, гемодиализная процедура и др. факторы.

Применение ЭПО при экспериментальной ХПН приводит к уменьшению количества нейтрофилов в периферической крови за счет палочкоядерных и сегментоядерных форм (табл. 1). Количество лимфоцитов в крови повышалось на правах тенденции относительной группы животных с ХПН и достоверно не отличалось от группы ложнооперированных животных. При исследовании функциональной активности фагоцитирующих клеток установлено снижение интенсивности фагоцитоза и фагоцитарного числа, однако показатели поглотительной способности фагоцитов не достигали значений в группе ложнооперированных животных. В условиях применения ЭПО снижалась активность и интенсивность спонтанного НСТ-теста, показатели не отличались от значений в группе

ложнооперированных животных. ЭПО нормализует показатели адаптивного иммунитета при ХПН: интенсивность реакции ГЗТ и количество АОК в селезенке повышались и достигали значений в группе ложнооперированных животных. Таким образом, ЭПО при экспериментальной ХПН выступает в роли регулятора количественного состава лейкоцитов в крови, функциональной активности фагоцитов и показателей клеточного и гуморального звеньев адаптивного иммунитета.

Механизм иммуотропных эффектов ЭПО может быть связан с его дезинтоксикационным и антиоксидантным действием, ранее нами продемонстрировано, что применение ЭПО при экспериментальной ХПН приводит к снижению концентрации креатинина и продуктов процессов перекисного окисления липидов в сыворотке [6]. Кроме того, ЭПО как антиапоптогенный фактор может ограничивать гибель лимфоцитов в кровотоке.

Таблица 1

Влияние ЭПО на количество лейкоцитов в крови при ХПН (M±m)

Показатели	Группа 1 Л/оперир. (n=22)	Группа 2 ХПН (n=24)	Группа 3 ХПН +ЭПО(n=29)
Лейкоциты, • 10 ⁹ /л	8,59±0,78	9,13±0,74	8,46±0,45
Эозинофилы, • 10 ⁹ /л	0,21±0,04	0,19±0,03	0,28±0,05
Нейтрофилы/ядерные, • 10 ⁹ /л	0,29±0,06	0,34±0,05	0,19±0,03* **
Нейтрофилы с/ядерные, • 10 ⁹ /л	3,19±0,35	5,17±0,46*	3,82±0,28**
Нейтрофилы всего, • 10 ⁹ /л	3,49±0,39	5,51±0,49*	4,00±0,30**
Лимфоциты, • 10 ⁹ /л	4,27±0,41	2,64±0,20*	3,27±0,21
Моноциты, • 10 ⁹ /л	0,62±0,12	0,80±0,13	0,89±0,09*

Примечание. Здесь и далее * – статистически значимые (p<0,05) различия с группой 1, ** – с группой 2.

Таблица 2

Влияние ЭПО на показатели врожденного иммунитета при ХПН (M±m)

Показатели	Группа 1 Л/оперир. (n=19)	Группа 2 ХПН (n=15)	Группа 3 ХПН +ЭПО (n=29)
Активность фагоцитоза, %	32,37±2,01	45,20±3,05*	41,21±2,16*
Интенсивность фагоцитоза, у.е.	0,65±0,05	1,25±0,20*	0,93±0,09* **
Фагоцитарное число, у.е.	2,21±0,09	3,60±0,29*	2,34±0,17* **
НСТ-тест спонт., активность, %	8,67±1,69	18,00±2,29*	12,10±1,47**
НСТ-тест спонт., индекс, у.е.	0,14±0,03	0,29±0,05*	0,16±0,03**

НСТ-тест инд., активность, %	15,05±2,79	20,36±1,83	15,26±1,08
НСТ-тест инд., индекс, у.е.	0,19±0,04	0,28±0,03*	0,18±0,02

Таблица 3

Влияние ЭПО на показатели адаптивного иммунитета при ХПН (M±m)

Показатели	Группа 1 Л/оперирир. (n=15)	Группа 2 ХПН (n=11)	Группа 3 ХПН +ЭПО(n=14)
ГЗТ, мл	0,48±0,07	0,26±0,04*	0,40±0,04**
АОК, 10 ⁴	597,06±140,28	257,17±59,54*	955,76±167,67**
АОК, ед. / 10 ⁶ ЯСК	536,07±177,32	154,16±65,65*	967,97±317,80**

Выводы

1. При экспериментальной ХПН в периферической крови увеличивается абсолютное количество фагоцитирующих клеток (сегментоядерных нейтрофилов и моноцитов), снижается количество лимфоцитов.
2. Активация врожденного иммунитета при экспериментальной ХПН проявляется увеличением поглотительной способности и кислород-зависимого метаболизма фагоцитирующих клеток. При оценке адаптивного иммунитета зафиксировано угнетение клеточного (Т-хелпер-1-зависимого) и гуморального (Т-хелпер-2-зависимого) иммунного ответа.
3. Применение ЭПО в суммарной дозе 900 МЕ/кг при экспериментальной ХПН приводит к восстановлению количественного состава лейкоцитов в периферической крови, поглотительной активности и кислород-зависимого метаболизма фагоцитов в крови, показателей Т-хелпер-1 и Т-хелпер-2- зависимого иммунного ответа.

Список литературы

1. Волчегорский, И.А. Экспериментальное моделирование и лабораторная оценка адаптивных реакций организма / И.А. Волчегорский, И.И. Долгушин, О.Л. Колесников и др. – Челябинск : Изд-во ЧелГПУ, 2000. – 167 с.
2. Захаров, Ю.М. Неэритропоэтические эффекты эритропоэтина / Ю.М. Захаров // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 2007. – Т. 93, № 6. – С. 592-608.
3. Осиков, М.В. Влияние альфа-1-кислого гликопротеина на процессы свободнорадикального окисления при экспериментальной печеночной недостаточности /

М.В. Осиков // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2007. – Т. 144, № 7. – С. 29-31.

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. 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, Козочкин Д.А., Ильиных М.А. // Современные проблемы науки и образования. – 2012. – № 6. – С. 195-195.

8. 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.

9. Lisowska, K.A. Erythropoietin receptor is expressed on human peripheral blood T and B lymphocytes and monocytes and is modulated by recombinant human erythropoietin treatment / K.A. Lisowska, A. Debska-Slizień, E. Bryl et al. // Artif. Organs. – 2010. – Vol. 34(8). – P. 654-62.

10. Santos, L.S. Surgical reduction of the renal mass in rats: morphologic and functional analysis on the remnant kidney / L.S. Santos, E.W. Chin, et al. // Acta Cir Bras. – 2006. – Vol. 21, № 4. – P. 252-257.

Рецензенты:

Куренков Е.Л., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой анатомии человека ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Челябинск.

Абрамовских О.С., д.м.н., профессор кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии, клинической лабораторной диагностики ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Челябинск.