

ИММУННЫЙ СТАТУС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ГИПЕРПАРАТИРЕОЗЕ И ЕГО КОРРЕКЦИЯ БЛОКАТОРАМИ КАЛЬЦИЕВЫХ КАНАЛОВ

¹Осиков М.В., ¹Черепанов Д.А., ¹Федосов А.А.

¹ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России (454092, Челябинск, ул. Воровского, 64, e-mail: prof.osikov@yandex.ru)

Предыдущие исследования позволили продемонстрировать в клинических и экспериментальных условиях изменение иммунного статуса в терминальную стадию хронической почечной недостаточности (ХПН) – активацию эффекторов врожденного иммунитета и депрессию адаптивного иммунитета. Одним из факторов патогенеза иммунной дисфункции при ХПН может выступать паратиреоидный гормон (ПТГ), в избытке продуцируемый в условиях вторичного гиперпаратиреоза (ГПТ). В этой связи на роль корригирующих факторов иммунного статуса претендуют блокаторы кальциевых каналов. Цель работы – исследовать иммунный статус при экспериментальном ГПТ и влияние на него блокатора кальциевых каналов амлодипина. Проверка гипотезы выполнена на 90 белых нелинейных крысах-самцах, разделенных на 3 группы: 1 — интактные, 2 — ГПТ, 3 — ГПТ и введение амлодипина. ГПТ у крыс 2-й группы моделировали путем содержания животных на синтетической гиперфосфатной смеси (0,6% кальция и 4,2% фосфора) в течение 120 дней, верифицировали повышением концентрации ПТГ в сыворотке. Животным 3-й группы с 120-х суток эксперимента ежедневно вводили препарат «Амлодипин-Тева» (международное непатентованное название: амлодипин, Израиль) в дозе 0,25 мг/кг в сутки в течение 7 дней. В периферической крови определяли количественный состав лейкоцитов, функциональную активность нейтрофилов по поглотительной способности и генерации активных форм кислорода в спонтанном и индуцированном НСТ-тесте. Th1- и Th2-зависимый ответ оценивали соответственно в реакции гиперчувствительности замедленного типа и по количеству антителообразующих клеток в селезенке после иммунизации. Установлено, что при гиперпаратиреозе развиваются лимфоцитопения, активация генерации активных форм кислорода нейтрофилами и угнетение Th1-зависимого и Th2-зависимого иммунного ответа. Угнетение Th1-зависимого и Th2-зависимого иммунного ответа прогрессирует по мере снижения количества лимфоцитов в крови. Применение амлодипина в суммарной дозе 1,75 мг/кг при гиперпаратиреозе приводит к восстановлению количества лимфоцитов в крови и показателей Th1-зависимого и Th2-зависимого иммунного ответа, активации поглотительной способности и снижению функционального резерва генерации активных форм кислорода нейтрофилами.

Ключевые слова: иммунитет, иммунный статус, гиперпаратиреоз, блокаторы кальциевых каналов, амлодипин

IMMUNE STATUS IN EXPERIMENTAL HYPERPARATHYROIDISM AND ITS CORRECTION BY CALCIUM CHANNEL BLOCKERS

Osikov M.V.¹, Cherepanov D.A.¹, Fedosov A.A.¹

¹South Ural State Medical University of Health Ministry of Russia, Chelyabinsk, Russia (454092, Chelyabinsk, Vorovskogo str., 64), e-mail: prof.osikov@yandex.ru

Previous studies have demonstrated the immune status change to end-stage renal disease (ESRD) - activation of effectors of innate immunity and adaptive immunity depression in clinical and experimental conditions. A parathyroid hormone (PTH) produced in excess in case of secondary hyperparathyroidism (HPT) is one of the factors in the pathogenesis of immune dysfunction in chronic renal failure. In this regard, calcium channel blockers tend to be corrective factors of the immune status. The aim of study: to investigate the immune status in experimental HPT and influence of amlodipine, calcium channel blocker, on it. Hypothesis was tested on 90 white nonlinear male rats divided into 3 groups: 1 - intact rats; 2 - with HPT; 3 - HPT and on amlodipine introduction. HPT was modeled by keeping the 2nd group on hyperphosphate synthetic mixture (0.6% calcium and 4.2% phosphorus) for 120 days and verified by serum PTH concentration increase. In 120 days of the experiment "Amlodipine-Teva" (international nonproprietary name: amlodipine, Israel) in a dose of 0.25 mg/kg per day was injected to the 3rd group for 7 days. Leukocyte number, neutrophil functional activity by absorbance and reactive oxygen species generation in spontaneous and induced NBT-test were measured in peripheral blood. Th1- and Th2-dependent response was evaluated in a delayed type hypersensitivity reaction and by the antibody producing cells number in rats' spleen after immunization. In hyperparathyroidism lymphocytopenia, activation of reactive oxygen species by neutrophils and inhibition of Th1- and Th2-dependent immune response was found to develop. Inhibition of Th1- and Th2-dependent immune response progresses with the reduction of lymphocytes number in blood. In hyperparathyroidism Amlodipine (total dose of 1.75 mg/kg)

results in restoration of blood lymphocyte count and of Th1-and Th2-dependent immune response indices, phagocyte absorbency activation and reduced functional reserve of active oxygen generation by neutrophils.

Keywords: immunity, immune status, hyperparathyroidism, calcium channel blockers, amlodipine

Ранее нами продемонстрировано изменение иммунного статуса при хронической почечной недостаточности (ХПН) в клинических и в экспериментальных условиях, выражающееся в активации эффекторов врожденного иммунитета и подавлении адаптивного иммунитета [2, 5]. Регуляторы гомеостаза эндогенного происхождения (гормоны, реактанты острой фазы и др.) могут выступать в роли факторов патогенеза и рассматриваться как перспективные агенты коррекции нарушений гомеостаза [1, 3, 4, 6]. При ХПН одним из факторов патогенеза изменений иммунного статуса может выступать паратиреоидный гормон (ПТГ), в избытке циркулирующий в крови в условиях вторичного гиперпаратиреоза (ГПТ). ГПТ и сопутствующие ему изменения фосфорно-кальциевого гомеостаза приводят к накоплению ионизированного кальция в цитоплазме иммунокомпетентных клеток, поэтому обоснованным способом коррекции их функционального статуса и количественного представительства может быть применение блокаторов кальциевых каналов. **Цель работы** – исследовать иммунный статус при экспериментальном гиперпаратиреозе и влияние на него блокатора кальциевых каналов амлодипина.

Материалы и методы исследования. Работа выполнена на 90 белых нелинейных половозрелых крысах-самцах массой 200–220 г, находящихся в стандартных условиях вивария, случайным образом разделенных на 3 группы: I – интактная, II – ГПТ, III – ГПТ и введение блокатора кальциевых каналов амлодипина. Все манипуляции с экспериментальными животными выполнялись при строгом соблюдении требований Европейской конвенции (Страсбург, 1986) по содержанию, кормлению и уходу за подопытными животными, а также выводу их из эксперимента с последующей утилизацией. В постановке опытов руководствовались требованиями Всемирного общества защиты животных (WSPA) и Европейской конвенции по защите экспериментальных животных 86/609. ГПТ у крыс II группы моделировали содержанием на гиперфосфатной диете по методу Draper H.H. et al. [7] в нашей модификации. В течение 120 дней рацион крыс состоял из синтетической гиперфосфатной смеси (0,6% кальция и 4,2% фосфора). Развитие ГПТ верифицировали по увеличению концентрации ПТГ в плазме. Животным III группы начиная с 120-х суток эксперимента ежедневно вводили блокатор кальциевых каналов в составе препарата «Амлодипин-Тева» (международное непатентованное название: амлодипин, Израиль) в дозе 0,25 мг/кг в сутки в течение 7 дней, суммарная доза 1,75 мг/кг. Кровь для исследований забирали пункцией левого желудочка сердца. Количество лейкоцитов в крови определяли общепринятым меланжерным методом в камере Горяева. Лейкоцитарную

формулу подсчитывали в мазках крови, окрашенных по Романовскому—Гимзе, количество клеток выражали в относительных (%) и абсолютных ($\cdot 10^9/\text{л}$) величинах. Исследование поглотительной способности нейтрофилов периферической крови проводили на модели поглощения частиц монодисперсного (диаметр 1,7 мкм) полистирольного латекса. С помощью иммерсионной микроскопии учитывали активность фагоцитоза – (%) клеток, захвативших хотя бы одну частицу латекса, интенсивность фагоцитоза – (у.е.) число поглощенных микросфер латекса в 100 подсчитанных клетках и фагоцитарное число – (у.е.) число поглощенных микросфер латекса на один нейтрофил. Генерацию активных форм кислорода нейтрофилами оценивали в тесте восстановления нитросинего тетразолия (НСТ) в его нерастворимую форму диформаза (НСТ-тесте). Проводили спонтанный и индуцированный НСТ-тест, с помощью иммерсионной микроскопии определяли активность — процент клеток, восстанавливающих НСТ, и интенсивность НСТ-теста, дифференцируя клетки в зависимости от заполнения площади цитоплазмы. Функциональный резерв нейтрофилов определяли как отношение показателей индуцированного НСТ-теста к спонтанному. Оценку гуморального иммунного ответа проводили по количеству антителообразующих клеток (АОК) в селезенке крыс, иммунизированных аллогенными эритроцитами, в абсолютных величинах и в пересчете на ядросодержащие клетки (ЯСК). Реакцию гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) у крыс, иммунизированных аллогенными эритроцитами, оценивали по выраженности воспалительного отека стопы. Статистический анализ проведен с использованием пакета прикладных программ Statistica for Windows v.10.0. Проверку статистических гипотез проводили с использованием критериев Краскела—Уоллиса, Манна—Уитни, Вальда—Вольфовитца, наличие связи между показателями исследовали с помощью коэффициента корреляции Спирмена.

Результаты исследования и их обсуждение. Установлено, что при экспериментальном ГПТ в периферической крови изменяется количественный состав лейкоцитов, в относительных величинах увеличивается количество нейтрофилов за счет палочкоядерных и сегментоядерных форм, увеличивается количество моноцитов, снижается количество лимфоцитов (табл. 1). Пересчет показателей на абсолютные величины выявил моноцитопению и лимфоцитопению, количество лимфоцитов снижается в среднем на 53% по сравнению с группой контроля (табл. 2). При оценке функциональной активности нейтрофилов – ключевых эффекторов врожденного иммунитета — отмечено увеличение интенсивности спонтанного и индуцированного НСТ-теста соответственно на 50% и 26% от средних величин в контрольной группе. Показатели поглотительной способности фагоцитов – активность, интенсивность фагоцитоза и фагоцитарное число — значимо не изменяются. Исследование адаптивного иммунитета при ГПТ выявило угнетение Th1-зависимого

иммунного ответа, оцениваемого по интенсивности реакции ГЗТ, а также Th2-зависимого иммунного ответа при подсчете АОК в селезенке в абсолютных величинах и в пересчете на ЯСК. Полагаем, что депрессия показателей адаптивного иммунитета в определенной мере обусловлена лимфоцитопенией. При проведении корреляционного анализа нами установлена прямая средней силы статистически значимая связь между количеством лимфоцитов в периферической крови и абсолютным количеством АОК в селезенке (коэффициент корреляции Спирмена $R= 0,69$; $p<0,05$) и интенсивностью реакции ГЗТ (коэффициент корреляции Спирмена $R= 0,73$; $p<0,05$).

Таблица 1

Влияние амлодипина на количественный состав лейкоцитов в периферической крови при экспериментальном гиперпаратиреозе в относительных величинах ($M\pm m$)

Показатели	Группа 1 Контроль (n=18)	Группа 2 ГПТ(n=6)	Группа 3 ГПТ+АН(n=6)
Эозинофилы, %	1,94±0,61	1,00±0,26	1,00±0,26
Базофилы, %	0	0,17±0,17	0,17±0,17
Нейтрофилы п/ядерные, %	2,78±0,53	7,67±0,56 *	3,83±0,48 **
Нейтрофилы с/ядерные, %	31,00±1,42	47,67±3,22 *	34,17±3,84
Нейтрофилы всего, %	33,77±1,23	55,33±3,16 *	38,00±3,80 **
Лимфоциты, %	57,61±1,19	37,50±3,25 *	50,83±3,90 **
Моноциты, %	6,67±0,86	6,00±0,52	10,00±0,37 **

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

Таблица 2

Влияние амлодипина на количественный состав лейкоцитов в периферической крови при экспериментальном гиперпаратиреозе в абсолютных величинах ($M\pm m$)

Показатели	Группа 1 Контроль (n=18)	Группа 2 ГПТ(n=6)	Группа 3 ГПТ+АН(n=6)
Лейкоциты, $\bullet 10^9/\text{л}$	8,34±0,98	6,18±0,81	7,68±0,85
Эозинофилы, $\bullet 10^9/\text{л}$	0,11±0,14	0,06±0,02	0,09±0,03
Базофилы	0	0,01±0,01	0,02±0,02
Нейтрофилы п/ядерные, $\bullet 10^9/\text{л}$	0,26±0,06	0,46±0,05	0,30±0,06
Нейтрофилы с/ядерные, $\bullet 10^9/\text{л}$	2,54±0,31	3,03±0,56	2,59±0,34
Нейтрофилы всего, $\bullet 10^9/\text{л}$	2,79±0,34	3,49±0,61	2,89±0,37
Лимфоциты, $\bullet 10^9/\text{л}$	4,77±0,54	2,23±0,20 *	3,91±0,59 **
Моноциты, $\bullet 10^9/\text{л}$	0,66±0,14	0,38±0,08	0,76±0,08 **

Эффект ПТГ на иммунокомпетентные клетки и формирование иммунного статуса при гиперпаратиреозе могут быть связаны с прямым и опосредованным действием. Установлено, что 2-й тип рецептора к ПТГ (PTH2R) экспрессируется на гранулоцитах и в меньшей степени – на моноцитах и лимфоцитах [9]. В литературе отсутствует единое мнение о векторе изменений определенных функций фагоцитов при ХПН в связи с повышением концентрации ПТГ при вторичном гиперпаратиреозе: исследователи констатируют повышение, снижение или отсутствие изменений адгезии, хемотаксиса, поглотительной и киллинговой

способностей. Активация фагоцитов в периферической крови при гиперпаратиреозе может быть связана с повышением внутриклеточной концентрации Ca^{2+} и сопутствующими изменениями активности внутриклеточных мессенджеров (аденилатциклазы, активация кальцийзависимых мессенджеров – транскрипционных факторов Spi1/PU.1, AP-1/FOS и последующая активация семейства генов кальгранулинов S100–S100A8 и S100A9, генов CCL2 /MCP-1, CD14, FOLR2), интенсивности углеводного обмена, захвата и утилизации кислорода и иными факторами [8]. Большинство исследователей констатируют связь вторичного ГПТ при ХПН с дисфункцией Т- и В-звена иммунитета, прежде всего из-за повышения базального уровня цитозольного кальция [10]. Показательно, что паратиреоидэктомия часто приводит к восстановлению иммунного статуса и нивелированию клинических эквивалентов иммунодефицита.

Применение амлодипина при экспериментальном ГПТ приводит к изменению количественного представительства лейкоцитов в периферической крови. Так, в относительных величинах полностью восстанавливается количество нейтрофилов, лимфоцитов, увеличивается количество моноцитов (табл. 1). При пересчете показателей на абсолютные величины обнаружено восстановление количества лимфоцитов и моноцитов в крови (табл. 2). В условиях применения амлодипина изменяется функциональная активность нейтрофилов в крови (табл. 3). Увеличиваются интенсивность фагоцитоза (в среднем на 48% от значений в контрольной группе) и фагоцитарное число (в среднем на 18%). Амлодипин изменяет показатели генерации активных форм кислорода нейтрофилами – повышается активность спонтанного НСТ-теста, снижается функциональный резерв нейтрофилов, оцениваемый по активности НСТ-теста. Применение амлодипина приводит к увеличению показателей адаптивного иммунитета – восстанавливаются интенсивность реакции ГЗТ и количество АОК в селезенке в пересчете на ЯСК (табл. 4).

Таблица 3

Влияние амлодипина на показатели врожденного иммунитета при экспериментальном гиперпаратиреозе ($M \pm m$)

Показатели	Группа 1 Контроль (n=18)	Группа 2 ГПТ(n=6)	Группа 3 ГПТ+АН(n=6)
Активность фагоцитоза, %	33,22±2,76	29,00±2,89	32,67±2,49
Интенсивность фагоцитоза, у.е.	0,69±0,07	0,83±0,09	1,23±0,05 * **
Фагоцитарное число, у.е.	2,05±0,09	3,16±0,62	3,84±0,29 *
НСТ-тест спонт., активность, %	9,94±0,99	10,00±0,63	16,67±0,71 * **
НСТ-тест спонт., индекс	0,16±0,02	0,24±0,01 *	0,27±0,02 *
НСТ-тест инд., активность, %	19,28±1,98	19,33±0,61	20,33±0,76
НСТ-тест инд., индекс	0,27±0,02	0,34±0,01 *	0,36±0,03 *
Функц. резерв (акт-ть НСТ-теста)	2,07±0,23	1,98±0,17	1,23±0,06 * **
Функц. резерв (инт-ть НСТ-теста)	1,84±0,16	1,45±0,04	1,34±0,09 *

Таблица 4

Влияние амлодипина на показатели адаптивного иммунитета при экспериментальном гиперпаратиреозе (M±m)

Показатели	Группа 1 Контроль (n=18)	Группа 2 ГПТ(n=6)	Группа 3 ГПТ+АН(n=6)
ГЗТ, мл	0,38±0,03	0,24±0,04 *	0,41±0,07 **
ЯСК, •10 ⁶ ЯСК	192,2±24,7	156,17±14,12 *	771,59±152,95 **
ЯСК, •10 ⁴	125,3±33,5	74,05±5,03 *	105,17±34,46

По данным других исследователей, применение при ГПТ таких блокаторов кальциевых каналов, как верапамил, нифедипин, амлодипин и иные, нормализует содержание кальция, АТФ и углеводов в цитоплазме, но только частично восстанавливает функцию фагоцитов [8].

Выводы

1. При экспериментальном индуцированном диетой гиперпаратиреозе развиваются лимфоцитопения, активация генерации активных форм кислорода нейтрофилами и угнетение Th1-зависимого и Th2-зависимого иммунного ответа. Угнетение Th1-зависимого и Th2-зависимого иммунного ответа прогрессирует по мере снижения количества лимфоцитов в крови.
2. Применение блокатора кальциевых каналов амлодипина в суммарной дозе 1,75 мг/кг при экспериментальном гиперпаратиреозе приводит к восстановлению количества лимфоцитов в крови и показателей Th1-зависимого и Th2-зависимого иммунного ответа, активации поглотительной способности и снижению функционального резерва генерации активных форм кислорода нейтрофилами.

Список литературы

1. Осиков М.В. Влияние альфа-1-кислого гликопротеина на процессы свободно-радикального окисления при экспериментальной печеночной недостаточности / М.В. Осиков // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2007. – Т. 144, № 7. – С. 29–31.
2. Осиков М.В. Влияние гемодиализа на процессы свободно-радикального 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. Реактивные изменения клеточно-гуморальной системы организма как типовой патологический процесс и его регуляция реактантами острой фазы: автореф. дис... д-ра мед. наук. – Челябинск, 2008. – 44 с.
5. Осиков М.В. Уровень эритропоэтина и иммунный статус организма у больных хронической почечной недостаточностью, находящихся на гемодиализе / М.В. Осиков, Л.Ф. Телешева, Ю.И. Агеев, А.А. Федосов // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 4. – URL: www.science-education.ru/110-9973 (дата обращения: 10.04.2015).
6. 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.
7. Draper H.H. Osteoporosis in aging rats induced by high phosphorus diets / H.H. Draper, T.L. Sie, J.G. Bergan // J. Nutr. – 1972. – Vol. 102(9). – P. 1133–1141.
8. Geara A.S. Effects of parathyroid hormone on immune function / A.S. Geara, M.R. Castellanos, C. Bassil et al. // Clin. Dev. Immunol. – 2010. – doi: 10.1155/2010/418695. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20886005> (дата обращения: 31.01.2015).
9. Seeliger S. The parathyroid hormone-2 receptor is expressed on human leukocytes and down-regulated in hyperparathyroidism / S. Seeliger, M. Hausberg, I. Eueet et al. // ClinNephrol. – 2003. – Vol. 59(6). – P. 429-435.
10. Vaziri N.D. Effect of uremia on structure and function of immune system / N.D. Vaziri, M.V. Pahl, A. Crum [et al.] // J. Ren. Nutr. – 2012. – Vol. 1. – P. 149–156.

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.