

МЕХАНИЗМ ВЛИЯНИЯ ЭРИТРОПОЭТИНА НА ПОКАЗАТЕЛИ АДАПТИВНОГО ИММУНИТЕТА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТЕРМИЧЕСКОЙ ТРАВМЕ

¹Осиков М.В., ¹Кишкин А.М., ¹Федосов А.А.

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

Работа выполнена на 54 белых нелинейных крысах, разделенных на 3 группы: интактные животные, животные с термической травмой (ТТ), животные с термической травмой, которым вводили эритропоэтин (ЭПО). ТТ моделировали при контакте кожи в течение 30 с с нагретым до температуры 100 °С предметом (ожог III-A степени), площадь ожога 4%. ЭПО («Рекормон», МНН: эпоэтин бэта, Roche, Швейцария) вводился внутривентрально, в суммарной дозе 1500 МЕ/кг массы. В периферической крови у крыс определяли количество Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов с использованием моноклональных антител CD3 и CD45RA соответственно. Гибель лимфоцитов путем некроза и апоптоза оценивали при окрашивании клеток конъюгированным с флуорохромом аннексином V (Annexin-5-FITC) и 7-аминоактиномицином D (7-AAD). Анализ окрашенных клеток проводили на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter, США). Th1- и Th2-зависимый ответ оценивали соответственно в реакции гиперчувствительности и по количеству антителообразующих клеток в селезенке крыс после иммунизации. Установлено, что при ТТ на 3-и сутки в крови снижается количество Т- и В-лимфоцитов, угнетается Th1- и Th2-зависимый иммунный ответ, увеличивается количество лимфоцитов в крови с признаками апоптоза и некроза. Снижение количества Т- и В-лимфоцитов в крови, угнетение Th1- и Th2-зависимого иммунного ответа нарастает по мере увеличения количества лимфоцитов с признаками апоптоза и некроза. Применение ЭПО приводит к частичному или полному восстановлению количества Т- и В-лимфоцитов в крови, Th1- и Th2-зависимого иммунного ответа, снижению количества лимфоцитов в крови с признаками апоптоза и некроза. Восстановление количества Т- и В-лимфоцитов в крови, Th1- и Th2-зависимого иммунного ответа при ТТ в условиях применения ЭПО ассоциировано со снижением количества лимфоцитов в крови с признаками апоптоза и некроза.

Ключевые слова: термическая травма, адаптивный иммунитет, эритропоэтин.

MECHANISMS OF ERYTHROPOIETIN INFLUENCE ON ADAPTIVE IMMUNITY INDICATORS IN EXPERIMENTAL THERMAL INJURY

¹Osikov M.V., ¹Kishkin A.M., ¹Fedosov A.A.

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

The study examines 54 white nonlinear rats divided into 3 groups: intact animals, animals with thermal injury (TI), animals with thermal injury treated with erythropoietin (EPO). Skin burn injury was modeled by 100°C heat source application for 30 seconds (III-A degree burn) covering 4% of the surface. EPO ("Recormon" INN: epoetin beta, «Roche», Switzerland) was introduced intraperitoneally in a total dose of 1500 IU/kg. The amount of T-lymphocytes and B-lymphocytes with CD3 and CD45RA monoclonal antibodies respectively was determined in the rats' peripheral blood. Apoptosis and necrosis of lymphocytes was assessed by staining of cells with fluorochrome-conjugated annexin V (Annexin-5-FITC) and 7-aminoaktinomitsin D (7-AAD). A flow cytometer «Navios» («Beckman Coulter», USA) is used to analyze the stained cells. Th1- and Th2-dependent response was evaluated in hypersensitivity reactions and the number of antibody-forming cells respectively in the rats' spleens after immunization. The number of T-lymphocytes and B-lymphocytes decreases in the blood, Th1-dependent and Th2-dependent immune response is inhibited, number of lymphocytes in the blood with signs of apoptosis and necrosis increases on the 3rd day after TI. Reduction of the number of T-lymphocytes and B-lymphocytes in the blood, inhibition of Th1-dependent and Th2-dependent immune response increases as the number of lymphocytes with signs of apoptosis and necrosis increases. The use of EPO leads to a partial or full restoration of the number of T-lymphocytes and B-lymphocytes in the blood, Th1-dependent and Th2-dependent immune response, reducing the number of lymphocytes in the blood with signs of apoptosis and necrosis. Restoring the number of T-lymphocytes and B-lymphocytes in the blood, Th1-dependent and Th2-dependent immune response in case of TI with administration of EPO is associated with decreased number of lymphocytes in the blood with signs of apoptosis and necrosis.

Keywords: thermal injury, adaptive immunity, erythropoietin.

В динамике иммунологической реактивности при термической травме (ТТ) выделяют как минимум три фазы: период ранней иммунодепрессии, захватывающий первые дни после ожога; период компенсации, характеризующийся усилением иммунореактивности; период поздней иммунодепрессии, возникающий только после обширных повреждений. Сведения об изменении иммунного статуса в ранние сроки ТТ противоречивы, большинство исследователей отмечают активацию фагоцитов, изменение активности комплемента, концентрации в сыворотке иммуноглобулинов и др. опсопинов, депрессию клеточного звена адаптивного иммунитета, неоднозначны сведения о цитокиновом профиле. В то же время дисфункция иммунной системы при ТТ является причиной повышенной восприимчивости к условно-патогенной микрофлоре, гнойно-септических осложнений, септического шока, расширения зоны вторичной альтерации, полиорганной недостаточности и летальности, поэтому терапевтические подходы в комбустиологии в первые сутки ведения пациентов должны включать иммунокорригирующие подходы. В этом отношении перспективным фармакологическим агентом может выступить эритропоэтин (ЭПО). Ранее нами продемонстрировано протекторное влияние эритропоэтина (ЭПО) на иммунный статус при хронической почечной недостаточности, а также на врожденный иммунитет при ТТ [1-7]. Интерес к ЭПО обусловлен его плейотропными эффектами, включающими, кроме иммуностропного, кардиотропный, нефроцитопротекторный, антиоксидантный, стимулирующий репарацию тканей.

Цель работы – исследовать механизм влияния экзогенного ЭПО на показатели адаптивного иммунитета при экспериментальной ТТ.

Материалы и методы исследования. Работа выполнена на 54 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., при свободном доступе к пище и воде при 12-14-часовом световом дне. Все манипуляции с экспериментальными животными выполнялись в соответствии с правилами гуманного отношения к животным, методическими рекомендациями по их выведению из опыта и эвтаназии. Экспериментальные животные разделены на 3 группы: группа 1 – интактные животные (n=18), группа 2 – животные с термической травмой (n=18), группа 3 – животные с термической травмой, которым вводили ЭПО (n=18). Для создания модели ТТ использовали плоскодонный стеклянный стакан из химического стекла с диаметром дна 4 см, наполненный дистиллированной водой с температурой 100 °С, время контакта с кожей для моделирования ТТ IIIA степени составило 30 с. Площадь ожога вычисляли по формуле площади круга, в нашем эксперименте она составила 12,56 см². Для расчета поверхности тела у крыс использовали формулу Мее-Рубнера в модификации Lee: $S=K \cdot W^{0,6}$, где S -

поверхность тела в квадратных сантиметрах, K - коэффициент, равный 12,54, W - вес животного в граммах. Площадь поверхности тела животных в нашем эксперименте составила $336,44 \pm 12,67$ см². Так как абсолютная площадь ожога была одинаковой во всех случаях (12,56 см²), то относительная площадь ожога составила $3,97 \pm 0,14\%$, т.е. около 4%. ЭПО в составе препарата «Рекормон» (МНН: эпоэтин бэта, Roche, Швейцария) вводился внутривенно, начиная с 1-х суток, ежедневно в дозе 500 МЕ/кг массы в течение 3 дней, суммарная доза 1500 МЕ/кг. Контрольной группе животных с ТТ вводилось эквивалентное количество стерильного физиологического раствора. Исследования проводили на 3-и сутки. Забор крови проводили под общим ингаляционным наркозом (диэтиловый эфир) путем пункции левого желудочка сердца в вакуумные пробирки фирмы «Вакуэт» (Австрия).

Количество популяций лимфоцитов в периферической крови у крыс определяли методом прямой иммунофлуоресценции цельной крови с использованием моноклональных антител CD3 (клон 1F4) – экспрессируется на Т-лимфоцитах, CD45RA (клон ОХ-33) – экспрессируется преимущественно на В-лимфоцитах. Анализ окрашенных клеток проводили на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter, США), результат выражали в 10^9 /л крови. Оценку гуморального иммунного ответа крыс проводили по количеству антителообразующих клеток (АОК) в селезенке крыс, иммунизированных аллогенными эритроцитами, результат выражали в абсолютном количестве и в пересчете на 10^6 ядродержащих клеток в селезенке. Реакцию гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) у крыс, иммунизированных аллогенными эритроцитами, оценивали по выраженности воспалительного отека стопы волюмометрическим методом. Лимфоциты из периферической крови выделяли на двойном градиенте плотности фиколла и урографина («ДНК-технология», Россия), концентрацию лимфоцитов в суспензии довели до $3 \cdot 10^6$ /л. Гибель лимфоцитов оценивали при окрашивании клеток конъюгированным с флюорохромом аннексином V (Annexin-5-FITC) и 7-аминоактиномицином D (7-AAD) (Beckman Coulter, США) на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter, США), результат выражали в % клеток. 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. Отличия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. При экспериментальной ТТ в периферической крови количество Т-лимфоцитов (CD3+) снижается на 28%, количество В-лимфоцитов (CD45+) снижается на 27% средних значений в контрольной группе (таблица 1).

Таблица 1

Влияние эритропоэтина на показатели адаптивного иммунитета при термической травме

(M±m)

Показатели	1 группа Интактные	2 группа ТТ	3 группа ТТ+ЭПО
CD3+, •10 ⁹ /л	3,14±0,12	2,25±0,16 p ₁₋₂ <0,01	4,55±0,22 p ₁₋₃ <0,01 p ₂₋₃ <0,01
CD45+, •10 ⁹ /л	2,22±0,14	1,60±0 p ₁₋₂ <0,01	2,55±0,07 p ₂₋₃ <0,01
Интенсивность реакции ГЗТ, мл	0,36±0,03	0,28±0,04 p ₁₋₂ <0,01	0,68±0,01 p ₁₋₃ <0,01 p ₂₋₃ <0,01
АОК в селезенке, • 10 ⁴ ед.	192,19±24,69	22,31±3,07 p ₁₋₂ <0,01	24,77±2,21 p ₁₋₃ <0,01
АОК в селезенке, • 10 ⁶ ЯСК	125,33±33,50	30,75±2,91 p ₁₋₂ <0,01	64,54±14,37 p ₁₋₂ <0,01 p ₂₋₃ <0,01

Развитие лимфоцитопении сопровождается депрессией Th1-зависимого иммунного ответа, что проявляется снижением интенсивности реакции ГЗТ на 22% от средних значений в контрольной группе. Депрессия Th2-зависимого иммунного ответа презентруется снижением количества антителообразующих клеток в селезенке в абсолютных величинах в 8,7 раза от средних значений в контрольной группе, в пересчете на 10⁶ ядродержащих клеток в селезенке количество антителообразующих клеток снижается в 4,2 раза.

Одним из механизмов развития лимфоцитопении и депрессии Th1- и Th2-зависимого иммунного ответа может выступать активация гибели иммунокомпетентных клеток. Результаты исследования гибели лимфоцитов периферической крови путем некроза и апоптоза представлены в табл. 2.

Таблица 2

Влияние эритропоэтина на показатели гибели лимфоцитов периферической крови при термической травме (M±m)

Показатели	1 группа Интактные	2 группа ТТ	3 группа ТТ+ЭПО
Интактные клетки (Annexin-5-FITC-/7-AAD-), % клеток	98,09±1,35	96,70±0,22 p ₁₋₂ <0,01	97,75±0,20 p ₂₋₃ <0,01
Ранний апоптоз (Annexin-5-FITC+/7-AAD-), % клеток	1,62±0,09	2,90±0,27 p ₁₋₂ <0,01	2,00±0,22 p ₂₋₃ <0,01
Поздний апоптоз/некроз (Annexin-5-FITC+/7-AAD+), % клеток	0,10±0,03	0,15±0,02	0,10±0
Некроз (Annexin-5-FITC - / 7-AAD +), % клеток	0,19±0,03	0,25±0,07 p ₁₋₂ <0,01	0,21±0,02

Установлено снижение представительства интактных клеток (Annexin-5-FITC-/7-AAD-), увеличение количества клеток с ранними признаками апоптоза (Annexin-5-FITC+/7-AAD-), признаками некроза (Annexin-5-FITC - / 7-AAD +). С использованием корреляционного анализа установлено наличие обратной средней силы связи между количеством лимфоцитов в крови с ранними признаками апоптоза и количеством Т-лимфоцитов (коэффициент корреляции Спирмена $R = -0,45$; $p < 0,05$), В-лимфоцитов ($R = -0,41$; $p < 0,05$), интенсивностью реакции ГЗТ ($R = -0,57$; $p < 0,05$), количеством АОК в селезенке в пересчете на 10^6 ядродержащих клеток ($R = -0,51$; $p < 0,05$). Кроме того, зафиксирована обратная слабая связь между количеством лимфоцитов в крови с признаками некроза и количеством Т-лимфоцитов ($R = -0,39$; $p < 0,05$), интенсивностью реакции ГЗТ ($R = -0,35$; $p < 0,05$).

Применение ЭПО при экспериментальной ТТ приводит к увеличению количества Т-лимфоцитов (CD3+) и В-лимфоцитов (CD45+) в периферической крови, причем количество Т-лимфоцитов становится выше, чем в группе интактных животных. Интенсивность реакции ГЗТ, отражающая выраженность Th1-зависимого иммунного ответа, в условиях применения ЭПО повышается и становится статистически значимо выше, чем в группе интактных животных. ЭПО повышает количество АОК в селезенке в пересчете на 10^6 ядродержащих клеток, однако их количество не достигает значений в группе интактных животных.

Одним из механизмов влияния ЭПО на показатели адаптивного иммунитета при ТТ выступает ограничение апоптоза лимфоцитов. В условиях применения ЭПО повышается количество интактных лимфоцитов (Annexin-5-FITC-/7-AAD-), снижается количество клеток с ранними признаками апоптоза (Annexin-5-FITC+/7-AAD-). По данным корреляционного анализа, наблюдается отрицательная средняя силы связь между количеством клеток с ранними признаками апоптоза (Annexin-5-FITC+/7-AAD-) и количеством Т-лимфоцитов ($R = -0,52$; $p < 0,05$), интенсивностью реакции ГЗТ ($R = -0,59$; $p < 0,05$) и отрицательная слабая связь с количеством В-лимфоцитов ($R = -0,33$; $p < 0,05$), количеством АОК в селезенке в пересчете на 10^6 ядродержащих клеток ($R = -0,38$; $p < 0,05$).

По данным других исследователей, уже в раннем периоде после ТТ происходят выраженные дистрофические изменения в тимусе, вызывающие глубокую депрессию Т-клеточного звена иммунитета, которая проявляется как в снижении общего количества Т-лимфоцитов, так и различных субпопуляций с изменением их функциональной активности. Степень снижения числа Т-лимфоцитов находится в определенной зависимости от тяжести ТТ [9; 10]. Определенную роль в подавлении активности Т-лимфоцитов при ТТ, в частности ответ CD4+ наивных клеток на антигенную стимуляцию и формирование клона антиген-

специфических Т-лимфоцитов, играют Т-регуляторные лимфоциты (Tregs). В Т-лимфоцитах при ТТ нарушены механизмы внутриклеточной сигнализации, опосредованные митоген-активируемыми протеинкиназами и Ca^{2+} [8]. Протеинкиназа С опосредует цАМФ-зависимые эффекты простагландина E_2 в подавлении активности Т-лимфоцитов после ТТ. Механизм нарушения функции Т-лимфоцитов окончательно не определен, о чем свидетельствуют многочисленные сведения, зачастую противоречивого характера. Одним из механизмов подавления функциональной активности Т-лимфоцитов при ожогах выступает повышение концентрации в плазме протеина HMGB1 (high mobility group box-1), обратно коррелирующее с отношением CD4/CD8. Кроме повышенной гибели лимфоцитов по механизму апоптоза в качестве альтернативной причины Т-клеточной дисфункции рассматривается и другой механизм: активная супрессия вследствие раннего смещения цитокинового баланса в сторону противовоспалительных медиаторов. Причем выраженность апоптоза лимфоцитов, как было установлено в TUNEL-тесте у крыс при ТТ, зависит от уровня эндотоксинемии. Получены сведения о значимой корреляции полиморфизма гена CD14+ и Т-клеточного иммунитета, что, в частности, предрасполагает к развитию септических осложнений у ожоговых пациентов.

Наряду с изменениями клеточного иммунитета при ТТ происходит снижение количества В-лимфоцитов. Однако В-система характеризуется большей устойчивостью, изменение гуморального иммунного ответа характеризуется сдвигами в концентрации иммуноглобулинов. Большинство исследователей наблюдали уже на 1-3 сутки после ТТ снижение уровня Ig M, Ig A, а в случае глубоких ожогов увеличение содержания Ig G. Направленность и величина отклонений в уровне иммуноглобулинов зависит не только от активности антителообразующих клеток, но и от их количества, которое уменьшается в результате плазмореи, распада их вследствие повышения активности протеолитических ферментов.

Выводы

1. При экспериментальной термической травме в периферической крови снижается количество Т- и В-лимфоцитов, угнетается Th1- и Th2-зависимый иммунный ответ, увеличивается количество лимфоцитов в крови с признаками апоптоза и некроза.
2. Снижение количества Т- и В-лимфоцитов в крови, угнетение Th1- и Th2-зависимого иммунного ответа прогрессирует по мере увеличения количества лимфоцитов с признаками апоптоза и некроза.
3. Применение эритропоэтина в суммарной дозе 1500 МЕ/кг приводит к частичному или полному восстановлению количества Т- и В-лимфоцитов в крови, Th1- и Th2-зависимого

иммунного ответа, снижению количества лимфоцитов в крови с признаками апоптоза и некроза.

4. Восстановление количества Т- и В-лимфоцитов в крови, Th1- и Th2-зависимого иммунного ответа при экспериментальной термической травме в условиях применения эритропоэтина ассоциировано со снижением количества лимфоцитов в крови с признаками апоптоза и некроза.

Список литературы

1. 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.
2. 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: 05.06.2015).
3. Осиков М.В. Роль эритропоэтина в реализации тромбоцитарно-клеточных взаимодействий в крови при хронической почечной недостаточности / М.В. Осиков, Т.А. Григорьев, А.А. Федосов // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 10-2. – С. 285-289.
4. 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.
5. 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: 05.06.2015).
6. 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: 05.06.2015).
7. Осиков М.В. Влияние эритропоэтина на показатели врожденного иммунитета в ранние сроки экспериментальной термической травмы / М.В. Осиков, Л.Ф. Телешева, А.М. Кишкин, А.А. Федосов // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 7-2. – С. 334-339.

8. Buchanan I.B. The effect of burn injury on CD8+ and CD4+ T cells in an irradiation model of homeostatic proliferation / I.B. Buchanan, R. Maile, J.A. Frelinger et al. // J. Trauma. – 2006. – Vol. 61 (5). – P. 1062-1068.
9. Fazal N. Inhibition of T cell MAPKs (Erk 1/2, p38) with thermal injury is related to down-regulation of Ca²⁺ signaling / N. Fazal, M.A. Choudhry, M.M. Sayeed // Biochim. Biophys. Acta. – 2005. – Vol. 1741 (1-2). – P. 113-119.
10. MacConmara M.P. Regulatory T cells suppress antigen-driven CD4 T cell reactivity following injury / M.P. MacConmara, G. Tajima, F. O'Leary et al. // J. Leukoc. Biol. – 2011. – Vol. 89 (1). – P. 137-147.

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.