

МЕХАНИЗМ ВЛИЯНИЯ ЭРИТРОПОЭТИНА НА КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ СОСТАВ ЛИМФОЦИТОВ В КРОВИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТЕРМИЧЕСКОЙ ТРАВМЕ

Осиков М. В., Симонян Е. В., Саедгалина О. Т., Федосов А. А.

ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Челябинск, e-mail: kanc@chelsma.ru

Лимфоцитопения и вторичный иммунодефицит при термической травме (ТТ) являются причиной гнойно-септических осложнений и высокой летальности. Обнаруженные ранее иммуностропные свойства эритропоэтина (ЭПО) при патологии почек позволяют предположить их наличие при ТТ. Исследование выполнено на 90 белых нелинейных половозрелых крысах. ТТ III-A степени и площадью 4 % моделировали путем погружения участка межлопаточной области крысы в очищенную воду с температурой 98–99 °С. ЭПО («Эпостим», МНН: эпозтин бета, ООО «Фармапарк», Россия) вводили в дозе 500 МЕ/кг ежедневно, суммарная доза составила 4000 МЕ/кг. Исследования проводили на 3 и 8 сутки. Методом проточной цитофлуориметрии определяли количество в крови CD3+, CD45RA+ лимфоцитов, апоптоз лимфоцитов при окрашивании клеток аннексином V (Annexin-5-FITC) и 7-аминоактиномицином D (7-AAD). Содержание продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали спектрофотометрически в гептановой и в изопропанольной фазах липидного экстракта лимфоцитов с дифференцировкой первичных продуктов (E232/E220, диеновые конъюгаты), вторичных продуктов (E278/E220, кетодиены и сопряженные триены), конечных продуктов (E400/E220, Шиффовы основания). Установлено, что при ТТ на 3 и 8 сутки снижается количество CD3+ и CD45RA+ лимфоцитов в крови, увеличивается количество лимфоцитов с ранними признаками апоптоза, поздними признаками апоптоза, признаками некроза, происходит накопление первичных продуктов ПОЛ в гептановой фазе, вторичных и конечных продуктов ПОЛ в гептановой и в изопропанольной фазах липидного экстракта лимфоцитов периферической крови. Применение при ТТ ЭПО приводит к восстановлению на 3 сутки и увеличению на 8 сутки количества CD3+ и CD45RA+ лимфоцитов в крови, снижению на 8 сутки количества лимфоцитов с ранними признаками апоптоза, поздними признаками апоптоза, признаками некроза. Применение ЭПО при ТТ оказывает ПОЛ-ограничивающий эффект в гептановой и в изопропанольной фазах липидного экстракта лимфоцитов периферической крови.

Ключевые слова: эритропоэтин, термическая травма, лимфоциты, апоптоз, перекисное окисление липидов.

MECHANISMS OF ERYTHROPOIETIN INFLUENCE ON THE QUANTITATIVE COMPOSITION OF BLOOD LYMPHOCYTES IN EXPERIMENTAL THERMAL INJURY

Osikov M. V., Simonyan E. V., Saedgalina O. T., Fedosov A. A.

South Ural State Medical University of Health Ministry of Russia, Chelyabinsk, e-mail: kanc@chelsma.ru

Lymphocytopenia and secondary immunodeficiency in thermal injury (TI) cause purulent-septic complications and high mortality. Erythropoietin (EPO) immunotropic properties discovered earlier in renal pathology suggest their presence in TI. The study was performed on 90 white sexually mature non-linear rats. III-A degree TI covering 4 % of surface was modeled by immersing interscapular area into 98–99 °C purified water. EPO ("Epostim" INN: epoetin beta, Ltd. "Pharmapark", Russia) was introduced at 500 IU/kg daily dose, the total dose was 4000 IU/kg. The examinations were performed on day 3 and 8. CD3+, SD45RA+ blood lymphocytes amount, apoptosis by lymphocyte cells staining by Annexin V (Annexin-5-FITC) and 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) was assessed by flow cytofluorimetry. The lipid peroxidation (LPO) content was assessed by spectrophotometry in heptane and isopropanol phases of lymphocyte lipid extract with primary products (E232/E220, diene conjugates), secondary products (E278/E220, ketodiene and conjugated trienes), end products (E400/E220, Schiff bases) differentiation. TI findings by days 3 and 8 revealed blood lymphocytes CD3+ and CD45RA+ amount to decrease, lymphocytes amount with early, late apoptosis and necrosis signs to increase. An accumulation of LPO primary products in heptane fraction, LPO secondary and end products in heptane and isopropanol fractions of lymphocytes lipid extract isolated from peripheral blood occurs. EPO administration causes recovery on day 3 and CD3+ and CD45RA+ blood lymphocytes increase by 8 day and lymphocytes amount decrease with early, late apoptosis and necrosis signs by day 8. EPO administration induces LPO-limiting effect in heptane and isopropanol fractions of lymphocytes lipid extract isolated from peripheral blood.

Keywords: erythropoietin, thermal injury, lymphocytes, apoptosis, lipid peroxidation.

Ожоги представляют глобальную медико-социальную проблему. По оценкам ВОЗ, в мире ежегодно страдают от ожогов различной степени тяжести более 6,6 млн человек. На долю термической травмы приходится большая часть ожогов: воздействие огнем 55 %, горячей водой 40 %. В России ежегодно регистрируется более 400 тысяч случаев смерти от ожогов. Высокая летальность обусловлена сложностью и многообразием патогенетических механизмов, лежащих в основе развития, течения и исхода термической травмы [10]. Центральную роль в патогенезе термической травмы занимает развитие системного воспалительного ответа на повреждение, вторичного иммунодефицита за счет гибели иммунокомпетентных клеток путем некроза и/или апоптоза. Это приводит к риску развития инфекционных осложнений, полиорганной недостаточности и в тяжелых случаях – к смерти. Поэтому актуальным является поиск новых средств и иммунокорректирующих подходов для терапии ТТ. В последнее время интерес многих ученых направлен на изучение регуляторов гомеостаза эндогенной природы [1-3]. В частности, ранее нами в клинических и в экспериментальных условиях при различной патологии продемонстрированы протекторные свойства эритропоэтина (ЭПО), в том числе в связи с иммуномодулирующим действием [4-9]. Полагаем, что ЭПО может оказывать иммуностропные эффекты при ТТ за счет изменения гибели лимфоцитов в периферической крови. Цель работы – исследовать некоторые механизмы влияния эритропоэтина на популяционный спектр лимфоцитов в крови при экспериментальной термической травме.

Материалы и методы исследования. Эксперимент выполнен на 90 белых нелинейных половозрелых крысах массой 250 ± 20 г. при строгом соблюдении требований Всемирного общества защиты животных (WSPA) и Европейской конвенции по защите экспериментальных животных 86/609. Все животные случайным образом были разделены на 3 группы: 1 группа – интактные ($n=10$), 2 группа – крысы с ТТ ($n=40$), 3 группа – крысы с ТТ, которым внутрибрюшинно вводили ЭПО ($n=40$). ТТ IIIА степени и площадью 4 % моделировали путем погружения участка межлопаточной области крысы в очищенную воду с температурой 98–99 °С на 12 с. Глубину ожога верифицировали при гистологическом исследовании микропрепаратов кожи на микроскопе «Leika DMRXA» (Германия) с помощью компьютерной программы анализа изображений «ImageScope M» (Россия, Москва). ЭПО («Эпостим», международное непатентованное название: эпозин бета, ООО «Фармапарк», Россия) вводили в дозе 500 МЕ/кг ежедневно, суммарная доза введенного ЭПО на конец исследования составила 4000 МЕ/кг. Во 2 и 3 группах ежедневно проводили перевязки с наложением асептической повязки на область ожоговой раны. Кровь получали пункцией левого желудочка сердца под внутривенным наркозом «Золетилом» (тилетамин и золазепам, «ВирбакСантеАнималь», Франция). Исследования проводили на 3 и 8 сутки.

Лимфоциты из периферической крови выделяли общепринятым методом на градиенте плотности фиколл-верографина 1,077. Определение популяционного спектра лимфоцитов периферической крови (CD3+, CD45+) осуществляли с помощью проточного цитофлуориметра «Navios» («BeckmanCoulter», США) с использованием специфических крысиных моноклональных антител производителя «ELISAKit» (Китай). Апоптоз лимфоцитов оценивали при окрашивании клеток конъюгированным с флюорохромоманнексином V (Annexin-5-FITC) и 7-аминоактиномицином D (7-AAD) из набора «Annexin 5 – FITC/7-AADkit» («BeckmanCoulter», США) на проточном цитофлуориметре. Дифференцировали интактные клетки (Annexin-5-FITC-/7-AAD-), клетки с ранними признаками апоптоза (Annexin-5-FITC+/7-AAD-), клетки с поздними признаками апоптоза и частично некротические клетки (Annexin-5-FITC+/7-AAD+). Результат выражали в %. Содержание продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали спектрофотометрически в гептановой (г) и в изопропанольной (и) фазах липидного экстракта лимфоцитов по методу Волчегорского И. А. и соавт. Результаты выражали в единицах индексов окисления (е.и.о.): E232/E220 (первичные продукты ПОЛ – диеновые конъюгаты), E278/E220 (вторичные продукты ПОЛ – кетодиены и сопряженные триены) и E400/E220 (конечные продукты ПОЛ – Шиффовы основания). Результаты обрабатывали с использованием программы «Statistica 10.0 for Windows». Проверку статистических гипотез в группах проводили с использованием критериев Манна – Уитни, Вальда – Вольфовитца, Крускала – Уоллиса.

Результаты исследования и их обсуждение. Установлено, что при ТТ на 3 сутки эксперимента при исследовании популяционного спектра лимфоцитов крови содержание CD3+ лимфоцитов статистически значимо не изменяется, на 8 сутки наблюдается значимое почти двукратное снижение количества CD3+ клеток в крови (таблица 1).

Таблица 1

Влияние эритропоэтина на количественный состав лимфоцитов в периферической крови при термической травме (M±m)

Показатели	Группа 1 Интактные (n=10)	Группа 2a ТТ 3 сутки (n=10)	Группа 3a ТТ+ЭПО 3 сутки (n=10)	Группа 2b ТТ 8 сутки (n=10)	Группа 3b ТТ+ЭПО 8 сутки (n=10)
CD3+, 10 ⁹ /л	3,14±0,12	2,94±0,31	4,10±0,56 p _{2a-3a} <0,01	1,62±0,38 p _{1-2b} <0,01	8,50±1,84 p _{2b-3b} <0,01 p _{1-3b} <0,01
CD45RA+, 10 ⁹ /л	2,22±0,14	1,54±0,27 p _{1-2a} <0,01	2,51±0,35 p _{2a-3a} <0,01	0,90±0,07 p _{1-2b} <0,01	5,34±0,92 p _{2b-3b} <0,01 p _{1-3b} <0,01

Примечание. Здесь и далее p – показатель значимости различий между группами по критериям Манна – Уитни, Вальда – Вольфовитца, Крускала – Уоллиса.

Количество CD45RA+ лимфоцитов снижается на 3 и 8 сутки ТТ. Полученные данные позволяют констатировать снижение представительства в периферической крови лимфоцитов, экспрессирующих рецепторы Т-лимфоцитов (CD3+) и преимущественно В-лимфоцитов (CD45RA+).

При исследовании гибели лимфоцитов в периферической крови путем апоптоза и некроза при ТТ выявлено, что количество клеток с ранними признаками апоптоза (Annexin-5-FITC+/7-AAD-) прогрессивно увеличивается на 3 и 8 сутки эксперимента, так как количество лимфоцитов с данным фенотипом на 8 сутки значительно больше количества на 3 сутки ТТ (таблица 2). Содержание лимфоцитов с поздними признаками апоптоза, признаками некроза (Annexin-5-FITC+/7-AAD+) также прогрессивно увеличивается на 3 и 8 сутки эксперимента относительно группы интактных животных. Как следствие, количество интактных лимфоцитов прогрессивно снижается от 3 к 8 суткам ТТ.

Содержание при ТТ продуктов ПОЛ в липидном экстракте лимфоцитов периферической крови в гептановой фазе, которая концентрирует основную часть триацилглицеридов (резервных липидов), и в изопропанольной фазе, содержащей мембранные фосфолипиды, представлено в таблице 3. Как видно, на 3 сутки эксперимента возрастает количество диеновых конъюгатов, кетодиенов и сопряженных триенов в гептановой фазе и оснований Шиффа в изопропанольной фазе липидного экстракта лимфоцитов. К 8 суткам ТТ в гептановой фазе сохраняется повышенным содержание диеновых конъюгатов в гептановой фазе и оснований Шиффа в изопропанольной фазе. Кроме этого, на 8 сутки ТТ увеличивается содержание оснований Шиффа в гептановой фазе и кетодиенов и сопряженных триенов в изопропанольной фазе липидного экстракта лимфоцитов.

Полагаем, что окислительный стресс при ТТ, инициирующим звеном которого в периферической крови выступают активированные фагоциты, эндотелиоциты, тромбоциты, приводит к активации процессов пероксидации липидов мембран клеток крови, в том числе лимфоцитов, следствием чего является накопление продуктов ПОЛ в лимфоцитах периферической крови. Повреждение цитоплазматической мембраны и мембран органелл лимфоцитов запускает процесс гибели лимфоцитов в периферической крови путем некроза и/или апоптоза и приводит к снижению представительства Т-лимфоцитов (CD3+) и преимущественно В-лимфоцитов (CD45RA+). Таким образом, одним из звеньев патогенеза вторичного иммунодефицита при ТТ выступает лимфоцитопения, развивающаяся вследствие гибели лимфоцитов периферической крови, инициированной окислительным стрессом.

Применение ЭПО при ТТ приводит к восстановлению количества CD3+ и CD45RA+ лимфоцитов в периферической крови на 3 сутки эксперимента (таблица 1). На 8 сутки ТТ количество CD3+, и CD45RA+ лимфоцитов в периферической крови становится более чем в 2 раза выше, чем в группе интактных животных.

Исследование интенсивности гибели лимфоцитов в крови при ТТ в условиях введения ЭПО показало, что на 3 сутки количество интактных клеток, клеток с ранними признаками апоптоза, с поздними признаками апоптоза, признаками некроза статистически значимо не отличается от группы сравнения (таблица 2). Отметим, что при сравнении с группой интактных животных на 3 сутки ТТ было увеличено только количество лимфоцитов с поздними признаками апоптоза, признаками некроза. На 8 сутки ТТ применение ЭПО приводит к снижению количества клеток с ранними признаками апоптоза, с поздними признаками апоптоза, признаками некроза до значений в группе интактных животных. Как следствие, наблюдается увеличение количества интактных клеток.

Таблица 2

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

Показатели	Группа 1 Интактные (n=10)	Группа 2а ТТ 3 сутки (n=10)	Группа 3а ТТ+ЭПО 3 сутки (n=10)	Группа 2б ТТ 8 сутки (n=10)	Группа 3б ТТ+ЭПО 8 сутки (n=10)
Annexin-5- FITC-/7- AAD-, % клеток	93,16±0,16	88,38±2,26 p _{1-2a} <0,01	91,62±1,85	66,56±5,60 p _{1-2b} <0,01 p _{2a-2b} <0,01	91,94±0,80 p _{2b-3b} <0,01
Annexin-5- FITC+/7- AAD-, % клеток	6,66±0,79	10,74±2,07 p _{1-2a} <0,01	7,69±1,59	22,26±1,89 p _{1-2b} <0,01 p _{2a-2b} <0,01	7,90±0,77 p _{2b-3b} <0,01
Annexin-5- FITC+/7- AAD+, % клеток	0,16±0,04	0,82±0,17 p _{1-2a} <0,01	0,62±0,28 p _{1-3a} <0,01	10,70±3,90 p _{1-2b} <0,01 p _{2a-2b} <0,01	0,14±0,05 p _{2b-3b} <0,01

Применение ЭПО при ТТ приводит на 3 сутки наблюдения к снижению содержания диеновых конъюгатов в гептановой фазе липидного экстракта лимфоцитов периферической крови, количество других продуктов ПОЛ значимо не отличается от группы животных с ТТ (таблица 3). На 8 сутки эксперимента в условиях применения ЭПО в гептановой фазе липидного экстракта лимфоцитов периферической крови снижается содержание диеновых конъюгатов и оснований Шиффа, в изопропанольной фазе снижается содержание кетодиенов и сопряженных триенов, а также оснований Шиффа.

Влияние эритропоетина на содержание продуктов ПОЛ в гептановой и изопропанольной фазах липидного экстракта лимфоцитов периферической крови при термической травме
(M±m)

Показатели	Группа 1 Интактные (n=10)	Группа 2a ТТ 3 сутки (n=10)	Группа 3a ТТ+ЭПО 3 сутки (n=10)	Группа 2b ТТ 8 сутки (n=10)	Группа 3b ТТ+ЭПО 8 сутки (n=10)
ДК (г), е.и.о.	0,25±0,03	0,77±0,03 p _{1-2a} <0,01	0,35±0,07 p _{2a-3a} <0,01	0,77±0,10 p _{1-2b} <0,01	0,40±0,07 p _{2b-3b} <0,01
КД и СТ (г), е.и.о.	0,204±0,011	0,32±0,03 p _{1-2a} <0,01	0,31±0,08	0,19±0,07	0,106±0,060 p _{2b-3b} <0,01
ШО (г), е.и.о.	0,017±0,005	0,150±0,047	0,035±0,013	0,162±0,049 p _{1-2b} <0,01	0,026±0,009 p _{2b-3b} <0,01
ДК (и), е.и.о.	0,86±0,24	1,03±0,05	0,96±0,09	0,97±0,15	1,13±0,04
КД и СТ (и), е.и.о.	0,12±0,03	0,13±0,03	0,14±0,02	0,17±0,01	0,11±0,01 p _{2b-3b} <0,01
ШО (и), е.и.о.	0,035±0,010	0,070±0,019 p _{1-2a} <0,01	0,114±0,057	0,052±0,019 p _{1-2b} <0,01	0,018±0,007 p _{2b-3b} <0,01

Примечание. Содержание продуктов ПОЛ в гептановой (г) и в изопропанольной (и) фазах липидного экстракта лимфоцитов.

Таким образом, нами при ТТ зафиксирован ПОЛ-ограничивающий эффект ЭПО в лимфоцитах периферической крови. Ограничение повреждения клеток свободными радикалами приводит к уменьшению их гибели путем апоптоза или некроза и, как следствие, восстановлению количественного представительства в кровотоке. Однако, учитывая установленный ранее факт значительного увеличения количества Т- и В-лимфоцитов в крови на 8 сутки ТТ в условиях применения ЭПО, может предположить стимулирующий эффект ЭПО в отношении пролиферации и дифференцировки клеток в ходе лимфопоэза в костном мозге, других органах иммунной системы.

Цитопротекторное действие ЭПО может реализоваться как напрямую, так и опосредованно за счет воздействия на ферменты антиоксидантной защиты, способствующих снижению количества активных форм кислорода. Ранее нами было установлено, что ЭПО повышает активность ферментов антиокислительной защиты в эритроцитах [5, 8]. По данным некоторых авторов, при связывании ЭПО с специфическими рецепторами на цитоплазматической мембране запускаются сигнальные пути, в том числе при участии активаторов транскрипции (STAT-5, STAT-3), которые приводят к активации генов, ответственных за пролиферацию и дифференцировку клеток.

Выводы

1. Установлено, что при экспериментальной термической травме на 3 и 8 сутки наблюдения происходит снижение количества CD3+ и CD45RA+ лимфоцитов в периферической крови, увеличивается количество лимфоцитов в крови с ранними признаками апоптоза, поздними признаками апоптоза, признаками некроза. При ТТ происходит накопление первичных продуктов перекисного окисления липидов в гептановой фазе, вторичных и конечных продуктов перекисного окисления липидов в гептановой и в изопропанольной фазах липидного экстракта лимфоцитов периферической крови.
2. Применение при термической травме эритропоэтина в дозе 500 МЕ/кг ежедневно приводит к восстановлению на 3 сутки и увеличению на 8 сутки количества CD3+ и CD45RA+ лимфоцитов в периферической крови, снижению на 8 сутки количества лимфоцитов в крови с ранними признаками апоптоза, поздними признаками апоптоза, признаками некроза. Применение ЭПО при ТТ оказывает ПОЛ-ограничивающий эффект в гептановой и в изопропанольной фазах липидного экстракта лимфоцитов периферической крови.

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. Реактивные изменения клеточно-гуморальной системы организма как типовой патологической процессии его регуляция реактантами острой фазы : автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – Челябинск, 2008. – 44 с.
3. Осиков М. В. Роль орозомукоида в регуляции активности систем плазменного протеолиза при экспериментальной почечной недостаточности / М. В. Осиков // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2009. – Т. 148, № 7. – С. 27-30.
4. Осиков М. В. Патофизиологический анализ влияния эритропоэтина на психологический статус у больных хронической почечной недостаточностью, находящихся на гемодиализе / М. В. Осиков, К. В. Ахматов, Л. В. Кривохижина // Вестник Южно-Уральского государственного университета. Серия: Образование, здравоохранение, физическая культура. – 2010. – № 19 (195). – С. 110-116.
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. 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.
7. Осиков М. В. Влияние эритропоэтина на активность систем плазменного протеолиза при экспериментальной почечной недостаточности / М. В. Осиков, Т. А. Григорьев // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2012. – Т. 153, № 1. – С. 27–30.
8. Осиков М. В. Влияние эритропоэтина на функциональную активность тромбоцитов / М. В. Осиков, Т. А. Григорьев, А. А. Федосов и др. // *Современные проблемы науки и образования*. – 2012. – № 6.; URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=7450> (дата обращения: 06.03.2016).
9. 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.
10. Ghanime G. Epidemiology of major burns at the Lebanese burn center in geitawi, Lebanon. / G. Ghanime, N. Rizkallah, J.M. Said // *Ann. burns fire disasters*. – 2013. – Vol. 26, № 2. – P. 59-62.