

EFFECT OF ERYTHROPOIETIN ON FUNCTIONAL ACTIVITY OF BLOOD NEUTROPHILS OF PREMATURE INFANTS IN EXPERIMENT *IN VITRO*

Osikov M. V., Almukhametova O. N., Vorgova L. V.

South Ural State Medical University, Russian Ministry of Health,
Chelyabinsk, Russia

Aim of the study – to investigate the effect of erythropoietin (EPO) on the absorption and NBT-reducing capacity of neutrophils isolated from the blood of preterm neonates (PN) *in vitro*. The study was performed on 18 infants: PN from premature birth (PB) (n=6); PN from early preterm birth (EPB) (n=6); PN from a very early preterm birth (VEPB) (n=6). The EPO used in concentrations of 30 IU/l; 15 IU/l; 7,5 IU/l; 3,75 IU/L. Evaluated the absorption capacity and oxygen-dependent metabolism of neutrophils isolated from umbilical cord blood. Have PN from EPB and VEPB, EPO in *in vitro* experimental conditions increases, and PN from PB – reduces the absorption capacity and NBT-reducing capacity of blood neutrophils. EPO effect on the absorption capacity of blood neutrophils in *in vitro* experimental conditions does not depend on gestational age and manifests itself in small doses (3,75 IU/l and 7.5 IU/l), and NBT-reducing capacity of blood neutrophils in large doses (15 IU/l and 30 IU/l).

Key words: preterm infants, erythropoietin, neutrophils

ВЛИЯНИЕ ЛОКАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ ЭРИТРОПОЭТИНА НА ПОКАЗАТЕЛИ ГИБЕЛИ ЛИМФОЦИТОВ В КРОВИ В ДИНАМИКЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТЕРМИЧЕСКОЙ ТРАВМЫ

Осиков М. В., Симонян Е. В., Сاعدгалина О. Т.,
Бивалькевич В. А.

ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, Челябинск, Россия

Цель работы – Исследовать влияние локального применения эритропоэтина (ЭПО) в составе трансдермальной пленки (ТДП) на показатели гибели лимфоцитов в крови в динамике экспериментальной термической травмы (ТТ). Эксперимент выполнен на 90 белых нелинейных крысах, которые были случайно разделены на 3 группы: 1 – интактные, 2 – животные с ТТ и асептической повязкой (n=40), 3 – животные с ТТ на фоне применения ТДП с ЭПО (n=40). Моделирование ТТ IIIA степени и площадью 3,5% осуществляли путем погружения межлопаточной области кожи животного в очищенную воду с температурой 98-99°C на 12 с. В предварительных исследованиях была разработана ТДП на основе натрия карбоксиметилцеллюлозы с ЭПО в дозе 500 МЕ/г. Перевязку осуществляли ежедневно. Исследования проводили на 3, 5, 8 и 14 сутки. Показатели гибели лимфоцитов оценивали при окрашивании клеток конъюгированным с флюорохромом аннексином и 7-аминоактиномицином D на проточном цитофлуориметре «Navios». Установлено, что при ТТ на 3, 5 и 8 сутки увеличивается количество лимфоцитов с фенотипом Annexin-5-FITC⁺/7-AAD⁻ и Annexin-5-FITC⁺/7-AAD⁺, на 5 и 8 сутки снижается количество лимфоцитов с фенотипом Annexin-5-FITC⁻/7-AAD⁻. В условиях применения ТДП с ЭПО при ТТ на 5 и 14 сутки снижается количество лимфоцитов с фенотипом Annexin-5-FITC⁺/7-AAD⁻, на 8 и 14 сутки снижается количество Annexin-5-FITC⁺/7-AAD⁺ лимфоцитов, на 5 и 14 сутки увеличивается количество лимфоцитов Annexin-5-FITC⁻/7-AAD⁻. Таким образом, применение при ТТ ТДП с ЭПО приводит к снижению в крови количества лимфоцитов с признаками апоптоза и некроза.

Ключевые слова: термическая травма, эритропоэтин, лимфоциты, трансдермальная пленка

Введение. Термическая травма (ТТ) занимает лидирующую позицию среди всех ожоговых повреждений. Основной проблемой при ТТ является развитие системных (вторичный иммунодефицит, сепсис, септический шок, полиорганная недостаточность) и местных (инфицирование раневой поверхности, образование патологических рубцов, нарушение двигательных функций) осложнений, одним из ключевых звеньев патогенеза которых является дисфункция иммунной системы, включающая, в том числе, увеличение гибели лимфоцитов в крови. В связи с этим, терапия ТТ должна включать применение как системной, так и местной иммунокоррекции. На сегодняшний день применение раневых покрытий, содержащих различные фармакологически активные вещества, является одним из методов консервативного лечения ран. Интерес в терапии ТТ представляет эритропоэтин (ЭПО), иммуностимулирующие эффекты которого были нами продемонстрированы в клинических и в экспериментальных условиях при различной патологии [1].

Цель работы. Исследовать влияние локального применения ЭПО в составе трансдермальной пленки на показатели гибели лимфоцитов в крови в динамике экспериментальной ТТ.

Материалы и методы. Эксперимент выполнен на 90 белых нелинейных крысах массой

180-220 г. в соответствии с требованиями Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETSIN 123, 18 марта 1986 г.). Животные случайным образом были разделены на 3 группы: 1 – интактные (n=10), 2 – животные с ТТ и асептической повязкой (n=40) ТТ, 3 – животные с ТТ на фоне применения трансдермальной пленки с ЭПО (n=40) ТТ+ЭПО. Моделирование ТТ IIIA степени и площадью 3,5% осуществляли путем погружения межлопаточной области кожи животного в очищенную воду с температурой 98-99°C на 12 с. Животные находились под общей анестезией – «Золетил» (МНН: тилетамин гидрохлорид и золазепам гидрохлорид, «VirbacSanteAnimale», Франция). В предварительных исследованиях была разработана ТДП на основе натрия карбоксиметилцеллюлозы с ЭПО в дозе 500 МЕ/г [2]. Перевязку в группах 2 и 3 осуществляли ежедневно. Исследования проводили на 3, 5, 8 и 14 сутки. Лимфоциты выделяли на градиенте плотности фиколл-верографина. Показатели гибели лимфоцитов оценивались при окрашивании клеток конъюгированным с флуорохромом аннексином V (Annexin-5-FITC) и 7-аминоактиномицином D (7-AAD) из набора «Annexin 5 – FITC/7-AADkit» («BeckmanCoulter», США) на проточном цитофлуориметре «Navios» («BeckmanCoulter», США). Дифференциро-

Таблица 1. Влияние локального применения эритропоэтина в составе трансдермальной пленки на показатели гибели лимфоцитов при экспериментальной термической травме (Me (Q25 – Q75))

| Группы (n=10) | Annexin-5-FITC-/7-AAD-, % клеток | Annexin-5-FITC+/7-AAD-, % клеток | Annexin-5-FITC+/7-AAD+, % клеток |
|------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Группа – Интактные | 91,90 (81,80-93,10) | 7,85 (7,25-8,35) | 0,10 (0,10-0,30) |
| Группа ТТ 3 сутки | 90,20 (84,00-93,90) | 11,90 (7,30-17,65)* | 0,95 (0,55-1,40)* |
| Группа ТТ+ЭПО 3 сутки | 86,40 (85,10-87,05) | 12,45 (11,10-14,00) | 0,95 (0,75-1,50) |
| Группа ТТ 5 сутки | 82,10 (80,00-84,80)* | 16,40 (14,70-18,80)* | 1,00 (1,00-1,00)* |
| Группа ТТ+ЭПО 5 сутки | 89,15 (81,50-92,35)# | 6,30 (4,90-13,90)# | 1,50 (0,00-2,20) |
| Группа ТТ 8 сутки | 75,15 (69,15-79,65)* | 21,40 (19,00-26,90)* | 4,65 (2,50-7,40)* |
| Группа ТТ+ЭПО 8 сутки | 75,80 (73,60-83,70) | 22,60 (15,55-24,25) | 1,60 (0,75-2,15)□ |
| Группа ТТ 14 сутки | 93,45 (89,35-96,90) | 8,10 (4,20-11,40) | 0,10 (0,10-0,40) |
| Группа ТТ+ЭПО 14 сутки | 99,30 (99,20-99,40)• | 0,60 (0,35-0,70)• | 0,05 (0,00-0,10)• |

Примечание. * – значимые (p<0,05) различия с группой интактных животных, # – с группой ТТ на 5 сутки, □ – с группой ТТ на 8 сутки, • – с группой ТТ на 14 сутки по критериям Манна – Уитни, Вальда – Вольфовитца, Краскела-Уоллиса.

вали 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%. Статистический анализ проводили с помощью программы «Statistica for Windows v. 10.0».

Результаты и их обсуждение. Содержание лимфоцитов в крови с различными фенотипами при ТТ представлены в таблице 1. Установлено, что при ТТ количество клеток с ранними и поздними признаками апоптоза, признаками некроза на 3, 5 и 8 сутки увеличивается, а на 14 сутки статистически значимо не изменяется по сравнению с группой интактных животных. Количество интактных клеток снижается на 5 и 8 сутки ТТ и статистически значимо не изменяется на 3 и 14 сутки эксперимента.

При оценке влияния применения трансдермальной пленки с ЭПО при ТТ на показатели гибели лимфоцитов в крови установлено, что количество клеток с ранними признаками апоптоза статистически значимо не изменяется на 3 и 8 сутки, снижается на 5 и 14 сутки эксперимента относительно группы с ТТ (Таблица 1). Количество в крови лимфоцитов с поздними признаками апоптоза и/или некроза статистически значимо не изменяется на 3 и 5 сутки, снижается на 8 и 14 сутки эксперимента. Количество в крови интактных лимфоцитов статистически значимо не изменяется относительно группы с ТТ на 3 и 8 сутки применения пленки с ЭПО при ТТ и увеличивается на 5 и 14 сутки.

Полагаем, что активация гибели лимфоцитов в крови при ТТ может быть обусловлена повышением концентрации проапоптогенных цитокинов, например, TNF- α , свободными радикалами в условиях оксидативного стресса и другими факторами. Применение ЭПО в составе трансдермальной пленки приводит к ограничению зоны вторичной альтерации за счет антиоксидантного действия, и тем самым, препятствует выходу проапоптогенных цитокинов в кровотоки [3].

Выводы.

1. Установлено, что при ТТ на 3, 5 и 8 сутки увеличивается количество лимфоцитов с фенотипом Annexin-5-FITC⁺/7-AAD⁻ и Annexin-5-FITC⁺/7-AAD⁺, на 5 и 8 сутки снижается количество лимфоцитов с фенотипом Annexin-5-FITC⁻/7-AAD⁻.

2. В условиях применения трансдермальной пленки с ЭПО при ТТ на 5 и 14 сутки снижается количество лимфоцитов с фенотипом Annexin-5-FITC⁺/7-AAD⁻, на 8 и 14 сутки снижается количество Annexin-5-FITC⁺/7-AAD⁺ лимфоцитов, на 5 и 14 сутки увеличивается количество лимфоцитов Annexin-5-FITC⁻/7-AAD⁻.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Осиков М. В., Григорьев Т. А., Федосов А. А., Козочкин Д. А., Ильиных М. А. Влияние эритропоэтина на функциональную активность тромбоцитов // Современные проблемы науки и образования. – 2012. – № 6.; URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=7450> (дата обращения: 10.04.2017). Osikov M. V., Grigoryev T. A., Fedosov A. A., Kozochkin D. A., Ilinykh M. A. Vliyaniye eritropoetina na funktsionalnuyu aktivnost trombositov // Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya. – 2012. – № 6.; URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=7450> (data obrashcheniya: 10.04.2017).
2. Пат. 2611401 Российская Федерация, МПК А 61 К 38/18, А 61 К 47/00. Способ получения лекарственного средства с эритропоэтином местного действия [Текст] / Осиков М. В., Симонян Е. В., Саедгалина О. Т.; заявитель и патентообладатель ГБОУ ВПО ЮУГМУ Минздрава России. – № 2015146627; заявл. 28.10.15; опубл. 21.02.17, Бюл. № 6. Pat. 2611401 Rossiyskaya Federatsiya. MPK A 61 K 38/18. A 61 K 47/00. Sposob polucheniya lekarstvennogo sredstva s eritropoetinom mestnogo deystviya [Tekst] / Osikov M. V., Simonyan E. V., Sayedgalina O. T.; zayavitel i patentobladatel GBOU VPO YuUGMU Minzdrava Rossii. – № 2015146627; zayavl. 28.10.15; opubl. 21.02.17. Byul. № 6.
3. Danielczok J et al. Does Erythropoietin Regulate TRPC Channels in Red Blood Cells? // Cellular Physiology and Biochemistry. – 2017. – Vol. 41. – № 3. – pp. 1219-1228.

THE EFFECT OF LOCAL APPLICATION OF ERYTHROPOIETIN ON DEATH INDICATORS OF LYMPHOCYTES IN THE BLOOD IN THE DYNAMICS OF EXPERIMENTAL THERMAL INJURY

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

Of the South Ural state medical University, Chelyabinsk, Russia

To investigate the effect of local application of erythropoietin (EPO) in the composition of transdermal film (TDF) on the death's indicators of lymphocytes in the blood in dynamics of experimental thermal trauma (TI). The experiment was made out on 90 white nonlinear rats that were divided into groups: 1 – intact rats; 2 – animals with the TI and an aseptic bandage (n=40), 3 – animals with the TI application of the TDF with EPO (n=40). Modeling TI IIIA degree and area of 3.5% was carried out by immersing the interscapular region of the skin of the animal in clean water with a temperature of 98-99°C 12 s. In the preliminary studies was developed TDF on the basis of sodium carboxymethyl cellulose with EPO at the dose of 500 IU/g. The dressing was carried out daily. The study was conducted for 3rd, 5th, 8th and 14th days. Death's indicators of lymphocytes was assessed by staining cells with fluorochrome conjugated with annexin V and 7-aminoantipyrine D in flow cytometer "Navios". It is established that at TI at 3, 5 and 8 day increase in the number of lymphocytes with the phenotype of the Annexin-5-FITC⁺/7-AAD⁻ and Annexin-5-FITC⁺/7-AAD⁺, 5 and 8 day reduced the number of lymphocytes with the phenotype of the Annexin-5-FITC⁻/7-AAD⁻. In the application of TDF with the EPO at the TI for 5 and 14 days reduced the number of lymphocytes with the phenotype of the Annexin-5-FITC⁺/7-AAD⁻, 8 and 14 days, reduced the number of Annexin-5-FITC⁺/7-AAD⁺ cells at 5 and 14 days increased lymphocytes Annexin-5-FITC⁻/7-AAD⁻. Thus, in TI the application of TDF with EPO leads to a decrease in blood lymphocytes with signs of apoptosis and necrosis.

Key words: thermal injury, transdermal film, erythropoietin, lymphocytes

ИЗМЕНЕНИЯ ИММУННЫХ РЕГУЛЯТОРНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ У ДЕТЕЙ В УСЛОВИЯХ ЭКСПОЗИЦИИ СТРОНЦИЕМ

Отавина Е. А., Долгих О. В.

ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», Пермь, Россия

Проведен анализ маркерных показателей иммунной регуляции у детей в условиях избыточного поступления стронция с питьевой водой. Исследование показало, что маркеры специфической гиперчувствительности и медиаторы межклеточной иммунной регуляции: IgG специфический к стронцию, цитокины IL-6, IL-12, IL-17, α-TNF, LTC₄/D₄/E₄ – спонтанные и специфически стимулированные, RANKL и остеопротегерин могут быть использованы для оценки риска нарушения здоровья в качестве ранних маркеров изменений иммунорегуляции у детей, проживающих в условиях экспозиции стронцием.

Ключевые слова: иммунорегуляция, лейкотриены, стронций

Введение. Особенности функционального состояния системы иммунной регуляции, определяющей адаптационные возможности и устойчивость организма в условиях возросшего воздействия химических факторов, могут выступать в качестве индикаторных критериев для решения задачи своевременного выявления патогенетических предпосылок развития заболеваний, в том числе аутоиммунных и аллергических [1,2]. При этом,