ISSN 1561—6274. Нефрология. 1999. Том 3. № 1.

© Коллектив авторов, 1999
УДК 615.357:616-008.64-036.12-085.38

С.И. Рябов, И.А. Ракитянская, Али Яхья Абдулла Аль-Шауш, И.Г. Каюков, Ю.А. Ермаков

ДОЗАЗАВИСИМЫЙ ЭФФЕКТ ПРИЕМА РЕКОМБИНАНТНОГО ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ЭРИТРОПОЭТИНА У БОЛЬНЫХ С ХРОНИЧЕСКОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ НА РАЗЛИЧНЫХ СРОКАХ ГЕМОДИАЛИЗНОЙ ТЕРАПИИ

S.I. Ryabov, I.A. Rakityanskaya, Ali Yakhya Abdulla Al-Shawish, I.G. Kayukov, Yu.A. Ermakov

THE DOSE-DEPENDENT EFFECT OF RECOMBINANT HUMAN ERYTHROPOIETIN IN PATIENTS WITH CHRONIC RENAL FAILURE AT DIFFERENT TERMS OF HEMODIALYSIS TREATMENT

Научно-исследовательский институт нефрологии Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им.акад. И.П.Павлова, Россия.

РЕФЕРАТ

Получены данные, свидетельствующие о том, что суммарная доза рекомбинантного человеческого эритропоэтина (РЧЭПО) оказывает индивидуальное влияние на взаимосвязи между иммунологическими показателями у больных, получающих терапию гемодиализом (ГД) на разных сроках. При этом было выявлено, что лимфоциты супрессоры с маркером СД8 в группе больных, получающих ГД от 1 года до 2,5, никак не реагируют на введение ни разовой, ни суммарной дозы РЧЭПО ($p>0,05$). В группе больных, получающих ГД 5 лет и более, не взаимодействуют между собой и не реагируют на введение суммарной дозы РЧЭПО зрелые лимфоциты СД2 и СД8. Суммарная доза РЧЭПО, которую получают пациенты на разных сроках ГД-терапии, как и продолжительность введения препарата по-разному влияют на содержание лимфоцитов в крови и на их взаимодействие между собой. Отсутствие полученных взаимодействий между отдельными субпопуляциями под влиянием дозы РЧЭПО говорит в пользу того, что этих взаимодействий нет и нет никакого ответа на увеличение дозы препарата и продолжительности его введения больному. Показано, что влияния суммарной дозы РЧЭПО на мононуклеары крови очень индивидуальны и зависят от сроков ГД-терапии.

Ключевые слова: хроническая почечная недостаточность, гемодиализ, рекомбинантный человеческий эритропоэтин, лимфопоэз, мононуклеары.

ABSTRACT

The data obtained show that the total dose of recombinant human erythropoietin (RHEP) has an individual effect on interrelations between immunological indices in patients receiving hemodialysis (HD) therapy at different terms. It was shown that CD8 lymphocyte suppressors in the group of patients receiving HD during the period from 1 to 2,5 years had no reaction to either a single or total dose of RHEP ($p>0,05$). In the group of patients given HD during 5 and more years no interrelation and no reaction to total doses of RHEP was noted in mature CD2 and CD8 lymphocytes. The total dose of RHEP given to the patients at different terms of HD treatment as well as the duration of administration of the drug has different influence on the amount of lymphocytes in blood and on their interaction. The absence of the interaction between separate subpopulations under the influence of the dose of RHEP suggests that there are no such interactions and no response to higher doses of the drug and to longer duration of their administration to the patients. The influence of the total dose of RHEP on the blood mononuclears was shown to be very individual and to depend on the terms of HD treatment.

Key words: chronic renal failure, hemodialysis, recombinant human erythropoietin, lymphopoiesis, mononuclears.

ВВЕДЕНИЕ

Во всем мире после синтеза рекомбинантного человеческого эритропоэтина (РЧЭПО) для лечения анемии у больных с хронической почечной недостаточностью (ХПН), получающих перманентный гемодиализ (ГД), стали использовать этот препарат. Однако было показано, что эритропоэтин (ЭПО) эффективен только в

случае хорошего очищения пациента от уремических токсинов, если исчезают (или резко снижаются) факторы, способствующие развитию анемии у этой категории больных. При изучении биологической активности ЭПО у здоровых и пациентов с терминальной ХПН было выявлено существование более чем одной формы иммунореактивного ЭПО [8] из-за различий между уровнями иммунологически определяемого и биологически активного гормона в сыворотке крови. У больных с ХПН уровень ЭПО, измеряемый методом RIA, был существенно выше, чем в биотесте [5]. Предполагалось, что ЭПО, циркулирующий у больных с ХПН, имеет множество иммунореактивных компонентов, т. е. несколько вариантов по углеводному составу — феномен, который часто наблюдается среди гликопротеиновых гормонов [4]. Репрезентативный элюционный профиль образцов сыворотки крови больных с ХПН показал наличие иммунореактивного ЭПО, который элюцировал как в областях с высокой и низкой молекулярной массой, так и с одиночным пиком, совпадающим с меченым эритропоэтиновым индикатором [2, 8]. Фракции с высокой молекулярной массой составляли 58% от общего ЭПО, а фракции с низкой — 20%. Авторы делают вывод о том, что иммунореактивный сывороточный ЭПО гетерогенен по молекулярной массе у здоровых и у пациентов с ХПН. Это явление связывают с включением большего количества биологически неактивных компонентов. Гетерогенность приписывается таким факторам, как секреция предшественников и фрагментов, периферический метаболизм гормонов, связывание с белками-носителями, измененный почечный клиренс и различия в углеводной части гликопротеидных гормонов [2, 8, 9, 12].

В последние годы появились немногочисленные работы, в которых показано, что РЧЭПО обладает выраженным иммуномодулирующим свойством. Причем замечено, что низкие дозы препарата вызывают более выраженное влияние на иммунный гомеостаз организма [6, 10]. В частности, выявлены изменения в содержании в крови субпопуляций мононуклеаров СД3-, СД4- и СД8-клеток уже через 4 нед от начала приема РЧЭПО у больных с ХПН, получающих гемодиализ. Процентное содержание СД3-лимфоцитов через 4 нед снижается с 59,3±5,5 до 53,2±5,1%, а содержание СД4 — с 44,6±6,7 до 27,5±7,6% через 4 нед терапии и до 36,2±6,4% через 12 нед. Уровень СД8-лимфоцитов изменялся с 29,2±10,6 до 16,5±6,7% и 16,5±6,5% через 4 и 12 нед лечения. Соответственно этому существенно менялось и значение соотношения СД4/СД8 с 1,45±0,4 до 2,2±0,4 через 12 нед лечения [3].

Аналогичные данные по снижению содержания супрессоров СД8 получены и другими исследователями [1], которые также отмечают увеличение пролиферативного ответа на митоген — фитогемагглютинин (ФГА) in vitro и увеличение отношения СД4/СД8. При изучении содержания в крови натуральных киллеров (NK) показано, что терапия РЧЭПО у пациентов, получающих ГД (на купрофановых мембранах), через 3 мес приводит к снижению NK с 16,6±6,4 до 10±3,6% (соответственно, 210±69 кл./мкл и 126±41 кл./мкл). Также существенно снижалась и цитотоксическая активность NK-клеток — с 32±10,6 до 23,6±8,8% [1]. Аналогичные результаты были получены и в других исследованиях через 18 нед от начала лечения больных РЧЭПО [7]. Несмотря на то, что в литературе нет данных о механизме действия РЧЭПО на лимфоциты и не выявлено специфического его связывания с рецепторами мембраны этих клеток, терапия РЧЭПО вызывает существенные изменения в относительном и абсолютном содержании лимфоцитов в периферической крови [11].

Целью нашей работы было изучение влияния различных доз РЧЭПО на динамику субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови у больных с ХПН, получающих гемодиализную терапию.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Для решения поставленной задачи нами были обследованы 66 пациентов с хроническим гломерулонефритом (ХГН) с ХПН, получающих ГД. 35 больных принимали различные дозы РЧЭПО (350, 500, 1000, 1500 ед.). Использовался РЧЭПО (Рекормон) производства фирмы «Boehringer Mannheim GmBH» (Австрия). Обследованные больные были разделены на три группы в зависимости от длительности гемодиализной терапии (1—2,5 лет, более 2,5 — менее 5 лет, 5 лет и более).

Изучение субпопуляционного состава Т-лимфоцитов периферической крови проводилось с помощью моноклональных антител, меченных Fitc («Dako», Германия).

Статистическую обработку данных проводили на ЭВМ по стандартному статистическому пакету «Statistica for Windows, 4.3» фирмы Stat. Soft. Inc.,1993 г.

Во всех группах сравнения рассчитывали средние значения каждого показателя, стандартные ошибки средней, значения стандартного квадратичного отклонения. Взаимосвязи между изучаемыми показателями внутри каждой группы выявляли с помощью множественной нелинейной регрессии и нелинейной корреляции с предварительным выравниванием значений иммунологических показателей по экспо-

ненциальной функции. Критический уровень достоверности нулевой статистической гипотезы (Р) принимали равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В группе больных, получающих ГД от 1 до 2,5 лет, методом множественной нелинейной регрессии были выявлены следующие изменения в субпопуляционном составе лимфоцитов периферической крови под влиянием суммарной дозы РЧЭПО и под воздействием длительности приема препарата. Показано, что в данную статистическую модель вошли только три субпопуляции Т-лимфоцитов: ранние лимфоидные предшественники, несущие внутриядерный маркерный фермент — терминальную дезоксинуклеотидилтрансферазу (TdT+-клетки), в целом зависят от суммарной дозы (β=1,79, t=8,19, p=0,00001) и от длительности приема препарата (β=−1,12, t=5,14, p=0,0002). Но если суммарная доза способствует увеличению в периферической крови содержания TdT+-лимфоцитов, то длительность приема, наоборот, приводит к обратному эффекту падения содержания этих клеток в крови. Также двойное влияние оказывают суммарная доза РЧЭПО и длительность курса приема препарата на ранние тимоцитарные лимфоциты с маркером СД1а (p=0,00001). Однако при анализе данной модели показано, что суммарная доза отдельно не влияет на содержание в крови этих клеток (β=0,167, t=0,6, p=0,54), а длительность приема РЧЭПО оказывает значимое влияние на увеличение содержания в крови лимфоцитов СД1а (β=0,16, t=2,6, p=0,0054). Уменьшение содержания зрелых Т-лимфоцитов с маркером СД2 зависит от суммарной дозы (β=−1,19, t=2,99, p=0,0057) и от длительности приема препарата (β=0,88, t=2,2, p=0,036).

На другие субпопуляции мононуклеаров крови в данной выборке пациентов нам не удалось выявить влияния ни суточной дозы, ни длительности приема РЧЭПО.

В группе больных, получающих ГД от 2,5 до 5 лет, методом множественной нелинейной регрессии, проведенной с содержанием разных субпопуляций лимфоцитов в крови, было показано, что увеличение содержания в периферической крови тимических лимфоцитов с маркером СД1а зависит от суммарной дозы РЧЭПО и длительности приема (p=0,0001). Тем не менее, при проведении отдельного анализа составляющих статистической модели выявлено, что только длительное применение РЧЭПО оказывает достоверно значимое влияние на увеличение содержания этих клеток (β=1,002, t=4,00, p=0,00064), а суммарная доза введенного препарата достоверно не связана с количеством СД1а лимфоцитов (β=−0,22, t=0,88, p=0,39).

Влияние дозы и длительности приема оказываются вместе значимыми для повышения уровня в крови ранних TdT+-клеток (p=0,007), но оказалось, что влияние каждого из двух первых факторов в отдельности недостоверно: суммарная доза — β=0,34, t=1,09, p=0,28; длительность курса терапии — β=0,39, t=1,2, p=0,22. Аналогичные результаты получены и по отношению к ранним клеткам с маркерами СД25 (p=0,045) и СД71 (p=0,02) — 1) СД25: суммарная доза — β=0,18, t=0,48, p=0,63; длительность приема препарата — β=0,33, t=0,89, p=0,37; 2) СД71: суммарная доза — β=0,43, t=1,1, p=0,25; длительность приема препарата — β=0,14, t=0,38, p=0,7.

Таким образом, в данной группе больных (ГД-терапия от 2,5 до 5 лет) прослеживается ослабление влияния как суммарной дозы, так и длительности приема РЧЭПО на отдельные субпопуляции лимфоцитов крови.

По-видимому феномен ослабления влияния как суммарной дозы, так и длительности приема РЧЭПО на систему лимфопоэза можно объяснить нарастанием истощения лимфоидного ростка при длительном приеме РЧЭПО, так как чем больше увеличивается доза со временем приема, тем, по-видимому, быстрее наступает истощение компенсаторных возможностей системы лимфопоэза.

В группе больных, получающих ГД 5 лет и более, проведение анализа методом множественной нелинейной регрессии показало влияние суммарной дозы и длительности приема препарата на ранние тимоцитарные клетки СД1а (p=0,002) и лимфоидные предшественники TdT+-клетки (p=0,05). На повышение содержания лимфоцитов СД1а в крови влияет длительность приема препарата (β=0,69, t=2,65, p=0,01), но не оказывает воздействия другая составляющая этой модели — суммарная доза РЧЭПО (β=−0,067, t=0,25, p=0,8). На количество TdT+-клеток в крови в целом модель влияет (p=0,05), но по отдельным составляющим по-разному: длительность приема оказывает воздействие на снижение содержания этих клеток в крови (β=0,72, t=2,63, p=0,01), в то время как суммарная доза не оказывает никакого влияния (β=−0,15, t=0,56, p=0,57).

Следующим этапом работы было изучение взаимосвязи отдельных субпопуляций крови между собой методом множественной нелинейной регрессии под влиянием суммарной дозы РЧЭПО. В группе больных, получающих ГД от 1 до 2,5 лет, отмечается при возрастании дозы РЧЭПО увеличение TdT+-клеток (p=0,0003), которое приводит к возрастанию в крови лимфоцитов с маркером СД1а (p=0,002). Далее было показано, что увеличение суммарной дозы

РЧЭПО, вызывая увеличение ТдТ+-клеток (p=0,003), не оказывает существенного влияния на лимфоциты с маркером СД25 (p=0,08). В эту же модель (R=0,87; p<0,00001) не встраиваются лимфоциты с маркером СД4 (p=0,92) и СД8 (p=0,98).

В группе больных, получающих ГД от 2,5 до 5 лет, увеличение дозы препарата приводит к последовательному нарастанию содержания ТдТ+-клеток (p=0,003), СД25-лимфоцитов (p=0,004), но СД1а ранние лимфоциты не включаются (p=0,2) в эту модель (R=0,83, p=0,0003). В статистические модели цепной последовательной межклеточной реакции не могут встроиться клетки с маркером СД8 (p=0,22), а также быстропролиферирующие лимфоциты с маркером СД71 (p=0,2).

В выборке пациентов, получающих ГД более 5 лет, влияние увеличения суммарной дозы РЧЭПО также напоминает ситуацию в предыдущей группе, но последовательность самой реакции взаимодействия несколько отличается: на первое место выступают изменения СД1а-лимфоцитов (p=0,0002), СД25-лимфоциты (p=0,009), а также СД8-супрессоры (p=0,004), (R=0,76, p=0,013), далее реакция развивается с активацией лимфоцита СД25 (p=0,013), который с обратной закономерностью привлекает к активации ранние лимфоидные элементы ТдТ+-клетки (p= 0,02), (R=0,61, p=0,004) и, наконец, СД4-хелперы (p=0,057).

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные данные свидетельствуют о том, что суммарная доза РЧЭПО оказывает индивидуальное влияние на взаимосвязи между мононуклеарами крови у больных, получающих ГД-терапию на разных сроках. При этом было выявлено, что лимфоцит супрессор с маркером СД8 в группе больных, получающих ГД от 1 года до 2,5, никак не реагирует на введение ни разовой, ни суммарной дозы РЧЭПО (p>0,05), а в выборке пациентов, получающих ГД 5 лет и более, не взаимодействуют между собой и не реагируют на введение суммарной дозы РЧЭПО зрелые лимфоциты СД2 и СД8. Следовательно, как суммарная доза РЧЭПО, которую получают больные на разных сроках ГД-терапии, так и продолжительность введения препарата по-разному влияют на содержание лимфоцитов в крови и на их взаимодействие между собой.

Отсутствие взаимодействий между отдельными субпопуляциями под влиянием дозы РЧЭПО говорит в пользу того, что этих взаимодействий нет и нет никакого ответа на увеличение дозы препарата и продолжительности его введения больному.

При попытке моделировать взаимодействия разных субпопуляций между собой под влиянием РЧЭПО на разных сроках ГД-терапии показано, что влияние суммарной дозы на мононуклеары крови является очень индивидуальным и зависит от сроков ГД-терапии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, РЧЭПО является основным стимулом для дифференцировки и пролиферации эритроидных предшественников в костном мозге. Взаимодействие между эритроидными клетками и Т-лимфоцитами также может стимулировать эритропоэз. Кроме того, Т-лимфоциты и их продукты влияют на ранние эритроидные предшественники и, таким образом, взаимодействуют с эритропоэтином и контролируют эритропоэз.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Baj Z. Pokoca L., Majewska E. et al. T-lymphocyte subsets and NK cell cytotoxicity in chronic hemodialysis patients. The effect of recombinant human erythropoietin treatment // Arch. Immunol. Ther. Exp.—1992.—Vol. 40 .—P. 201—206.

2. Barber H.R. Immunobiology for the clinician.—N.Y.: J.Wiley and Sons,1977.

3. Bartunkova J., Fucikova T.,Sulkova S., Mareckova H. The effect of erythropoietin on lymphocyte and granulocyte functions in dialyzed patients // Cas. Lek. Cesk.—1989.—Vol. 14.—P. 1332—1335.

4.Graber S.E., Krantz S.B. Erythropoietin: biology and clinical use // Hematol. Oncol. Clin. North. Amer.—1989.—Vol. 3, № 3.—P. 369—400.

5. Hanley D.A., Takatsuki K., Sultan J. et al. Direct release of parathyroid fragments from functioning bovine parathyroid glands in vitro // J. Clin. Invest. 1978.—Vol. 62.—P. 1247—1250.

6. Imiela J., Korczak-Kowalska G., Malecki R. et al. Immunomodulatory action of human recombinant erythropoietin in man // Immunology Letter.—1993.—Vol. 35.—P. 271—276.

7. Praffl W., Gross H.—J., Neumeier D. et al. Lymphocyte subsets and delayed cutaneous hypersensitivity in hemodyalysis patients receiving recombinant human erythropoietin // Contr. Nephrol.—1988.—Vol. 66.—P. 195—204.

8. Sherwood J.B., Carmichael L.D., Goldwasser E.G. The heterogeneity of circulating human serum erythropoietin // Endocrinology.—1988.—Vol. 122, № 4.—P. 1472—1477.

9. Steffensen G., Aunsholt N.A. Does erythropoietin cause hormonal changes in haemodialysis patients? // Nephrol. Dial. Transplant.—1993.—Vol. 8, № 11.—P. 1215—1218.

10. Sulkova S., Bartunkova J., Krystufkova O. et al. The effect of rh EPO on humoral immune response in dialysis patients // Abstr. XXIXth Congress of the EDTA.—France, 1992.—P. 203.

11. Wilson W.E.,Kirkpatrick C.H., Taimage D.W. Suppression of immunologic responsiveness in uremia // Ann. Intern. Med.—1995.—Vol. 62.—P. 1—14.

12. Yang J.C.,Ricciardi S., Ciarletta A. et al. Expression cloning of a cDNA encoding a novel human hematopoietic growth factor: human homologue of murine T-cell growth factor // Blood.—1989.—Vol. 74.—P. 1880—1886.

Поступила в редакцию 22.12.98 г.