

УДК 616-092

## Прямые эффекты эритропоэтина на функциональные свойства макрофагальных клеток человека

Мелашченко О.Б., Меньяло М.Е., Мелашченко В.В., Газатова Н.Д., Гончаров А.Г., Селедцов В.И.

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта» Министерства образования и науки Российской Федерации. 236041, Калининград, ул. Александра Невского, д. 14

**Цель.** Исследовали прямые эффекты эритропоэтина (erythropoietin, Epo) на функциональную активность моноцитов/макрофагов (Мц/Мф) человека *in vitro*. **Методы.** Популяцию CD14<sup>+</sup> клеток получали из мононуклеарных клеток (МНК) крови человека методом позитивной магнитной колоночной сепарации. Мц/Мф культивировали без липополисахарида (ЛПС) или с ЛПС в течение 24 ч. Мембранную экспрессию CD14 (гликозилфосфатидилинозитол-связанный белок), CD16 (низкоафинный Fc-рецептор), CD119 (рецептор интерферона- $\gamma$ ), CD124 (рецептор интерлейкина-4) и CD197 (хемокиновый рецептор CCR7) оценивали методом проточной цитофлуорометрии. Содержание фактора некроза опухоли- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ), интерлейкина-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ), IL-6 и IL-10 в культуральных супернатантах определяли иммуноферментным методом. **Результаты.** Показано, что Epo достоверно снижал количество CD14<sup>+</sup>, CD124<sup>+</sup> и CD197<sup>+</sup> клеток, но не CD16<sup>+</sup> клеток среди неактивированных Мф. Epo также заметно уменьшал количество CD197<sup>+</sup> клеток, но не CD14<sup>+</sup>, CD124<sup>+</sup> и CD197<sup>+</sup> клеток, среди Мф, активированных ЛПС. Кроме того, Epo был способен умеренно усиливать продукцию интерлейкина-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ) и IL-6, неактивированными Мф и, наоборот, снижать продукцию этих цитокинов, осуществляемую активированными Мф. В то же время, Epo не оказывал существенного влияния на макрофагальную продукцию TNF- $\alpha$  и IL-10. **Заключение.** Направленность и выраженность регуляторных эффектов Epo на функции Мц/Мф зависят от активационного состояния этих клеток.

**Ключевые слова:** эритропоэтин, макрофаг, липополисахарид, цитокин, иммунорегуляция.

**Для цитирования:** Мелашченко О.Б., Меньяло М.Е., Мелашченко В.В., Газатова Н.Д., Гончаров А.Г., Селедцов В.И. Прямые эффекты эритропоэтина на функциональные свойства макрофагальных клеток человека. Патогенез. 2018; 16(1): 26—33

DOI: 10.25557/2310-0435.2018.01.26-33

**Для корреспонденции:** Селедцов Виктор Иванович, e-mail: seledtsov@rambler.ru

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке в рамках госзадания Минобрнауки РФ № 20.5562.2017/8.9.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Поступила:** 19.12.2017

## Directs effects of erythropoietin on functional properties of human monocytes/macrophages

Melashchenko O.B., Meniailo M.E., Malashchenko V.V., Gazatova N.D., Goncharov A.G., Seledtsov V.I.

Immanuel Kant Baltic Federal University, A. Nevskogo Str. 14, Kaliningrad 236041, Russian Federation

**Aim.** We studied direct effects of erythropoietin (Epo) on the function of human monocytes/macrophages (Mc/Mphs) *in vitro*. **Methods.** CD14-positive cells were isolated from human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) by positive magnetic separation. Mc/Mphs were cultured without or with lipopolysaccharide (LPS) for 24 hours. Membrane expression of CD14 (membrane glycosylphosphatidylinositol-bound protein), CD16 (low-affinity Fc receptor), CD119 (interferon- $\gamma$  receptor), CD124 (interleukin-4 receptor), and CD197 (chemokine receptor CCR7) was evaluated by flow cytometry. The content of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6 and IL-10 in culture supernatants was determined by the enzyme immunoassay. **Results.** Epo was found to significantly reduce the amount of CD14<sup>+</sup>, CD124<sup>+</sup> and CD197<sup>+</sup> cells, but not CD16<sup>+</sup> and CD119<sup>+</sup> cells, among non-activated Mphs. Epo also detectably reduced the content of CD197<sup>+</sup> cells, but not CD14<sup>+</sup>, CD124<sup>+</sup> and CD197<sup>+</sup> cells, among LPS-activated Mphs. In addition, Epo was able to moderately increase the production of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and IL-6 by non-activated Mphs and, vice versa, to reduce the production of these cytokines by activated Mphs. At the same time, Epo did not significantly affect the Mph production of TNF- $\alpha$  and IL-10. **Conclusion.** Direction and intensity of regulatory effects of Epo on Mphs functions depend on the activation status of these cells.

**Keywords:** erythropoietin, macrophage, lipopolysaccharide, cytokine, immunoregulation.

**For citation:** Melashchenko O.B., Meniailo M.E., Malashchenko V.V., Gazatova N.D., Goncharov A.G., Seledtsov V.I. [Directs effects of erythropoietin on functional properties of human monocytes/macrophages] Pathogenesis [Pathogenesis]. 2018; 16(1): 26—33 (In Russian).

DOI: 10.25557/2310-0435.2018.01.26-33

**For correspondence:** Seledtsov Victor Ivanovich, e-mail: seledtsov@rambler.ru

**Funding.** The work was supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation No. 20.5562.2017 / 8.9.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Received:** 19.12.2017

## Введение

Эритропоэтин (Еро) — гемопоэтин с молекулярной массой 34 кДа, играющий основополагающую роль в поддержании эритропоэза [1]. Еро в основном продуцируется интерстициальными фибробластами почек и перисинусоидальными клетками печени [2]. В ответ на гипоксию продуцировать Еро в умеренных количествах способны клетки разных органов и тканей организма [3]. Реализацию своих эритропоэтических функций Еро осуществляет посредством связывания со специфическим мембранным мономерным рецептором (ЕроR) [4]. В отличие от мономерного эритроидного ЕроR, рецептор Еро, экспрессирующийся на незритроидных клетках, представляет собой димер, состоящий из мономерного ЕроR ( $\alpha$ -цепь) и  $\beta$ -цепи, является общей для рецепторов IL-3, IL-5 и гранулоцит-макрофагального фактора (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-SCF) [5]. После взаимодействия Еро с ЕроR происходит активация янус киназы 2 (JAK2), которая фосфорилирует множественные остатки тирозина в цитоплазматическом домене ЕроR и связанные с ним внутриклеточные сигнальные молекулы [6]. Эти взаимодействия поддерживают клеточную жизнеспособность и антиапоптотические процессы в клетке [7, 8]. Мембранная экспрессия ЕроR выявлена не только на эритроидных клетках, но также на эндотелиальных клетках, мегакариоцитах, нейронах [9]. В условиях тканевой ишемии показан тканепротективный эффект на сердечную мышцу [10], на ткань почки [11] и нервную ткань [12]. Также установлено, что Еро стимулирует процесс заживления ран [13].

Широкий спектр клеточных продуцентов Еро и повсеместная распространенность ЕроR в тканях организма подразумевают его вовлеченность в метаболические тканевые процессы, непосредственно не связанные с центральным гемопозом. Иммунная система не является исключением в этом отношении. Экспрессия ЕроR обнаружена на моноцитах/макрофагах (Мц/Мф), дендритных клетках и лимфоцитах [9, 14]. Важно, что активированные Мф способны негативно влиять на эритропоэз за счет продукции провоспалительных цитокинов, таких, как фактор некроза опухоли- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) и интерлейкин-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ) [15].

В литературе описаны как про- так и противовоспалительные эффекты Еро [16, 17]. Показаны как иммуностимулирующие [18], так и иммуносупрессивные свойства этого цитокина [19]. В разных экспериментальных моделях показано, что экзогенный Еро способен ослаблять аутоиммунное воспаление [18, 20]. Есть основания полагать, что макрофагальные клетки, экспрессирующие ЕроR и чувствительные к действию Еро, являются важными элементами в механизме действия Еро, как на врожденный, так и на адаптивный иммунитет. В этой работе мы исследовали прямые эффекты Еро на функциональную активность Мц/Мф, выделенных из крови здоровых доноров и показали их зависимость от активационного состояния макрофагальных клеток.

## Материалы и методы

Материалом для исследования служила венозная гепаринизированная кровь (20 мл), взятая стандартным методом из локтевой вены 11 условно здоровых доноров (мужчин и женщин в возрасте от 21 до 40 лет) с помощью стандартных вакуумных систем «BD Vacutainer™» («Greiner-bio-one», Австрия). Все доноры подписывали информированное согласие.

**Выделение Мц/Мф.** Мононуклеарные клетки (МНК) выделяли из крови посредством центрифугирования в градиенте плотности фиколл-урографин (Ficoll-Paque™ Premium sterile solution, GE Healthcare, США), плотность  $1,077 \pm 0,001$  g/ml). Подсчет клеток проводили на счетчике клеток Z2 (Beckman Coulter, США). CD14<sup>+</sup> клетки выделяли из взвеси МНК методом позитивной магнитной колоночной сепарации (MS Columns, Miltenyi Biotec, Германия) с использованием суперпарамагнитных частиц, конъюгированных с антителами к молекуле CD14 (MicroBeads, Miltenyi Biotec, Германия), согласно инструкции производителя. Чистоту и жизнеспособность CD14<sup>+</sup> клеток оценивали на проточном цитофлуориметре (Accuri C6, BD Biosciences, США) с использованием анти-CD14 антител, конъюгированных с PerCP (eBioscience, США) и раствора пропидиум иодида (PI) (eBioscience, США).

**Культивирование клеток.** Выделенные CD14<sup>+</sup> клетки культивировали 24 часа в бессывороточной среде TechMACS (Miltenyi Biotec) в 24-луночных планшетах в концентрации  $1,0-1,5 \times 10^6$  кл/мл. В качестве активатора использовали бактериальный ЛПС из *Salmonella typhi* (Пирогенал, МЕДГАМАЛ ФНИЦЭМ им. Н.Ф. ГАМАЛЕИ, Россия) в концентрации 1 мкг/мл. Рекомбинантный Еро человека (Эпокрин, Россия) добавляли в клеточные пробы в концентрации 0.1; 1.0; или 10.0 MU/ml в начале культивирования.

**Проточная цитофлуориметрия.** Экспрессию мембранных молекул оценивали методом проточной цитофлуориметрии с использованием коктейля антител, конъюгированных с флуоресцентными метками: CD14-PerCP (eBioscience, США), CD16-FITC, CD119-PE, CD124-APC и CD197-AF488 (BioLegend, США). Настройку цветовой компенсации проводили с помощью одноцветных контролей. Для выставления границ зоны позитива и учета неспецифического связывания использовали неокрашенный контроль и FMO-контроль. Уровень неспецифического фонового сигнала учитывали с помощью изотип контролей (Iso IgG2a,  $\kappa$  — APC, PE, AF488 и Iso IgG1,  $\kappa$  — FITC, PE, BioLegend, США).

**Иммуноферментный анализ.** Концентрации IL-10, IL-6, IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$  в культуральных супернатантах определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческих тест-систем (Вектор Бест, Россия). Анализ осуществляли на автоматическом иммуноферментном анализаторе (ChemWell 2910, Awareness Technology Inc., США).

**Статистика.** Статистическую обработку данных проводили с помощью программы IBM SPSS Statistics 20 (Statistical Package for the Social Sciences, США). Полученные результаты оценивали методами статистического описания и проверки статистических гипотез. Анализировали выборку с помощью гипотезы нормальности распределения (Колмогорова—Смирнова). В качестве средневывборочной характеристики использовали медиану (Me), первый и третий квартили (Q1; Q3). Для оценки статистической достоверности исследуемых выборок использовали непараметрический критерий Вилкоксона для зависимых выборок, не подчиняющихся нормальному закону распределения. Различия считались значимыми при уровне  $p < 0,05$ .

### Результаты исследования

На рис. 1 представлена использованная нами стратегия гейтирования, которая позволяла идентифицировать CD14<sup>+</sup>, а также CD16<sup>+</sup>, CD119<sup>+</sup>, CD124<sup>+</sup> и CD197<sup>+</sup> клетки среди Мц/Мф.

Чистота выделенных из МНК CD14<sup>+</sup> клеток составила 97,9 (93,6; 99,2)%, их исходная жизнеспособность составляла 95,4 (94,0; 99,5)%. Инкубация 24 часа способствовала снижению, как общего количества клеток, так и их жизнеспособности примерно на 10% (данные не показаны).

CD14 — гликозилфосфатидилинозитол-связанный белок, экспрессируется на макрофагах, действует как ко-рецептор для бактериального ЛПС [21]. Мы нашли, что Еро в двух концентрациях (1.0 и 10.0 MU/ml) снижал содержание CD14-позитивных клеток среди прокультивированных 24 ч неактивированных Мц/Мф (табл. 1, рис. 2). CD16 является низкоафинным Fc-рецептором, который обеспечивает вовлечение иммунокомпетентных клеток в процесс антителозависимой цитотоксичности [22]. Как показано в табл. 1, Еро не оказывал существенного влияния на экспрессию CD16, выявляемую на неактивированных Мф.

CD119 является рецептором к интерферону- $\gamma$  (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ ), который при взаимодействии с соответствующим лигандом запускает механизм классической,

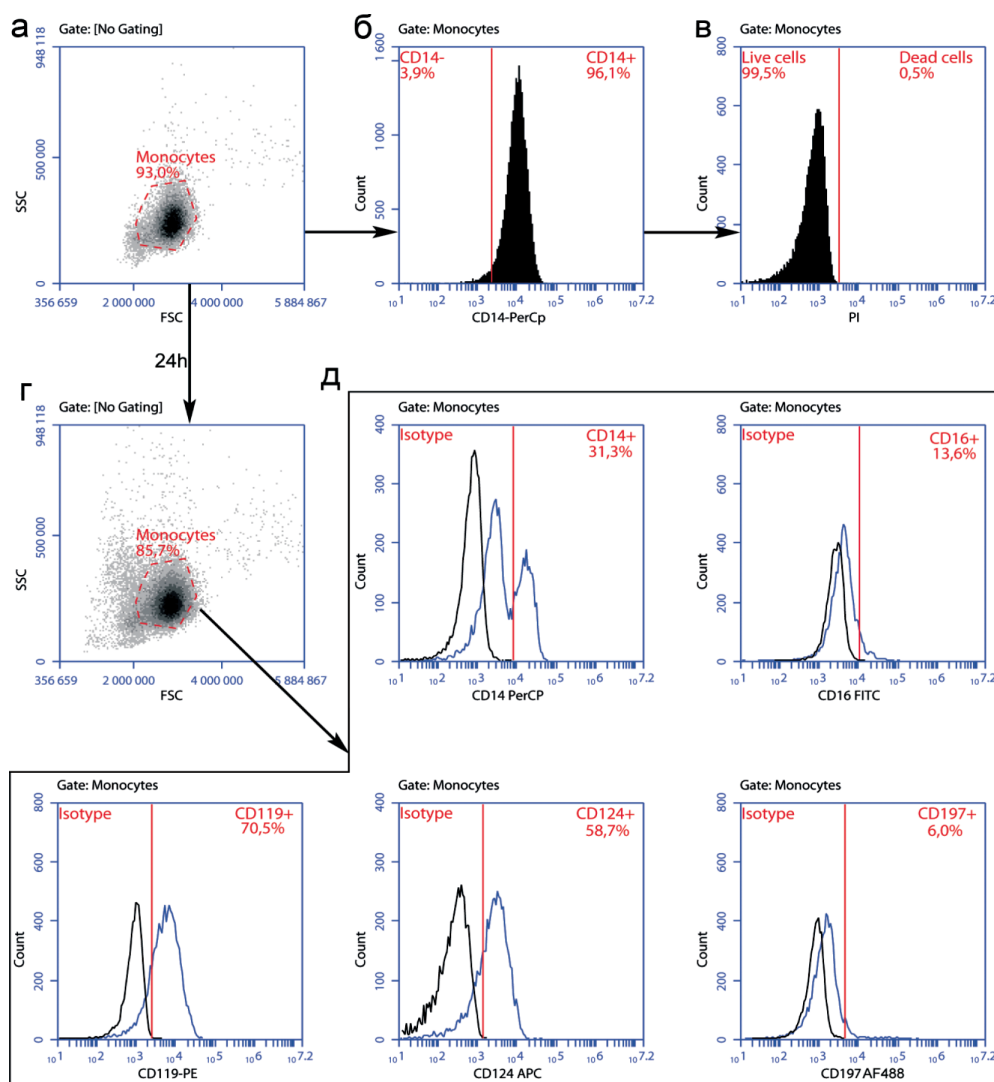


Рис. 1. Алгоритм цитометрического анализа моноцитов/макрофагов при определении их фенотипа:

а — распределение клеток по прямому (FSC) и боковому (SSC) светорассеянию до инкубации; б — содержание CD14<sup>+</sup> клеток до инкубации; в — жизнеспособность клеток, определяемая по окрашиванию PI: зона позитива — мертвые, зона негатива — живые; г — распределение клеток по прямому (FSC) и боковому (SSC) светорассеянию после инкубации 24 часа; д — содержание CD14<sup>+</sup> клеток; содержание CD16<sup>+</sup> клеток; содержание CD119<sup>+</sup> клеток; содержание CD124<sup>+</sup> клеток; содержание CD197<sup>+</sup> клеток/

провоспалительной (M1) активации Мц/Мф [23]. Согласно данным, представленным в табл. 1, Еро не оказывал существенного влияния на экспрессию CD119 на неактивированных Мф.

CD124 относится к 1 типу рецепторов IL-4. Связывание этого рецептора с соответствующим лигандом способствует M2 альтернативной активации Мф, которая ослабляет их воспалительную активность [24]. Полученные нами данные указывают на способность Еро заметно снижать содержание CD124<sup>+</sup> клеток среди неактивированных Мф (табл. 1, рис. 2).

CD197 (CCR7) является рецептором двух лигандов хемокинов группы С-С, которые выделяются стромальными клетками Т-зон лимфатических узлов. Связывание этих хемокинов с CCR7 на Мц/Мф стимулирует их миграцию в Т-зависимые зоны лимфоидных органов, где эти клетки активно вовлекаются в адаптивный иммуногенез [25]. Как показано в табл. 1 и на рис. 2, Еро был способен заметно снижать содержание CD197<sup>+</sup> клеток среди неактивированных Мф.

Согласно полученным данным, активация Мц/Мф ЛПС не оказывала существенного влияния на содержание CD16<sup>+</sup> и CD119<sup>+</sup> клеток, но приводила к снижению относительного количества CD14<sup>+</sup> (с 27,3 (11,2; 38,4) до 10,1 (8,4; 20,3),  $p < 0,05$ ) и CD124<sup>+</sup> клеток (с 52,1 (44,6; 62,8) до 46,8 (45,2; 55,8),  $p < 0,05$ ) и повышала содержание CD197<sup>+</sup> (с 6,2 (2,0; 10,9) до 7,9 (4,2; 12,1),  $p < 0,05$ ). Как показано в табл. 2, Еро снижал содержание CD197<sup>+</sup> клеток среди активированных Мф, не оказывая существенного влияния на экспрессию всех других исследованных маркеров.

В последующих экспериментах мы оценили влияние Еро на макрофагальную продукцию TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 и IL-10. TNF- $\alpha$  — провоспалительный фактор, который играет чрезвычайно важную роль в развитии противомикробных и аутоиммунных реакций. IL-1 $\beta$  обладает не только провоспалительной, но и лейкопоэз-стимулирующей активностью [26]. IL-6 — медиатор острой фазы воспаления [27]. IL-10 является противовоспалительным медиатором, обладающим иммуносупрессорной активностью [28]. Согласно данным, представленным в табл. 3, культивирование Мц/Мф в присутствии Еро (10,0 МУ/мл) заметно усиливало секрецию ими IL-1 $\beta$  и IL-6, но не на TNF- $\alpha$  и IL-10.

Вызываемая ЛПС активация Мц/Мф приводила к выраженному кратному увеличению секреции всех исследованных цитокинов. Как показано в табл. 4, Еро был способен снижать осуществляемую активированными макрофагами продукцию IL-1 $\beta$ , IL-6, в меньшей степени — IL-10, но не TNF- $\alpha$ .

### Обсуждение

Как и гранулоциты, Мф обладают высокой фагоцитарной активностью. В сравнении с гранулоцитами, Мф являются более долгоживущими. Они сами способны презентировать антигенные пептиды Т-клеткам, а также дифференцироваться в антиген-презентирующие дендритные клетки. Таким образом, Мф представляет собой ключевой элемент, связующий механизмы врожденного и адаптивного иммунитета.

Таблица 1

Содержание CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup>, CD119<sup>+</sup>, CD124<sup>+</sup>, CD197<sup>+</sup> (%) клеток среди неактивированных Мф

Маркер	Еро (МУ/ml)			
	0,0	0,1	1,0	10,0
CD14	27,3 (11,2-38,4)	26,5 (10,1-35,3)	<b>21,6 (6,8-34,0) *</b>	<b>14,8 (11,9-35,1) *</b>
CD16	12,8 (5,2-21,8)	11,8 (4,4-24,9)	10,5 (4,2-26,8)	14,0 (5,2-23,9)
CD119	78,5 (77,7-82,3)	77,2 (76,0-79,7)	78,3 (74,8-81,8)	74,3 (69,0-81,9)
CD124	52,1 (44,6-62,8)	49,3 (44,6-63,7)	<b>48,6 (43,6-57,8) *</b>	<b>50,6 (41,1-57,3) *</b>
CD197	6,2 (2,0-10,9)	<b>5,2* (1,6-9,5)</b>	<b>4,6 (1,4-8,6) *</b>	5,7 (1,9-11,7)

Примечание. Здесь и далее данные представлены в виде Ме (Q1; Q3); \* —  $p < 0,05$  в сравнении с клетками, культивированными без Еро, выделено жирным шрифтом.

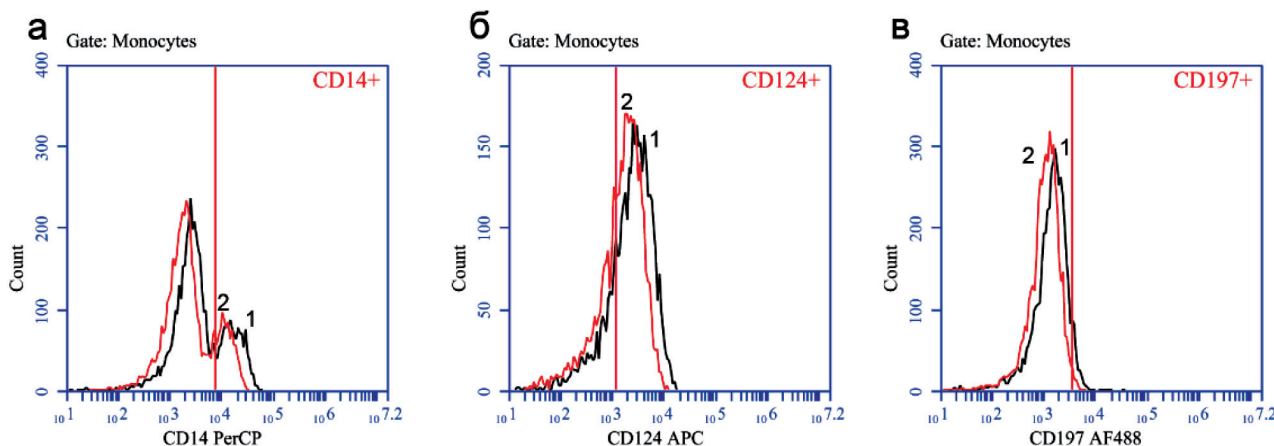


Рис. 2. Содержание CD14<sup>+</sup> (а), CD124<sup>+</sup> (б) и CD197<sup>+</sup> (в) клеток среди неактивированных Мц/Мф. 1 — Мц/Мф, культивированные без Еро; 2 — Мц/Мф, культивированные с Еро (1 МУ/мл).



Еро играет чрезвычайно важную роль в адаптации организма к изменяющимся условиям внешней среды. Кровотечение или другие факторы, приводящие к гипоксии тканей, стимулируют продукции Еро. Еро-плейотропный цитокин обладает как гемопоэтической, так и негемопоэтической активностью [29]. Адаптивные эффекты Еро напрямую затрагивают иммунную систему.

Ранее мы [30] и другие авторы [31] показали способность Еро прямо супрессировать провоспалительные реакции Т-лимфоцитов. Убедительно показано свойство Еро супрессировать опосредуемые патогенными Т-клетками аутоиммунные реакции [31]. Вместе с тем, имеются данные о позитивном влиянии Еро на адаптивный антителогенез [32, 33]. Также описаны провоспалительные эффекты Еро, связанные с усилением активности фермента NO-оксидазы и стимуляции продукции TNF $\alpha$  [16, 34]. Показана способность Еро поддерживать дифференцировки Мф в зрелые дендритические клетки [35]. Согласно данным, представленным в нашей статье, Еро способен снижать экспрессию CD14, CD124 и CD197, но не CD16, на неактивированных Мф и только CD197 на активированных Мф. Эти данные, по-видимому, отражают тенденцию снижения чувствительности прокультивированных с Еро макрофагальных клеток к действию иммуноактивных молекул. Таким образом, Еро мог бы сдержи-

вать вовлечение макрофагальных клеток в адаптивный иммуногенез и в целом увеличивать порог чувствительности иммунной системы к влиянию антигенного микроокружения. С другой стороны, в наших экспериментах Еро умеренно стимулировал осуществляемую неактивированными Мф продукцию провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$  и IL-6. Возможно, этот эффект Еро направлен на создание цитокинового микроокружения (фона), необходимого для своевременного развития иммунных реакций, индуцируемых иммуногенными антигенными воздействиями. В то же время, продемонстрированный в нашем исследовании негативный эффект Еро на продукцию провоспалительных цитокинов активированными Мф, вместе с данными, предполагающими негативное влияние Еро на миграционную активность Мф, указывает на вовлеченность Еро в негативную регуляцию иммуногенеза, которая может быть направлена на предотвращение развития избыточных тканедеструктивных иммунных реакций. Эти результаты в полной мере согласуются с данными, указывающими на способность Еро супрессировать активность NF- $\kappa$ B в активированных Мф [19]. Интересно, что в наших экспериментах Еро прямо не влиял на макрофагальную продукцию TNF- $\alpha$ . Отсюда можно предположить, что ранее описанные эффекты Еро на продук-

Таблица 2

**Содержание CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup>, CD119<sup>+</sup>, CD124<sup>+</sup>, CD197<sup>+</sup> (%) клеток среди активированных Мф**

Маркер	Еро (МУ/ml)			
	0,0	0,1	1,0	10,0
CD14	10,1 (8,4; 20,3)	15,3 (7,5; 24,0)	14,3 (7,5; 25,8)	15,8 (7,6; 21,1)
CD16	12,9 (5,6; 20,7)	11,5 (4,2; 24,1)	11,3 (3,9; 20,4)	11,7 (4,7; 41,1)
CD119	74,9 (59,2; 83,0)	77,4 (69,0; 83,4)	76,9 (70,2; 82,4)	75,2 (68,9; 83,0)
CD124	46,8 (45,2; 55,8)	47,8 (44,8; 58,6)	47,1 (44,6; 58,3)	54,0 (45,4; 60,8)
CD197	7,9 (4,2; 12,1)	<b>6,6 (3,9; 11,2) *</b>	<b>6,2 (3,5; 10,8) *</b>	<b>7,2 (4,0; 11,1) *</b>

Примечание. \* —  $p < 0,05$  в сравнении с клетками, активированными ЛПС в отсутствие Еро, выделено жирным шрифтом.

Таблица 3

**Продукция цитокинов (пг/мл) неактивированными макрофагальными клетками**

Цитокин	Без Еро	С Еро (10.0 МУ/мл)
TNF- $\alpha$	18,2 (0,0; 160,1)	29,8 (0,0; 523,3)
IL-1 $\beta$	48,9 (0,0; 198,6)	<b>70,2 (0,0; 150,0) *</b>
IL-6	48,0 (9,0; 437,6)	<b>94,5 (20,0; 882,0) *</b>
IL-10	<10,0	<10,0

Примечание. \* —  $p < 0,05$  в сравнении с неактивированными клетками, без добавления Еро, выделено жирным шрифтом.

Таблица 4

**Продукция цитокинов (пг/мл) активированными макрофагальными клетками**

Цитокин	Еро (МУ/ml)			
	0,0	0,1	1,0	10,0
TNF- $\alpha$	1255,8 (928,4; 1798,5)	1157,0 (693,5; 1696,4)	1431,4 (823,1; 1928,2)	1411,8 (754,6; 1981,5)
IL-1b	474,6 (370,8; 621,0)	455,7 (319,2; 592,8)	<b>342,6 (257,4; 636,6) *</b>	<b>426,6 (293,4; 555,6) *</b>
IL-6	12097 (9939; 17697)	13000 (9532; 14393)	<b>11500 (6486; 13231) *</b>	<b>10666 (5547; 11657) *</b>
IL-10	131,4 (114,6; 229,2)	139,8 (75,0; 196,8)	148,2 (108,0; 170,4)	<b>109,2 (100,8; 177,3) *</b>

Примечание. \* —  $p < 0,05$  в сравнении с клетками, активированными ЛПС в отсутствие Еро, выделено жирным шрифтом.

цию TNF- $\alpha$  [16, 19, 30] были, скорее всего, опосредованными. В целом, полученные нами данные указывают то, что направленность и выраженность эффектов Еро на функциональную активность Мф могут зависеть от активационного состояния этих клеток.

В настоящее время складывается консенсус по целесообразности применения Еро в лечении аутоиммунных расстройств. Наиболее эффективным его использование представляется в период обострения заболевания. В пользу этого указывают следующие данные. Во-первых Еро способен прямо снижать активность патогенных Т-клеток; во-вторых, Еро может негативно влиять на миграционную и цитокин-продуцирующую активность активированных Мф; в третьих, Еро улучшает клиренс апоптотического материала, и, тем самым, снижает аутоантигенную стимуляцию иммунной системы [32]; в четвертых, Еро обладает выраженным ткане(cito)протективным эффектом, то есть он обладает антиапоптотической активностью и стимулирует регенерацию поврежденных органов и тканей; и, наконец, в пятых, Еро стимулирует эритропоэз и тем самым противодействует развитию анемии, которая является неизбежным спутником хронических воспалительных процессов.

#### Список литературы

1. Jelkmann W. Molecular biology of erythropoietin. *Intern. Med.* 2004; 43(8): 649-659.
2. Ifeanyi O.E. A review on Erythropoietin. *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci.* 2015; 2(4): 35-47.
3. Tamura T., Aoyama M., Ukai S., Kakita H., Sobue K., Asai K. Neuroprotective erythropoietin attenuates microglial activation, including morphological changes, phagocytosis, and cytokine production. *Brain Res.* 2017; 1662: 65-74. DOI:10.1016/j.brainres.2017.02.023
4. Brines M., Grasso G., Fiordaliso F., Sfacteria A., Ghezzi P., Fratelli M., Latini R., Xie Q.W., Smart J., Su-Rick C.J., Pobre E., Diaz D., Gomez D., Hand C., Coleman T., Cerami A. Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common  $\beta$ -subunit heteroreceptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004; 101(41): 14907-14912. DOI: 10.1073/pnas.0406491101
5. Nairz M., Sonnweber T., Schroll A., Theurl I., Weiss G. The pleiotropic effects of erythropoietin in infection and inflammation. *Microbes Infect.* 2012; 14(3): 238-246. DOI: 10.1016/j.micinf.2011.10.005
6. Ueda F., Tago K., Tamura H., Funakoshi-Tago M. Three tyrosine residues in the erythropoietin receptor are essential for janus kinase 2 V617F mutant-induced tumorigenesis. *J. Biol. Chem.* 2017; 292(5): 1826-1846. DOI: 0.1074/jbc.M116.749465
7. Solling C. Organ-protective and immunomodulatory effects of erythropoietin-an update on recent clinical trials. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2012; 110(2): 113-121. DOI: 10.1111/j.1742-7843.2011.00820.x
8. Watanabe M., Lundgren T., Saito Y., Cerami A., Brines M., Ostenson C.G., Kumagai-Braesch M. A nonhematopoietic erythropoietin analogue, ARA 290, inhibits macrophage activation and prevents damage to transplanted islets. *Transplantation.* 2016; 100(3): 55462. DOI: 10.1097/TP.0000000000001026
9. Lisowska K.A., Bryl E., Witkowski J.M. Erythropoietin receptor is detectable on peripheral blood lymphocytes and its expression increases in activated T lymphocytes. *Haematologica.* 2011; 96(3): 12-13. DOI: 10.3324/haematol.2010.038414
10. Arcasoy M.O. The non-haematopoietic biological effects of erythropoietin. *Br. J. Haematol.* 2008; 141(1): 14-31. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2008.07014.x
11. Chen X., Wang C.C., Song S.M., Wei S.Y., Li J.S., Zhao S.L., Li B. The administration of erythropoietin attenuates kidney injury induced by ischemia/reperfusion with increased activation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *J. Formos. Med. Assoc.* 2015; 114(5): 430-437. DOI: 10.1016/j.jfma.2015.01.007
12. Siren A.L., Fratelli M., Brines M., Goemans C., Casagrande S., Lewczuk P., Keenan S., Gleiter C., Pasquali C., Capobianco A., Mennini T., Heumann R., Cerami A., Ehrenreich H., Ghez-

zi P. Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001; 98(7): 4044-4049. DOI: 10.1073/pnas.051606598

13. Haroon Z.A., Amin K., Jiang X., Arcasoy M.O. A novel role for erythropoietin during fibrin-induced wound-healing response. *Am. J. Pathol.* 2003; 163(3): 993-1000. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)63459-1

14. Lifshitz L., Tabak G., Gassmann M., Mittelman M., Neumann D. Macrophages as novel target cells for erythropoietin. *Haematologica.* 2010; 95(11): 1823-1831. DOI: 10.3324/haematol.2010.025015

15. Jelkmann W.E., Fandrey J., Frede S., Pagel, H. Inhibition of erythropoietin production by cytokines. *Ann. NY Acad. Sci.* 1994; 718(1): 300-311.

16. Poulsen T.D., Andersen L.W., Steinbruchel D., Gotze J.P., Jorgensen O.S., Olsen N.V. Two large preoperative doses of erythropoietin do not reduce the systemic inflammatory response to cardiac surgery. *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* 2009; 23(3): 316-323. DOI: 10.1053/j.jvca.2008.08.018

17. Pesce M., Felaco P., Franceschelli S., Speranza L., Grilli A., De Lutiis M.A., Ferrone A., Siroli V., Bonomini M., Felaco M., Patruno, A. Effect of erythropoietin on primed leucocyte expression profile. *Open Biol.* 2014; 4(6): 140026. DOI: 10.1098/rsob.140026

18. Nairz M., Sonnweber T., Schroll A., Theurl I., Weiss G. The pleiotropic effects of erythropoietin in infection and inflammation. *Microbes Infect.* 2012; 14(3): 238-246. DOI: 10.1016/j.micinf.2011.10.005

19. Yuan R., Maeda Y., Li W., Lu W., Cook S., Dowling P. Erythropoietin: a potent inducer of peripheral immuno/inflammatory modulation in autoimmune EAE. *PLoS One.* 2008; 3(4): e1924. DOI: 10.1371/journal.pone.0001924

20. Moransard M., Bednar M., Frei K., Gassmann M., Ogunshola O.O. Erythropoietin reduces experimental autoimmune encephalomyelitis severity via neuroprotective mechanisms. *J. Neuroinflammation.* 2017; 14(1): 202. DOI: 10.1186/s12974-017-0976-5

21. Kitchens R.L. Role of CD14 in cellular recognition of bacterial lipopolysaccharides. *Chem. Immunol.* 2000; 74: 61-82. PMID:10608082

22. Yeap W.H., Wong K.L., Shimasaki N., Teo E.C., Quek J.K., Yong H.X., Diong C.P., Bertoletti A., Linn Y.C., Wong S.C. CD16 is indispensable for antibody-dependent cellular cytotoxicity by human monocytes. *Sci. Rep.* 2016; 6: 34310. DOI: 10.1038/srep34310

23. Martinez F.O., Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000prime Rep.* 2014; 6: 13. DOI: 10.12703/P6-13

24. Nelms K., Keegan A.D., Zamorano J., Ryan J.J., Paul W.E. The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annu. Rev. Immunol.* 1999; 17(1): 701-738. DOI: 10.1146/annurev.immunol.17.1.701

25. Forster R., Davalos-Misslitz A.C., Rot A. CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* 2008; 8(5): 362-371. DOI: 10.1038/nri2297

26. Saperstein S., Chen L., Oakes D., Pryhuber G., Finkelstein J. IL-1 $\beta$  augments TNF- $\alpha$ -mediated inflammatory responses from lung epithelial cells. *J. Interferon. Cytokine. Res.* 2009; 29(5): 273-284. DOI: 10.1089/jir.2008.0076

27. Scheller J., Chalaris A., Schmidt-Arras D., Rose-John S. The pro-and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim. Biophys. Acta.* 2011; 1813(5): 878-888. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2011.01.034

28. Couper K.N., Blount D.G., Riley E.M. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J. Immunol.* 2008; 180(9): 5771-5777. PMID:18424693

29. Korzeniewski S.J., Pappas A. Endogenous erythropoietin. *Vitam. Horm.* 2017; 105: 39-56. DOI: 10.1016/bs.vh.2017.03.003

30. Todosenko N.M., Shmarov V.A., Malashchenko V.V., Menailo M.E., Melashchenko O.B., Gazatova N.D., Goncharov A.G., Seledtsov V.I. Erythropoietin exerts direct immunomodulatory effects on the cytokine production by activated human T-lymphocytes. *Int. Immunopharmacol.* 2016; 36: 277-281. DOI: 10.1016/j.intimp.2016.05.006

31. Wood M.A., Goldman N., DePierri K., Somerville J., Riggs J.E. Erythropoietin increases macrophage-mediated T cell suppression. *Cell. Immunol.* 2016; 306: 17-24. DOI: 10.1016/j.celimm.2016.05.004

32. Liu Y., Luo B., Han F., Li X., Xiong J., Jiang M., Yang X., Wu Y., Zhang Z. Erythropoietin-derived nonerythropoietic peptide

ameliorates experimental autoimmune neuritis by inflammation suppression and tissue protection. *PLoS One*. 2014; 9(3): e90942. DOI: 10.1371/journal.pone.0090942

33. Nagashima T., Yokohama A., Nagai K., Kasamatsu T., Gotoh N., Iriuchishima H., Sekigami T., Saitoh T., Handa H., Tsukamoto N., Murakami H. Short-term administration of recombinant human erythropoietin decreases B cell number in human peripheral blood. *Transfus. Apher. Sci.* 2018; [Epub ahead of print]. DOI: 10.1016/j.transci.2018.01.009

34. Toba H., Kojima Y., Wang J., Noda K., Tian W., Kobara M., Nakata, T. Erythropoietin attenuated vascular dysfunction and inflammation by inhibiting NADPH oxidase-derived superoxide production in nitric oxide synthase-inhibited hypertensive rat aorta. *E. J. Pharmacol.* 2012; 691(1-3): 190-197. DOI: 10.1016/j.ejphar.2012.07.018

35. Rocchetta F., Solini S., Mister M., Mele C., Cassis P., Norris M., Remuzzi G., Aiello S. Erythropoietin enhances immunostimulatory properties of immature dendritic cells. *Clin. Exp. Immunol.* 2011; 165(2): 202-210. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2011.04417.x

## References

1. Jelkmann W. Molecular biology of erythropoietin. *Intern. Med.* 2004; 43(8): 649-659.

2. Ifeanyi O.E. A review on Erythropoietin. *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci.* 2015; 2(4): 35-47.

3. Tamura T., Aoyama M., Ukai S., Kakita H., Sobue K., Asai K. Neuroprotective erythropoietin attenuates microglial activation, including morphological changes, phagocytosis, and cytokine production. *Brain Res.* 2017; 1662: 65-74. DOI:10.1016/j.brainres.2017.02.023

4. Brines M., Grasso G., Fiordaliso F., Sfacteria A., Ghezzi P., Fratelli M., Latini R., Xie Q.W., Smart J., Su-Rick C.J., Pobre E., Diaz D., Gomez D., Hand C., Coleman T., Cerami A. Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common  $\beta$ -subunit heteroreceptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004; 101(41): 14907-14912. DOI: 10.1073/pnas.0406491101

5. Nairz M., Sonnweber T., Schroll A., Theurl I., Weiss G. The pleiotropic effects of erythropoietin in infection and inflammation. *Microbes Infect.* 2012; 14(3): 238-246. DOI: 10.1016/j.micinf.2011.10.005

6. Ueda F., Tago K., Tamura H., Funakoshi-Tago M. Three tyrosine residues in the erythropoietin receptor are essential for janus kinase 2 V617F mutant-induced tumorigenesis. *J. Biol. Chem.* 2017; 292(5): 1826-1846. DOI: 0.1074/jbc.M116.749465

7. Solling C. Organ-protective and immunomodulatory effects of erythropoietin—an update on recent clinical trials. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2012; 110(2): 113-121. DOI: 10.1111/j.1742-7843.2011.00820.x

8. Watanabe M., Lundgren T., Saito Y., Cerami A., Brines M., Ostenson C.G., Kumagai-Braesch M. A nonhematopoietic erythropoietin analogue, ARA 290, inhibits macrophage activation and prevents damage to transplanted islets. *Transplantation.* 2016; 100(3): 554-62. DOI: 10.1097/TP.0000000000001026

9. Lisowska K.A., Bryl E., Witkowski J.M. Erythropoietin receptor is detectable on peripheral blood lymphocytes and its expression increases in activated T lymphocytes. *Haematologica.* 2011; 96(3): 12-13. DOI: 10.3324/haematol.2010.038414

10. Arcasoy M.O. The non-haematopoietic biological effects of erythropoietin. *Br. J. Haematol.* 2008; 141(1): 14-31. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2008.07014.x

11. Chen X., Wang C.C., Song S.M., Wei S.Y., Li J.S., Zhao S.L., Li B. The administration of erythropoietin attenuates kidney injury induced by ischemia/reperfusion with increased activation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *J. Formos. Med. Assoc.* 2015; 114(5): 430-437. DOI: 10.1016/j.jfma.2015.01.007

12. Siren A.L., Fratelli M., Brines M., Goemans C., Casagrande S., Lewczuk, P., Keenan S., Gleiter C., Pasquali C., Capobianco A., Mennini T., Heumann R., Cerami A., Ehrenreich H., Ghezzi P. Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001; 98(7): 4044-4049. DOI: 10.1073/pnas.051606598

13. Haroon Z.A., Amin K., Jiang X., Arcasoy M.O. A novel role for erythropoietin during fibrin-induced wound-healing response. *Am. J. Pathol.* 2003; 163(3): 993-1000. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)63459-1

14. Lifshitz L., Tabak G., Gassmann M., Mittelman M., Neumann D. Macrophages as novel target cells for erythropoietin. *Haema-*

*tologica* 2010; 95(11): 1823-1831. DOI: 10.3324/haematol.2010.025015

15. Jelkmann W.E., Fandrey J., Frede S., Pagel, H. Inhibition of erythropoietin production by cytokines. *Ann. NY Acad. Sci.* 1994; 718(1): 300-311.

16. Poulsen T.D., Andersen L.W., Steinbruechel D., Gotze J.P., Jorgensen O.S., Olsen N.V. Two large preoperative doses of erythropoietin do not reduce the systemic inflammatory response to cardiac surgery. *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* 2009; 23(3): 316-323. DOI: 10.1053/j.jvca.2008.08.018

17. Pesce M., Felaco P., Franceschelli S., Speranza L., Grilli A., De Lutis M. A., Ferrone A., Sirilli V., Bonomini M., Felaco M., Patruno, A. Effect of erythropoietin on primed leucocyte expression profile. *Open Biol.* 2014; 4(6): 140026. DOI: 10.1098/rsob.140026

18. Nairz M., Sonnweber T., Schroll A., Theurl I., Weiss G. The pleiotropic effects of erythropoietin in infection and inflammation. *Microbes Infect.* 2012; 14(3): 238-246. DOI: 10.1016/j.micinf.2011.10.005

19. Yuan R., Maeda Y., Li W., Lu W., Cook S., Dowling P. Erythropoietin: a potent inducer of peripheral immuno/inflammatory modulation in autoimmune EAE. *PLoS One.* 2008; 3(4): e1924. DOI: 10.1371/journal.pone.0001924

20. Moransard M., Bednar M., Frei K., Gassmann M., Ogunshola O.O. Erythropoietin reduces experimental autoimmune encephalomyelitis severity via neuroprotective mechanisms. *J. Neuroinflammation.* 2017; 14(1): 202. DOI: 10.1186/s12974-017-0976-5

21. Kitchens R.L. Role of CD14 in cellular recognition of bacterial lipopolysaccharides. *Chem. Immunol.* 2000; 74: 61-82. PMID:10608082

22. Yeap W.H., Wong K.L., Shimasaki N., Teo E.C., Quek J.K., Yong H.X., Diong C.P., Bertolotti A., Linn Y.C., Wong S.C. CD16 is indispensable for antibody-dependent cellular cytotoxicity by human monocytes. *Sci. Rep.* 2016; 6: 34310. DOI: 10.1038/srep34310

23. Martinez F.O., Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000prime Rep.* 2014; 6: 13. DOI: 10.12703/P6-13

24. Nelms K., Keegan A.D., Zamorano J., Ryan J.J., Paul W.E. The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annu. Rev. Immunol.* 1999; 17(1): 701-738. DOI: 10.1146/annurev.immunol.17.1.701

25. Forster R., Davalos-Miszlitz A.C., Rot A. CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* 2008; 8(5): 362-371. DOI: 10.1038/nri2297

26. Saperstein S., Chen L., Oakes D., Pryhuber G., Finkelstein J. IL-1 $\beta$  augments TNF- $\alpha$ -mediated inflammatory responses from lung epithelial cells. *J. Interferon. Cytokine. Res.* 2009; 29(5): 273-284. DOI: 10.1089/jir.2008.0076

27. Scheller J., Chalaris A., Schmidt-Arras D., Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim. Biophys. Acta.* 2011; 1813(5): 878-888. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2011.01.034

28. Couper K.N., Blount D.G., Riley E.M. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J. Immunol.* 2008; 180(9): 5771-5777. PMID:18424693

29. Korzeniewski S.J., Pappas A. Endogenous erythropoietin. *Vitam. Horm.* 2017; 105: 39-56. DOI: 10.1016/bs.vh.2017.03.003

30. Todosenko N.M., Shmarov V.A., Malashchenko V.V., Meniailo M.E., Melashchenko O.B., Gazatova N.D., Goncharov A.G., Seledtsov V.I. Erythropoietin exerts direct immunomodulatory effects on the cytokine production by activated human T-lymphocytes. *Int. Immunopharmacol.* 2016; 36: 277-281. DOI: 10.1016/j.intimp.2016.05.006

31. Wood M.A., Goldman N., DePierri K., Somerville J., Riggs J.E. Erythropoietin increases macrophage-mediated T cell suppression. *Cell. Immunol.* 2016; 306: 17-24. DOI: 10.1016/j.cellimm.2016.05.004

32. Liu Y., Luo B., Han F., Li X., Xiong J., Jiang M., Yang X., Wu Y., Zhang Z. Erythropoietin-derived nonerythropoietic peptide ameliorates experimental autoimmune neuritis by inflammation suppression and tissue protection. *PLoS One.* 2014; 9(3): e90942. DOI: 10.1371/journal.pone.0090942

33. Nagashima T., Yokohama A., Nagai K., Kasamatsu T., Gotoh N., Iriuchishima H., Sekigami T., Saitoh T., Handa H., Tsukamoto N., Murakami H. Short-term administration of recombinant human erythropoietin decreases B cell number in human peripheral blood. *Transfus. Apher. Sci.* 2018; [Epub ahead of print]. DOI: 10.1016/j.transci.2018.01.009

---

34. Toba H., Kojima Y., Wang J., Noda K., Tian W., Kobara M., Nakata, T. Erythropoietin attenuated vascular dysfunction and inflammation by inhibiting NADPH oxidase-derived superoxide production in nitric oxide synthase-inhibited hypertensive rat aorta. *E. J. Pharmacol.* 2012; 691(1-3): 190-197. DOI: 10.1016/j.ejphar.2012.07.018

35. Rocchetta F., Solini S., Mister M., Mele C., Cassis P., Norris M., Remuzzi G., Aiello S. Erythropoietin enhances immunostimulatory properties of immature dendritic cells. *Clin. Exp. Immunol.* 2011; 165(2): 202-210. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2011.04417.x

#### **Сведения об авторах**

Мелашенко Ольга Борисовна — научный сотрудник центра медицинских биотехнологий Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта» Министерства образования и науки Российской Федерации

Меняйло Максим Евгеньевич — младший научный сотрудник центра медицинских биотехнологий Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта» Министерства образования и науки Российской Федерации

Мелашенко Владимир Владимирович — инженер-исследователь центра медицинских биотехнологий Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта» Министерства образования и науки Российской Федерации

Газатова Наталья Динисламовна — научный сотрудник центра медицинских биотехнологий Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта» Министерства образования и науки Российской Федерации

Гончаров Андрей Геннадьевич — кандидат медицинских наук, доцент, директор центра медицинских биотехнологий Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта» Министерства образования и науки Российской Федерации

Селедцов Виктор Иванович — доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник центра медицинских биотехнологий Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта» Министерства образования и науки Российской Федерации