

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ ПРЕПАРАТОВ РЕКОМБИНАНТНОГО ЭРИТРОПОЭТИНА ЭПОКРИН И РЕКОРМОН НА ЭРИТРОПОЭЗ *IN VIVO* И *IN VITRO*

Н. В. Тишевская<sup>1</sup>

Исследование проведено на культурах эритробластических островков и на животных с посттрансфузионной полицитемией. Рекормон и Эпокрин стимулируют эритропоэз в эритробластических островках *in vitro* и *in vivo*. В культуре эритробластических островков рекормон в 1,3 раза активнее эпокрин ( $p < 0,05$ ) воздействует на процесс образования эритробластических островков *de novo* и *de repeto*. В условиях *in vivo* у животных с экспериментальной полицитемией эпокрин и рекормон обеспечивают адекватный ответ эритроидного ростка кроветворения на эритропоэтический сигнал, в 3,4 раза ( $p < 0,05$ ) увеличивая количество эритробластических островков в костном мозге и в 2,2 раза ( $p < 0,05$ ) повышая число ретикулоцитов в крови.

**Ключевые слова:** рекомбинантный эритропоэтин; рекормон; эпокрин; эритропоэз; эритробластический островок.

### ВВЕДЕНИЕ

Стимулирующее эритропоэз действие эритропоэтина (ЭПО) заключается в активации дифференцировки коммитированных клеток-предшественниц эритроидного ряда, укорочении митотического цикла эритробластов, исключении промежуточных делений в эритроидном ряду, уменьшении “неэффективного” эритропоэза, улучшении микроциркуляции в ткани костного мозга, ускорении выхода ретикулоцитов в периферическое русло и укорочении срока их созревания [6]. В настоящее время для профилактики и лечения анемий различного генеза широко применяются препараты рекомбинантного ЭПО (рЭПО). Молекула рЭПО, как и нативного гормона, представляет собой гликопротеид, состоящий из 165 аминокислот, с молекулярной массой до 36 кДа. рЭПО вырабатывается овариальными клетками китайского хомячка, в которые трансфицирован ген ЭПО человека. В зависимости от особенностей биотехнологического процесса конечный продукт представляет собой  $\alpha$  или  $\beta$  форму. По химическому строению молекулы  $\alpha$  и  $\beta$  отличаются друг от друга: в ЭПО- $\beta$  преобладают щелочные изоформы, он более гликозилирован, содержит больше остатков сиаловых кислот и активнее связывается с лектинами [15].

Целью нашего исследования явилось сравнение характера прямого воздействия рЭПО- $\alpha$  и рЭПО- $\beta$  на морфофункциональные единицы эритропоэза — эритробластические островки (ЭО). Эритропоэз у млекопитающих и человека протекает в этих костномозговых клеточных ассоциациях, представляющих собой центрально расположенный макрофаг с “коронной” эритроидных клеток разной степени зрелости — от проэритробластов до ретикулоцитов. Изучение темпа

развития клеток эритроидной линии в ЭО костного мозга явилось новым подходом к решению вопросов, связанных с особенностями влияния цитокинов, гормонов и лекарственных средств на эритропоэз *in vivo* и *in vitro* [1, 2, 5, 8, 10]. Однако не всегда эксперименты на животных позволяют в полной мере оценить ответ клеток на конкретный раздражитель из-за его малой силы (низкой концентрации), или же реакция клеток изменяется в присутствии других биологически активных субстанций, конкурирующих с исследуемым веществом на уровне рецепторов. В этом плане в экспериментах *in vitro* своеобразная “изоляция” объекта исследования (ЭО) от других дистантных и контактных регуляторов предоставляет большие возможности для детального изучения процессов пролиферации и дифференцировки эритроидных клеток, а также межклеточных взаимодействий. При добавлении адекватного количества ЭПО в культуральную среду общее число ЭО на поверхности культурального сосуда сохраняется на исходном уровне в течение 72 ч благодаря вновь образующимся островкам [4, 5], в культурах же без добавления ЭПО образования новых ЭО не происходит, а наблюдается лишь созревание уже дифференцированных клеток. Поддержание эритропоэза в системе *in vitro* на физиологическом уровне в присутствии ЭПО, а также увеличение количества ЭО на поверхности культуральных сосудов под влиянием повышенной концентрации этого гормона свидетельствуют о том, что исходно в культуре присутствуют колониеобразующие единицы эритроцитарные (КОЕэ), контакт которых с макрофагами и приводит к формированию новых островков.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на 30 самках белых беспородных крыс массой 180 – 200 г. Эксперименты были проведены в соответствии с этическими нормами и рекомен-

<sup>1</sup> Южно-Уральский государственный медицинский университет, Россия, 454092, Челябинск, ул. Воровского, 64.

дациями по гуманизации работы с лабораторными животными, отраженными в Европейской конвенции по защите позвоночных животных (Страсбург, 1985), используемых для экспериментальных и других научных целей. Все манипуляции с животными производили под эфирным наркозом, эвтаназию грызунов осуществляли путем цервикальной дислокации, также проводимой под эфирным наркозом.

Для изучения влияния исследуемых препаратов рЭПО на эритропоэз *in vitro* из костного мозга интактных крыс выделяли ЭО и культивировали их на чашках Петри в газопотожном термостате в течение 24 или 48 ч по методике, описанной ранее [5, 9]. Перед началом культивирования в культуральную среду добавляли “Эпокрин” (ЭПО- $\alpha$ , ФГУП “ГосНИИ ОЧБ” ФМБА России, Санкт-Петербург) или “Рекормон” (ЭПО- $\beta$ , Рош Диагностикс ГмбХ, Германия) в концентрациях 0,25, 0,5, 1 или 2 МЕ/мл. В контрольные культуры рЭПО не добавляли. Каждая концентрация эпокрин и рекормона была протестирована на 5 культурах ЭО. В экспериментах *in vivo* с целью создания модели угнетенного эритропоэза крысам-реципиентам внутрибрюшинно была произведена однократная трансфузия 80 % взвеси отмытых эритроцитов крыс-доноров в объеме 7 % от массы тела. Через 5 сут после трансфузии эритроцитарной взвеси разным группам опытных животных внутривенно были введены эпокрин или рекормон в дозе 10 МЕ/100 г. Контрольной группе крыс вместо рЭПО вводили 0,9 % раствор NaCl. Через 48 ч после введения ЭПО в крови животных определяли количество ретикулоцитов, после чего крысы были выведены из эксперимента с целью исследования их костномозгового эритропоэза.

В препаратах ЭО, полученных *in vivo* и *in vitro*, после их окраски по Паппенгейму подсчитывали общее количество островков в расчете на 1 бедренную кость или на 1 см<sup>2</sup> поверхности культурального сосуда. С целью оценки качественного состава ЭО изучали их распределение по классам зрелости, пользуясь классификацией [3]. “Корона” ЭО 1 класса зрелости (ЭО1) была представлена проэритробластами и базофильными эритробластами с числом клеток от 2 до 8; “корона” ЭО 2 класса (ЭО2) — базофильными и ранними полихроматофильными эритробластами с числом клеток от 9 до 16. ЭО 3 класса (ЭО3) содержали от 17 до 32 полихроматофильных эритробластов и оксифильных нормобластов, “корона” инволюционирующих островков (ЭОинв) была представлена поздними полихроматофильными эритробластами, оксифильными нормобластами и ретикулоцитами с числом ядросодержащих клеток менее 16. К реконструирующимся островкам (ЭОрек) относили инволюционирующие ЭО, в “короне” которых обнаруживались проэритробласты и/или базофильные эритробласты, что являлось результатом дифференцировки КОЕэ, присоединившейся к макрофагу ЭОинв.

Полученные данные обрабатывались методами описательной статистики с расчетом средних значений, ошибки среднего, доверительных интервалов, стандартного отклонения. Сравнения групп проводили методами непараметрической статистики с использованием критериев Манна – Уитни и хи-квадрат.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исходное количество ЭО в чашках Петри перед началом культивирования составляло около 1500 островков/см<sup>2</sup> поверхности. При отсутствии в культуральной среде рЭПО общее число ЭО в культурах через 24 ч уменьшилось на 35 %, а к 48 ч — на 68 %. Добавление рекормона и эпокрин в культуральную среду препятствовало дезагрегации ЭО, но если рекормон через 24 ч культивирования даже в концентрации 0,25 МЕ/мл сохранял общее количество островков на уровне, близком к исходному (95 % от фона), то эпокрин обладал сравнимым эффектом только в случае использования концентраций 1 или 2 МЕ/мл (табл. 1). Через 48 ч разница в стимулирующем действии этих препаратов рЭПО сохранялась: в присутствии эпокрин на общее количество островков в культуре составляло более 1400 ЭО/см<sup>2</sup> лишь в концентрации 2 МЕ/мл, а рекормон справлялся с этой задачей, начиная с концентрации 0,5 МЕ/мл.

При анализе качественного состава ЭО в культурах были выявлены различия и в характере воздействия препаратов рЭПО- $\alpha$  и рЭПО- $\beta$  на процессы комплексации КОЕэ/проэритробластов с макрофагами (табл. 2). Через 24 ч культивирования количество ЭО, вновь образующихся на основе контактов КОЕэ/проэритробластов со свободными макрофагами (ЭО1),

Таблица 1. Влияние рекомбинантных эритропоэтинов на общее количество эритробластических островков крыс в культуре (ЭО/см<sup>2</sup>,  $M \pm m$ )

Концентрация эритропоэтина	Рекормон	Эпокрин
Фон (до начала культивирования)	1484,6 $\pm$ 3,5	
<b>24 ч культивирования</b>		
0 МЕ/мл (контроль)	980,4 $\pm$ 6,4	
0,25 МЕ/мл	1426,4 $\pm$ 15,4	1311,7 $\pm$ 7,3*
0,5 МЕ/мл	1451,6 $\pm$ 14,1	1345,9 $\pm$ 5,5*
1 МЕ/мл	1484,8 $\pm$ 5,6	1412,7 $\pm$ 2,2*
2 МЕ/мл	1492,3 $\pm$ 11,2	1468,3 $\pm$ 4,3
<b>48 ч культивирования</b>		
0 МЕ/мл (контроль)	479,6 $\pm$ 11,1	
0,25 МЕ/мл	1310,6 $\pm$ 13,6	1098,5 $\pm$ 8,6*
0,5 МЕ/мл	1419,2 $\pm$ 3,3	1209,4 $\pm$ 1,2*
1 МЕ/мл	1444,8 $\pm$ 2,7	1329,9 $\pm$ 3,5*
2 МЕ/мл	1472,1 $\pm$ 9,5	1407,2 $\pm$ 2,6*

\* Наличие достоверных различий между препаратами рЭПО ( $p < 0,05$ ); все опытные показатели достоверно отличались от контрольных значений ( $p < 0,05$ ).

Таблица 2. Влияние рекомбинантных эритропоэтинов на количество эритробластических островков 1 класса зрелости и реконструирующихся эритробластических островков в культуре ( $M \pm m$ )

Класс ЭО	ЭО1/см <sup>2</sup>		ЭОрек/см <sup>2</sup>	
Фон (до начала культивирования)	99,2 ± 1,6		142,2 ± 2,9	
Концентрация эритропоэтина	Рекормон	Эпокрин	Рекормон	Эпокрин
<b>24 ч культивирования</b>				
0 МЕ/мл (контроль)	38,4 ± 3,6		114,2 ± 2,8	
0,25 МЕ/мл	89,8 ± 2,2	62,6 ± 4,3*	151,0 ± 3,7	131,1 ± 3,3*
0,5 МЕ/мл	86,6 ± 2,2	74,5 ± 5,1	166,4 ± 1,4	144,7 ± 4,8*
1 МЕ/мл	99,6 ± 1,2	77,4 ± 2,4*	184,2 ± 2,5	159,8 ± 2,7*
2 МЕ/мл	121,3 ± 6,2	85,2 ± 3,3*	198,3 ± 3,2	168,3 ± 3,5*
<b>48 ч культивирования</b>				
0 МЕ/мл (контроль)	0		40,3 ± 2,2	
0,25 МЕ/мл	73,0 ± 1,8	21,2 ± 2,5*	149,6 ± 1,2	100,3 ± 6,6*
0,5 МЕ/мл	66,6 ± 2,2	37,4 ± 1,9*	174,0 ± 1,9	122,1 ± 4,3*
1 МЕ/мл	69,6 ± 1,2	59,9 ± 3,6	159,2 ± 1,7	148,7 ± 2,5*
2 МЕ/мл	71,4 ± 2,9	78,6 ± 2,7	140,5 ± 2,7	162,2 ± 1,8*

**Примечания:** \* наличие достоверных различий между препаратами рЭПО ( $p < 0,05$ ); все опытные показатели достоверно отличались от контрольных значений ( $p < 0,05$ ).

было достоверно больше при использовании рекормона: если препарат рЭПО-α в концентрации 2 МЕ/мл только поддерживал эритропоэз на уровне физиологического, то добавление в культуральную среду препарата ЭПО-β позволяло смоделировать *in vitro* темп формирования ЭО *de novo*, характерный для компенсационного эритропоэза. Через 48 ч культивирования различия в процессе формирования ЭО1 между действием рЭПО-α и рЭПО-β наблюдались при использовании препаратов в концентрациях 0,25 и 0,5 МЕ/мл, хотя все исследуемые концентрации препаратов способствовали формированию ЭО *de novo*, а в культурах,

не содержащих рЭПО, через 48 ч образование ЭО1 прекращалось полностью.

При подсчете количества ЭО, формирующихся на основе контактов КОЕэ/проэритробластов с центральными макрофагами, уже имеющими эритроидную “корону” (ЭОрек), были получены данные о том, что оба исследуемых препарата рЭПО достоверно стимулируют процесс реконструкции эритропоэза в культуре ЭО, и этот эффект сохранялся в течение 48 ч. Важно отметить, что, несмотря на то, что под влиянием рекормона эритропоэз *de repeto* в культурах ЭО был более выражен, чем в культурах, содержащих эпокрин, по сравнению с контрольными значениями оба препарата рЭПО очень активно способствовали образованию ЭОрек.

Таблица 3. Влияние рекомбинантных эритропоэтинов на показатели эритропоэза у животных с посттрансфузионной полицитемией ( $M \pm m$ )

Показатель	Контроль (посттрансфузионная полицитемия, $n = 5$ )	Рекормон ( $n = 10$ )	Эпокрин ( $n = 10$ )
Общее количество ЭО ( $\times 10^3$ /бедеренная кость)	86,3 ± 2,1	297,4 ± 4,5	286,2 ± 3,2
% ЭО1	2,2 ± 0,1	7,4 ± 0,3	5,1 ± 0,1*
% ЭО2	1,9 ± 0,1	9,4 ± 0,2	6,8 ± 0,2*
% ЭО3	38,4 ± 0,2	30,5 ± 0,1	32,3 ± 0,2
% ЭОинв	53,5 ± 0,5	35,7 ± 0,4	37,2 ± 0,3
% ЭОрек	4,6 ± 0,2	17,7 ± 0,3	18,4 ± 0,2
Количество ретикулоцитов в крови ( $\times 10^9$ )	3,5 ± 0,2	7,8 ± 0,2	7,5 ± 0,2

**Примечания:** \* наличие достоверных различий между препаратами рЭПО ( $p < 0,05$ ); все опытные показатели достоверно отличались от контрольных значений ( $p < 0,05$ ).

Для изучения влияния препаратов рЭПО-α и рЭПО-β *in vivo* на развитие эритроидных клеток костного мозга в эксперименте использовались животные с исходно угнетенным эритропоэзом. Показано, что при внутрибрюшинном введении интактным крысам большого количества аллогенных эритроцитов к 5 сут после манипуляции в костном мозге животных наблюдается выраженное торможение эритроидного роста кроветворения. Это сопровождается уменьшением количества ЭО с пролиферирующими клетками в “короне”, значительным снижением числа ретикулоцитов в периферической крови, и такое состояние угнетенного эритропоэза сохраняется у опытных животных вплоть до 12 сут [7]. После введения каждого из препаратов рЭПО в костном мозге крыс с посттрансфузионной полицитемией общее количество ЭО достоверно увеличилось (табл. 3). При анализе процентного соотношения островков разных классов зрелости было установлено, что и рЭПО-α, и рЭПО-β стимулируют как

процесс формирования ЭО *de novo*, так и реконструкцию эритропоэза.

Различия в действии рекормона и эпокрин заключались в том, что рЭПО-β более активно влиял на механизм комплексации КОЕэ/проэритробластов со свободными костномозговыми макрофагами, вследствие чего процентное содержание ЭО 1 и 2 классов в костном мозге животных, получивших инъекцию рекормона, было достоверно выше этих показателей у крыс, которым был введен эпокрин. Однако оба используемых препарата рЭПО продемонстрировали одинаковый уровень активации процесса повторного вовлечения центральных макрофагов ЭО в эритропоэз. Это выражалось в уменьшении числа инволюцирующих ЭО и увеличении количества ЭОрек как в группе животных, получивших рекормон, так и у крыс, для стимуляции эритропоэза которых применялся эпокрин. В случае использования эпокрин эта активация процесса реконструкции в ЭО оказалась достаточной для адекватной ретикулоцитарной реакции, поскольку показатели количества ретикулоцитов в периферической крови опытных животных, получивших разные препараты рЭПО, достоверно не отличались друг от друга.

Сравнительный анализ эффективности действия различных препаратов рЭПО проводился и ранее. В 1991 г. в фармацевтическом колледже Миннеаполиса (США) впервые было проведено рандомизированное двойное слепое исследование фармакокинетики и фармакодинамики внутривенного и подкожного введения эпоэтина-α и эпоэтина-β на здоровых добровольцах. Авторы показали, что при внутривенной инъекции у эпоэтина-β на 20 % больше, чем у эпоэтина-α, период полувыведения, при подкожном введении эпоэтин-β всасывается медленнее, чем эпоэтин-α, и ретикулоцитарный ответ в периферической крови ярче выражен при использовании эпоэтина-β [11]. При применении рЭПО-α и рЭПО-β у больных терминальной стадией почечной недостаточности, находящихся на гемодиализе, исследователями из Брумфилдского госпиталя (Челмсфорд, Великобритания) было показано, что для поддержания количества гемоглобина на уровне 110 – 125 г/л необходимы более высокие дозы рЭПО-α [12]. Однако в другом исследовании, проведенном в аналогичной группе пациентов в Центре здоровья г. Тузла (Босния и Герцеговина), были получены данные о том, что нет достоверных различий в клиническом эффекте рЭПО-α или рЭПО-β, и путь введения препаратов (подкожный или внутривенный) не влияет на результат [13]. Эта работа подтвердила вывод, сделанный группой немецких ученых из Института медико-биологических и фармацевтических исследований (Нюрнберг, Германия): *in vivo* рЭПО-α и рЭПО-β одинаково эффективны [14]. Данные, полученные в результате проведенных нами экспериментов, существенно дополняют существующие представления о ха-

рактере непосредственного влияния рЭПО-α и рЭПО-β на эритроидную ткань костного мозга.

Нами показано, что рекормон и эпокрин обладают выраженным стимулирующим действием на эритропоэз *in vitro* и *in vivo*. В культуре ЭО рекормон активнее воздействует на пролиферацию и дифференцировку эритроидных клеток, чем эпокрин, т.е. *in vitro* для поддержания эритропоэза на физиологическом уровне необходимы большие концентрации рЭПО-α. В условиях *in vivo* и эпокрин, и рекормон обеспечивают адекватный ответ эритроидного ростка кроветворения на эритропоэтический сигнал. Рекормон по сравнению с эпокрином обладает более выраженным эффектом на процесс образования новых ЭО в костном мозге (эритропоэз *de novo*). Однако за счет поддержания процесса вовлечения в эритропоэз макрофагов, уже имеющих зрелую эритроидную “корону” (эритропоэз *de repeto*), введение эпокрин, так же как и инъекция рекормона, вызывает у полицитемичных животных полноценный ретикулоцитарный ответ.

## ВЫВОДЫ

1. В условиях *in vitro* рекормон и эпокрин поддерживают развитие эритроидных клеток на физиологическом уровне в дозах 0,5 и 1 МЕ/мл, соответственно.
2. При внутривенном введении в дозе 10 МЕ/100 г рекормон и эпокрин одинаково эффективно стимулируют пролиферацию, дифференцировку и созревание эритроидных клеток в костном мозге крыс с исходно угнетенным эритропоэзом.

## ЛИТЕРАТУРА

1. И. А. Волчегорский, Н. В. Тишевская, Д. А. Кузнецов, *Вестник Рос. акад. мед. наук*, № 2, 30 – 36 (2002).
2. И. А. Волчегорский, Н. В. Тишевская, Е. В. Дементьева, *Эксперим. и клин. фармакол.*, **71**(6), 23 – 27 (2008).
3. Ю. М. Захаров, И. Ю. Мельников, А. Г. Рассохин, *Архив анатомии, гистол. и эмбриол.*, № 5, 38 – 42 (1990).
4. Ю. М. Захаров, Н. В. Тишевская, *Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова*, **87**(1), 84 – 89 (2001).
5. Ю. М. Захаров, Н. В. Тишевская, *Вестник Уральской мед. академ. науки*, № 1, 65 – 68 (2003).
6. Ю. М. Захаров, Н. В. Тишевская, С. А. Шевяков и др., *Мед. наука и образование Урала*, **9**(2), 40 – 43 (2008).
7. Ю. М. Захаров, И. Ю. Мельников, С. А. Шевяков, Н. В. Тишевская, *Вестник Уральской мед. академ. науки*, **3**(49), 100 – 103 (2014).
8. Н. В. Корнилова, Ю. М. Захаров, А. Г. Рассохин, *Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова*, **80**(3), 83 – 87 (1994).
9. Н. В. Тишевская, А. А. Болотов, Ю. М. Захаров, *Мед. академ. ж.*, **5**(4), 50 – 59 (2005).
10. М. Ф. Харченко, Н. В. Корнилова, Ю. М. Захаров, Е. С. Битюкова, *Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова*, **80**(11), 32 – 36 (1994).
11. C. Halstenson, M. Macres, S. Katz, et al., *Clin. Pharmacol.*, **50**(6), 702 – 712 (1991).
12. A. Loughnan, G. R. Ali, S. C. Abeygunasekara, *Ren Fail.*, **33**(3), 373 – 375 (2011).
13. E. Ostrvica, E. Mesic, D. Ostrvica, et al., *Med. Arh.*, **64**(1), 4 – 6 (2010).

14. F. Sörgel, U. Thyroff-Friesinger, A. Vetter, et al., *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.*, **47**(6), 391 – 401 (2009).
15. P. L. Storrington, R. J. Tiplady, R. E. Gaines Das, et al., *Br. J. Haematol.*, **100**(1), 79 – 89 (1998).

Поступила 21.06.15

## COMPARATIVE ANALYSIS OF REPOA (EPOKRIN) AND REPOB (RECORMON) INFLUENCE ON ERYTHROPOIESIS *IN VIVO* AND *IN VITRO*

**N. V. Tishevskaya**

South Ural State Medical University, ul. Vorovskogo 64, Chelyabinsk, 454092 Russia

The study performed on erythroblastic island cultures and rats with experimental polycythemia showed that recormon and epokrin stimulated erythropoiesis in erythroblastic islands both *in vitro* and *in vivo*. In cell cultures, recormon activates the formation of erythroblastic islands *de novo* and *de repeto* 1.3 times better than epokrin ( $p < 0.05$ ). Erythroid cells exhibited same reaction to epokrin and recormon *in vivo*: the number of erythroblastic islands in the bone marrow increased 3.4 times ( $p < 0,05$ ) and the number of reticulocytes in the blood increased 2.2 times ( $p < 0.05$ ).

**Keywords:** recombinant erythropoietin (rEPO); recormon; epokrin; erythropoiesis; erythroblastic island.