



© Коллектив авторов, 2018
УДК 612.111.3:[616.155.32 : 612.438]-092.4

Т. В. Пархоменко*, О. А. Клыценко, В. В. Томсон, О. В. Галибин

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

ВЛИЯНИЕ ЭРИТРОПОЭТИНА НА Т-ЛИМФОЦИТЫ ТИМУСА КРЫС *IN VITRO* ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ИНГИБИТОРОВ РАЗНЫХ КЛАССОВ

Резюме

Введение. Эритропоэтин (ЭПО) — физиологический стимулятор эритропоэза. Одним из основных эффектов ЭПО является снижение скорости апоптоза эритроидных клеток-предшественниц в костном мозге. Протекторные свойства ЭПО продемонстрированы при различных заболеваниях в клинических и экспериментальных условиях. Ранее было установлено, что ЭПО оказывает активирующее воздействие на Т-лимфоциты (ТЛЦ), сопровождающееся увеличением количества флуоресцирующих митохондрий в клетке ($n_{m/c}$), имеющих протонный потенциал ($\Delta\psi$), и (или) ростом внешнего мембранного потенциала ($\Delta\psi$). **Цель** исследования — оценка реакции ТЛЦ на ЭПО после воздействия специфических ингибиторов реакций фосфорилирования в дыхательной цепи.

Материал и методы. Исследовалось влияние ЭПО («Eprex», Cilag) на ТЛЦ крыс *in vitro* после их дезэнергизации несколькими ингибиторами: динитрофенолом (ДНФ) — ингибитором дыхательной цепи и разобщителем окислительного фосфорилирования; пентахлорфенолом (ПХФ) — разобщителем окислительного фосфорилирования; дициклогексилкарбодиимидом (ДЦКД) — ингибитором мембрансвязанной части АТФ-азы митохондриальной мембраны с помощью потенциалчувствительного витального флуоресцентного зонда-катиона 4-(*n*-диметиламиностирил)-1-метилпиридиния (ДСМ). ТЛЦ выделяли из тимусов по стандартной методике. Окрашенные ДСМ клетки исследовали на люминесцентном микроскопе («Люмам — И2», ЛОМО, Россия) с использованием термостатированного столика. В каждом препарате измеряли флуоресценцию 50–70 клеток и рассчитывали среднюю интенсивность флуоресценции ТЛЦ (\bar{F}). В каждой флуоресцирующей клетке подсчитывали $n_{m/c}$. Статистическую обработку данных экспериментов проводили по коэффициенту корреляции рангов Спирмена.

Результаты и обсуждение. В экспериментах с ТЛЦ из разных тимусов зарегистрировано снижение $n_{m/c}$ и \bar{F} после инкубации со всеми использованными ингибиторами, причем степень и скорость снижения этих параметров зависела от типа ингибитора и длительности инкубации. Максимальное снижение энергетики ТЛЦ достигалось при инкубации с ДНФ, после которого ЭПО не восстанавливает \bar{F} и $n_{m/c}$. После инкубации с ПХФ ЭПО восстанавливает ~20–23 % $n_{m/c}$ и \bar{F} . Реакция ТЛЦ на ДЦКД подтверждает важную роль АТФ-азы в поддержании мембранного митохондриального потенциала. После дезэнергизации ТЛЦ под действием ДЦКД ЭПО восстанавливает ~42 % $n_{m/c}$ и ~38 % \bar{F} .

Выводы. ЭПО способен частично восстанавливать поляризацию мембран митохондрий в ТЛЦ, нарушенную в результате воздействия ДЦКД.

Ключевые слова: эритропоэтин, Т-лимфоциты, энергетическая активность, ингибиторы, потенциалчувствительный витальный флуоресцентный зонд-катион 4-(*n*-диметиламиностирил)-1-метилпиридиния

Пархоменко Т. В., Клыценко О. А., Томсон В. В., Галибин О. В. Влияние эритропоэтина на Т-лимфоциты тимуса крыс *in vitro* после воздействия ингибиторов разных классов. Ученые записки СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова. 2018; 25 (1): 56–61. DOI: 10.24884/1607-4181-2018-25-1-56-61.

* Автор для связи: Татьяна Васильевна Пархоменко, канд. биол. наук, ст. научн. сотр. Лаборатории патоморфологии ФГБОУ ВО «СПбГМУ им. И. П. Павлова» Минздрава России, Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого, д. 6-8, 197022. E-mail: parhomenkotv@1spbmgmu.ru.

© Composite authors, 2018
UDC 612.111.3:[616.155.32 : 612.438]-092.4

T. V. Parkhomenko*, O. A. Klytsenko, V. V. Tomson, O. V. Galibin

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Pavlov First Saint Petersburg State Medical University» St. Petersburg, Russia

EFFECT OF ERYTHROPOIETIN ON T-LYMPHOCYTES OF THE THYMUS OF RATS *IN VITRO* AFTER EXPOSURE TO INHIBITORS OF DIFFERENT CLASSES

Abstract

Introduction. Erythropoietin (EPO) — physiological stimulator of erythropoiesis. It activates the mitosis and maturation of red blood cells from progenitor cells erythroid series. One of the main effects of EPO is the slowdown in the rate of apoptosis

of erythroid progenitor cells in the bone marrow. Protective properties of EPO demonstrated in various diseases in clinical and experimental conditions. Previously, it was found that activating EPO-effect on T-lymphocytes (TLC) may result not only to the increase of the number of fluorescent mitochondria in cell ($n_{m/c}$) with proton potential ($\Delta\psi_m$), but also external growth of growth of external membrane potential electric potential of plasma ($\Delta\psi_p$).

The objective of this work was to investigate the TLC response upon EPO after exposure to specific inhibitors of phosphorylation reactions in the respiratory chain.

Material and methods. We studied EPO («Eprex», Cilag) effect on rat TLC *in vitro* after their deenergization by several inhibitors: dinitrophenol (DNP) - uncoupler of oxidative phosphorylation and inhibitor of respiratory chain), pentachlorophenol (PCP)- uncoupler of oxidative phosphorylation, N,N-dicyclohexylcarbodiimide (DCCD)- of Ca²⁺ - inhibitor of the membrane-bound part of the mitochondrial membrane ATP-ase with the help of a potential-sensitive vital fluorescent probe-cation 4-(p-dimethylaminostyryl)-1-methylpyridinium (DSM). Rat TLC were isolated from thymuses according to the standard method. The microfluorimetric studies of DSM-stained TLC were performed by means of fluorescent microscope («Lumam I-2», «ЛОМО», Russia) with thermostatic table. Fluorescence of 50–70 single cells was measured in each specimen, mean fluorescence intensity of TLC (\bar{F}) was calculated. In addition, $n_{m/c}$ was calculated in each fluorescent cell. Statistical processing of the experimental data was performed by the Spearman's rank correlation coefficient.

Results and discussion. In experiments with TLC from different thymuses, we registered a decrease in \bar{F} and $n_{m/c}$ after incubation with all used inhibitors. It was found that the difference in decrease velocity of $n_{m/c}$ and of \bar{F} depended on the type of inhibitor and on the duration of incubation. Maximum reduction of energy of the TLC achieved by incubation with a DNF, after which the EPO does not recover \bar{F} and $n_{m/c}$. After incubation with PCP, EPO restores ~ 20–23 % $n_{m/c}$ and \bar{F} . The reaction of TLC on the DCCD confirms the important role of the ATP-ase in the maintenance of mitochondrial membrane potential. After deenergization of TLC under the action of DCCD, EPO has the maximum effect: restored ~ 42 % $n_{m/c}$ and ~ 38 % \bar{F} .

Conclusions. EPO is able to partially recover the polarization of the mitochondria membranes in TLC violated as a result of exposure to DCCD.

Keywords: erythropoietin, T-lymphocytes, energy activity, inhibitors, potential-sensitive vital fluorescent probe-cation 4-(p-dimethylaminostyryl)-1-methylpyridinium

Parkhomenko T. V., Klytsenko O. A., Tomson V. V., Galibin O. V. Effect of erythropoietin on T-lymphocytes of the thymus of rats *in vitro* after exposure to inhibitors of different classes. The Scientific Notes of IPP-SPSMU. 2018;25(1):56–61. (In Russ.). DOI: 10.24884/1607-4181-2018-25-1-56-61.

* **Corresponding author:** T. V. Parkhomenko, Senior Research Associate, Laboratory of Pathomorphology, Scientific research center of the FSBEI HE «I. P. Pavlov SPbSMU», 6-8 L'va Tolstogo street, Saint-Petersburg, Russia, 197022. E-mail: parhomenkotv@1spbgsu.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Эритропоэтин (ЭПО) — физиологический стимулятор эритропоэза. Он активирует митоз и созревание эритроцитов из клеток-предшественников эритроцитарного ряда [1]. ЭПО секретируется в почках и в перисинусоидальных клетках печени. Одним из основных эффектов ЭПО является снижение скорости апоптоза эритроидных клеток-предшественниц в костном мозге. Рецепторы к ЭПО обнаружены на клетках нервной ткани, яичников и яичек, матки, гладкомышечных клетках сосудов, кардиомиоцитах, эндотелиоцитах, эпителии легких и почечных канальцев [2]. Рекомбинантный эритропоэтин-альфа (Эпобиокрин, Эпрекс, Эпостим) широко используется для коррекции анемий при различных заболеваниях [3–5]. ЭПО связывается с рецептором эритропоэтина на поверхности клеток-предшественников и активирует JAK2-сигнальный каскад [6, 7]. ЭПО увеличивает аффинность колониеобразующих эритроцитарных единиц к макрофагам костного мозга, что усиливает пролиферацию и дифференцировку эритробластов, стимулирует секрецию макрофагами эритробластических островков (ЭО) эндогенного ЭПО и гликозаминогликанов, способствуя формированию эритропоэтического микроокружения, а также подавляет апоптоз эритрокариоцитов в ЭО [8]. При термической травме зафиксирован ПОЛ-ограничивающий (ПОЛ-перекисное окисление липидов) эффект ЭПО в лимфоцитах периферической крови. Можно предположить стимулирующий эффект ЭПО в отношении

пролиферации и дифференцировки клеток в ходе лимфопоэза в костном мозге, других органах иммунной системы [9, 10]. Протекторные свойства ЭПО в связи с иммуномодулирующим действием продемонстрированы при различных заболеваниях в клинических и экспериментальных условиях [11–13]. В 2007 г. был обнаружен модулирующий характер влияния ЭПО на Т-лимфоциты (ТЛЦ), выделенные из тимуса крыс *in vitro*, по изменению их энергетического состояния с использованием потенциалчувствительного флуоресцентного зонда [14]. Авторами было установлено, что ЭПО оказывает активирующее воздействие на ТЛЦ, сопровождающееся увеличением количества светящихся митохондрий в клетке ($n_{m/c}$), имеющих протонный потенциал ($\Delta\psi_m$), и (или) ростом внешнего мембранного потенциала ($\Delta\psi_p$) [15]. Специфические ингибиторы являются важным инструментом для изучения процессов энергообеспечения в клетках.

Цель исследования — оценка реакции ТЛЦ на ЭПО после воздействия специфических ингибиторов реакций фосфорилирования в дыхательной цепи.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования служили ТЛЦ, выделенные из тимусов белых крыс линии Вистар, весом 200–300 г, по известной методике [14]. Полученные клетки помещали в стандартный раствор Хенкса (0,13 М хлорида натрия, 5,5 М хлорида калия, 1,2 мМ фосфата натрия, 1,0 мМ хлорида кальция, 1,0 мМ хлорида магния, 10,0 мМ глюкозы; рН 7,4 в 100 мл дистиллированной воды). Для

верификации клеток с неповрежденными цитоплазматическими мембранами применяли тест с трипановым синим. С целью выявления места воздействия ЭПО на тот или иной тип мембран ТЛЦ использовали ингибиторы реакций фосфорилирования в дыхательной цепи. В работе применяли динитрофенол (ДНФ) (*Sigma*) – ингибитор дыхательной цепи и разобщитель окислительного фосфорилирования; пентахлорфенол (ПХФ) (*Sigma*) – разобщитель окислительного фосфорилирования; дициклогексилкарбодимид (ДЦКД) (*Sigma*) – ингибитор мембрансвязанной части АТФ-азы митохондриальной мембраны; ЭПО («Ерех», *Cilag*); потенциалчувствительный флуоресцентный зонд 4-(*n*-диметиламиностирил)-1-метилпиридиния (ДСМ), синтезированный в Институте органического синтеза АН Латвии [14]. Опытные образцы суспензии ТЛЦ [$-2 - 3$] $\times 10^7$ клеток/мл] в пробирках типа Эппендорф инкубировали в присутствии ингибиторов в течение 10, 20, 40 мин при 37 °С, затем добавляли ЭПО (в конечной концентрации 2 ед./мл), инкубировали далее 30 мин, добавляли зонд ДСМ (конечная концентрация – 1,5 мкМ) и продолжали инкубацию еще 20 мин. Конечные концентрации ингибиторов: ДНФ – 0,1 мМ; ПХФ – 1,5 мкМ; ДЦКД – 0,1 мМ. Все ингибиторы растворяли в 70 %-м этиловом спирте. Отношение объемов добавляемых растворов к исходному объему суспензии клеток не превышало 1:20 соответственно. К контрольным пробам добавляли объемы раствора Хенкса, равные объемам ингибиторов, и после инкубации при 37 °С в течение 10, 20, 40 мин инкубировали с ЭПО (в конечной концентрации 2 ед./мл) 30 мин, далее – с ДСМ в течение 20 мин. Контрольные и опытные образцы ТЛЦ исследовали на люминесцентном микроскопе «Люам – И2» (ЛОМО, Россия) при увеличении в 900 раз, с использованием термостатированного столика. Флуоресценцию зонда возбуждали ртутной лампой с длиной волны 405 – 436 нм. Для регистрации флуоресценции

использовали фотометрическую насадку ФМЭЛ-1 и интерференционный фильтр с максимумом пропускания 585 нм. Регистрировали величину интенсивности флуоресценции каждой индивидуальной клетки. Аналоговый сигнал, регистрируемый с помощью вольтметра, преобразовывался в цифровой с помощью прибора – аналого-цифрового преобразователя (АЦП) (ЛОМО, Россия). Размер фотометрируемого участка был равен диаметру клетки, т. е. фотометрировали всю клетку целиком. В каждой флуоресцирующей клетке подсчитывали количество светящихся митохондрий ($n_{m/c}$), которые визуальным образом распознавали по характерной гранулярной желтой флуоресценции зонда ДСМ [14]. В каждом препарате измеряли флуоресценцию 50 – 70 клеток и рассчитывали среднюю интенсивность флуоресценции ТЛЦ (\tilde{F} , усл. ед.). За время измерений в клетках не происходило существенных изменений флуоресцентного сигнала. Фотосъемку препаратов клеток, окрашенных зондом ДСМ, выполняли, используя микроскоп «Люам-И2» и фотокамеру ТСА-5,0; программный пакет «Микро-Анализ View» (ООО «ЛОМО-Микросистемы», Россия). Статистическую обработку данных экспериментов проводили по коэффициенту корреляции рангов Спирмена. Всего было исследовано 8000 клеток в 160 препаратах. Некоторые предварительные результаты восстанавливающего эффекта ЭПО на ТЛЦ крыс после их обработки ингибиторами опубликованы нами ранее [16].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Энергетическая активность каждой исследованной клетки характеризуется интегральной интенсивностью флуоресценции ДСМ в цитоплазме, которая зависит от суммы трансмембранных потенциалов на плазматической и митохондриальной мембранах. Ранее нами было установлено, что ЭПО воздействует на ТЛЦ крыс, изменяя градиенты электрических полей на клеточных мембранах. Эффект ЭПО-стимуляции ТЛЦ сопровождается

Изменение средней интенсивности флуоресценции (\tilde{F} , усл. ед.) и числа флуоресцирующих митохондрий на клетку ($n_{m/c}$) в процессе инкубации ТЛЦ с ингибиторами и ЭПО при 37 °С

The change of mean fluorescence (\tilde{F} , arb. units) and number of fluorescent mitochondria per one cell ($n_{m/c}$) in the process of incubation of rat T-lymphocytes with inhibitors and EPO at 37 °С

Время, мин	Контроль		ТЛЦ + ДНФ		ТЛЦ + ПХФ		ТЛЦ + ДЦКД	
	$n_{m/c}$	\tilde{F}	$n_{m/c}$	\tilde{F}	$n_{m/c}$	\tilde{F}	$n_{m/c}$	\tilde{F}
10	10,8±0,8	27,6±2,6	0,5±0,1*	5,7±0,6**	4,4±0,8*	9,6±0,8*	3,3±0,3*	9,2±0,6*
20	9,0±0,7	25,5±2,5	0,4±0,1*	4,5±0,5*	2,8±0,3**	7,0±0,6*	1,9±0,3**	5,5±0,5*
40	8,8±0,6	23,0±2,5	0	2,3±0,3*	0	2,5±0,3*	0	2,8±0,4**
+ ЭПО								
30	20,5±1,0	48,3±4,7	0	2,3±0,3*	4,7±0,6*	9,7±0,7*	8,7±0,8**	18,4±0,8**

* – $P < 0,01$; ** – $P < 0,025$; $n_{m/c}$ – среднее число флуоресцирующих митохондрий на клетку в данных временных точках по всем измеренным клеткам; \tilde{F} , усл. ед. – средние величины флуоресценции в данных временных точках по всем измеренным клеткам. Контроль: ТЛЦ, инкубированные без ингибиторов при 37 °С, с добавлением ЭПО через 40 мин инкубации; опыт: ТЛЦ + ДНФ, ТЛЦ + ПХФ, ТЛЦ + ДЦКД – клетки после инкубации с ДНФ, ПХФ и ДЦКД и затем – с ЭПО при 37 °С. Для каждой временной точки приведена величина среднего (M) и ошибка среднего (m).

увеличением $n_{m/c}$, имеющих протонный потенциал ($\Delta\mu_m$), и (или) ростом внешнего мембранного потенциала ($\Delta\psi$) [14]. L. Lifshitz et al. [11], продемонстрировавшие иммуномодулирующие эффекты ЭПО, которые проявлялись на клеточном и гуморальном уровнях иммунной системы, не обнаружили рецепторов ЭПО на лимфоцитах. По данным этих авторов, рецепторы ЭПО имеются на макрофагах костного мозга. Обработка ЭПО этих клеток *in vitro* повышала их фагоцитарную активность и увеличивала экспрессию на клеточной поверхности рецепторов CD116, F4/80 и CD80. В. Г. Артюховым и др. [17] было показано, что активирующее воздействие, например, облучение УФ-светом, индуцирует изменение поверхностного фенотипа ТЛЦ крови человека, вызывая изменение уровня экспрессии антигенраспознающих рецепторных комплексов (CD3-, CD4- и CD8-маркеров) и перераспределение их на поверхности иммунокомпетентных клеток с образованием рецепторных кластеров различных типов. Возрастание \bar{F} и $n_{m/c}$ под действием ЭПО в ТЛЦ, скорее всего, отражает увеличение общей поляризации мембран; поляризация мембран связана с экспрессией поверхностных рецепторов, которая, в свою очередь, обусловлена энергетическим состоянием примембранных комплексов митохондрий вблизи поверхности [18]. Исходно доля клеток с неповрежденными цитоплазматическими мембранами в данной работе составляла 92–96%. В экспериментах с ТЛЦ из разных тимусов зарегистрировано снижение $n_{m/c}$ и \bar{F} после инкубации со всеми использованными ингибиторами, причем степень и скорость снижения этих параметров зависели от типа ингибитора и длительности инкубации (таблица, рис. 1). Максимальный эффект достигался при воздействии ДНФ: уже через 10 мин инкубации светящиеся митохондрии практически отсутствуют в суспензии клеток; \bar{F} также резко снижается; через 20 мин продолжается снижение $n_{m/c}$ и \bar{F} ; через 40 мин светящихся митохондрий не видно, \bar{F} — на уровне фона. ЭПО не восстанавливает \bar{F} и $n_{m/c}$. На рис. 1, а наглядно продемонстрированы динамика нарастания доли ТЛЦ без флуоресцирующих митохондрий (N_{C-EM} %) под действием ДНФ и отсутствие восстанавливающего эффекта ЭПО. ДНФ является классическим протонифором, который быстро и необратимо снижает одновременно оба компонента электрохимического градиента — электрический и химический, деполаризует мембраны.

Через 10 мин инкубации ТЛЦ с ПХФ остается ~37% $n_{m/c}$ и ~35% \bar{F} ; через 20 мин ~26% $n_{m/c}$ и ~25% \bar{F} от контроля; через 40 мин светящихся митохондрий не видно, \bar{F} на уровне фона. На рис. 1, б показано изменение доли ТЛЦ без флуоресцирующих митохондрий (N_{C-EM} %) под действием ПХФ и восстанавливающий эффект ЭПО. Нарастание во времени ингибирующего воздействия ПХФ на ТЛЦ практически линейно и частично обратимо в присутствии ЭПО, который восстанавливает ~23% $n_{m/c}$ и ~20% \bar{F} , что примерно соответствует доле зрелых ТЛЦ в суспензии клеток тимуса. Можно предположить, что эффект обратимости является кажущимся, поскольку под действием ЭПО активируются те клетки, которые исходно имели высокий $\Delta\psi$, и ПХФ в них практически не проникает, так как имеет отрицательный заряд и не повреждает мембрану снаружи, как в случае ДНФ.

10-минутная инкубация ТЛЦ с ДЦКД оставляет ~30% флуоресцирующих $n_{m/c}$ и ~33% \bar{F} . После 20 мин воздействия ДЦКД в суспензии регистрируется ~18% $n_{m/c}$ и ~20% \bar{F} , происходит резкая деэнергизация митохондрий. Через 40 мин светящихся митохондрий не видно, \bar{F} — на уровне фона. 30-минутная инкубация с ЭПО восстанавливает ~42% $n_{m/c}$ и ~38% \bar{F} от контрольного уровня. Рис. 1, в демонстрирует изменение доли ТЛЦ без флуоресцирующих митохондрий (N_{C-EM} %) под действием ДЦКД и восстанавливающее воздействие ЭПО.

F0F1-АТФ-аза митохондрий является сложным липопротеидным комплексом и состоит из гидрофильного каталитического центра F1 и мембран-

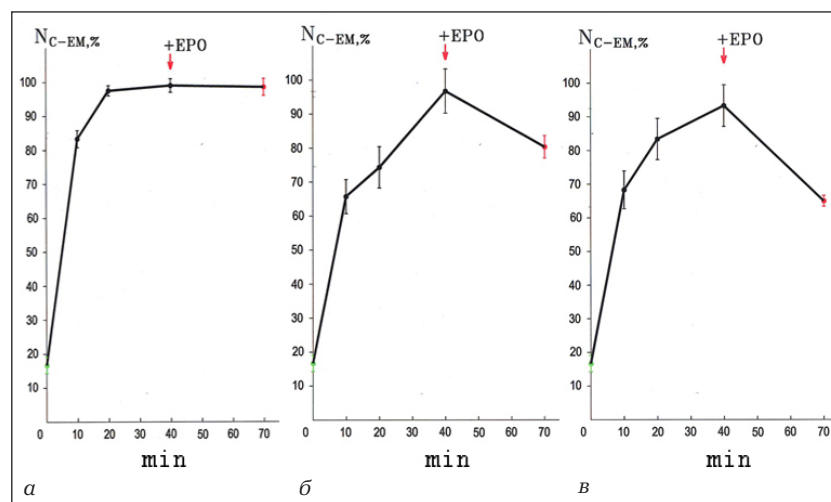


Рис. 1. Изменение доли Т-лимфоцитов без флуоресцирующих митохондрий (N_{C-EM} %) в процессе инкубации с ДНФ (а), с ПХФ (б), с ДЦКД (в) и влияние ЭПО при 37 °С: по оси абсцисс — время, мин; по оси ординат — средние величины долей Т-лимфоцитов без флуоресцирующих митохондрий для каждой временной точки по всем измеренным клеткам. Доверительные интервалы при $P \leq 0,05$

Fig. 1. A change of portion of rat T-lymphocytes with non fluorescent mitochondria (N_{C-EM} %) in the process of incubation with DNP (a), PCP (b), DCCD (v) and influence of EPO at 37 °C. Abscissa: storage time (min); ordinate: mean values of TLC with non fluorescent mitochondria for each time point for all measured cells. $P \leq 0,05$



Рис. 2. Т-лимфоциты из тимуса крысы, окрашенные зондом ДСМ: *а* – исходный образец после инкубации с ЭПО, $\bar{F} = 52,0$ усл. ед.; *б* – ТЛЦ после 40-минутной инкубации с ДЦКД, $\bar{F} = 3,0$ усл. ед.; *в* – ТЛЦ после воздействия ЭПО на обработанные ДЦКД клетки, $\bar{F} = 20,0$ усл. ед.

Fig. 2. Rat T-lymphocytes, stained probe DSM: *a* – The original sample after incubation with EPO, $\bar{F} = 52,0$ arb. units; *б* – TLC after 40 min of incubation with DCCD, $\bar{F} = 3,0$ arb. units; *в* – TLC after exposure to EPO at DCCD treated cells, $\bar{F} = 20,0$ arb. units

ного сектора F0 [19]. ДЦКД – специфический ингибитор транслокации протонов в F0F1 АТФ-зе митохондрий [20], который ковалентно связывается с протеолипидом – одной из субъединиц F0. В опытах с меченым ДЦКД было установлено, что ДЦКД действует на протеолипид, связываясь всего с одним остатком глутаминовой кислоты GLY-59 [21]. ДЦКД ингибирует АТФ-азу в мембранах митохондрий, за счет этого снижается $n_{m/c}$ и общая \bar{F} . Реакция ТЛЦ на воздействие ДЦКД подтверждает важную роль АТФ-азы в поддержании мембранного митохондриального потенциала. Эффект деэнергизации митохондрий под действием ДЦКД обратим в присутствии ЭПО, если судить по среднему числу митохондрий в восстановленных ТЛЦ. Это может свидетельствовать о способности ЭПО частично восстанавливать поляризацию митохондриальных мембран. На рис. 2 изображены ТЛЦ, окрашенные зондом ДСМ.

Возможно, механизм избирательного обратимого воздействия ЭПО после ДЦКД на ТЛЦ объясняется различным содержанием и состоянием F0F1 АТФ-азы в мембранах митохондрий клеток разной степени рецепторной зрелости и связанной с этим метаболической реактивностью. Наши данные свидетельствуют о том, что ЭПО влияет на метаболизм ТЛЦ, связанный с энергетической активностью митохондрий.

ВЫВОДЫ

1. Из использованных в настоящей работе ингибиторов наибольшее воздействие на Т-лимфоциты оказывает динитрофенол. Эритропоэтин не восстанавливает энергетику Т-лимфоцитов после динитрофенола.

2. Максимальный восстанавливающий эффект эритропоэтина на Т-лимфоциты наблюдается после воздействия ингибитора АТФ-азы – дицклогексилкарбодимида, что свидетельствует о существенной роли протонной помпы АТФ-азы в создании градиента на мембранах митохондрий.

3. Эритропоэтин способен частично восстанавливать поляризацию мембран митохондрий в

Т-лимфоцитах, нарушенную в результате воздействия дицклогексилкарбодимида.

Конфликт интересов

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов.

Conflicts of interest

Authors declare no conflict of interest.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Jelkmann W., Gross A. J.* Erythropoietin. – Berlin; N.-Y.: Springer-Verlag; Yeidelberg, 1989. – 180 p.
2. *Осиков М. В., Григорьев Т. А., Федосов А. А. и др.* Влияние эритропоэтина на функциональную активность тромбоцитов // *Соврем. пробл. науки и образования.* – 2012. – № 6. URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_23220530_33460976.pdf (дата обращения 18.12.2017).
3. *Бакиев В. И., Коломоец Н. М.* Эритропоэтин в клинической практике // *Клин. мед.* – 2007. – № 85 (9). – С. 30–37.
4. *Biggar P., Kim G. H.* Treatment of renal anemia: Erythropoiesis stimulating agents and beyond // *Kidney Res Clin Pract.* – 2017. – № 36 (3). – P. 209–223.
5. *New Treatment Approaches for the Anemia of CKD / M. Bonomini, L. Del Vecchio, V. Sirolli, F. Locatelli // Am. J. Kidney Dis.* – 2016. – № 67 (1). – P. 133–142.
6. *Livnah O., Johnson D. L., Stura E. A. et al.* An antagonist peptide-EPO receptor complex suggests that receptor dimerization is not sufficient for activation // *Nature Structural & Molecular Biology.* – 1998. – № 5 (11). – P. 993–1004.
7. *Сараева Н. О.* Использование рекомбинантного эритропоэтина в гематологической практике // *Сибир. мед. журн.* – 2006. – № 64 (6). – С. 5–10.
8. Исследование роли межклеточных взаимодействий в регуляции эритропоэза в эритробластических островках костного мозга / Ю. М. Захаров, И. Ю. Мельников, Н. В. Тишевская, С. А. Шевяков // *Вестн. Уральской мед. академ. науки.* – 2015. – № 55 (4). – С. 59–62.
9. Механизм влияния эритропоэтина на количественный состав лимфоцитов крови при экспериментальной термической травме / Т. В. Осиков, Е. В. Симонян, О. Т. Саедгалина, А. А. Федосов // *Соврем. проблемы науки и образования.* – 2016. – № 2. URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_25869790_84106576.pdf (дата обращения 18.12.2017).
10. *Rocha J., Eduardo-Figueira M., Barateiro A. et al.* Erythropoietin reduces acute lung injury and multiple organ failure/dysfunction associated to a scald-burn inflammatory injury in the rat // *Inflammation.* – 2015. – № 38 (1). – P. 312–326.

11. Lifshitz L., Avneon M., Prutchi-Sagiv S. et al. Immunomodulatory functions of Erythropoietin // Focus uni-luebeck Supplement. – № 28. – 2009.

12. Todosenko N. M., Shmarov V. A., Malashchenko V. V. et al. Erythropoietin exerts direct immunomodulatory effects on the cytokine production by activated human T-lymphocytes // Int. Immunopharmacol. – 2016. – № 36. – P. 277–281.

13. Wang S., Zhang C., Li J. et al. Erythropoietin protects against rhabdomyolysis-induced acute kidney injury by modulating macrophage polarization // Cell Death Dis. – 2017. – № 8 (4). – P. e2725.

14. Stimulating effect of erythropoietin on thymocyte energetics established in vitro with a potential-sensitive fluorescent probe in the mitochondria / G. I. Morozova, T. V. Parkhomenko, O. A. Klitsenko, V. V. Tomson // Biochem. Suppl. Series A: Membr. Cell Biology. – 2007. – № 1 (4). – P. 325–330.

15. Quantitative evaluation of erythropoietin (EPO) influence on rat T-lymphocytes / T. V. Parkhomenko, G. I. Morozova, O. A. Klytsenko, V. V. Tomson // Annals of Hematology. – 2000. – № 79 (5). – P. B8.

16. Evaluation of restoring erythropoietin (EPO) effect on rat T-lymphocytes after their treatment with some inhibitors in vitro // T. V. Parkhomenko, G. I. Morozova, O. A. Klytsenko, V. V. Tomson // Annals of Hematology. – 2003. – № 82 (6). – P. S114.

17. Артюхов В. Г., Путинцева О. В., Брагина В. А. и др. Флюоресцентные методы в исследовании УФ-индуцированных изменений структурно-функционального состояния лимфоцитов крови человека // Бюлл. эксперимент. биол. и мед. – 2012. – № 153 (6). – С. 891–895.

18. The erythropoietin (EPO) response of cells isolated from rat thymuses in vitro / T. V. Parkhomenko, G. I. Morozova, O. A. Klytsenko, V. V. Tomson // Focus uni-luebeck Supplement. – 2009. – № 32.

19. Futai M., Noumi T., Maeda M. ATP-synthase (H⁺-ATP-ASE) – results by combined biochemical and molecular biological approaches // Annual Review of Biochemistry. – 1989. – № 58. – P. 111–136.

20. Clejan L., Bosch C. G., Beattie D. S. Inhibition by dicyclohexylcarbodiimide of proton ejection but not electron-transfer in rat-liver mitochondria // Journal of Biological Chemistry. – 1984. – № 259 (21). – P. 13017–13020.

21. Linnane A., Lukins H., Nagley P. et al. Assembly of the yeast mitochondrial H⁺-ATP-ase correlative studies involving gene sequencing and immunochemical probes of assembly // Achievements and perspectives of mitochondrial research. – 1985. – № 1 (Bioenergetics). – P. 211–222.

REFERENCES

1. Jelkmann W., Gross A.J.(Eds.). Erythropoietin, Springer-Verlag Berlin Yeidelberg New York, 1989,180 p.

2. Osikov M.V., Grigoryev T.A., Fedosov A.A., Kozochkin D.A., Ilinykh M.A. Effect of erythropoietin on the functional activity of platelets. Modern problems of science and education. 2012. № 6. URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_23220530_33460976.pdf.

3. Baksheyev V. I., Kolomoyets N. M. Erythropoietin in clinical practice. Clinical medicine. 2007; 85 (9):30-37.

4. Biggar P, Kim GH. Treatment of renal anemia: Erythropoiesis stimulating agents and beyond. Kidney Res Clin Pract. 2017; 36(3):209-223.

5. Bonomini M¹, Del Vecchio L², Sirolli V³, Locatelli F². New Treatment Approaches for the Anemia of CKD. Am J Kidney Dis. 2016; 67(1):133-42.

6. Livnah O, Johnson DL, Stura EA, Farrell FX, Barbone FP, You Y, Liu KD, Goldsmith MA, He W, Krause CD, Pestka S, Jolliffe LK, Wilson IA. An antagonist peptide-EPO receptor complex suggests that receptor dimerization is not sufficient for activation. Nature Structural & Molecular Biology. 1998; 5 (11): 993–1004.

7. Saraeva N. About. The use of recombinant erythropoietin in haematological practice. Siberian medical journal. 2006; 64(6): 5-10. (in Russ.).

8. Zakharov Yu. M., Melnikov I. Y., Tasevska N. In. The sheviakov A. A. study of the role of intercellular interactions in the regulation of erythropoiesis in erythroblastosis islets of the bone marrow. Bulletin of the Ural medical academic science. 2015; 55(4):59-62. (in Russ.).

9. Osikov M.V., Simonyan E.V., Saedgalina O.T., Fedosov A.A. Mechanisms of erythropoietin influence on the quantitative composition of blood lymphocytes in experimental thermal injury. Modern problems of science and education. 2016. № 2. URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_25869790_84106576.pdf. (in Russ.).

10. Rocha J, Eduardo-Figueira M, Barateiro A, Fernandes A, Brites D, Pinto R, Freitas M, Fernandes E Mota-Filipe H, Sepodes B. Erythropoietin reduces acute lung injury and multiple organ failure/dysfunction associated to a scald-burn inflammatory injury in the rat. Inflammation. 2015; 38(1):312-26.

11. Lifshitz L., Avneon M., Prutchi-Sagiv S., Katz O., Gassmann M., Mittelman M., Neuman D. Immunomodulatory functions of Erythropoietin. Focus uni-luebeck Supplement. 2009; 28.

12. Todosenko NM¹, Shmarov VA¹, Malashchenko VV¹, Meniailo ME¹, Melashchenko OB¹, Gazatova ND, Goncharov AG¹, Seledtsov VP². Erythropoietin exerts direct immunomodulatory effects on the cytokine production by activated human T-lymphocytes. Int Immunopharmacol. 2016; 36:277-281.

13. Wang S^{1,2}, Zhang C^{1,2}, Li J^{1,2}, Niyazi S^{1,2}, Zheng L^{1,2}, Xu M^{1,2}, Rong R^{1,2,3}, Yang C^{1,2}, Zhu T¹. Erythropoietin protects against rhabdomyolysis-induced acute kidney injury by modulating macrophage polarization. Cell Death Dis. 2017; 8(4):e2725.

14. Morozova G.I., Parkhomenko T.V., Klitsenko O.A., Tomson V.V. Stimulating effect of erythropoietin on thymocyte energetics established *in vitro* with a potential-sensitive fluorescent probe in the mitochondria. Biochem. Suppl. Series A: Membr Cell Biology. 2007; 1 (4):325-330.

15. Parkhomenko T.V., Morozova G.I., Klytsenko O.A., Tomson V.V. Quantitative evaluation of erythropoietin (EPO) influence on rat T-lymphocytes. Annals of Hematology. 2000; 79 (5): B8.

16. Parkhomenko T.V., Morozova G.I., Klytsenko O.A., Tomson V.V. Evaluation of restoring erythropoietin (EPO) effect on rat T-lymphocytes after their treatment with some inhibitors in vitro. Annals of Hematology. 2003;82 (6):S114.

17. Artuhov VG, Putintzeta OV, Bragina VA, Pashkov MV, Vasilenko DV. Fluorescent methods in the research induced by UV radiation changes of structural and functional state of human blood lymphocytes. Bull Exp Biol Med 2012; 153(6):891-895.

18. Parkhomenko T.V., Morozova G.I., Klitsenko O.A., Tomson V.V. The erythropoietin (EPO) response of cells isolated from rat thymuses in vitro. Focus uni-luebeck Supplement. 2009:32.

19. Futai M., Noumi T., Maeda M. ATP - synthase (H⁺-ATP-ASE) – results by combined biochemical and molecular biological approaches. Annual Review of Biochemistry. 1989; 58:111-136.

20. Clejan L., Bosch C.G., Beattie D.S. Inhibition by dicyclohexylcarbodiimide of proton ejection but not electron-transfer in rat-liver mitochondria. Journal of Biological Chemistry. 1984; 259 (21):13017-13020.

21. Linnane A., Lukins H., Nagley P., Marzuki S., Hadikusumo R., Jean-Francois M., John U., Ooi B., Watkins L., Willson T., Wright J., Meltzer S. Assembly of the yeast mitochondrial H⁺-ATP-ASE correlative studies involving gene sequencing and immunochemical probes of assembly. Achievements and perspectives of mitochondrial research. 1985;1(Bioenergetics): 211-222.

Дата поступления статьи 29.06.2017 г.

Дата публикации статьи 02.04.2018 г.