

Wpływ rekombinowanej ludzkiej erytropoetyny na układ odpornościowy

The influence of recombinant human erythropoietin on the immune system

STRESZCZENIE

Erytropoetyna (EPO) jest hormonem produkowanym przez komórki śródmiąższowe nerki, który działa na komórki macierzyste erytrocytów, regulując ich proliferację i chroniąc przed apoptozą. Ze względu na budowę upodabniającą ją do czynników tkankowych o charakterze cytokin uważa się, że EPO poza wpływem na układ czerwonokrwinkowy może też regulować pracę układu odpornościowego. Przemawiają za tym wyniki licznych badań przeprowadzonych wśród chorych na przewlekłą chorobę nerek (PChN), którym podaje się rekombinowaną ludzką erytropoetynę (rhEPO) w celu wyrównania niedokrwistości, która jest nieodłącznym elementem tej choroby. W publikacji omówiono zaburzenia funkcjonowania układu odpornościowego z uwzględnieniem różnych rodzajów odpowiedzi immunologicznej. Przedstawiono też wyniki badań dotyczących pozytywnego wpływu leczenia za pomocą rhEPO u chorych hemodializowanych, które wskazują na istnienie wielu mechanizmów poprawy odpowiedzi immunologicznej u tych pacjentów. Artykuł ma na celu zwrócić uwagę na fakt, że poprawa funkcjonowania układu odpornościowego u pacjentów z PChN nie wydaje się być jedynie efektem korekcy niedokrwistości. Przemawia za tym zmiana ekspresji antygenów na limfocytach, dzięki którym możliwe są ich wzajemne relacje, poprawa proliferacji limfocytów T oraz zmiany w profilu cytokin u tych chorych. Owe zmiany mogą wynikać z naśladowania przez EPO działania innych cytokin bądź bezpośredniego wpływu na limfocyty i monocyty poprzez receptor dla EPO lub inne receptory z rodziny receptorów hematopoetyn, które charakteryzują się podobną budową i przekazują sygnał przez podobny system sygnalizacyjny w komórce.

Forum Medycyny Rodzinnej 2009, tom 3, nr 5, 359–366

słowa kluczowe: rekombinowana ludzka erytropoetyna, układ odpornościowy, limfocyty T CD4⁺, cytokiny

Katarzyna A. Lisowska^{1, 2},
Ewa Bryl², Jacek M. Witkowski²

¹Katedra i Klinika Nefrologii,
Transplantologii i Chorób Wewnętrznych
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
²Katedra i Zakład Fizjopatologii
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Adres do korespondencji:

dr n. med. Katarzyna A. Lisowska
Katedra i Zakład Fizjopatologii
GUMed
ul. Dębinki 7, 80–211 Gdańsk
e-mail: katlis@gumed.edu.pl

ABSTRACT

Erythropoietin (EPO) is a hormone produced by the interstitial kidney cells, which acts on the parent cells of the erythrocytes that regulate their proliferation and protect against apoptosis. In the light of their structure, in which they resemble tissue elements of a cytokine character, it is considered that EPO may, apart from its influence on the red blood cell system, regulate the work of the immune system. There is evidence for this in the large amount of research that has been conducted among chronic kidney disease patients, to whom recombinant human erythropoietin (rhEPO) is given in order to correct the anaemia, which is inherent in their condition. Published work deals with disturbances to the operation of the immune system because of various types of immunological response. Also published have been the results of research concerning the favourable effect of treatment using rhEPO to help patients in haemodialysis, and these indicate the existence of a number of mechanisms that improve the immunological response in these patients. The aim of the present article is to draw attention to the fact that improvement in the function of the immune system in patients with chronic kidney disease does not seem to be solely the result of correction of anaemia. Evidence for this is a change in the expression of antigens on lymphocytes, which their mutual interactions, correction of the proliferation of T and B lymphocytes and changes in the cytokine profiles of these patients. These changes may result from EPO imitating the action of other cytokines or from a direct effect on the lymphocytes and monocytes via EPO receptor or other receptors of the haematopoietin receptor family, which are characterised by a similar structure and which transmit a signal through the similar signalling system in the cell.

Family Medicine Forum 2009, vol. 3, nr 5, 359–366

key words: recombinant human erythropoietin, immune system, CD4⁺ T lymphocytes

Erytropoetyna — glikoproteina produkowana przez komórki śródmiąższowe nerki, działa na komórki macierzyste erytrocytów (tzw. progenitory erytropoezy), regulując ich proliferację i promując przeżycie w odpowiedzi na niskie stężenie tlenu [1]. Ze względu na budowę upodobniającą ją do czynników tkankowych o charakterze cytokin uważa się, że erytropoetyna (EPO, *erythropoietin*) poza wpływem na układ czerwonokrwinkowy może też regulować pracę układu odpornościowego. Przemawia też za tym struktura receptora dla erytropoetyny (EPO-R, *erythropoietin receptor*), który należy do rodziny receptorów hematopoetyn i swoją budową przypomina receptory dla interleukin (IL, *interleukins*):

IL-3, IL-5 czy podjednostkę β receptora dla IL-2 również należącej do tej rodziny [2].

Wyizolowanie z moczu pacjentów z niedokrwistością złośliwą EPO przyczyniło się do poznania struktury hormonu, a następnie sklonowania genu kodującego go, czego dokonali Jacobs i wsp. oraz Lin i wsp. w 1985 roku [3, 4]. W 2000 roku po raz pierwszy zostały określone zasady leczenia niedokrwistości za pomocą rekombinowanej ludzkiej erytropoetyny (rhEPO, *recombinant human erythropoietin*) u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek (PChN). Choroba ta oraz leczenie pacjentów polegające na powtarzanych hemodializach przyczynia się do rozwoju niedokrwistości wynikającej z niedoboru EPO spowodowanej nieadekwatną pro-

dukcją tego hormonu przez uszkodzoną tkankę nerkową. Rekombinowana ludzka erytropoetyna, która w porównaniu z formą natywną charakteryzuje się dłuższym okresem półtrwania oraz zwiększoną aktywnością biologiczną, przyczynia się do wyrównania niedokrwistości, a co za tym idzie — poprawy stanu ogólnego chorych na PChN.

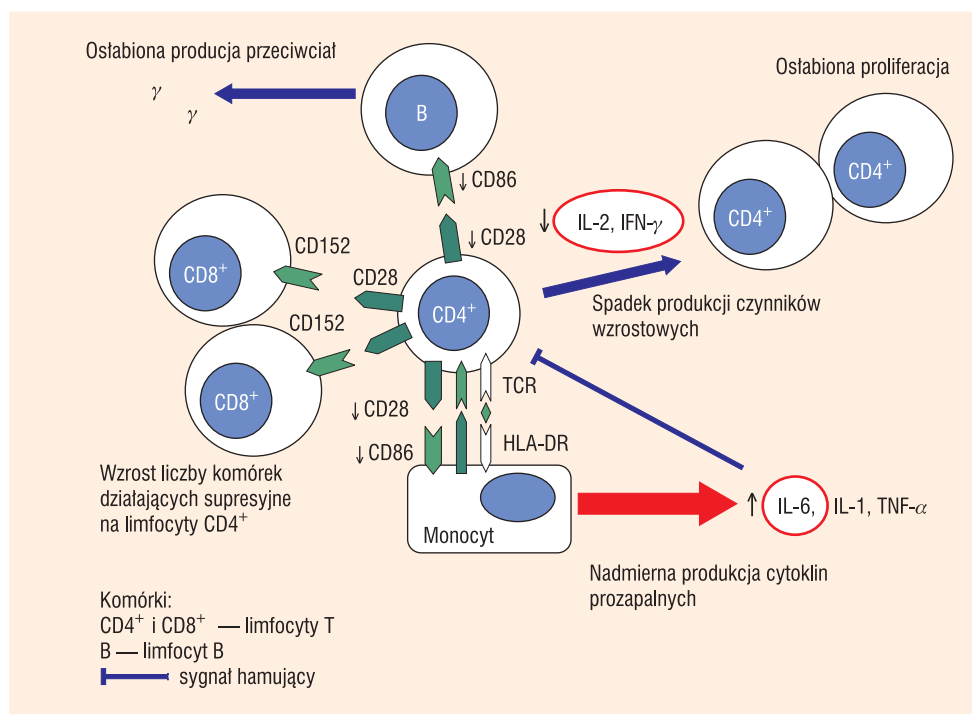
Leczenie za pomocą rhEPO, obok działania bezpośredniego na układ czerwonokrwinkowy, powoduje w organizmie wiele innych zmian, które trudno wytłumaczyć jedynie korekcją niedokrwistości. Jednym z pozytywnych aspektów stosowania rhEPO jest poprawa funkcjonowania układu odpornościowego chorych na PChN.

U pacjentów z PChN przed podaniem rhEPO obserwuje się zaburzenia w odpowiedzi immunologicznej nieswoistej, komórkowej i humoralnej. Zaburzenia w odpowiedzi nieswoistej związane są z nadmierną produkcją cytokin prozapalnych: czynnika martwicy nowotworu α (TNF- α , *tumor necrosis factor α*), IL-1 oraz IL-6 [5, 6] (ryc. 1). Uważa się, że nadmierna produkcja cytokin jest

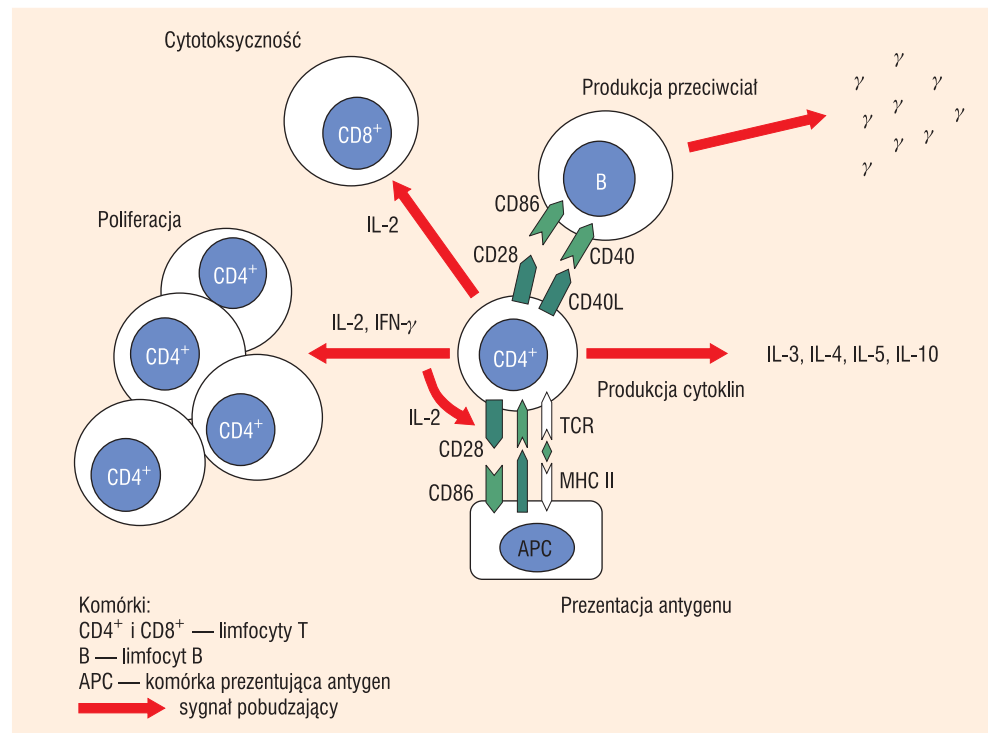
wynikiem stanu zapalnego będącego rezultatem postępującej mocznicy, a także przewlekłej stymulacji monocytów [7]. Monocyty są stymulowane przez endotoksyny i niskocząsteczkowe fragmenty LPS przechodzące przez barierę krew/błona dializacyjna w trakcie procesu hemodializy [7].

Kolejne zmiany dotyczące zaburzeń w odpowiedzi immunologicznej są związane z funkcjonowaniem limfocytów T CD4⁺, które pełnią centralną rolę w układzie odpornościowym (ryc. 2). Limfocyty T CD4⁺ aktywowane w trakcie prezentacji antygeny regulują odpowiedź limfocytów T CD8⁺, limfocytów B czy NK (*natural killers*). U pacjentów z PChN limfocyty T CD4⁺ charakteryzują się obniżoną reakcją przejawiającą się między innymi obniżoną produkcją IL-2 oraz IFN- γ w odpowiedzi na stymulację mitogenową [8]. U osoby zdrowej limfocyty CD4⁺ mogą różnicować się w komórki pomocnicze typu 1 (Th1, *T helper 1 cells*) lub typu 2 (Th2, *T helper 2 cells*). Komórki Th1 promują odpowiedź typu komórkowego, podczas gdy komórki Th2 stymulują limfo-

Rekombinowana ludzka erytropoetyna, która w porównaniu z formą natywną charakteryzuje się dłuższym okresem półtrwania oraz zwiększoną aktywnością biologiczną, przyczynia się do wyrównania niedokrwistości



Rycina 1. Zaburzenia funkcjonowania układu odpornościowego u chorych na PChN



Rycina 2. Prawidłowa reakcja układu odpornościowego w odpowiedzi na antygen

cyty B do produkcji przeciwciał. U pacjentów hemodializowanych dominują komórki Th1, ale paradoksalnie linia ta charakteryzuje się obniżoną produkcją IL-2 oraz IFN- γ (ryc. 1). Uważa się, że jest to rezultat hamującego działania IL-6 produkowanej w dużej ilości przez monocyty.

Limfocyty B u pacjentów z PChN charakteryzują się zmniejszoną zdolnością do produkcji przeciwciał, czego klinicznym wyrazem jest osłabiona odpowiedź na szczepienia przeciwko wirusowemu zapaleniu wątroby typu B [9]. Ponieważ ich funkcjonowanie zależy od pobudzenia limfocytów T CD4⁺, defekt w ich reakcjach wydaje się być rezultatem wymienionych wcześniej zaburzeń tych komórek. Co więcej, charakteryzują się one obniżoną ekspresją antygenu CD86, który, wiążąc się z limfocytym T poprzez antygen CD28, przyczynia się do pobudzenia produkcji IL-2 [10]. Wydaje się więc, że może to być kolejny czynnik wpływający na zaburzenie produkcji IL-2 u hemodializowanych chorych.

Najwięcej danych dotyczących korzystnego wpływu rhEPO na układ odpornościowy pochodzi z badań prowadzonych wśród chorych na PChN, którym podaje się lek celem wyrównania niedokrwistości. Wykazano, że podanie rhEPO pacjentom hemodializowanym wpływa na stężenie IL-10 oraz TNF- α produkowanych przez jednojądrzaste komórki krwi obwodowej. Stężenie TNF- α ulega spadkowi w ciągu pierwszych tygodni od podania rhEPO i utrzymuje się na obniżonym poziomie przez kolejne miesiące leczenia, podczas gdy stężenie antyzapalnej IL-10 wzrasta [11]. Spadek stężenia TNF- α jest najprawdopodobniej efektem działania IL-10, której rola polega między innymi na hamowaniu produkcji TNF i IL-1 wydzielanych przez zaktywowane makrofagi [12].

Kolejna zmiana u pacjentów leczonych rhEPO, przemawiająca za poprawą funkcjonowania limfocytów T, to wzrost stężenia IL-2 [13]. Interleukina 2 jest cytokiną pośredniczącą w odpowiedzi komórkowej

i nieznan jest mechanizm, w jaki rhEPO może pobudzać jej produkcję. Jedną z hipotez mówi o działaniu rhEPO na podjednostkę β receptora dla IL-2, która wraz z EPO-R należy do jednej rodziny receptorów dla hematopoetyn i charakteryzuje się obecnością konserwowanej ewolucyjnie sekwencji aminokwasowej w domenie cytoplazmatycznej, która jest niezbędna dla przekazywania sygnału do jądra komórki [14]. Istnieje też możliwość, że na limfocytach istnieje niezależny receptor dla EPO, na co może wskazywać fakt, że kontakt rhEPO z komórkami linii limfoidalnych aktywuje czynnik transkrypcyjny STAT5 z rodziny czynników transkrypcyjnych STAT (*signal transducer and activator of transcription*) i fosforylację białek będących jego substratami [15].

U pacjentów leczonych rhEPO obserwuje się też spadek odsetka komórek CD8⁺CD152⁺ [16], które to w układzie odpornościowym wykazują działanie supresyjne polegające na hamowaniu aktywacji limfocytów T CD4⁺. Antygen CD152 rywalizuje z antygenem ko-stymulującym CD28 o wiązanie z antygenami CD80/CD86 na komórkach prezentujących antygen (APC, *antigen presenting cell*) [17]. Antygen CD152, może wiązać cząsteczkę CD80 kilkadziesiąt razy silniej niż antygen CD28, a tym samym zakłócać odpowiedź limfocytów T na stymulację antygenową bądź mitogenową [17, 18]. Wydaje się, że u pacjentów z PChN krążące we krwi limfocyty CD8⁺CD152⁺ mogą być bezpośrednią przyczyną zmniejszonej stymulacji limfocytów T i obniżonej produkcji IL-2, ale podanie rhEPO wywołuje apoptozę (programowaną śmierć komórkową) tychże limfocytów, znosząc ich supresyjne działanie [19]. Efekt ten jest odmienny od wpływu wywieranego przez EPO na komórki układu czerwono krwinkowego, gdzie hormon ten chroni progenitory erytropoezy przed apoptozą i umożliwia ich dalsze różnicowanie [20].

Wyniki kolejnych badań prowadzonych wśród hemodializowanych pacjentów leczo-

nych rhEPO wskazują na poprawę zdolności proliferacyjnej limfocytów T w odpowiedzi na stymulatory typu konkawalina A (ConA, *concanavalin A*) czy przeciwciała anty-CD3 [21]. Wyniki te potwierdzone były zarówno dzięki użyciu metody izotopowej oceniającej wbudowywanie radioaktywnej tymidyny [22], jak i nowoczesnej metody DCT (*dividing cell tracking*) stosującej znacznik fluorescencyjny CFSE (*carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*) (obserwacje własne — praca w druku). Metoda DCT w połączeniu z oznaczeniem fenotypu powierzchniowego pozwoliła wykazać, że zaburzenia proliferacyjne limfocytów T, a konkretnie populacji CD4⁺CD28⁺, u pacjentów przed leczeniem za pomocą rhEPO wynikają z wydłużonego, w stosunku do osób zdrowych oraz leczonych rhEPO, czasu pomiędzy fazą spoczynkową (G0) a pierwszą fazą cyklu komórkowego (G1). Cecha ta była skorelowana z obniżoną ekspresją antygeny ko-stymulującego CD28 oraz antygeny aktywacyjnego CD69 na tych komórkach (obserwacje własne — praca w druku). Tu warto zwrócić uwagę na kolejną zależność pomiędzy niską ekspresją CD28 a wysokim stężeniem TNF- α u pacjentów przed leczeniem za pomocą rhEPO, gdyż udowodniono, że TNF- α wpływa na poziom antygeny CD28, hamując aktywność promotora dla genu CD28, czyli działając bezpośrednio na mechanizm transkrypcji tego genu [23].

Dalsze obserwacje potwierdzają również poprawę w zakresie odpowiedzi humoralnej przejawiającej się lepszą odpowiedzią na szczepienie przeciwko wirusowemu zapaleniu wątroby typu B u pacjentów hemodializowanych leczonych rhEPO [24]. Odpowiedź limfocytów B rozumiana jako pobudzenie proliferacji oraz produkcja przeciwciał jest zależna od prawidłowego funkcjonowania limfocytów T oraz odpowiedniego poziomu IL-10. Wydaje się więc, że rhEPO przywraca prawidłowe zależności pomiędzy komórkami układu odpornościowego.

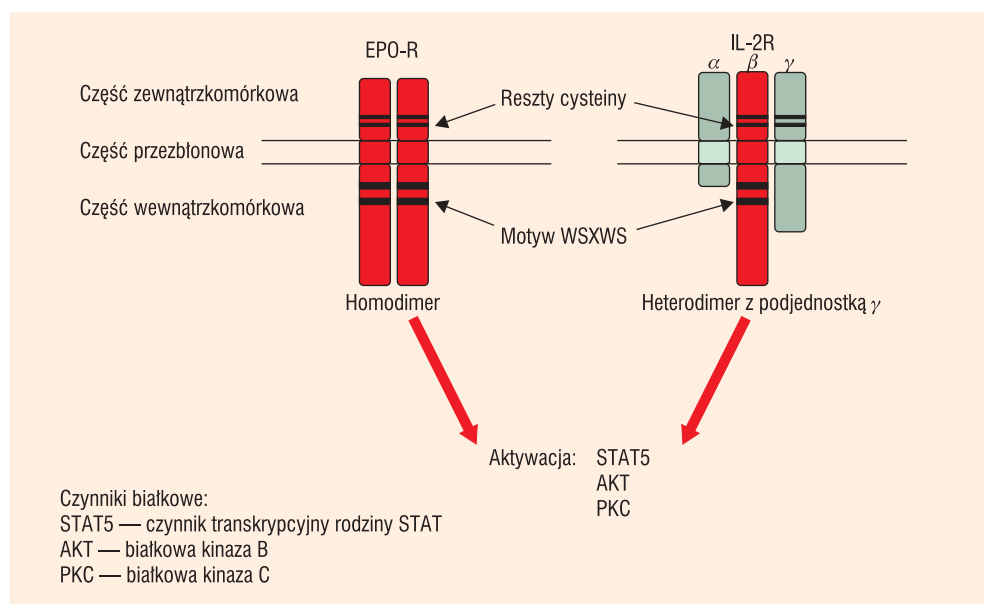


Wydaje się, że rhEPO przywraca prawidłowe zależności pomiędzy komórkami układu odpornościowego

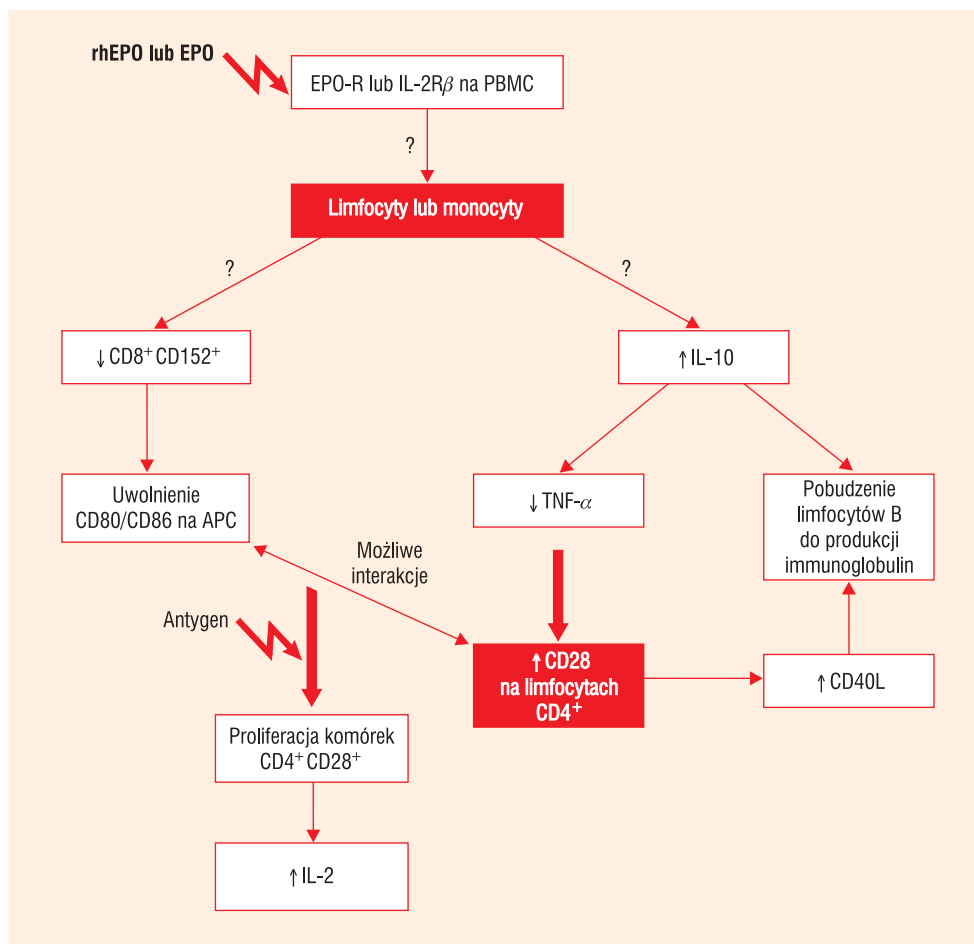
Wyniki powyższych badań są dowodem na to, że EPO oddziałuje na komórki układu odpornościowego. Nieznany jest jednak mechanizm tego działania. Można założyć, że na komórkach układu odpornościowego jest, podobnie jak na komórkach linii erytrocytarnej, obecny receptor dla EPO. Jednak do tej pory EPO-R został wykryty jedynie na granulocytach [25]. Prawdopodobnie dotychczas stosowane metody nie były wystarczająco czułe bądź receptor pojawia się na limfocytach na skrajnie niskim poziomie. Inna możliwość to działanie EPO na komórki T bądź B poprzez inne receptory z rodziny receptorów hematopoetyń (np. przez podjednostkę β receptora dla IL-2), które charakteryzują się podobną budową i przekazują sygnał przez podobny system sygnalizacyjny w komórce (ryc. 3).

Przypuszczalny schemat funkcjonowania rhEPO lub EPO w układzie odpornościowym został przedstawiony na rycinie 4. Podanie rhEPO wpływa na obniżenie odsetka komórek $CD8^+CD152^+$, co powoduje uwolnienie antygenów $CD80/CD86$ na APC. Kolejnym następstwem leczenia za pomocą rhEPO jest wzrost stężenia IL-10 przy jednoczesnym spadku stężenia $TNF-\alpha$, który może przyczyniać się do wzrostu ekspresji antygeny $CD28$ na limfocytach T $CD4^+$. Limfocyty T $CD4^+$

o prawidłowym poziomie antygeny $CD28$ mogą prawidłowo reagować na pojawienie się antygeny, co przejawia się poprawą ich proliferacji, a także wzrostem produkcji IL-2. Wzrost stężenia IL-10 może być jednym z czynników stymulujących limfocyty B do produkcji przeciwciał. Jest to zatem wiele mechanizmów poprawy odpowiedzi immunologicznej u pacjentów leczonych rhEPO, czego klinicznym wyrazem jest ogólne polepszenie odpowiedzi komórkowej, humoralnej oraz nieswoistej u tych chorych. Możliwe więc, że EPO w układzie odpornościowym naśladuje działanie innych cytokin, tym samym modulując odpowiedź limfocytów T oraz B. Nie można wykluczyć jednak takiej możliwości, jaką jest bezpośrednie działanie EPO poprzez swój receptor bądź też inne receptory z rodziny receptorów hematopoetyń, które charakteryzują się obecnością podobnych sekwencji odpowiedzialnych za wiązanie liganda oraz przekazują informację z powierzchni komórek do jądra komórkowego między innymi przez czynnik STAT5 [25]. Konieczne są więc dalsze badania, które będą w stanie wyjaśnić, w jaki sposób EPO bądź rhEPO może modulować aktywność limfocytów oraz stężenie cytokin pro- i antyzapalnych.



Rycina 3. Schemat budowy receptora dla EPO oraz dla IL-2



Rycina 4. Proponowany schemat reakcji układu immunologicznego na podanie rhEPO

PIŚMIENICTWO

- Eckardt K.U. Erythropoietin production in liver and kidneys. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 1996; 5: 28–34.
- Ihle J.N. Cytokine receptor signaling. *Nature* 1995; 377: 591–594.
- Jacobs K., Shoemaker C., Rudersdorf R. i wsp. Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature* 1985; 313: 806–810.
- Lin F.K., Suggs S., Lin C.H., Browne J.K. i wsp. Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1985; 82: 7580–7584.
- Cavaillon J.M., Poignet J.L., Fitting C., Delons S. Serum interleukin-6 in long-term hemodialyzed patients. *Nephron* 1991; 60: 307–313.
- Herbelin A., Nguyen A.T., Zingraff J., Urena P., Descamp-Latscha B. Influence of uremia and hemodialysis on circulating interleukin-1 and tumor necrosis factor. *Kidney Int.* 1990; 37: 116–125.
- Lonnemann G., Linnenweber S., Burg M., Koch K.M. Transfer of endogenous pyrogens across artificial membranes? *Kidney Int. Suppl.* 1998; 53: S43–S46.
- Gerez L., Madar L., Shkolnik T. i wsp. Regulation of interleukin-2 and interferon-gamma gene expression in renal failure. *Kidney Int.* 1991; 40: 266–272.
- Docci D., Cipolloni P.A., Baldrati L., Capponcini C., Turci F., Feletti C. Immune response to a recombinant hepatitis B vaccine in hemodialysis patients. *Int. J. Artif. Organs* 1990; 13: 451–453.
- Girndt M., Sester M., Sester U., Kaul H., Kohler H. Defective expression of B7-2 (CD86) on monocytes of dialysis patients correlates to the uremia-associated immune defect. *Kidney Int.* 2001; 59: 1382–1389.
- Bryl E., Myśliwska J., Dębska-Ślizień A. i wsp. The influence of recombinant human erythropoietin on tumor necrosis factor alpha and interleukin-10 production by whole blood cell culture in hemodialysis patients. *Artif. Organs* 1998; 22: 177–181.
- Fiorentino D.F., Zlotnik A., Mosmann T.R., Howard M., O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine pro-

- duction by activated macrophages. *J. Immunol.* 1991; 147: 3815–3822.
13. Bryl E., Myśliwska J., Dębska-Ślizień A. i wsp. Recombinant human erythropoietin stimulates production of interleukin 2 by whole blood cell cultures of hemodialysis patients. *Artif. Organs* 1999; 23: 809–816.
 14. Tilbrook P.A., Klinken S.P. The erythropoietin receptor. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 1999; 31: 1001–1005.
 15. Pallard C., Gouilleux F., Charon M., Groner B., Gisselbrecht S., Dusanter-Fourt I. Interleukin-3, erythropoietin and prolactin activate a STAT5-like factor in lymphoid cells. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 15942–15945.
 16. Trzonkowski P., Myśliwska J., Dębska-Ślizień A. i wsp. Long-term therapy with recombinant human erythropoietin decreases percentage of CD152(+) lymphocytes in primary glomerulonephritis haemodialysis patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2002; 17: 1070–1080.
 17. Walunas T.L., Lenschow D.J., Bakker C.Y. i wsp. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* 1994; 1: 405–413.
 18. Linsley P.S., Greene J.L., Tan P. i wsp. Coexpression and functional cooperation of CTLA-4 and CD28 on activated T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 1992; 176: 1595–1604.
 19. Trzonkowski P., Dębska-Ślizień A., Szmit E. i wsp. Long-term therapy with recombinant human erythropoietin increases CD8⁺ T-cell apoptosis in haemodialysis patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2005; 20: 367–376.
 20. Moritz K.M., Lim G.B., Wintour E.M. Developmental regulation of erythropoietin and erythropoiesis. *Am. J. Physiol.* 1997; 273: R1829–R1844.
 21. Shurtz-Swirski R., Kristal B., Shkolnik T., Weisman I., Shapiro G., Shasha S.M. Short-term effect of erythropoietin on T-cell mitogenic proliferation in chronic renal failure patients. *Nephron* 1996; 72: 27–29.
 22. Bryl E., Vallejo A.N., Weyand C.M., Goronzy J.J. Down-regulation of CD28 expression by TNF- α . *J. Immunol.* 2001; 167: 3231–3238.
 23. Schaefer R.M., Paczek L., Berthold G., Gilge U., Heidland A. Improved immunoglobulin production in dialysis patients treated with recombinant erythropoietin. *Int. J. Artif. Organs* 1992; 15: 204–208.
 24. Sela S., Shurtz-Swirski R., Sharon R. i wsp. The polymorphonuclear leucocyte — a new target for erythropoietin. *Nephron* 2001; 88: 205–210.
 25. Klingmüller U., Bergelson S., Hsiao J.G., Lodish H.C. Multiple tyrosine residues in the cytosolic domain of the erythropoietin receptor promote activation of STAT5. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996; 93: 8324–8328.