

ФАРМАКОЛОГИЯ СИСТЕМЫ КРОВИ

ВЛИЯНИЕ КОЛХИЦИНА И ЙОД-ЛИТИЙ- α -ДЕКСТРИНА НА ФАГОЦИТОЗ ГРАНУЛОЦИТОВ И МОНОЦИТОВ ПРИ СЕМЕЙНОЙ СРЕДИЗЕМНОМОРСКОЙ ЛИХОРАДКЕ

В. П. Акопян, С. А. Аветисян, Т. К. Давтян¹

Изучены нарушения в регуляции фагоцитарной активности нейтрофилов и моноцитов цельной периферической крови больных семейной средиземноморской лихорадкой (ССЛ), не получавших колхициновую терапию, методом количественного проточно-цитофлюориметрического исследования. Исследовано влияние йод-литий- α -декстрина (арменикума)² и колхицина на фагоцитарную активность нейтрофилов и моноцитов больных ССЛ *in vitro*. Показано, что в популяции нейтрофилов и моноцитов больных ССЛ в межприступном периоде ($n = 6$) активность и интенсивность фагоцитоза повышена по сравнению с тем же показателем во время приступа ($n = 6$) и у здоровых доноров ($n = 9$). Интенсивность фагоцитоза нейтрофилов и моноцитов у больных во время приступа повышена по сравнению со здоровыми донорами. Установлена способность йод-литий- α -декстрина (арменикум) и колхицина ингибировать фагоцитоз эффекторных клеток больных ССЛ дозо- и времязависимым образом. Показано, что подавляющий эффект препаратов усиливается при уменьшении соотношения бактерии/клетки – мишени.

Ключевые слова: семейная средиземноморская лихорадка, фагоцитоз, нейтрофилы, моноциты, йод-литий- α -декстрин, колхицин

ВВЕДЕНИЕ

Семейная средиземноморская лихорадка (ССЛ), или периодическая болезнь — аутосомно-рецессивное воспалительное заболевание, чаще всего встречающееся у народов средиземноморского бассейна (армян, евреев, арабов). Характерной особенностью ССЛ являются периодически возникающие и длящиеся 2–3 дня лихорадка и боль, обусловленные асептическим серозитом. Частота приступов колеблется в широких пределах — от одного раза в год до нескольких раз в месяц. В межприступном периоде при отсутствии осложнений больные чувствуют себя практически здоровыми. ССЛ часто осложняется вторичным амилоидозом с преимущественным поражением почек, что усложняет прогноз заболевания [1].

Литературные данные о состоянии фагоцитарной активности нейтрофилов и моноцитов при ССЛ противоречивы. В ранее проведенных исследованиях отмечено отсутствие каких-либо изменений фагоцитарной активности нейтрофилов или обнаружено снижение фагоцитарной активности моноцитов [7]. Необходимо отметить также, что повышение фагоцитарной активности моноцитов/макрофагов рассматривается в качестве главного механизма амилоидогенеза при ССЛ [1].

С целью изучения нарушений в регуляции фагоцитарной активности гранулоцитов и моноцитов провели проточно-цитофлюориметрические исследования цельной периферической крови больных ССЛ, не получавших колхициновую терапию. Исследовано также влияние колхицина и йод-литий- α -декстрина на фагоцитарную активность нейтрофилов и моноцитов больных ССЛ.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Периферическая кровь. Исследована периферическая кровь 12 больных ССЛ возрастной группы 18–27 лет. У всех больных первые приступы, характерные для ССЛ, проявились в раннем детском возрасте. Все больные не получали колхицин и не имели амилоидоза. Больные первой группы ($n = 6$) исследованы во время приступа, а второй ($n = 6$) — в межприступном периоде. Периферическую кровь больных и 9 здоровых доноров (Банк крови “Виола”) забирали в пробирках, содержащих литий-гепарин (Vacuet, Greiner). Гематологические показатели периферической крови определяли с помощью автоматического клеточного анализатора Celly v2.20 (Hycel Diagnostics).

¹ Кафедра фармакологии и кафедра патофизиологии Ереванского государственного медицинского университета им. М. Гераци, Армения, Ереван, 375025, ул. Корюна, 2. Исследовательский центр “Арменикум”, Ереван, Армения.

² Комплекс йод-литий- α -декстрина (Арменикум) представляет из себя комплексное соединение, содержащее элементарный йод и литий, связанные с полисахаридным носителем — α -декстрином и поливиниловым спиртом. Поливиниловый спирт добавлен с целью повышения водорасворимости препарата, благодаря своим поверхностно-активным свойствам. Структура препарата “Арменикум” рассмотрена в статье Т. К. Davtyan и соавт., Electronic Journal of Natural Sciences, 2004, vol. № 3, 22 – 30.

Количественное определение фагоцитоза гранулоцитов и моноцитов. Цитофлуориметрическое исследование фагоцитоза проводили при помощи тест-системы Phagotest (Orpegen Pharma). Для этого к 100 мкл цельной крови добавляли опсонизированные *E. coli* – FITC в количестве $1 - 2 \cdot 10^7$ и пробы нормализовали по отношению к абсолютному содержанию гранулоцитов в образцах. В исследовании мы придерживались соотношения *E. coli*/клетки-эффекторы 25:1. Пробы инкубировали при 37 °С в течении 10 мин, а контрольные пробы оставляли на льду. Реакцию фагоцитоза останавливали добавлением раствора кумасси, подавляющего флуоресценцию незахваченных клетками *E. coli* – FITC. После удаления эритроцитов лизирующим раствором во избежание появления артефактов при подсчете агрегированных бактерий ДНК фагоцитов окрашивали пропидий йодидом. Количество фагоцитирующих клеток и интенсивность процесса фагоцитоза определяли на цитофлуориметре FACS Calibur™ с пакетом программы CellQuest (Becton Dickinson).

Влияние фармакологических препаратов на фагоцитарную активность. Использованы колхицин (“Sigma”), йод-литий- α -декстрин (арменикум) (Арм) (производство ЗАО Арменикум, Армения). Растворы Арм готовили непосредственно перед использованием, разводя препарат в физиологическом растворе [6]. При изучении влияния указанных препаратов на фагоцитарную активность нейтрофилов и моноцитов цельной крови аликвоты образцов по 1 мл инкубировали в присутствии различных концентраций препаратов в течение 1–3 ч при 37 °С. После завершения инкубации проводили нормализацию соотношения *E. coli* – FITC/клетки – эффекторы и проводили проточную цитофлуориметрию как описано выше.

При статистическом анализе контрольной и опытной групп проводили проверку вариационных рядов на нормальность распределения и однородность дисперсий (критерий Колмогорова – Смирнова, W- и F-критерий). В случаях, когда гипотеза нормальности отвергалась, использовались непараметрические критерии Уилкоксона – Манна – Уитни (p_y). В остальных случаях расчет проводили с помощью критерия Стьюдента (p_t) и парного T-критерия (p_p).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 представлены типичные результаты определения фагоцитоза клеток методом проточной цитофлуориметрии путем сепарации клеточных популяций по характерным параметрам поверхностной грануляции (SSC) и размерам (FSC), а также обработкой клеток пропидий йодидом, который позволяет отличать популяцию агрегированных бактерий от фагоцитирующих клеток по интенсивности флуоресценции (рис. 1, а и б). Квадратичная статистика популяций клеток в дот-плотах “FSC-*E. coli* – FITC” дает информацию о процентном содержании клеток, способных захватывать бактерии (активность фагоцитоза), а гистограммная статистика – об относительной способности единичной клетки захватывать определенное коли-

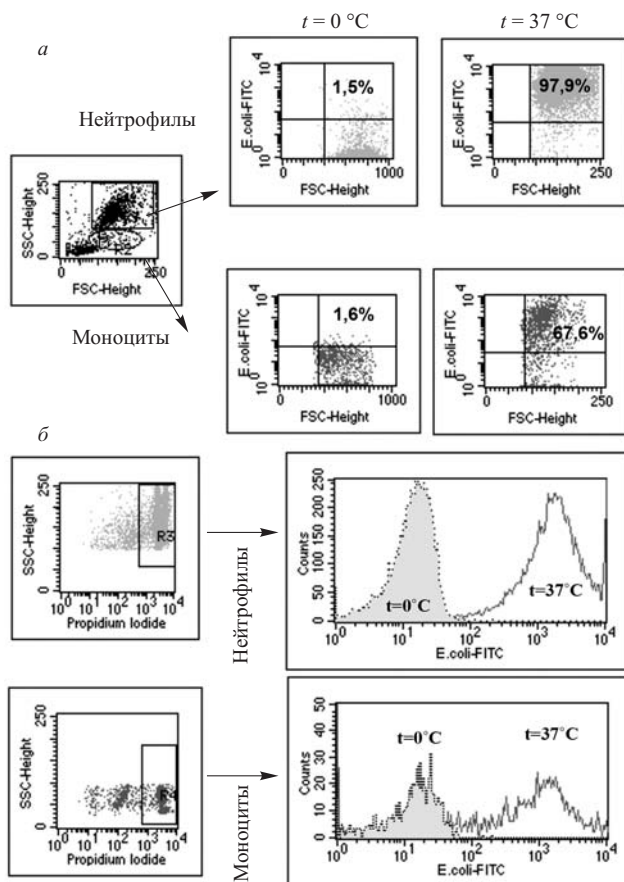


Рис. 1. Количественное цитофлуориметрическое определение фагоцитоза гранулоцитов и моноцитов в цельной периферической крови: а — сепарация клеток по маркерам SSC и FSC и последующий анализ активности фагоцитоза в соответствующих дот-плотах; б — сепарация фагоцитирующих клеток, позитивных по окрашиванию пропидий йодидом, и последующий анализ интенсивности фагоцитоза в соответствующих гистограммах.

чество бактерий (интенсивность фагоцитоза). Этот показатель наиболее удобно представить как геометрический средний номер канала флуоресценции (СНК) в гистограммах “число клеток – *E. coli* – FITC” (рис. 1).

Из данных, представленных в таблице, следует, что фагоцитарная активность и интенсивность фагоцитоза у больных ССЛ в межприступном периоде статистически достоверно повышена в популяциях нейтрофилов и моноцитов. Активность фагоцитоза нейтрофилов и

Фагоцитоз нейтрофилов и моноцитов больных семейной средиземноморской лихорадкой (ССЛ)

Цельная кровь	Активность фагоцитоза		Интенсивность фагоцитоза (СНК)	
	Нейтрофилы	Моноциты	Нейтрофилы	Моноциты
Здоровые доноры (n = 9)	97,9 ± 0,4	65,3 ± 1,7	1116 ± 45,8	951,5 ± 46,2
Больные ССЛ в межприступном периоде (n = 6)	98,7 ± 0,1 ^a	80,5 ± 4 ^b	2073 ± 38,8 ^c	1759 ± 84,3 ^c
Больные ССЛ во время приступа (n = 6)	97,6 ± 0,6 ^{d,e}	67,3 ± 4,1 ^{d,f}	1729 ± 75,5 ^{b,d}	1310 ± 105 ^{b,d}

Примечания: ^a — $p_t < 0,05$; ^b — $p_t < 0,01$; ^c — $p_t < 0,001$ при сравнении больных ССЛ со здоровыми донорами; ^d — $p_t > 0,05$ во время приступа с больными в межприступном периоде; ^e — $p_t = 0,05$; ^f — $p_t < 0,05$ во время приступа с больными в межприступном периоде.

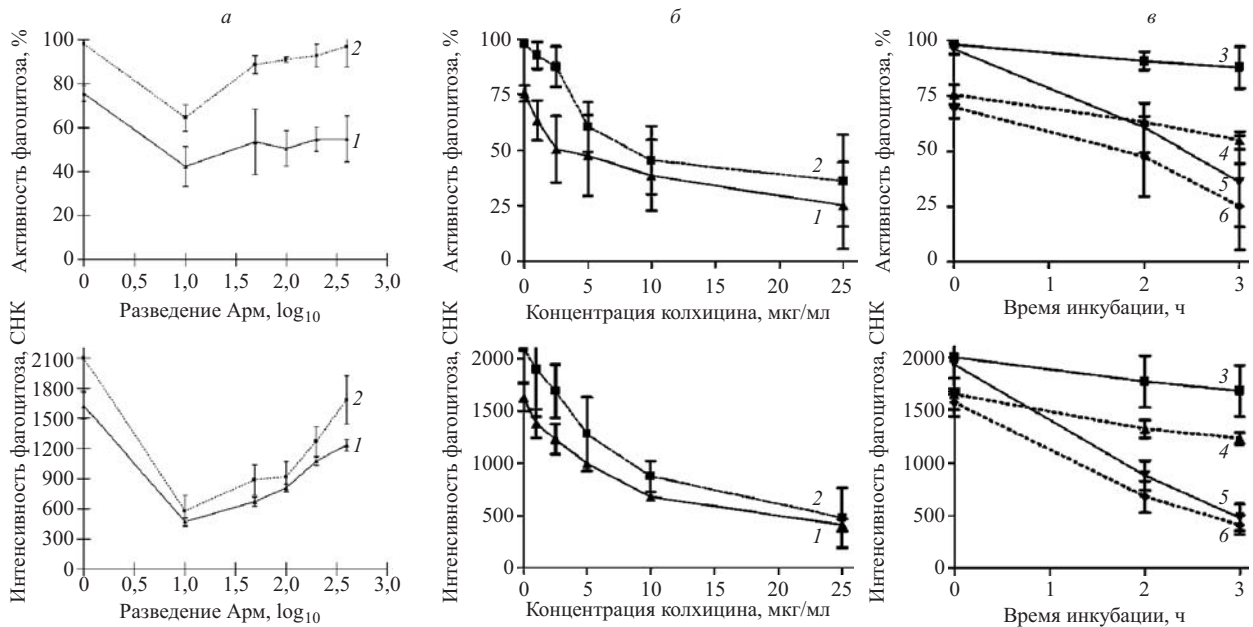


Рис. 2. Влияние арменикума и колхицина на фагоцитоз нейтрофилов и моноцитов больных семейной средиземноморской лихорадкой в зависимости от дозы (а, б) и времени инкубации (в).

1 — моноциты, 2 — нейтрофилы, 3 — нейтрофилы + арменикум, 4 — моноциты + арменикум, 5 — нейтрофилы + колхицин, 6 — моноциты + колхицин.

моноцитов у больных ССЛ во время приступа не отличается от показателей здоровых доноров. В то же время у больных во время приступа, по сравнению с группой здоровых доноров, остается повышенной лишь интенсивность фагоцитоза эффекторными клетками.

Таким образом, полученные данные указывают на усиление активности и интенсивности фагоцитоза нейтрофилов и моноцитов в межприступном периоде ССЛ. Поэтому важное значение приобретает изучение фармакологической регуляции активности эффекторных клеток воспаления именно в этом периоде. Исходя из этого, мы проводили дальнейшее исследование с использованием цельной периферической крови только больных ССЛ в межприступном периоде.

Изучение влияния колхицина на фагоцитоз нейтрофилов и моноцитов периферической крови больных ССЛ (рис. 2, а) показал, что колхицин в концентрации 1–5 мкг/мл не влияет на фагоцитоз эффекторных клеток, однако при концентрации 10–25 мкг/мл значительно подавляет как интенсивность, так и активность фагоцитоза в обеих популяциях клеток ($p_1 < 0,001$ и $p_1 < 0,0001$). Подавляющий эффект колхицина носит времязависимый характер и достигает максимума после 2–3 ч инкубации клеток (рис. 2, в). Ингибирующий эффект колхицина на фагоцитоз моноцитов и нейтрофилов значительно увеличивается при снижении соотношения *E. coli*/клетки – эффекторы в 2 раза ($p_1 < 0,0001$).

Как видно из представленных на рис. 2, б данных, Арм в разведении 1:10–1:100 в течение 2 ч инкубации с цельной периферической кровью больных ССЛ значительно подавлял как активность, так и интенсивность фагоцитоза нейтрофилов ($p_1 < 0,04$ и $p_y < 0,009$).

В разведении 1:200–1:400 препарат подавлял интенсивность фагоцитоза нейтрофилов ($p_p < 0,05$), но не влиял на его активность. Подавляющее действие Арм на моноциты периферической крови больных ССЛ в разведениях 1:10–1:200 было выражено по отношению к активности и интенсивности фагоцитоза, а в разведении 1:400 подавлялась лишь интенсивность фагоцитоза на уровне единичного моноцита ($p_1 < 0,03$). При уменьшении соотношения *E. coli*/клетки – эффекторы в 2 раза (соотношение 12,5:1) ингибирующий эффект Арм на активность фагоцитоза как моноцитов, так и нейтрофилов становится статистически достоверным ($p_p < 0,05$). С увеличением времени инкубации Арм с клетками подавляющий эффект препарата усиливается (рис. 2, в). Так, если Арм не влияет на фагоцитоз клеток в течение первых 10 мин инкубации с клетками, то после 2 и 3 ч инкубации он значительно подавляет активность и интенсивность фагоцитоза моноцитов и нейтрофилов.

Таким образом, Арм и колхицин подавляют фагоцитоз моноцитов и нейтрофилов периферической крови больных ССЛ, что носит дозо- и времязависимый характер и зависит также от соотношения бактерии/клетки – эффекторы.

Данные о фагоцитарной активности нейтрофилов и моноцитов в литературе представлены противоречиво. Разнообразие данных в основном можно объяснить неоднородностью популяций больных ССЛ в различных исследованиях, включающих группы больных, получивших колхициновую терапию, больных с амилоидозом и в разных клинических стадиях и проявлениях ССЛ. В одной из таких работ с использованием высокочувствительного метода проточной цитофлюо-

риметрии приводятся данные о том, что у больных ССЛ в период приступа изменений в содержании обеих популяций клеток, способных фагоцитировать *E. coli*, по сравнению с аналогичными показателями в группе здоровых доноров, не наблюдается. Однако в этой работе не приводятся данные об интенсивности фагоцитоза единичной клеткой в группах сравнения, по-видимому, вследствие ненормирования соотношения клеток-эффекторов с *E. coli* – FITC [7].

Известно, что ССЛ характеризуется миссенс мутациями в гене MEFV, кодирующем пирин [1, 5]. Пирин экспрессируется в нейтрофилах, эозинофилах и активированных цитокинами моноцитах, при этом обнаружена ко-локализация полноразмерного белка в активных филаментах и микротрубочках клеток [4]. N-концевой участок пирина участвует в процессах регуляции воспаления и апоптоза нейтрофилов и моноцитов [9]. Все эти данные свидетельствуют о том, что пирин является важнейшим модулятором естественного иммунитета.

Самым удивительным феноменом при ССЛ является высокая чувствительность к колхицину, который эффективно блокирует приступы. Высокая чувствительность к колхицину, несмотря на развитие генодиагностики, является важным диагностическим критерием при ССЛ [4, 8]. Все эти данные позволили выдвинуть гипотезу о том, что уникальная колхициновая чувствительность при ССЛ может свидетельствовать о наличии колхицин-чувствительного воспалительного пути, частью которого является пирин. Согласно этой гипотезе колхицин скорее всего влияет на стадии инициации или амплификации воспаления, нежели на функции эффекторных клеток в очагах воспаления [8].

Однако механизм действия колхицина при ССЛ неизвестен. Известно, что колхицин блокирует полимеризацию микротрубочек и обмен тубулина, миграцию лейкоцитов, экспрессию адгезивных рецепторов, дегрануляцию [3, 8], то есть блокирует процессы, которые ассоциированы с регуляцией цитоскелета клеток. В данной работе показано, что колхицин является эффективным препаратом, способным блокировать усиленный фагоцитоз нейтрофилов и моноцитов больных ССЛ. Весьма интересными представляются данные, полученные при изучении влияния Арм на фагоцитар-

ную активность клеток при ССЛ. Известно, что механизм действия Арм заключается в его способности блокировать полисахарид-связывающие CD14 рецепторы моноцитов [2], что свидетельствует о том, что механизм влияния Арм отличается от механизма действия колхицина на фагоцитоз.

ВЫВОДЫ

1. С использованием высокочувствительного precisely-цитофлюориметрического метода исследования фагоцитоза в цельной периферической крови больных семейной средиземноморской лихорадкой (ССЛ) показано, что количество гранулоцитов и моноцитов, способных фагоцитировать бактерии, а также интенсивность фагоцитоза на уровне единичной клетки значительно усиливаются у больных ССЛ в межприступном периоде по сравнению с больными ССЛ во время приступа и здоровыми донорами.

2. Йод-литий- α -декстрин и колхицин подавляют фагоцитоз моноцитов и нейтрофилов периферической крови больных ССЛ, что носит дозо- и времязависимый характер и зависит также от соотношения бактерий и клеток – эффекторов.

ЛИТЕРАТУРА

1. В. М. Арутюнян, Г. С. Акопян, *Периодическая болезнь*, МИА, Москва (2000).
2. Т. К. Давтян, И. С. Акопян, Л. М. Мхитарян, Э. С. Габриелян, *Аллергология и иммунология*, № 5, 121 – 122 (2004).
3. A. Blocker, G. Griffith, J. C. Olivo, et al., *J. Cell Sci.*, **3**, 303 – 312 (1998).
4. M. Centola, G. Wood, D. M. Frucht, et al., *Blood*, **95**, 3223 – 3231 (2000).
5. J. J. Chae, H. D. Komarov, J. Cheng, et al., *Mol. Cell*, **7**, 591 – 604 (2003).
6. E. S. Gabrielyan and L. M. Mkhitarian (eds.), *ARMENICUM — Experimental and Clinical Studies*, Gitutyun, Yerevan (2001).
7. G. Keskin, A. Inal, A. Sengul, et al., *Yonsei Medical J.*, **41**, 441 – 444 (2000).
8. E. Mansfield, J. J. Chae, H. D. Komarov, et al., *Blood*, **98**, 851 – 859 (2001).
9. S. Papin, C. Cazeneuve, P. Dugesony, et al., *J. Biol. Chem.*, **278**, 48839 – 48847 (2003).

Поступила 17.11.04

THE EFFECT OF COLCHICINE AND IODINE-LITHIUM- α -DEXTRIN ON THE PHAGOCYTOSIS OF GRANULOCYTES AND MONOCYTES IN PATIENTS WITH FAMILIAL MEDITERRANEAN FEVER

V. P. Akopyan¹, S. A. Avetisyan¹, and T. K. Davtyan²

¹ Yerevan State Medical University, ul. Koryuna 2, Yerevan, 375025 Armenia

² "Armenicum" Research Center, Yerevan, Armenia

Disturbances in the regulation of phagocytic activity of neutrophils and monocytes (PANM) in whole peripheral blood of patients with familial Mediterranean Fever (FMF), which had not received treatment with colchicines, were determined by quantitative flow cytofluorimetry. The effect of iodine-lithium- α -dextrin (armenicum) and colchicine on the PANM in the blood of FMF patients was studied *in vitro*. The intensity of phagocytosis in populations of neutrophils and monocytes in FMF patients ($n = 6$) during the remission period is higher than that during the FMF attack ($n = 6$) and higher than in healthy donors ($n = 9$). The PANM in patients during the FMF attack is higher compared to that in healthy donors. Iodine-lithium- α -dextrin (armenicum) and colchicine inhibited the phagocytosis of effector cells in FMF patients in a dose-dependent and time-dependent manner. It was shown that the suppressive effect of the drugs increased with decreasing bacteria/effector cells ratio.