

Проточно-цитофлюорометрический анализ фагоцитоза гранулоцитов и моноцитов при семейной средиземноморской лихорадке

Т.К. Давтян, С.А. Аветисян, Г.С. Акопян, А.М. Манукян, Д.А. Погосян

Исследовательский центр «Арменикум», кафедры патофизиологии
и внутренних болезней №2 ЕРГМУ им. М. Гераци

375025, Ереван, ул. Корюна, 2

Ключевые слова: семейная средиземноморская лихорадка, фагоцитоз, нейтрофилы, моноциты

Семейная средиземноморская лихорадка (ССЛ), или периодическая болезнь, — аутосомно-рецессивное воспалительное заболевание, характерной особенностью которого 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 затрудняет прогноз заболевания [1–3].

Согласно новой классификации наследственных воспалительных заболеваний, не характеризующихся наличием антиген-специфического гуморального или клеточного иммунного ответа, ССЛ входит в группу аутовоспалительных заболеваний [14]. Несмотря на специфические гено- и фенотипические особенности различных аутовоспалительных заболеваний, общими для всех являются периодический характер лихорадки, серозитов, артритов и развитие амилоидоза как основного осложнения [6, 7]. Картирование, молекулярное клонирование генов и расшифровка первичной структуры их продуктов и характерных мутаций позволили выяснить, что молекулярные механизмы патогенеза аутовоспалительных заболеваний заключаются в нарушении регуляции активации и апоптоза эффекторных клеток воспаления и естественного иммунитета [15].

Однако литературные данные о состоянии фагоцитарной активности нейтрофилов и моноцитов при ССЛ достаточно противоречивы. В ранних работах не были описаны какие-либо изменения фагоцитарной активности нейтрофилов на модели захвата клетками *Candida albicans* [24], в то время как другими авторами было обнаружено снижение фагоцитарной активности моноцитов в отношении *Shigella flexneri* и *Shigella albus* [8, 9]. В некоторых работах последних лет с использованием более чувствительного метода про-

точной цитофлюорометрии было показано, что у больных ССЛ в период острого приступа фагоцитарная активность нейтрофилов и моноцитов не отличается от показателей здоровых доноров, а у больных ССЛ с амилоидозом этот показатель достоверно снижается [17]. Необходимо отметить также, что повышение фагоцитарной активности моноцитов/макрофагов рассматривается в качестве главного механизма амилоидогенеза при ССЛ [4, 5].

С целью изучения нарушений в регуляции фагоцитарной активности гранулоцитов и моноцитов проведено проточно-цитофлюорометрическое исследование цельной периферической крови больных ССЛ, не получавших колхициновую терапию.

Материал и методы

Периферическая кровь. Была 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 амилоидоз. Первая группа больных (n=6) была исследована во время приступа, а вторая (n=6) — в межприступном периоде. Забор периферической крови больных и 15 здоровых доноров проводили утром в специальные пробирки, содержащие литий-гепарин (LithHem heparin, Vacuet, Greiner), максимальная разница между заборами составляла 0,5–1,5 ч. Периферическая кровь здоровых доноров была предоставлена банком крови «Виола» при донации зарегистрированной фирмой доноров.

Образцы крови немедленно были разделены на аликвоты в стерильные пластиковые пробирки по 0,5–1 мл. В первой части образцов определяли основные гематологические показатели с помощью автоматического клеточного анализатора Celly v2.20 (Nucel Diagnostics).

Количественное определение фагоцитоза грануло-

цитарных и моноцитов. Количество фагоцитирующих моноцитов и нейтрофилов определяли с использованием цитофлуориметрической тест-системы Phagotest производства фирмы Opreget Pharma. Для этого к 100 мкл цельной крови добавляли опсонизированные *E. coli*-FITC в количестве $1-2 \times 10^7$. Пробы нормализовали по отношению к абсолютному содержанию гранулоцитов в образцах, инкубировали при 37°C в течение 10 мин, а контрольные пробы (технический контроль) оставляли на льду. Реакцию фагоцитоза останавливали добавлением специального реактива, подавляющего флуоресценцию незахваченных клетками *E. coli*-FITC, одновременно не влияя на флуоресценцию интернализованных клетками бактерий. После удаления эритроцитов лизирующим раствором во избежание появления артефактов при подсчете агрегированных бактерий ДНК фагоцитов окрашивали витальной краской-пропидий йодидом. Количество фагоцитирующих клеток и интенсивность процесса фагоцитоза определяли на цитофлуориметре FACS Calibur™ с пакетом программы CellQuest (Becton Dickinson).

Статистическая обработка данных. При статистическом анализе контрольной и опытных групп проводилась проверка 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_u). В остальных случаях расчет проводился с помощью критерия Стьюдента (P) и парного T-критерия (P_p).

Результаты и обсуждение

Проточная цитофлуориметрия фагоцитоза в цельной периферической крови. Известно, что цитофлуориметрический метод количественного определения фагоцитоза нейтрофилов и моноцитов тест-системой Phagotest является высокоспецифичным и чувствительным, например, к температуре [21]. На рис. 1 представлены типичные результаты определения фагоцитоза клеток с использованием этой системы. Как видно из рис. 1, высокая чувствительность достигается: 1) сепарацией клеточных популяций по характерным параметрам поверхностной грануляции (SSC) и размерам (FSC) (рис. 1а); 2) обработкой клеток пропидий йодидом, который позволяет отличить популяцию агрегированных бактерий от фагоцитирующих клеток по интенсивности флуоресценции (рис. 1б); 3) подавлением флуоресценции неинтернализованных фагоцитами *E. coli*-FITC раствором сумаси, который не действует на флуоресценцию захваченных клетками бактерий (рис. 1б). При этом квадратичная статистика популяций клеток в дот-

плотах «FSC-*E. coli*-FITC» дает информацию о содержании клеток (%), способных захватывать бактерии (активность фагоцитоза), а гистограммная статистика

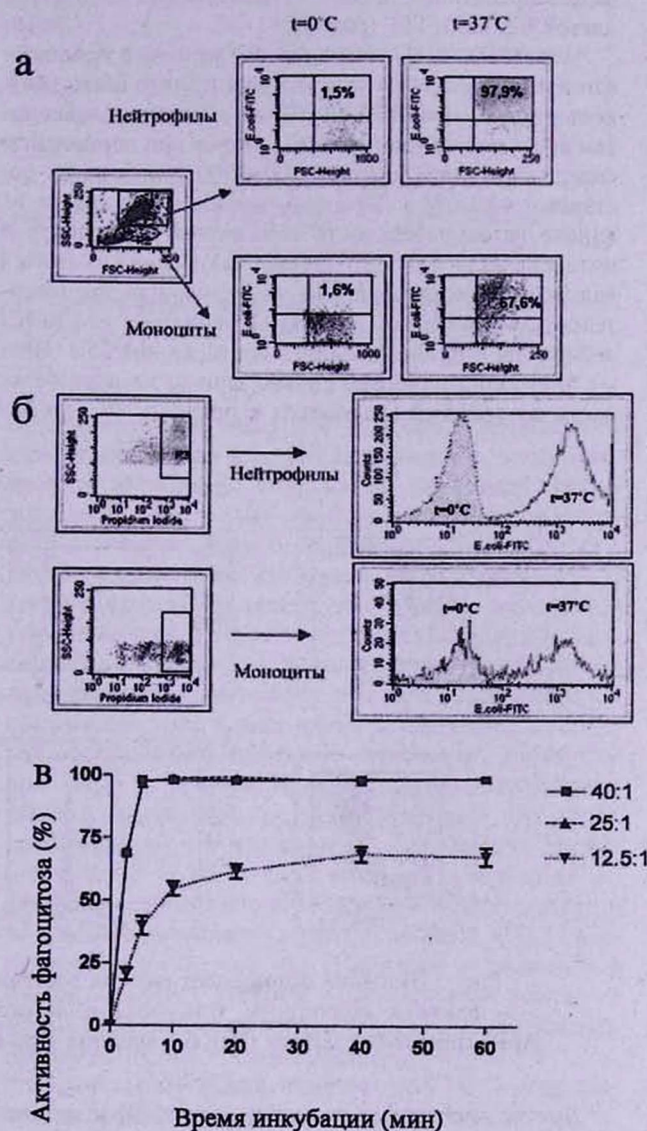


Рис. 1. Количественное цитофлуориметрическое определение фагоцитоза гранулоцитов и моноцитов в цельной периферической крови: а – сепарация клеток по маркерам SSC и FSC и последующий анализ активности фагоцитоза в соответствующих дот-плотах; б – сепарация фагоцитирующих клеток, позитивных по окрашиванию пропидий йодидом и последующий анализ интенсивности фагоцитоза в соответствующих гистограммах; в – кинетика активности фагоцитоза нейтрофилов периферической крови в зависимости от соотношения *E. coli*-FITC/клетки-эффекторы

(статистика Колмогорова–Смирнова) – об относительной способности единичной клетки захватить определенное количество бактерий (интенсивность фагоцитоза), причем последний показатель наиболее удобно представить как геометрический средний номер канала флюоресценции (СНК), в гистограммах количество клеток – *E. coli*-FITC (рис. 1).

Вариабельность показаний фагоцитоза с использованием этой системы обусловлена прежде всего соотношением *E. coli*-FITC (2×10^7 на образец) к лейкоцитам в 100 мкл цельной крови, которое при нормальном содержании лейкоцитов 5000–8000 клеток/мкл составляет 40:1–25:1. При этом данное соотношение не влияло на вариабельность показателей активности и интенсивности фагоцитоза (рис. 1в). Исходя из этого в дальнейших исследованиях мы проводили предварительную нормализацию соотношения *E. coli*-FITC/лейкоциты и придерживались соотношения 25:1. Время инкубации наиболее сильно влияло на вариабельность показателей фагоцитоза в пределах 10 мин ин-

кубации клеток с бактериями, после чего выходило на плато (рис. 1в). Поэтому в дальнейших исследованиях все инкубации проводились не менее 10 мин при 37°C. Использование опсонизированных *E. coli*-FITC включало также влияние сывороточных белков (иммуноглобулинов, компонентов системы комплемента и др.) на процесс захвата клетками бактерий.

Отдельно мы изучили адекватность данного метода для исследования влияния фармакологических препаратов на фагоцитоз нейтрофилов и моноцитов в цельной крови. Предварительные исследования показали, что Арменикум (Арм) при непосредственном взаимодействии с *E. coli*-FITC в буферном растворе может искажать флюоресценцию FITC. Как представлено на рис. 2, Арм в силу высокого окислительного потенциала может подавлять более чем в 100 раз флюоресценцию FITC (рис. 2а, I). Однако после предварительной инкубации Арм с тиосульфатом натрия (рис. 2а, II) или с цельной кровью (рис. 2б) от 10 мин до 2 ч и более, флуктуации не наблюдаются (рис. 2).

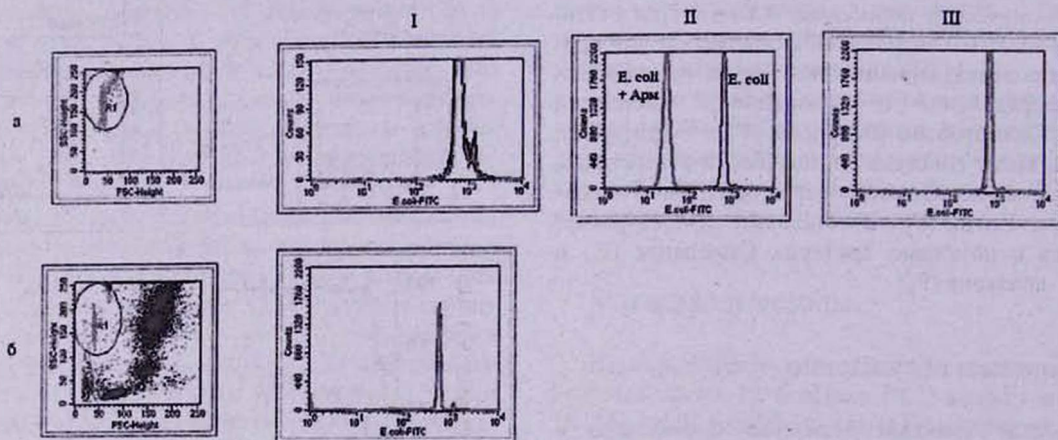


Рис. 2. Влияние фармакологических препаратов на интенсивность флюоресценции *E. coli*-FITC: а – влияние колхицина, тиосульфата натрия, дексаметазона и преднизолона (I), Арм (II) и Арм+тиосульфат натрия (III); б – влияние Арм в присутствии цельной периферической крови

Другие препараты – колхицин, тиосульфат натрия, дексаметазон, преднизолон – не влияют на флюоресценцию *E. coli*-FITC. Следовательно, этот метод можно использовать для определения влияния препаратов на фагоцитоз клеток при условии преинкубации цельной крови с препаратами от 10 мин до 2ч и предварительного гематологического анализа содержания клеток в крови.

Фагоцитоз нейтрофилов и моноцитов у больных ССЛ. Из данных, представленных в таблице, следует, что активность и интенсивность фагоцитоза у больных ССЛ в межприступном периоде статистически достоверно повышены в популяции как нейтрофилов,

так и моноцитов. В то же время активность фагоцитоза нейтрофилов и моноцитов у больных ССЛ во время приступа не отличается от аналогичного показателя здоровых доноров. Интенсивность фагоцитоза достоверно увеличена у больных и во время приступа по сравнению со здоровыми донорами. Интересно, что активность и интенсивность фагоцитоза нейтрофилов и моноцитов у больных в межприступном периоде усиливаются по сравнению с больными во время приступа и здоровыми донорами. В то же время у больных во время приступа, по сравнению с группой здоровых доноров, остается повышенной лишь интенсивность фагоцитоза эффекторными клетками.

Таблица

Фагоцитоз нейтрофилов и моноцитов больных 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 ^{*1}	80,5±4 ^{*2}	2073±38,8 ^{**}	1759±84,3 ^{**}
Больные ССЛ во время приступа (n=6)	97,6±0,6 ^{*1}	67,3±4,1 ^{*0}	1729±75,5 ^{*2*}	1310±105 ^{*2*}

*¹ $p_1 < 0.05$; *² $p_1 < 0.01$; ** $p_1 < 0.001$ при сравнении больных ССЛ со здоровыми донорами; ⁰ $p_1 > 0.05$ при сравнении больных ССЛ во время приступа со здоровыми донорами; ¹ $p_1 = 0.05$ и ^{*} $p_1 < 0.05$ при сравнении больных ССЛ во время приступа с больными в межприступном периоде

Полученные нами данные согласуются с данными, Ж. Keskin G. et al. [17], однако в этой работе нет информации об интенсивности фагоцитоза между группами сравнения, по-видимому, вследствие ненормирования в ходе экспериментов соотношения клеток-эффекторов с *E. coli*-FITC.

В настоящей работе нами с использованием высокочувствительного проточно-цитофлуориметрического метода исследования фагоцитоза нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов цельной периферической крови больных ССЛ показано, что количество клеток, 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 острого приступа и здоровыми донорами. При этом интенсивность фагоцитоза эффекторных клеток воспаления усилена и в группе больных ССЛ во время приступа по сравнению со здоровыми донорами, несмотря на факт нормализации содержания клеток, способных фагоцитировать бактерии. Оригинальность данного исследования заключается в том, что мы проводили исследования с использованием периферической крови больных ССЛ, которые не имели амилоидоза и никогда не получали колхицин, чем и объясняется немногочисленность исследуемой популяции больных по сравнению с другими аналогичными исследованиями, описанными в литературе.

Данные о фагоцитарной активности нейтрофилов и моноцитов крайне противоречивы. В одних работах представляются сведения о снижении фагоцитирующей активности нейтрофилов и моноцитов [8, 9], в других – не обнаруживались какие-либо значимые изменения [17, 24], а в работах, посвященных механизмам амилоидогенеза, наоборот, активация фагоцитоза моноцитов/макрофагов выделяется как важное

патогенетическое звено [10, 19]. Такое разнообразие данных можно, на наш взгляд, объяснить неоднородностью популяций больных в различных исследованиях, включающих группы пациентов, получивших колхицинотерапию, пациентов с амилоидозом в разных клинических стадиях и проявлениях ССЛ, а также разные этнические группы. Кроме того, используемые методы и объекты фагоцитоза (например, *Candida albicans*, *Shigella flexneri* и т.д.) не были стандартизированы по сравнению с тем, чем располагают исследователи в настоящее время. В единственной работе, посвященной изучению активности фагоцитоза при ССЛ с использованием стандартизированного объекта фагоцитоза и чувствительного проточно-цитофлуориметрического метода, приводятся данные о том, что у больных ССЛ в период приступа не наблюдаются изменения содержания в обеих популяциях клеток, способных захватить меченых FITC, опсонизированных *E. coli*, по сравнению с таковыми в группе здоровых доноров. Однако в этой работе не приводятся данные об интенсивности фагоцитоза единичной клеткой в группах сравнения [17].

В настоящее время известно, что ССЛ – рецессивное аутосомное аутовоспалительное заболевание, характеризующееся миссенс мутациями в гене MEFV, кодирующего белок, содержащий 781 аминокислоту, который называется пирином или маренострином [16]. Пирин экспрессируется в нейтрофилах, эозинофилах и активированных цитокинами моноцитах [11]. Обнаружена ко-локализация полноразмерного белка в активных филаментах и микротрубочках клеток [18]. N-терминальный участок (~90 аминокислотных остатков) пирина определен как пириновый домен (PYD или PAAD), имеет высокую гомологичность с доменами смерти или эффекторными доменами смерти каспаз и участвует в гомо- и гетеротипных белок-

белковых взаимодействий в процессах регуляции воспаления и апоптоза [20, 23]. Именно через этот участок мутантный пирин взаимодействует с адапторным белком ASC (апоптоз-ассоциированный крапинчатый белок) и индуцирует аутокатализ IL-1 конвертирующего белка или каспазы 1b, вследствие чего увеличивается продукция провоспалительного IL-1 β и подавляется апоптоз макрофагов [12]. Кроме того, пирин взаимодействует с белком, ассоциированным с пролин-серин-треонинфосфатазой, который участвует в организации цитоскелета. Это взаимодействие приводит к гиперфосфорилированию этого белка и повышению продукции IL-1 β клетками периферической крови [22]. Все эти данные свидетельствуют о том, что пирин является важнейшим модулятором естественного иммунитета и что в патогенезе развития ССЛ важное значение имеют нарушения в процессах активации и апоптоза эффекторных клеток воспаления –

нейтрофилов и моноцитов.

Основная функция важнейших клеток естественного иммунитета, таких как моноциты/макрофаги и гранулоцитные нейтрофилы, заключается в фагоцитозе и антимикробной неспецифической или группоспецифической защите организма. Анализ частот носительства мутации гена MEFV среди различных этнических популяций свидетельствует о том, что гетерозиготность миссенс мутации обеспечивала селективное преимущество по резистентности к какому-то пока неизвестному инфекционному агенту в ходе эволюции [13, 16]. Именно этим можно объяснить эволюционную мотивацию миссенс мутаций в гене пирина, биологической платой за которые явилось повышение порога воспалительных процессов и усиление фагоцитоза как инфекционных агентов, так и белков острой фазы, например SAA.

Поступила 03.11.04

Գրանուլոցիտների և մոնոցիտների ֆագոցիտոզի հոսքային-ցիտոֆլուորոմետրիկ քննությունը ընդհանրական միջերկրածովային տենդի ժամանակ

Տ.Կ. Դավթյան, Ս.Ա. Ավետիսյան, Գ.Ս. Հակոբյան, Ա.Մ. Մանուկյան, Դ.Ա. Պողոսյան

Ընտանեկան միջերկրածովային տենդով (ԸՄՏ) կոլիցիինային բուժում չստացած հիվանդների ծայրամասային արյան նեյտրոֆիլների և մոնոցիտների ֆագոցիտար ակտիվության կարգավորման խանգարումների ուսումնասիրության նպատակով կատարվել է քանակական հոսքային-ցիտոֆլուորոմետրիկ հետազոտություն: Մեր կողմից *in vitro* պայմաններում ուսումնասիրվել է ԸՄՏ հիվանդների նեյտրոֆիլների և մոնոցիտների ֆագոցիտար ակտի-

վության վրա դեղաբանական տարբեր խմբերի դեղամիջոցների ազդեցությունը: Պարզվել է, որ ԸՄՏ հիվանդների մոտ միջնապայական շրջանում նեյտրոֆիլների և մոնոցիտների պոպուլյացիայում ֆագոցիտոզի ակտիվությունն ու ինտենսիվությունը բարձր են՝ նոսպայի վիճակում գտնվող հիվանդների և առողջ դոնորների համեմատությամբ: Նոսպայի ժամանակ նեյտրոֆիլների և մոնոցիտների ֆագոցիտոզի ինտենսիվությունը ավելի բարձր է քան առողջ դոնորների մոտ:

Flowcytofluorometric analysis of the phagocytosis of granulocytes and monocytes at familial Mediterranean fever

T. K. Davtyan, S. A. Avetisyan, G. S. Hakopyan, A. M. Manukyan, D. A. Poghosyan

We conducted a quantitative flow cytofluorimetric research to study the disturbances in the regulation of phagocytic activity of neutrophils and monocytes in whole peripheral blood in patients with Familial Mediterranean fever (FMF) who have not received colchicine treatment. The effects of drugs from various pharmacological groups on the phagocytic activity of neutrophils and monocytes

in FMF patients were studied *in vitro*. It is shown that the activity and intensity of phagocytosis are higher in populations of neutrophils and monocytes in FMF patients during the remission period ($n=6$), as compared to those in attack ($n=6$) and healthy donors ($n=9$). The intensity of phagocytosis of neutrophils and monocytes in patients during attack is higher compared to healthy donors.

Литература

- Агаджанян В.В. В кн.: Клиника и течение периодической болезни, Ленинск-Кузнецкий, 1998.
- Айвазян А.А. В кн.: Периодическая болезнь, Ереван, 1982.
- Арутюнян В.М., Еганян Г.А. В кн.: Гастроэнтерологический аспект периодической болезни, Ереван, 1994.
- Кочубей А.Н., Виноградова О.М., Белокриницкий Д.В. Тер. архив, 1987, 59, с.80.
- Серов В.В. Архив патологии, 1989, 10, с.3.
- Aganna E., Hammond L., Hawkins P.N., Aldea A. et al. Arthritis Rheum., 2003, 49, p. 2632.
- Arkwright P.D., McDermott M.F., Houten S.M. et al. Clin. Exp. Immunol., 2002, 130, p.484.
- Bar-Eli M., Levy M., Ehrenfeld M., Eliakim M., Gallily R. Adv.Exp. Med. Biol., 1979, 121, p.341.
- Bar-Eli M., Terrino M.C., Peters R.S. Schwabe A.A. Am. J. Hematol., 1981, 11, p.387.
- Bell A., Chan S., Ali-Khan Z. Int. J. Exp. Clin. Invest., 1999, 6, p.31.
- Centola M., Wood G., Frucht D.M., Galon J. et al. Blood, 2000, 95, p.3223.
- Chae J.J., Komarov H.D., Cheng J., Wood G. et al. Mol. Cell., 2003, 7, p.591.
- French FMF Consortium: A candidate gene for familial Mediterranean fever Nat. Genet., 1997, 17, p.25.
- Galon J., Aksentijevich I., McDermott F., O'Shea J., Kastner D.L., Curr. Opin. Immunol., 2000, 12, p.479.
- Gummucio D.L., Diaz A., Schaner P.A.B., Richards N. et al. Clin. Exp. Rheumatol., 2002, 20, S45.
- International FMF Consortium: Ancient missense mutation in a new member of the RoRet gene family are likely to cause familial Mediterranean fever, Cell, 1997, 90, p. 797.
- Keskin G., Inal A., Sengul A., Cindoruk M., Haznedaroglu S., Duranay M., Sangur Y. Yonsei Medical J., 2000, 41, p.441.
- Mansfield E., Chae J.J., Komarov H.D., Broetz T.M., Frucht D.M. et al. Blood, 2001, 98, p.851.
- Merlini G., Belotti V. N. Engl. J. Med., 2003, 349, p.583.
- Papin S., Cazeneuve C., Dugesony P., Jeru I., Sahai D., Amselem S. J. Biol. Chem., 2003, 278, p.48839.
- Robinson J.P., Carter W.O. In Bauer K.D. (eds.) Clinical flow cytometry, principles and applications, Williams & Wilkins, Baltimore, 1993, p.405.
- Shoham N.G., Centola M., Mansfield E., Hull K.M. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2003, 100, p.13501.
- Stehlik C., Fiorentino L., Dorfleitner A., Bruey J.-M. et al. Exp. Med., 2002, 196, p.1605.
- Territo M.C., Peters R.S., Cline M.J. Amer. J. Hematol., 1976, 1, p.341.