

Фармакологическая модуляция спонтанного и индуцированного дыхательного взрыва гранулоцитов и моноцитов при семейной средиземноморской лихорадке

С.А. Аветисян

Кафедра патофизиологии ЕрГМУ им. М. Герац

375025, Ереван, ул. Корюна, 2

Ключевые слова: семейная средиземноморская лихорадка, спонтанный и индуцированный дыхательный взрыв, нейтрофилы, моноциты, колхицин, йод-литий- α -декстрин (Арменикум), глюкокортикоиды

Семейная средиземноморская лихорадка (ССЛ), или периодическая болезнь, является классическим аутовоспалительным заболеванием, молекулярные механизмы патогенеза которого заключаются в нарушении регуляции активации и апоптоза эффекторных клеток воспаления и естественного иммунитета [10]. При ССЛ обнаружено усиление хемотаксиса [4], хемилюминесценции [3], продукции лизоцима и супероксид аниона нейтрофилами [5]. Также наблюдается выраженный дисбаланс между про- и антиоксидантными системами [1, 9]. Известно, что при ССЛ отмечается высокая чувствительность к колхициновой и весьма низкая – к глюкокортикоидной терапии [7, 10]. Литературные данные указывают на усиление спонтанного дыхательного взрыва нейтрофилов и моноцитов в межприступном периоде ССЛ [1, 9]. Поэтому важное значение приобретает изучение фармакологической регуляции активности спонтанного и индуцированного дыхательного взрыва нейтрофилов и моноцитов периферической крови больных ССЛ именно в этом периоде. В связи с этим нами проведено сравнительное изучение влияния препаратов различных фармакологических групп на спонтанный и индуцированный дыхательный взрыв нейтрофилов и моноцитов периферической крови только больных ССЛ в межприступном периоде, не получавших колхициновую терапию. Нами было исследовано сравнительное влияние колхицина, дексаметазона, преднизолона, йод-литий- α -декстрина (Арменикум) и рекомбинантного фактора некроза опухолей- α (ФНО- α) на спонтанный и хемотаксис-, протеинкиназа С-, фагоцитоз-индуцированный дыхательный взрыв нейтрофилов и моноцитов периферической крови больных *in vitro*.

Материал и методы

Периферическая кровь. Была исследована периферическая кровь 12 больных ССЛ в межприступном периоде возрастной группы 18–27 лет. Больные не получали колхицин и не имели амилоидоза. Забор крови проводили в пробирки, содержащие литий-гепарин (Vacuet, Greiner). Гематологические показатели определяли с помощью автоматического клеточного анализатора Celly v2.20 (Hycel Diagnostics).

Количественное определение дыхательного взрыва гранулоцитов и моноцитов. Метод определения дыхательного взрыва основан на измерении флюоресценции единичных клеток при их инкубации с высокочувствительным флюоресцентным зондом – дигидродамином 123 (DHR123), вступающим в реакцию с кислородсодержащими свободными радикалами (КСР – супероксид-анион, перекись водорода и гипохлорная кислота). Цитофлюорометрическое определение дыхательного взрыва моноцитов и нейтрофилов проводили при помощи тест-системы Bursttest (Orpegen Pharma). Для этого к 100 мкл цельной крови добавляли 20 нг/мл форбол-12-миристил-13 ацетата (РМА), или 100 нг/мл синтетического пептида N-формилметионин-лейцин-фенилаланин (fMLP), или 2×10^7 опсонизированных и фиксированных формалином *E. coli*, или 20 мкл забуференного физиологического раствора и пробы инкубировали 10 мин при 37°C. После инкубации в пробы добавляли DHR123 и продолжали инкубировать при той же температуре в течение 10 мин. ДНК клеток окрашивали витальной краской – пропидий йодидом. Активность (% клеток, подвергающихся дыхательному взрыву) и интенсивность дыхательного взрыва (относительная способность единичной клетки продуцировать КСР, что представлено как геометрический средний номер канала флюоресценции – СНК)

в отсутствие (спонтанный дыхательный взрыв) или в присутствии индукторов (индуцированный дыхательный взрыв) определяли на цитофлюорометре FACSCalibur™ с пакетом программ CellQuest (Becton Dickinson) отдельно для каждой популяции клеток.

Влияние фармакологических препаратов на фагоцитарную активность. Нами были использованы колхицин (Sigma), дексаметазон (KRKA), рекомбинантный ФНО- α (R&D systems), а также йод-литий- α -декстрин "Арменикум"™ (Арм) (производство ЗАО "Арменикум", Ереван, Армения). Аликвоты образцов цельной крови по 1 мл инкубировали в присутствии различных концентраций препаратов в течение 3 ч при 37°C. Контролем служила необработанная периферическая кровь больных ССЛ в межприступном периоде. После завершения инкубации и гематологического анализа крови проводили проточную цитофлюорометрию по описанной выше методике.

Статистическая обработка данных. При статистическом анализе контрольной и опытной 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_t) и парного T-критерия (P_p).

Результаты и обсуждение

В таблице представлены результаты исследования влияния препаратов на спонтанный и хемотаксис- (fMLP), протеинкиназа C- (PMA), фагоцитоз- (*E. coli*) зависимый дыхательный взрыв нейтрофилов и моноцитов больных *in vitro*.

Колхицин стимулирует активность и интенсивность спонтанного дыхательного взрыва нейтрофилов и значительно подавляет fMLP-, PMA- и фагоцитоз-индуцированную продукцию КСР в обеих популяциях клеток больных ССЛ. Арм в разведении 1:400 подавляет активность и интенсивность хемотаксис-зависимого дыхательного взрыва моноцитов и нейтрофилов. Подобно колхицину дексаметазон, преднизолон и рекомбинантный ФНО- α стимулируют активность и интенсивность спонтанного дыхательного взрыва нейтрофилов, но, в отличие от колхицина, стимулируют

Таблица

Влияние различных фармакологических препаратов на спонтанный и индуцированный дыхательный взрыв нейтрофилов и моноцитов больных ССЛ

Фарм. препарат	Активность дыхательного взрыва (%)				Интенсивность дыхательного взрыва (ЧНК)			
	спонтанный	fMLP	PMA	<i>E. coli</i>	спонтанный	fMLP	PMA	<i>E. coli</i>
Нейтрофилы Контроль	11.2±2.5	57.1±13.9	98±0.8	99.6±0.1	108±9.7	343.5±93.2	1037±293	1536±380
Колхицин (10 мкг/мл)	42.5±12.7*	49.1±17.4	54.7±13.5°	55.1±12.4°	180.5±16.7*	215.6±75.8°	218.7±56.4*	223.4±67.4**
Арм (1:400)	11.6±0.9	41±9.5°	97.4±2	96.5±3.2	108.7±12.3	302.7±67.6	961.9±305.2	1734±446
Дексаметазон (50 мкг/мл)	28.3±6.7°	79.3±11.5°	98.1±1.1	98.2±0.6	148.5±10.8°	431.6±64.9°	1221±329	1891±515
Преднизолон (25 мкг/мл)	86.6±22.7*	81.8±14.9°	97.9±0.8	98.1±0.6	160.4±34.4°	473.4±59.8°	899.6±294	1785±465
ФНО- α (5 нг/мл)	41.5±9.7*	86.5±12.5°	98.1±0.9	98.2±0.4	173.9±21.9°	425±62.9°	1426±319	1981±625
Моноциты Контроль	19.4±4.5	35.5±10.8	64.7±13.8	73.5±18.2	117.8±12.4	209.6±67	345.1±92	464.2±117.3
Колхицин (10 мкг/мл)	28.5±10.3°	30.6±12.6	33.5±7.9°	27.8±10.4°	92.6±19.5°	102.7±21.5°	106.7±15.1°	90.6±18.3°
Арм (1:400)	14.3±3.1	23.1±7.1°	71.7±17.4	76.4±18	128.4±18.2	154.4±49.9	323.7±113.4	430.3±142.2
Дексаметазон (50 мкг/мл)	21.5±6.7°	70.6±12.5°	95.5±19.9°	881±5.9°	103.3±22.1	315.6±52.8°	342.6±114	479.4±92.9
Преднизолон (25 мкг/мл)	30.8±9.8°	82.1±16.7°	89.3±7.8°	85.6±9.3°	121±22.5	397±61.2°	336±95	525±125.5
ФНО- α (5 нг/мл)	63.5±14.4°	77.6±20.2°	97±0.9°	98±0.8°	118±12.2	298±52.2°	390±84.6	450±92.8

Примечание. * $p_t < 0.05$; ** $p_t < 0.001$; ° $p_p \leq 0.05$ по сравнению с необработанной кровью

моноцитов и нейтрофилов больных ССЛ (табл.).

Дексаметазон, преднизолон и рекомбинантный ФНО- α , в отличие от колхицина, стимулируют активность и интенсивность фагоцитоз-индуцированной продукции КСР моноцитов, но не имеют существенного влияния в популяции нейтрофилов больных. Как следует из представленных данных, Арм по степени подавляющего эффекта на хемотаксис-зависимый дыхательный взрыв моноцитов и нейтрофилов отличается как от колхицина, так и от глюкокортикоидов. В то же время колхицин является наиболее эффективным ингибитором протеинкиназа С- и фагоцитоз-индуцированной продукции КСР нейтрофилами и моноцитами больных (табл.).

Таким образом, сравнительное изучение действия

фармакологических препаратов различных групп показало, что наиболее эффективными ингибиторами хемотаксис-, протеинкиназа С- и фагоцитоз-зависимого дыхательного взрыва нейтрофилов и моноцитов больных ССЛ являются колхицин и Арм, в то время как синтетические глюкокортикоиды проявляют противоположную активность или не оказывают существенного воздействия.

Из вышеприведенных данных видно, что Арм, в отличие от колхицина и глюкокортикоидов, является наиболее эффективным ингибитором хемотаксис-зависимого дыхательного взрыва моноцитов и нейтрофилов. В связи с этим представилось интересным изучение совместного действия Арм с вышеуказанными фармакологическими препаратами.

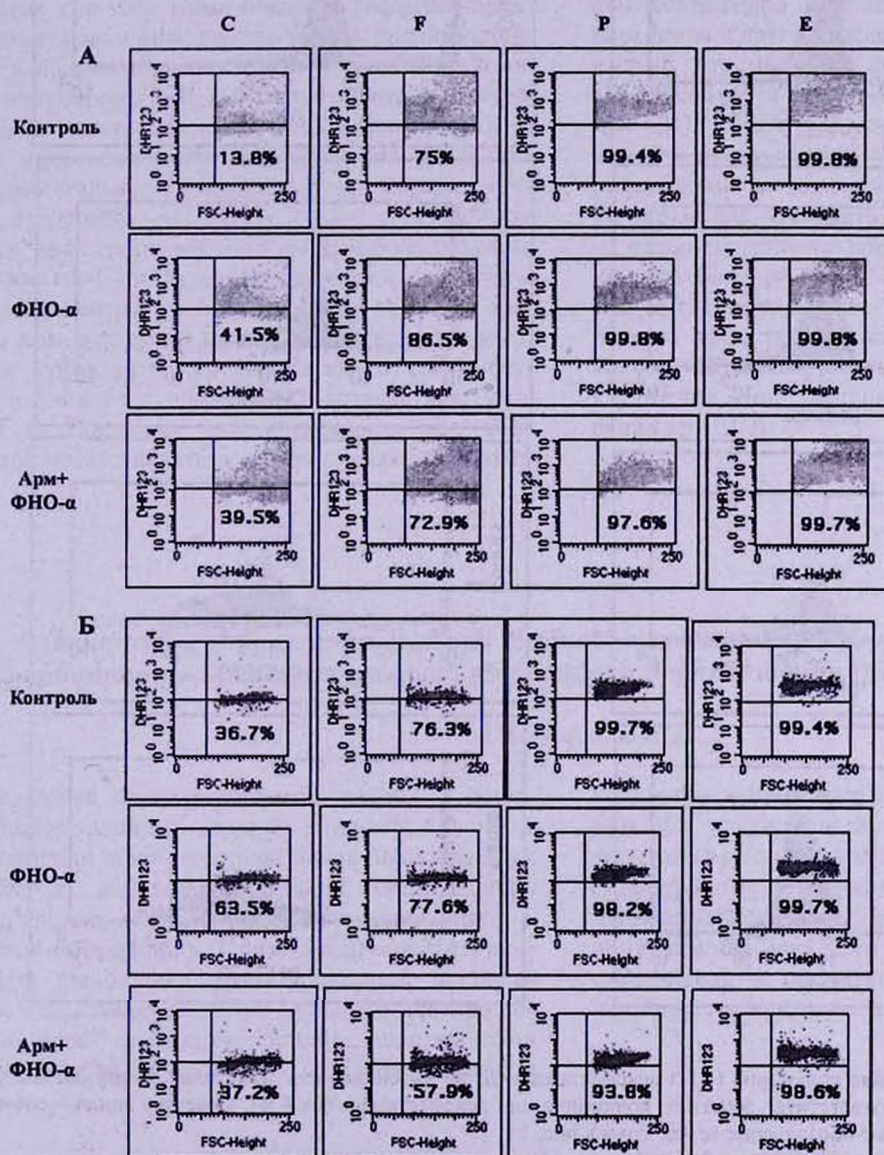


Рис.1. Совместное действие Арм и ФНО- α на активность дыхательного взрыва нейтрофилов (А) и моноцитов (Б) больных ССЛ: С – спонтанный, F – fMLP-, P – PMA-, E – *E. coli*-индуцированный дыхательный взрыв

Как представлено на рис. 1, Арм подавляет стимулирующий эффект дексаметазона на спонтанный и хемотаксис-, протеинкиназа С-, фагоцитоз-индуцированный дыхательный взрыв нейтрофилов и моноцитов больных *in vitro*. Кроме того, Арм также обладает способностью нейтрализовать активирующий эффект ФНО- α на спонтанный и индуцированный дыхатель-

ный взрыв нейтрофилов и моноцитов (рис. 1). В присутствии колхицина потенцируется ингибирующий эффект Арм на РМА- и *E. coli*-зависимую продукцию КСР. В то же время ингибирующее влияние Арм на хемотаксис-зависимый дыхательный взрыв моноцитов и нейтрофилов в присутствии колхицина значительно подавляется, что показано на рис. 2.

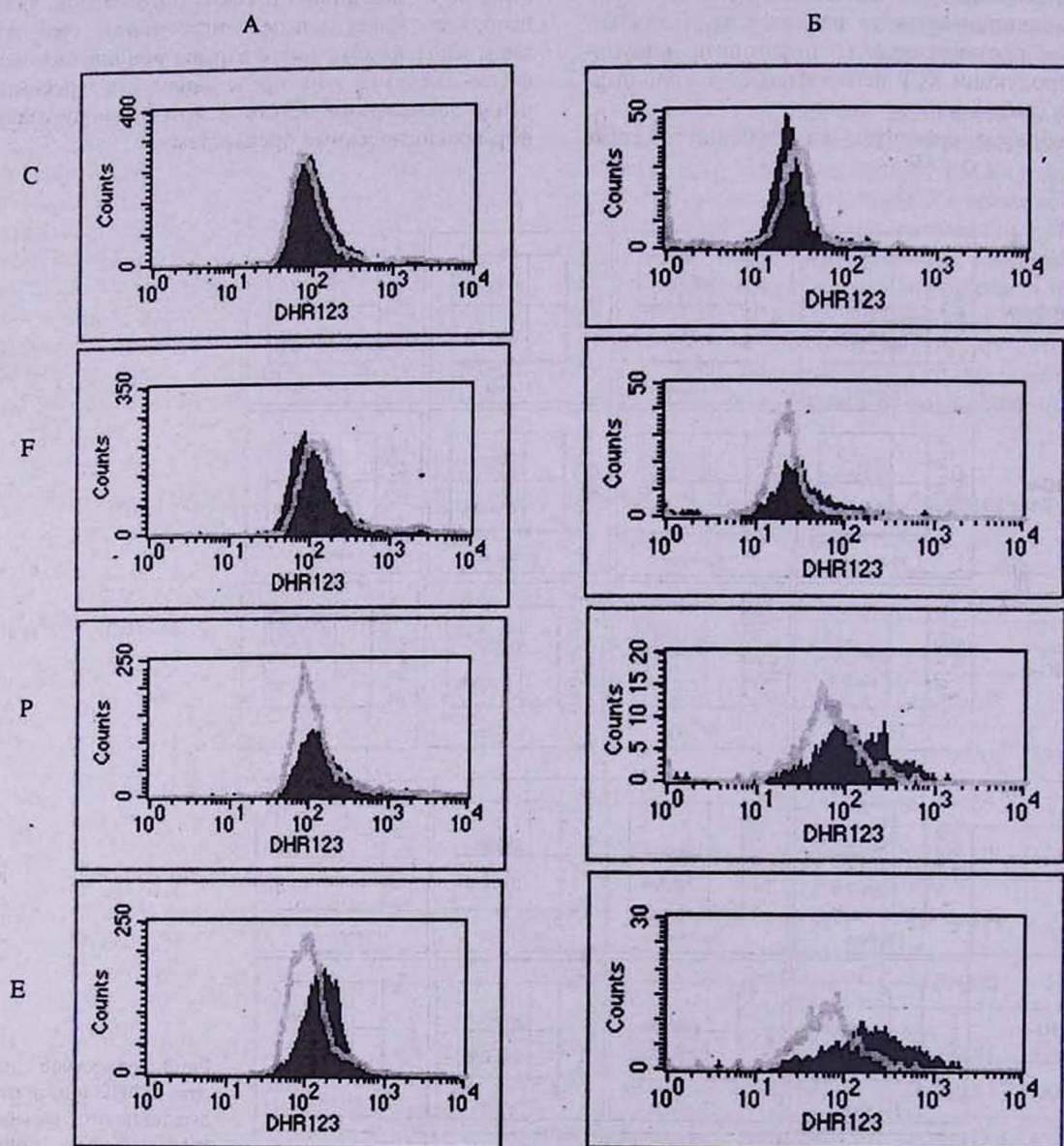


Рис. 2. Модуляция Арм действия колхицина (А) и дексаметазона (Б) на интенсивность дыхательного взрыва нейтрофилов больных ССЛ: темный фон соответствует действию колхицина или дексаметазона без Арм, а светлая линия – совместному действию препаратов; остальные обозначение те же, что и к рис. 1

Таким образом, Арм проявляет весьма выраженное модулирующее воздействие на спонтанный и хемотаксис-, протеинкиназа С-, фагоцитоз-индуцированный дыхательный взрыв нейтрофилов и моноцитов больных *in vitro*, усиливает ингибирующий эффект колхицина на протеинкиназа С- и фагоцитоз-индуцированную продукцию КСР и ингибирует стимулирующие эффекты ФНО- α и глюкокортикоидов на спонтанный и индуцированный дыхательный взрыв нейтрофилов и моноцитов больных ССЛ.

В данном исследовании мы разработали условия для изучения влияния фармакологических препаратов разных групп на спонтанный и хемотаксис-, протеинкиназа С-, фагоцитоз-индуцированный дыхательный взрыв нейтрофилов и моноцитов больных ССЛ в межприступном периоде в условиях, максимально приближенных к *in vivo*. Нами показано дифференциальное влияние колхицина, дексаметазона, преднизолона, ФНО- α и йод-литий- α -декстрина *in vitro* на спонтанный и индуцированный дыхательный взрыв нейтрофилов и моноцитов больных ССЛ в зависимости от силы и механизма действия индукторов продукции КСР. Сравнительное изучение действия фармакологических препаратов различных групп показало, что наиболее эффективными ингибиторами хемотаксис-, протеинкиназа С- и фагоцитоз-зависимого дыхательного взрыва нейтрофилов и моноцитов являются колхицин и Арм, в то время как синтетические глюкокортикоиды проявляют противоположную активность или не оказывают существенного воздействия. Уникальная колхициновая чувствительность при ССЛ может свидетельствовать о наличии колхицин-чувст-

вительного воспалительного пути, особенностью которого является ингибирование колхицином стадии инициации или амплификации воспаления, нежели функции эффекторных клеток в очагах воспаления [7]. Однако механизм действия колхицина при ССЛ неясен. Известно, что колхицин блокирует полимеризацию микротрубочек и обмен тубулина, миграцию лейкоцитов, экспрессию адгезивных рецепторов, дегрануляцию [6,8], то есть блокирует процессы, которые ассоциированы с регуляцией цитоскелета клеток. Колхицин эффективно подавляет индуцированный дыхательный взрыв моноцитов и нейтрофилов, чем и можно объяснить высокую колхициновую чувствительность больных ССЛ.

Весьма интересными представляются данные, полученные при изучении влияния Арм, механизм которого совершенно отличается от механизмов действия колхицина и других исследованных препаратов. Несомненно, что механизм действия Арм заключается в его способности блокировать полисахарид-связывающие CD14-рецепторы моноцитов [2]. Известно также, что Арм взаимодействует с другими поверхностными рецепторами клеток, например с CD11a/CD18 (LFA-1), что может объяснить его модулирующее влияние на процессы дыхательного взрыва нейтрофилов и моноцитов больных ССЛ. Наиболее интересным представляется выраженное модулирующее воздействие Арм на эффекты колхицина, ФНО- α и глюкокортикоидов, что может открыть новые возможности для улучшения существующих курсов лекарственной терапии при ССЛ.

Поступила 11.01.05

Գրանույոցիւոնրի եւ մոնոցիւոնրի ինքնաժին ու մակաժված շնչական պայթյունի ֆարմակոլոգիական մոդուլյացիան ընդամենական միջերկրածովային տենդի ժամանակ

Ս.Ա. Ավերիսյան

Ընտանեկան միջերկրածովային տենդով հիվանդների ծայրամասային արյան մեյոտոֆիլներում և մոնոցիտներում *in vitro* պայմաններում հետազոտվել է ինքնաժին ու մակաժված շնչական պայթյունների վրա կոլխիցինի, դեքսամետազոնի, պրեդնիզոլոնի և յոդ-լիթիում- α -¹էքստրինի (Արմենիկում) ազդեցությունները: Այդ դեղամիջոցների ազդեցության համեմատական ուսումնասիրությունից պարզվեց, որ մակաժված շնչական պայթյունի առավել արդյունավետ ինհիբիտորներ են կոլխիցինը և Արմենիկումը, մինչդեռ

սինթետիկ գլյուկոկորտիկոիդները զգալի ազդեցություն չեն թողնում կամ ցուցաբերում են հակառակ ակտիվություն: Արմենիկումն ուժեղացնում է կոլխիցինի ճնշող ազդեցությունն ազատ ռադիկալների պրոտեինիկինազ C- և ֆագոցիտոզ մակաժված արտադրությունը, իսկ մյուս կողմից՝ ճնշում է գլյուկոկորտիկոիդների և ուռուցքային նեկրոզի գործոն α -ի խթանող ազդեցությունները:

Pharmacological modulation of the spontaneous and induced respiratory burst of granulocytes and monocytes at Familial Mediterranean Fever

S. A. Avetisyan

The effects of colchicine, dexamethasone, prednisolone and iodine-lithium- α -dextrin (Armenicum) on the spontaneous and chemotaxis-, proteinkinase C- and phagocytosis-induced respiratory burst of neutrophils and monocytes of the peripheral blood in patients with Familial Mediterranean Fever (FMF) were studied. A relative study of the action of pharmacological drugs of different groups showed that the most effective inhibitors of the chemotaxis-, proteinkinase C- and phagocytosis-

dependent respiratory burst of neutrophils and monocytes of FMF patients are colchicine and Armenicum, while synthetic glucocorticoids manifested the opposite activity or did not have any significant effect. Armenicum increases the inhibiting effect of colchicine on the proteinkinase C- and phagocytosis-induced production of free radicals and inhibits the stimulating effects of glucocorticoids and TNF- α .

Литература

1. Арутюнян В.М., Акопян Г.С. Периодическая болезнь, МИА, М., 2000.
2. Давтян Т.К., Акопян И.С., Мхитарян Л.М., Габриелян Э.С. Аллергология и иммунология, 2004, 5, с. 121.
3. Anton P.A., Targan S.R., Vigna S.R. et al. J. Clin. Immunol., 1988, 8, p. 148.
4. Bar-Eli M., Ehrenfeld M., Levy M. et al. Am. J. Med. Sci., 1981, 281, p. 15.
5. Bar-Eli M., Terrino M.C., Peters R.S., Schwabe A.A. Am. J. Hematol., 1981, 11, p.387.
6. Blocker A., Griffith G., Olivo J.C. et al. J. Cell Sci., 1998, 3, p. 303.
7. Centola M., Wood G., Frucht D.M. et al. Blood, 2000, 95, p. 3223.
8. Mansfield E., Chae J.J., Komarov H.D. et al. Blood, 2001, 98, p. 851.
9. Sarkisian T., Emerit I., Arutyunyan R. et al. Human Genet., 1997, 101, p. 238.
10. Stehlik Ch., Reed J.C. J. Exp. Med., 2004, 200, p. 551.