

## ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ МОДУЛЯЦИЯ ФАГОЦИТОЗА ГРАНУЛОЦИТОВ И МОНОЦИТОВ ПРИ СЕМЕЙНОЙ СРЕДИЗЕМНОМОРСКОЙ ЛИХОРАДКЕ

С. А. Аветисян<sup>1</sup>

С целью изучения фармакологической модуляции фагоцитоза гранулоцитов и моноцитов проведены количественные проточно-цитофлюориметрические исследования цельной периферической крови больных семейной средиземноморской лихорадкой (ССЛ), не получавших колхициновую терапию. Исследовано влияние препаратов различных фармакологических групп на фагоцитарную активность нейтрофилов и моноцитов больных ССЛ *in vitro*. Сравнительное изучение действия этих препаратов показало, что наиболее эффективными ингибиторами фагоцитоза нейтрофилов и моноцитов при ССЛ являются колхицин и йод-литий- $\alpha$ -декстрин (арменикум), в то время как синтетические глюкокортикоиды и тиосульфат натрия имеют низкую активность или не проявляют существенного воздействия. Обнаружена способность арменикума модулировать подавляющий эффект колхицина, нейтрализовать эффект ФНО- $\alpha$  и усиливать эффекты глюкокортикоидов. Выявлено ингибирующее влияние тиосульфата натрия на действие арменикума.

**Ключевые слова:** семейная средиземноморская лихорадка, фагоцитоз, нейтрофилы, моноциты, йод-литий- $\alpha$ -декстрин (арменикум), колхицин, глюкокортикоиды, тиосульфат натрия

### ВВЕДЕНИЕ

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. ССЛ часто осложняется вторичным амилоидозом с преимущественным поражением почек, что усложняет прогноз заболевания [1]. Согласно новой классификации наследственных воспалительных заболеваний, не характеризующихся наличием антиген-специфического гуморального или клеточного иммунного ответа, ССЛ входит в группу аутовоспалительных заболеваний [6]. Молекулярные механизмы патогенеза аутовоспалительных заболеваний заключаются в нарушении регуляции активации и апоптоза эффекторных клеток воспаления и естественного иммунитета [8]. Специфические мутации при ССЛ обнаружены в гене, кодирующем пирин, который экспрессируется в фагоцитирующих клетках и участвует в процессах регуляции фагоцитоза, апоптоза и синтеза провоспалительных цитокинов [4].

С целью изучения фармакологической модуляции фагоцитоза гранулоцитов и моноцитов мы проводили количественные проточно-цитофлюориметрические исследования цельной периферической крови больных ССЛ, не получавших колхициновую терапию. Было изучено сравнительное влияние колхицина, рекомбинантного фактора некроза опухолей- $\alpha$ ,

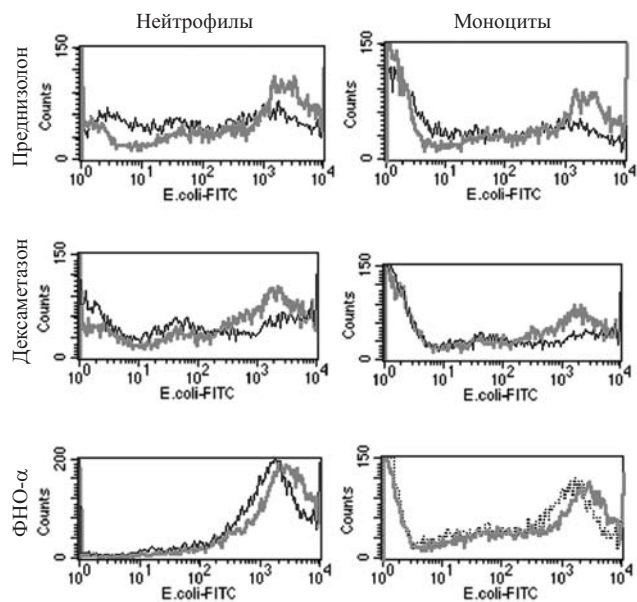
(ФНО- $\alpha$ ), тиосульфата натрия, дексаметазона, преднизолона и йод-литий- $\alpha$ -декстрина (арменикум) на фагоцитарную активность нейтрофилов и моноцитов больных ССЛ.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

*Периферическая кровь.* Исследована периферическая кровь 12 больных ССЛ возрастной группы 18–27 лет. Все больные были первичными, не получали колхицин и не имели амилоидоза. Периферическую кровь больных собирали в пробирки, содержащие литий-гепарин (Vacuet, Greiner). Основные гематологические показатели периферической крови определяли с помощью автоматического клеточного анализатора Celly v2.20 (Hucel Diagnostics).

*Количественное определение фагоцитоза гранулоцитов и моноцитов.* Цитофлюориметрическое исследование фагоцитоза проводили при помощи тест – системы Phagotest (Orpegen Pharma). Для этого к 100 мкл цельной крови добавляли опсонизированные *E. coli*-FITC в количестве  $1 - 2 \cdot 10^7$ , пробы нормализовали по отношению к абсолютному содержанию гранулоцитов в образцах. В исследовании придерживались соотношения *E. coli*/клетки – эффекторы 25:1. Пробы инкубировали при 37 °С в течение 10 мин, контрольные пробы оставляли на льду. Реакцию фагоцитоза останавливали добавлением раствора кумасси, подавляющего флюоресценцию 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

<sup>1</sup> Кафедра патофизиологии Ереванского государственного медицинского университета им. М. Гераци, Ереван, Армения, 375025, ул. Корюна, 2.



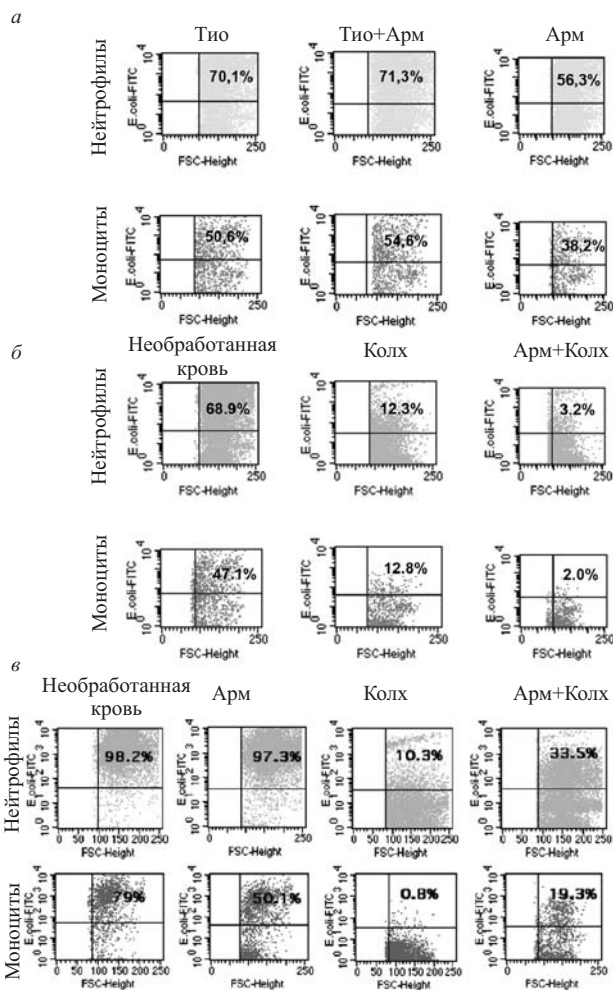
**Рис. 1.** Модуляция арменикума (Арм) действия глюкокортикоидов и ФНО- $\alpha$  на интенсивность фагоцитоза нейтрофилов и моноцитов больных семейной средиземноморской лихорадкой.

Светлые линии на гистограммах соответствуют действию препаратов в отсутствие Арм, темные линии — совместному действию препаратов и Арм.

фагоцитоза определяли на цитофлюориметре FACS Calibur™ с пакетом программы CellQuest (Becton Dickinson).

*Влияние фармакологических препаратов на фагоцитарную активность.* Использованы колхицин “Sigma”, дексаметазон (KRKA), преднизолон (Никомед), тиосульфат натрия (“Sigma”), рекомбинантный ФНО- $\alpha$  (R&D systems), а также йод-литий- $\alpha$ -декстрин — арменикум — Арм (производство ЗАО Арменикум, Ереван, Армения). Растворы Арм готовили непосредственно перед использованием, разводя препарат в физиологическом растворе [5]. 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 цитофлюориметрию 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 ( $p_v$ ). В остальных случаях расчет проводили с помощью критерия Стьюдента ( $p_s$ ) и парного T-критерия ( $p_p$ ).



**Рис. 2.** Совместное действие арменикума (Арм), тиосульфата натрия (а) и колхицина (б, в) на активность фагоцитоза нейтрофилов и моноцитов больных семейной средиземноморской лихорадкой. Соотношение *E. coli*-FITC составляет: а и б) 12,5:1; в) 25:1.

Тио — тиосульфат натрия, Колх — колхицин.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что особенностью ССЛ является высокая чувствительность к колхициновой и весьма низкая чувствительность к глюкокортикоидной терапии. В связи с этим мы проводили сравнительное изучение влияния препаратов различных фармакологических групп на фагоцитарную активность нейтрофилов и моноцитов периферической крови больных ССЛ в межприступном периоде. В таблице представлены результаты исследования по влиянию препаратов на фагоцитоз нейтрофилов и моноцитов цельной периферической крови больных ССЛ в условиях действия препаратов в течение 3 ч инкубации клеток. В этих условиях было ярко выражено подавляющее действие Арм и колхицина, в то время как дексаметазон, преднизолон и тиосульфат натрия не оказывали существенного эффекта на фагоцитоз клеток больных ССЛ. В

**Влияние различных фармакологических препаратов на фагоцитоз нейтрофилов и моноцитов больных семейной средиземноморской лихорадкой *in vitro***

Условия эксперимента	Активность фагоцитоза, %		Интенсивность фагоцитоза (СНК)	
	Нейтрофилы	Моноциты	Нейтрофилы	Моноциты
Инкубация 3 ч при 37 °С	Соотношение <i>E.coli</i> -FITC/клетки-эффекторы 25:1			
Необработанная кровь	90,8 ± 6,9	63,5 ± 13,1	2100 ± 327,4	1624 ± 133,1
Колхицин, 10 мкг/мл	36,2 ± 20,6*	25,3 ± 19,7*	480,5 ± 287**	410 ± 290,6**
Арменикум, 1:400	88 ± 9,4	54,9 ± 10,4	1682 ± 241,1 <sup>#</sup>	1231 ± 59,5*
Дексаметазон, 50 мкг/мл	89,3 ± 6,9	59,5 ± 11,2	1968 ± 210,5	1579 ± 115
Преднизолон, 25 мкг/мл	87,5 ± 7,6	57,7 ± 9,9	1810 ± 260,7	1490 ± 207,1
Тиосульфат натрия, 300 мкг/мл	91,7 ± 8,9	66,3 ± 13,1	2290 ± 307,1	1815 ± 212,7
Рекомбинантный ФНО-α, 5 нг/мл	96,6 ± 5,5	69,9 ± 7,4	2810 ± 422*	2100 ± 111,4*
	Соотношение <i>E.coli</i> -FITC/клетки-эффекторы 12,5:1			
Необработанная кровь	71,2 ± 8,8	52,2 ± 11,4	1967 ± 291,2	1759 ± 97,7
Колхицин, 10 мкг/мл	12,3 ± 6,7**	14,3 ± 7,7**	215 ± 88,8***	104,4 ± 69,9***
Арменикум, 1:400	59,5 ± 7,7 <sup>#</sup>	27,9 ± 9,9*	1346 ± 106,8*	1177 ± 112,2**
Дексаметазон, 50 мкг/мл	62,4 ± 7,7	49,9 ± 10,2	1652 ± 215,5 <sup>#</sup>	1493 ± 98,8 <sup>#</sup>
Преднизолон, 25 мкг/мл	53,5 ± 12,2	47,7 ± 13,1	1680 ± 115,5 <sup>#</sup>	1508 ± 99,9 <sup>#</sup>
Тиосульфат натрия, 300 мкг/мл	71,3 ± 10,2	52,2 ± 10,9	1863 ± 301,4	1648 ± 115,5

**Примечание.** \* —  $p_t < 0,05$ ; \*\* —  $p_t < 0,001$ ; \*\*\* —  $p_t < 0,0001$  и <sup>#</sup> —  $p_p \leq 0,05$  по сравнению с необработанной кровью.

этих условиях некоторым стимулирующим эффектом на фагоцитоз обладал рекомбинантный ФНО-α.

Однако в условиях двукратного снижения соотношения *E. coli*/эффекторные клетки подавляющий эффект дексаметазона и преднизолона на активность и интенсивность фагоцитоза клетками цельной крови был выражен слабо. В тех же условиях тиосульфат натрия также не оказывал сколько-нибудь выраженного эффекта на процессы фагоцитоза эффекторными клетками.

Таким образом, сравнительное изучение действия фармакологических препаратов различных групп показало, что наиболее эффективными ингибиторами фагоцитоза нейтрофилов и моноцитов при ССЛ являются колхицин и Арм, в то время, как глюкокортикоиды и тиосульфат натрия имеют низкую активность или не оказывают существенного воздействия.

Из вышеприведенных данных видно, что Арм по выраженности подавляющего эффекта на фагоцитоз нейтрофилов и моноцитов занимает промежуточное положение между колхицином и глюкокортикоидами. В связи с этим представилось интересным изучение совместного действия Арм с вышеуказанными фармакологическими препаратами.

Как представлено на рис. 1, Арм усиливает подавляющий эффект дексаметазона и преднизолона на интенсивность фагоцитоза нейтрофилов и моноцитов больных ССЛ. Кроме того, Арм обладает также способностью нейтрализовать активирующий эффект ФНО-α на фагоцитоз (рис. 1). В то же время тиосульфат натрия значительно подавлял ингибирующий эффект Арм в условиях соотношения *E. coli*/клетки – эффекторы 12,5:1 (рис. 2, а). Весьма интересные данные

были получены при совместном применении колхицина и Арм (рис. 2). В обычных условиях Арм подавлял ингибирующее влияние колхицина на фагоцитоз, (рис. 2, в) но в условиях меньшего соотношения *E. coli*/клетки – эффекторы, наоборот, оказывал аддитивный эффект (рис. 2).

Таким образом, Арм проявляет модулирующее воздействие на процессы фагоцитоза, усиливает эффект глюкокортикоидов и ингибирует эффекты ФНО-α и колхицина. Интересно, что ингибирующий эффект Арм можно контролировать тиосульфатом натрия, обладающим способностью подавлять эффект Арм.

При ССЛ, как и в случае других аутовоспалительных заболеваний, нейтрофилы и моноциты играют важную роль в реализации острофазного ответа, амилоидогенеза и т.д., однако лишь колхицин эффективно блокирует приступы при ССЛ. Именно этим ССЛ отличается от других аутовоспалительных заболеваний, имеющих характерное наследственное периодическое течение лихорадки (периодичная лихорадка, ассоциированная с рецептором ФНО, гипериммуноглобулин D, синдром Мукла-Веллса), которые эффективно купируются глюкокортикоидами и противовоспалительными препаратами [3, 7].

В данной работе мы разработали условия для изучения влияния фармакологических препаратов разных групп на фагоцитоз нейтрофилов и моноцитов в условиях, максимально приближенных к *in vivo*. Показано, что колхицин является самым эффективным среди исследованных препаратов, способных блокировать усиленный фагоцитоз нейтрофилов и моноцитов больных ССЛ. В этих условиях глюкокортикоиды и тиосульфат натрия не проявляли эффекта; они оказывали лишь ве-

сма слабый эффект при изменении условий эксперимента с понижением количества объекта фагоцитоза. Весьма интересными, на наш взгляд, представляются данные, полученные при изучении влияния Арм на фагоцитарную активность клеток при ССЛ. Известно, что механизм действия Арм заключается в его способности блокировать полисахарид-связывающие CD14-рецепторы моноцитов [2]. Тем самым механизм влияния Арм совершенно отличается от механизмов действия колхицина и других исследованных препаратов. Известно также, что Арм взаимодействует с другими поверхностными рецепторами клеток, например с CD4, CD8, CD2 и CD11/LFA-1, что может объяснить его модулирующее влияние на процессы фагоцитоза. Интересно, что Арм, как это было показано в других экспериментальных системах, и в данной системе проявлял анти-ФНО- $\alpha$  эффект [2, 5]. Наиболее интересным представляется факт подавления ингибирующего действия Арм тиосульфатом натрия, что, по-видимому, свидетельствует о важности окислительно-восстановительных процессов при модуляции фагоцитоза арменикумом.

Полученные данные о фармакологической регуляции активности нейтрофилов и моноцитов при ССЛ, а также сравнительное изучение эффективности препаратов различных фармакологических групп и их комбинаций могут открыть новые перспективы для усовершенствования существующих курсов лекарственной терапии при ССЛ.

## ВЫВОДЫ

1. Наиболее эффективными ингибиторами фагоцитоза нейтрофилов, и моноцитов при семейной средиземноморской лихорадке являются колхицин и арменикум (Арм), в то время как синтетические глюкокортикоиды и тиосульфат натрия имеют низкую активность или не оказывают существенного воздействия.

2. Подавляющий эффект Арм по сравнению с колхицином гораздо менее выражен, но значительно выше, чем у глюкокортикоидов.

3. Обнаружена способность Арм модулировать подавляющий эффект колхицина, нейтрализовать эффект ФНО- $\alpha$  и усиливать эффекты глюкокортикоидов. Выявлено ингибирующее влияние тиосульфата натрия на действие Арм.

4. Наиболее эффективным представляется факт подавления ингибирующего действия Арм тиосульфатом натрия, что, по-видимому, свидетельствует о важности окислительно-восстановительных процессов при модуляции фагоцитоза арменикумом.

## 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. M. Centola, G. Wood, D. M. Frucht, et al., *Blood*, **95**, 3223 – 3231 (2000).
4. J. J. Chae, H. D. Komarov, J. Cheng, et al., *Mol. Cell*, **7**, 591 – 604 (2003).
5. E. S. Gabrielyan and L. M. Mkhitarayan (eds.), *ARMENICUM — Experimental and Clinical Studies*, Gitutyun, Yerevan (2001).
6. D. L. Gummucio, A. Diaz., P. A. Schane, et al., *Clin. Exp. Rheumatol.*, **20**, 45 – 53 (2002).
7. E. Mansfield, J. J. Chae, H. D. Komarov, et al., *Blood*, **98**, 851 – 859 (2001).
8. Ch. Stehlik and J. C. Reed, *J. Exp. Med.*, **200**, 551 – 558 (2004).

Поступила 17.11.04

## PHARMACOLOGICAL MODULATION OF PHAGOCYTOSIS OF GRANULOCYTES AND MONOCYTES IN PATIENTS WITH FAMILIAL MEDITERRANEAN FEVER

S. A. Avetisyan

Yerevan State Medical University, ul. Koryuna 2, Yerevan, 375025 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 receive treatment with colchicines, and the effect of drugs from various pharmacological groups on the PANM in the blood of these patients were studied *in vitro* by quantitative flow cytofluorimetry. A comparative study of the drug action showed that the most effective PANM inhibitors during FMF are colchicine and iodine-lithium- $\alpha$ -dextrin (armenicum), while synthetic glucocorticoids and sodium thiosulfate showed low activity and produced no significant effect. It was established that armenicum is capable of modulating the PANM-inhibition effect of colchicine, neutralizing the effect of TNF, and increasing the effect of glucocorticoids. was observed. Sodium thiosulfate produces inhibition of the activity of armenicum.