

ФАРМАКОЛОГИЯ СИСТЕМЫ КРОВИ

ВЛИЯНИЕ КОЛХИЦИНА НА ПЕРИОДИЧНОСТЬ СПОНТАННОГО И ИНДУЦИРОВАННОГО “ДЫХАТЕЛЬНОГО ВЗРЫВА” ГРАНУЛОЦИТОВ И МОНОЦИТОВ ПРИ СЕМЕЙНОЙ СРЕДИЗЕМНОМОРСКОЙ ЛИХОРАДКЕ

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

Исследовано влияние колхицина на спонтанный и хемотаксис-, протеинкиназа С-, фагоцитоз- индуцированный “дыхательный взрыв” нейтрофилов и моноцитов периферической крови больных семейной средиземноморской лихорадкой (ССЛ). Проанализирована переходная активация нейтрофилов и моноцитов на уровне единичной клетки проточно-цитофлюориметрическим методом. Показано, что колхицин *in vitro* дозозависимым образом блокирует индукцию хемотаксис-, фагоцитоз- и протеинкиназа С-зависимого “дыхательного взрыва”, а также усиленную прооксидантную переходную активацию нейтрофилов и моноцитов больных ССЛ как в межприступном периоде, так и во время приступа. В то же время препарат стимулирует интенсивность спонтанного “дыхательного взрыва” нейтрофилов и моноцитов больных, а также эффективно подавляет периодичность разнонаправленной переходной активации “дыхательного взрыва” эффекторных клеток при ССЛ.

Ключевые слова: семейная средиземноморская лихорадка, спонтанный и индуцибельный “дыхательный взрыв”, нейтрофилы, моноциты, колхицин

ВВЕДЕНИЕ

Периодическая провоспалительная и прооксидантная активация нейтрофилов и моноцитов играет важную роль в реализации ответа острой фазы и лихорадки при аутовоспалительных заболеваниях, однако лишь колхицин эффективно блокирует периодические приступы при семейной средиземноморской лихорадке (ССЛ). Именно этим ССЛ отличается от других наследственных аутовоспалительных заболеваний, имеющих характерное периодическое течение лихорадки (периодическая лихорадка, ассоциированная с рецептором ФНО, гипериммуноглобулин-Д синдром, семейная холодовая крапивница и синдром Мукла-Веллса), которые эффективно купируются глюкокортикоидами и противовоспалительными препаратами [3]. Высокая чувствительность приступов ССЛ к колхицину может свидетельствовать о наличии колхицин-чувствительного пути индукции провоспалительной активации эффекторных клеток [2]. Целью настоящего исследования явилось изучение влияния колхицина на спонтанный и индуцированный “дыхательный взрыв” нейтрофилов и моноцитов периферической крови больных ССЛ, не получавших колхициновую терапию.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Периферическая кровь. Исследована периферическая кровь 12 больных ССЛ возрастной группы 18 – 27 лет. Больные не получали колхицин и не имели амилоидоза. Первая группа больных ($n = 6$) была исследована во время приступа, вторая группа ($n = 6$) — в межприступном периоде. Периферическую кровь забирали в пробирки, содержащие литий-гепарин (Vacuet, Greiner). Гематологические показатели периферической крови определяли с помощью автоматического клеточного анализатора Celly v2.20 (Hucel Diagnostics).

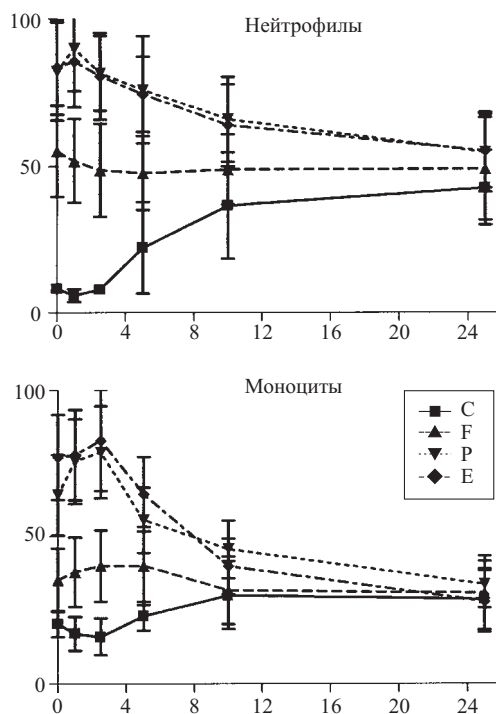
Количественное определение “дыхательного взрыва” гранулоцитов и моноцитов. Метод определения “дыхательного взрыва” основан на измерении флюоресценции единичных клеток при их инкубации с высокочувствительным флюоресцентным зондом — дигидрорадином 123 (DHR123), вступающим в реакцию с кислородсодержащими свободными радикалами (КСР — супероксид-анион, перекись водорода и гипохлорная кислота). Цитофлюориметрическое 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 $2 \cdot 10^7$ опсонизированных и фиксированных формалином *E. coli* или 20 мкл забуференного физиологического раствора. Пробы инкубировали 10 мин при 37 °С. После инкубации в пробы добавляли DHR123 и продол-

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

жали инкубировать при 37 °С в течение 10 мин. ДНК клеток окрашивали витальной краской — пропидий йодидом. Активность (процент 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 цитофлюориметре FACSCalibur с пакетом программ CellQuest (Becton Dickinson) отдельно для каждой популяции клеток.

Влияние колхицина на “дыхательный взрыв”. Растворы колхицина (Sigma) готовили непосредственно перед использованием, разводя препарат в абсолютном этаноле. Аликвоты образцов цельной крови по 1 мл инкубировали в присутствии различных концентраций колхицина в течение 3 ч при 37 °С. После завершения инкубации и гематологического анализа крови проводили проточную цитофлюориметрию по описанной выше методике.

При статистическом анализе различий между исследованными группами проводили проверку вариационных рядов на нормальность распределения и однородность дисперсий (критерий Колмогорова-Смирнова, W- и F-критерий). В случаях, когда гипотеза нормальности отвергалась, использовали непараметрические критерии Уилкоксона-Манна-Уитни (P_y). В



Влияние колхицина на спонтанный и индуцибельный “дыхательный взрыв” нейтрофилов и моноцитов больных ССЛ в зависимости от дозы.

По оси абсцисс — концентрация колхицина, мкг/мл, по оси ординат — активность “дыхательного взрыва” клеток, %. С — спонтанный, F — fMLP-, P — PMA-, E — *E. coli*-индуцированный “дыхательный взрыв.”

остальных случаях расчет проводили с помощью критерия Стьюдента (p_t) и парного T-критерия (p_p).

Таблица 1. Влияние колхицина на “дыхательный взрыв” нейтрофилов и моноцитов больных ССЛ в межприступном периоде

Показатель	Активность “дыхательного взрыва”, %				Интенсивность “дыхательного взрыва” (СНК)			
	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	42,7 ± 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 [#]
Моноциты								
Контроль	19,4 ± 4,5	35,5 ± 10,8	64,7 ± 13,8	73,5 ± 18,2	117,7 ± 12,4	209,6 ± 67	345,1 ± 92	464,2 ± 117,3
Колхицин	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 [#]

Переходная активация нейтрофилов и моноцитов в межприступном периоде ССЛ^а

	Активность “дыхательного взрыва”, %						Интенсивность “дыхательного взрыва” (СНК)					
	C → F	C → P	C → E	F → P	F → E	P → E	C → F	C → P	C → E	F → P	F → E	P → E
Нейтрофилы												
Контроль	$P_t = 0,005$	$P_t < 0,0001$	$P_t < 0,0001$	$P_t = 0,01$	$P_t = 0,01$	$P_{t,CH} = 0,05$	$P_t = 0,02$	$P_t = 0,006$	$P_t = 0,002$	$P_{t,CH} = 0,05$	$P_t = 0,01$	$P_{t,CH} = 0,05$
Колхицин	P_t, P_p, CH	P_t, P_p, CH	$P_{t,CH} = 0,05$	P_t, P_p, CH	P_t, P_p, CH	P_t, P_p, CH	P_t, P_p, CH	P_t, P_p, CH	$P_{t,CH} = 0,05$	P_t, P_p, CH	P_t, P_p, CH	P_t, P_p, CH
Моноциты												
Контроль	$P_{t,CH} = 0,05$	$P_t = 0,008$	$P_t = 0,01$	$P_{t,CH} = 0,01$	$P_{t,CH} = 0,03$	P_t, P_p, CH	$P_{t,CH} = 0,05$	$P_t = 0,01$	$P_t = 0,005$	$P_{t,CH} = 0,02$	$P_t = 0,04$	$P_{t,CH} = 0,05$
Колхицин	P_t, P_p, CH	P_t, P_p, CH	P_t, P_p, CH	P_t, P_p, CH	P_t, P_p, CH	P_t, P_p, CH	P_t, P_p, CH	P_t, P_p, CH	P_t, P_p, CH	P_t, P_p, CH	P_t, P_p, CH	P_t, P_p, CH

Примечания: * — $P_p \leq 0,05$; [#] — P_t или $P_y \leq 0,05$; ^{##} — P_t или $P_y \leq 0,001$ при сравнении средних значений с необработанным контролем; ^а — результаты представлены как статистическая достоверность между средними ± SEM значениями спонтанного (С), fMLP- (F), PMA- (P) и *E. coli*-индуцированного (E) окислительного взрыва.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение влияния колхицина на спонтанный и индуцированный “дыхательный взрыв” нейтрофилов и моноцитов периферической крови больных ССЛ в межприступном периоде показал, что колхицин в концентрации 1 – 5 мкг/мл не влияет ни на спонтанный, ни на хемотаксис-(fMLP), протеинкиназа С-(PMA) и фагоцитоз- (*E. coli*) зависимый “дыхательный взрыв” эффекторных клеток (рисунок). Однако при концентрации 10 – 25 мкг/мл колхицин сильно подавляет протеинкиназа С- и фагоцитоз-зависимый “дыхательный взрыв” в обеих популяциях клеток ($p_t < 0,001$ и $p_t < 0,0001$).

Из представленных в табл. 1 и 2 данных следует, что у больных ССЛ прослеживается периодическое усиление (в межприступном периоде) и погашение (во время приступа) спонтанного или индуцированного “дыхательного взрыва” нейтрофилов. В то же время в популяции моноцитов эта периодичность выражена слабо: здесь наблюдается лишь некоторое уменьшение частоты хемотаксис-зависимого “дыхательного взрыва” и интенсивности PMA-зависимой продукции КСР единичным моноцитом во время приступа. В отличие от моноцитов, нейтрофилы отвечают выраженной периодичностью индукции “окислительного взрыва” как в ответ на PMA-, так и на fMLP- и *E. coli*-индуцированную стимуляцию.

С целью изучения закономерностей переходной активации эффекторных клеток воспаления проводили анализ “дыхательного взрыва” клеток по следующему

ряду: спонтанный “дыхательный взрыв” (С) → слабая стимуляция хемотрактантом — fMLP (F) → стимуляция агонистом протеинкиназы С — PMA (P) → индукция фагоцитоза *E. coli* (E). Из представленных в таблицах данных следует, что в популяции нейтрофилов вероятность переходной активации хемотаксис-зависимого “дыхательного взрыва” у больных во время приступа снижается в 10 раз по сравнению с межприступным периодом, в то время как вероятность фагоцитоз-зависимой активации продукции КСР по ряду F → E — увеличивается в 10 раз. В популяции моноцитов, наоборот, у больных в межприступном периоде вероятность усиления продукции КСР при наличии хемотаксического сигнала снижается в 10 раз, в то время, как вероятность фагоцитоз-зависимой активации продукции КСР по ряду F → E — увеличивается в 10 раз. Если у больных во время приступа вероятность увеличения содержания моноцитов, продуцирующих КСР в ответ на фагоцитоз, возрастает в 100 раз, вероятность аналогичной активации нейтрофилов у этих же больных не изменяется. Таким образом, анализ вероятности переходной активации клеток по ряду С → F → P → E у больных ССЛ в межприступном периоде и во время приступа выявил выраженную периодичность изменения активности и интенсивности продукции КСР, а также противоположно направленную периодичность переходной активации моноцитов и нейтрофилов.

Колхицин (10 мкг/мл) стимулирует активность и интенсивность спонтанного “дыхательного взрыва”

Таблица 2. Влияние колхицина на “дыхательный взрыв” нейтрофилов и моноцитов больных ССЛ во время приступа

Показатель	Активность “дыхательного взрыва”, %				Интенсивность “дыхательного взрыва” (ЧНК)			
	Спонтанный	fMLP	PMA	<i>E. coli</i>	Спонтанный	fMLP	PMA	<i>E. coli</i>
Нейтрофилы								
Контроль	7,3 ± 1,9	17,3 ± 5,4	72 ± 25,6	97,1 ± 2,4	86,8 ± 21,5	111,7 ± 26,2	815 ± 423	1234 ± 334
Колхицин	41,3 ± 15,2 [#]	26,8 ± 14,6	36,6 ± 10,1 ^{##}	48,7 ± 14,2 [#]	148,2 ± 24,6 [*]	158,4 ± 22,6 [*]	181,4 ± 40,3 ^{###}	205,1 ± 64,8 ^{##}
Моноциты								
Контроль	16,3 ± 4,7	26,2 ± 5,7	68,8 ± 9,6	69,5 ± 8,1	100,7 ± 20,1	201,6 ± 54,4	243,5 ± 49,2	321,2 ± 78
Колхицин	38,3 ± 15,4 [#]	39,1 ± 16,5	44,3 ± 13,2 [*]	26,7 ± 9,1 ^{##}	155,7 ± 17,9 [*]	165,5 ± 40,4 [*]	146,9 ± 19,2 ^{###}	134,3 ± 38 ^{###}

Переходная активация нейтрофилов и моноцитов во время приступа ССЛ^а:

	Активность “дыхательного взрыва”, %						Интенсивность “дыхательного взрыва” (ЧНК)					
	С → F	С → P	С → E	F → P	F → E	P → E	С → F	С → P	С → E	F → P	F → E	P → E
Нейтрофилы												
Контроль	$P_t = 0,04$	$P_t = 0,006$	$P_t < 0,0001$	$P_t = 0,03$	$P_t < 0,0001$	$P_t P_p \text{ CH}$	$P_t \text{ CH}$	$P_t \text{ CH}$	$P_t \text{ CH}$	$P_t \text{ CH}$	$P_t \text{ CH}$	$P_t = 0,003$
Колхицин	$P_t P_p \text{ CH}$	$P_t P_p \text{ CH}$	$P_t P_p \text{ CH}$	$P_t P_p \text{ CH}$	$P_t P_p \text{ CH}$	$P_t P_p \text{ CH}$	$P_t P_p \text{ CH}$	$P_t P_p \text{ CH}$	$P_t P_p \text{ CH}$	$P_t P_p \text{ CH}$	$P_t P_p \text{ CH}$	$P_t P_p \text{ CH}$
Моноциты												
Контроль	$P_t \text{ CH}$	$P_t = 0,0005$	$P_t = 0,0005$	$P_t = 0,02$	$P_t = 0,004$	$P_t P_p \text{ CH}$	$P_t \text{ CH}$	$P_t = 0,01$	$P_t = 0,007$	$P_t P_p \text{ CH}$	$P_t \text{ CH}$	$P_t P_p \text{ CH}$
Колхицин	$P_p = 0,005$	$P_t P_p \text{ CH}$	$P_t P_p \text{ CH}$	$P_t P_p \text{ CH}$	$P_t P_p \text{ CH}$	$P_t P_p \text{ CH}$	$P_t P_p \text{ CH}$	$P_t P_p \text{ CH}$	$P_t P_p \text{ CH}$	$P_t P_p \text{ CH}$	$P_t P_p \text{ CH}$	$P_t P_p \text{ CH}$

Примечание: * — $P_t \leq 0,05$; # — P_t или $P_y \leq 0,05$; ## — P_t или $P_y \leq 0,001$; ### — P_t или $P_y \leq 0,0001$ при сравнении средних значений с необработанным контролем; ^а — результаты представлены как статистическая достоверность между средними ± SEM значениями спонтанного (С), fMLP- (F), PMA- (P) и *E. coli*-индуцированного (E) окислительного взрыва.

нейтрофилов больных как в межприступном периоде, так и во время приступа. В то же время колхицин значительно подавляет fMLP-, PMA- и фагоцитоз-индуцированную продукцию КСР в обеих популяциях клеток больных независимо от наличия приступа (табл. 1 и 2). При этом независимо от наличия или отсутствия приступа в популяции нейтрофилов вероятность переходной активации fMLP-, PMA- и *E. coli*-индуцированного “дыхательного взрыва” в присутствии колхицина одинаково эффективно снижается от 10 до 1000 раз по сравнению с необработанным контролем. Сходные результаты получены в популяции моноцитов, где также независимо от течения заболевания вероятность активации fMLP-, PMA- и *E. coli*-индуцированного “дыхательного взрыва” в присутствии колхицина снижается от 10 до 100 раз и исключается разнонаправленная периодичность переходной активации моноцитов и нейтрофилов больных ССЛ в межприступном периоде и во время приступа (табл. 1 и 2).

Таким образом, колхицин дозозависимым образом подавляет спонтанный и индуцированный “дыхательный взрыв” и вероятность переходной активации “дыхательного взрыва” моноцитов и нейтрофилов больных ССЛ, что исключает периодическую прооксидантную активацию эффекторных клеток воспаления.

Одной из характерных особенностей ССЛ является массивная инфильтрация нейтрофилами серозных оболочек в результате усиленного хемотаксиса клеток в ответ на субоптимальные провоспалительные сигналы [3]. В литературе описаны усиление хемотаксиса, хемилюминесценции, и продукции супероксидного аниона нейтрофилами [5], а также выраженный дисбаланс между про- и антиоксидантными системами, в результате чего при ССЛ возникает истощение антиоксидантных или гиперактивация прооксидантных систем эффекторных клеток воспаления [1].

Уникальная колхициновая чувствительность при ССЛ может свидетельствовать о наличии колхицин-чувствительного воспалительного пути, особенностью которого скорее является ингибирование колхицином стадии инициации или амплификации воспаления, чем функции эффекторных клеток в его очагах [4]. Об этом также свидетельствуют полученные нами данные о периодичном усилении и погашении актив-

ности и интенсивности продукции КСР и разнонаправленной переходной активации моноцитов и нейтрофилов у больных ССЛ. В данной работе показано, что колхицин эффективно блокирует индукцию хемотаксис-, фагоцитоз- и протеинкиназа C-зависимого “дыхательного взрыва”, а также усиленную прооксидантную переходную активацию нейтрофилов и моноцитов. Колхицин стимулирует спонтанную продукцию КСР и способствует подавлению как периодичности переходной индуцированной активации продукции КСР, так и противоположно направленной периодичности активации моноцитов и нейтрофилов больных ССЛ. Таким образом, высокая колхициновая чувствительность при ССЛ может быть обусловлена блокированием периодической прооксидантной гиперактивации эффекторных клеток воспаления.

ВЫВОДЫ

1. Колхицин *in vitro* дозозависимым образом блокирует индукцию хемотаксис-, фагоцитоз- и протеинкиназа C-зависимого “дыхательного взрыва” нейтрофилов и моноцитов больных семейной средиземноморской лихорадкой (ССЛ) в межприступном периоде и во время приступа.

2. Колхицин стимулирует интенсивность спонтанного “дыхательного взрыва” и проявляет ингибирующее влияние на переходную активацию “дыхательного взрыва” моноцитов и нейтрофилов больных ССЛ, что исключает периодическую прооксидантную активацию эффекторных клеток воспаления.

ЛИТЕРАТУРА

1. В. М. Арутюнян, Г. С. Акопян, *Периодическая болезнь*, МИА, Москва (2000).
2. M. Centola, G. Wood, D. M. Frucht, et al., *Blood*, **95**, 3223 – 3231 (2000).
3. D. Gummucio, A. Diaz, P. Schane, et al., *Clin. Exp. Rheumatol.*, **20**, 45 – 53 (2002).
4. E. Mansfield, J. J. Chae, H. D. Komarov, et al., *Blood*, **98**, 851 – 859 (2001).
5. T. Sarkisian, I. Emerit, R. Arutyunyan, et al., *Human Genet.*, **101**, 238 – 242 (1997).

Поступила 18.03.05

THE EFFECT OF COLCHICINE ON THE PERIODICITY OF THE SPONTANEOUS AND INDUCED RESPIRATORY BURST OF GRANULOCYTES AND MONOCYTES DURING 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

The influence of colchicine on the spontaneous and chemotaxis-, protein kinase C-, and phagocytosis-induced respiratory burst of neutrophils and monocytes in the peripheral blood of patients with familial Mediterranean fever (FMF) has been studied. The transient activation of neutrophils and monocytes on the level of a single cell has been monitored by means of flow cytometry. It is shown that colchicine blocks the induction of chemotaxis-, phagocytosis-, and protein kinase C-dependent respiratory burst *in vitro*, as well as the increased pro-oxidant transient activation of neutrophils and monocytes of FMF patients, both in the period of remission and during the FMF attack. Colchicine stimulates the intensity of the spontaneous respiratory burst of neutrophils and monocytes in patients in the course of remission and during the FMF attack. At the same time, the drug effectively suppresses the periodicity of the multidirectional transient activation of the respiratory burst of effector cells during FMF.