

МЕДИЦИНА

УДК 616-056: 616-097

Т. К. Давтян, С. А. Аветисян, академик Э. С. Габриелян, академик В. П. Акопян

Влияние йод-литий- α -декстрина (арменикума) на периодическую активацию спонтанного и индуцибельного дыхательного взрыва гранулоцитов и моноцитов при семейной средиземноморской лихорадке

(Представлено 22/ХІІ 2004)

Введение. С целью сочетания неспецифического антимикробного действия молекулярного и ионизированного йода с иммуномодулирующими свойствами отрицательно заряженных полисахаридов сконструирован комплексный препарат йод-литий- α -декстрин под названием “арменикум” (Арм) [1]. Пролонгированное отщепление молекул и ионов йода из комплексного полимера и его упорядоченная конформация способствуют антибактериальной, антивирусной активности и низкой токсичности препарата [2]. Арм обладает также выраженной иммуномодулирующей активностью [3, 4].

Периодическая провоспалительная и прооксидантная активация нейтрофилов и моноцитов играет важную роль в реализации острофазного ответа при семейной средиземноморской лихорадке (ССЛ) [5-7]. Специфические мутации при ССЛ обнаружены в гене, кодирующем пирин, который экспрессируется в фагоцитирующих клетках, участвует в процессах регуляции апоптоза и синтеза ИЛ-1 β [8-12].

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния Арм на индукцию спонтанного, хемотаксис-, фагоцитоз- и протеинкиназа С-опосредованного дыхательного взрыва нейтрофилов и моноцитов периферической крови у не получавших колхициновую терапию больных ССЛ.

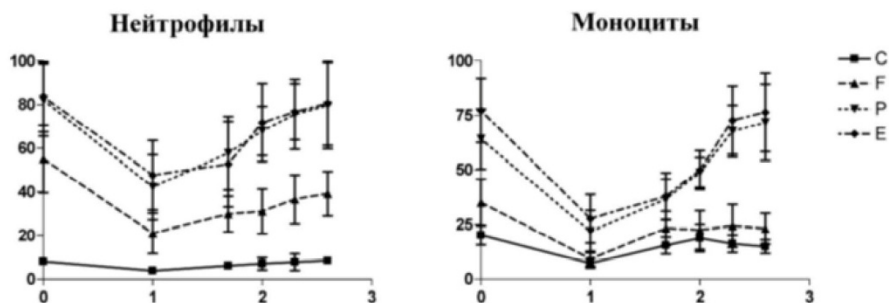
Материалы и методы. Была исследована **периферическая кровь** 12 больных ССЛ возрастной группы 18-27 лет. Больные не получали колхицин и не имели амилоидоз. Первая группа больных (n = 6) была исследована во время приступа, вторая (n = 6) - в межприступном периоде. Периферическую кровь забирали в пробирках, содержащих литий-гепарин (Vacuet, Greiner).

Метод **количественного определения дыхательного взрыва гранулоцитов и моноцитов** основан на измерении флюоресценции единичных клеток при их инкубации с высокочувствительным флюоресцентным зондом - дигидрородамином 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 один из следующих препаратов: 20 нг/мл фобол-12-миристил-13 ацетата (РМА); 100 нг/мл синтетического пептида *N*-формилметионин-лейцин-фенилаланин (fMLP); 2×10^7 опсонизированных и фиксированных формалином *E. Coli*; 20 мкл забуференного физиологического раствора - и пробы инкубировали 10 мин при 37⁰С. После инкубации в пробы добавляли DHR123 и продолжали инкубировать при 37⁰С 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) и в присутствии (индуцированный дыхательный взрыв) индукторов определяли на цитофлюориметре FACSCalibur™ с пакетом программ CellQuest (Becton Dickinson) отдельно для каждой популяции клеток.

Растворы Арм (производство ЗАО Арменикум, Ереван, Армения) и колхицина (Sigma) готовили непосредственно перед использованием, разводя препарат в физиологическом растворе и абсолютном этаноле соответственно. Аликвоты образцов цельной крови по 1 мл инкубировали в присутствии различных концентраций Арм и колхицина в течение 3 ч при 37⁰С. После завершения инкубации и гематологического анализа крови проводили проточную цитофлюориметрию, как описано выше.

При **статистическом анализе** различий между исследованными группами 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_y). В остальных случаях расчет проводился с помощью критерия Стьюдента (P_t) и парного *T*-критерия (P_p).

Результаты. Арм в разведении 1:10-1:100 значительно подавляет активность и интенсивность как спонтанного, так и хемотаксис (fMLP)-, протеинкиназа С (РМА)- и фагоцитоз- (*E. coli*) индуцированного дыхательного взрыва нейтрофилов и моноцитов больных ССЛ в межприступном периоде ($P_t < 0.04$ и $P_y < 0.03$). В разведении 1:400 Арм подавляет активность и интенсивность хемотаксис-зависимого дыхательного взрыва моноцитов и нейтрофилов больных ССЛ в межприступном периоде (рис.)



Влияние арменикума на спонтанный и индуцибельный дыхательный взрыв нейтрофилов и моноцитов больных ССЛ в зависимости от дозы. По оси абсцисс - \log_{10} разведения арменикума, по оси ординат - активность дыхательного взрыва клеток (%); С - спонтанный, F - fMLP-, P - PMA-, E - *E. Coli*-индуцированный дыхательный взрыв.

Из представленных в табл. 1 и 2 данных следует, что если в популяции нейтрофилов выслеживается периодическое усиление (в межприступном периоде) и погашение (во время приступа) спонтанного и индуцибельного дыхательного взрыва, то в популяции моноцитов такая периодичность выражена довольно слабо. В популяции моноцитов наблюдается лишь некоторое уменьшение частоты хемотаксис-зависимого дыхательного взрыва и интенсивности PMA-зависимой продукции КСР единичным моноцитом во время приступа. Анализ переходной активации дыхательного взрыва клеток по следующему ряду: спонтанный дыхательный взрыв (С)→слабая стимуляция хемоаттрактантом - fMLP (F)→стимуляция агонистом протеинкиназы С - PMA (P)→индукция фагоцитоза *E. coli* (E) - показал, что в популяции нейтрофилов вероятность переходной активации хемотаксис-зависимого дыхательного взрыва у больных во время приступа снижается в 10 раз по сравнению с больными в межприступном периоде, 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.

Таблица 1

Влияние арменикума и колхицина на дыхательный взрыв нейтрофилов и моноцитов больных ССЛ в межприступном периоде

Нейтрофилы	Активность дыхательного взрыва				Интенсивность дыхательного взрыва (ЧНК)			
	Спонтанный	fMLP	PMA	<i>E. coli</i>	Спонтанный	fMLP	PMA	<i>E. coli</i>
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
Арм	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
Арм+Колх	40.5±15.2*	47±13.6	46.6±12.1*	51.7±13.2*	172.5±10.7*	205.6±45.8°	218.7±66.4*	229.4±67**
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
Арм	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
Арм+Колх	25.4±8.3	32.6±10.6	35.6±9.9*	31.9±12.4*	102.6±20.5	109.7±21.5°	116.7±25.1*	110±28.3*

Влияние арменикума и колхицина на переходную активацию нейтрофилов и моноцитов в межприступном периоде ССЛ^а

Нейтрофилы	Активность дыхательного взрыва						Интенсивность дыхательного взрыва (СНК)					
	С→F	С→P	С→E	F→P	F→E	P→E	С→F	С→P	С→E	F→P	F→E	P→E
Контроль	P _t =0.005	P _t <0.0001	P _t <0.0001	P _t =0.01	P _t =0.01	P _t СН P _p =0.05	P _t =0.02	P _t =0.006	P _t =0.002	P _t СН P _p =0.05	P _t =0.01	P _t СН P _p =0.05
Арм	P _t =0.009	P _t <0.0001	P _t <0.0001	P _t =0.004	P _t =0.0006	P _t P _p СН	P _t =0.01	P _t =0.01	P _t =0.002	P _t =0.03	P _t =0.01	P _t P _p СН
Арм+Колх	P _t P _p СН	P _t P _p СН	P _t СН P _p =0.05	P _t P _p СН	P _t P _p СН	P _t P _p СН	P _t P _p СН	P _t P _p СН	P _t P _p СН	P _t СН P _p =0.05	P _t P _p СН	P _t P _p СН
Моноциты												
Контроль	P _t СН P _y =0.05	P _t =0.008	P _t =0.01	P _t СН P _p =0.01	P _t СН P _p =0.03	P _t P _p СН	P _t СН P _p =0.05	P _t =0.01	P _t =0.005	P _t СН P _p =0.02	P _t =0.04	P _t СН P _y =0.05
Арм	P _t P _p СН	P _t =0.006	P _t =0.004	P _t =0.03	P _t =0.02	P _t P _p СН	P _t P _p СН	P _t =0.04	P _t =0.02	P _t СН P _p =0.05	P _t СН P _p =0.05	P _t P _p СН
Арм+Колх	P _t P _p СН	P _t P _p СН	P _t P _p СН	P _t P _p СН	P _t P _p СН	P _t P _p СН	P _t P _p СН	P _t P _p СН	P _t P _p СН	P _t P _p СН	P _t P _p СН	P _t P _p СН

Примечания. ° – P_p≤0.05; * – P_t или P_y≤0.05; ** – P_t или P_y≤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

Таблица 2

Влияние арменикума и колхицина на дыхательный взрыв нейтрофилов и моноцитов больных ССЛ во время приступа

Нейтрофилы	Активность дыхательного взрыва				Интенсивность дыхательного взрыва (СНК)			
	Спонтанный	fMLP	PMA	E. coli	Спонтанный	fMLP	PMA	E. coli
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
Арм	9.1±4.3	11.7±4.1*	68.3±30.3	66.3±33.1	84.4±15.2	84.4±27.2°	691.6±381.7	1293±644.2
Арм+Колх	35.2±12*	29±15.6	39.2±12.1**	41.7±23.2**	139.2±34.6°	146±52.6	180.4±50.3***	205.6±54.8***
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
Арм	13.4±3.9	15.8±4.1°	59.3±26	59.5±30.3	93.8±24.5	130.4±35.6°	247.2±101	265.3±125
Арм+Колх	24.5±12.4	34.1±10.5°	31.3±11.2°	28.7±8.5**	135.7±15.9	169.4±36.4°	156.9±10.2*	149.3±28*

Влияние арменикума и колхицина на переходную активацию нейтрофилов и моноцитов во время приступа ССЛ^а

Нейтрофилы	Активность дыхательного взрыва						Интенсивность дыхательного взрыва (СНК)					
	С→F	С→P	С→E	F→P	F→E	P→E	С→F	С→P	С→E	F→P	F→E	P→E
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 СН	P _t СН P _p =0.005	P _t СН P _y =0.05	P _t СН P _p =0.009	P _t СН P _p =0.05	P _t =0.003	P _t P _p СН
Арм	P _t СН P _p =0.05	P _t =0.02	P _t =0.03	P _t =0.04	P _t СН P _p =0.05	P _t P _p СН	P _t P _p СН	P _t P _p СН	P _t P _p СН	P _t СН P _p =0.05	P _t =0.04	P _t P _p СН
Арм+Колх	P _t P _p СН	P _t P _p СН	P _t P _p СН	P _t P _p СН	P _t P _p СН	P _t P _p СН	P _t P _p СН	P _t P _p СН	P _t P _p СН	P _t P _p СН	P _t P _p СН	P _t P _p СН
Моноциты												
Контроль	P _t СН P _p =0.005	P _t =0.0005	P _t =0.0005	P _t =0.02	P _t =0.004	P _t P _p СН	P _t СН P _p =0.05	P _t =0.01	P _t =0.007	P _t P _p СН	P _t СН P _p =0.03	P _t P _p СН
Арм	P _t P _p СН	P _t =0.03	P _t =0.03	P _t P _p СН	P _t P _p СН	P _t P _p СН	P _t P _p СН	P _t P _p СН	P _t P _p СН	P _t P _p СН	P _t P _p СН	P _t P _p СН
Арм+Колх	P _t P _p СН	P _t P _p СН	P _t P _p СН	P _t P _p СН	P _t P _p СН	P _t P _p СН	P _t P _p СН	P _t P _p СН	P _t P _p СН	P _t P _p СН	P _t P _p СН	P _t P _p СН

Примечания. ° – P_p≤0.05; * – P_t или P_y≤0.05; ** – P_t или P_y≤0.001; *** – P_t или P_y≤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

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 нейтрофилами, а также противоположную направленность периодичности переходной активации моноцитов и нейтрофилов.

Арм в разведении 1:400 подавляет активность и интенсивность хемотаксис-зависимого дыхательного взрыва моноцитов и нейтрофилов больных ССЛ как в межприступном периоде, так и во время приступа (табл. 1 и 2). В присутствии колхицина (10 мкг/мл) 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 (табл. 1 и 2). У больных ССЛ в межприступном периоде Арм снижает вероятность продукции КСР РМА-стимулированным единичным нейтрофилом в 10 раз, но и повышает вероятность переходной активации нейтрофилов по ряду F→E и F→P от 10 до 100 раз. У этих же больных в присутствии Арм вероятность хемотаксис-зависимого дыхательного взрыва моноцитов и фагоцитоз-зависимой продукции КСР единичным моноцитом снижается в 10 раз, в то время как вероятность увеличения количества КСР-продуцирующих моноцитов при индукции фагоцитоза возрастает в 10 раз. У больных во время приступа Арм до 100 раз подавляет вероятность увеличения количества нейтрофилов при их стимуляции агонистом протеинкиназы С и при индукции фагоцитоза. При этом значительно подавляется вероятность хемотаксис-, протеинкиназа С- и фагоцитоз-индуцированной продукции КСР единичным нейтрофилом. У больных во время приступа вероятность переходного увеличения количества моноцитов и интенсивности хемотаксис-, протеинкиназа С- и фагоцитоз-индуцированной продукции КСР также снижается до 100 раз. При комбинированном действии колхицина и Арм вероятность переходной активации продукции КСР в присутствии fMLP, РМА и *E. coli* в обеих популяциях клеток больных ССЛ как в межприступном периоде, так и во время приступа снижается от 100 до 1000 раз (табл.2).

Таким образом, Арм подавляет активность и интенсивность хемотаксис-индуцированного дыхательного взрыва, а также вероятность переходной прооксидантной активации моноцитов и нейтрофилов больных ССЛ, что открывает новые возможности для улучшения существующих курсов лекарственной терапии при ССЛ.

Исследовательский центр “Арменикум”

Ереванский государственный медицинский университет им. М. Гераци

**Տ. Կ. Դավթյան, Ս. Ա. Ավետիսյան, ակադեմիկոս Է. Ս. Գաբրիելյան,
ակադեմիկոս Վ.Պ. Հակոբյան**

**Ընտանեկան միջերկրածովային տենդի ժամանակ գրանուլոցիտների և մոնոցիտների
սպոնտան ու ինդուցեբիլ շնչական պայթյունի վրա յոդ-լիթիում- α -դեքստրինի
(Արմենիկում) ազդեցությունը**

Ընտանեկան միջերկրածովային տենդով (ԸՄՏ) հիվանդների ծայրամասային արյան նեյտրոֆիլներում և մոնոցիտներում ուսումնասիրվել է յոդ-լիթիում- α -դեքստրինի (Արմենի-

կում) ազդեցությունը ինքնաբերական, քեմոտաքսիս-, պրոտեինկինազ C-, ֆագոցիտոզ-ինդուկցված շնչական պայթյունի վրա: Մեկ բջջի մակարդակով հոսքային ցիտոֆյուրիմետրիկ մեթոդով հետազոտվել է նաև նեյտրոֆիլների և մոնոցիտների անցումային ակտիվությունը: Պարզվել է, որ Արմենիկումն ընկճում է հիվանդների մոնոցիտների և նեյտրոֆիլների քեմոտաքսիս-ինդուկցված շնչական պայթյունի ակտիվությունն ու ինտենսիվությունը, ինչպես նաև իջեցնում այդ բջիջների անցումային պրոօքսիդանտային ակտիվացման հավանականությունը, ինչը կախված է ինչպես թթվածնի ազատ ռադիկալների արտադրության ինդուկտորների ուժից և ազդեցության մեխանիզմից, այնպես էլ հիվանդության նոպայի առկայությունից: Կոլխիցինի առկայությամբ Արմենիկումի ընկճող ազդեցությունը նշված գործընթացների վրա պոտենցվում է: Արմենիկումն ավելի արդյունավետ ազդում է մոնոցիտների պոպուլյացիայի վրա ինչպես նոպայի, այնպես էլ միջնոպայական շրջանում և կոլխիցինի նման նոպայի ժամանակ ընկճում է մոնոցիտների ու նեյտրոֆիլների պարբերական պրոօքսիդանտային ակտիվացումը:

T. K. Davtyan, S. A. Avetisyan, academician E. S. Gabrielyan, academician V. P. Hakobyan

The Effect of Iodine-lithium- α -dextrin (Armenicum) on the Periodic Activation of Spontaneous and Inducible Respiratory Burst of Granulocytes and Monocytes during Familial Mediterranean Fever

The effect of iodine-lithium- α -dextrin (Armenicum) on the spontaneous and chemotaxis-, proteinkinase C-, and phagocytosis-induced respiratory burst of neutrophils and monocytes in the peripheral blood of patients with Familial Mediterranean Fever (FMF) was studied. The transitory activation of neutrophils and monocytes was also analyzed on the level of a single cell using flow cytometry. It was shown that Armenicum suppresses the activity and intensity of chemotaxis-induced respiratory burst, and also lowers the probability of transitory pro-oxidant activation of monocytes and neutrophils in FMF patients, which depends both on the force and mechanism of the action of inducers of free radicals production, as well as on the presence or absence of an FMF attack. In the presence of cochicine, the inhibitory effect of Arm on chemotaxis-, proteinkinase C-, and phagocytosis-dependent free radicals production, and the periodic pro-oxidant activation of effector cells of inflammation, is potentiated. Armenicum most effectively acts on the monocyte population of FMF patients both in the period of remission as well as during an attack and, like colchicine, suppresses the periodic pro-oxidant activation of monocyte and neutrophils of FMF patients during an attack.

Литература

1. *Gabrielyan E.S., Mkhitaryan L.M. (eds.), ARMENICUM - Experimental and Clinical Studies*, Gitutyun, Yerevan. 2001. 228 p.
2. *Давтян Т.К., Акопян И.С., Мхитарян Л.М., Габриелян Э.С.* - Аллергология и иммунология. 2004. N 5. С. 121.
3. *Давтян Т.К., Мхитарян Л.М., Ароян А.А., Мкртчян Н.Р.* - International J. Immunorehabilitation. 2002. N 4. P. 88-89.
4. *Davtyan T.K., Hakobyan I.S., Gabrielyan E.S.* - 13th International Symposium on HIV & Emerging Infectious Diseases. 2004. PP2.15. P.177.
5. *Aganna E., Hammond L., Hawkins P.N., Aldea A., McKee S.A. Pools van Amstel H.A., Mischung C.* - Arthritis Rheum. 2003. V. 49. P. 2632-2644.
6. *Arkwright P.D., McDermott M.F., Houten S.M., Frenkel J., Waterham, Aganna E., Hammond L.J., Mirakian R.M., Tomlin P.I., Vijaydural P.I., Cant A.J.* - Clin. Exp. Immunol. 2002. V. 130. P. 484-488.
7. *Gummucio D.L., Diaz A., Schaner P.A.B., Richards N., Babcock C.B.S., Sehaller M.B.S., Cesena T.B.S.* - Clin. Exp. Rheumatol. 2002. V. 20. P. 45-53.
8. *Александрян Ю.Т., Арутюнян В.М., Давтян Т.К., Акопян Г.С.* - Иммунология. 1999. N 2. С. 9-13.
9. French FMF Consortium. - Nat. Genet. 1997. V. 17 P. 25-31.
10. International FMF Consortium. - Cell. 1997. V. 90. P. 797-807.
11. *Schattner A., Gurevitz A., Zemer D., Hahn T.Q.* - J. Med. 1996. V. 86. P. 205-210
12. *Stehlik Ch., Reed J.C.* - J. Exp. Med. 2004. V. 200. P. 551-558.