

УДК: 615.218:612.014

Дубняк Игорь Николаевич

аспирант кафедры фармакологии и клинической фармакологии,
Тихоокеанский государственный медицинский университет
Zyank@mail.ru

Елисеева Екатерина Валерьевна

доктор медицинских наук,
профессор кафедры фармакологии и клинической фармакологии,
Тихоокеанский государственный медицинский университет
yeliseeff@rbcmail.ru

Дубняк Яна Викторовна

кандидат технических наук, доцент,
департамент пищевых наук и технологий Школы биомедицины,
Дальневосточный федеральный университет.

yana.prym@mail.ru

Igor N. Dubniak

graduate student of department of pharmacology and clinical pharmacology,
Pacific state medical university
Zyank@mail.ru

Ekaterina V. Yeliseyeva

doctor of medical sciences,
professor of department of pharmacology and clinical pharmacology,
Pacific state medical university
yeliseeff@rbcmail.ru

Yana V. Dubniak

Candidate of Technical Sciences, associate professor,
Department of food sciences and technologies of School of biomedicine
of Far Eastern Federal University.
yana.prym@mail.ru

**ОСОБЕННОСТИ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ
СОСТОЯНИЯ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ МЕМБРАН
ФАГОЦИТИРУЮЩИХ КЛЕТОК. ПРИМЕНЕНИЕ В ПРАКТИКЕ**

**FEATURES OF PHARMACOLOGICAL CORRECTION OF THE
CONDITION OF LIZOSOMALNY MEMBRANES OF
FAGOTSITIRUYUSHCHY CAGES. APPLICATION IN PRACTICE**

Аннотация. В проведенной работе исследованы моноциты и нейтрофилы крови 60 здоровых людей и перитонеальные макрофаги 20 крыс. Полученные результаты свидетельствуют о том, что у здоровых людей изменения показатель стабильности лизосомных мембран (ПСЛМ) моноцитов и нейтрофилов крови под воздействие антигистаминных

препаратов первого поколения (хлоропирамин, хифенадин) при применении 50 % терапевтической дозы практически не наблюдается. При увеличении дозировки до терапевтического уровня и до двойной терапевтической дозы начинает наблюдаться увеличение ПСЛМ ($p < 0,05$), что говорит о лабильности лизосомных мембран. Анализ действия лоратадина на мембраны лизосомных клеток по изменению ПСЛМ показал, что ПСЛМ моноцитов, нейтрофилов и перитонеальных макрофагов при воздействии лоратадина в разных дозах приводит к слабой тенденции в сторону лабильности, что позволяет считать такие изменения аналогичными при воздействии антигистаминных препаратов первого поколения. При анализе изменения ПСЛМ фагоцитирующих клеток под воздействием фексофенадина отмечено его однонаправленное уменьшение, зависящее от увеличения его дозы ($p < 0,05$), то есть способность стабилизировать лизосомальные мембраны.

Ключевые слова: фагоцитирующие клетки, макрофаги, мембраны, ферменты, цитокины, стабильность лизосомных мембран, антигистаминные препараты, показатель стабильности лизосомных мембран (ПСЛМ), терапевтическая доза препарата

Summary. In the carried-out work monocytes and neutrophils of blood of 60 healthy people and peritoneal macrophages of 20 rats are investigated.

The received results demonstrate that healthy people have changes the indicator of stability of lizosomny membranes (ISLM) of monocytes and neutrophils of blood under influence of antihistaminic medicines of the first generation (хлоропирамин, хифенадин) at application of 50% of a therapeutic dose practically isn't observed. At increase in a dosage up to therapeutic level and up to a double therapeutic dose increase in PSLM begins to be observed ($p < 0,05$) that speaks about a labilization of lizosomny membranes. The analysis of action of a loratadin on membranes of lizosomny cages on change of PSLM has shown that PSLM of monocytes, neutrophils and peritoneal macrophages at influence of a loratadin in different doses leads to a weak tendency towards a labilization that allows to consider such changes similar at influence of antihistaminic medicines of the first generation. In the analysis of change of PSLM of fagotsitiruyushchy cages under the influence of a feksofenadin his unidirectional reduction depending on increase in his dose ($p < 0,05$), that is ability to stabilize lizosomalny membranes is noted.

Keywords: fagotsitiruyushchy cages, macrophages, membranes, enzymes, tsitokina, stability of lizosomny membranes, antihistaminic medicines, indicator of stability of lizosomny membranes (ISLM), therapeutic dose of medicine

Введение

Состояние стабильности мембран лизосом определяет степень выхода лизосомных ферментов из клеток, что обеспечивает развитие и течение патологического процесса, а в некоторых случаях его усиление.

Известно, что состояние стабильности лизосомных мембран клеток является одной из функций лизосом клеток системы макрофагов, степень активации которых влияет на это состояние [1; 2; ; 10]. Именно изменение стабильности мембран лизосом определяет степень выхода лизосомных ферментов из клеток и обеспечивает развитие и течение патологического процесса в виде его усиления или ослабления.

При активации макрофагов возникает усиление синтетических, секреторных процессов в клетках. В частности, происходит повышение синтеза и секреции лизосомных ферментов из клеток, усиление выработки провоспалительных цитокинов, в том числе, секреции интерлейкина 8 (IL-8), уровень которого в крови заметно повышается [5; 6; 10; 11]. Ранее нами было показано лабилизирующее влияние некоторых антибиотиков и гепарина, а также стабилизирующее влияние статинов на состояние лизосомных мембран фагоцитирующих клеток [5]. Задачей данного исследования явилось изучение лизосомомембранных свойств некоторых лекарственных средств из группы антигистаминных препаратов (хлоропирамин, хифенадин, лоратадин, фексофенадин) с помощью оригинального метода оценки стабильности лизосомных мембран фагоцитирующих клеток [11]. Еще мы высказывали предположения, что многие лекарственные средства, включая антигистаминные препараты, оказывают определенное воздействие на различные звенья иммунной системы, в том числе на фагоцитирующие клетки [1; 3; 4; 6], в связи с чем, нами было изучено действие антигистаминных препаратов на фагоцитирующие клетки крыс и здоровых людей в различных концентрациях.

Материал и методы исследования

Исследованы моноциты и нейтрофилы крови 60 здоровых людей и перитонеальные макрофаги 20 крыс. Для исследования мы брали кровь у здоровых в отношении аллергических заболеваний людей и суспензию перитонеальных клеток крыс. Моноциты крови выделяли на градиенте плотности фиколл-верографина методом А.Войт в описании [11] с последующим прикреплением к поверхности стекла. Выделение гранулоцитов крови проводили методом, описанным Г.Фрик и Э.Прейснер, получение перитонеальных клеток методом, описанным Р.В. Петровым с соавт.

Определение стабильности лизосомных мембран (СЛМ) моноцитов, гранулоцитов и макрофагов по показателю стабильности (ПСЛМ) проводили путем культивирования выделенных клеток в культуральной среде (среда 199 с 0,5 % стерильного L-глутамин и 2,5 % смешанной человеческой сыворотки, прогретой в течение 30 мин при 56°C) в течение 12-15 часов при 37°C. После прогревания определяли в надклеточной среде секретированный лизоцим ($L_{секр}$) в мкг/мл и, после 4-6-кратного замораживания-оттаивания культивируемых клеток, общий лизоцим ($L_{общ}$), секретированный плюс внутриклеточный лизоцим) в мкг/мл

микрометодом с расчетом ПСЛМ в % [11]. Повышение ПСЛМ выше контрольного уровня здоровых людей является критерием лабилизации лизосомных мембран клеток, снижение – стабилизации.

Синтетический лизоцим ($L_{\text{синт}}$) клеток системы макрофагов определяли в процессе выполнения метода определения ПСЛМ путем оценки разницы $L_{\text{общ}}$ до и после культивирования, выраженный в мкг/мл.

Определение IL-8 в супернатанте культивированных клеток (оценивалась секреция IL-8 моноцитами) проводилось методом сэндвич-варианта твердофазного иммуноферментного анализа с использованием реактивов фирмы «R&D Diagnostics Inc.» (США). Чувствительность метода для IL-8 – 1 пг/мл.

Обработку полученных данных проводили в соответствии с рекомендациями [8] с использованием пакета программ «Statistica 5» на персональном компьютере (ПК) «Pentium V».

Результаты исследования

Полученные результаты свидетельствуют о том (табл.1), что у здоровых людей изменения ПСЛМ моноцитов и нейтрофилов крови под воздействие антигистаминных препаратов первого поколения (хлоропирамин, хифенадин) при применении 50 % терапевтической дозы практически не наблюдается.

Таблица 1

Показатели стабильности лизосомных мембран фагоцитирующих клеток (моноцитов, нейтрофилов, перитонеальных макрофагов) и изменение ПСЛМ под воздействием антигистаминных препаратов I поколения

Исследуемый препарат, мкг/мл	ПСЛМ, %					
	Нейтрофилы		Моноциты		Макрофаги	
		t		t		t
Контроль	79,7±1,4	-	65,8±1,2	-	87,8±1,6	-
Хлоропирамин, 125	81,0±1,3	3,2	66,0±1,2	2,3	88,0±1,5	2,6
Хлоропирамин, 250	83,1±1,7	12,7	67,9±1,4	8,2	88,4±1,5	6,2
Хлоропирамин, 500	85,5±2,0	16,6	72,7±1,4	13,9	89,8±2,0	11,9
Хифенадин, 125	81,0±1,3	2,8	66,4±1,2	2,9	88,6±1,5	2,2
Хифенадин, 250	83,1±1,7	15,5	67,9±1,4	9,6	88,2±1,5	6,8
Хифенадин, 500	84,9±2,0	19,6	73,3±1,4	18,2	89,1±2,0	11,2

При увеличении дозировки до терапевтического уровня и до двойной терапевтической дозы начинает наблюдаться увеличение ПСЛМ ($p < 0,05$), что говорит о лабилизации лизосомных мембран.

Можно предположить, что наряду с нейтрализацией биологически активных веществ, в основном, гистамина, антигистаминные препараты первого поколения обладают способностью лабилизировать лизосомные мембраны, что, возможно, может приводить к эффектам, подобным синдрому отмены.

Наряду с этим, было интересно сравнить действие на изучаемые клетки антигистаминных препаратов II поколения. Нами были выбраны из этой группы лоратадин и фексофенадин. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2

Показатели стабильности лизосомных мембран фагоцитирующих клеток (моноцитов, нейтрофилов, перитонеальных макрофагов) и изменение ПСЛМ под воздействием антигистаминных препаратов II поколения

Исследуемый препарат, мкг/мл	ПСЛМ, %					
	Нейтрофилы		Моноциты		Макрофаги	
		t		t		t
1	2	3	4	5	6	7
Контроль	79,7±1,4	-	65,8±1,2	-	87,8±1,6	-
Лоратадин, 50	79,8±1,3	2,2	66,4±1,4	2,1	87,9±1,5	2,4
Лоратадин, 100	82,2±1,4	8,4	67,9±1,2	8,7	88,3±1,6	12,1
Лоратадин, 200	87,4±1,6	12,3	74,2±1,2	14,3	89,4±1,3	15,2
Фексофенадин, 900	79,0±1,1	3,9	65,9±1,4	2,9	87,6±1,3	2,2
Фексофенадин, 1800	75,3±1,3	18,2	63,5±1,2	9,9	84,2±1,2	18,7
Фексофенадин, 3600	73,3±1,5	25,8	63,5±1,45	12,2	81,5±1,2	22,4

Анализ действия лоратадина на мембраны лизосомных клеток по изменению ПСЛМ показал, что ПСЛМ моноцитов, нейтрофилов и перитонеальных макрофагов при воздействии лоратадина в разных дозах приводит к слабой тенденции в сторону лабильности, что позволяет считать такие изменения аналогичными при воздействии антигистаминных препаратов первого поколения. Еще более интересные результаты были получены при воздействии на фагоцитирующие клетки антигистаминного препарата этого же класса – фексофенадина.

При анализе изменения ПСЛМ фагоцитирующих клеток под воздействием фексофенадина отмечено его однонаправленное уменьшение, зависящее от увеличения его дозы ($p < 0,05$). Полученные результаты показали возможность фексофенадина стабилизировать лизосомные мембраны фагоцитирующих клеток, что наряду с нейтрализацией биологически активных веществ, видимо, способствует его более длительному эффекту и гарантии отсутствия синдрома отмены после прекращения лечения.

Обсуждение полученных данных

Оценивая полученные результаты с точки зрения особенностей изменения функционального состояния клеток системы макрофагов при воздействии разных дозировок антигистаминных препаратов первого и второго поколения, можно отметить повышение уровня ПСЛМ

моноцитами и нейтрофилами крови, а также перитонеальными макрофагами крыс после воздействия на них антигистаминных препаратов. Данное явление требует внимательного назначения этих препаратов практическими врачами с учетом их лабилизирующего лизосомные мембраны действия, в частности у пациентов с ослабленным иммунитетом. Стабилизацию мембран лизосомных мембран под воздействием фексофенадина можно считать дополнительным благоприятным эффектом, развивающимся при применении этого препарата.

Литература:

1. Алрой Д., Гарганта Ч., Видерщайн Г. Вторичные биохимические и морфологические последствия при лизосомальных болезнях накопления // Биохимия. 2014. Т. 79, № 7. С. 782–801.

2. Борзова Е.Ю. Принципы и перспективы антигистаминной терапии хронической крапивницы // Российский Аллергологический Журнал. 2012. № 5, вып.1. С.31–39.

3. Дубняк И.Н., Мальцева Е.А., Шаронов А.С., Дубняк Н.С. Влияние лекарственных препаратов на стабильность лизосомных мембран фагоцитирующих клеток //Аллергология и иммунология. 2006. Т 7. № 3. С.440.

4. Хаитова Р.М., Атаулаханова Р.И. Иммунотерапия: руководство для врачей. М.: ГЭОТАР-МЕДИА, 2014. 670 с.

5. Кольцов И.П., Храмова И.А. Взаимосвязь секреторно-синтетических процессов в моноцитах/макрофагах с уровнем секреции интерлейкина 8 моноцитами крови при эндометрите // Тихоокеанский медицинский журнал. 2011. № 3. С. 23–25.

6. Кравцов А.Л., Шмелькова Т.П. Секреторная дегрануляция нейтрофилов как триггер воспаления и регулятор иммунного ответа: роль сериновых лейкоцитарных протеаз и протеолитически активируемых рецепторов // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2011. № 1. С. 79-87.

7. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение прикладных программ «Statistica». М.: Изд-во Медиа сфера, 2002. 305 с.

8. Хаитов Р.М., Игнатъев Г.А., Сидорович И.Г. Иммунология. Норма и патология. М.: Медицина, 2010. 750 с.

9. Шаронов А.С. Фагоциты, лизосомы, мембраны: учебное пособие. Владивосток: Дальнаука, 2007. 128с.

10. Mosser D.M. The many faces of macrophage activation // J. of Leukocyte Biology. 2003. Vol. 73. P. 209-212.

Literature:

1. Alroi D., Garganta Ch., Vidershchayn G. Secondary biochemical and morphological consequences at lizosomalny diseases of accumulation//Biochemistry. 2014. T. 79, No. 7. Page 782-801.

2. Borzova E.Yu. *Principles and prospects of antihistaminic therapy of a chronic small tortoiseshell*//*Russian Allergologicheskoy Magazine*. 2012. No. 5, issue 1. Page 31-39.
3. Dubniak I.N. , Maltsev E.A., Sharonov A. S., Dubniak N.S. *Influence of medicines on stability of lizosomny membranes of fagotsitiruyushchy cages*//*Allergology and immunology*. 2006. T 7. No. 3. Page 440.
4. Haitova R.M., Ataulakhanova R.I. *Immunotherapy: the management for doctors*. M.: GEOTAR-MEDIA, 2014. 670 pages.
5. Koltsov I. P., Hramova I.A. *Interrelation of sekretorno-synthetic processes in monocytes/macrophages with interleukin secretion level 8 monocytes of blood at an endometritis*//*the Pacific medical magazine*. 2011. No. 3. Page 23-25.
6. Kravtsov A.L., Shmelkova T.P. *Sekretornaya degranulation of neutrophils as trigger of inflammation and regulator of the immune answer: a role of serinovy leykotsitarny proteases and proteolytic the activated receptors*//*Epidemiology and vaccinal prevention*. 2011. No. 1. Page 79-87.
7. Rebrova O.Yu. *Statistical analysis of medical data. Application of the Statistica application programs*. M.: Publishing house of Media sphere, 2002. 305 pages.
8. Haitov R.M., Ignatyev G.A., Sidorovich of I.G. *Immunologiya. Norm and pathology*. M.: Medicine, 2010. 750 pages.
9. Sharonov A. S. *Phagocytes, lysosomes, membranes: manual*. Vladivostok: Dalnauka, 2007. 128 pages.
10. Mosser D.M. *The many faces of macrophage activation* // *J. of Leukocyte Biology*. 2003. Vol. 73. P. 209-212.