

А.Х.Коган, И.Г.Даниляк, А.А.Стремоухов

РЕАКЦИЯ ГЕНЕРАЦИИ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА ЛЕЙКОЦИТАМИ НА ГИСТАМИН ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМАХ И ТЯЖЕСТИ ОБОСТРЕНИЯ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ

Кафедра патофизиологии и кафедра внутренних болезней № 2
1-го лечебного факультета ММА им.И.М.Сеченова

THE HISTAMINE EFFECT ON LEUKOCYTAL GENERATION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES DURING BRONCHIAL ASTHMA OF VARIOUS FORMS AND THE SEVERITY DEGREE

A.H.Kohan, I.G.Daniliack, A.A.Stremoukhov

S u m m a r y

The histamine effect on leukocytal generation of reactive oxygen species (LGROS) with SiO_2 stimulation was investigated by the luminol dependent chemiluminescence (ChL) method in 65 patients with bronchial asthma and in 19 donors. Histamine decreased LGROS in most of the donors, while in most of patients it increased LGROS. The reaction increase degree and the reaction frequency depended on form, stage, severity degree and duration of the disease. It was concluded that histamine can be included into the bronchial asthma pathogenesis not only by the way of direct bronchoconstriction stimulation, but with of the increase of LGROS. The supposition was made about possibility of the certain reaction use as an additional test for estimating the exacerbation degree and prognosis of the bronchial asthma course.

Р е з ю м е

У 65 больных бронхиальной астмой и 19 доноров методом люминолзависимой хемилюминесценции исследовано влияние гистамина на реакцию генерации активных форм кислорода лейкоцитами (ГАФКЛ), стимулированных SiO_2 . У большинства доноров гистамин снижал ГАФКЛ, тогда как у большинства больных гистамин увеличивал ГАФКЛ. Степень увеличения этой реакции и ее частота зависели от формы, фазы, тяжести обострения и длительности заболевания. Авторами был сделан вывод о включении гистамина в патогенез бронхиальной астмы не только путем прямой стимуляции бронхоспазма, но также посредством усиления ГАФКЛ. Высказано предположение о возможности использования данной реакции в качестве дополнительного теста для оценки тяжести обострения и прогноза течения бронхиальной астмы.

Гистамин является одним из наиболее важных медиаторов воспалительных и аллергических реакций [8,9,12]. Выделяясь в процессе взаимодействия тучных клеток (ТК) с аллергеном, гистамин присутствует как в раннюю, так и позднюю фазу аллергических реакций. Он модулирует функции клеток воспаления через имеющиеся на них специфические рецепторы [8—14]. Гистамин вызывает развитие бронхоспазма, стимулирует хемотаксис эозинофилов, угнетает высвобождение лизосомальных ферментов [5,8—11]. В последние годы интенсивно изучается роль активных форм кислорода (АФК), генерируемых лейкоцитами, в патогенезе бронхиальной астмы (БА). АФК вызывают повреждение клеточных мембран, увеличивают их проницаемость, потенцируют воспаление бронхов [1,3,4]. Кроме того, АФК усиливают высвобождение гистамина из ТК [12]. Не исключено, что гистамин в свою очередь моделирует генерацию АФК лейкоцитами (ГАФКЛ), образуя таким образом замкнутый "порочный" круг. Однако этот

вопрос в литературе не освещен. Целью данного исследования явилось определение чувствительности к гистамину реакции ГАФКЛ при различных формах и тяжести обострения БА.

Обследовано 65 больных БА (19 мужчин и 46 женщин) в возрасте 17—67 лет. Всем больным проведено общеклиническое, аллергологическое и лабораторное обследование, а также исследование показателей функции внешнего дыхания (ФВД) на спирометре "Микролаб 3300" с регистрацией жизненной емкости легких (ЖЕЛ), форсированной жизненной емкости легких (ФЖЕЛ), объема форсированного выдоха за 1 секунду (ОФВ₁), индекса Тиффно (ИТ). Диагноз ставился на основании общепринятых критериев [8,9]. 48 пациентов страдали atopической БА, 8 — аспириновой, 9 — стероидзависимой. 13 больных находились в фазе легкого обострения, 49 — среднетяжелого, 3 — в фазе тяжелого обострения. К началу обследования 40 пациентов лечились бронхорасширяющими препара-

тами (теофиллины, ингаляционные симпатомиметики), 9 — глюкокортикоидными препаратами (оральными — 6, ингаляционными — 3). 65 больных обследовано в фазе обострения, 62 — в ремиссию. Контрольную группу составили 19 практически здоровых доноров, не имеющих никаких гематологических, соматических и аллергических заболеваний и отягощенной наследственности по аллергическим заболеваниям в анамнезе.

ГАФКЛ определяли методом люминолзависимой хемилюминесценции (ХЛ) люминометром LKB "Wallac" (Швеция). Лейкоциты выделяли из гепаринизированной венозной крови по технике, описанной А.Х.Коганом и соавт. [4], и взвешивали их в 1—2 мл 0,85 % раствора NaCl, забуференного карбонатным буфером до pH=7,35; подсчитывали в камере Горяева исходную общую концентрацию гранулоцитов и доводили до 2500/мкл. К 0,3 мл приготовленной взвеси лейкоцитов добавляли 0,04 мл раствора гистамина в дозе 10^{-5} М (конечная концентрация $1,17 \cdot 10^{-6}$ М). Выбор дозы мотивирован литературными данными, согласно которым у здоровых доноров 10^{-5} М раствор гистамина, как правило, вызывает ингибирование ХЛ лейкоцитов на 30—50 % [13—15]. Полученную систему инкубировали в течение 2 минут при комнатной температуре, добавляли 0,04 мл насыщенного изосолярного водного раствора люминола pH=7,35, измеряли ХЛ до выхода на первый максимум, после чего вводили фагоцитируемые частицы, стимулирующие ХЛ, — 0,2 мл 1 % взвеси SiO₂ (размер частиц 4—15 мкм) и продолжали измерение ХЛ до установления второго максимума. Результаты оценивались по второму максимуму, отражающему стимулированную ГАФКЛ. Присутствие лимфоцитов в лейкоцитарной массе не мешало измерению ХЛ фагоцитов, т.к. в покое при обычных условиях они практически не хемилюминесцируют, а при контакте с твердыми частицами не фагоцитируют [7]. Для контроля ставили точно такой же опыт, как описано выше, но отличающийся от него тем, что вместо гистамина к взвеси добавляли равный объем забуференного 0,85 % раствора NaCl. После измерения ХЛ рассчитывали: а) показатель интенсивности стимулированной ХЛ лейкоцитов (ПИХЛс) отдельно для опыта с гистамином и для контрольного опыта без гистамина по формуле [4]:

$$\text{ПИХЛс} = \frac{\text{Максимальная ХЛ (кВ/с)} \cdot 10^6}{\text{Общ. кол-во гранулоцитов моноцитов в исслед. объеме}}.$$

б) величину реакции лейкоцитов на гистамин (ВРЛ, %) по формуле:

$$\text{ВРЛ} = \frac{\text{ПИХЛс (конт.)} - \text{ПИХЛс (гист.)}}{\text{ПИХЛс (конт.)}} \times 100\%.$$

У 14 (73,7 %) из 19 доноров гистамин снижал ГАФКЛ, у остальных (26,3 %) повышал. Напротив, суммарно лишь у 40% больных БА наблюдалось снижение ГАФКЛ под влиянием гистамина, в то время как у большинства (60 %) гистамин в указанной концентрации увеличивал ГАФКЛ в 4 раза по сравнению с донорами ($p < 0,001$) (табл.1).

Т а б л и ц а 1

Влияние гистамина на стимулированную генерацию АФК лейкоцитами доноров и больных БА в разные фазы ее развития, независимо от формы и тяжести обострения

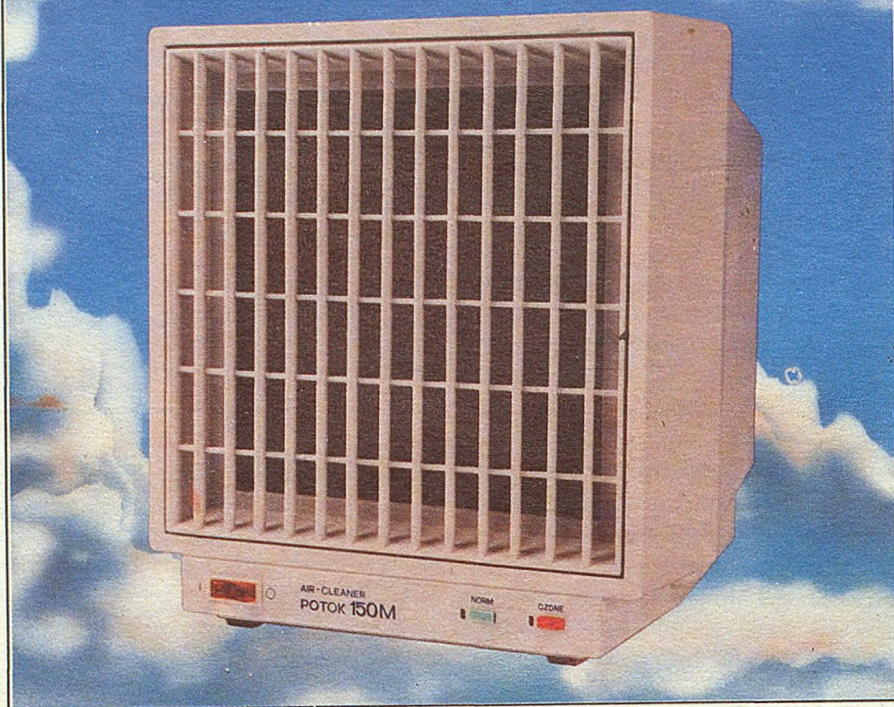
Группа больных	Изменение величины реакции ГАФКЛ под влиянием гистамина, %	
	снижение	увеличение
Доноры $n=19$	$15,9 \pm 2,8$ $n=14$ (73,7%)	$5,7 \pm 1,9^*$ $n=5$ (26,3%)
Больные БА		
обострение $n=65$	$12,7 \pm 2,0$ $n=26$ (40,0%)	$22,9 \pm 2,1^*$ $n=39$ (60,0%)
ремиссия $n=62$	$16,5 \pm 2,3$ $n=34$ (54,8%)	А $11,4 \pm 2,2^{**}$ $n=12$ (19,3%) Б $24,9 \pm 6,0^{***}$ $n=16$ (25,9%)

Примечание. * — достоверные различия между донорами и больными БА ($p < 0,001$), ** — достоверные различия между больными БА в фазе обострения и ремиссии ($p < 0,001$), *** — достоверные различия между подгруппами А и Б ($p < 0,01$)
А — больные БА с уменьшением стимулирующего влияния гистамина на ГАФКЛ,
Б — больные БА с увеличением стимулирующего влияния гистамина на ГАФКЛ.

Наряду с этим отмечался ряд особенностей изменения ГАФКЛ на воздействие гистамина в зависимости от формы и тяжести обострения БА. По особенностям реакции ГАФКЛ на гистамин больные atopической БА в фазе легкого и среднетяжелого обострения могут быть разделены на две подгруппы: а) с увеличением ГАФКЛ на воздействие гистамина (у 46,1—48,6 % больных), значимо большим, чем у аналогичной подгруппы доноров, — в 1,63—3,17 раза; б) со снижением ГАФКЛ на воздействие гистамина (у 51,4—53,8 % больных), но по величине меньшим (только у пациентов с обострением средней тяжести), чем в аналогичной группе доноров, в 1,74 раза. Следовательно, в обеих подгруппах atopической БА (а и б) происходит нарастание ГАФКЛ на воздействие гистамина, но в б-подгруппе за счет прямого увеличения эффекта нарастания, а в а-подгруппе за счет снижения тормозного влияния гистамина ("растормощения" его); при этом реакция на гистамин по величине больше при среднетяжелом, чем при легком обострении atopической БА (табл.2). Реакция ГАФКЛ на гистамин у больных с другими формами БА также отличается своими определенными особенностями. Как у больных аспириновой БА в фазе среднетяжелого обострения, так и у больных стероидзависимой БА в фазе среднетяжелого и тяжелого обострения (суммарно 17 случаев), в отличие от atopической БА, ни разу не наблюдалось снижения ГАФКЛ на воздействие гистамина (см. табл.2). У всех этих больных гистамин вызывал только нарастание ГАФКЛ, но большее, чем аналогичный эффект у доноров (26,3 %, см. табл.2) в 4,4—4,5—7,9 раза, а также больше, чем в подгруппе больных



**Поток 150М — уникальная установка
для обеззараживания воздуха помещений!**



**Комбинированный электрофильтр, при сравнительно низком
напряжении, обеспечивает как 100% инактивацию,
так и тонкую фильтрацию воздуха.**

**При разработке установки удалось решить практически все
проблемы, с которыми сталкиваются производители
и пользователи подобного оборудования.**

Поток 150М:

- не требует замены фильтрующего элемента;
- не деионизирует воздух;
- не использует в конструкции бактерицидных ламп и химических фильтров;
- не пересушивает воздух озонотом.

Поток 150М:

- прост в обращении;
- обеспечивает глубокую очистку воздуха
от мелкодисперсной пыли, аллергенов, микроорганизмов
(эффективность фильтрации частиц размером 0,01—100,0 мкм до 96%);
- инактивирует любые микроорганизмы и вирусы (эффективность инактивации до 100%);
- детоксицирует и дезодорирует воздух помещений.

Технические характеристики:

Производительность — до 150 куб.м/ч; потребляемая мощность — 45 Вт;
напряжение — 220 В (50 Гц); масса — 10 кг; габариты — 360/325/365мм

**Предлагаемая установка — оригинальная разработка российской фирмы «ПОТОК Лтд.».
Защищена российскими и международными патентами.**

117330 Москва, а/я 664. Тел./факс: (095) 284-4456, 254-9823

Таблица 2

Влияние гистамина на стимулированную генерацию АФК лейкоцитами доноров и больных БА в зависимости от формы и тяжести обострения

№	Группа	Тяжесть обострения и количество обследованных	Изменение величины реакции ГАФКЛ под влиянием гистамина, %	
			снижение а	увеличение б
1	Доноры	n=19	15,9±2,8 n=14 (73,7%)	5,7±1,9 n=5 (26,3%)
2	Больные atopической БА	легкая n=13	17,3±3,2 n=7 (53,8%)	9,3±3,5 n=6 (46,1%)
3	— " —	средняя n=35	9,1±1,7 n=18 (51,4%)	18,1±3,0 n=17 (48,6%)
4	Больные аспириновой БА	средняя n=8	—	24,9±2,5 n=8 (100%)
5	Больные стероидзависимой БА	средняя n=6	—	25,6±2,0 n=6 (100%)
6	— " —	тяжелая n=3	—	45,0±10,5 n=3 (100%)

Примечание. Статистическая достоверность различий:
а) $p_{1/2}>0,05$; $p_{1/3}<0,05$; $p_{2/3}<0,05$;
б) $p_{1/3}<0,01$; $p_{1/4}<0,01$; $p_{1/5}<0,01$; $p_{1/6}<0,05$; $p_{3/5}<0,05$.

атопической БА средней тяжести с аналогичным эффектом нарастания ГАФКЛ на гистамин в 1,37—1,46—2,49 раза.

У 20 больных стероиднезависимой БА в фазе обострения средней тяжести проведен сравнительный анализ изменений ГАФКЛ и экспираторных показателей ФВД. Как видно из табл.3, у больных с повышением ГАФКЛ на гистамин, по сравнению с больными, у которых гистамин снижал ГАФКЛ, экспираторные показатели бронхиальной проходимости ниже на 19—31 % ($p<0,05$).

Кроме того, выявлена зависимость реакции ГАФКЛ на гистамин от длительности заболевания (4,9±1,1 года для а-подгруппы и 8,9±1,3 года для б-подгруппы ($p<0,02$), (см. табл.2 и 3).

Таблица 3

Корреляция между реакцией ГАФКЛ на гистамин и показателями функции внешнего дыхания у больных БА

Изменение величины ГАФКЛ под влиянием гистамина	Показатели ФВД, % к должным величинам			
	ЖЕЛ	ФЖЕЛ	ОФВ ₁	ИТ
Увеличение ГАФКЛ n=9	60,6±6,0	46,8±6,7	46,8±6,8	56,1±4,8
Снижение ГАФКЛ n=11	75,2±2,2	67,0±2,6	67,9±3,2	70,6±3,1

Примечание. Различия между группами больных достоверны ($p<0,05$).

В фазе ремиссии (см. табл.1) у 34 (54,8 %) из 62 больных отмечена тенденция к нормализации реакции ГАФКЛ на гистамин. У одной части (12) больных (подгруппа А) сохранилась реакция увеличения ГАФКЛ на гистамин, однако выраженная в 2 раза меньше, чем при обострении ($p<0,001$). У другой части (16) больных (подгруппа Б) не отмечено уменьшения стимулирующего влияния гистамина на ГАФКЛ. ВРЛ в этой подгруппе практически осталась такой же, как в фазе обострения (см. табл.1), и была в 4,4 раза выше, чем у доноров ($p<0,001$), и в 2,2 раза выше, чем в подгруппе А ($p<0,01$). Анализ результатов в подгруппе Б выявил несколько более высокий средний возраст пациентов (47,8±3,0 и 42,6±1,6 года, соответственно). Кроме того, в нее вошли более тяжелые больные. В 2 случаях исходно отмечалось тяжелое обострение заболевания, в 4 — стероидзависимая астма, в 2 — астматическая триада, у 3 больных обострение на фоне ОРВИ, у 2 — на фоне обострения хронического бронхита, у 1 — пневмонии, у 1 — хронического фарингита.

Таким образом, результаты исследования свидетельствуют, что при БА гистамин в концентрации 10^{-6} М у большинства больных (60 %) увеличивает стимулированную генерацию АФК лейкоцитами. Степень увеличения этой реакции и ее частота зависят от формы, фазы и тяжести обострения заболевания. В ремиссии БА у большинства (74,1 %) больных отмечается выраженная тенденция к уменьшению реакции ГАФКЛ на гистамин по сравнению с обострением. Однако в клинически более тяжелых случаях, а также у части больных с присоединением бактериальной и вирусной инфекции этого не происходит. Вероятно, несовпадение сроков клинической ремиссии с клеточной (по генерации АФК лейкоцитами) ремиссией может потенциально способствовать возникновению более частых рецидивов в данной группе больных. Полученные данные свидетельствуют о включении гистамина в патогенез БА не только путем прямой стимуляции развития бронхоспазма, но также и опосредованно, через усиление генерации АФК лейкоцитами. Реакция стимулированной генерации АФК фагоцитами на гистамин может служить дополнительным тестом для оценки тяжести обострения и прогноза течения БА.

ЛИТЕРАТУРА

1. Болевич С. Свободнорадикальные кислородные и липидные процессы и возможность их коррекции у больных бронхиальной астмой: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — М., 1991.
2. Генес В.С. Некоторые простые методы кибернетической обработки данных диагностических и физиологических исследований. — М., 1967.
3. Даниляк И.Г., Коган А.Х., Болевич С. Генерация активных форм кислорода лейкоцитами крови, перекисное окисление липидов и антиперекисная защита у больных бронхиальной астмой // Тер. арх. — 1992. — № 3. — С.54—57.
4. Коган А.Х., Лосев Н.И., Цыпин А.Б., Мануйлов Б.М. Генерация активных микробных форм кислорода лейкоцитами при прохождении через сосудистое русло легких // Бюл. экспер. биол. — 1989. — № 6. — С.688—690.

5. Норрис А.А. Современные представления о патофизиологии бронхиальной астмы // Национальный конгресс по болезням органов дыхания, 3-й.— СПб., 1992.— С.4—5.
6. Ойвин И.А. Статистическая обработка результатов экспериментальных исследований // Пат. физиол.— 1960.— № 4.— С.76—85.
7. Смирнов А.Н. Функциональные особенности нейтрофилов // Руководство по гематологии / Под ред. А.И.Воробьева.— М., 1985.— Т.1.— С.78—83.
8. Федосеев Г.Б., Хлопова Г.П. Бронхиальная астма.— Л., Медицина, 1988.
9. Чучалин А.Г. Бронхиальная астма.— М., Медицина, 1985.
10. Bellavite P. The superoxide-forming enzymatic system of phagocytes // Free Radical Biol. Med.— 1988.— Vol.4.— P.225—261.
11. Leino L., Lilius E.M. Histamine receptors on leukocytes are expressed differently in vitro and ex vivo // Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.— 1990.— Vol.91, № 1.— P.30—35.
12. Mannaioni P.F. et al. Free radicals as endogenous histamine releasers // Agents and Actions.— 1988.— Vol.23, № 3—4.— P.129—142.
13. Meretey K. et al. Action of histamine on PHA chemiluminescence response of blood mononuclear cells in autoimmune patients // Ibid.— 1986.— Vol.18, № 1—2.— P.254—257.
14. Meretey K. et al. Effect of H1 and H2 agonists on the chemiluminescence of human blood mononuclear cells induced by phytohemagglutinin // Immunopharmacology.— 1985.— Vol.9, № 3.— P.175—180.
15. Ozaki Y. et al. Effect of histamine agonists and antagonists on luminol-dependent chemiluminescence of granulocytes // Agents and Actions.— 1984.— Vol.15, № 3—4.— P.182—188.

Поступила 31.10.95.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1995

УДК 616.248-053.2-085.835.52-07

Р.А.Даирова, Н.А.Геппе, С.Болевич, А.Х.Коган

ПОКАЗАТЕЛИ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ЛЕЙКОЦИТОВ У ДЕТЕЙ БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ, ПОЛУЧАВШИХ ИНГАЛЯЦИИ ГИПЕРКАПНИЧЕСКОЙ ГИПОКСИЧЕСКОЙ ГАЗОВОЙ СМЕСИ

Московская медицинская академия им.И.М.Сеченова

LEUKOCYTAL HEMILUMINESCENCE PARAMETERS IN BRONCHIAL ASTHMA INFANTS OBTAINING HYPERCAPNIC HYPOXIC MIXTURE INHALATION

R.A.Dairova, N.A.Heppe, S.Bolevich, A.H.Kohan

Summary

The CO₂ effect on phagocytal generation of reactive oxygen species was studied in 40 bronchial asthma infants obtaining therapy with hypercapnic hypoxic gas mixture (HHGM) inhalations. It was found that chemiluminescence intensity parameters were greater in that patients during the postattack period than in healthy infants. During the intermedia period, the parameters decreased but were significantly higher than in controls. The satisfactory leucocyte sensitivity to CO₂ was found in 37.5% of patients, that well correlates with positive clinical effect. The lower effect from HHGM was noted in 62.5% of infants with the decreased reaction to CO₂. The role of leukocytes in bronchoconstriction was shown.

Резюме

Изучено влияние CO₂ на генерацию активных форм кислорода фагоцитами у больных бронхиальной астмой 40 детей, в лечении которых использовали ингаляции гиперкапнической гипоксической газовой смеси (ГГС). Выявлено, что в послеприступном периоде показатели интенсивности хемилюминесценции были выше по сравнению с контрольной группой (здоровые дети). В межприступном периоде они снижаются, но превышают контрольные значения. Выявлена у 37,5% больных хорошая чувствительность лейкоцитов к CO₂, что хорошо коррелировало с клиническим положительным эффектом. У 62,5% детей со сниженной реакцией к CO₂ отмечен меньший эффект от ГГС. Показана роль лейкоцитов в развитии бронхоконстрикции при бронхиальной астме у детей.

В последние 10—15 лет отмечен значительный рост бронхиальной астмы (БА) среди детского населения [4]. Разработано множество теорий механизмов развития бронхоконстрикции при БА, которые определяют

патогенетические подходы к выбору метода терапии. Важнейшим компонентом бронхообструктивного синдрома является воспалительный процесс в дыхательных путях [4]. Механизм возникновения приступа БА охватывает