

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

ряд клеточных взаимодействий, включающих стимуляцию клеточных элементов воспаления, таких как тучные клетки, макрофаги, нейтрофилы, эозинофилы. Все эти клетки обладают способностью генерировать активные формы кислорода, являющиеся медиаторами воспаления. А.Х.Коганом и сотр. [7] было выявлено ингибирующее влияние CO_2 на генерацию активных форм кислорода (АФК) фагоцитами у здоровых людей. Нарушение свободнорадикальных процессов отмечается при различных заболеваниях, протекающих с выраженными воспалительными реакциями [5,6,10]. Целью нашей работы явилось изучение влияния CO_2 на генерацию активных форм кислорода фагоцитами при БА у детей и влияния ингаляций гиперкапнической гипоксической газовой смеси (ГГС) на течение заболевания.

Ингаляции ГГС были использованы у 40 детей больных БА в возрасте 10—14 лет. 15 здоровых детей 10—14 лет составили контрольную группу. Среди больных было 17 девочек и 23 мальчика. БА диагностировали на основании общеклинических критериев и данных лабораторного, инструментального и аллергологического обследования. У 37 детей была atopическая БА среднетяжелого течения и у 3 легкого течения. 25 детей были в межприступном и 15 детей в послеприступном периоде заболевания. Всем больным назначили гипоаллергенную диету, массаж грудной клетки. Ряд больных (7 детей) в послеприступном периоде получали эуфиллин, интал, антигистаминные препараты в возрастных дозах.

ГГС проводили методом возвратного дыхания с помощью газонакопителя — полиэтиленового мешка емкостью 5 литров. Пациент надувал перед каждой ингаляцией газонакопитель и затем дышал из него через маску. Продолжительность ингаляции из газонакопителя от 3 до 5 минут 4 раза с 5-минутными перерывами 1—2 раза в день. К концу 5-минутного цикла концентрация CO_2 в газонакопителе составляла 3,0—3,5%, а концентрация O_2 снижалась до 16—18%. Курс продолжался 10—14 дней и повторялся через 3—6 месяцев. До начала и в конце курса ГГС у всех больных исследовали функцию внешнего дыхания, газы крови, кислотно-щелочное состояние, иммуноглобулины (Ig) A, M, G, E и определяли генерацию активных форм кислорода лейкоцитами (ГАФКЛ). Функцию внешнего дыхания определяли на спирографе "Pneumoscreen II" фирмы "Jaeger". Оценивались показатели форсированной жизненной емкости легких (ФЖЕЛ — FVC) и максимальной скорости при выдыхании 50% ФЖЕЛ (МСВ₅₀ — FEV₅₀). КИЦС и напряжение O_2 смешанной капиллярной крови определяли на аппарате Микро-Аstrup фирмы "Радиометр" (Дания). Ig A, M, G, определяли по методу Манчини, IgE определяли иммуноферментным методом.

ГАФКЛ определяли люминолзависимым хемилюминесцентным (ХЛ) методом. Влияние CO_2 на ГАФКЛ исследовали по модифицированной методике А.Х.Когана. Лейкоциты выделяли из венозной крови по уже известной методике [2,3], освобождали их от примеси эритроцитов осмоллизисом дистиллированной водой.

Взвешивали лейкоциты в забуферном 0,9% растворе натрия хлорида с рН=7,35 (ЗБФР), состоящем из 7,5 мл 0,9% раствора натрия хлорида и 2,5 мл фосфатно-щелочного буфера рН=7,35, и в собственной плазме [1]. 0,2 мл полученной взвеси лейкоцитов концентрацией 2500 клеток в 1 мкл помещали в минибарокамеру (аппарат "Камовского"). Из минибарокамеры под контролем манометра откачивали воздух до давления 671,6 мм рт.ст. и вводили CO_2 (58,4 мм рт.ст.), повышая общее давление до 730 мм рт.ст. При этом в минибарокамере оставалось разрежение 30 мм рт.ст., необходимое для обеспечения ее герметичности. Таким образом в минибарокамере создавалась газовая смесь: воздух Р=678,6 мм рт.ст. (92%) + CO_2 Р=58,4 мм рт.ст. (8%). Содержание O_2 в смеси снижалось до 19,0%. По аналогичной технологии готовили другую газовую смесь: воздух Р=584 мм рт.ст. (80%) + CO_2 Р=146 мм рт.ст. (20%). В этой смеси концентрация O_2 снижалась до 16,8%. Для контроля в минибарокамеру помещали лейкоцитарные пробы рН=7,35, на такие же величины давления откачивали воздух, однако вместо CO_2 опять вводили воздух на величину давления, равную в опытах (соответственно 58,4 и 146 мм рт.ст.). Поскольку 8% и 20% CO_2 снижает рН ЗБФР с 7,35 до 7,30, что само по себе может изменить ХЛ лейкоцитов, то возникла необходимость внесения поправки на влияние сдвига рН на ХЛ-показатели: лейкоциты взвешивали в ЗБФР рН=7,30, помещали в минибарокамеру, откачивали воздух на величину давления, равную PCO_2 в опыте, и возвращали воздух в барокамеру на такую же величину. Опытные и контрольные пробы инкубировали в термостате при температуре 36,9°C 20 минут, после чего их извлекали, добавляли 0,02 мл насыщенного изосолярного водного раствора люминола рН=7,35, помещали в хемолюминесцентный ЛКБ, "Wallak" (Швеция) и при 36,9°C регистрировали ХЛ до выхода на плато-максимум. Это соответствовало базальному показателю ХЛ (ПИХЛб). Затем к клеточной взвеси добавляли 0,2 мл опсонизированного зимозана (исходная концентрация 500 мг зимозана + 50 мл ЗБФР) и продолжали измерение до второго плато-максимума, что соответствовало стимулированному показателю ХЛ (ПИХЛс).

Рассчитывали показатель базальной и стимулированной интенсивности ХЛ одного лейкоцита по формуле:

$$\text{ПИХЛ} = \frac{\text{максим. ХЛ} \cdot 10^6}{\text{количество гранулоцитов и моноцитов в исследуемом объеме}}$$

Изменение ПИХЛб и ПИХЛс в каждом случае под влиянием CO_2 оценивали в процентах по следующей схеме:

1 этап: рассчитывали изменение ПИХЛб и ПИХЛс под влиянием сдвига рН до 7,30 по формуле:

$$\frac{\text{ПИХЛ в ЗБФР рН=7,35} - \text{ПИХЛ в ЗБФР рН=7,30}}{\text{ПИХЛ в ЗБФР рН=7,35}} \times 100 \quad (1)$$

2 этап: рассчитывали изменение ПИХЛб и ПИХЛс при совместном влиянии молекул CO_2 и смещенного ими рН до 7,30 по формуле:

$$\frac{\text{ПИХЛ в ЗБФР рН=7,35} - \text{ПИХЛ в } \text{CO}_2 \text{ (8\% и 20\%)}}{\text{ПИХЛ в ЗБФР рН=7,35}} \times 100 \quad (2)$$

3 этап: рассчитывали изменение ПИХЛб и ПИХЛс, отражающее влияние только CO_2 (8% и 20%) по формуле:

$$(3) = (2) - (1)$$

4 этап. В случае с лейкоцитами, взвешенными в собственной плазме, рассчитывали изменение ПИХЛб и ПИХЛс под влиянием 8% и 20% CO_2 по формуле:

$$\frac{\text{ПИХЛ до воздействия } \text{CO}_2 - \text{ПИХЛ после воздействия } \text{CO}_2}{\text{ПИХЛ до воздействия } \text{CO}_2} \times 100$$

Таким образом, рассчитывали 8 показателей:

1, 2 — ПИХЛб и ПИХЛс лейкоцитов, взвешенных в ЗБФР, до и после воздействия 8% CO_2 ; 3, 4 — ПИХЛб и ПИХЛс лейкоцитов, взвешенных в ЗБФР, до и после воздействия 20% CO_2 ; 5, 6 — ПИХЛб и ПИХЛс лейкоцитов, взвешенных в собственной плазме, до и после воздействия 8% CO_2 ; 7, 8 — ПИХЛб и ПИХЛс лейкоцитов, взвешенных в собственной плазме, до и после воздействия 20% CO_2 .

Каждое изменение ПИХЛб и ПИХЛс под влиянием CO_2 оценивали по следующей системе: снижение ПИХЛб и ПИХЛс до 30% принимали за 1 балл, от 30 до 60% — за 2 балла и больше 60% — за 3 балла. Общая их сумма от 22 до 24 баллов расценивалась как показатель хорошей чувствительности лейкоцитов к CO_2 . При сумме 19 и менее баллов или при повышении одного из показателей под влиянием CO_2 результат расценивался как низкая чувствительность лейкоцитов к CO_2 .

Исследования ГАФКЛ у детей в послеприступном и в межприступном периодах показало, что ПИХЛб и ПИХЛс в послеприступном периоде были существенно выше, чем в межприступном периоде и в контроле (табл. 1).

В послеприступном периоде, когда сохраняются клинические проявления бронхообструктивного синдрома (единичные хрипы, умеренная одышка), снижение функций дыхания, гипоксемия, генерация АФК усилена. В межприступном периоде, т.е. клинко-лабораторной ремиссии, эти показатели снижались, но к норме не приходили.

Генерация АФК лейкоцитами в приступном периоде БА по данным Masahiko Kato et al. [8] тесно коррелирует с бронхиальной гиперреактивностью. Длительно сохраняющаяся продукция повышенного уровня АФК не только в приступном, но и в послеприступном и межприступном периоде может быть фактором, поддерживающим бронхиальную гиперреактивность, и соответственно предрасполагать к возникновению обострения. Отмечена также высокая чувствительность лейкоцитов к стимулирующим факторам у детей больных БА. При инфильтрации бронхиальной ткани лейкоцитами и сохраняющейся высокой активности незначительная стимуляция, по-видимому, может приводить к повторному выбросу медиаторов. Полученные данные подтверждают точку зрения S. Wasserman [9] о наличии при БА воспаления дыхательных путей. Показатели ГАФКЛ в собственной плазме были несколько ниже, чем в ЗБФР, что, возможно, связано с наличием плазменных факторов, которые ингибируют процесс образования АФК.

Лейкоциты больных БА по разному реагировали на воздействие 8% и 20% CO_2 в минибарокамере. У части больных (30%) происходило ингибирование ГАФКЛ практически как в контроле, у других наоборот снижалось ингибирующее влияние CO_2 и усиливалась ГАФКЛ.

Все больные были разделены на две группы с учетом чувствительности лейкоцитов к гиперкапнической газовой смеси. Выявлена хорошая чувствительность к CO_2 (22—24 балла) у 15 (37,5%) больных. У 25 (62,5%) больных — низкая чувствительность (сумма баллов составляла 19 и меньше). В эту группу вошли 4 детей, у которых сумма баллов составила 20—21.

Из 15 больных, чувствительных к CO_2 , у 10 детей наблюдался хороший клинический эффект (табл. 2). Приступов астмы не отмечено в течении 1,5 года, дети меньше болели ОРВИ, физически становились крепче, активнее. У 5 детей, несмотря на хорошую чувствительность к CO_2 , отмечен меньший клинический эффект от ингаляции ГГС — урежение частоты приступов в год, удлинение ремиссии, уменьшение количества и доз применяемых лекарств в 2—3 раза. Дети реже болели ОРВИ, однако приступы сохранялись. Из 25 больных с низкой чувствительностью к CO_2 у 13 детей

Таблица 1

Хемолюминесцентные показатели генерации активных форм кислорода лейкоцитами ($\text{мВ} \cdot \text{с} \cdot 10^6$ лейкоцитов), взвешенными в ЗБФР и собственной плазме, у детей больных БА в послеприступном и межприступном периодах ($M \pm m$)

Период БА	Лейкоциты, взвешенные в ЗБФР		Лейкоциты, взвешенные в плазме	
	ПИХЛб	ПИХЛс	ПИХЛб	ПИХЛс
Межприступный $n=25$	271,1 $\pm$ 23,4	540,0 $\pm$ 73,4	211,7 $\pm$ 19,6	470,8 $\pm$ 63,2
Послеприступный $n=15$	370,8 $\pm$ 18,3*##	860,2 $\pm$ 81,2**,#	305,6 $\pm$ 104,2	725,7 $\pm$ 114,7#
Контроль $n=20$	285,5 $\pm$ 44,2	433,9 $\pm$ 64,1	171,2 $\pm$ 28,1	716,1 $\pm$ 160,7

Примечание. * — $p < 0,05$ по сравнению с контролем; ** — $p < 0,001$ по сравнению с контролем; # — $p < 0,05$ между периодами БА, ## — $p < 0,001$ между периодами БА.

Таблица 2

Изменение ХЛ-показателей генерации активных форм кислорода лейкоцитами ($\text{мВ} \cdot \text{с} \cdot 10^6$ лейкоцитов) у детей больных БА до и после лечения ГГС *in vivo* с учетом чувствительности лейкоцитов к CO_2

Группа	ПИХЛб		ПИХЛс	
	до лечения ГГС	после лечения ГГС	до лечения ГГС	после лечения ГГС
1-я	300,8 $\pm$ 52,3	164,2 $\pm$ 19,2*	522,1 $\pm$ 2,1	356,3 $\pm$ 40,6*
2-я	229,1 $\pm$ 49,5	474,2 $\pm$ 24,42**##	544,4 $\pm$ 56,0	710,6 $\pm$ 131#

Примечание. * — $p < 0,05$ между показателями до и после лечения ГГС; ** — $p < 0,001$ между показателями до и после лечения ГГС; # — $p < 0,05$ между соответствующими показателями 1-й и 2-й группы больных; ## — $p < 0,001$ между соответствующими показателями 1-й и 2-й группы больных.

Динамика функциональных показателей у детей больных БА в зависимости от чувствительности лейкоцитов к CO_2 до и после курса лечения ГГС

Группа больных	МОС ₅₀ , % от должн.		рН		рСО ₂ , мм рт.ст.		рО ₂ , мм рт.ст.	
	до лечения	после лечения	до лечения	после лечения	до лечения	после лечения	до лечения	после лечения
1-я	87,75±8,57	88,87±9,9	7,477±0,263	7,415±0,355	33,86±2,81	39,44±2,77*	73,95±3,78	77,95±3,75
2-я	91,66±4,72	84,0±7,6	7,452±0,211	7,434±0,341	31,7±3,5	33,6±4,1	75,15±3,15	77,84±4,2

Примечание. * — $p < 0,05$.

ингаляции ГГС оказали незначительное влияние на течение БА: количество приступов урежалось, соответственно удлинялась ремиссия, но по тяжести приступы оставались прежними, купировались разнообразными лекарственными препаратами. У части больных отмечено увеличение физической активности, большинство стали посещать уроки физкультуры, реже болели ОРВИ. У 12 больных не отмечено клинического эффекта от немедикаментозного метода ГГС. Течение болезни оставалось прежним, либо прогрессировало (4 детей).

Лечение детей больных БА показало (см. табл. 2), что в 1-й группе детей с хорошей чувствительностью к CO_2 и исходно высокими ХЛ-показателями ГАФКЛ ПИХЛб и ПИХЛс после курса ГГС уменьшились соответственно в 1,8 и 1,5 раза ($p < 0,05$ для обоих показателей). Во 2-й группе (нечувствительных к CO_2) начальные показатели ПИХЛб и ПИХЛс превышали данные в контрольной группе. После лечения ГГС значения ПИХЛб и ПИХЛс возрастали соответственно в 2,1 и 1,3 раза ($p < 0,05$ и $p > 0,05$). Таким образом, в 1-й группе больных CO_2 снижало, во 2-й группе усиливало ГАФКЛ лейкоцитами.

Мы сопоставили полученные данные с исследованиями ФВД, КЩС и газами крови (табл. 3), с Ig A, M, G, E.

Спирографические данные у детей как в 1-й, так и во 2-й группах (ФЖЕЛ, МОС₅₀) до начала лечения были в пределах нормы. После курса ГГС в 1-й группе ФВД оставалась нормальной, во 2-й группе больных отмечалась тенденция к снижению показателей МОС₅₀. Необходимо отметить, что в этой группе больных почти все дети получали помимо ГГС и традиционную бронхолитическую терапию. В 1-й группе больных отмечен рост рСО₂ в крови в 1,2 раза ($p < 0,05$). Во 2-й группе детей рост рСО₂ был незначительным. Показатели рО₂ у большинства больных приходили к норме.

Исследование иммуноглобулинов показало рост IgA от 158,75±34,62 до 195,1±41,66 мг% и IgG от 1396,2±118,04 до 1431,2±208,6 мг% в 1-й группе и отсутствие изменений показателей во 2-й группе. IgM в обеих группах оставался без изменений. Демонстративные изменения выявлены со стороны показателей общего IgE. У 65% из общего числа больных после курса

ГГС отмечено снижение в 2 и более раз уровня IgE. После курса ГГС показатели приближались к нормальным цифрам у детей только в 1-й группе. Во 2-й группе показатели IgE на фоне комплексной терапии также снижались, но были значительно выше и после лечения.

Таким образом, бронхиальная астма представляет воспалительное заболевание, при котором лейкоцитам отводится важная роль в развитии бронхоконстрикции путем генерации АФК, которые выступают как медиаторы воспаления. Различия в реагировании лейкоцитов на воздействие CO_2 может быть критерием отбора больных для лечения ГГС, так как в этом случае CO_2 оказывает ингибирующее влияние на генерацию ими АФК и способствует уменьшению воспаления в бронхах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Болевич С. Свободнорадикальные кислородные и липидные процессы и возможность их коррекции у больных бронхиальной астмой: Дис. ... канд. мед. наук. — М., 1991.
2. Коган А.Х., Лосев Н.И., Цыпин А.Б. и др. Генерация активных микробицидных форм кислорода лейкоцитами при прохождении через сосудистое русло легких // Бюл. exper. биол. — 1989. — № 6. — С. 688—690.
3. Коган А.Х., Цыпин А.Б., Мануйлов Б.М. О роли легких в регуляции генерации активных форм кислорода лейкоцитами в норме и патологии // Пат. физиол. — 1991. — № 1. — С. 46—50.
4. Международный консенсус по проблемам диагностики и лечения астмы: Резюме докладов. — СПб, 1992.
5. Fantane J.C., Ward P.A. Role oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions // Am. J. Pathol. — 1982. — Vol. 107. — P. 396—418.
6. Hertz F., Cloarec A. Pharmacology of free radicals: recent views on their relation to inflammatory mechanism // Life Sci. — 1984. — Vol. 34. — P. 713—720.
7. Kogan A.Kh., Manuilov B.M., Tsylin A.B. The of active-oxygen forms generation by leucocytes and their accumulation in lungs together with the increasing of phagocytic activity // International Conference on Critical Aspects of Free Radicals: Abstracts. — Vienna, 1993. — P. 122.
8. Masahiko K., Nakano M., Torikawa A. Ability of polymorphonuclear leucocytes to generate active oxygen species in children with bronchial asthma. Use of chemiluminescence probes with a cypridina luciferin analog and luminol // Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. — 1991. — Vol. 95. — P. 14—22.
9. Wasserman S.I. The lung mast cell: its physiology and potential relevance to defense of the lung // Environ. Hlth Persp. — 1980. — Vol. 35. — P. 153—164.

Поступила 17.06.94.