

11. Antonelli Incalzi R., Ristelli R., Fuso L. et al. Cardiac arrhythmias and left ventricular function in respiratory failure from COPD // Chest.— 1990.— Vol. 97, N 5.— P. 1092—1097.
12. Chazan R., Droszer W., Maruchin J. E. Pharmacodynamics of salbutamol in human // Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.— 1988.— Vol. 26, N 8.— P. 385—387.
13. Crawford S. M., Miles D. W. Salbutamol and cardiac arrhythmias // Curr. Med. Res. Opin.— 1981.— Vol. 7, N 6.— P. 410—415.
14. Dean J. W., Lal M. Y. Arrhythmias in heart failure: role of mechanically induced changes in electrophysiology // Lancet.— 1989.— Vol. 1, N 8650.— P. 1309—1312.
15. Finsh J. S. Cardiovascular toxicity: clinical evaluation of albuterol, isoproterenol and placebo in rising dose tolerance trial // Ann. Allergy.— 1981.— Vol. 47, N 5.— Pt 2.— P. 402—404.
16. Handley G. J. Cardiac arrhythmias in chronic obstructive pulmonary disease // Tex. Med.— 1981.— Vol. 77, N 3.— P. 6.
17. Kachel R. G. Coronary artery disease and arrhythmias in chronic obstructive pulmonary disease // Chest.— 1979.— Vol. 76, N 2.— P. 242.
18. Klitzke A.-K., Crice C.-P., Bethge K. P. et al. Herzrhythmusstörungen bei Patient mit chronischen obstructiven Lungenerkrankungen unter Therapie // Pneumologie.— 1990.— Bd 44, N 1.— S. 536—537.
19. Khokhar N. Cardiac arrhythmias associated with acute respiratory failure in chronic obstructive pulmonary disease // Mil. Med.— 1981.— Vol. 146, N 12.— P. 856—858.
20. Valette H., Raffestin B., Lockhart A. Cardiac function in chronic bronchitis: effects of pacing and plasma expansion // Clin. Sci.— 1981.— Vol. 60.— P. 371—375.

Поступила 30.12.92

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993  
УДК 616.248-07:616.155.1-008.1-074

И. А. Баранова, С. Н. Орлов, В. В. Петруняка, Н. И. Покудин,  
А. А. Кубатиев, А. Г. Чучалин

## АТФазная АКТИВНОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ: ВЛИЯНИЕ КАЛЬЦИТРИНА

Институт пульмонологии МЗ РФ, Москва; Институт биофизики РАН, Пущино; Цент-  
ральный институт усовершенствования врачей, Москва

### THE ATPase ACTIVITY OF ERYTHROCYTES IN PATIENTS WITH BRONCHIAL ASTHMA: THE ACTION OF CALCITRIN

I. A. Baranova, S. N. Orlov, V. V. Petrunyaka, N. I. Pokudin, A. A. Kubatiev, A. G. Chuchalin

#### summary

The significant decrease of  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$  and  $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$  activity was found at saponin-permeabilized erythrocytes in patients with with bronchial asthma. These changes were most expressed in infection-dependent variant of the disease, in which activities of both enzymes were different from normal by 40—60 %. The reduction of transport ATPase activities was also observed in erythrocytes of steroid-dependent patients. Parenteral administration of calcitriene in these patients caused the increase of activities of both enzymes.

#### резюме

В обработанных сапонином эритроцитах больных бронхиальной астмой выявлено достоверное снижение активности  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы и  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы. Эти изменения были наиболее выражены для инфекционно-зависимого варианта течения заболевания, при котором активность обоих ферментов отличалась от нормы на 40—60 %. Снижение активности транспортных АТФаз наблюдалось и у больных, постоянно принимающих глюкокортикоидные гормоны. Парентеральное введение кальцитрина этим пациентам вызывало увеличение активности обоих ферментов.

Молекулярные механизмы формирования гиперреактивности дыхательных путей при бронхиальной астме до сих пор не установлены. Наряду с более изученными аллергическими процессами в последние годы все большее внимание уделяется неиммунологическим механизмам развития заболевания и, в частности, изучению клеточных мембран и мембранозависимых клеточных реакций. Так, например, у больных бронхиальной астмой уже выявлены изменения ад-

ренергической регуляции и связанной с ней системы синтеза и деградации циклических нуклеотидов [10, 11, 17]; высказано предположение о нарушении обмена фосфоинозитидов [7]. Отмечено изменение кальциевого гомеостаза как на уровне клетки [18], так и на уровне всего организма (нарушения в системе кальцийрегулирующих гормонов) [8, 9]. В то же время практически ничего не известно о функциональном состоянии конкретных систем, поддерживающих



концентрацию кальция на физиологическом уровне, и в отношении одновалентных ионов. Изучение этих механизмов позволило бы объяснить механизм формирования патологических изменений, характерных для бронхиальной астмы, наметить пути и способы устранения выявленных нарушений.

Большие трудности в данном вопросе во многом связаны с отсутствием адекватной экспериментальной модели заболевания. Проводимые в настоящее время исследования ограничены опытами на полосках тканей дыхательных путей экспериментальных животных. В то же время многочисленные данные о генетической детерминированности заболевания (наследственная предрасположенность к гиперреактивности бронхов, данные исследования HLA-системы антигенов у больных с различными вариантами течения бронхиальной астмы и т. д.) [3, 14, 16, 19] позволяют предполагать, что биохимические маркеры, имеющие отношение к патогенезу заболевания, можно искать при исследовании функциональных особенностей клеток крови. Выбор эритроцита в нашем исследовании в качестве модели для изучения ионтранспортирующих систем был обусловлен простотой строения этой клетки (отсутствие ядра и органелл), относительной ее устойчивостью при хранении (что важно для проведения клинических экспериментов), а также возможностью исследования на примере этой клетки функционального состояния мембран при различных заболеваниях полигенной природы. Такой подход был успешно применен для исследования состояния ионтранспортирующих систем при другом заболевании полигенной природы — артериальной гипертензии [6]. Данные же об этих механизмах при бронхиальной астме весьма ограничены.

Ранее нами было установлено, что в эритроцитах больных бронхиальной астмой содержание натрия повышено на 10—20 %, что связано с 35—45 % увеличением входящего потока натрия, обусловленного  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $2\text{Cl}^-$ -котранспортом [2]. Было также отмечено, что скорость входа  $^{45}\text{Ca}$  в квин-2 нагруженные эритроциты больных снижена на 5—10 %. Достоверных отличий в концентрации свободного кальция не обнаружено [2]. В настоящей работе мы сообщаем данные об активности  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ - и  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаз в эритроцитах больных бронхиальной астмой — универсальных ферментов, встречающихся в большинстве эукариотических клеток, ответственных за формирование трансмембранных градиентов одновалентных ионов и кальция соответственно, а также о коррекции выявленных нарушений одним из препаратов, применяемых в лечении тяжелых больных этим заболеванием, — кальцитрином (свинным кальцитонином).

Обследовано 25 больных бронхиальной астмой с наиболее часто встречающимися вариантами течения заболевания: atopическим и инфекционно-зависимым (по классификации Г. Б. Федосеева,

1982 г.). Была особо выделена группа больных (16 человек) инфекционно-зависимым вариантом течения, постоянно принимающих глюкокортикоидные гормоны. Возрастной и половой состав контрольной группы (10 человек) соответствовал составу обследованных больных.

Кровь (3 мл) забирали из кубитальной вены утром натощак в пробирки, содержащие 200 мкл гепарина (1000 ЕД/мл), приготовленного на физиологическом растворе.

Активность транспортных АТФаз определяли в эритроцитах, обработанных сапонином. Исследованиями, проведенными ранее, установлено, что эта модель, позволяющая варьировать в широком диапазоне внутриклеточную концентрацию катионов (что необходимо для такого рода экспериментов), по набору эндогенных регуляторов, вовлеченных в транспорт ионов, по-видимому, наиболее приближена к интактной клетке [4, 5]. В этих же работах полно описан метод определения активности  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы и  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы. Зависимость активности  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы эритроцитов, обработанных сапонином, от концентрации свободного  $\text{Ca}^{2+}$  носит экстремальный характер с максимумом в области 0,5—1 мкМ. В этой связи в нашем исследовании активность  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы определяли в отсутствии экзогенного кальция ( $\text{Ca}^{2+} < 0,01$  мкМ) и при добавках кальция, соответствующих  $\text{Ca}^{2+} = 0,7$  и 5 мкМ. Для двух последних значений концентраций свободного кальция мы также определяли активность  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы.

Для изучения влияния кальцитрина (кальцитонина) на активность транспортных АТФаз у стероидозависимых больных бронхиальной астмой это обследование проводилось также через 1 час после внутримышечного введения препарата (в остром клиническом тесте) и через 1 неделю после начала курсового лечения (по 3 Ед через день).

В эритроцитах больных бронхиальной астмой существенно снижена активность обоих видов транспортных АТФаз (табл. 1). Эти различия наиболее выражены при инфекционно-зависимом варианте заболевания. Так, например, при  $\text{Ca}^{2+} = 0,7$  мкМ у этих больных активность  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы снижена на 60—70 и 40—50 % соответственно. Можно предположить, что снижение активности  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы, наряду с увеличением скорости  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -котранспорта, является основной причиной повышения концентрации внутриклеточного натрия, которое по результатам предыдущей работы также в большей мере выражено у больных с инфекционно-зависимым вариантом бронхиальной астмы [2]. Снижение активности  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы, по-видимому, компенсировано снижением скорости входа кальция в эритроциты, в результате чего внутриклеточная концентрация свободного кальция у больных бронхиальной астмой и контрольной



Таблица 1

Активность  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы и  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы (мкмоль Рi на л клеток в мин) в эритроцитах больных атопическим и инфекционно-зависимым вариантами бронхиальной астмы

| Группы обследованных          | n  | Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -АТФаза |                |                | Ca <sup>2+</sup> -АТФаза |                  |
|-------------------------------|----|------------------------------------------|----------------|----------------|--------------------------|------------------|
|                               |    | Концентрация кальция в мкМ               |                |                |                          |                  |
|                               |    | 0,01                                     | 0,7            | 5,0            | 0,7                      | 5,0              |
| Контроль                      | 10 | 60,83±5,29                               | 144,39±13,49   | 74,72±6,70     | 225,42±22,71             | 257,73±14,56     |
| Больные бронхиальной астмой:  |    |                                          |                |                |                          |                  |
| автопический вариант          | 9  | 55,13±8,96                               | 92,59±10,21*   | 60,08±8,86     | 171,40±8,89*             | 199,67±7,81**    |
| инфекционно-зависимый вариант | 10 | 30,06±2,17****                           | 53,60±2,21**** | 38,17±2,82**** | 127,22±16,74***          | 166,54±10,06**** |

Примечание. Показатели, отличающиеся от нормы: одна звездочка  $p < 0,05$ , две  $p < 0,01$ , три  $p < 0,005$ , четыре  $p < 0,001$ .

группы достоверно не различается [2].

Следует отметить, что приведенные здесь результаты получены в условиях насыщения  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы одновалентными катионами ( $\text{Na}^+ = \text{K}^+ \simeq 60$  мМ), т. е. отражают максимальную активность фермента. Судя по незначительному отличию активности  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы при двух выбранных концентрациях  $\text{Ca}^{2+}$  (0,7 и 5 мкМ), то же относится и к активности этого фермента. Не исключено, что в интактных эритроцитах ( $\text{Na}_i^+ \simeq 10$  мМ;  $\text{K}^+ \simeq 4$  мМ;  $\text{Ca}^{2+} \simeq 0,1$  мкМ) отличия в активности транспортных АТФаз не столь значительны.

В настоящее время мы не можем ответить на вопрос, являются ли зарегистрированные отличия активностей  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы и  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы в эритроцитах больных бронхиальной астмой наследственно детерминированными либо они — следствие развития патологического процесса. В пользу первой возможности указывает тот факт, что терапия воспалительного процесса стероидными гормонами не приводит к существенной коррекции активности транспортных АТФаз (сравни табл. 1 и 2). Ранее аналогичные результаты получены при исследовании других ионотранспортирующих систем эритроцитов больных брон-

хиальной астмой, находящихся на терапии глюкокортикоидными гормонами [2].

Генетическая детерминированность бронхиальной астмы позволяет высказать предположение, что нарушения, выявленные на мембране эритроцита, могут быть отмечены в клетках тех тканей, где экспрессируются мембранные белки, ответственные за реализацию соответствующих ионотранспортирующих функций. Снижение активности  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы, фермента обеспечивающего поддержание концентрации свободного  $\text{Ca}^{2+}$  в покое клетки на уровне  $10^{-7}$  М, может быть реальной предпосылкой для повышения внутриклеточной концентрации свободного кальция в этих клетках и явиться достаточным условием для их гиперреактивности. Снижение активности  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы может приводить к повышению внутриклеточной концентрации  $\text{Na}^+$  и деполяризации сарколеммы гладкомышечных клеток дыхательных путей [15, 20]. Кроме того,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФаза выполняет ключевую роль в регуляции трансцеллюлярного транспорта одновалентных ионов и воды в клетках эпителия воздухопроводящих путей [21].

Интерес к изучению воздействия терапии кальцитрином (кальцитонином) на активность фермен-

Таблица 2

Влияние кальцитрина на активность  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы и  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы (мкмоль Рi на литр клеток в мин) у стероидозависимых больных бронхиальной астмой ( $n=16$ )

| Группа обследованных       | Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -АТФаза |              |             | Ca <sup>2+</sup> -АТФаза |              |
|----------------------------|------------------------------------------|--------------|-------------|--------------------------|--------------|
|                            | Концентрация кальция в мкМ               |              |             |                          |              |
|                            | 0,01                                     | 0,7          | 5,0         | 0,7                      | 5,0          |
| До лечения                 | 49,30±3,17                               | 83,05±3,86   | 49,98±4,40  | 158,67±8,50              | 173,61±5,53  |
| В остром клиническом тесте | 49,26±4,35                               | 103,37±5,10* | 72,45±9,74  | 156,67±14,52             | 215,09±9,96* |
| При курсовом лечении       | 50,65±3,18                               | 100,72±6,33* | 73,33±6,80* | 159,91±7,13              | 215,57±9,32* |

Примечание. Звездочка — результаты, отличающиеся от показателей до лечения при  $p < 0,05$ .



тов, регулирующих внутриклеточную концентрацию одновалентных ионов и кальция, у больных бронхиальной астмой вызван результатами предыдущих лабораторных и клинических исследований. Показано, что препарат снижает степень гиперреактивности дыхательных путей, клинически продемонстрирована возможность на терапии кальцитрином в некоторых случаях сократить дозу глюкокортикоидных гормонов [1]. Известно также, что этот препарат, активно влияющий на гомеостаз кальция, вызывает улучшение показателей гормонов кальцийрегулирующей системы у больных с различными формами бронхиальной астмы [9].

Механизм действия кальцитонина на внутриклеточные процессы мало изучен. Сведения по этому вопросу в основном ограничены работами Borle et al. [12, 13]. В своих экспериментах на различных видах клеток он продемонстрировал, что кальцитонин уменьшает внутриклеточную концентрацию свободного кальция, а также снижает величину входящих и выходящих потоков этого иона. Ионтранспортирующие системы, вовлеченные в действие кальцитонина, полностью до сих пор не идентифицированы.

В нашем исследовании уже через час после введения кальцитрина наблюдалось увеличение активности  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы при  $\text{Ca}^{2+}=0,7$  мкМ и  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы при  $\text{Ca}^{2+}=5$  мкМ, а через неделю после начала терапии нормализующий эффект этого препарата достигал критерия достоверности (см. табл. 2). Полученные результаты позволяют заключить, что терапия кальцитрином у больных бронхиальной астмой не только воздействует на гормональную регуляцию кальциевого гомеостаза, но и влияет на регуляцию потоков одновалентных ионов и кальция через плазматическую мембрану, способствуя нормализации их внутриклеточного содержания.

Таким образом, в данной работе установлено, что в эритроцитах больных бронхиальной астмой снижена активность АТФаз, осуществляющих поддержание неравновесного распределения  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$ . Корректирующее влияние кальцитрина на активность транспортных АТФаз, отмеченное в этой работе, может быть одним из возможных механизмов терапевтического эффекта этого препарата у больных бронхиальной астмой.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Гervазиев Д. В. Роль изменений кальцийрегулирующей системы в формировании гиперреактивности бронхов у больных бронхиальной астмой: Автореф. дис. ... канд. мед. наук.— М., 1986.

2. Орлов С. Н., Баранова И. А., Покудин Н. И. и др. Транспорт одновалентных ионов и кальция в эритроцитах при бронхиальной астме // Вестн. АМН СССР.— 1991.— № 3.— С. 43—49.
3. Петрова М. А., Услонцев Б. М. // Новое в этиологии, патогенезе, клинике, лечении и профилактике бронхиальной астмы / Под ред. Г. Б. Федосеева.— Л., 1985.— С. 11—13.
4. Петруняк В. В., Панюшкина Е. А., Северина Е. П. Активизация и ингибирование  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы мембран эритроцитов эндогенными  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимыми регуляторами.  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимое действие убаина на  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазу // Биол. мембраны.— 1990.— № 4.— С. 352—358.
5. Петруняк В. В., Северина Е. П., Орлов С. Н. и др. Оценка роли эндогенных регуляторов в активации  $\text{Ca}$ -АТФазы мембран эритроцитов // Биохимия.— 1989.— № 6.— С. 974—979.
6. Постнов Ю. В., Орлов С. Н. Первичная гипертензия как патология клеточных мембран.— М., 1987.
7. Рябова К. Г. Альфа-адренергическая рецепция при бронхиальной астме: Автореф. дис. ... канд. мед. наук.— М., 1987.
8. Чучалин А. Г. Закономерности обмена кальция у человека при различных патологических процессах // Тер. арх.— 1987.— № 1.— С. 121—127.
9. Чучалин А. Г., Борова М. М. Функциональное состояние кальцийрегулирующей системы у больных бронхиальной астмой // Клин. мед.— 1989.— № 8.— С. 56—59.
10. Barnes P. J. Adrenergic-receptor of normal and asthmatic airways // Eur. J. Respir. Dis.— 1984.— Suppl. 135.— P. 72—79.
11. Barnes P. J., Dollery C. T., MacDermot J. Increased pulmonary  $\alpha$ -adrenergic and reduced  $\beta$ -adrenergic receptors in experimental asthma // Nature.— 1980.— Vol. 285.— P. 569.
12. Borle A. B. Calcitonin and the regulation of calcium transport and of cellular calcium metabolism // Triangle.— 1983.— Vol. 22, N 2—3.— P. 75—80.
13. Borle A. B. Regulation of cellular calcium metabolism and calcium transport by calcitonin // J. Membr. Biol.— 1975.— Vol. 21, N 1—2.— P. 125—146.
14. Bousquet J., Kjeééman N.-I. M. Predictive value of tests in childhood allergy // J. Allergy Clin. Immunol.— 1986.— Vol. 78, N 5.— Pt 1.— P. 1019—1022.
15. Coburn R. F., Baron C. B. Coupling mechanisms in airway smooth muscle // Am. J. Physiol.— 1990.— Vol. 258.— P. L. 119—L. 133.
16. Hopp R. J., Bewtra A. K., Biven R. et al. Bronchial Reactivity pattern nonasthmatic parents of asthmatics // Ann. Allergy.— 1988.— Vol. 61.— N 3.— P. 181—186.
17. Kunos J., Kunos J., Hirata F., Ishac E. J. N. Adrenergic receptors: Possible mechanisms of inverse regulation of  $\alpha$  and  $\beta$ -receptors // J. Allergy Clin. Immunol.— 1985.— Vol. 76, N 2.— Pt. 2.— P. 346—351.
18. Middleton E. Airway smooth muscle, asthma, and calcium ions // Ibid.— 1984.— Vol. 73, N 5.— Pt 2.— P. 643—650.
19. Michel F. B., Chanez P., Clauzel A. M. et al. Facteurs genetiques de l'asthme // Rev. Franc. Allergol.— 1989.— Vol. 29, N 2.— P. 81—87.
20. Raeburn D. Effects of altered availability of  $\text{Na}^+$  on guinea — pig airway smooth muscle contractility // Pulm. Pharmacol.— 1990.— Vol. 3, N 3.— P. 121—127.
21. Rechkemmer G. R. The molecular biology of chloride secretion on epithelia // Am. Rev. Respir. Dis.— 1988.— Vol. 136, N. 6.— Pt 2.— P. S7—S9.

Поступила 20.01.93