

коящейся клетке на уровне 10^{-7} М и ее восстановлению после возбуждения клетки [24]. Если описанные нарушения активности Ca^{2+} -АТФазы при бронхиальной астме не ограничены эритроцитами, а имеют характер широко распространенного дефекта, то это может быть достаточным условием для повышения концентрации свободного кальция в гладкомышечных клетках, макрофагах, лейкоцитах и вследствие этого их гиперреактивности.

Таким образом, выявленные нами на примере эритроцитов изменения содержания и транспорта одновалентных ионов и кальция могут принимать непосредственное участие в формировании гиперреактивности гладкомышечных клеток бронхов. Эти же нарушения могут приводить к активации клеток крови и альвеолярного лаважа (способствуя повышению выработки медиаторов бронхоспазма) и гиперсекреции слизи дыхательным эпителием.

ЛИТЕРАТУРА

- Петрова М. А., Услонцев Б. М. // Новое в этиологии, патогенезе, клинике, лечении и профилактике бронхиальной астмы. / Под ред. Г. Б. Федосеева. — Л., 1985.
- Петруняк В. В., Гончаренко М. С., Кондакова А. К., Мавров И. И. // Вопр. мед. химии. — 1989. — N 6. — С. 59—64.
- Петруняк В. В., Панюшкина Е. А., Северина Е. П. // Биол. мембраны. — 1990. — N 4. — С. 352—358.
- Петруняк В. В., Северина Е. П., Орлов С. Н. и др. // Биохимия. — 1989. — N 6. — С. 974—979.
- Покудин Н. И., Орлов С. Н. // Биол. мембраны. — 1986. — N 2. — С. 108—117.
- Постнов Ю. В., Орлов С. Н. Первичная гипертензия как патология клеточных мембран. — М., 1987.
- Ткачук В. А. Введение в молекулярную эндокринологию. — М., 1982.
- Чучалин А. Г. // Тер. арх. — 1987. — N 1. — С. 121—127.
- Эмирова А. С., Татарский А. Р., Чучалин А. Г. // Там же. — 1990. — N 3. — С. 100—102.
- Bai T. R. // Amer. Rev. resp. Dis. — 1990. — Vol. 141. — P. 552—557.
- Borke J. L., Eriksen E. F., Minami J. et al. // J. clin. Endocr. Metab. — 1988. — Vol. 67. — P. 1299—1304.
- Borke J. L., Minami J., Verma A. K. et al. // J. clin. Invest. — 1987. — Vol. 80. — P. 1225.
- Cole C. H., Maletz R. // Clin. Sci. — 1975. — Vol. 47. — P. 239—245.
- Frizzell A. // Amer. Rev. resp. Dis. — 1988. — Vol. 138. — P. 53—56.
- Hendricki H., Casteels R. // Pflügers Arch. — 1974. — Bd 343. — S. 299—308.
- Kaji D. M., Thakkar U., Kahn T. // J. clin. Invest. — 1981. — Vol. 68. — P. 422—430.
- Michel F. B., Chanez P., Clauzel A. M. et al. // Rev. franc. Allerg. — 1989. — Vol. 29. — P. 81—87.
- Middleton E. Jr. // J. Allergy. — 1985. — Vol. 76. — P. 341—346.
- Orlov S. N., Pokudin N. I., Kotelevtsev Yu. V., Gulak P. V. // J. Membr. Biol. — 1989. — Vol. 107. — P. 105—117.
- Reckemmer G. R. // Amer. Rev. resp. Dis. — 1988. — Vol. 138. — P. 57—59.
- Richardson J. B. // J. Allergy. — 1987. — Vol. 80. — P. 409—411.
- Sheppard D. // Chest. — Vol. 96. — P. 1165—1168.
- Small R. C., Foster R. W. // Amer. Rev. resp. Dis. — 1987. — Vol. 136. — P. 57—511.
- Thastrup O. // Agents Actions. — 1990. — Vol. 29. — P. 8—15.
- Toldi Z., Gyurkovits K. // Orv. Hetil. — 1986. — Vol. 127. — P. 2497—2499.

Поступила 09.01.91

ERYTHROCYTE CATION TRANSPORT IN BRONCHIAL ASTHMA

S. N. Orlov, I. A. Baranova

Summary

The content and ion-transporting systems of monovalent ions and calcium in patients with bronchial asthma were studied through an example of erythrocyte membrane. An increase of intracellular concentration of sodium associated with increased cellular influx of this ion (Na^+ , K^+ , 2Cl^- co-transport) and decreased eflux (Na^+ , K^+ -ATPase) has been revealed. Decreased activity of Ca^{2+} -ATPase — an enzyme sustaining physiological levels of intracellular calcium has been observed. Possible mechanisms of involvement of the above-mentioned abnormalities in bronchial asthma pathogenesis have been suggested.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 616.248-07:616.155.3-008.922.1

И. Г. Даниляк, А. Х. Коган, С. Болевич

ГЕНЕРАЦИЯ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА ЛЕЙКОЦИТАМИ КРОВИ У БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

Кафедра внутренних болезней № 2 1-го лечебного факультета (зав. — проф. А. В. Сумароков) и кафедра патофизиологии (зав. — проф. Н. И. Лосев) ММА им. И. М. Сеченова

Роль свободнорадикальных кислородных процессов в патологии привлекает внимание ученых во многих областях медицины [3, 6, 7]. Получены данные о свойстве активных форм кислорода (супероксидного анион-радикала O_2^- , синглетного кислорода $^1\text{O}_2$, гидроксильного радикала $\text{HO}^\cdot$, пе-

рекиси водорода H_2O_2), образуемых нейтрофилами и моноцитами (микро- и макрофагами), стимулировать секрецию тучными клетками гистамина [12] и свободнорадикальное окисление арахидоновой кислоты в нейтрофилах [14], что ведет к образованию лейкотриенов, вызывающих спазм

мелких бронхов. Доказано, что супероксид анион-радикал является медиатором воспаления [17]. Представленные данные послужили поводом для проводимых в последние годы исследований генерации активных форм кислорода лейкоцитами (ГАФКЛ) и альвеолярными макрофагами у больных бронхиальной астмой. S. Meltzer и др. [15] нашли у этих больных увеличение ГАФКЛ крови при стимуляции их N-формил-метионил-лейцил-фенилаланином. Clezel и др. [11] сообщили об увеличении у больных бронхиальной астмой генерации активных форм кислорода (АФК) альвеолярными макрофагами, получаемыми с помощью бронхоальвеолярного лаважа.

Аналогичное наблюдали P. Godard и др. [13], высказавшие предположение о зависимости продукции АФК периферической крови и неспецифической гиперреактивности бронхов. Авторы пришли к выводу о важной роли АФК в патогенезе бронхиальной астмы. Увеличение генерации АФК моноцитами крови у больных бронхиальной астмой обнаружила Е. Б. Величкова [1].

В противовес вышеприведенным данным P. Shult и др. [16] не выявили изменения ГАФКЛ при бронхиальной астме.

Малочисленность и противоречивость данных литературы о ГАФКЛ у больных бронхиальной астмой и важность этого вопроса в связи с возможным участием АФК в патогенезе бронхиальной астмы послужили поводом для настоящего исследования, целью которого было выявление особенностей ГАФКЛ крови у больных бронхиальной астмой.

Было обследовано 84 больных бронхиальной астмой (54 женщины и 30 мужчин в возрасте 17—69 лет), из них 58 больных не лечились глюкокортикоидными гормонами. У 37 больных была диагностирована atopическая форма болезни, у 6 — инфекционно-аллергическая, у 10 — аспириновая, у 5 — астма физических нагрузок и у 26 больных была стероидозависимая бронхиальная астма. Диагноз ставился на основании общепринятых критериев [5, 9, 10] в результате общеклинического, лабораторного, инструментального и аллергологического исследований. В качестве контрольной группы были обследованы 20 здоровых доноров.

Лейкоциты выделяли из венозной крови по следующей методике [2]. У больных утром натощак из локтевой вены забирают 10—12 мл крови в заранее приготовленную пробирку. Кровь отстаивают в течение 1,5 часов при температуре 4 °С. При этом кровь разделяется на три слоя: нижний — эритроциты, верхний — плазма, средний — тонкая белесоватая пленка (лейкоциты). Собирают тонкую пленку лейкоцитов и часть плазмы. Полученную суспензию центрифугируют при 1000 об/мин в течение 10 минут, затем плазму сливают. Осадок представляет собой лейкоцитарную массу.

При необходимости проводят осмоллизис эритроцитов. Для этого к лейкомассе прибавляют 6 мл дистиллированной воды с рН-7,35 и ресуспендируют клетки; не более чем через 10 секунд после добавления дистиллированной воды к суспензии приливают 2 мл 3,6 % раствора хлорида натрия с рН-7,35 для

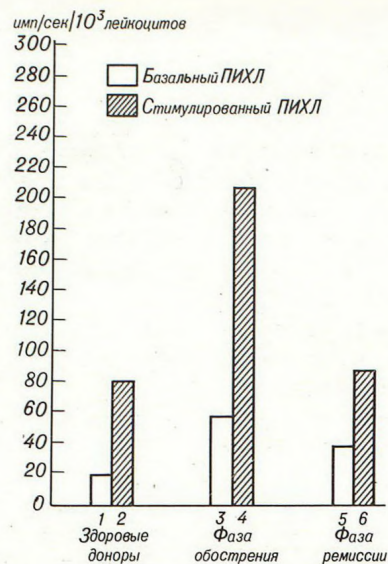


Рис. 1. Средние базальный и стимулированный ПИХЛ у здоровых доноров и у больных бронхиальной астмой в фазе обострения и ремиссии

Достоверность различия по группам:
 $p_{1-2} < 0,001$ $p_{2-4} < 0,001$ $p_{3-5} < 0,05$
 $p_{1-3} < 0,05$ $p_{2-6} > 0,05$ $p_{4-6} < 0,001$
 $p_{1-5} > 0,05$ $p_{3-4} < 0,001$ $p_{5-6} < 0,001$

прекращения осмоллизиса. Полученную взвесь центрифугируют при 1000 об/мин в течение 5 минут. Супернатант сливают. При необходимости осадок из лейкоцитарных клеток еще раз отмывают физиологическим раствором с рН-7,35.

Осадок из клеток ресуспендируют в 1 мл физиологического раствора с рН-7,35. Забирают 0,02 мл образовавшейся лейкоцитарной взвеси для дифференциального подсчета количества лейкоцитов. После подсчета клеток дополнительно разводят суспензию физиологическим раствором таким образом, чтобы в 1 мл находилось 2,5 млн. лейкоцитов. В гемоциметре помещали стандартный объем лейкомассы 0,2 мл со стандартным общим количеством лейкоцитов, равным 500 000.

ГАФКЛ крови исследовали методом люминоло-зависимой хемилюминесценции (ХЛ). В качестве гемоциметра использовали адаптированный радиометр «Роботрон» № 20046 (ГДР). Определяли уровень базальной (спонтанной) ХЛ стандартного объема лейкомассы 0,2 мл со стандартной концентрацией лейкоцитов 2500 лейкоцитов в 1 мкл после добавления 0,02 мл насыщенного изосолярного раствора люминола рН-7,35 и интенсивность их ХЛ-ответа на стимуляцию неспецифическим активатором 0,1 мл 1 % SiO_2 ($d=3$ микрона). Рассчитывали базальный и стимулированный показатели интенсивности ХЛ лейкоцитов (ПИХЛ) в имп/сек/10³ лейкоцитов за вычетом фонового свечения [2]. Лейкомасса состояла из всех видов лейкоцитов (гранулоциты, моноциты и лимфоциты). Способностью к ХЛ обладают гранулоциты и моноциты; лимфоциты в обычных условиях практически не хемилюминесцируют [8]. Поэтому при измерении ХЛ общей лейкомассы по существу определялась ХЛ гранулоцитов и моноцитов.

Исследования ГАФКЛ проводились в период

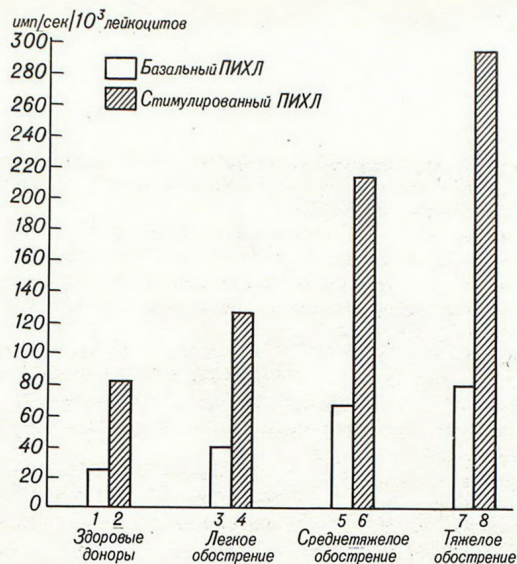


Рис. 2. Средние базальный и стимулированный ПИХЛ в зависимости от тяжести обострения бронхиальной астмы

Достоверность различия по группам:

$p_{1-2} < 0,001$	$p_{2-4} > 0,05$	$p_{3-5} > 0,05$	$p_{5-6} < 0,001$
$p_{1-3} > 0,05$	$p_{2-6} < 0,001$	$p_{3-7} > 0,05$	$p_{5-7} > 0,05$
$p_{1-5} < 0,001$	$p_{2-8} < 0,001$	$p_{4-6} < 0,05$	$p_{6-8} > 0,05$
$p_{1-7} > 0,05$	$p_{3-4} < 0,001$	$p_{4-8} < 0,001$	$p_{7-8} < 0,001$

обострения заболевания (80) и в фазе ремиссии (65), причем у 61 больного показатели исследовались в динамике.

Полученные данные обработаны методом вариационной статистики. Оценка достоверности результатов проводилась непараметрическим методом [4].

Результаты изучения базального и стимулированного ПИХЛ у здоровых доноров и у больных бронхиальной астмой представлены на рис. 1.

Во время обострения бронхиальной астмы, судя по изменению ХЛ лейкоцитов, увеличивается ГАФКЛ больных по сравнению со здоровыми донорами. При этом достоверно возрастают как базальный ПИХЛ (от $19,71 \pm 4,25$ у здоровых доно-

ров до $54,07 \pm 7,32$ у больных; $p < 0,001$), так и стимулированный (от $79,12 \pm 18,51$ у здоровых доноров до $204,53 \pm 22,39$ у больных; $p < 0,001$).

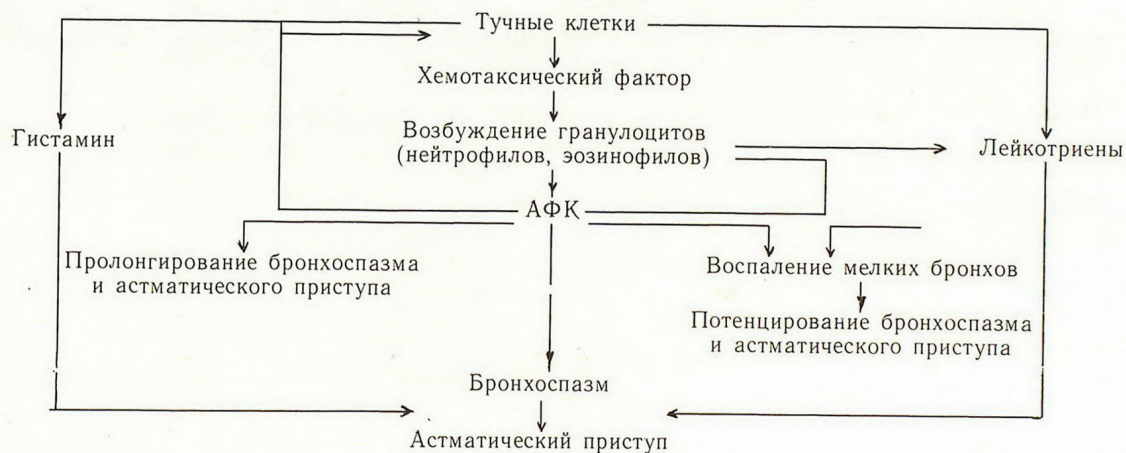
В период ремиссии, судя по динамике ПИХЛ, ГАФКЛ снижается и приближается к норме, однако не достигает ее. Обнаружено достоверное снижение базального ($33,26 \pm 6,70$; $p < 0,05$) и стимулированного ($85,43 \pm 12,12$; $p < 0,001$) ПИХЛ в фазе ремиссии по сравнению с фазой обострения бронхиальной астмы. Надо отметить, что оба показателя в фазе ремиссии остаются несколько выше, чем у здоровых доноров, но достоверного различия между ними нет ($p > 0,05$).

Изучая зависимость ГАФКЛ крови от формы болезни, можно заметить его увеличение у больных аспириновой астмой (базальный ПИХЛ $74,93 \pm 30,41$, стимулированный $224,18 \pm 53,36$) и атопической формой болезни (базальный ПИХЛ $43,06 \pm 7,52$, стимулированный $175,27 \pm 31,13$). У 6 больных инфекционно-аллергической астмой базальный ПИХЛ равнялся $63,11 \pm 28,57$, стимулированный $154,65 \pm 30,08$. Самые низкие цифры (базальный ПИХЛ $28,28 \pm 10,78$, стимулированный $128,74 \pm 74,96$) получены у 5 больных астмой физических нагрузок. Хотя полученные результаты исследования выявляют определенное отличие изученных показателей у больных аспириновой, атопической, инфекционно-аллергической астмой и астмой физических нагрузок, малочисленность групп не позволяет сделать достоверные выводы.

Зависимость ГАФКЛ крови от тяжести обострения бронхиальной астмы представлена на рис. 2 (все больные были со среднетяжелым течением заболевания).

У больных с легким обострением не обнаружена достоверная разница по сравнению со здоровыми донорами (базальный ПИХЛ $38,59 \pm 11,20$, стимулированный $123,66 \pm 21,94$; $p > 0,05$ и $p > 0,05$). У больных со среднетяжелым обострением заболевания достоверно увеличивается по сравнению со здоровыми донорами и базальный, и стимулированный ПИХЛ ($65,06 \pm 11,16$ и $210,65 \pm 31,04$ соот-

Место АФК в патогенезе бронхиальной астмы



ветственно; $p < 0,05$ и $p < 0,05$), а у больных с тяжелым обострением только стимулированный ПИХЛ (базальный ПИХЛ $79,21 \pm 36,67$, стимулированный $290,76 \pm 35,00$; $p > 0,05$ и $p < 0,001$). Более высокие цифры получены при среднетяжелом и тяжелом обострении. Так, у больных со среднетяжелым и тяжелым обострением заболевания по сравнению с легким обострением достоверно увеличивается стимулированный ПИХЛ ($p < 0,05$ и $p < 0,001$ соответственно).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о достоверном усилении свободнорадикальных кислородных реакций у больных бронхиальной астмой в фазе обострения, а также о зависимости этих процессов от формы и выраженности обострения болезни и о тенденции к их нормализации в фазе ремиссии. Все это говорит об определенной роли свободнорадикальных кислородных реакций в патогенезе бронхиальной астмы.

Литературные и отчасти собственные данные позволяют предположить следующую схему включения АФК в патогенез бронхиальной астмы (см. схему): тучные клетки выделяют хемотаксический фактор, стимулирующий нейтрофилы и эозинофилы, вследствие чего они усиленно генерируют АФК, которые, с одной стороны, потенцируют бронхоспазм и астматический приступ, а с другой — вызывают воспаление мелких бронхов и впоследствии пролонгирование бронхоспазма и астматического приступа. Кроме того, АФК усиливают продукцию гистамина тучными клетками, который, как хорошо известно, вызывает бронхоспазм. Дискуссионным является вопрос, могут ли сами АФК вызывать бронхоспазм.

В заключение следует сказать, что полученные результаты исследования позволяют предположить определенный вклад ГАФКЛ в патогенез бронхиальной астмы и особенно ее приступов, обосновывают целесообразность включения «ловушек» и ингибиторов кислородных свободных радикалов и интермедиатов в комплексную терапию бронхиальной астмы.

Таким образом, у больных бронхиальной астмой в период обострения заболевания происходит достоверное увеличение ГАФКЛ крови. Интенсивность нарастания ГАФКЛ крови зависит от выраженности обострения. В фазе ремиссии ГАФКЛ крови снижается и приближается к норме.

ЛИТЕРАТУРА

1. Величковская Е. Б. Диагностическое значение исследований хемилюминесценции моноцитов при atopической бронхиальной астме: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — М., 1986.
2. Генес В. С. Некоторые простые методы кибернетической обработки данных диагностических и физиологических исследований. — М., 1967.
3. Даниляк И. Г. Современная фармакотерапия больных бронхиальной астмой: Дис. ... д-ра мед. наук. — М., 1983.
4. Коган А. Х., Кудрин А. Н., Лосев Н. И. // Теоретические и методические основы биохемилюминесценции. — М., 1986. — С. 104—107.
5. Коган А. Х., Лосев Н. И., Кудрин А. Н., Миезмгобын А. // Бюл. экспер. биол. — 1986. — № 5. — С. 538—539.
6. Коган А. Х., Погромов А. П., Лашкевич А. В., Аль-Хадиди М. // Свободные радикалы и биостимуляторы. — София, 1987. — С. 73.
7. Коган А. Х., Лосев Н. И., Цыпин А. Б., Мануйлов Б. М. // Бюл. экспер. биол. — 1989. — № 6. — С. 688—690.
8. Смирнов А. Н. // Руководство по гематологии. — М., 1985. — Т. 1. — С. 78—83.
9. Федосеев Г. Б., Хлопотова Г. П. Бронхиальная астма. — Л.: Медицина, 1988.
10. Чучалин А. Г. Бронхиальная астма. — М.: Медицина, 1985.
11. Cluzel et al. // J. Allergy. — 1986. — Vol. 77, N 1. — P.
12. Godard P. H., Damon M., Cluzel M., Bousquet J. // Allerg. Immunol. — 1987. — N 8, Suppl. — P. 15—18.
13. Mannaioni P. F., Gianella E., Palmerani B., Gammoassi F. // Agents Actions. — 1988. — Vol. 23, N 3—4. — P. 129—142.
15. Schult P., Lega M., Jadidi S. et al. // Ibid. — 1988. — Vol. — P. 429—437.
16. Simovic, Dinic, Savic, Jovic. // Vojnosanit. pregl. — 1988. — Vol. 45, N 4. — P. 279—287.
17. Wasserman S. I. // Environm. Hlth Perspect. — 1980. — Vol. 35. — P. 153—164.

Поступила 19.12.90

GENERATION OF ACTIVE OXYGEN FORMS BY BLOOD LEUCOCYTES IN BRONCHIAL ASTHMA PATIENTS

I. G. Danilyak, A. K. Kogan, S. Bolevitch

Summary

Generation of active oxygen forms by blood leucocytes (GAOFL) was studied in 84 bronchial asthma patients and 20 normal donors. Baseline value of chemoluminescence (CL) and stimulated CL value were determined with the method of luminol-dependent CL. Both CL values were increasing in bronchial asthma patients during exacerbation in comparison to normal donors. Both CL values were decreasing and approached normal ones in remission. CL values were higher in aspirin-induced bronchial asthma than in atopical and exercise-induced asthma. CL values were significantly higher in moderate and severe exacerbations than in mild ones. The findings above argue, to a certain extent, for the participation of active oxygen forms in bronchial asthma pathogenesis.